

Technische Universität München

Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere

**Regulierte lentivirale Expression von Wachstumsfaktoren in  
Primärzellen zur Therapie osteochondraler Defekte**

Daniela Hirsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. M. Schemann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. A. Schnieke, Ph.D.

2. apl. Prof. Dr. J. Graw

Die Dissertation wurde am 07.06.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.11.2011 angenommen.

---

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ZUSAMMENFASSUNG.....                                                                           | 1  |
| ABSTRACT .....                                                                                 | 2  |
| 1 EINLEITUNG .....                                                                             | 3  |
| 1.1 Knorpel.....                                                                               | 3  |
| 1.1.1 Knorpelaufbau.....                                                                       | 3  |
| 1.1.2 Knorpelschäden.....                                                                      | 4  |
| 1.1.3 Konventionelle Therapie von Knorpeldefekten .....                                        | 5  |
| 1.1.3.1 Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) .....                                       | 5  |
| 1.1.3.2 Mikrofrakturierung .....                                                               | 6  |
| 1.2 Stammzellen.....                                                                           | 7  |
| 1.2.1 Embryonale und adulte Stammzellen .....                                                  | 8  |
| 1.2.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs) .....                                                    | 8  |
| 1.3 Gentherapie .....                                                                          | 10 |
| 1.3.1 Somatische Gentherapie und Keimbahntherapie.....                                         | 10 |
| 1.3.2 Vektoren zur Gentherapie.....                                                            | 11 |
| 1.4 Lentiviraler Gentransfer.....                                                              | 12 |
| 1.4.1 Aufbau von Lentiviren .....                                                              | 12 |
| 1.4.1.1 Viruspartikel.....                                                                     | 13 |
| 1.4.1.2 Das lentivirale Genom.....                                                             | 13 |
| 1.4.1.3 Der lentivirale Replikationszyklus .....                                               | 15 |
| 1.4.2 Pseudotypisierte, selbstinaktivierende lentivirale Vektoren der dritten Generation ..... | 17 |
| 1.5 Wachstumsfaktoren zur Knorpelregeneration .....                                            | 19 |
| 1.5.1 <i>Bone morphogenic protein 2 (BMP-2)</i> .....                                          | 20 |
| 1.5.1.1 Molekulare Charakterisierung .....                                                     | 20 |
| 1.5.1.2 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten .....                                              | 22 |
| 1.5.2 <i>Wnt1-induced secreted protein 3 (WISP-3)</i> .....                                    | 22 |
| 1.6 Regulierte Genexpression durch das Tet on – System .....                                   | 23 |

---

|        |                                                           |    |
|--------|-----------------------------------------------------------|----|
| 1.7    | Aufgabenstellung .....                                    | 25 |
| 2      | MATERIAL .....                                            | 27 |
| 2.1    | Chemikalien.....                                          | 27 |
| 2.2    | Biochemische Reagenzien.....                              | 27 |
| 2.3    | Kits.....                                                 | 28 |
| 2.4    | Medien und Lösungen .....                                 | 29 |
| 2.5    | Enzyme.....                                               | 31 |
| 2.6    | Plasmide.....                                             | 31 |
| 2.6.1  | Verpackungsplasmide .....                                 | 31 |
| 2.6.2  | Transferplasmide.....                                     | 31 |
| 2.7    | Bakterienstämme.....                                      | 32 |
| 2.8    | Zelllinien und Primärzellen .....                         | 32 |
| 2.8.1  | 293T.....                                                 | 32 |
| 2.8.2  | CMS5 .....                                                | 32 |
| 2.8.3  | ATDC5.....                                                | 32 |
| 2.8.4  | Primäre Chondrozyten .....                                | 33 |
| 2.8.5  | Mesenchymale Stammzellen .....                            | 33 |
| 2.9    | Zellkulturmedien und Zusätze .....                        | 33 |
| 2.10   | Verbrauchsmaterial .....                                  | 34 |
| 2.11   | Geräte .....                                              | 34 |
| 2.12   | Weitere Software.....                                     | 35 |
| 2.12.1 | Microsoft Excel.....                                      | 35 |
| 2.12.2 | Vector NTI.....                                           | 35 |
| 3      | METHODEN.....                                             | 36 |
| 3.1    | Allgemeine molekularbiologische Methoden.....             | 36 |
| 3.1.1  | RNA-Isolation aus adhärennten Zellen und Fibrinclots..... | 36 |
| 3.1.2  | Reverse Transkription von RNA in cDNA.....                | 37 |

---

|         |                                                                       |    |
|---------|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.3   | Präparation von Gesamt-DNA aus humanen Chondrozyten .....             | 37 |
| 3.1.4   | Amplifikation von Nukleinsäure-Fragmenten durch PCR.....              | 37 |
| 3.1.4.1 | Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung.....              | 37 |
| 3.1.4.2 | Nachweis der HI-Virusfreiheit.....                                    | 38 |
| 3.1.4.3 | WISP-3 Expressionsanalyse durch RT-PCR.....                           | 39 |
| 3.1.5   | Modifikation von Nukleinsäuren.....                                   | 40 |
| 3.1.5.1 | Restriktionsverdau von Plasmiden .....                                | 40 |
| 3.1.5.2 | Auffüllen von überhängenden Enden mit Klenow.....                     | 40 |
| 3.1.5.3 | Elution von DNA aus einem präparativen Agarosegel.....                | 41 |
| 3.1.5.4 | Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....                           | 41 |
| 3.1.5.5 | Ligation von DNA-Fragmenten.....                                      | 41 |
| 3.1.6   | Analyse von Nukleinsäuren .....                                       | 42 |
| 3.1.6.1 | Agarosegelelektrophorese.....                                         | 42 |
| 3.1.6.2 | Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....        | 42 |
| 3.1.7   | Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....              | 42 |
| 3.1.8   | Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im kleinen Maßstab.....     | 43 |
| 3.1.9   | Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im großen Maßstab .....     | 43 |
| 3.2     | Zellkulturmethoden .....                                              | 43 |
| 3.2.1   | Isolation von primäre Chondrozyten .....                              | 44 |
| 3.2.2   | Isolation von mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens.....           | 44 |
| 3.2.3   | Kultur von Zelllinien und Primärzellen .....                          | 44 |
| 3.2.3.1 | Aussaat einer bestimmten Zellzahl.....                                | 45 |
| 3.2.3.2 | Einfrieren von Zellen.....                                            | 46 |
| 3.2.3.3 | Auftauen von Zellen.....                                              | 46 |
| 3.2.3.4 | Kultur in Fibrinclots.....                                            | 47 |
| 3.2.4   | Lentivirus-Produktion durch Kotransfektion in 293T-Zellen.....        | 47 |
| 3.2.5   | Lentivirale Infektion von Zelllinien und Primärzellen.....            | 48 |
| 3.2.6   | Induktion des Tet on – Systems durch Doxyzyklin .....                 | 48 |
| 3.2.7   | Differenzierungsassays.....                                           | 48 |
| 3.2.8   | Implantation <i>ex vivo</i> transduzierter Kaninchenchondrozyten..... | 49 |

---

|         |                                                                                                                          |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3     | Methoden zur Analyse .....                                                                                               | 50 |
| 3.3.1   | Quantifizierung der Genexpression durch quantitative Real-time RT-PCR .....                                              | 50 |
| 3.3.2   | DNA-Quantifikation durch PicoGreen Assay .....                                                                           | 51 |
| 3.3.3   | Durchlicht - und Fluoreszenzmikroskopie .....                                                                            | 51 |
| 3.3.4   | Durchflusszytometrische Analyse der eGFP Expression .....                                                                | 52 |
| 3.3.5   | Quantifikation der BMP-2 Expression durch BMP-2 ELISA .....                                                              | 52 |
| 3.3.6   | Detektion von Proteoglykanen durch Alzianblau-Färbung .....                                                              | 53 |
| 3.3.7   | Untersuchung des Differenzierungspotentials von IMSCs durch<br>Differenzierungsassays .....                              | 53 |
| 3.3.7.1 | Osteogeneseauswertung .....                                                                                              | 53 |
| 3.3.7.2 | Chondrogeneseauswertung .....                                                                                            | 53 |
| 3.3.8   | Histologische Analyse des Reparaturgewebes .....                                                                         | 54 |
| 3.4     | Statistische Auswertung .....                                                                                            | 54 |
| 4       | ERGEBNISSE .....                                                                                                         | 55 |
| 4.1     | Klonierung von Vektoren zur lentiviralen Expression gewünschter Transgene .....                                          | 55 |
| 4.1.1   | Vektoren zur regulierten Expression des Reportergens eGFP .....                                                          | 56 |
| 4.1.2   | Vektoren zur regulierten und konstitutiven Expression des therapeutischen<br>Transgens BMP-2 .....                       | 56 |
| 4.1.3   | Vektoren zur regulierten und konstitutiven Expression von WISP-3 .....                                                   | 57 |
| 4.1.4   | Vektoren zur Expression des Transaktivators .....                                                                        | 57 |
| 4.2     | Optimierung der Transduktionseffizienz mesenchymaler Stammzellen des Kaninchens<br>gegenüber lentiviraler Vektoren ..... | 58 |
| 4.3     | Analyse und Optimierung von lentiviral-vermittelter, Doxyzyklin-induzierter Genexpression<br><i>in vitro</i> .....       | 59 |
| 4.3.1   | Tet-regulierte eGFP – Expression <i>in vitro</i> .....                                                                   | 60 |
| 4.3.2   | Tet-regulierte BMP-2 Expression <i>in vitro</i> .....                                                                    | 65 |
| 4.3.2.1 | Kinetik der Doxyzyklin-induzierten BMP-2 Expression .....                                                                | 69 |
| 4.3.2.2 | Wiederholte Induktion der doxyzyklin-abhängigen BMP-2 Expression .....                                                   | 70 |
| 4.3.2.3 | Analyse BMP-2 induzierter <i>downstream</i> Prozesse <i>in vitro</i> .....                                               | 72 |

---

|         |                                                                                                                     |     |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.3   | Tet-regulierte WISP-3 Expression <i>in vitro</i> .....                                                              | 75  |
| 4.3.3.1 | RT-PCR.....                                                                                                         | 75  |
| 4.3.4   | Differenzierungspotential infizierter IMSCs .....                                                                   | 76  |
| 4.3.4.1 | Osteogenese .....                                                                                                   | 76  |
| 4.3.4.2 | Chondrogenese.....                                                                                                  | 78  |
| 4.4     | Tet-regulierte Genexpression <i>in vivo</i> .....                                                                   | 78  |
| 4.4.1   | <i>In vitro</i> Analyse infizierter Zellen in Monolayer .....                                                       | 80  |
| 4.4.1.1 | eGFP Expression.....                                                                                                | 80  |
| 4.4.1.2 | BMP-2 Expression .....                                                                                              | 81  |
| 4.4.2   | <i>In vitro</i> Analyse infizierter Zellen in Fibrinclots .....                                                     | 82  |
| 4.4.2.1 | eGFP Expression.....                                                                                                | 82  |
| 4.4.2.2 | BMP-2 Expression .....                                                                                              | 82  |
| 4.4.2.3 | Proteoglykansynthese durch BMP-2 exprimierende Zellen in <i>in vitro</i> Clots .....                                | 83  |
| 4.4.3   | Analyse des regenerierten Gewebes.....                                                                              | 84  |
| 4.4.3.1 | BMP-2 Expression .....                                                                                              | 84  |
| 4.4.3.2 | Histologische Analyse des Reparaturgewebes im osteochondralen Defekt .....                                          | 85  |
| 5       | DISKUSSION .....                                                                                                    | 87  |
| 5.1     | Therapie von Knorpeldefekten .....                                                                                  | 87  |
| 5.2     | Lentivirus-vermittelte regulierte Expression von Transgenen in chondrogenen Zellen.....                             | 88  |
| 5.2.1   | Regulierte BMP-2 Expression in autologen Chondrozyten zur Therapie von Knorpeldefekten.....                         | 91  |
| 5.2.2   | Regulierte Expression von Wachstumsfaktoren in mesenchymalen Stammzellen zur Therapie osteochondraler Defekte ..... | 96  |
| 5.2.3   | Erhöhte Sicherheit durch lentivirale SIN-Vektoren .....                                                             | 99  |
| 5.3     | Ausblick .....                                                                                                      | 100 |
|         | ABKÜRZUNGEN.....                                                                                                    | 102 |
|         | ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....                                                                                         | 106 |
|         | TABELLENVERZEICHNIS .....                                                                                           | 109 |
|         | ANHANG .....                                                                                                        | 110 |
|         | DANKSAGUNG .....                                                                                                    | 121 |

LITERATURVERZEICHNIS ..... 122

## ZUSAMMENFASSUNG

Chondrale und osteochondrale Erkrankungen stellen aufgrund der geringen Selbstheilungskapazität des Knorpelgewebes bis heute eine therapeutische Herausforderung dar. Gen- und zelltherapeutische Verfahren bei denen autologe, *ex vivo* transduzierte Zellen bestimmte Wachstumsfaktoren überexprimieren erscheinen vielversprechend.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in diesem Zusammenhang die Doxyzyklin - regulierte Expression von therapeutischen Transgenen in chondrogenen Zellen durch VSV.G pseudotypisierte SIN-Lentiviren charakterisiert. Der Schwerpunkt lag auf der Infektion von primären Kaninchenchondrozyten und mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens (IMSC). Neben dem Wachstumsfaktor *bone morphogenic protein 2* (BMP-2) dessen positiver Einfluss auf die Knorpelheilung bereits häufig beschrieben wurde, erfolgte die Überexpression des therapeutischen *Wnt-induced secreted protein 3* (WISP-3) Gens mit dem Ziel der Verbesserung der Qualität des regenerierten Gewebes.

Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation, d.h. die Induktion sowie das Abschalten, der lentiviralen BMP-2 Expression unter Kontrolle des Doxyzyklin-induzierbaren Tet on - Systems in Kaninchenchondrozyten sowohl *in vitro* – auf eine maximale BMP-2 Sekretion von 16 ng BMP-2/ml - als auch *in vivo* (26,5 fache Induktion) im osteochondralen Defektmodell im Kaninchen möglich ist.

Wiederholtes An- und Abschalten der Transgenexpression sowie das Aufrechterhalten der Expression über einen therapeutisch relevanten Zeitraum konnte außerdem *in vitro* gezeigt werden.

Zudem konnte die Übertragbarkeit der lentiviralen, tet-vermittelten BMP-2 Expression auf humane Chondrozyten bestätigt werden.

Auch in IMSCs erfolgte *in vitro* eine 112-fache Induktion der BMP-2 Expression nach lentiviraler Transduktion des Ein – Vektor – Konstrukts.

Sowohl in Chondrozyten als auch in IMSCs war die Menge an produziertem BMP-2 ausreichend, um Funktionalität – messbar durch Aktivierung der Proteoglykan- bzw. Kollagen Typ II-Synthese - zu erreichen.

Des Weiteren konnte auch das WISP-3 Transgen, das durch Induktion der Expression von knorpelspezifischem Kollagen Typ II zur Verbesserung der Knorpelqualität beitragen soll, in IMSCs reguliert exprimiert werden.

Die lentivirale Infektion der IMSCs, unabhängig vom Transgen, hatte dabei keinen hemmenden Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen osteogen oder chondrogen differenzieren zu können.

Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint die gentechnische Anwendung des Tet on – Systems zur regulierten lentiviralen Expression therapeutischer Transgene in verschiedenen Zelltypen welche in der Knorpelheilung involviert sind als erfolgversprechend zur Behandlung von Knorpeldefekten.

**ABSTRACT**

Chondral and osteochondral defects are still a therapeutic challenge due to the poor self-healing capacity of cartilage tissue. Gene and cell therapeutic approaches based on autologous, *ex vivo* transduced cells expressing specific growth factors are promising.

Thus, the aim of this study was to characterize the doxycycline-regulated expression of therapeutic transgenes in chondrogenic cells by VSV.G pseudotyped lentiviral SIN vectors. The main focus was the infection of primary rabbit chondrocytes and rabbit mesenchymal stem cells (IMSC). In addition to growth factor bone morphogenic protein 2 (BMP-2) whose positive effect on cartilage healing has often been described, overexpression of therapeutic Wnt-induced secreted protein 3 (WISP-3) gene was performed aiming at an improvement of quality of regenerated tissue.

In this study, regulation, i.e. induction as well as shut-off, of lentiviral BMP-2 expression under control of the doxycycline-inducible Tet on – System in rabbit chondrocytes *in vitro* – to a maximal BMP-2 secretion of 16 ng BMP-2/ ml, as well as *in vivo* (26,5-fold induction) in a rabbit model for osteochondral defects were demonstrated. Furthermore, repeated induction and shut-off of transgene expression and maintenance of expression over a therapeutic relevant time-span were shown.

Additionally, feasibility of lentiviral, tet-dependent BMP-2 expression in human chondrocytes was confirmed.

In IMSCs a 112-fold induction of BMP-2 expression after lentiviral transduction of the one – vector – construct was obtained *in vitro*.

The amount of BMP-2 produced in chondrocytes as well as in IMSCs was sufficient to achieve functionality as demonstrated by induction of proteoglycan or collagen type II synthesis.

In addition, the application of the lentiviral Tet on – System allows for regulated expression of WISP-3 transgene in IMSCs that is supposed to contribute to an improvement of cartilage quality by inducing the expression of cartilage specific collagen type II.

Lentiviral infection of IMSCs did not inhibit the cells potency to undergo osteogenesis or chondrogenesis.

Thus, based on these results, gene therapeutic application of the lentiviral Tet on – System in a variety of cell types involved in cartilage repair appears promising for treatment of cartilage defects.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Knorpel

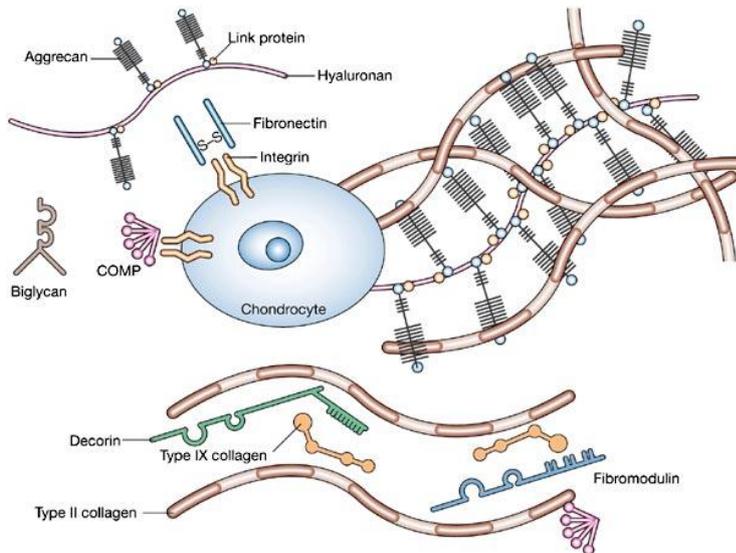
Knorpel ist ein essentieller Bestandteil eines jeden Gelenks. Er ist eine spezielle Art des Bindegewebes und ermöglicht in dünnen Schichten glatte, reibungsarme Gelenkbewegungen. Darüber hinaus sorgt er für bestmögliche Verteilung von Belastungen auf das gesamte Gelenk. Charakteristisch ist die hohe Beständigkeit des Knorpelgewebes sowie seine Elastizität und Flexibilität wodurch einwirkende mechanische Kräfte zu keinen dauerhaften Verformungen des Knorpels führen [1-3]. Bedingt sind diese Eigenschaften durch die molekulare Zusammensetzung des Knorpels.

### 1.1.1 Knorpelaufbau

Während der Embryogenese entsteht artikulärer Knorpel durch Kondensation mesenchymaler Stammzellen und darauffolgender Differenzierung zu Knorpelzellen, sog. Chondrozyten [4]. Die Chondrozyten bilden anschließend eine extrazelluläre Matrix in die sie mit einer sehr geringen Dichte von 15000 Zellen pro  $\text{mm}^3$  eingebettet sind [5]. Dieser zelluläre Anteil beträgt in etwa 5% des Gewebevolumentums [4, 6].

Die Extrazellulärmatrix ist reich an Kollagenen und Proteoglykanen (Abbildung 1-1). 40-50% der Extrazellulärmatrix sind Kollagene, wovon 90% Typ II Kollagen ist. Aber auch Kollagen VI, IX und XI ist vorhanden. In tieferen hypertrophischen Regionen wird außerdem Kollagen Typ X exprimiert. Proteoglykane haben einen Anteil von circa 25% an der Extrazellulärmatrix, davon sind circa 50% Aggrekan [4].

Die Chondrozyten interagieren mit der Extrazellulärmatrix über eine spezielle perizelluläre Matrix, welche reich an Typ VI Kollagen ist. Neben der Zell-Matrix Interaktion dient die perizelluläre Matrix zusätzlich zum Schutz der Chondrozyten vor auf den Knorpel einwirkende Kräfte [4].



**Abbildung 1-1: Molekularer Knorpelaufbau**

Knorpel setzt sich zusammen aus einer dichten extrazellulären Matrix in die eine geringe Zahl Chondrozyten eingebettet ist. Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix sind Kollagenfasern, vor allem Typ II Kollagene und Proteoglykane. Zu den wichtigsten Proteoglykanen zählen u.a. Aggrecane, Hyaluronsäure, Bindeproteine und Glykosaminoglykane [7].

Knorpel ist ein avaskuläres, aneurales und alymphatisches Gewebe [4]. Aufgrund der fehlenden Gefäße erfolgt die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff durch Diffusion. Um eine ausreichende Versorgung zu gewährleisten ist die Dicke von humanem Knorpel auf 7-8 mm limitiert. Verstärkt wird die Diffusion durch eine Art Pumpmechanismus, der durch Gelenkbewegungen und die damit verbundenen zyklischen Belastungen entsteht [6].

Der Informationsaustausch zwischen den vereinzelt Zellen, zwischen denen kein direkter Kontakt besteht, ist an die geringe Stoffwechselrate angepasst und erfolgt daher neben diffundierenden, humoralen Faktoren durch mechanische Belastung [6].

### 1.1.2 Knorpelschäden

Knorpelschäden treten oft in Erscheinung im Zusammenhang mit Erkrankungen wie Rheuma oder Arthrose, aber auch bei circa 150 weiteren muskuloskeletalen Erkrankungen [8].

Derartige Schäden können sowohl als Folge von akuten Verletzungen als auch durch chronische, entzündliche Erkrankungen auftreten.

Häufig bleiben Knorpelschäden, aufgrund der Symptomlosigkeit, über längere Zeiträume hinweg unbemerkt. Symptomatische Defekte führen jedoch zu Schmerzen und Morbidität. Zudem konnte gezeigt werden, dass Knorpelläsionen das Arthroserisiko um ein Fünffaches erhöhen [6, 9].

Knorpel ist ein Gewebe mit einer geringen Selbstheilungskapazität [10, 11]. Bedingt ist diese Tatsache durch verschiedene Charakteristika des Knorpelgewebes. Der geringe Informations- und

Stoffaustausch im Knorpelgewebe, bedingt durch die isolierte Lage der Chondrozyten, führt dazu, dass die Zellen von auftretenden Knorpelschäden kaum in Kenntnis gesetzt werden können. Des Weiteren können die Chondrozyten die dichte Extrazellulärmatrix nicht verlassen um Knorpeldefekte zu füllen und haben nicht die Möglichkeit, zum Zwecke der Geweberegeneration, ihre Stoffwechselrate zu erhöhen [6]. Aufgrund dieser Tatsachen wird vermehrt nach Methoden gesucht, die Knorpelregeneration zu verbessern.

### **1.1.3 Konventionelle Therapie von Knorpeldefekten**

Erste Ansätze, Knorpel *in situ* zu therapieren gehen auf das Jahr 1959 zurück. Dabei wurden im defektnahen, subchondralen Knochenmarkraum kleine Löcher gebohrt um das Einwandern von Knochenmarkzellen zur Knorpelläsion zu verbessern [6].

Diese sog. Pridie-Technik wurde später zur Technik der Mikrofrakturierung, welche mit einer geringeren Perforationsgröße auskommt, weiterentwickelt. Mikrofrakturierung ist heute eine gut etablierte und häufig angewendete Methode zu Therapie von Knorpeldefekten [6].

Eine weitere Methode ist die autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT). Die Wahl der Methode ist nicht entscheidend für die Qualität des regenerierten Gewebes. Sowohl Mikrofrakturierung als auch autologe Chondrozyten-Transplantation führen bei 77 % der Patienten zu zufriedenstellenden Ergebnissen [6, 12].

Das entstehende Reparaturgewebe besteht jedoch häufig aus weichem Faserknorpel und weist daher veränderte mechanische und chemische Eigenschaften auf als nativer hyaliner Knorpel. Häufig sind daher in Langzeitstudien ähnliche degenerative Veränderungen zu beobachten wie sie auch ohne Behandlung auftreten [13, 14].

#### **1.1.3.1 Autologe Chondrozytentransplantation (ACT)**

Autologe Chondrozyten-Transplantation wurde das erste Mal 1994 zur zellbasierten Therapie von Knorpeldefekten angewandt. Diese Methode ist eine Kombination aus der Implantation *ex vivo* expandierter artikulärer Chondrozyten in einem ersten Schritt und dem anschließenden Fixieren der Zellen durch einen autologen Knochenhautlappen [15] (Abbildung 1-2).



**Abbildung 1-2: Vorgehensweise zur autologen Chondrozyten-Transplantation**

In einem ersten Schritt werden gesunde, autologe Chondrozyten entnommen. Sie werden *in vitro* kultiviert und expandiert und in einem zweiten Schritt in den Defekt reimplantiert und durch einen Knochenhautlappen im Defekt fixiert [1] [www.yorkshirekneeclinic.co.uk].

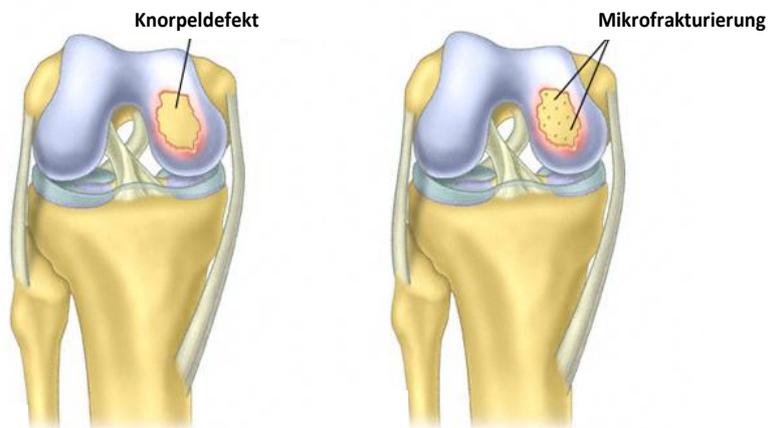
Der Knochenhautlappen wird so angebracht, dass er den Defekt abdeckt. Die expandierten, autologen Chondrozyten werden in Suspension unterhalb des implantierten Knochenhautlappens injiziert. Sie produzieren neue extrazelluläre Matrix und führen somit zur Regeneration des Knorpels. Diese Methode ist jedoch mit Nachteilen behaftet. Bei der Entnahme der Chondrozyten entsteht ein zusätzlicher Knorpeldefekt. Außerdem werden für das Auffüllen des Defekts eine große Zahl an Zellen benötigt, wodurch es notwendig ist, die entnommenen Zellen zu expandieren. Dabei besteht die Gefahr, dass Chondrozyten zu einem Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp dedifferenzieren, wodurch die Fähigkeit ektopisch Knorpel herstellen zu können, zerstört werden kann. Häufig besteht das regenerierte Gewebe in Folge dessen aus weichem, faserigen anstelle von beständigem, hyalinen Knorpel [6, 16].

Verbesserte Ergebnisse sind jedoch zu erwarten, wenn zusätzlich zur Chondrozyten-Transplantation ein Trägermaterial, wie z. B. Kollagen [17-19], Hyaluronan [20] oder Polylactid [21] zum Einsatz kommt [4]. Die Matrix erleichtert das Ansiedeln der Chondrozyten im Defekt zu Beginn des Heilungsprozesses und wird nach und nach abgebaut. Häufig wird durch die Verwendung der Matrix das Anbringen des Knochenhautlappens überflüssig [22, 23].

### 1.1.3.2 Mikrofrakturierung

Bei Knorpelläsionen unter einer Größe von 1-4 cm<sup>2</sup> ist die Therapie erster Wahl die Mikrofrakturierung. Dabei wird die subchondrale Knochenplatte durch Bohrung kleiner Löcher

perforiert. Blutungen aus dem subchondralen Knochenspalt enthalten Koagulate, die sich im Defekt ansammeln. Sie bilden dort bevorzugt ein Mikroenvironment das die Anlockung, Proliferation und chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark stimuliert [6, 24-26] (Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3: Mikrofrakturierung zur Therapie von Knorpeldefekten**

Durch Perforation der defektnahen subchondralen Knochenplatte wandern mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark in die Läsion ein und bilden dort Reparaturgewebe [6, 24-26] [[www.yorkshirekneeclinic.co.uk](http://www.yorkshirekneeclinic.co.uk)]

Der Vorteil dieser Knochenmark stimulierenden Technik ist, dass mehrere Hauptziele der Knorpelregeneration erfüllt sind: es ist ein einfaches, minimal-invasives und kosteneffektives Verfahren mit wenigen damit verbundenen Komplikationen und mit hoher Kapazität beständiges Knorpelreparaturgewebe herzustellen [1, 27].

Jedoch ist das klinische Ergebnis der Therapie altersabhängig. Bei jungen Patienten führt die Mark-Stimulierung zu einer Verbesserung in 75% der Fälle. Das Reparaturgewebe besteht jedoch aus Faserknorpel oder einem Gemisch aus Faser- und hyalinem Knorpel mit unterschiedlichen Mengen an Typ II Kollagenen. Diese Beobachtung könnte auch Grund dafür sein, dass eine andere Studie zeigt, dass auf gute Kurzzeitergebnisse schlechte Langzeitergebnisse folgen [28].

## 1.2 Stammzellen

Bereits bei der konventionellen Methode der Mikrofrakturierung bedient man sich der Eigenschaft mesenchymaler Stammzellen Chondrogenese betreiben und zu Knorpelzellen differenzieren zu können. Zunehmende Beachtung bei der Entwicklung von Therapien verschiedenster Knorpelerkrankungen gewinnen daher undifferenzierte und kommittierte Stammzellen.

Unter Stammzellen versteht man Zellen die sich selbst erneuern und in verschiedene Zelltypen differenzieren können. Abhängig vom Differenzierungspotential unterscheidet man totipotente,

pluripotente und multipotente Stammzellen. Eine totipotente Zelle ist in der Lage alle Zellen hervorzubringen, die für die Entwicklung eines Organismus benötigt werden, dazu gehören auch Zelltypen, die sich nicht im Embryo befinden, aber für dessen Entwicklung essentiell sind, wie zum Beispiel Zellen der Plazenta und der Nabelschnur. Stammzellen, welche Zellen der drei Keimblätter, jedoch keine extraembryonalen Strukturen wie z. B. Trophoblasten, hervorbringen können, werden als pluripotent bezeichnet. Multipotente Zellen können schließlich nur noch in bestimmte Zelltypen differenzieren [29, 30].

### **1.2.1 Embryonale und adulte Stammzellen**

Stammzellen lassen sich unterteilen in embryonale Stammzellen und adulte oder somatische Stammzellen. Embryonale, pluripotente Stammzellen findet man ausschließlich in der inneren Zellmasse der Blastozyste, wohingegen adulte Stammzellen in adulten Geweben zu finden sind. Adulte Stammzellen werden benötigt um Gewebe und Organe aufrechtzuerhalten. In den meisten Fällen sind sie multipotent. Auch pluripotente, adulte Stammzellen gibt es in geringen Mengen, so zum Beispiel im Nabelschnurblut [4].

Da die Gewinnung von embryonalen Stammzellen die Zerstörung eines Embryos voraussetzt sind embryonale Stammzellen ethisch sehr umstritten und deren Isolation in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz verboten.

Weniger bedenklich hingegen sind adulte Stammzellen. Sie wurden das erste Mal 1999 von Pittinger aus dem Knochenmark isoliert und deren Multipotenz charakterisiert [31].

In geringem Maß sind adulte Stammzellen in Rückenmark, Fettgewebe, Knochenmark, Gehirn- und olfaktorischem Gewebe und im Bindegewebe verschiedenster Organe zu finden. Lediglich im Nabelschnurblut sind adulte Stammzellen in großer Anzahl vorhanden [32-38].

### **1.2.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)**

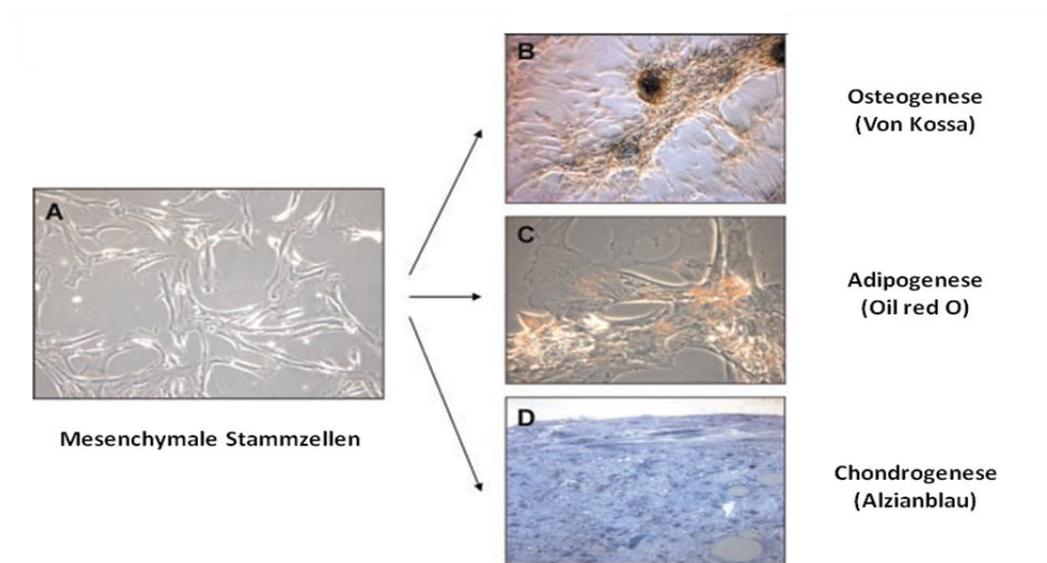
Im Knochenmark befinden sich u. a. multipotente, adulte Stammzellen, sog. mesenchymale Stammzellen (MSCs), welche die Fähigkeit haben sich in verschiedene Gewebetypen, wie z. B. Knochen [39], Fett [40, 41] und Knorpel [40, 42] zu differenzieren.

Innerhalb des Knochenmarks beträgt der Anteil an MSCs an der Gesamtheit mononukleärer Zellen lediglich 0,001-0,1 % [43]. Neben dem Knochenmark wurden MSCs auch noch aus weiteren Geweben, wie z. B.: Knochenhaut [44], Spongiosa [45], Muskel [46], Fettgewebe [47], Gelenkhaut [48], Haut [49], Lunge [50], peripheres Blut [51], und Nabelschnurblut [52, 53] isoliert.

In den letzten Jahren hat man viele Kenntnisse gewonnen zur Isolation, Kultivierung, Charakterisierung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen, wodurch sie ein vielversprechendes Werkzeug für die regenerative Medizin und *tissue engineering*, u. a. in Hinblick auf Knorpeldefekte, geworden sind [4].

Durch bestimmte Faktoren sollen sie spezifisch differenzieren können, z. B. durch Chondrogenese zu Chondrozyten, und funktionelle Matrix hervorbringen mit ähnlichen oder sogar verbesserten Eigenschaften verglichen mit dem ursprünglichen Gewebe [4].

Charakterisiert werden können humane MSCs durch deren Differenzierung in die drei Hauptlinien – Adipogenese, Osteogenese und Chondrogenese (Abbildung 1-4) – und über den Nachweis der Oberflächenmarker STRO-I, CD73, CD105, CD 106, CD 145 und CD 166, sowie das Fehlen von CD11b, CD31, CD34, CD45 und CD117 [4].



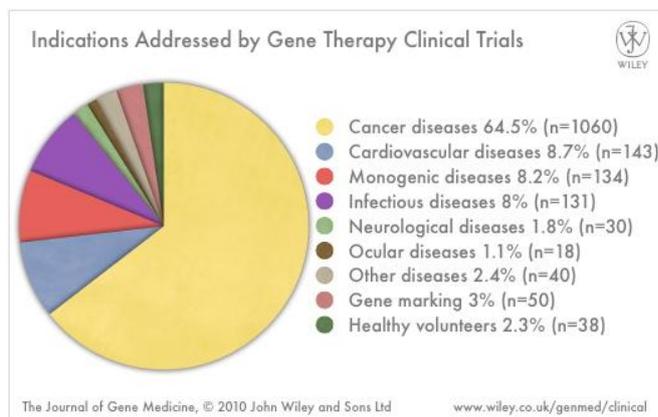
**Abbildung 1-4: Nachweis der Differenzierungsfähigkeit mesenchymaler Stammzellen**

Das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen kann *in vitro* durch Differenzierungsassays nachgewiesen werden. Undifferenzierte MSCs (A) können durch Kultur in geeigneten Medien Osteogenese (B, Nachweis durch Von Kossa-Färbung), Adipogenese (C, Nachweis durch Oil red O-Färbung) und Chondrogenese (D, Nachweis durch Alzianblau-Färbung) durchführen [4].

Zur therapeutischen Anwendung eignen sich mesenchymale Stammzellen aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und ihrer Fähigkeit gezielt in verschiedene Zelltypen differenzieren zu können. Zusätzlich können mesenchymale Stammzellen durch gentechnische Methoden modifiziert werden.

### 1.3 Gentherapie

Bereits 1966 gab es erste Überlegungen durch Tatum, funktionelle Transgene zu therapeutischen Zwecken in Zellen einzubringen und somit Anomalien zu korrigieren oder Zellen mit neuen Funktionen herzustellen [54, 55]. In den letzten Jahren gewinnt die Gentherapie bei der Entwicklung von Behandlungen für verschiedenste Krankheiten zunehmend an Bedeutung. Abbildung 1-5 zeigt dass bis 2010 vor allem Krebserkrankungen Gegenstand durchgeführter gentherapeutischer klinischer Studien waren.



**Abbildung 1-5: Anteil an gentherapeutischen klinischen Studien nach zugrundeliegenden Erkrankungen**

Bis heute wurden bereits über 1600 gentherapeutische klinische Studien durchgeführt. Ein Großteil davon, 64,5%, zielen dabei auf die Therapie von Krebserkrankungen ab [[www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/](http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/)].

Auch *tissue engineering* Strategien, d.h. die Züchtung von körpereigenen Ersatzgeweben, sollen zukünftig durch gentherapeutische Maßnahmen unterstützt werden können um verbesserte Therapieergebnisse zu erhalten [1].

#### 1.3.1 Somatische Gentherapie und Keimbahntherapie

Unter somatischer Gentherapie versteht man den Transfer von DNA in Körperzellen eines Individuums. Die Veränderung wirkt sich nur auf das Individuum aus und wird nicht auf Nachkommen der folgenden Generation übertragen. Im Gegensatz dazu steht die genetische Modifikation von Keimzellen. Dabei wird die genetische Änderung auf nachfolgende Generationen übertragen. Keimbahntherapie findet bisher nur Anwendung im Tiermodell, die Anwendung im Menschen ist nach deutschem Embryonenschutzgesetz verboten. Die meisten gentherapeutischen Ansätze zielen somit auf die Modifikation von somatischen Zellen ab [55].

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Arten der somatischen Gentherapie: Die erste Herangehensweise basiert auf der Entnahme von Zellen aus dem Körper des Patienten. Nach der genetischen Manipulation außerhalb des Körpers werden die Zellen wieder in den Körper eingebracht. Dieses Verfahren wird als *ex vivo* bezeichnet. Im Gegensatz dazu steht die *in vivo* Gentherapie. Dabei verbleiben die zu modifizierenden Zellen im Körper des Patienten [56].

### 1.3.2 Vektoren zur Gentherapie

Ein optimaler Vektor zur Anwendung in der Gentherapie soll idealerweise folgende Anforderungen erfüllen: Die Herstellung sollte einfach und effizient sein, die Expression des Transgens bezüglich Konzentration und Dauer bedarfsgerecht. Des Weiteren wird eine möglichst geringe Immunogenität und geringe Toxizität angestrebt. Entscheidend ist auch eine möglichst große Verpackungskapazität des Vektors. Idealerweise ermöglicht er eine orts- bzw. zellspezifische Expression [57].

Da keines der bisher angewandten Vektorsysteme alle Anforderungen erfüllt, hängt die Wahl eines geeigneten Vektors in erster Linie von dem gesetzten Ziel ab.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Vektoren zur Gentherapie – viral und nicht-viral. Beide Vektoren haben ein weites Anwendungsspektrum, wobei für jeden Anwendungszweck Vor- und Nachteile bestehen [55].

Unter nicht-viralem Gentransfer versteht man das Einbringen von Plasmid-DNA in Zielzellen. Es können dabei sehr große DNA-Fragmente, kostengünstig und einfach in Zellen eingebracht werden. Unterstützt werden kann die nicht-virale Transduktion nackter DNA beispielsweise durch kationische Liposomen. Sie bestehen aus einer Doppellipidschicht, ähnlich dem Aufbau einer Zellmembran, welche einen Raum mit wässriger Lösung umhüllt. In den umschlossenen Hohlraum ist die DNA gelöst. Liposomen interagieren mit der Zellmembran der Zielzelle und die DNA wird durch Endozytose oder Membranfusion in die Zelle eingebracht. Die Immunogenität dieser Methode ist gering. Weitere Verfahren zur nicht-viralen Transduktion sind Elektroporation, DNA-Injektion und Partikelbeschuss. Die Effizienz und die Expressionsdauer nicht-viraler Methoden sind jedoch gering [55].

Eine hohe Transduktionseffizienz hingegen kann durch virale Vektoren erreicht werden. Viraler Gentransfer kann mittels in das Wirtsgenom integrierende oder nichtintegrierende Vektoren geschehen [58].

Der am häufigsten für gentherapeutische Versuche genutzte episomal verbleibende virale Vektor ist das Adenovirus [59]. Adenovirale Vektoren können sowohl sich teilende als auch sich nichtteilende Zellen infizieren. Die Verpackungskapazität ist mit bis zu ca. 38 kb sehr groß. Die Wirtszellspezifität adenoviraler Vektoren ist gering, wodurch ein weites Spektrum an Geweben und Organen für die Behandlung mit adenoviralen Vektoren in Frage kommt [55]. Die Transgenexpression durch adenovirale Vektoren ist aufgrund des episomal verbleibenden Virusgenoms transient.

Im Gegensatz dazu steht die Gruppe der ins Wirtsgenom integrierenden viralen Vektoren. Der bekannteste und meistgenutzte Vertreter dieser Gruppe ist das Retrovirus. Das linearisierte Virusgenom wird dabei in das Wirtsgenom integriert wodurch eine langanhaltende und stabile Transgenexpression erreicht wird [55]. Gewöhnlich zeigt sich die Virusaufnahme als sehr effizient für verschiedene Gewebearten und daher ist das Virus gut geeignet für somatische Gentherapie [56, 60]. Nachteile von retroviralen Vektoren sind, dass sie nur sich teilende Zellen infizieren können und somit nicht anwendbar sind für viele adulte Gewebe. Des Weiteren kann die Integration des Virusgenoms ins Wirtsgenom zur Integrationsmutagenese führen, was schwerwiegende Folgen nach sich ziehen kann [55, 61, 62].

## **1.4 Lentiviraler Gentransfer**

Lentivirale Vektoren sind in den letzten Jahren zu einem wertvollen Werkzeug zum Transfer von Fremd-DNA in Zellen geworden. Sie integrieren ins Wirtsgenom und erlauben somit eine stabile, langanhaltende Transgenexpression. Ein weiterer Vorteil von lentiviralen Vektoren ist, dass sie auch ruhende Zellen effizient infizieren können [58].

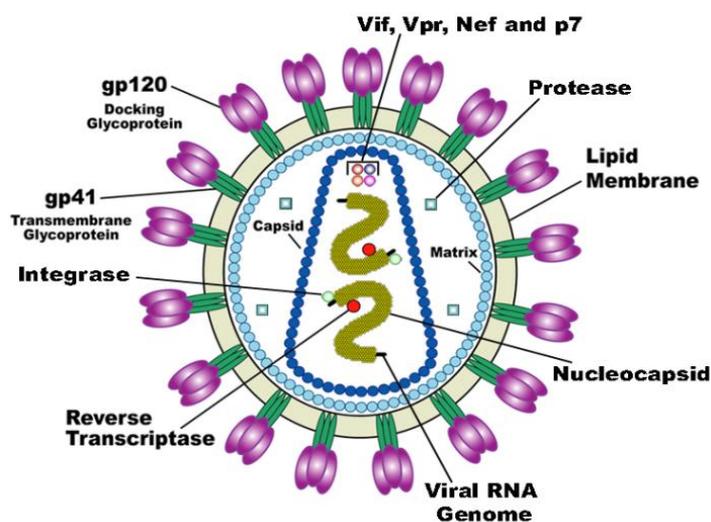
Durch verschiedene Modifikationen, wie Deletionen bestimmter Sequenzen gegenüber dem Wildtyp-Virusgenom, Verwendung von *split genome* Ansätzen und der Herstellung von sog. selbstinaktivierenden (SIN) Vektoren, konnten lentivirale Vektoren in der Vergangenheit wesentlich sicherer gestaltet werden [63, 64].

### **1.4.1 Aufbau von Lentiviren**

Lentiviren stellen eine Untergruppe der *Retroviridae* da. Sie haben ein einzelsträngiges RNA-Genom mit doppelsträngiger DNA als Zwischenprodukt [65].

1.4.1.1 Viruspartikel

Lentiviren haben eine Größe von circa 100 nm. Sie haben ein membranumhülltes, konisches Kapsid. Die Membran ist mit externen Glykoproteinen (gp120) verbunden und von Transmembranproteinen durchzogen (gp41). Die Membraninnenseite stellt eine Matrixproteinschicht dar. Externes und transmembranes Glykoprotein haben ein gemeinsames Vorläuferprotein welches in die Endprodukte gespalten wird. Über das sogenannte Link-Protein ist die Hüllmembran mit dem Viruskapsid verbunden. Es setzt sich aus Kapsidproteinen zusammen. Das virale RNA – Genom befindet sich innerhalb des Kapsids und ist mit Nukleokapsidproteinen komplexiert [65] (Abbildung 1-6).



**Abbildung 1-6: Aufbau eines lentiviralen Partikels**

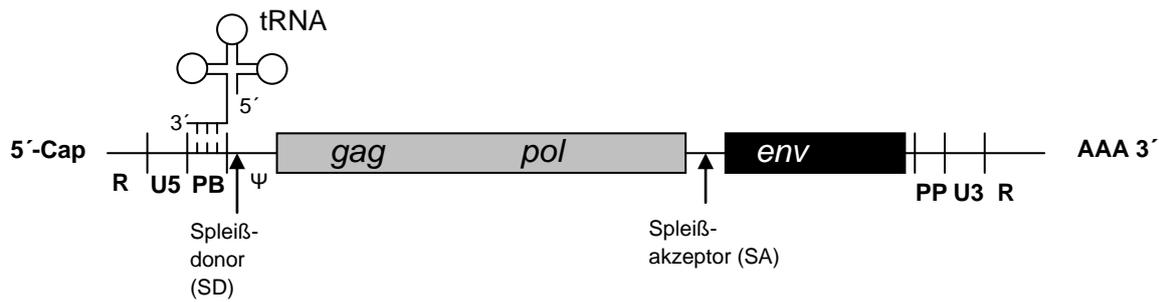
Im Partikelinneren befindet sich das konische Kapsid das zwei identische RNA-Stränge beinhaltet. Das Kapsid wird von einer matrixausgekleideten Membran umschlossen in die Glykoproteine eingelagert sind. Nef: *negative factor*, Vif: *viral infectivity factor*, Vpr: *viral protein rapid* [www.niaid.nih.gov/].

1.4.1.2 Das lentivirale Genom

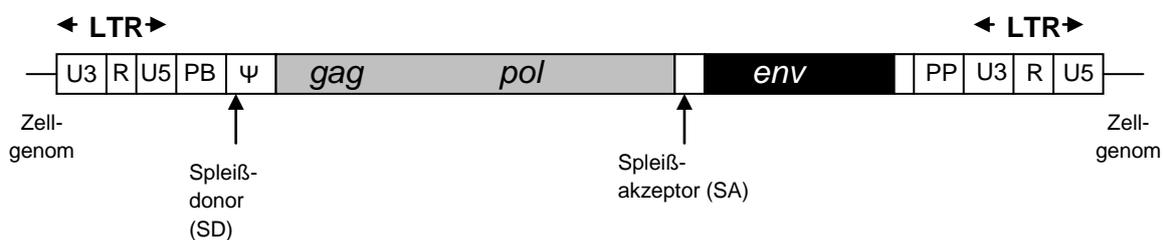
Das lentivirale Genom besteht aus zwei identischen RNA-Strängen (Abbildung 1-7). Ähnlich zu eukaryotischer RNA weisen sie 5'-Cap und 3'- Polyadenylierung auf.

Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsid-Proteine werden durch das *gag*-Gen, viruseigenen Enzyme, Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, von den *pol*-Genen kodiert. Das *env*-Gen exprimiert die Oberflächenproteine gp41 und gp120. Das Virusgenom kodiert zusätzlich für zwei regulatorische Gene – *tat* und *rev*. Sie werden für die virale Replikation benötigt und veranlassen die Expression der akzessorischen Proteine *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*. Bei akzessorischen Proteinen handelt es sich um wichtige Virulenzfaktoren.

**A RNA-Genom des infektiösen Viruspartikels**



**B Integrierte Provirus-DNA**



**Abbildung 1-7: Aufbau des Retrovirusgenoms**

Dargestellt ist der allgemeine Aufbau des Retrovirusgenoms ohne lentivirusspezifische Sequenzen für akzessorische und regulatorische Proteine. (A) Anordnung der Sequenzelemente und der offenen Leserahmen im RNA-Genom. Am 5'-Terminus befindet sich eine Cap-Gruppe, am 3'-Terminus ist das Genom polyadenyliert. (B) Anordnung der Sequenzelemente und der offenen Leserahmen im Genom des Provirus nach Integration in das Wirtszellgenom. LTR = *long terminal repeat*. R = redundante Regionen, U5 und U3 = (unique) einmalige Regionen, PB = Primer-Bindungsstelle,  $\psi$  = Verpackungssignal, Gag/Pol/Env = Gene für gruppenspezifische Antigene (Gag), Enzyme (Pol) und Oberflächenproteine (Env), PP = Polypurintrakt. Modifiziert nach Modrow [65].

Die kodierenden Regionen werden von regulatorischen Kontrollsequenzen flankiert. Beteiligt sind diese bei der reversen Transkription, sowie bei der Integration der viralen Erbinformation in die zelluläre DNA: Unmittelbar am 5'-Ende mit der Cap-Struktur befindet sich die R-Region. In identischer Reihenfolge und Orientierung liegt sie auch am 3'-Ende des Genoms vor. An die U5-Region schließt sich die Primer-Bindungsstelle (PB) an. Sie ist über eine Länge von 18 Basen über Basenpaarung mit dem 3'-Ende eines zellulären tRNA-Moleküls, welches als Primer für die Reverse Transkription benötigt wird, komplexiert. Zwischen der Primerbindungsstelle und dem *gag*-Gen liegt die sog. *Leader*-Region. Sie enthält eine Spleißdonorstelle für die Produktion aller gespleißten mRNA-Moleküle. Darauf folgt das  $\psi$ -Verpackungssignal. Mittels dieses Verpackungssignals werden die RNA-Genome bei der Morphogenese an die Nukleokapsidabschnitte im *gag*-Bereich der sich bildenden Viruspartikel angelagert. *Downstream* der kodierenden Regionen findet man den Polypurintrakt (PP).

Dieser Bereich besteht aus Adenosin- und Guanosinresten und ist für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstrangs bei der reversen Transkription essentiell.

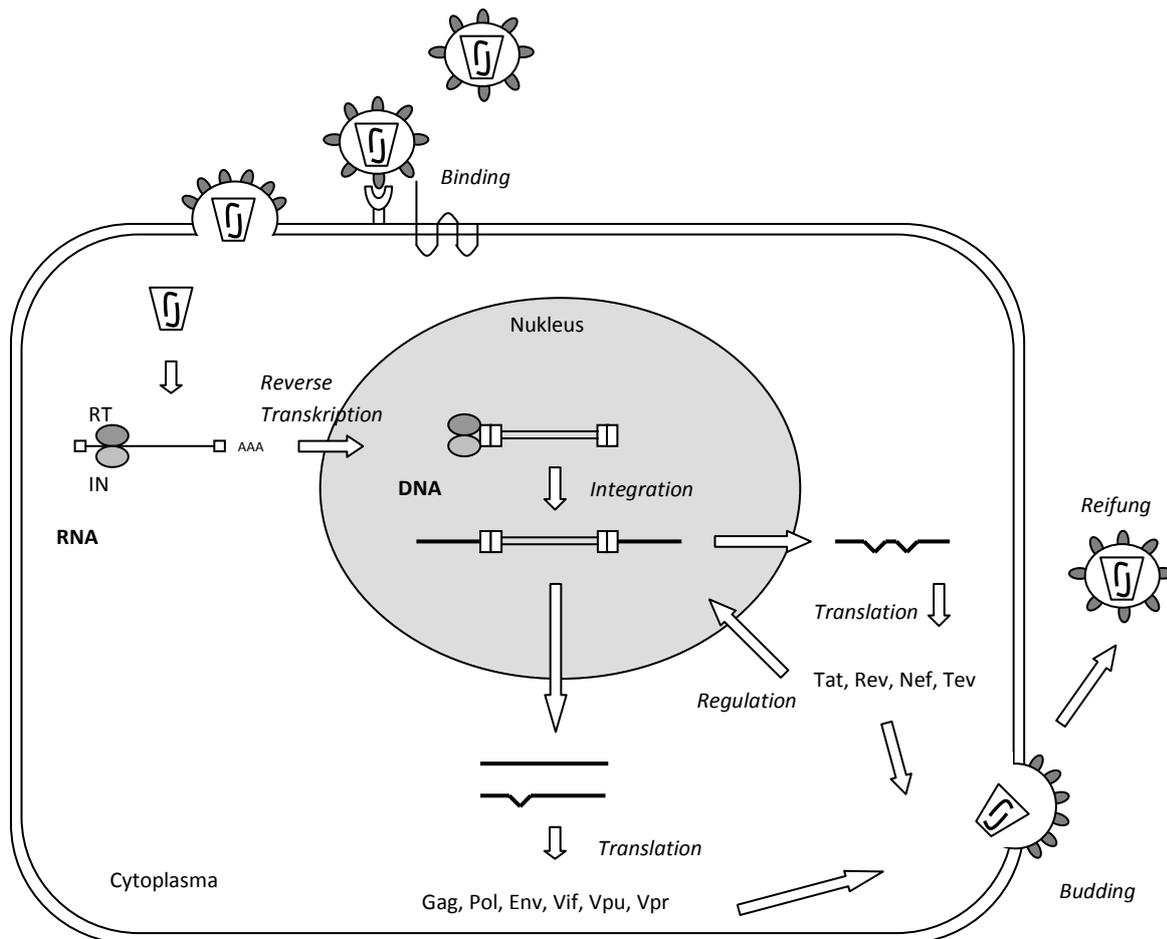
An den Polypurintrakt schließt sich die U3-Region an. Nach der Transkription des RNA-Genoms in doppelsträngige DNA verdoppelt sich die U3-Region. Die zweite Kopie befindet sich im 5'-LTR des Provirus. Wichtig ist die U3-Region für die Integration ins Wirtsgenom und für die Genexpression des ins Wirtsgenom integrierten Provirus aufgrund der enthaltenen Promotoren und cis-aktiven Elemente [65].

#### 1.4.1.3 Der lentivirale Replikationszyklus

Zu Beginn der lentiviralen Infektion binden die externen Glykoproteine der Lentivirushülle an spezielle Rezeptoren, welche entscheidend sind für den Virustropismus. Bei HIV-1 handelt es sich dabei um den CD4 und die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 [66]. Die Bindung an Membranrezeptoren bewirkt die Fusion von Virus- und Zellmembran [67]. Matrix- und Kapsidproteine lösen sich auf und der Nukleokapsidkomplex gelangt in das Innere der Zelle. Anschließend beginnt die reverse Transkription im Zytoplasma [66]. Durch die reverse Transkription wird aus der Einzelstrang-RNA Doppelstrang-DNA synthetisiert. Zelluläre tRNA dient dabei als Primer. Die geringe Genauigkeit der Reversen Transkriptase, welche auf die fehlende *proofreading* – Fähigkeit der Reversen Transkriptase zurückzuführen ist, ist verantwortlich für die hohe Variabilität des viralen Genoms [66].

Im Anschluss wird der synthetisierte DNA-Doppelstrang durch die virale Integrase geschnitten und in das Wirtsgenom integriert [66]. Erst nach der Integration kann die lentivirale Genexpression erfolgen [68, 69]. Zunächst werden von dem integrierten Provirus doppelt gespleißte mRNAs gebildet, die für *rev*, *tat* und *nef* kodieren. Die Translation von *tat* und *rev* wird für die weitere Expression sog. „später“ Gene, die zu einfach gespleißter oder ungespleißter mRNA führen, benötigt. Zu diesen „späten“ Genen gehören die Strukturgene, welche für die Virusherstellung essentiell sind.

Abschließend werden die virale RNA und die gebildeten Strukturproteine zu Viruspartikeln verpackt und durch einen Vorgang der als „*Budding*“ bezeichnet wird, an der Zellmembran aus der Zelle ausgeschleust. Erst nachträglich wird das *gag/pol* Vorläuferprotein gespalten und erst dann sind die gereiften Viruspartikel infektiös (Abbildung 1-8).



**Abbildung 1-8: Der lentivirale Replikationszyklus**

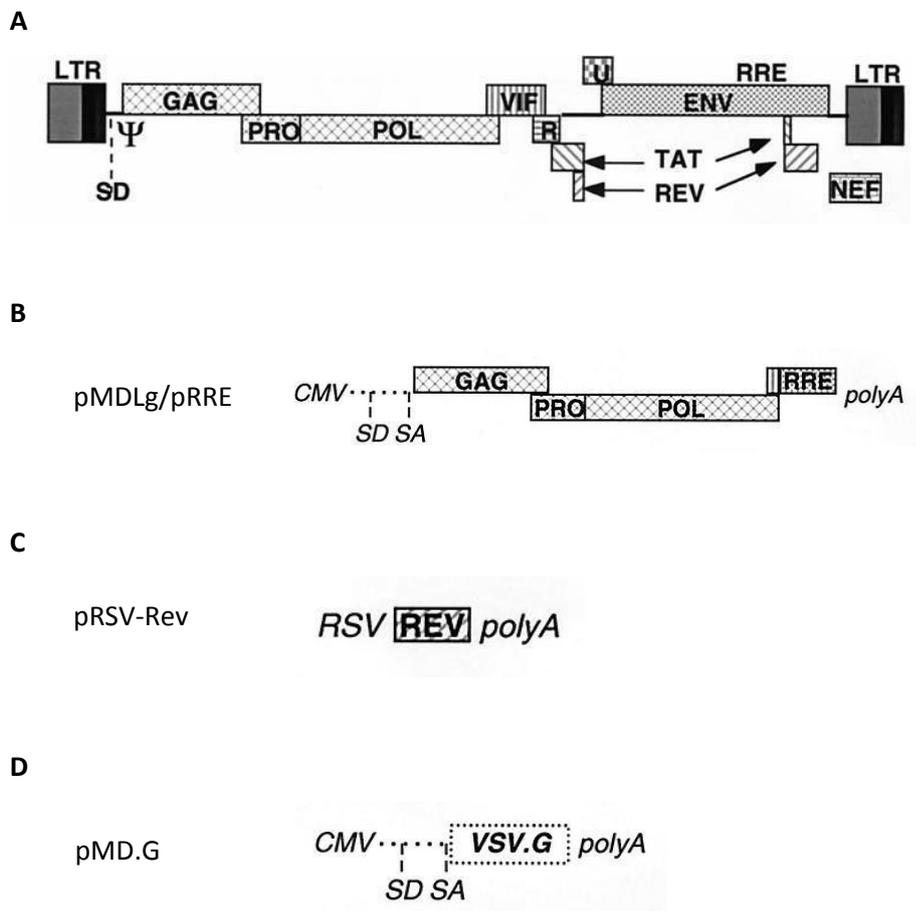
Mit seinen Oberflächenproteinen bindet das Lentivirus an CD4 Rezeptoren auf der Membran der Zielzelle. Als Korezeptoren dienen CCR5- und CXCR4- Rezeptoren. Die Bindung veranlasst die Verschmelzung des Virus mit der Zellmembran, wodurch das Kapsid ins Zytoplasma gelangt. Die virale RNA wird durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Im Zellkern vermittelt die virale Integrase die Integration der Virus-DNA in das zelluläre Genom. Es werden anschließend mehrfach gespleißte, einfach gespleißte und ungespleißte mRNAs transkribiert. Nach dem Transport in das Zytoplasma werden die Transkripte entweder translatiert oder dienen als neues Virusgenom. Strukturproteine und RNA-Genome lagern sich an die Zellmembran an. Die entstandenen Lentiviruspartikel knospen sich von der Zelle ab. Durch Spaltung des *gag/pol*-Vorläuferproteins wird das Virus infektiös. Modifiziert nach Modrow [65].

Lentiviren transportieren einen Nukleoproteinkomplex (Präintegrationskomplex) in das Zytoplasma der infizierten Zelle, der die virale RNA wie beschrieben revers transkribiert und die neu synthetisierte DNA in die DNA des Wirtsgenoms integriert. Damit die DNA integriert werden kann muss der Komplex in den Zellkern gelangen, was nur durch die Nukleoporen möglich ist. Der Präintegrationskomplex anderer Retroviren wird nicht durch die Nukleoporen transportiert und kann somit nur sich teilende Zellen infizieren, wenn sich die Kernmembran zur Zellteilung auflöst. Ermöglicht wird dieser aktive Transport durch die Nukleoporen durch das im Präintegrationskomplex der Lentiviren enthaltene *nuclear localization signal* [63].

### 1.4.2 Pseudotypisierte, selbstinaktivierende lentivirale Vektoren der dritten Generation

Um mögliche Sicherheitsbedenken hinsichtlich der Pathogenität HIV-abgeleiteter Vektoren zu minimieren wurden in der Vergangenheit zunehmend sicherere lentivirale Systeme etabliert. Die Entstehung pathogener Viren durch homologe Rekombination wird dabei ausgeschlossen.

Lentivirale Vektoren der dritten Generation zeichnen sich dadurch aus, dass die Sequenzen für akzessorische Proteine, *tat* und *rev* deletiert wurden. Sie sind für eine effiziente Transduktion nicht essentiell. Die verbleibenden Lentivirusgene werden durch drei verschiedene Verpackungsplasmide kodiert (Abbildung 1-9) [63, 70]. Des Weiteren wird das endogene *env*-Gen durch ein heterologes *envelope*-Gen, z.B. das Gen für das Glykoprotein des *vesicular stomatitis virus* (VSV.G), ersetzt.



**Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des lentiviralen Provirus (A) und der drei Konstrukte für das Verpackungssystem der dritten Generation (B-D)**

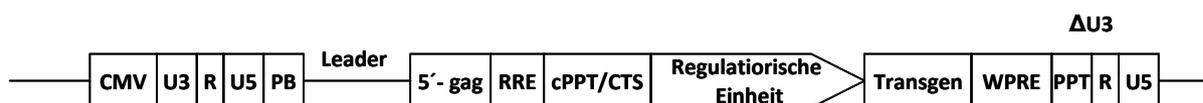
Die benötigten kodierenden Sequenzen des Wildtyp-HI-Virus (A) werden für das Verpackungssystem der dritten Generation auf drei Plasmide aufgeteilt: pMDLg/pRRE (A) exprimiert die *gag*- und *pol*-Gene unter Kontrolle des CMV-Promotors. Der Kerntransport der entstehenden Transkripte findet nur statt, wenn Rev, welches durch das Konstrukt pRSV-Rev (B) exprimiert wird, an die RRE-Sequenz bindet. pMD.G (C) kodiert für das Glykoprotein des *vesicular stomatitis virus*, wodurch ein pseudotypisierter Virus hergestellt wird. [63]

pMDLg/pRRE kodiert für die lentiviralen *gag*- und *pol*- Proteine. Durch den vorgeschalteten CMV-Promotor entsteht zunächst ein *gag/pol*- Vorläufertranskript. Da dieses zusätzlich eine RRE-Sequenz enthält wird es nach Bindung durch *rev* an RRE effizient in den Kern transportiert. Das entstehende Vorläuferprotein wird durch proteolytische Spaltung in die *gag*- und *pol*- Proteine getrennt.

Das *rev*-Gen wird durch das Konstrukt pRSV-*rev* in *trans* exprimiert. Die Kontrolle der Expression erfolgt durch einen RSV-Promotor. Neben dem *gag/pol*- Vorläuferprotein enthält auch die genomische RNA eine *rev*-bindende RRE-Sequenz.

pMD.G kodiert für das Glykoprotein des *vesicular stomatitis virus* (VSV.G) unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Durch diese Pseudotypisierung erhält der entstehende Lentivirus verbesserte Eigenschaften: Der Eintritt in die Zielzelle mittels VSV.G erfolgt vermutlich über Bindung an ubiquitäre Phospholipidkomponenten der Zellmembran und ist somit nicht auf bestimmte, CD4-Rezeptor-tragende, Zelltypen beschränkt [71]. Somit wird aufgrund der Pseudotypisierung die Bandbreite geeigneter Zellen zu Infektion mit lentiviralen Vektoren drastisch erhöht [72]. Zusätzlich weisen VSV.G pseudotypisierte Vektoren eine sehr hohe Stabilität auf [66].

Das Transferplasmid codiert für das gewünschte Transgen. Es wird unter Kontrolle der internen regulatorischen Einheit transkribiert und die gebildete mRNA wird als Genom in die entstehenden Viruspartikel verpackt. In der Zielzelle erfolgt die reverse Transkription. Die entstehende doppelsträngige DNA wird schließlich als Provirus ins Wirtsgenom integriert. Erst vom integrierten Provirus kann die Expression des Transgens erfolgen.



**Abbildung 1-10: Schematischer Aufbau des Transferplasmids**

Das Transferplasmid enthält alle Elemente, die für die Expression genomischer mRNA, deren Verpackung, reverse Transkription und Integration und schließlich der Expression des Transgens benötigt werden. CMV: Cytomegalovirus *immediate early gene enhancer*, U3: Promotorbereich aus U3 (*unique 3' region*), R: *Repeat region*, U5: *Unique 5' region*, PB: *Primer binding site*, 5'gag: 5' Ende des *gag*-Gens, RRE: *Rev responsive element*, cPPT/CTS: *Central polypurine tract and central termination site*, WPRE: *Woodchuck post-transcriptional regulatory element*, PPT: *Polypurine tract*, ΔU3: 400 bp Deletion in der U3-Region. [70, 73, 74].

Durch Fusion des LTR-Promotors mit einem CMV *immediate early gene enhancer* kann die Transkription des Transgens *tat* unabhängig erfolgen [63, 70, 73, 75].

Eine zusätzliche Verbesserung der Sicherheit erreicht man durch Verwendung sog. selbstinaktivierender (SIN) Vektoren. Sie enthalten eine Deletion einer 400 bp-Sequenz in dem 3'-LTR

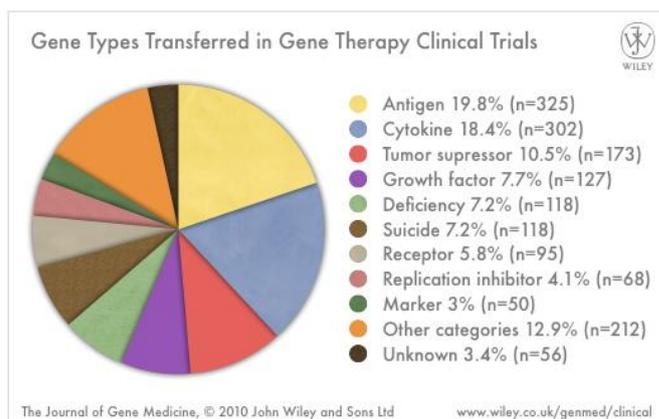
U3 Bereich [73]. In diesem Bereich enthaltene Promotor – und Enhancersequenzen können somit nicht mehr zu einer transkriptionellen Aktivierung *downstream* gelegener Gene führen. Während der Plusstrangsynthese dient die modifizierte U3-Region als Vorlage für die Bildung des analogen Bereichs des 5´-LTRs. Die Transkription der genomischen mRNA ist somit unmöglich [63, 76, 77] (Abbildung 1-10).

Die Herstellung lentiviraler Vektoren erfolgt durch Kotransfektion der drei Verpackungsplasmide mit einem geeigneten Transferplasmid in die Produzentenzelllinie 293T. 293T- Zellen enthalten das SV40 T Antigen und sind somit in der Lage die episomalen Verpackungsplasmide, welche den SV40 Replikationsursprung enthalten, zu replizieren. Die entstehenden Viren sind in der Lage Zielzellen zu infizieren und ihr Genom in das Wirtsgenom zu integrieren. Eine Replikation des Virus ist aber nicht mehr möglich [63, 75].

### 1.5 Wachstumsfaktoren zur Knorpelregeneration

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren verbessern Zellproliferation und -differenzierung sowie die Matrixsynthese und haben somit einen positiven Einfluss auf die Knorpelheilung [78-83].

Sie stellen mögliche Kandidatengene für gentherapeutische Ansätze zur Knorpelregeneration dar und können zellbasierte Methoden unterstützen. Bereits 7,7 % aller gentherapeutischen klinischen Studien basieren auf Wachstumsfaktoren als Transgenen (Abbildung 1-11).



**Abbildung 1-11: Aufteilung bisheriger klinischer Studien zur Gentherapie nach Transgen-Klassen**

7,7 % aller bisher durchgeführten klinischen Studien zur Gentherapie verwenden Wachstumsfaktoren als therapeutische Gene [www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical].

### 1.5.1 *Bone morphogenic protein 2 (BMP-2)*

*Bone morphogenic proteins* (BMPs) sind Wachstumsfaktoren und gehören zur TGFβ (*transforming growth factor beta*) Superfamilie [84]. Bereits 20 Mitglieder dieser Familie wurden bisher identifiziert und charakterisiert [85].

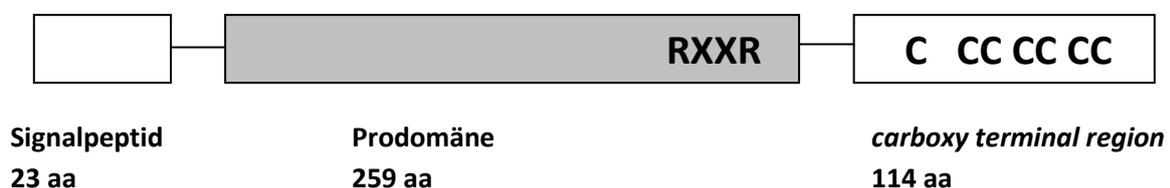
Sie spielen eine wichtige Rolle bei Zellwachstums- und differenzierungsprozessen [86-88]. Darüber hinaus sind sie beteiligt an der frühen Embryonalentwicklung, bei der Organogenese und der Homöostase von adultem Gewebe [89, 90]. Des Weiteren wurden BMPs bereits 1965 von Urist als Wachstumsfaktoren mit osteoinduktiver Fähigkeit beschrieben [91, 92]. In der Folge konnte nicht nur diese Fähigkeit sondern auch die Fähigkeit, die Knorpelbildung zu induzieren gezeigt werden [84].

BMPs werden in Bereichen der Knochen- und Knorpelbildung sowie der Knochenreparatur exprimiert [93] und führen zur verstärkten Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten sowie der Bildung extrazellulärer Matrix [94].

Speziell BMP-2 ist, im Zusammenhang mit TGFβ, in der Lage die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondroblasten und Osteoblasten zu induzieren [24, 88, 95]. Rekombinantes BMP-2 Protein stimuliert darüber hinaus die Produktion von Proteoglykanen und inhibiert gleichzeitig dessen Abbau [96]. Daher ist nicht verwunderlich, dass gezeigt werden konnte, dass BMP-2 einen positiven Einfluss auf die Knorpelheilung hat [13, 26, 97].

#### 1.5.1.1 Molekulare Charakterisierung

BMP-2 wird zunächst als Vorläuferprotein synthetisiert. Es besteht aus Signalpeptid, Prodomäne und carboxyterminaler Region [98] (Abbildung 1-12).

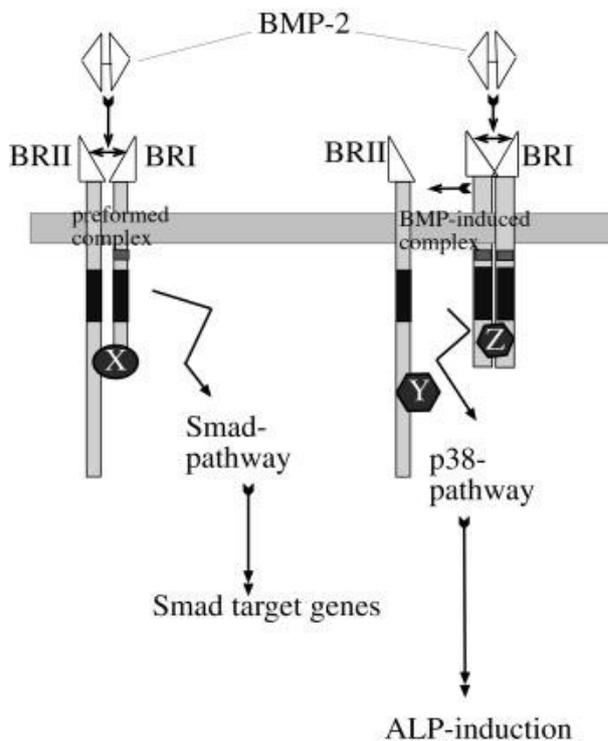


**Abbildung 1-12: Schematischer Aufbau des BMP-2 Vorläuferproteins**

Das BMP-2 Vorläuferprotein besteht aus Signalpeptid, Prodomäne und carboxyterminaler Region. Durch proteolytische Spaltung nach der RXXR-Sequenz der Prodomäne entsteht das reife Protein. Das aktive Protein entsteht durch Dimerisierung der carboxyterminalen Region. aa = Aminosäuren [98].

Das Signalpeptid wird für die Sekretion des Proteins benötigt. Die Prodomäne ist beteiligt an Proteinfaltung, Dimerbildung und Regulation der biologischen Aktivität. Die abgespaltene carboxyterminale Region dimerisiert durch Bildung intermolekularer Disulfidbrücken, wodurch das aktive Protein entsteht [90, 99].

BMP-2 ist ein extrazelluläres Protein. Es bindet an membranständige Typ I und Typ II Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden [93, 100, 101].



**Abbildung 1-13: BMP-2 aktivierte Signalkaskaden**

Nach Bindung an Rezeptorkomplexe, bestehend aus Typ I und Typ II BMP-2 Rezeptoren, kann die BMP-2 vermittelte Signalkaskade entweder über den Smad-Signalweg oder auf einem smad-unabhängigen Signaltransduktionsweg erfolgen. BRI /BR II = BMP Rezeptor I / II, ALP = Alkaline Phosphatase. [102]

Die intrazelluläre BMP-2 induzierte Signaltransduktion kann auf smad-abhängigem oder smad-unabhängigem Weg erfolgen (Abbildung 1-13). Der smad-abhängige Signalweg wird durch Bindung von BMP-2 an einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus Typ I und Typ II BMP-Rezeptoren aktiviert. Im Folgenden werden Smad 1, 5 und 8 phosphoryliert und schließlich kommt es zur Aktivierung spezifischer Zielgene. Der Smad-unabhängige Weg wird induziert durch die BMP-2 vermittelte Oligomerisierung der Rezeptoren. BMP-2 bindet mit hoher Affinität an BRI, wodurch Homodimere gebildet werden. Anschließend wird BRII rekrutiert. p38 MAPK vermittelt die Induktion der ALP am Ende der Signalkaskade [102].

### 1.5.1.2 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten

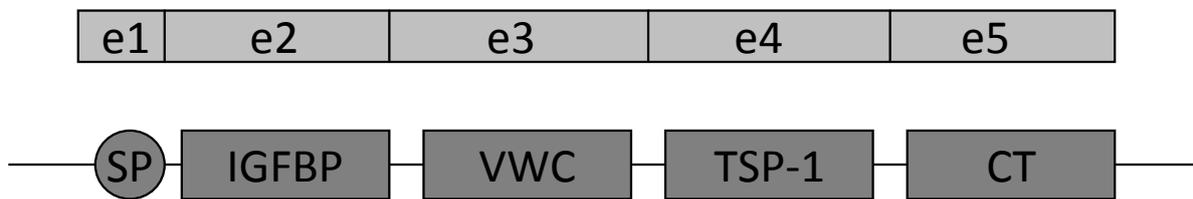
Sellers et al. konnten zeigen, dass sich rekombinantes BMP-2 Protein zur Therapie von Läsionen des artikulären Knorpels eignet [13]. BMP-2 fördert die Expression von knorpelspezifischer Matrix sowie die Chondrozytendifferenzierung [103, 104]. Problematisch ist jedoch, dass sehr hohe Konzentrationen benötigt werden um Effekte *in vivo* induzieren zu können [105], sowie die kurze Halbwertszeit des Proteins, wodurch wiederholte Applikationen, verbunden mit dadurch entstehenden hohen Kosten, notwendig werden [13]. Gentherapeutische Ansätze erscheinen daher als sinnvoll. Um hohe Proteinkonzentrationen über eine therapeutisch relevante Zeitspanne gewährleisten zu können eignen sich in erster Linie integrierende virale Vektoren. Die Nutzung von viraler Expression kann durch die *in situ* Produktion ein effizienter Weg für die Behandlung mit BMP-2 *in vivo* sein, da transduzierte Zellen BMP-2 konstant exprimieren bis zum Absterben der Zelle. Zusätzlich stellt die konstante Sekretion von BMP-2 Protein über mehrere Wochen hinweg eine physiologisch bessere Lösung dar als die klinische Applikation. Man erwartet, dass die gleichmäßige Abgabe eine bessere Knochenbildung, ohne die Begrenzung einer einmaligen BMP-2-Gabe, zur Folge hat [8].

Jedoch ist, um eine funktionelle Konzentration des Wachstumsfaktors im Gewebe erreichen zu können, der Einsatz starker viraler Promotoren zur Kontrolle der Transgenexpression sinnvoll. Deren Aktivität unterliegt jedoch möglicherweise epigenetischem Silencing durch Methylierung, was ein Absinken der Genexpression zur Folge hätte. Ferner besteht die Gefahr, dass es in Folge der konstitutiven, viralen Überexpression eines Wachstumsfaktors nach Integration ins Wirtsgenom zu überschießendem Wachstum nach Abschluß des Heilungsprozesses kommt.

### 1.5.2 *Wnt1-induced secreted protein 3 (WISP-3)*

Das *Wnt1-induced secreted protein 3 (WISP-3)* ist ein Mitglied der *cysteine-rich61/ connective tissue growth factor/ nephroblastoma overexpressed* Genfamilie (CCN-Familie). Mitglieder dieser Genfamilie sind in Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, *survival* [61, 106-108] sowie in weitere Entwicklungsprozesse involviert. Sie sind matrixassoziierte Signalmoleküle und haben einen ähnlichen Aufbau aus konservierten, cystein-reichen Domänen gemeinsam [109, 110] (Abbildung 1-14). Alle CCN Proteine weisen ein *insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-like motif* auf. Die von Willebrand Typ C Domäne (VWC), die Trombospondin Typ I Domäne und die C-

terminale Komponente sind wichtig für Protein-Protein Interaktionen (Oligomerisierung oder Interaktion mit extrazellulären Molekülen und Rezeptoren) [111].



**Abbildung 1-14: Struktur der CCN Proteinfamilie**

Fünf Exons codieren für Signalpeptid (SP), *insulin-like growth factor binding protein-like motif* (IGFBP), von Willebrand Type C Domäne (VWC), Trombospondin Typ I Domäne (TSP-1) und die C-terminale Komponente (CT) [106, 107]

WISP-3 wird u.a. in Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert und ist dort vermutlich in den Prozess der Homöostase involviert [111]. WISP-3 stimuliert dabei die Kollagen Typ II und Aggrecan Expression in Chondrozyten [112]. Ein weiterer Hinweis dafür, dass WISP-3 an der Aufrechterhaltung von Knorpelgewebe beteiligt ist, ist die Tatsache, dass Mutationen im WISP-3-Gen u.a. zum Verlust von Knorpelgewebe führt [113, 114].

Aufgrund dieser Eigenschaften ist WISP-3 ein weiteres geeignetes Kandidatengen zur Gentherapie von Knorpeldefekten.

## 1.6 Regulierte Genexpression durch das Tet on – System

Bisherige gentherapeutische Ansätze zur Therapie von osteochondralen Defekten sind limitiert durch fehlende Regulationsmöglichkeiten. Um überschießende Knorpelbildung zu verhindern, erscheint es sinnvoll, nach Abschluss des Heilungsprozesses die Transgenexpression durch eine Art „molekularen Schalter“ unterbinden zu können [115].

Regulierbare Systeme haben oft folgende Nachteile: Die Effektormoleküle - Schwermetallionen, Steroidhormone oder Hitzschockproteine - sind oft wenig spezifisch und durch entstehende pleiotrope Effekte ist die Auswertung der Effekte durch das gewünschte Genprodukt häufig nicht eindeutig. Des Weiteren zeigen regulierbare Systeme oft eine deutliche „leakiness“, d.h. auch im abgeschalteten Zustand ist eine zu hohe Rest-Genaktivität nachweisbar [116, 117].

Eine weitere Methode zur Regulation der Transgen-Expression stellt das Tet – System dar. Es zeichnet sich durch hohe Genexpression im aktiven Zustand und kaum Restaktivität im inaktiven

Zustand aus [116, 117]. Da es sich nur aus prokaryotischen Bestandteilen zusammensetzt sind pleiotrope Auswirkungen gering. Vorteile des Effektors Tetrazyklin bzw. dessen Derivats Doxzyklin sind, dass eine orale Gabe möglich ist, es alle Gewebe penetriert und es bereits bei sehr geringen Konzentrationen wirksam ist. Auch die Anwendung des Tet – Systems im lentiviralen System ist bereits gut untersucht und optimiert [118]. Das Tet – System ist somit ein sehr gut geeignetes regulierbares System [118].

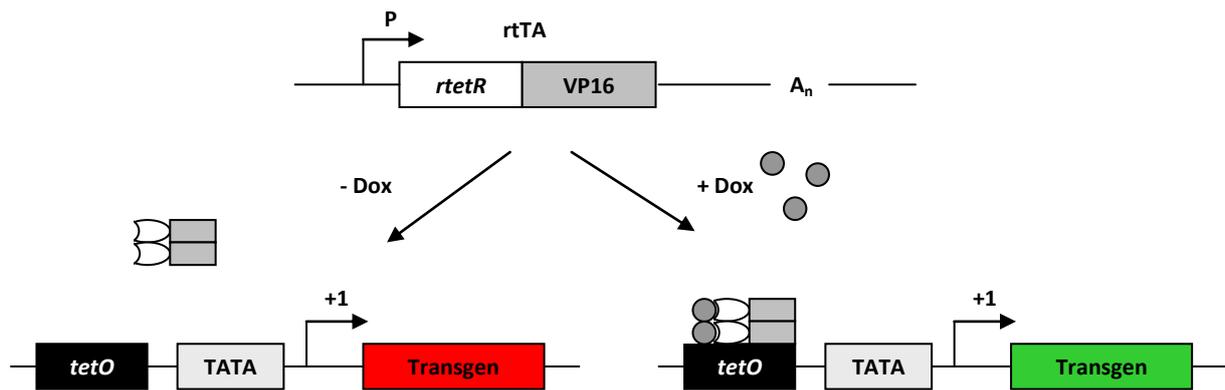
Die Tet - regulierte Genexpression sollte ursprünglich dazu dienen, Proteinfunktionen bzw. den Einfluss von Genprodukten in verschiedenen Netzwerken *in vivo* zu analysieren. Dazu ist es notwendig die Genexpression vorübergehend ausschalten und Auswirkungen untersuchen zu können. Dadurch, dass die Genexpression zeitlich begrenzt und reversibel an- und abgeschaltet werden kann, ist es möglich, z.B. Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse zu untersuchen [116, 117, 119, 120].

Zunächst wurde das Tet off – System entwickelt. Der Effektor (Tetrazyklin bzw. dessen Derivat Doxzyklin) bindet dabei am Transaktivator (TA) und ändert somit seine DNA-bindenden Eigenschaften. Effektorbindung am Transaktivator bewirkt die Inaktivierung des Transaktivators. Im aktiven Zustand, d.h. bei Abwesenheit des Effektors, bindet TA spezifisch am *tet* Operon (*tetO*), welches sich circa 70 bp *upstream* der Transkriptionsstart-Stelle befindet und bewirkt die Transkription durch den Minimal-Promotor. Die Zugabe des Effektors bewirkt den Abbruch der Genexpression [116, 117].

Der Transaktivator (TA) setzt sich aus *tetR* (*repressor of transposon 10 derived Tc resistancance operon of E. coli*) und der damit fusionierten C-terminalen, sauren Domäne von VP16 des Herpes simplex Virus zusammen [119].

Für viele gentherapeutische Anwendungen scheint die Weiterentwicklung des Tet off - Systems zum Tet on – System sinnvoll (Abbildung 1-15): *TetR* bzw. TA wurden dabei so verändert, dass der Effektor die Bindung zum Operon nicht unterbricht sondern induziert. Der entstehende Transaktivator (rtTA) hat somit reverse DNA-Binde-Eigenschaften verglichen mit dem nativen Transaktivator. Somit wird für die Bindung des reversen Transaktivators (rtTA) an das Operon die Zugabe des Effektors nötig [120].

Für die gentherapeutische Anwendung bei osteochondralen Defekten scheint das Tet on - System geeigneter als das Tet off - System, da das Genprodukt – BMP-2 oder WISP-3 – nur für einen kurzen Zeitraum – während der Heilung – aktiviert werden soll und für den Off - Zustand keine weitere Gabe des Antibiotikums notwendig ist.



**Abbildung 1-15: Schematische Darstellung des Tet on – Systems**

Der reverse Transaktivator setzt sich aus dem *rtetR* und dem VP16 Anteil zusammen. Die Expression des Transaktivators wird durch einen geeigneten Promotor gesteuert (P). Auf die Transaktivatorsequenz folgt ein Polyadenylierungssignal ( $A_n$ ). In Abwesenheit des Effektors Doxyzyklin (*dox*) erkennt der reverse Transaktivator nicht die spezifische DNA Zielsequenz (*tetO*). Das Transgen wird daher nicht exprimiert. Die Zugabe von Doxyzyklin und dessen Bindung an den reversen Transaktivator bewirkt die Bindung des reversen Transaktivators an *tetO* und somit die Expression des Transgens [120].

Weitere Optimierung von Effektor, Transaktivator und Operon können die Effizienz des Tet on – Systems weiter steigern: So ist das Tetrazyklin-Derivat Doxyzyklin besser geeignet als Tetrazyklin um das Tet on – System zu induzieren. Ab einer Konzentration von 10 ng/ml ist ein Anstieg der Genexpression messbar. Das Optimum liegt bei 1 µg/ml [120].

Durch weitere Mutationen in der Transaktivator-Sequenz entsteht der Transaktivator  $rtTA2^S$ -M2. Er zeichnet sich im Vergleich zu *rtTA* durch eine 10-fach höhere Sensibilität gegenüber Doxyzyklin aus, ist stabiler in eukaryotischen Zellen und zeigt keine Hintergrundexpression in Abwesenheit von Doxyzyklin [121].

Des Weiteren kann die *leakiness* minimiert werden durch Verwendung von SIN-Vektoren und *Tet responsive elements* der zweiten Generation ( $TRE_{tight}$ ) [118].

## 1.7 Aufgabenstellung

Chondrale und osteochondrale Schäden stellen Erkrankungen dar, für die bislang keine zufriedenstellenden Therapien vorhanden sind. Ein neuartiger Therapieansatz ist die Anwendung gen- und zelltherapeutischer Verfahren basierend auf *ex vivo* viral transduzierten autologen Zellen zur Expression von Wachstumsfaktoren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen in diesem Zusammenhang die Wachstumsfaktoren – *bone morphogenic protein 2* (BMP-2) und *Wnt induced secreted protein 3* (WISP-3) - lentiviral, durch VSV.G

pseudotypisierte SIN Lentiviren vermittelt, in chondrogenen Zellen exprimiert werden. Neben der konstitutiven Expression liegt dabei der Schwerpunkt auf der regulierten Expression der Transgene durch das Tet on – System.

Vektoren zu regulierten Expression der Transgene unter Kontrolle des Zwei- oder Ein- Vektor Tet on – Systems, sowie für die konstitutive Expression werden daher hergestellt. Zur Optimierung des Systems wird die Expression des Transaktivators (Tet on – System) bzw. des Transgens (konstitutive Expression) unter Kontrolle verschiedener Promotoren (CMV-, PGK-, und SF-Promotor) gestellt.

Durch Infektion verschiedener, chondrogener Zellen, darunter primäre Kaninchenchondrozyten und mesenchymale Stammzellen des Kaninchens, sind die Regulierbarkeit, Kinetik und Funktionalität der tet-vermittelten Transgenexpression *in vitro* zu charakterisieren. Außerdem werden die Übertragbarkeit auf humane Zellen und das Differenzierungspotential lentiviral infizierter mesenchymaler Stammzellen untersucht.

Zudem sollen die Regulation und Funktionalität der BMP-2 Expression unter Kontrolle des Tet on – Systems in *ex vivo* transduzierten Chondrozyten, nach Implantation in einen osteochondralen Defekt, in einem Kaninchen-Defektmodell gezeigt werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien

|                                     |                                                 |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Ascorbinsäure-2-Phosphat            | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| Alizarinrot S                       | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| Calciumchlorid                      | Fluka Biochemika GmbH, Neu-Ulm                  |
| Chlorwasserstoff 37%                | Merck KGaA, Darmstadt                           |
| Dexamethason                        | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| 1,9-Dimethylmethylenblau            | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)             | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Merck KGaA, Darmstadt                           |
| Ethanol absolut                     | Merck KGaA, Darmstadt                           |
| Ethanol 70% (v/v)                   | Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München |
| Glyzin                              | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| β-Glyzerolphosphat                  | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| Glyzerol                            | Riedel-de-Häen, Seelze                          |
| Hexadimethrinbromid (Polybren)      | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| Isopropanol                         | Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München |
| Methanol                            | Merck KGaA, Darmstadt                           |
| N-Acetyl-Cystein                    | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| Natriumhydroxid                     | Merck KGaA, Darmstadt                           |
| Prolin                              | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| Propidiumiodid                      | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS)           | Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg          |
| Trypanblau (0,4%)                   | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim                   |

### 2.2 Biochemische Reagenzien

|                                    |                                      |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Agarose                            | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Alzianblau                         | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim        |
| Ampicillin, Ampicillin-Natriumsalz | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim        |
| Bovines Serumalbumin (BSA)         | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim     |

|                                                                  |                                      |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Chondroitin-6-Sulphat                                            | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim        |
| DNA-Molekulargewichtsstandard                                    | Invitrogen GmbH, Karlsruhe           |
| Doxyzyklin Hyclat                                                | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim        |
| Ethidumbromid (10mg/ml)                                          | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim        |
| ITS (Insulin 1 mg/ml, Transferin 0,55 mg/ml,<br>Selen 0,5 µg/ml) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim        |
| Loading Dye (6x)                                                 | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim        |
| Papain (28 U/mg)                                                 | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim        |
| PreDeveloped TaqMan Assay Reagent<br>Human 18SrRNA               | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| qPCR Mastermix Plus                                              | Eurogentec s.a., Seraing, Belgien    |
| rhBMP-2                                                          | R&D Systems GmbH, Wiesbaden          |
| rhTGP-β3                                                         | R&D Systems GmbH, Wiesbaden          |
| TaqMan Gene Expression Assay                                     | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| TRizol                                                           | Invitrogen GmbH, Karlsruhe           |

### 2.3 Kits

|                                              |                                      |
|----------------------------------------------|--------------------------------------|
| BMP-2 ELISA Kit                              | R&D Systems GmbH, Wiesbaden          |
| Calcium CPC Liquicolor Kit                   | Stanbio Laboratories, Boerne         |
| DC Protein Assay                             | Bio-Rad, München                     |
| DNeasy® Blood and Tissue Kit                 | Qiagen GmbH, Hilden                  |
| High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| OneStep RT-PCR Kit                           | Qiagen GmbH, Hilden                  |
| Plasmid Maxi Kit                             | Qiagen GmbH, Hilden                  |
| QIAquick Gel Extraction Kit                  | Qiagen GmbH, Hilden                  |
| Quanti-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit        | Invitrogen GmbH, Karlsruhe           |
| Quick Titer™ Lentivirus Quantitation Kit     | Cell Biolabs Inc., San Diego, USA    |
| Rapid DNA Dephos & Ligation Kit              | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim     |
| TISSUCOL® Kit                                | Baxter AG, Wien                      |

## 2.4 Medien und Lösungen

|                                              |                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alizarinrot S Lösung                         | - 0,2 g Alizarinrot S<br>- 10 ml H <sub>2</sub> O<br>- pH 4,1 bis 4,3 einstellen mit NH <sub>3</sub>                                                                                            |
| Ascorbinsäure-2-Phosphat                     | 10 mM in serumfreiem DMEM                                                                                                                                                                       |
| Dexamethason                                 | 1 mM in 100% Ethanol                                                                                                                                                                            |
| Verdünnungspuffer für Differenzierungsassays | - 50 mM Natriumphosphat<br>- 2 mM EDTA<br>- 2 mM N-Acetyl-Cystein<br>- pH 6,5 einstellen                                                                                                        |
| DMMB-Lösung                                  | - 16 mg DMMB, üN gelöst in 100% Ethanol<br>- 2,37 g NaCl und 3,04 g Glyzin in 975 ml H <sub>2</sub> O<br>- 0,69 ml 11,6 M HCl zugeben<br>- Lösungen vereinen<br>- pH 3,0 einstellen mit 1 M HCl |
| β-Glycerolphosphat                           | 1 M in serumfreiem DMEM                                                                                                                                                                         |
| Prolin                                       | 4 mg/ml in serumfreiem DMEM                                                                                                                                                                     |
| rhBMP-2                                      | 20 µg/ml in 4 mM HCl + 0,1% BSA                                                                                                                                                                 |
| rhTGF-β3                                     | 10 µg/ml in 4 mM HCl + 0,1% BSA                                                                                                                                                                 |

---

|                           |                                                                                                                                                                                                  |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HBS-Puffer (2x)           | - 6,5 g HEPES<br>- 8,0 g NaCl<br>- 10 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Stock<br>(5,25 g in 500 ml ddH <sub>2</sub> O)<br>- pH 7,05 einstellen<br>- auffüllen auf 500 ml<br>- sterilfiltrieren |
| FACS-Puffer               | - PBS (1x)<br>- 1x FKS                                                                                                                                                                           |
| TE-Puffer                 | - 10 mM Tris/HCl pH 8,0<br>- 1 mM EDTA                                                                                                                                                           |
| TAE-Puffer (1x)           | - 0,04 M Tris Acetat<br>- 0,001 M EDTA                                                                                                                                                           |
| LB-Medium (Luria-Bertani) | - 1% Bacto-Trypton<br>- 0,5% Bacto-Hefeextrakt<br>- 1% NaCl<br>- mit NaOH auf pH 7 einstellen                                                                                                    |
| Mini-Präp Lösung 1        | - 50 mM Glucose<br>- 25 mM Tris/HCl pH 8,0<br>- 10 mM EDTA pH 8,0                                                                                                                                |
| Mini-Präp Lösung 2        | - 0,2 N NaOH<br>- 1% SDS                                                                                                                                                                         |
| Mini-Präp Lösung 3        | 3 M Na-5 M Acetat pH 4,8                                                                                                                                                                         |
| Lyse-Puffer               | - 250 mM Tris pH 8,0<br>- 0,1% Triton X - 100                                                                                                                                                    |

## 2.5 Enzyme

|                                       |                                         |
|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| Alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu$ l) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim        |
| Collagenase A                         | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim        |
| Klenow-Enzym (2 U/ $\mu$ l)           | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim        |
| Restriktionsenzyme                    | New England Biolabs GmbH, Frankfurt/ M. |
| RNase                                 | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim        |
| <i>Taq</i> -Polymerase                | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot            |

## 2.6 Plasmide

### 2.6.1 Verpackungsplasmide

Zur lentiviralen Kotransfektion wurden Verpackungsplasmide der dritten Generation verwendet. Dabei werden die verbleibenden HIV-Wildtyp-Sequenzen nach Deletion der Bereiche welche für akzessorische und regulatorische Proteine kodieren, aus Sicherheitsgründen durch drei verschiedene Plasmide kodiert [63]:

|                 |                                                                                                                                             |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>pMD.GP</b>   | kodiert für gruppenspezifische Antigene ( <i>gag</i> ) und virale Enzyme ( <i>pol</i> ) unter Kontrolle des CMV-Promotors (Abbildung 1.9 B) |
| <b>pRSV-rev</b> | kodiert für Rev-Protein unter Kontrolle des RSV-Promotors (Abbildung 1.9 C)                                                                 |
| <b>pMD.G</b>    | kodiert für das <i>vesicular stomatitis virus</i> Glykoprotein unter Kontrolle des CMV-Promotors (Abbildung 1.9 D)                          |

### 2.6.2 Transferplasmide

Alle verwendeten Transferplasmide sind Derivate des Vektors pHIV-7. Durch enzymatische Modifikation wurden jeweils ein gewünschtes Transgen (eGFP, BMP-2, WISP-3 oder Transaktivator

des Tet on – Systems) und eine gewünschte regulierende Einheit (Phosphoglyzeratkinase-, *immediate early* Zytomegalievirus- oder *spleen focus forming virus* -Promotor bzw. *Tetracycline Responsive Element*) eingebracht. Für die Anwendung des Ein – Vektor Tet on – Systems wurden jeweils eine Transgen- und zusätzlich eine Transaktivator - Expressionskassette in dasselbe Plasmid kloniert. Plasmidkarten aller verwendeten Plasmide befinden sich im Anhang.

## **2.7 Bakterienstämme**

*E. coli* K12 DH10B

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## **2.8 Zelllinien und Primärzellen**

### **2.8.1 293T**

Bei 293T handelt es sich um ein Derivat der 293 Zelllinie, einer epithelialen Zelllinie, welche ursprünglich aus humanem, embryonalen Nierengewebe isoliert wurde [122]. Sie zeichnen sich durch die Expression des SV40 T-Antigens aus [123], wodurch die Replikation transfizierter Plasmide, welche den SV40-Replikationsursprung enthalten, ermöglicht wird. Verwendet wurden 293T Zellen für die Kotransfektion zur Lentivirusproduktion.

### **2.8.2 CMS5**

Die CMS5-Zelllinie [124] ist eine murine Fibrosarkom-Tumorzelllinie welche eine sehr gute Infizierbarkeit mit VSV.G pseudotypisierten Lentiviren aufweist.

### **2.8.3 ATDC5**

Bei ATDC5-Zellen [125] handelt es sich um eine murine, chondrogene Zelllinie, welche aus einem Teratokarzinom isoliert wurde. Bezogen wurden die Zellen von ECACC (Salisbury, England).

## 2.8.4 Primäre Chondrozyten

Die Isolation von primären Kaninchenchondrozyten erfolgt aus Knorpelbiopsien, welche von Fr. Gabriele Wexel aus dem Kniegelenk von weiblichen, weißen Neuseeländern entnommen wurden nach Ueblacker et al. [126].

Human Chondrozyten konnten nach gleichem Protokoll aus Patientenmaterial gewonnen werden. Alle Patienten wurden aufgeklärt und haben schriftlich der Verwendung des Biopsiematerials zu wissenschaftlichen Zwecken zugestimmt.

## 2.8.5 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen des Kaninchens wurden aus dem Knochenmark von weiblichen, weißen Neuseeländern nach Huang et. al. [47] isoliert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen je 15 cm Schale ausgelegt. Nicht angewachsene Zellen, u. a. hämatopoetische Stammzellen, wurden zwei Tage nach der Isolation durch Waschen mit PBS entfernt.

Humane mesenchymale Stammzellen wurden von Cambrex (Cambrex IEP GmbH, Wiesbaden) bezogen.

## 2.9 Zellkulturmedien und Zusätze

|                                                                                        |                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )                                                     | Merck KGaA, Darmstadt         |
| Doxyzyklin                                                                             | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim |
| Dulbecco's minimal essential medium (DMEM)                                             | Biochrom AG, Berlin           |
| Fötales Kälberserum Sera Plus (FKS)                                                    | PAN Biotech GmbH, Aidenbach   |
| L-Glutamin (200 mM)                                                                    | Biochrom AG, Berlin           |
| PBS Dulbecco (1x)                                                                      | Biochrom AG, Berlin           |
| Penicillin / Streptomycin (10000 units / $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$<br>In 0,9% NaCl) | Biochrom AG, Berlin           |
| Trypsin / EDTA (0,25% / 0,02% in PBS w/o $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ )         | Biochrom AG, Berlin           |
| Trypsin / EDTA, 0,05%                                                                  | Invitrogen GmbH, Karlsruhe    |

## 2.10 Verbrauchsmaterial

|                                        |                                          |
|----------------------------------------|------------------------------------------|
| CryoTube™ Vials, 1,8 ml                | Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden            |
| FACS-Röhrchen                          | BD Biosciences, Heidelberg               |
| Polystyren Reaktionsgefäße             | TPP AG, Trasadingen, Schweiz             |
| Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml           | Josef Peske oHG, Aindling-Pichl          |
| Reaktionsgefäße 2 ml mit Schraubdeckel | Brand, Dietenhofen                       |
| Reaktionsgefäße, 15 und 50 ml          | TPP AG, Trasadingen, Schweiz             |
| Spritzen                               | BD Biosciences, Heidelberg               |
| Sterile Pipetten                       | BD Biosciences, Heidelberg               |
| Sterilfilter 0,22 und 0,45 µm          | Josef Peske oHG, Aindling-Pichl          |
| Well-Platten (6-, 12-, 24-, 96-wells)  | TPP AG, Trasadingen, Schweiz             |
| Zellkulturflaschen                     | TPP AG, Trasadingen, Schweiz             |
| Zellkulturschalen (6, 10 und 15 cm)    | TPP AG, Trasadingen, Schweiz             |
| Zirconia-Beads, 2,0 mm                 | Biospec Products Inc., Bartlesville, USA |

## 2.11 Geräte

|                                                                                              |                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Accu-Jet®                                                                                    | Brand, Dietenhofen                       |
| Mini-Beadbeater                                                                              | Biospec Products Inc., Bartlesville, USA |
| CO <sub>2</sub> Inkubator                                                                    | Forma Scientific Inc. Marietta, USA      |
| Cryobox Qualifreeze                                                                          | Qualilab, Olivet, Frankreich             |
| Digitalkamera für Fluoreszenzmikroskop<br>(AxioCam MR)                                       | Carl Zeiss Jena GmbH, Jena               |
| FACS-Vantage (Software CELLQuest)                                                            | BD Biosciences, Heidelberg               |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Digitale<br>Bildbearbeitungssoftware Axiovision 4.2)      | Carl Zeiss Jena GmbH, Jena               |
| Inversmikroskop Axiovert 25                                                                  | Carl Zeiss Jena GmbH, Jena               |
| Neubauer Zählkammer                                                                          | Marienfeld, Lauda-Königshofen            |
| PCR-Cycler, PTC-100                                                                          | MJ Research, Inc., Waltham, USA          |
| PCR-Maschine Mastercycler®                                                                   | Eppendorf, Hamburg                       |
| Photometer (Rodgau-Wallac VICTOR <sup>2</sup> , Software<br>Wallac 1420 Manager version 2.0) | PerkinElmer LAS GmbH, Jügesheim          |
| Pipetten                                                                                     | Eppendorf, Hamburg                       |

|                                                |                                      |
|------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Sterile Werkbank Hera Safe                     | Heraeus Instruments, Hanau           |
| TaqMan 7900 HT (Sequence Detection System 2.2) | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Vortexer (MS 2 Minishaker)                     | IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen    |
| Zentrifuge Biofuge fresco                      | Heraeus Instruments, Hanau           |
| Zentrifuge J2-HS (Rotor, JA-10 und JA-20)      | Beckman Coulter GmbH, Krefeld        |
| Zentrifuge Varifuge 3.0 R                      | Heraeus Instruments, Hanau           |

## **2.12 Weitere Software**

### **2.12.1 Microsoft Excel**

Das Programm wurde zur Datenauswertung, Erstellung von Diagrammen und statistischen Analyse verwendet.

### **2.12.2 Vector NTI**

Das Programm wurde zur virtuellen Konstruktion von Plasmiden verwendet.

### 3 METHODEN

#### 3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 RNA-Isolation aus adhärennten Zellen und Fibrinclots

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus adhärennten Zellen wurden die Zellen zunächst unter Zurhilfenahme von Trypsin von der Zellkulturplatte gelöst und abzentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils in 1ml Trizol/  $1 \times 10^6$  Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) resuspendiert.

Fibrinclots wurden im Beadbeater (Biospec Products Inc., Bartlesville, USA) zerkleinert. Die gefrorenen Clots wurden dazu auf Trockeneis in ein 2 ml Gefäß mit Schraubdeckel (Brand, Dietenhofen) überführt, in das bereits 1 ml Trizol/  $1 \times 10^6$  Zellen und einige 2,0 mm Zirconia Beads (Biospec Products) vorgelegt wurden. Die Suspension wurde anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Das weitere Vorgehen verlief für adhärennte Zellen und Fibrinclots gleich: Nach einer fünfminütigen Inkubation der Trizolsuspensionen bei Raumtemperatur wurden zu den Ansätzen 200  $\mu$ l Chloroform je 1 ml Trizol zugegeben und durch 15 sekundiges Vortexen gemischt. Nach einer weiteren Inkubation von zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur wurden die Ansätze 15 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Während dieser Zeit konnte in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße jeweils 500  $\mu$ l Isopropanol vorgelegt werden. Die obere, farblose Phase wurde anschließend zu dem Isopropanol gegeben und gründlich gemischt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Minuten und eine 30-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde anschließend mit 1 ml 80% EtOH durch 5 Minuten zentrifugieren bei 7600 rpm und 4°C gewaschen. Nachdem das Pellet circa 10 Minuten luftgetrocknet wurde, erfolgt die Resuspension abhängig von der Pelletgröße in 20 oder 30  $\mu$ l nukleasefreiem Wasser (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Vor der Konzentrationsbestimmung erfolgte die Denaturierung der RNA durch Erhitzen bei 65°C für 10 Minuten. Die Absorptionsmessung erfolgte wie in Abschnitt 3.1.6.2 beschrieben. Die Lagerung der extrahierten RNA erfolgte bei -80°C.

### 3.1.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) analog der Herstellerangaben. Eingesetzt wurde je Ansatz 1 µg der eingestellten RNA. Die Durchführung erfolgte in 200 µl Reaktionsgefäßen und einem PCR – Cyler (PTC-100, MJ Research, Inc., Waltham, USA). Bis zur Verwendung konnte die cDNA bei -20°C gelagert werden.

### 3.1.3 Präparation von Gesamt-DNA aus humanen Chondrozyten

Um humane Chondrozyten vor der Infektion mit lentiviralen Vektoren auf eine mögliche HIV-Infektion zu überprüfen wurde zunächst die Gesamt-DNA isoliert. Die Durchführung erfolgte mit dem DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) analog der Herstellerangaben.

### 3.1.4 Amplifikation von Nukleinsäure-Fragmenten durch PCR

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR) können kurze Nukleinsäure-Fragmente *in vitro* vervielfältigt werden. Dabei wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf über 90°C aufgetrennt (Denaturierung). An die Einzelstränge können sich Primer mit komplementären Sequenzen anlagern (Annealing). Die gebundenen Primer sind Ausgangspunkt für die thermostabile Polymerase welche schließlich einen Zweitstrang nach Vorlage des DNA-Einzelstrangs synthetisiert (Extension). Die Amplifikation des DNA-Fragments erfolgt durch Durchlaufen mehrerer aufeinanderfolgender Zyklen von Denaturierung, Annealing und Extension.

#### 3.1.4.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung

Das PGKrtTA Insert für die Klonierung von pHIV-7TREBMP-2PGKrtTA, pHIV-7TReGFPPGKrtTA und pHIV-7WISP-3PGKrtTA konnte nicht durch enzymatische Verdaus aus bereits vorhandenen Plasmiden isoliert werden. Daher wurde das 1340 bp Fragment mit Hilfe der PCR aus dem Plasmid pHIV-

7PGKrtTA amplifiziert. Ein 50 µl PCR-Ansatz enthielt 500 ng Plasmid-DNA, 1 µl von *forward* und *reverse* Primer, 5 U *Taq*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) und 5 µl 10 x Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Primer waren 1 µM konzentriert und hatten folgende Sequenzen:

PGKrtTAfw 5'-TAT AAC GCG TAA TTC TAC CGG GTA GGG G-3'

PGKrtTArev 5'-CGC TAG CAT CCT TAC TTA GTT ACC CGG-3'

Zur Klonierung enthielten die Primer, neben den komplementären Sequenzen, Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *MluI* und *NheI* (grau unterlegt). Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 3-1 angegeben.

**Tabelle 3-1: PCR-Programm zur Amplifikation von PGKrtTA**

| Zyklen | Temperatur | Dauer    |
|--------|------------|----------|
| 1      | 94°C       | 2 min    |
| 2      | 94°C       | 45 sec   |
|        | 45°C       | 45 sec   |
|        | 72°C       | 1:30 min |
| 28     | 94°C       | 45 sec   |
|        | 56°C       | 45 sec   |
|        | 72°C       | 1:30 min |
| 1      | 72°C       | 10 min   |

Die PCR-Ansätze wurden anschließend auf ein präparatives TAE-Gel geladen und daraus mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) laut Herstellerangaben eluiert.

#### 3.1.4.2 Nachweis der HI-Virusfreiheit

Um vor der Infektion mit lentiviralen Vektoren humane Zellen auf eine mögliche HIV-Infektion zu testen wurden PCRs zur Detektion der HIV *env* und *gag* Sequenzen in der zellulären DNA durchgeführt. Die zelluläre DNA wurde dafür mit dem DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) aus den humanen Chondrozyten nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurden 50 µl PCR-Reaktionsansätze pipettiert, welche 100-500 ng DNA, 1 µl des jeweiligen *forward* und *reverse* Primers und 25 µl 2x FastStart Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) enthielten. Folgende Primer (1 µM) wurden für die *env* bzw. *gag* site verwendet:

Gag = SK38 5'-ATA ATC CAC CTA TCC CAG TAG GAG AAA T-3'  
 SK39 5'-TTT GGT CCT TGT CTT ATG TCC AGA ATG C-3'  
 Env = SK68 5'-AGC AGC AGG AAG CAC TAT GG-3'  
 SK69 5'-CCA GAC TGT GAG TTG CAA CAG-3'

Die verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 3-2 gezeigt.

**Tabelle 3-2: PCR-Programm zum Nachweis der gag- bzw. env site**

|               | <i>gag</i> |        |     | <i>env</i> |        |     |
|---------------|------------|--------|-----|------------|--------|-----|
| Denaturierung | 95°C       | 4 min  | 1x  | 95°C       | 4 min  | 1x  |
| Amplifikation | 95°C       | 1 min  | 30x | 95°C       | 1 min  | 30x |
|               | 55°C       | 1 min  |     | 58°C       | 1 min  |     |
|               | 72°C       | 1 min  |     | 72°C       | 1 min  |     |
|               | 72°C       | 10 min | 1x  | 72°C       | 10 min | 1x  |
| Lagerung      | 4°C        | ∞      | 1x  | 4°C        | ∞      | 1x  |

Das Überprüfen der PCR-Reaktionen erfolgte auf analytischen 2% TAE-Agarosegelen. Das Vorhandensein von gag bzw. env Sequenzen würde sich dabei durch eine 120 bp Bande zeigen. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich eine PCR-Reaktion mit dem Plasmid pMD.GP als template-DNA angesetzt.

Die isolierten humanen Chondrozyten aller Patienten waren HIV negativ.

### 3.1.4.3 WISP-3 Expressionsanalyse durch RT-PCR

Die Expression von humanem WISP-3 in mesenchymalen Stammzellen wurde durch Reverse Transkriptase PCR nachgewiesen. Dazu wurde RNA aus infizierten Stammzellen nach dem Trizol-Protokoll (Abschnitt 3.1.1) isoliert.

10 ng der isolierten RNA wurden für die RT-PCR-Reaktion mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Pipettierschema und PCR-Programm wurden wie im Herstellerprotokoll angegeben verwendet. Folgende Primer wurden zur Detektion von WISP-3 bzw. der internen Kontrolle GAPDH benutzt:

---

|              |                                         |
|--------------|-----------------------------------------|
| WISP3_hu_fw  | 5'-CTG TGT TAC ATT CAG CCT TGC GAG-3'   |
| WISP3_hu_rev | 5'-CTT GGT TTT ACA GAA TCT TGA GCT C-3' |
| GAPDH_Rb_fw  | 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GC-3'        |
| GAPDH_Rb_rev | 5'-ACA ATG CCG AAG TGG TCG-3'           |

20 µl eines jeden Reaktionsansatzes wurden auf ein analytisches 2% TAE-Agarosegel geladen.

### 3.1.5 Modifikation von Nukleinsäuren

#### 3.1.5.1 Restriktionsverdau von Plasmiden

Doppelsträngige DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen, durchtrennt werden. Die Enzyme erkennen palindromische Erkennungssequenzen, welche meistens vier bis sechs Basenpaare umfassen. Durch die Hydrolyse entstehen, abhängig vom Enzym glatte (*blunt ends*) oder 3' bzw. 5'überhängende (*sticky ends*) Enden.

Üblicherweise wurde 1 µg DNA mit 10 U Restriktionsenzym für einen Einzelverdau, bzw. 5 U beider Enzyme für einen Doppelverdau im entsprechenden Puffer und ggf. BSA (entsprechend der Herstellerangaben) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

#### 3.1.5.2 Auffüllen von überhängenden Enden mit Klenow

Für eine *blunt end* Ligation wurden überhängende, einzelsträngige Ende mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt. Es besitzt sowohl 5'-3'- Polymerase- als auch 3'-5'- Exonukleaseaktivität.

Zu einem Restriktionsverdau wurde, nach der nötigen Inkubationszeit, 0,5 µl dNTP-Mix (Roche, 10 mM je dNTP) und 2 U Klenow-Enzym (Roche, Mannheim) zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C für zwei Stunden.

### 3.1.5.3 Elution von DNA aus einem präparativen Agarosegel

Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines präparativen Agarosegels. Der komplette Reaktionsansatz wurde auf ein 1% TAE-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht konnten die Banden in gewünschter Größe aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) analog der Herstellerangaben extrahiert werden.

### 3.1.5.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach der Isolation der gewünschten DNA-Fragmente wurde der Zielvektor dephosphoryliert, um die Wahrscheinlichkeit der Religation zu minimieren. Mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase werden dabei freie Phosphatgruppen an den 5' Enden abgespalten.

Verwendet wurde das Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche, Mannheim). 17 µl des aufgefüllten Vektors wurden dephosphoryliert. Alle Schritte wurden analog dem Herstellerprotokoll für *blunt* oder *sticky* 5' überhängende Enden durchgeführt.

### 3.1.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Der linearisierte Vektor und das gewünschte Insertfragment wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Zur Anwendung kam das Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche, Mannheim). Analog zu den Herstellerangaben wurden die Ligationsansätze pipettiert und inkubiert. Neben dem angegebenen Ligationsansatz wurden Kontrollen ohne Ligase, zur Überprüfung des Anteils an ungeschnittenem Vektor, und ohne Insert, um die Wahrscheinlichkeit der Religation zu überprüfen, mitgeführt.

### 3.1.6 Analyse von Nukleinsäuren

#### 3.1.6.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten (analytisches Agarosegel) oder zur Isolation gewünschter DNA-Fragmente (präparatives Agarosegel) wurden Reaktionsansätze elektrophoretisch getrennt. Zur Herstellung der Agarosegele wurden 1%, bzw. 2% bei geringer erwarteter Bandengröße, Agarose (Peqlab, Erlangen) in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Im Gelträger wurde die Agaroselösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Vor dem Auftragen auf das ausgehärtete Gel erfolgte die Zugabe von 6 x DNA-Auftragspuffer zu dem Reaktionsansatz. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Gelelektrophoresekammern durch Anlegen einer Spannung von 90 V. Nach ausreichender Trennung, erkennbar an der Laufweite des Farbstoffs, konnte die Größenbestimmung bzw. das Ausschneiden der DNA-Fragmente unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 366$  nm durchgeführt werden.

#### 3.1.6.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung des Nukleinsäuregehalts in DNA – oder RNA – Lösungen erfolgt die photometrische Messung der optischen Dichte. Die Absorption der 1:100 verdünnten, zu analysierenden Proben, wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm gegen  $H_2O_{bidest}$  (Blank) gemessen. Die gemessene optische Dichte bei  $\lambda = 260$  nm (OD260) ermöglicht die Konzentrationsberechnung:

ds DNA = (OD260 x 50 x Verdünnungsstufe) : 1000 = DNA-Konzentration in µg/µl

ss RNA = (OD260 x 40 x Verdünnungsstufe) : 1000 = RNA-Konzentration in µg/µl

### 3.1.7 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Mit Hilfe von Bakterien lassen sich Plasmide amplifizieren. Dazu wurden chemisch kompetente DH10B *E. coli* nach Ausubel [127] hergestellt. Zur Transformation wurden 2 µl der ligierten DNA zu einem 100 µl Aliquot *E. coli* gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein

---

Hitzeschock für 2 Minuten Wasserbad bei 42°C. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium je Ansatz wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Jeweils 100 µl des Ligations-, Religations- und – Ligase-Ansatzes wurden anschließend auf vorgewärmte LB-Agar-Platten ausplattiert. Zur Selektion der Bakterien, welche die künstlichen Plasmide mit Ampicillinresistenz aufgenommen hatten, wurden die Platten bei der Herstellung mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Sie wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im kleinen Maßstab**

Von den, auf Agarplatten herangezogenen, Bakterienkolonien wurden 1 ml – Übernachtskulturen in Selektivmedium (80 µg/ml Ampicillin) hergestellt. Die Isolation von Plasmid – DNA aus Bakterien im kleinen Maßstab erfolgte nach dem „Quick-and-dirty“ – Protokoll nach Ausubel [127].

### **3.1.9 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im großen Maßstab**

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien im großen Maßstab erfolgte mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) ausgehend von 100 ml Übernachtskulturen in Selektivmedium (80 µg/ml Ampicillin). Alle Schritte erfolgten laut Herstellerprotokoll.

## **3.2 Zellkulturmethoden**

Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen, ggf. zusätzlich unter S2-Bedingungen für Virusarbeiten, an einer Zellkulturwerkbank. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Inkubatoren kultiviert.

### 3.2.1 Isolation von primäre Chondrozyten

Die Isolation von primären Chondrozyten, sowohl vom Kaninchen als auch human, erfolgte aus Knorpelbiopsien wie in Ueblacker et al. beschrieben [126].

Um das Entstehen pathogener Viren durch Rekombination auszuschließen wurden humane Chondrozyten vor der lentiviralen Infektion mittels PCR auf das Vorhandensein von *gag*- bzw. *env*-Sequenzen überprüft.

Die Knorpelbiopsien der Kaninchen wurden von Fr. G. Wexel aus dem Kniegelenk weiblicher, weißer Neuseeländer mit einem Durchschnittsgewicht von circa 3,5 kg entnommen. Die Anästhesie wurde durch die intravenöse Injektion von 10 mg/kg Propofol eingeleitet und nach der Intubation mit der intravenösen Gabe von 1,5 mg/kg/h Propofol und 0,05 mg/kg Fentanyl aufrechterhalten. Die Kaninchen wurden mit 100% Sauerstoff beatmet und zur intraoperativen Antibiose wurde 0,5 ml Borgal® 24% (Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) intravenös verabreicht. Das rechte Kniegelenk wurde zunächst rasiert und desinfiziert und durch eine mediale, parapatellare Arthrotomie unter sterilen Bedingungen geöffnet. Die Patelle wurde lateral verschoben und kleine Knorpelstücke wurden mit dem Skalpell aus der Trochlea entnommen. Anschließend wurde das Gelenk wieder geschlossen. Zur postoperativen Analgesie wurde über drei Tage 5 mg/kg Carprofen einmal täglich und 0,025 mg/kg Buprenorphin zweimal täglich subkutan verabreicht.

### 3.2.2 Isolation von mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens

Die Isolation der mesenchymalen Stammzellen des Kaninchen erfolgte aus dem Femur von weißen Neuseeländern nach Huang et al [47]. Die isolierten Zellen wurden gezählt und in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen je 15 cm Platte ausgelegt. Nach circa sieben bis zehn Tagen waren die Zellen konfluent.

### 3.2.3 Kultur von Zelllinien und Primärzellen

Bevor Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal, bzw. Stammzellen (MSC) zweimal, mit 1 x PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin 0,25 %, bzw. 0,05 % für MSCs, abgelöst. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Trypsinaktivität

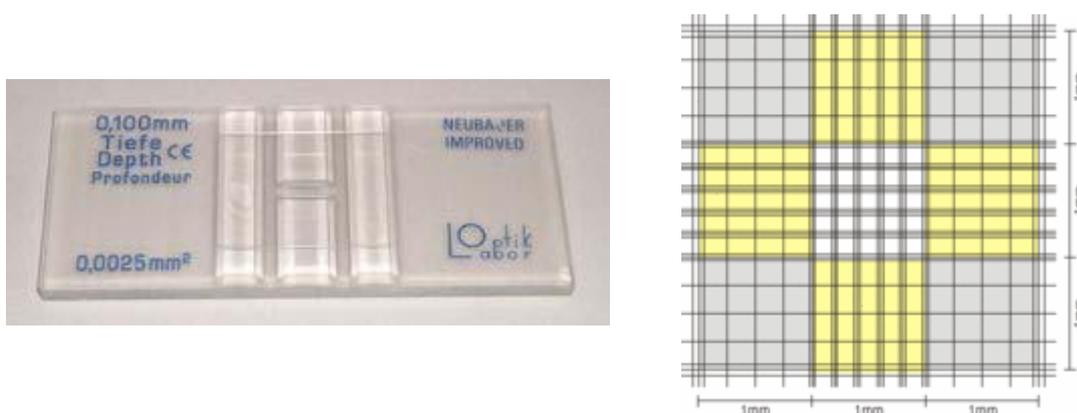
abgestoppt. Im gewünschten Verhältnis wurden die Zellen auf neue Platten aufgeteilt und weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zusammensetzung verwendeter Medien gibt Tabelle 3-3 wieder.

**Tabelle 3-3: Medienzusammensetzung**

| Zellen                                         | Mediumzusammensetzung                                                                                         |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 293 T und CMS5                                 | D-MEM<br>10% FKS<br>1% Glutamin                                                                               |
| ATDC5                                          | ½ D-MEM<br>½ Ham's F12<br>10% FKS<br>1% Glutamin                                                              |
| Chondrozyten (Kaninchen und human)             | D-MEM<br>10% FKS<br>1% Penicillin/Streptomycin                                                                |
| Mesenchymale Stammzellen (Kaninchen und human) | Advanced D-MEM<br>10% FKS (Lonza)<br>1% Antibiotic/Antimycotic<br>1% Non-essential amino acids<br>1% Glutamin |

### 3.2.3.1 Aussaat einer bestimmten Zellzahl

Zur Aussaat einer bestimmten Zellzahl wurden die Zellen abgelöst und in Medium resuspendiert. 15 µl der Resuspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben.



**Abbildung 3-1: Neubauer Zählkammer und Gitterübersicht zur Bestimmung der Zellzahl**

Ein grau unterlegtes Feld entspricht einem definierten Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> und erlaubt somit die Berechnung der Zellzahl [www.wikipedia.de].

Da jedes grau unterlegte Feld in Abbildung 3-1 einem Volumen von  $0,1 \text{ mm}^3$  entspricht wurde die Zellzahl je Milliliter wie folgt bestimmt:

Zellzahl/ml = Durchschnittliche Zellzahl je grau unterlegtem Feld  $\times 10^4$  [128].

Es wurden mindestens drei grau unterlegte Felder gezählt.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen vor dem Zählen mit Trypanblau gefärbt. Tote Zellen können den Farbstoff nicht aus der Zelle ausschleusen und erscheinen somit bei mikroskopischer Betrachtung blau.

Die  $15 \mu\text{l}$  Zellsuspension werden für die Anfärbung mit  $15 \mu\text{l}$  Trypanblau (Sigma-Aldrich, Steinheim) vermischt. Die Zellzahl wird wie beschrieben, jedoch unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, bestimmt.

### 3.2.3.2 Einfrieren von Zellen

Wie beschrieben (3.2.3) wurden die Zellen abgelöst und resuspendiert. In einem  $15 \text{ ml}$  Reaktionsgefäß wurden die Zellen für drei Minuten bei  $1200 \text{ rpm}$  zentrifugiert. Anschließend konnte das Pellet in  $900 \mu\text{l}$  FKS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) aufgenommen und in ein  $1,8 \text{ ml}$  Cryogefäß (Nunc, Wiesbaden), in das bereits  $100 \mu\text{l}$  DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) vorgelegt wurden, überführt werden. Um ein langsames Abkühlen von einem Grad je Minute zu ermöglichen wurden die Cryogefäße in einer mit Isopropanol gefüllten Cryobox bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, bis die Zellen am nächsten Tag in einen Stickstofftank umgestellt wurden.

### 3.2.3.3 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad erwärmt. In einer Zellkulturschale wurde bereits geeignetes Medium (Tabelle 3-3) vorgelegt. Die Wahl der Schalengröße hing dabei von der eingefrorenen Zellzahl ab. Die Zellsuspension wurde anschließend zu dem vorgelegten Medium gegeben und gemischt. Der Auftau-Prozess sollte schnellstmöglich verlaufen, um eine Schädigung der Zellen durch das in der Zellsuspension enthaltene DMSO zu verhindern. Letzte DMSO Reste wurden durch einen Mediumwechsel am darauffolgenden Tag entfernt.

### 3.2.3.4 Kultur in Fibrinclots

Neben der Kultur im Monolayer wurden Chondrozyten auch in dreidimensionalen Sphären kultiviert. Die Zellen wurden dazu, wie beschrieben, abgelöst und gezählt. Für die Herstellung eines Fibrinclots wurden 300000 Zellen in einem 15 ml Reaktionsgefäß pelletiert (zentrifugieren für drei Minuten bei 1200 rpm). Das Pellet wurde anschließend in 17 µl Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 25 µl Fibrinkleber (TISSUCOL® Kit Baxter AG, Vienna, Austria) überführt. In einer 24-well-Platte wurde für jeden Clot ein Well mit 8 µl Thrombin (TISSUCOL® Kit Baxter AG, Vienna, Austria) vorbereitet. Die 42 µl Zell-Fibrin-Suspension wurden schließlich vorsichtig auf das Thrombin getropft. Nach circa einer halben Stunde waren die Fibrinclots ausgehärtet und konnten mit 1 ml Medium je Well überschichtet werden.

### 3.2.4 Lentivirus-Produktion durch Kotransfektion in 293T-Zellen

Zur Produktion von pseudotypisierten, selbstinaktivierenden Lentiviren erfolgte die Kotransfektion dreier Verpackungsplasmide und eines Transferplasmids in 293T-Zellen. Die Zellen wurden dafür am Vortag in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen je 10 cm Zellkulturschale ausgelegt. Am Tag der Kotransfektion erfolgte morgens ein Mediumwechsel.

Ein Kotransfektionsansatz bestand aus 10 µg eines beliebigen Transferplasmids (Abbildung 1-10), 6,6 µg pMD.GP, 5,0 µg pRSV-rev und 0,5 µl pHCMV.G (Abbildung 1-9) [40]. Dem DNA-Mix wurden 61 µl  $\text{CaCl}_2$  und 409 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde langsam in ein 15 ml Polystyrengefäß mit 500 µl 2x HBS-Puffer getropft und durch Erzeugen von Blasen gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Kotransfektionsansatz auf das Medium der ausgelegten Zellen aufgetropft und durch leichtes Schwenken gemischt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium durch 4 ml frisches Medium ersetzt. Circa 24 Stunden später wurde der virushaltige Überstand mit einer Spritze durch einen 0,45 µm Filter (Josef Peske oHG, Aindling-Pichl) gefiltert um Zellbestandteile zu beseitigen und anschließend in Aliquots in 1,8 ml Cryogefäßen (Nunc, Wiesbaden) bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die Quantifikation der lentiviralen Partikel je Milliliter erfolgte mit dem Quick Titer™ Lentivirus Quantitation Kit (Cell Biolabs Inc. San Diego, USA) analog der Herstellerangaben.

### 3.2.5 Lentivirale Infektion von Zelllinien und Primärzellen

Am Vortag der Infektion wurden  $3 \times 10^5$  (CMS5, ATDC5) bzw.  $1 \times 10^5$  (Chondrozyten, Mesenchymale Stammzellen) Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgelegt. Für Infektionen in kleineren oder größeren Zellkulturgefäßen wurde die Zellzahl entsprechend der Flächenverhältnisse angepasst. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und 1 ml lentiviraler Überstand und 8 µg/ml Polybren (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) auf die Zellen gegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurde zusätzliches Medium auf die Zellen gegeben. Die Infektionsdauer für mesenchymale Stammzellen betrug, aufgrund der geringeren Infizierbarkeit 24 h, wobei das Infektionsvolumen auf 2,5 ml erhöht wurde.

### 3.2.6 Induktion des Tet on – Systems durch Doxzyklin

Die tetrazyklin-abhängige Genexpression wurde durch Zugabe des Tetrazyklinderivats Doxzyklin (Sigma-Aldrich, Steinheim) induziert. Begonnen wurde mit der Zugabe etwa fünf Tage vor der Analyse der infizierten Zellen. Die Doxzyklin-Konzentration wurde auch nach Mediumwechsel und Passagieren der Zellen beibehalten.

Durch Lösen des Doxzyklin-Hyclats in ddH<sub>2</sub>O wurden Stocks mit einer Konzentration von 1 µg/µl (für die *in vitro* Anwendung) bzw. 50 µg/µl (*in vivo* Anwendung) hergestellt und in Aliquots bei -20° gelagert. Die verwendete Endkonzentration *in vitro* betrug 1 µg/ml. Für die *in vivo* Anwendung betrug die Endkonzentration im Trinkwasser 200 µg/ml.

### 3.2.7 Differenzierungsassays

Die Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen in zwei Hauptrichtungen – Osteogenese und Chondrogenese – vor und nach der lentiviralen Infektion wurde durch Differenzierungsassays untersucht. Die Durchführung erfolgte wie von Neuhuber et al. beschrieben [129]. Die Zusammensetzung der benötigten Differenzierungsmedien ist in Tabelle 3-4 beschrieben.

Tabelle 3-4: Zusammensetzung der Differenzierungsmedien

| <b>Differenzierungassay</b> | <b>Mediumzusammensetzung</b>                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Chondrogenese</b>        | DMEM (4,5 mg/ml Glukose)<br>1% FKS (Lonza)<br>1% Penicillin/ Streptomycin<br>50 µg/ml Ascorbinsäure-2-Phosphat<br>40 µg/ml Prolin<br>2 mM Pyruvat<br>1x ITS <sup>+</sup><br>100 nM Dexamethason<br>10 ng/ml TGF-β3<br>200 ng/ml BMP-2 |
| <b>Osteogenese</b>          | DMEM (1 mg/ml Glukose)<br>10% FKS (Lonza)<br>1% Penicillin/ Streptomycin<br>100 nM Dexamethason<br>50 µM Ascorbinsäure-2-Phosphat<br>10 mM β-Glyzerolphosphat                                                                         |

### 3.2.8 Implantation *ex vivo* transduzierter Kaninchenchondrozyten

Für alle durchgeführten Versuche lag ein genehmigter Tierversuchsantrag vor.

Zur Untersuchung der Funktionalität des lentiviralen Tet on – Systems zur Genexpression *in vivo* wurden zunächst Kaninchenchondrozyten, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, isoliert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen je 6 cm Zellkulturschale ausgelegt und analog zu Abschnitt 3.2.5 mit lentiviralen Überständen infiziert.

Für einen Doppeldefekt wurden  $1 \times 10^5$  TREBMP-2SFrT<sub>A</sub> infizierte Zellen, bzw. uninfizierte Zellen für Kontrolltiere, pelletiert und in 34 µl Medium resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl Fibrinkleberlösung (TISSUCOL® Kit Baxter AG, Vienna, Austria) zugegeben.

Zeitgleich wurde bei jedem Kaninchen ein Doppeldefekt gesetzt wie von Vogt et al. beschrieben [78]. Die Anästhesie verlief analog zur Biospie-Entnahme (Abschnitt 3.2.1). Die laterale parapatellare Arthrotomie wurde zur Clot-Implantation am linken Knie durchgeführt. Mit einem Stahlbohrer (3,6 mm im Durchmesser) und einer Abstandsvorrichtung wurden zwei übereinstimmende osteochondrale Defekte (3 mm tief) in dem Patellalaufleger gesetzt. Die Defekte wurden mit Kochsalzlösung gespült. In jeden Defekt wurden zunächst 8 µl Thrombin vorgelegt und anschließend die Zell-Fibrinkleber-Lösung zugegeben. Nach dem Aushärten des Fibrinklebers wurde das Gelenk wieder verschlossen.

Nach vier Wochen wurden je Tier zwei Knochenscheiben mit jeweils einem Defekt ausgesägt. Eine Knochenscheibe wurde für eine Woche in 100% Methanol bei 4°C fixiert und durch achtwöchige

Inkubation in 7% EDTA für die histologische Aufarbeitung entkalkt. Nach den ersten vier Wochen erfolgte eine Zwischenfixierung für zwei Tage in 100% Methanol. Der zweite Defekt wurde, wie beschrieben, für RNA-Isolation und BMP-2 Quantifikation verwendet [78].

### 3.3 Methoden zur Analyse

#### 3.3.1 Quantifizierung der Genexpression durch quantitative Real-time RT-PCR

Die Quantifizierung der Genexpression auf mRNA Ebene erfolgt mittels quantitativer Real time PCR (qRT-PCR).

Von jeder Probe wurde, neben der Transgenexpression, zusätzlich die Expression des Haushaltgens 18 S zur Normierung bestimmt.

Für die absolute Quantifizierung wurden zusätzlich zu den Proben Standardgeraden mit den Konzentrationen 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 und 0,03125 ng Gesamt cDNA (18S) bzw. 20, 10, 5, 2, 1 und 0,5 ng Gesamt cDNA (Zielgen) aufgetragen und gemessen. Alle Proben wurden zur Messung 1:100 verdünnt. Für die 18 S Messung wurden 2 µl, für die Zielgen-Messung 10 µl, der Verdünnung aufgetragen und gemessen.

Zur relativen Quantifizierung wurden die zu vermessenden Proben für die 18 S Messung 1:500, für die BMP-2 Messung 1:100 verdünnt. Jeweils 10 µl der Verdünnungen wurden in Triplikaten eingesetzt.

Zu allen Ansätzen wurden 900 nM *reverse* und *forward* Primer, 200 nM Sonde und 12,5 µl Mastermix (qPCR™ Mastermix Plus, Eurogentec, Köln) zugegeben. Die Assays für BMP-2 (TaqMan® Gene Expression Assay, ready-to-use Primer und Probe Mischung) und 18S (Human 18S rRNA (20x), Pre-Developed TaqMan® Assay Reagent) wurden von Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen.

Die *made-to-order* Primer-Probe für Kollagen Typ II wurde ebenfalls von Applied Biosystems hergestellt und setzte sich aus folgenden Primern und Probe zusammen: Forward: GGACGTTTCAGGCGAAACTG, Reverse: CAAAGGCGCACATGTTCGAT, Probe: Fam-CCCTGCTGGTCCTCC-NFQ.

Die Reaktionen wurden im TaqMan 7900HT ABI Prism (Applied Biosystems, Foster City, USA) in 96-well Platten (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plates) durchgeführt. Die Messung und

Auswertung erfolgte mit der Sequence Detection Software SDS2.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgte nach der 2E-ddCT-Methode [130].

### 3.3.2 DNA-Quantifikation durch PicoGreen Assay

Die Quantifikation der DNA-Konzentration zur Normierung der GAG-Quantifizierung der Chondrogenese-Auswertung erfolgte mit Hilfe des Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kits der Firma Invitrogen. Vorbereitend wurde das PicoGreen Reagenz 1:200 in 1x TE-Puffer verdünnt. Der  $\lambda$  – Standard wurde 1:50 verdünnt, was einer Endkonzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  entspricht. Ausgehend von dieser Verdünnung wurden eine Standard-Verdünnungsreihe pipettiert (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Pipettierschema zur Herstellung des PicoGreen-Standards

| <i>Konzentration<br/>[<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>]</i> | <i><math>\mu\text{l}</math> <math>\lambda</math>-Verdünnung</i> | <i><math>\mu\text{l}</math> TE-Puffer</i> |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 2                                                             | 400                                                             | 0                                         |
| 1                                                             | 200                                                             | 200                                       |
| 0,5                                                           | 100                                                             | 300                                       |
| 0,2                                                           | 40                                                              | 360                                       |
| 0,1                                                           | 20                                                              | 380                                       |
| 0,05                                                          | 10                                                              | 390                                       |
| 0,02                                                          | 4                                                               | 396                                       |
| 0                                                             | 0                                                               | 400                                       |

Jeweils 100  $\mu\text{l}$  der 1:10 und 1:100 verdünnten Proben sowie des Standards wurden auf eine schwarze 96-well-Platte gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  der PicoGreen-Verdünnung in jedes Well. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Fluoreszenz nach Anregung bei 485 nm bei einer Emissionswellenlänge von 538 nm gemessen werden. Der DNA – Gehalt der Proben wurde anhand der Standardgerade bestimmt.

### 3.3.3 Durchlicht - und Fluoreszenzmikroskopie

Von infizierten und ggf. durch Doxyzyklingabe induzierten Zellen wurden sowohl Durchlicht- als auch Fluoreszenzaufnahmen bei 100-facher Gesamtvergrößerung angefertigt. Die Belichtungszeit für Fluoreszenzaufnahmen betrug 12 Sekunden.

### 3.3.4 Durchflusszytometrische Analyse der eGFP Expression

Die Analyse eGFP exprimierender Zellen erfolgte durchflusszytometrisch durch FACS-Messung. Sowohl Zellgröße (*forward scatter*) und Granularität (*side scatter*), als auch relative Fluoreszenzstärke (FL1, FL2, FL3) werden dabei bestimmt.

In einem Flüssigkeitsstrom werden die Zellen einem Argonstrahl ausgesetzt, welcher durch die durchfließenden Zellen unterbrochen wird. Durch das Ausmaß der Streuung können Angaben zu Zellgröße und Granularität gemacht werden. Zusätzlich wird die Fluoreszenz von eGFP bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und die Emission bei 510 nm gemessen.

Zur Messung wurden circa  $1 \times 10^6$  Zellen in einem FACS-Röhrchen pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 1x PBS und einmal mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 500  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. Unmittelbar vor der Messung wurde Propidiumiodid zugegeben (Endkonzentration = 1  $\mu$ g/ml) und 20000 Ereignisse gemessen. Durchgeführt wurden die FACS-Messungen von Katja Dumler.

Die Messung der Prozentzahl an eGFP exprimierenden Zellen erlaubt, nach lentiviraler Infektion von CMS5-Zellen mit LVpHIV7SFeGFP, die Ermittlung der Konzentration an transduzierenden bzw. infizierenden Einheiten:

$$\text{Virustiter [TU/ml]} = \frac{(\% \text{ positive Zellen} \times \text{ausgesäte Zellzahl} : \text{Verdünnungen}) : 100}{\text{Infektionsvolumen [ml]}}$$

### 3.3.5 Quantifikation der BMP-2 Expression durch BMP-2 ELISA

Die Quantifikation von sekretiertem BMP-2 Protein in Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA (Quantikine Immunoassay BMP-2 Kit, R&D Systems, Wiesbaden). Je Ansatz wurden circa 1 ml Zellkulturüberstand abgenommen, für 7 min bei 7000 rpm zentrifugiert, um Zellbestandteile zu entfernen, und nach dem Überführen in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß bis zur Messung bei -80°C gelagert. Alle nachfolgenden Schritte wurden wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt.

### 3.3.6 Detektion von Proteoglykanen durch Alzianblau-Färbung

Der Nachweis von gebildeten Proteoglykanen erfolgte mittels Alzianblau-Färbung wie durch Akiyama beschrieben [131]. 21 bzw. 17 Tage vor der Färbung wurden dazu  $4 \times 10^4$  Chondrozyten im 12-well oder  $1 \times 10^5$  ATDC5-Zellen im 6-well ausgelegt und in Medium mit 37,5 µg/ml Ascorbinsäure kultiviert [132].

### 3.3.7 Untersuchung des Differenzierungspotentials von IMSCs durch Differenzierungsassays

Die Auswertung der wie im Abschnitt 3.2.7 beschrieben kultivierten Zellen erfolgte nach Neuhuber et al. [129].

#### 3.3.7.1 Osteogeneseauswertung

Die Calcium-Konzentration, produziert durch Zellen nach osteogener Differenzierung, wurde mittels Calcium CPC Liquicolor Kit (Stanbio, Boerne) analog zum Herstellerprotokoll quantifiziert und mit der Calcium-Produktion uninduzierter Kontrollzellen verglichen.

Die im Zuge der Osteogenese stattgefunden Mineralisierung wurde zusätzlich anhand der Alizarinrot-Färbung visualisiert. Dafür wurden die differenzierten Zellen mit 70% igem, eiskaltem Ethanol für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 2% iger Alizarinrot S Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Wasser gewaschen und Fotos angefertigt.

#### 3.3.7.2 Chondrogeneseauswertung

Die Pelletkulturen nach chondrogener Differenzierung wurden zur Chondrogeneseauswertung zweimal mit PBS gewaschen und, nach dem Entfernen des Überstands, die getrockneten Pellets bis zur Durchführung des Papainverdaus bei -20°C eingefroren.

Papain (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde in Verdünnungspuffer zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Davon wurden 200 µl zu jedem Pellet gegeben. Anschließend wurden die Proben gevortext und über Nacht bei 60°C verdaut.

Zur Chondroitin-Quantifizierung erfolgte die Zugabe von 200 µl DMMB-Lösung zu 50 µl eines jeden Ansatzes und eines Chondroitin-6-Sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim) Standards (0,1 bis 0,8 µg/ml, in Verdünnungspuffer). Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Die Chondroitinmenge wurde auf den DNA-Gehalt normiert. Dieser wurde mittels Quanti-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Karlsruhe), analog zum Herstellerprotokoll, gemessen.

### **3.3.8 Histologische Analyse des Reparaturgewebes**

Die fixierten und entkalkten Knochenscheiben (Absatz 3.2.8) wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 5 µm Paraffinschnitte, quer, von der proximalen zur distalen Seite des Patellarauflagers, hergestellt, welche anschließend von Frau Ziegleder (Anatomische Anstalt der LMU) mit Hämatoxylin-Eosin (HE) bzw. Alzianblau gefärbt wurden.

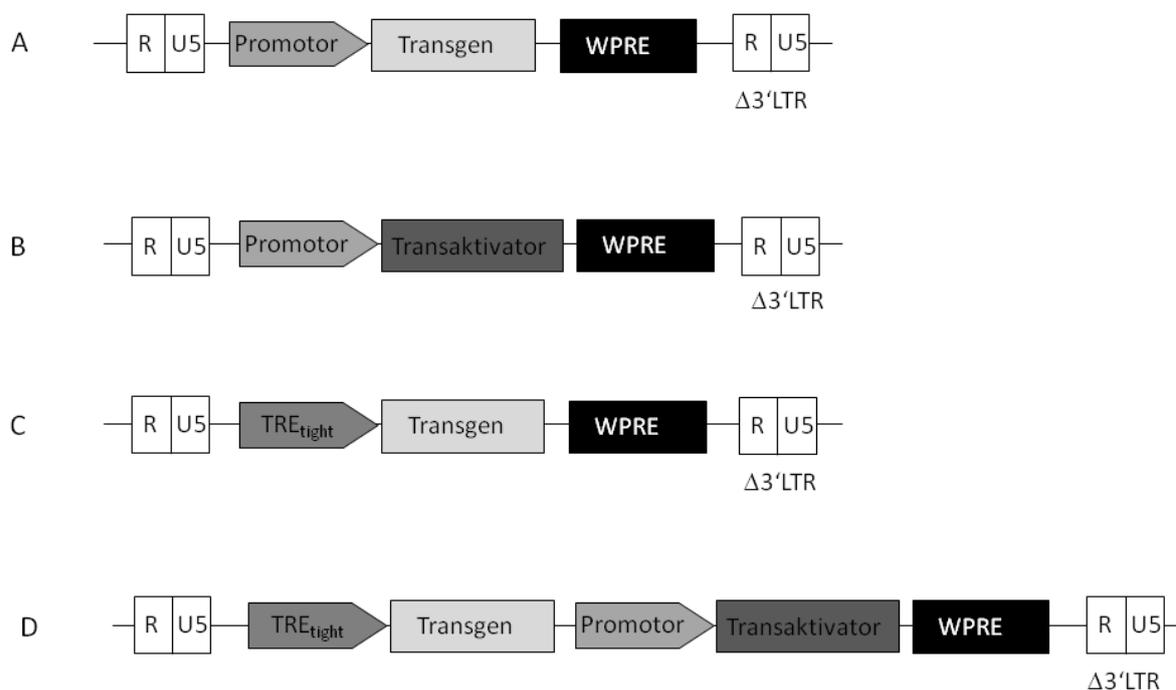
### **3.4 Statistische Auswertung**

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Experimente dreifach durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Der Vergleich uninduzierter gegenüber induzierter Werte erfolgte mittels t-test. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angenommen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Klonierung von Vektoren zur lentiviralen Expression gewünschter Transgene

Zur Durchführung des angestrebten Projekts wurden Konstrukte benötigt, die das eGFP-, BMP-2 oder WISP-3 Transgen entweder konstitutiv oder reguliert, unter Kontrolle des Tet on – Systems, exprimieren (Abbildung 4-1).



**Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Proviren zur konstitutiven und regulierten, lentiviralen Expression gewünschter Transgene**

(A) Provirus zur konstitutiven, lentiviralen Expression. (B) Provirus zur Expression des Transaktivators des lentiviralen Zwei-Vektor Tet on – Systems. (C) Response-Provirus für das lentivirale Zwei-Vektor Tet on – System zur regulierten Expression des Transgens. (D) Aufbau des Ein-Vektor Tet on – Proviruses. Zum Einsatz kamen der *immediate early* Cytomegalievirus (CMV) -, der Phosphoglyzeratkinase (PGK) -, und der *spleen focus forming virus* (SF) – Promotor, sowie die Transgene eGFP, BMP-2 und WISP-3. R = Repeat region, U5 = Unique 5' region, WPRE = Woodchuck post-transcriptional regulatory element, TRE<sub>tight</sub> = tetracycline responsive element der zweiten Generation.

Die Expression soll dabei durch verschiedene Virus- und Haushaltsgenpromotoren kontrolliert werden. Das Einbringen der gewünschten Transgene in den pHIV-7 Backbone ermöglichte deren lentivirale Expression. Alle entstandenen Konstrukte wurden durch Testverdaus auf ihre Richtigkeit überprüft und ggf. zusätzlich sequenziert. Die verwendeten Enzyme und Primer sind im Anhang aufgeführt.

#### 4.1.1 Vektoren zur regulierten Expression des Reportergens eGFP

Um die Funktionsfähigkeit des Tet on – Systems zu überprüfen wurden zunächst Vektoren konstruiert, welche das leicht nachzuweisende Reportergen eGFP reguliert exprimieren.

Das Plasmid pHIV7TREeGFP dient als Responsekomponente für das Zwei – Vektor – System und war bereits vorhanden. Ausgehend davon konnten die entsprechenden Ein – Vektor – Konstrukte – pHIV7TREeGFPSFrtTA und pHIV7TREeGFPPGKrtTA - kloniert werden.

Für pHIV7TREeGFPSFrtTA wurde pHIV7TREeGFP mit *XbaI* linearisiert und die SFrtTA-codierende Sequenz mit einem *XhoI* und *NheI* Doppelverdau aus pTSFrtTA isoliert. Alle Enden wurden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt. Das 1499 bp große Insertfragment konnte anschließend durch *blunt end* – Ligation mit dem Vektor verbunden werden.

Da keine entsprechenden Schnittstellen vorhanden waren, konnte das PGKrtTA – Insert für pHIV7TREeGFPPGKrtTA nur durch PCR mit den Primern PGKrtTAfw und PGKrtTArev aus dem Plasmid pHIV7PGKrtTA isoliert werden. Zur besseren Zugänglichkeit für Restriktionsenzyme wurden das 1340 bp große PCR-Fragment zunächst in den pJet – Vektor (Fermentas, St. Leon-Rot) kloniert. Aus diesem konnte das gewünschte Fragment durch Verdau mit *MluI* und *NheI* ausgeschnitten werden. Auch der Akzeptorvektor pHIV7TREeGFP wurde mit *MluI* und *NheI* verdaut und beide Fragmente wurden ligiert.

Die beiden Plasmide pHIV7PGKeGFP und pHIV7SFeGFP, die eine konstitutive eGFP Expression ermöglichen, dienten als Kontrolle und waren zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden.

#### 4.1.2 Vektoren zur regulierten und konstitutiven Expression des therapeutischen Transgens BMP-2

Auch das therapeutische Transgen BMP-2 sollte unter Kontrolle des Tet on – Systems gestellt werden. Das entsprechende Zwei – Vektor – Konstrukt pHIV7TREBMP-2 war bereits vorhanden und konnte für die Anwendung im Ein – Vektor – System modifiziert werden. Die SFrtTA-Sequenz konnte aus dem Plasmid pTSFrtTA durch Restriktionsverdau mit *XhoI* und *NheI* gewonnen werden. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms wurden alle Enden dieses 1499 bp große Fragment sowie des mit *NheI* linearisierten pHIV7TREBMP-2, aufgefüllt. Anschließend wurden Vektor und Insert ligiert.

Die Klonierung von pHIV7TREBMP-2PGKrtTA verlief wie für pHIV7TREeGFPPGKrtTA beschrieben.

Auch BMP-2 wurde zur Kontrolle konstitutiv exprimiert. Der Vektor pHIV7PGKBMP-2 entstand durch Ligation der durch Linearisierung von pHIV7PGKsmacollapse mit *XbaI* und Ausschneiden des BMP-2 Inserts aus pBulletBMP-2 ebenfalls mit *XbaI*, entstandenen Fragmente. pHIV7SFBMP-2 wurde bereits in eigenen Vorarbeiten hergestellt.

#### 4.1.3 Vektoren zur regulierten und konstitutiven Expression von WISP-3

Das WISP-3 Transgen mit Fc-Tag wurde aus dem Plasmid pHIV7PGKWISP-3 durch Isolation eines 1847 bp Fragment mit *XbaI* und *HindIII* isoliert und mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt. Nach Linearisieren von pHIV7TRE mit *BamHI* und Auffüllen wurde das Insert-Fragment in den Vektor ligiert. Der entstehende Vektor pHIV7TREWISP-3 wurde zusätzlich mit *MluI* und *NheI* geschnitten um den Vektor für das Ein – Vektor – System zu erhalten. Das PGKrtTA – Insert wurde mit *MluI* und *NheI* (1328 bp) aus pHIV-7PGKrtTA isoliert.

Für den Kontrollvektor pHIV7SFWISP-3 wurde WISP-3 wie oben beschreiben isoliert und aufgefüllt und in den mit *BamHI* linearisierten, aufgefüllten pHIV7SF eingebracht.

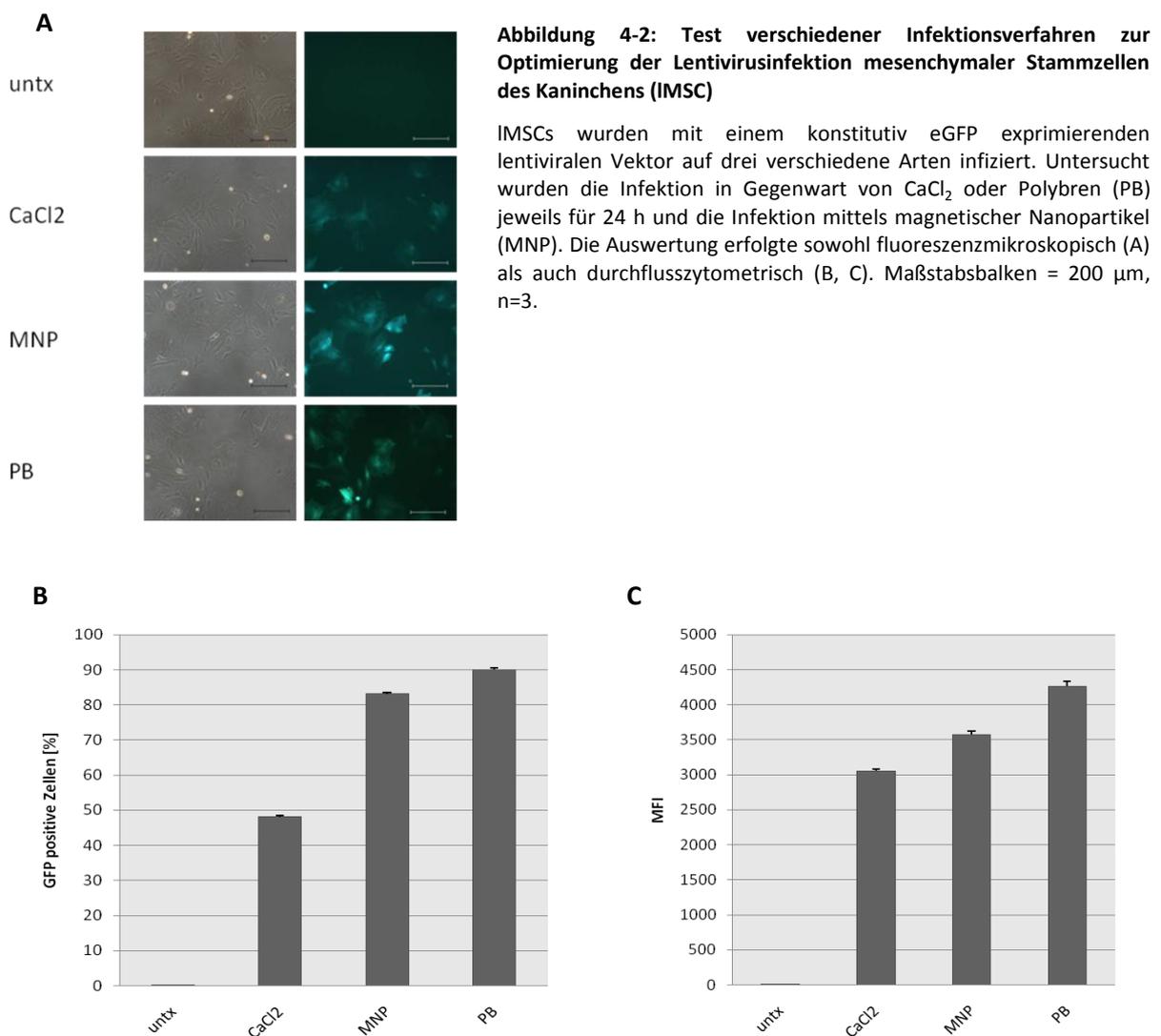
#### 4.1.4 Vektoren zur Expression des Transaktivators

Neben den durch die viralen CMV – oder SF – Promotor getriebenen Transaktivatoren, welche bereits vorhanden waren, sollte der Transaktivator zusätzlich unter Kontrolle des PGK – Promotors gestellt werden. Die Transaktivatorsequenz wurde aus pUHrt61-1 durch Verdau mit *EcoRI* und *BamHI* isoliert und mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und anschließend in den mit *BamHI* linearisierten, aufgefüllten pHIV7PGKsmacollapse ligiert. Diese Konstrukte dienen zur Anwendung im Zwei – Vektor – System.

## 4.2 Optimierung der Transduktionseffizienz mesenchymaler Stammzellen des Kaninchens gegenüber lentiviraler Vektoren

Für die gentherapeutische Verwendung zellbasierter Verfahren ist eine möglichst hohe Transduktionseffizienz der Zielzellen gegenüber dem jeweiligen Vektor nötig. Im Fall primärer Chondrozyten führt die konventionelle Infektion mit lentiviraler Expression in den meisten Fällen zu einer ausreichenden Transgenexpression. Mesenchymale Stammzellen hingegen sind gegenüber lentiviraler Vektoren weniger zugänglich.

Daher wurde, zunächst durch Vergleichen verschiedener Verfahren zur Infektion mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens, die bestmögliche Methode ermittelt welche im Folgenden als Standardmethode angewandt wurde.



Getestet wurden die Infektion in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  über einen Zeitraum von 24 h, die Infektion in Gegenwart von Polybren über 24 h und die Infektion mit Hilfe der magnetischen Nanopartikeln PEI – MAG2 (MNP) bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{g Fe/VP}$ .

Ein geeignetes Lentivirus für die Optimierung der Transduktionseffizienz ist LV $\text{SFFeGF}$ , da dieses Virus das Reporter-gen eGFP unter Kontrolle des viralen SF-Promotor stark überexprimiert und somit eine einfache Auswertung mittels FACS-Messung ermöglicht.

Am effizientesten hat sich die Infektion über 24 Stunden in Verbindung mit Polybren erwiesen. Auf diese Weise konnten 90 % der Zellen ( $90,0 \pm 0,6$  %) durch lentivirale Vektoren infiziert werden und eine mittlere Fluoreszenzintensität von 4265 ( $4265,2 \pm 64,8$ ) erreicht werden. Die Infektion mittels MNP ( $83,1 \pm 0,4$  %, MFI  $3574,2 \pm 53,5$ ) und  $\text{CaCl}_2$  ( $48,1 \pm 0,4$  %, MFI  $3054,1 \pm 24,8$ ) waren geringfügig weniger effizient.

#### **4.3 Analyse und Optimierung von lentiviral-vermittelter, Doxyzyklin-induzierter Genexpression *in vitro***

Zunächst war das Ziel die lentiviral-vermittelte Genexpression unter Kontrolle des Tet on – Systems zu optimieren. Konstrukte mit verschiedenen Promotoren sollten Aufschluss geben, welcher Promotor – getestet wurden der *immediate early* Zytomegalieviruspromotor (CMV = C), der Phospho-Glyzerat-Kinase-Promotor (PGK = P) sowie der *spleen focus-forming-virus*-Promotor (SF = S) – am geeignetsten ist zur Expression des Transaktivators.

Die Zellen wurden zur Optimierung mit eGFP kodierenden lentiviralen Überständen infiziert. Die Messungen erfolgten nachdem das Tet on – System circa fünf Tage lang durch Zugabe von 1  $\mu\text{g/ml}$  Doxyzyklin induziert wurden.

Entweder erfolgte die Koinfektion dieser Transaktivator-Konstrukte mit Response-Konstrukten verschiedener Transgene (TREeGFP = TE/ TREBMP-2 = TB/ TREWISP-3 = TW) zur Untersuchung des Zwei – Vektor – Systems, oder die Infektion mit den analogen Ein – Vektor – Konstrukten (TREeGFPSFrtTA = TES/ TREeGFPPGKrtTA = TEP/ TREBMP-2SFrtTA = TBS/ TREBMP-2PGKrtTA = TBP/ TREWISP-3PGKrtTA = TWP).

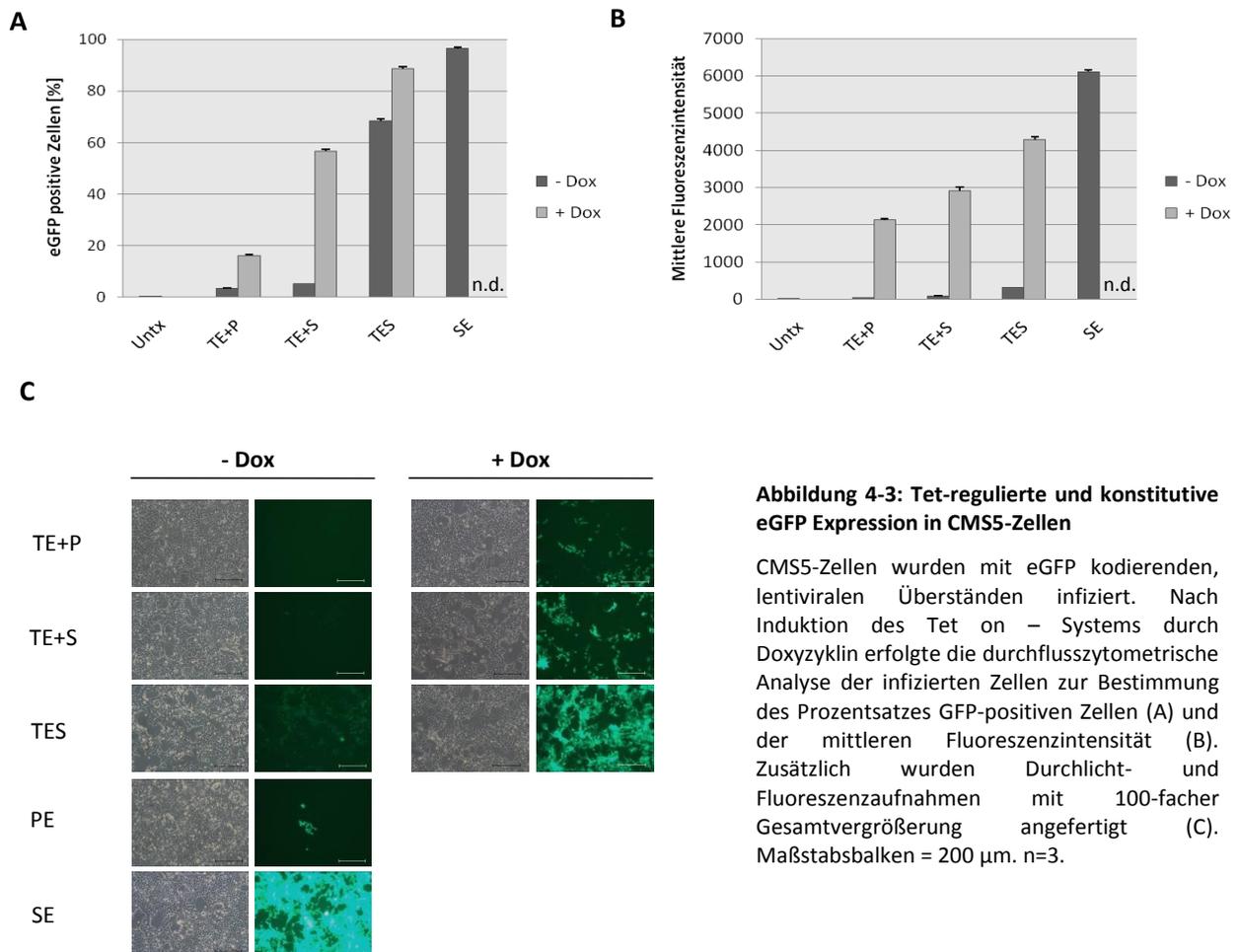
Die Tetrazyklin-vermittelte Transgenexpression wurde zur direkt getriebenen Expression (SFeGFP = SE/ PGKeGFP = PE/ SFBMP-2 = SB/ PGKBMP-2 = PB/ SFWISP-3 = SW/ PGKWISP-3 = PW), welche parallel als Kontrolle mitgeführt wurde, in Relation gesetzt.

### 4.3.1 Tet-regulierte eGFP – Expression *in vitro*

Das eGFP Reportergen diente zur Untersuchung und Optimierung der Funktionalität des Tet on – Systems. Das Hauptaugenmerk lag auf der Induktion der Transgenexpression durch Zugabe von Doxyzyklin.

Die infizierten Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert, um den Prozentsatz an eGFP positiven Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität zu bestimmen. Untersucht wurden gut infizierbare CMS5-Zellen, chondrogene ATDC5-Zellen sowie primäre Kaninchenchondrozyten.

Erste Anhaltspunkte sollte die Infektion von CMS5-Zellen geben. Bei Verwendung des SE-Konstruktes konnte aufgrund der guten Infizierbarkeit der CMS5-Zellen bei nahezu allen Zellen eGFP Expression nachgewiesen werden (96,5±0,5 %, Abbildung 4-3 A).



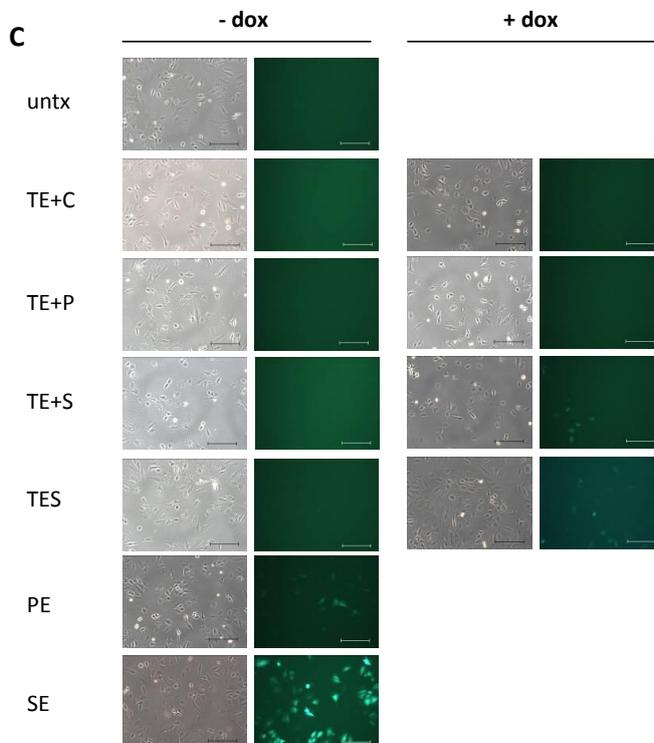
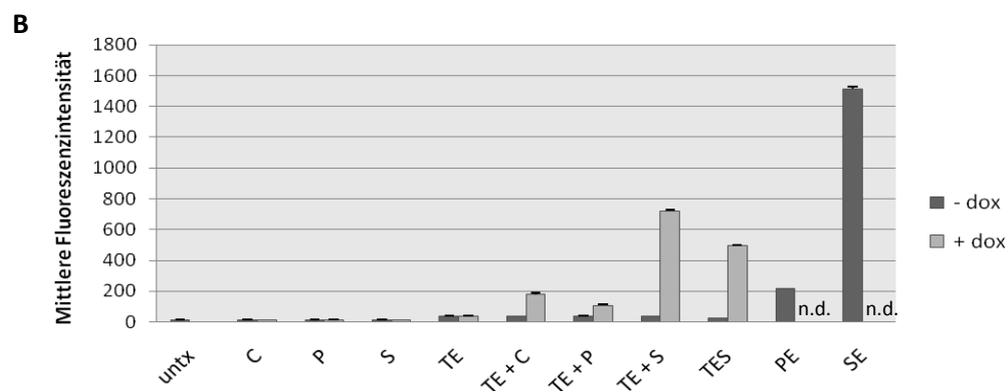
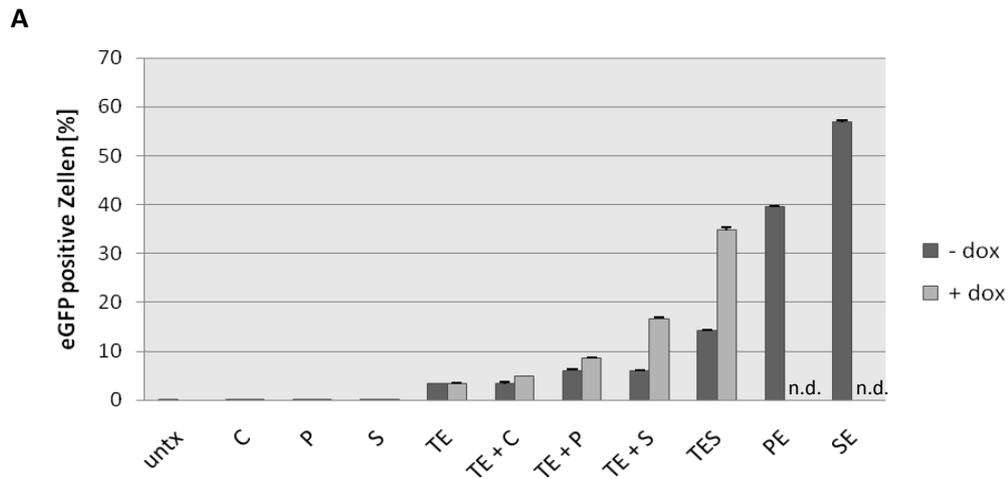
Die regulierbare eGFP Expression wurde mit den Konstrukten TE+P, TE+S (Zwei – Vektor – System) und TES (Ein – Vektor – System) evaluiert. Die stärkste Induktion auf CMS5-Zellen wurde mit dem Zwei – Vektor – System mit SF-Promotor getriebenem Transaktivator nach Zugabe von Doxyzyklin erreicht (TE+S 7,1±0,1-fache Induktion). TE+P und TES- infizierte Zellen zeigten eine 4,8-fache bzw. 1,3-fache Induktion (TE+P 4,8±0,4; TES 1,3±0,03).

Die stärkste Induktion der Fluoreszenzintensität nach Doxyzyklin-Zugabe konnte auf TE+P infizierten CMS5-Zellen gemessen werden (53,4±3,7-fache Induktion; Abbildung 4-3 B). Die Induktionsfaktoren TE+S und TES – infizierter Zellen betragen 39,3±7,9 und 13,6±0,4. Die höchste regulierbare Fluoreszenzintensität erreichten TES – infizierte Zellen mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 4283,8±81,4. Mit konstitutiver Expression wurde eine mittlere Fluoreszenzintensität von 6117,5±51,7 erreicht.

Auch fluoreszenzmikroskopisch konnte die doxyzyklin-abhängige Induktion der eGFP Expression bestätigt werden (Abbildung 4-3 C).

Nachfolgend sollte die Induzierbarkeit des Tet on – Systems auf chondrogenen Zellen, der ATDC5-Zelllinie, gezeigt werden. Bei dieser Zelllinie wurden weiterhin Konstrukte mit verschiedenen Promotoren im Vergleich verwendet.

Bezogen auf den Prozentsatz an eGFP positiven Zellen zeigten TE+S infizierte ATDC5-Zellen die stärkste Induktion (Zwei – Vektor – System; 2,8±0,1-fache Induktion; Abbildung 4-4 A), welche jedoch vergleichbar war mit der Induktion in TES infizierten Zellen (Ein – Vektor – System; 2,5±0,1-fache Induktion). Die maximale, absolute Prozentzahl an eGFP positiven Zellen kann gesteigert werden von 16,7%, bei Verwendung des Zwei – Vektor – Systems, auf 34,8% bei Verwendung des analogen Ein – Vektor – Systems. Die Prozentzahl an gemessenen eGFP positiven Zellen nach Induktion des Ein – Vektor – Systems liegt in Bereichen welche durch direkte Transgenexpression erreicht werden konnten (PE).



**Abbildung 4-4: Tet-regulierte und konstitutive eGFP Expression in ATDC5-Zellen**

Mit eGFP kodierenden Lentiviren infizierte und durch Doxyzyklin induzierte ATDC5 – Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Ermittelt wurden der Prozentsatz an GFP positiven Zellen (A) und die mittlere Fluoreszenzintensität (B). Weiteren Aufschluss über eGFP-Expression gaben Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (C). Maßstabsbalken = 200 µm. n=3.

Auch die Induktion der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) unter Kontrolle des Tet on – Systems ist auf ATDC5-Zellen vergleichbar zwischen Ein – und Zwei – Vektor – System ( $19,6\pm 0,5$ -fache bzw.  $20,1\pm 0,5$ -fache Induktion; Abbildung 4-4 B). Bei Verwendung des Ein – Vektor – Systems (TES) konnte absolut eine höhere MFI gemessen werden als bei direkter eGFP Expression unter Kontrolle des PGK – Promotors.

Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung infizierter und ggf. induzierter ATDC5- Zellen zeigte ebenfalls eine Induktion der eGFP Expression nach Doxyzyklin-Zugabe (Abbildung 4-4 C).

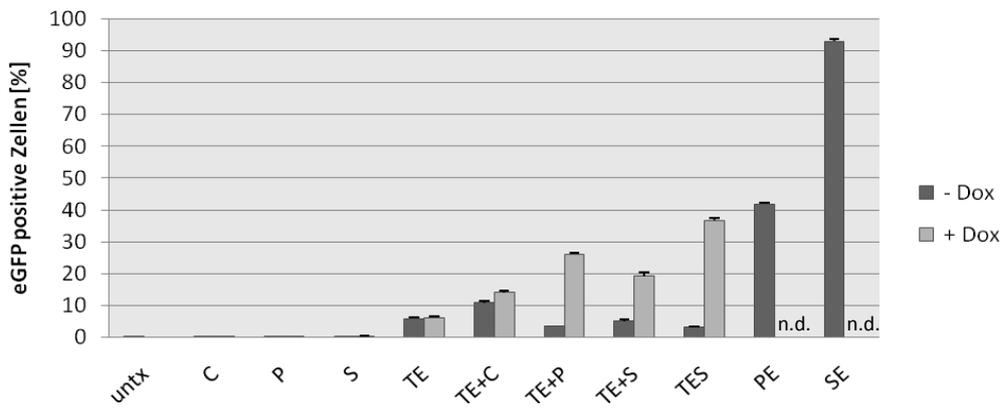
Anschließend wurde das System auf primäre Kaninchenchondrozyten übertragen. Der Promotorvergleich ergab keine bzw. eine sehr geringe Induzierbarkeit bei Verwendung des CMV – Promotor getriebenen Transaktivators (TE+C; Abbildung 4-5 A) hinsichtlich des Prozentsatzes GFP positiven Zellen. Mit dem PGK-Promotor getriebenen Konstrukt (TE+P) wurden 26,1%, mit dem SF-Promotor-Konstrukt (TE+S) 19,2% eGFP positive Zellen gemessen (TE+P =  $7,2\pm 0,3$ -fache, TE+S =  $3,8\pm 0,3$ -fache Induktion). Der höchste prozentuale Anteil an eGFP positiven Zellen auf Chondrozyten von 36,8%, wurde durch Verwendung des analogen Ein – Vektor – Systems erreicht (TES,  $12,1\pm 1,0$ -fache Induktion). Im Vergleich dazu führte konstitutive eGFP Expression zu 41,9% (PE) bzw. 93% (SE) positiven Zellen.

Die Induktion der mittleren Fluoreszenzintensität nach Infektion mit dem SF-Promotor getriebenen Transaktivator (TE+S =  $12,0\pm 0,6$ -fache Induktion; Abbildung 4-5 B) war stärker als nach Infektion mit dem PGK – Transaktivator (TE+P = 6,8-fache Induktion). Die stärkste, induzierbare eGFP Expression, mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 535,1 ( $535,1\pm 3,7$ ) kann durch das analoge Ein – Vektor – Konstrukt erreicht werden (TES,  $3,9\pm 1,1$ -fache Induktion). Im Vergleich dazu lag die MFI nach konstitutiver eGFP Expression bei  $792,5\pm 21,0$  (PE) bzw.  $6051,3\pm 133,7$  (SE).

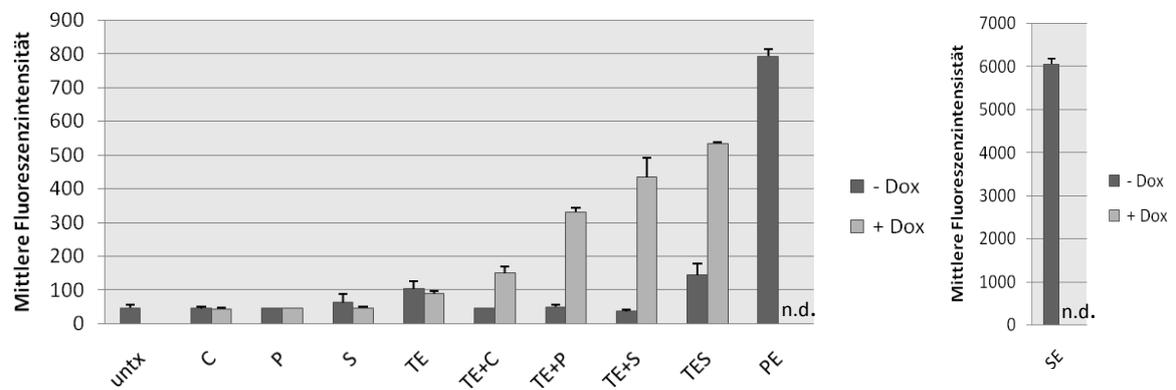
Auch bei primären Kaninchenchondrozyten zeigten sich nach Zugabe von Doxyzyklin eGFP exprimierende Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 4-5 C).

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Expression durch den SF-Promotor stärker ist als unter Kontrolle des PGK-Promotors und dass das Ein-Vektor-System gegenüber dem Zwei-Vektor-System zu bevorzugen ist.

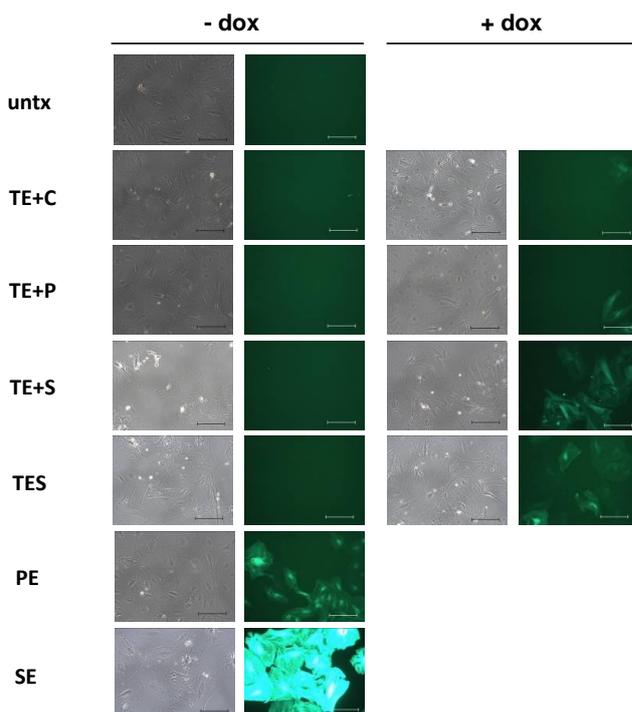
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 4-5: Tet-regulierte und konstitutive eGFP Expression in primären Kaninchenchondrozyten**

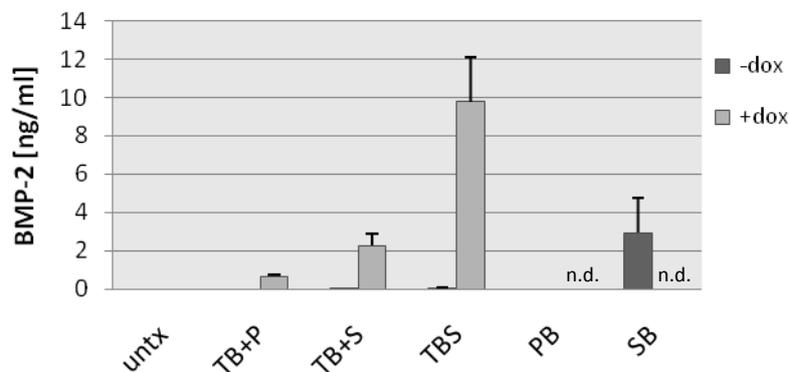
Primäre Kaninchenchondrozyten wurden mit eGFP kodierenden, lentiviralen Überständen infiziert. Die Zellen wurden nach Induktion mit Doxyzyklin durchflusszytometrisch, zur Bestimmung des Prozentsatzes GFP positiver Zellen (A) und der mittleren Fluoreszenzintensität (B), und fluoreszenzmikroskopisch (C) analysiert. Maßstabsbalken = 200 µm.

### 4.3.2 Tet-regulierte BMP-2 Expression *in vitro*

Unter Verwendung des gleichen Versuchsaufbaus wie in den vorangegangenen Experimenten wurde die Expression von BMP-2 durch das Ein – und Zwei – Vektor Tet on – System untersucht. Für die Expression des Transaktivators wurden der *spleen focus – forming virus* Promotor (TBS, TB+S) und der Phosphoglyzerat – Promotor (TBP, TB+P) verglichen.

Die Konzentration von sekretiertem BMP-2 wurde im Überstand mittels ELISA nachgewiesen.

Auch hierbei dienten leicht lentiviral infizierbare CMS5- Zellen zunächst zur Optimierung.

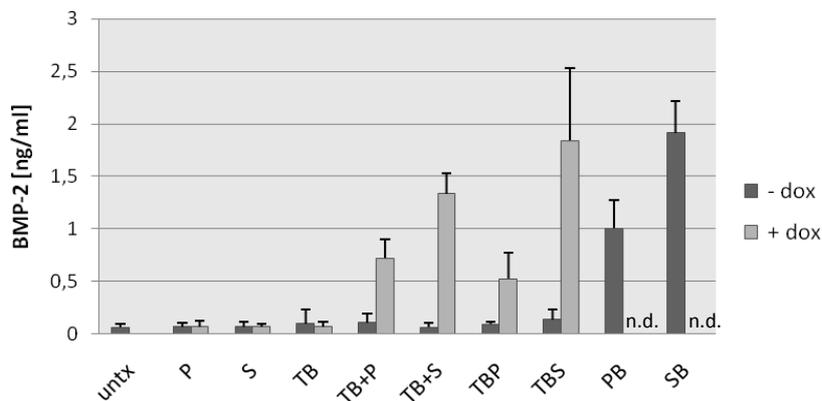


**Abbildung 4-6: Tet-regulierte und konstitutive BMP-2 Expression in CMS5-Zellen**

CMS5-Zellen wurden mit BMP-2 kodierenden, lentiviralen Überständen infiziert und mit 1 µg/ml Doxyzyklin induziert. Die Konzentration an sekretiertem BMP-2 wurde im Überstand nach 72 h Inkubation mittels ELISA quantifiziert. Die Messwerte wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 Stunden normiert. n=3.

Die stärkste Induktion tet-vermittelter BMP-2 Expression auf CMS5-Zellen wurde durch Infektion mit dem Ein – Vektor - Konstrukt mit SF – Promotor getriebenem Transaktivator (TBS) erreicht (388,7-fache Induktion). Die erreichte BMP-2 Menge nach Induktion lag dabei bei  $9,8 \pm 2,3$  ng/ml BMP-2 exprimiert durch  $1 \times 10^6$  Zellen in 24 h. Dieser Wert lag um Faktor 2,7 ( $2,7 \pm 0,4$ ) höher als die BMP-2 Menge, welche durch konstitutive BMP-2 Expression unter Kontrolle des SF – Promotors erreicht wurde (SB,  $2,9 \pm 1,8$  ng/ml,  $1 \times 10^6$  und 24 h). Die BMP-2 Sekretion bei Verwendung des Zwei – Vektor Tet on – Systems (TB+P und TB+S) war nach Induktion mit  $0,7 \pm 0,1$  bzw.  $2,3 \pm 0,6$  ng BMP-2/ml deutlich geringer verglichen mit dem Ein – Vektor – System (Abbildung 4-6).

Auf ATDC5 Zellen konnte die größte Induktionsrate beobachtet werden nach Infektion mit SF kontrolliertem Transaktivator, sowohl im Ein –, als auch im Zwei – Vektor – System (Abbildung 4-7;  $20,4 \pm 5,4$ -fache bzw.  $11,6 \pm 4,6$ - fache Induktion). Der BMP-2 Expressionslevel nach Induktion von TBS – Zellen ist ähnlich hoch, wie nach Infektion mit SFBMP-2 (TBS+D  $1,8 \pm 0,7$  ng/ml, SB  $1,9 \pm 0,3$  ng/ml).

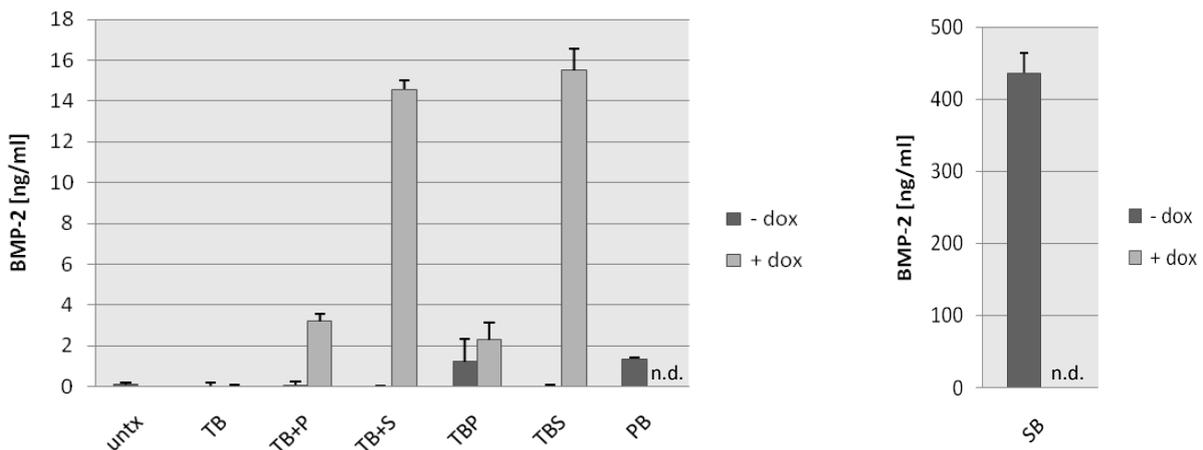


**Abbildung 4-7: Tet-regulierte und konstitutive BMP-2 Expression in ATDC5-Zellen**

ATDC5 – Zellen wurden mit BMP-2 kodierendem Lentivirus infiziert. Durch Zugabe von 1 µg/ml Doxzyklin wurde die tet – vermittelte Genexpression induziert. Die Konzentration von BMP-2 im Überstand wurde nach 72 h Inkubation durch ELISA bestimmt. Alle Messwerte wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 h normiert. n=3.

In Hinblick auf die Anwendung transduzierter Zellen in einem Kaninchendefektmodell wurde die tet-regulierte BMP-2 Expression zusätzlich auf primäre Kaninchenchondrozyten übertragen. In Kaninchenchondrozyten ist sowohl der Induktionsfaktor als auch der absolute Expressionslevel vergleichbar zwischen TB+S (Zwei – Vektor – System) und TBS (Ein – Vektor – System) infizierten Zellen ( $14,6 \pm 0,4$  ng/ml bzw.  $15,5 \pm 1,1$  ng/ml, normiert auf 24 h und  $1 \times 10^6$  Zellen). Im Gegensatz zu ATDC5 – Zellen war die BMP-2 – Produktion von SB infizierten Chondrozyten ( $436,6 \pm 27,5$  ng/ml) 30 mal höher als die regulierte BMP-2 Produktion nach Induktion des Ein – oder Zwei – Vektor – Systems (Abbildung 4-8).

Auf uninfizierten und uninduzierten Chondrozyten konnte lediglich auf TBP infizierten Zellen eine Hintergrundexpression gemessen werden.

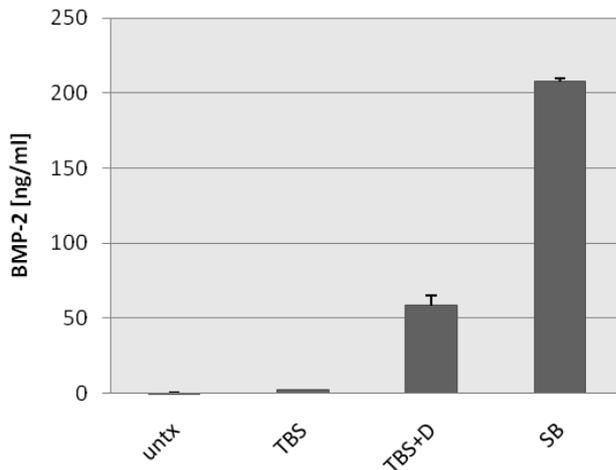


**Abbildung 4-8: Tet-regulierte und konstitutive BMP-2-Expression in primären Kaninchenchondrozyten**

Primäre Kaninchenchondrozyten wurden mit BMP-2 kodierenden Lentiviren infiziert. Die tet-vermittelte BMP-2 Expression wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxzyklin induziert. Die Messung der BMP-2 Konzentration im Überstand, inkubiert für 72 Stunden, erfolgte durch ELISA. Die erhaltenen Messwerte wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 h normiert. n=3.

In Hinblick auf die mögliche Anwendung der lentiviralen, tet-regulierten BMP-2 Expression in der Humanmedizin erfolgte zusätzlich die Messung der BMP-2 Sekretion durch transduzierte, humane Chondrozyten.

Da alle vorangegangenen Experimente auf ein Optimum durch TBS vermittelte Expression hinweisen, wurde im Folgenden nur das SF-Promotor getriebene Konstrukt verwendet.

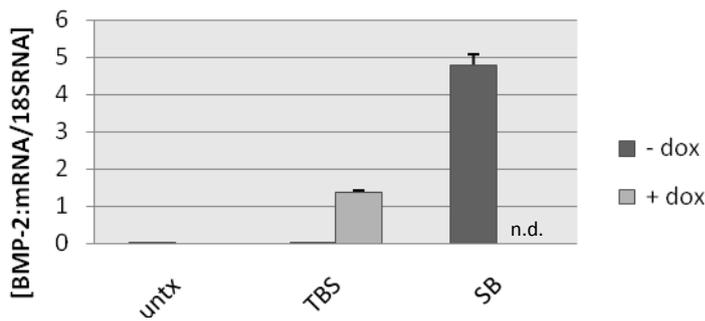


**Abbildung 4-9: Regulierte und konstitutive BMP-2 Expression in humanen Chondrozyten**

Primäre, humane Chondrozyten wurden mit BMP-2 kodierenden Lentiviren infiziert. Die tet-vermittelte BMP-2 Expression wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin induziert. Die Messung der BMP-2 Konzentration im Überstand, inkubiert für 72 Stunden, erfolgte durch ELISA. Die erhaltenen Messwerte wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 h normiert. n=3.

Durch Induktion der tet-regulierten BMP-2 Expression in TBS infizierten, humanen Chondrozyten konnte ein 26-facher Anstieg ( $25,6 \pm 3,4$ -fach) der sekretierten BMP-2 Menge erreicht werden. Gegenüber der konstitutiven BMP-2 Expression ist die regulierte Expression nach Induktion um Faktor 4 ( $3,6 \pm 0,4$  fach) geringer. Die maximal gemessene absolute Menge durch regulierte Expression in humanen Chondrozyten lag bei 59 ng/ml ( $58,5 \pm 6,5$  ng/ml), produziert durch  $1 \times 10^6$  Chondrozyten in 24 h (Abbildung 4-9).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz zur Therapie osteochondraler Defekte basiert auf der regulierten BMP-2 Expression in mesenchymalen Stammzellen, um somit deren chondrogene Differenzierung zu fördern. Daher erfolgte die Untersuchung der Genexpression in transduzierten, mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens, zunächst auf Transkriptionsebene. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert und nach reverser Transkription durch quantitative Real-time PCR analysiert (Abbildung 4-10). Bei allen Proben wurde in parallelen Ansätzen, zur Normierung der Genexpression, der 18S Gehalt bestimmt.

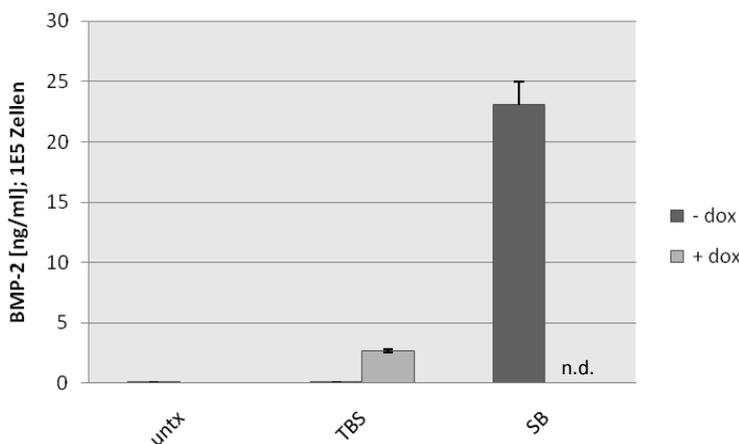


**Abbildung 4-10: Absolute Quantifizierung tet-induzierter BMP-2 Expression in IMSCs**

Aus den zu untersuchenden, infizierten und ggf. induzierten, mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens wurde die Gesamt-RNA isoliert und nach reverser Transkription mittels quantitativer Real-time PCR analysiert. Die Normierung erfolgte auf den 18S Gehalt. n=3.

Die Analyse TBS- infizierter IMSCs ergab einen 36-fachen ( $36,3 \pm 3,5$  fach) Anstieg der doxyzyklin – abhängigen BMP-2 Expression nach Zugabe des Effektors. Die Transkription durch das konstitutiv exprimierende SB-Konstrukt war ggü. dem induzierten TBS- Konstrukt 3,5-fach erhöht ( $3,5 \pm 0,3$ ).

Zusätzlich wurde die BMP-2 Expression durch das Tet on – System in IMSCs auf Proteinebene untersucht, indem die BMP-2 Konzentration in Zellkulturüberständen mittels ELISA quantifiziert wurde (Abbildung 4-11).



**Abbildung 4-11: Tet-regulierte und konstitutive BMP-2 Expression in IMSCs**

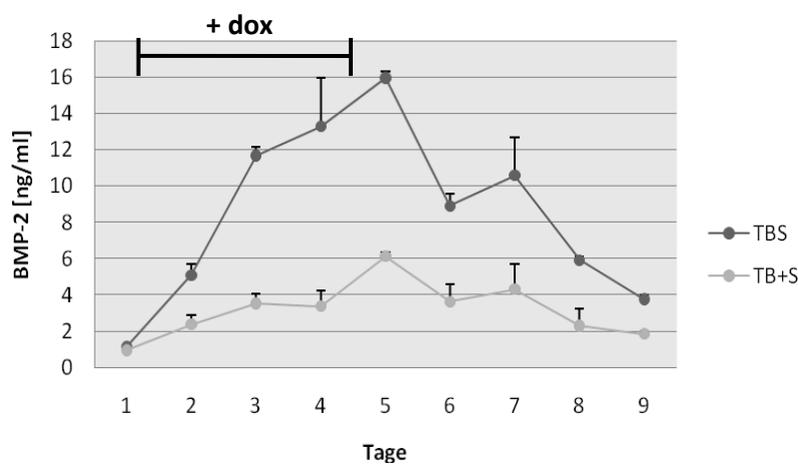
IMSCs wurden mit BMP-2 kodierenden, lentiviralen Überständen infiziert und die regulierte BMP-2 Expression durch Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin induziert. Die Quantifikation von sekretiertem BMP-2 erfolgte in 72 h Zellkulturüberständen mittels ELISA. Alle Messwerte wurden auf  $1 \times 10^5$  Zellen und 24 h normiert. n=3.

Es konnte ein 112,5-facher Anstieg ( $112,5 \pm 4,0$ ) der sekretierten Proteinmenge durch uninduzierte ggü. induzierten Proben gemessen werden. Die durch das SB – Konstrukt exprimierte BMP-2 Menge war, gegenüber der der induzierten TBS Zellen, um Faktor 8,5 höher ( $8,5 \pm 1,0$ ). Durch regulierte BMP-2 Expression wurde eine Konzentration von 2,7 ng/ml ( $2,7 \pm 0,1$  ng/ml BMP-2/ $1 \times 10^5$  Zellen/24 h) und durch konstitutive Expression in IMSCs 23,0 ng/ml ( $23,0 \pm 2,0$  ng/ml BMP-2/ $1 \times 10^5$  Zellen/24 h) erreicht.

Somit konnte die regulierte, lentivirale BMP-2 Expression in mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden.

4.3.2.1 Kinetik der Doxyzyklin-induzierten BMP-2 Expression

In Hinblick auf die *in vivo* Applikation von Zellen mit doxyzyklin-induzierbarer BMP-2 Expression zur Behandlung von osteochondralen Defekten, ist es sinnvoll, die Kinetik der BMP-2 Expression nach Induktion bzw. nach Wegnahme von Doxyzyklin zu untersuchen. Um Ein – und Zwei – Vektor – System zu vergleichen, wurden für neun Tage Überstände von TB+S und TBS infizierten primären Kaninchenchondrozyten gesammelt. Täglich wurde das Medium gewechselt und die Zellen, für die Normierung auf Zellzahl, in Parallelansätzen gezählt. Von Tag eins bis Tag vier erfolgte die Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin.



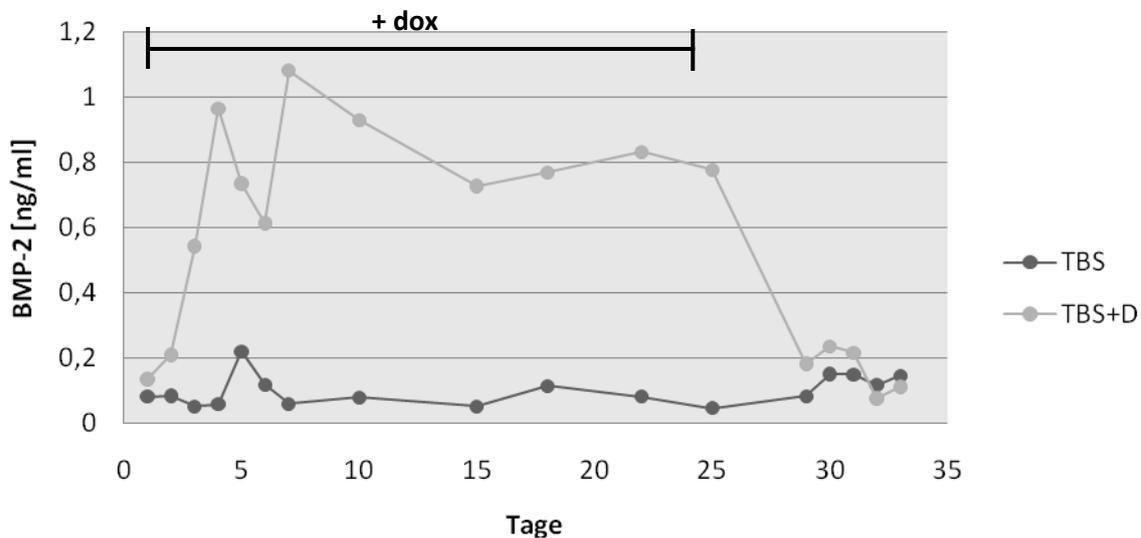
**Abbildung 4-12: Kinetik tet-regulierter BMP-2 Expression durch Ein – und Zwei – Vektor System in primären Kaninchenchondrozyten.**

Primäre Kaninchenchondrozyten wurden mit den jeweiligen BMP-2 kodierenden Lentiviren infiziert bzw. koinfiziert. Der Vergleich der Kinetik tet-regulierter BMP-2 Expression durch Ein – und Zwei – Vektor – System erfolgte durch Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin an den Tagen eins bis vier. Die Quantifikation der BMP-2 Konzentration im Überstand erfolgte durch ELISA. Nach der Abnahme des Überstands wurde das Medium täglich gewechselt. Alle Messwerte wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 h normiert. n= 3

Die Expression von BMP-2 stieg von Tag eins bis Tag fünf an. An Tag fünf war die maximale Induktion erreicht (TBS  $16,0 \pm 0,4$  ng/ml, TB+S  $6,1 \pm 0,2$  ng/ml). Nach der Wegnahme von Doxyzyklin sank die BMP-2 Produktion, bis an Tag neun der Hintergrundlevel erreicht war (Abbildung 4-12).

Zusätzlich wurden Überstände gesammelt von TBS infizierten Chondrozyten (Abbildung 4-13), kultiviert in Anwesenheit (+D) oder Abwesenheit (-D) von Doxyzyklin. TBS+Dox Zellen wurden von Tag eins bis Tag 25 durch die Zugabe von Doxyzyklin induziert um die Kinetik und die längeranhaltend konstante, tet-induzierte BMP-2 Expression zu zeigen. Anschließend wurde das Tet on – System, durch Wegnahme von Doxyzyklin, abgeschaltet. TBS Zellen dienten als Kontrolle und wurden während des gesamten Experiments nicht induziert. An den Tagen 1 bis 7, 10, 15, 18, 22, 25 und 29

bis 33 wurden Überstände gesammelt und die Zellzahl, jeweils 24 Stunden nachdem das Medium gewechselt wurde, bestimmt.



**Abbildung 4-13: Stabile Tet-regulierte BMP-2 Expression in primären Kaninchenchondrozyten**

Zur Überprüfung ob eine stabile, tet-regulierte BMP-2 Expression möglich ist wurden primäre Kaninchenchondrozyten mit TBS-Lentivirus infiziert. TBS-Zellen blieben über den gesamten Versuch uninduziert und dienten als Kontrolle, wohingegen TBS+D Zellen zusätzlich zum täglichen Mediumwechsel mit 1 µg/ml Doxyzyklin induziert wurden. Die BMP-2 Konzentration wurde durch ELISA bestimmt und auf  $1 \times 10^5$  Zellen und 24 h normiert. n= 3.

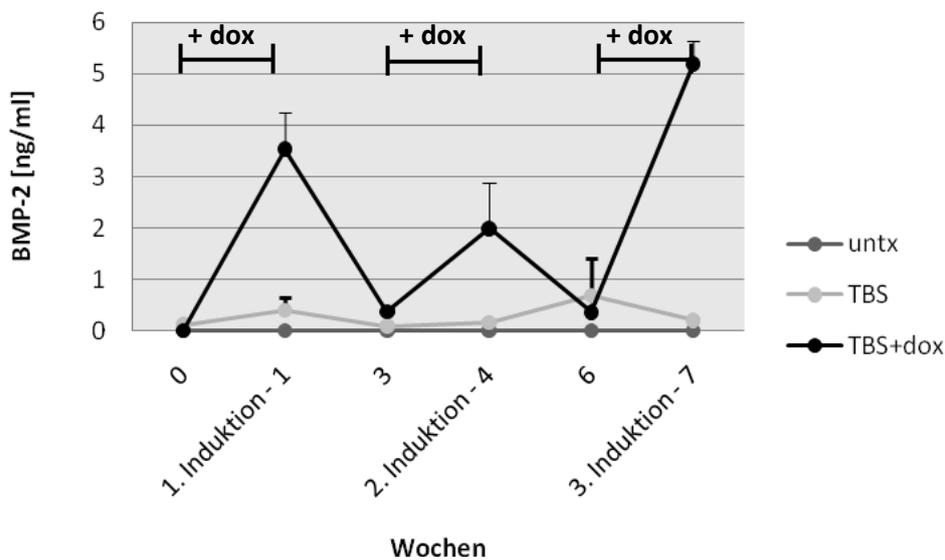
Die BMP-2 Expression stieg von Tag eins bis Tag vier an. An Tag vier war die maximale Induktion erreicht. Zwischen Tag vier und Tag 25 konnte die tet-induzierte BMP-2 Expression aufrechterhalten werden, ohne ein deutliches Absinken ( $0,8 \pm 0,2$  ng/ml BMP-2, normiert auf 24 h und  $1 \times 10^5$  Zellen), welches auf epigenetisches Silencing hinweisen würde. Ab dem Zeitpunkt der Doxyzyklin-Wegnahme sank die BMP-2 Sekretion, bis an Tag 29 der Hintergrundlevel erreicht war (Abbildung 4-13). Uninduzierte TBS-Zellen zeigten während des gesamten Zeitraums lediglich eine BMP-2 Expression auf dem Hintergrundlevel.

#### 4.3.2.2 Wiederholte Induktion der doxyzyklin-abhängigen BMP-2 Expression

Die Integration der BMP-2 exprimierenden Sequenzen in das Wirtsgenom erlaubt theoretisch die wiederholte Induktion der Transgenexpression. Aufgrund der Anwendung starker viraler Promotoren (v.a. SF-Promotor) zur Expression des Transaktivators, könnte die regulierte Expression durch DNA – Methylierung, welches epigenetisches Silencing der Genaktivität zur Folge hat, beeinträchtigt sein.

Daher sollte getestet werden, ob ein wiederholtes Induzieren tet-abhängiger Genexpression ohne einen Verlust der Effizienz möglich ist.

TBS infizierte, primäre Kaninchenchondrozyten wurden daher dreimal über einen Zeitraum von sechs Wochen wiederholt induziert (Abbildung 4-14). Jeder Induktionszyklus beinhaltete die dreitägige Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin zu den zu induzierenden Zellen (TBS+dox), wohingegen TBS Zellen uninduziert blieben und als Kontrolle dienten. Zwischen zwei Induktionszyklen wurde kein Doxyzyklin zugegeben. Die Menge an sekretiertem BMP-2 wurde zu Beginn des Experiments, am Ende eines jeden Induktionszykluses und zwei Wochen nach der Wegnahme von Doxyzyklin gemessen.



**Abbildung 4-14: Wiederholte Induktion Tet-regulierter BMP-2 Expression auf Chondrozyten**

Primäre Kaninchenchondrozyten wurden mit BMP-2 kodierendem Lentivirus infiziert. Zur Demonstration der wiederholten Induzierbarkeit tet-regulierter BMP-2 Expression wurden TBS+dox-Zellen in drei Zyklen durch Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin induziert. Uninfizierte und uninduzierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Abnahme der Überstände zur BMP-2 Quantifikation durch ELISA erfolgt zu Beginn des Versuchs (0 Wochen), nach jedem Induktionszyklus (Wochen 1, 4 und 7) und jeweils zwei Wochen nach der Wegnahme von Doxyzyklin (Wochen 3 und 6). Die Messwerte wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 h normiert. n= 3.

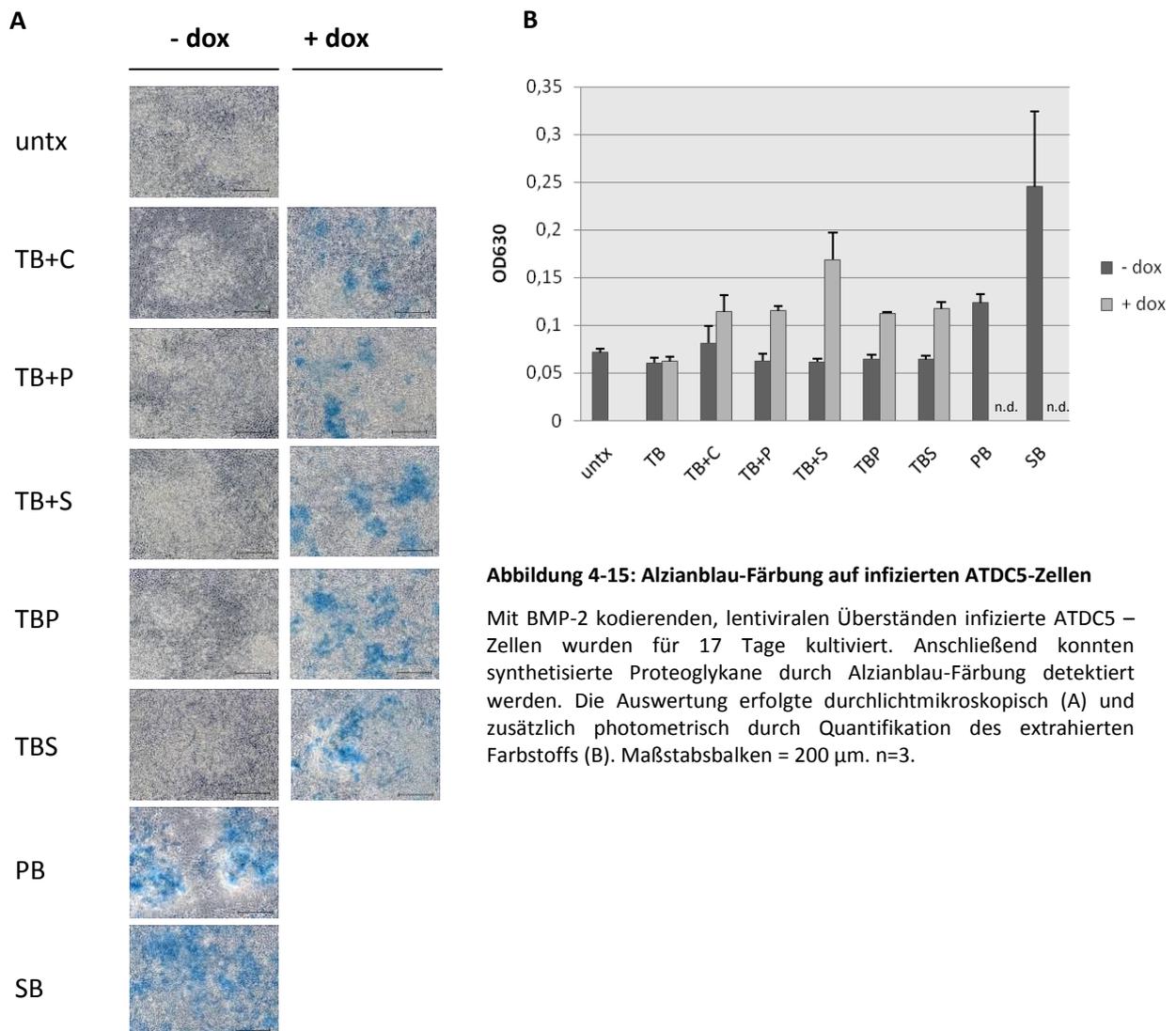
Somit konnte gezeigt werden, dass das Tet on – System über einen Zeitraum von sechs Wochen wiederholt induziert werden kann, ohne einen Verlust der Effizienz zu zeigen (Erster Zyklus: 1,0 ng/ml, zweiter Zyklus: 0,6 ng/ml, dritter Zyklus: 1,6 ng/ml, Abbildung 4-14). Zwischen den Induktionszyklen, d.h. nach Wegnahme von Doxyzyklin, sank die BMP-2 Expression auf den Ausgangslevel zurück. Auf den uninfizierten und nicht-induzierten Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt BMP-2 Expression nachgewiesen werden.

4.3.2.3 Analyse BMP-2 induzierter *downstream* Prozesse *in vitro*

Um zu zeigen, dass das lentiviral-vermittelte, reguliert exprimierte BMP-2 ausreichend ist für die Induktion biologischer Effekte wurden Marker der Chondrogenese in infizierten Zellen untersucht.

Der Nachweis von Proteoglykanen, welche im Zuge der Chondrogenese synthetisiert werden, erfolgt durch die Alzianblau-Färbung infizierter und ggf. induzierter Zellen. Zusätzlich gibt die Menge an extrahiertem Farbstoff Aufschluss über eine verstärkte Proteoglykansynthese.

Auf diese Weise konnte verstärkte Proteoglykanbildung in ATDC5- Zellen nach konstitutiver Expression von BMP-2 und nach regulierter Expression nach Induktion durch Doxyzyklin gezeigt werden (Abbildung 4-15).

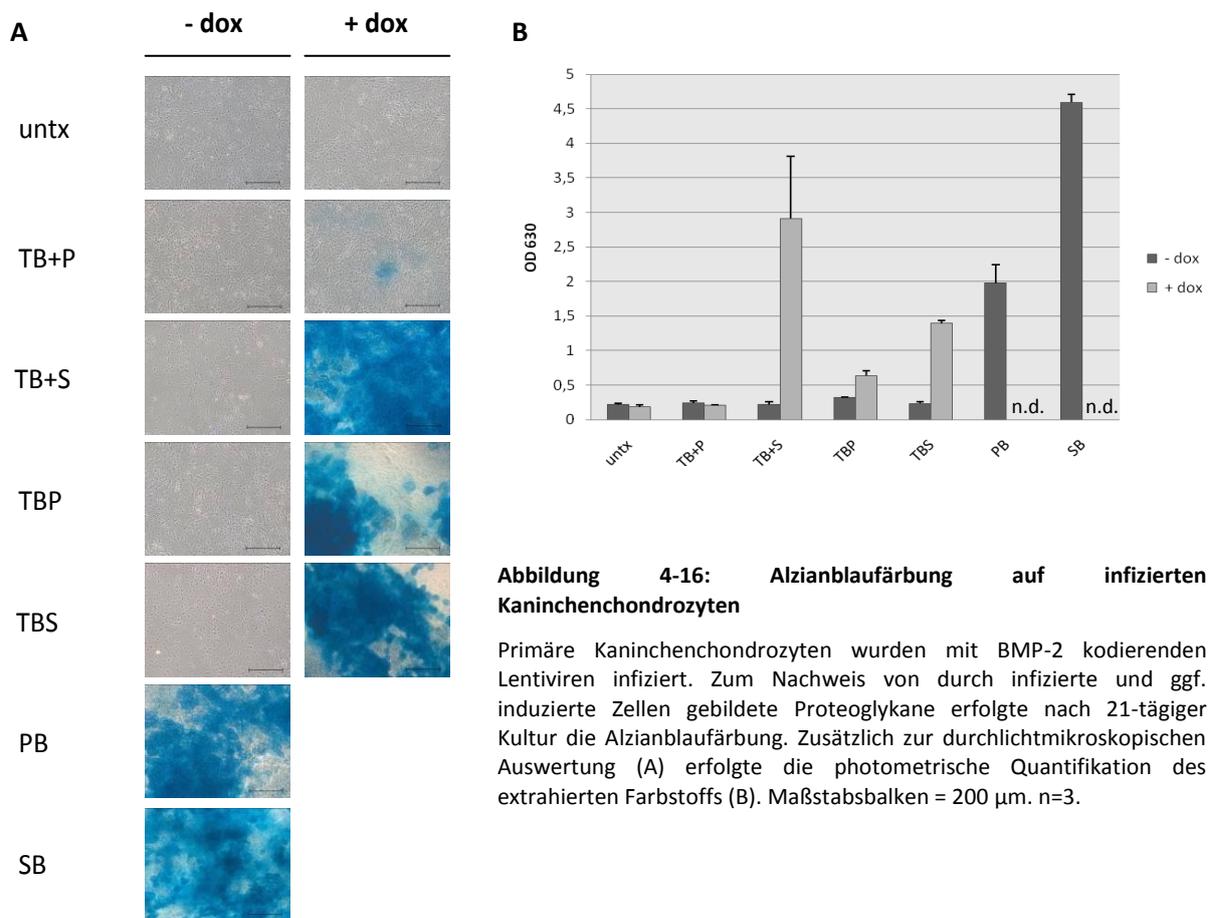


**Abbildung 4-15: Alzianblau-Färbung auf infizierten ATDC5-Zellen**

Mit BMP-2 kodierenden, lentiviralen Überständen infizierte ATDC5 – Zellen wurden für 17 Tage kultiviert. Anschließend konnten synthetisierte Proteoglykane durch Alzianblau-Färbung detektiert werden. Die Auswertung erfolgte durchlichtmikroskopisch (A) und zusätzlich photometrisch durch Quantifikation des extrahierten Farbstoffs (B). Maßstabsbalken = 200 µm. n=3.

Die Quantifizierung ergab, dass nach Kultur mit Doxyzyklin eine stärkere Proteoglykan-Synthese durch SF – Promotor getriebene Konstrukte, verglichen mit CMV – oder PGK – Promotor getriebenen Konstrukten, erreicht wurde. Die höchste, regulierbare Proteoglykansynthese wurde nach Infektion mit dem TB+S Konstrukt und Induktion durch Doxyzyklin gemessen.

Auch primäre Kaninchenchondrozyten produzierten vermehrt Proteoglykane nachdem sie mit Tet on – Konstrukten, mit PGK – oder SF – Promotor getriebenem Transaktivator, oder einem konstitutiv BMP-2 exprimierenden Konstrukt infiziert wurden (Abbildung 4-16).



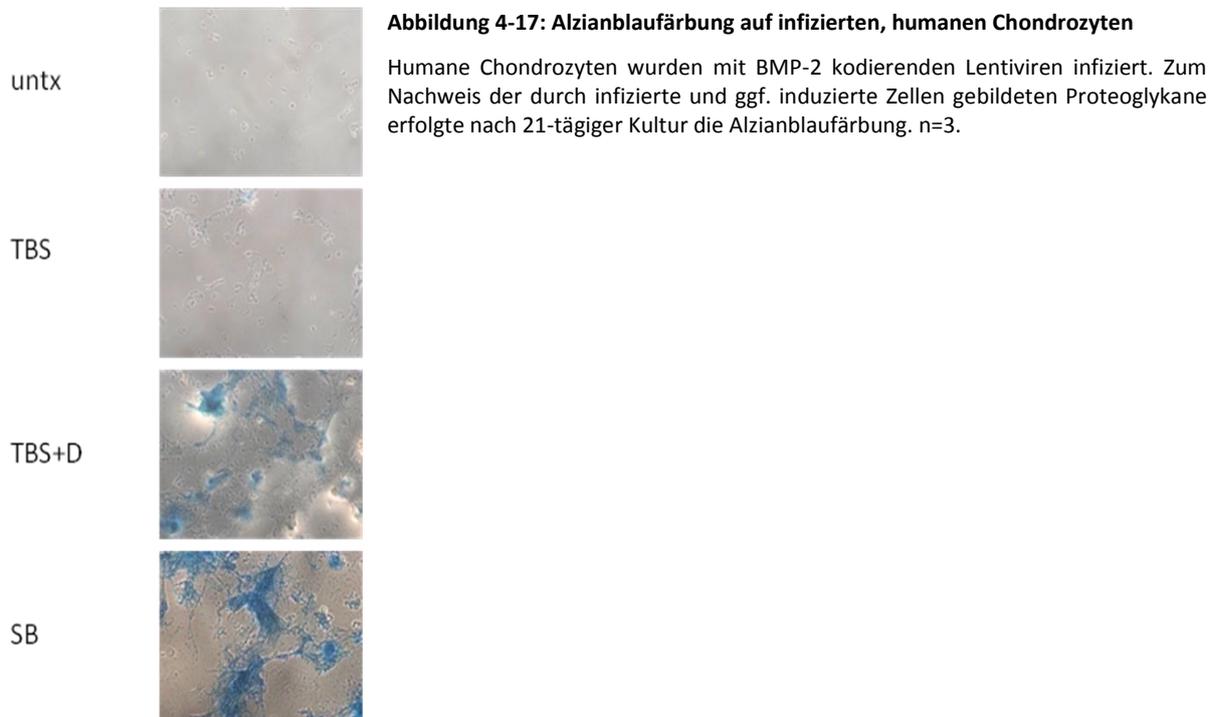
**Abbildung 4-16: Alzianblaufärbung auf infizierten Kaninchenchondrozyten**

Primäre Kaninchenchondrozyten wurden mit BMP-2 kodierenden Lentiviren infiziert. Zum Nachweis von durch infizierte und ggf. induzierte Zellen gebildete Proteoglykane erfolgte nach 21-tägiger Kultur die Alzianblaufärbung. Zusätzlich zur durchlichtmikroskopischen Auswertung (A) erfolgte die photometrische Quantifikation des extrahierten Farbstoffes (B). Maßstabsbalken = 200 µm. n=3.

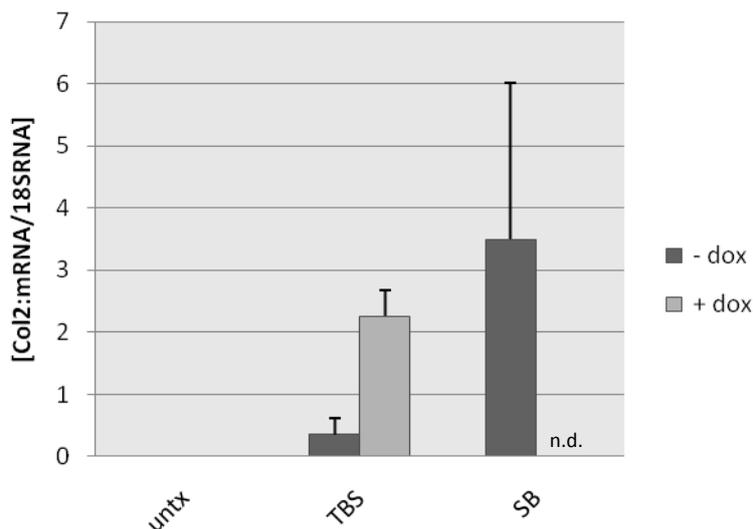
Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch die Extraktion des Farbstoffes (Abbildung 4-16 B). Eine bis zu 13-fache Induktion konnte erreicht werden bei Verwendung des Zwei – Vektor – Systems mit SF – Promotor getriebenem Transaktivator, wohingegen die Induktion durch das Ein – Vektor – System Faktor 6 betrug.

Die Alzianblau-Färbung auf humanen Chondrozyten bestätigte außerdem, dass auch humane Zellen nach Infektion mit dem Ein – Vektor – BMP-2 – Konstrukt und Induktion, bzw. nach konstitutiver BMP-2 Expression, vermehrt knorpelspezifische Proteoglykane synthetisieren (Abbildung 4-17).

Eine Extraktion des Farbstoffs zur Quantifizierung war in diesem Experiment nicht möglich.



Ein weiterer Marker für die Funktionalität von BMP-2 ist die Genexpression von knorpelspezifischem Typ II Kollagen. In infizierten, mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens wurde daher die Kollagen Typ II Expression nach regulierter und konstitutiver BMP-2 Expression untersucht.



**Abbildung 4-18: Kollagen Typ II Expression BMP-2 exprimierender mesenchymaler Stammzellen des Kaninchens**

Mesenchymale Stammzellen des Kaninchens wurden mit BMP-2 kodierenden Viren infiziert und ggf. durch 1 µg/ml Doxzyklin induziert. Die Messung der Expression von Typ II Kollagen erfolgte durch qRT-PCR. Alle Messwerte wurden auf 18S Werte normiert. n=3

In Folge der Induktion der tet-vermittelten BMP-2 Expression in mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens konnte ein 7-facher Anstieg ( $6,5\pm 0,8$ -fach) der Kollagen Typ II Expression erreicht werden (Abbildung 4-18).

Die Messwerte für die Kollagen Typ II Expression durch SB infizierte IMSCs schwankten stark und waren durchschnittlich nur geringfügig höher als die Expression durch induzierte TBS infizierte IMSCs.

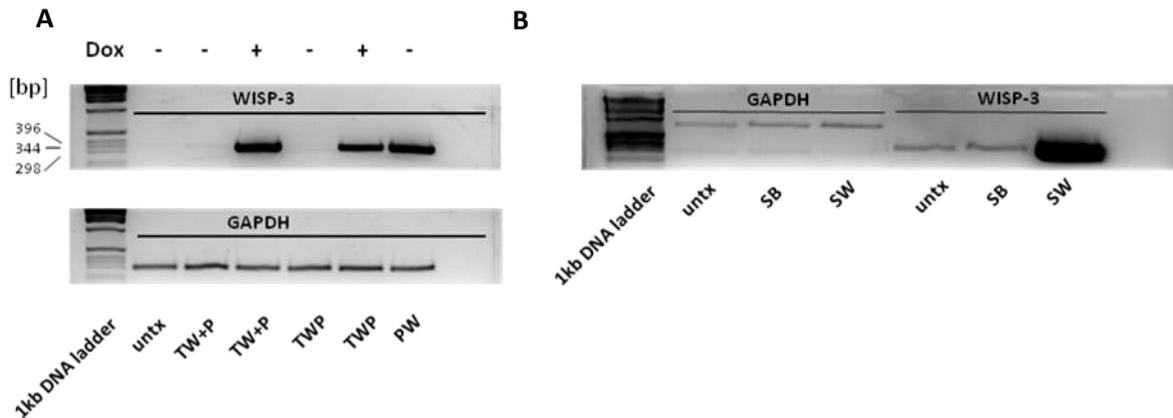
### **4.3.3 Tet-regulierte WISP-3 Expression *in vitro***

Ein weiteres Kandidatengens das für die gentherapeutische Anwendung bei Knorpeldefekten diskutiert wird, ist das WISP-3 Transgen. Es hat einen positiven Einfluss auf die Expression von knorpelspezifischem Kollagen Typ II und kann somit eventuell zur Verbesserung der Qualität des regenerierten Gewebes beitragen.

#### **4.3.3.1 RT-PCR**

Der Nachweis von WISP-3 Expression erfolgte auf Transkriptionsebene. Gesamt-RNA wurde dafür aus infizierten und ggf. induzierten, mesenchymalen Stammzellen isoliert. Mittels RT-PCR konnte eine deutliche Expression SFWISP-3 (SW) infizierter Zellen gezeigt werden. Auch unter Verwendung des Tet on – Systems im Ein – Vektor – (TWP) oder Zwei-Vektor System (TW+P) mit PGK Promoter getriebenem Transaktivator kann nach Induktion mit Doxyzyklin die WISP-3 Expression angeschaltet werden.

Die Infektion von humanen, mesenchymalen Stammzellen diente der Gegenüberstellung endogener WISP-3 Expression gegenüber konstitutiver, viraler Überexpression. Außerdem sollte überprüft werden, ob die starke Überexpression von BMP-2 (SB) die endogene WISP-3 Expression verstärkt.



**Abbildung 4-19: Konstitutive und tet-regulierte WISP-3 Expression in mesenchymalen Stammzellen**

Reverse Transkriptase PCR zum Nachweis konstitutiver und tet-regulierter WISP-3 Expression in mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens (A) oder humanen Zellen (B). Eingesetzt wurden je Reaktionseinsatz 10 ng RNA. 20 µl jedes Reaktionsansatzes wurden auf ein 2% TAE-Agarosegel aufgetragen. Als Kontrolle diente die Expression des Haushaltsgens GAPDH.

Nach Infektion mit dem konstitutiv WISP-3 exprimierenden SW Konstrukt konnte gezeigt werden, dass grundsätzlich die WISP-3 Expression dieser Zellen durch lentivirale Überexpression ergänzt werden kann (Abbildung 4-19).

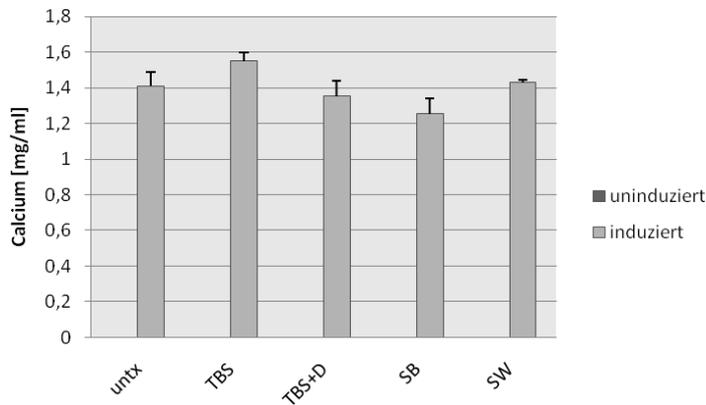
Die virale Expression von BMP-2 hat keinen Einfluß auf die endogene WISP-3 Expression.

#### 4.3.4 Differenzierungspotential infizierter IMSCs

Auch nach lentiviraler Transduktion ist es entscheidend, dass mesenchymale Stammzellen ihr Differenzierungspotential beibehalten bzw. ob sie es in eine gewünschte Richtung verändern. Aus diesem Grund wurde das Differenzierungspotential von infizierten und ggf. induzierten und uninfizierten IMSCs mit Hilfe der gängigsten Differenzierungsassays – Osteogenese und Chondrogenese – analysiert und verglichen.

##### 4.3.4.1 Osteogenese

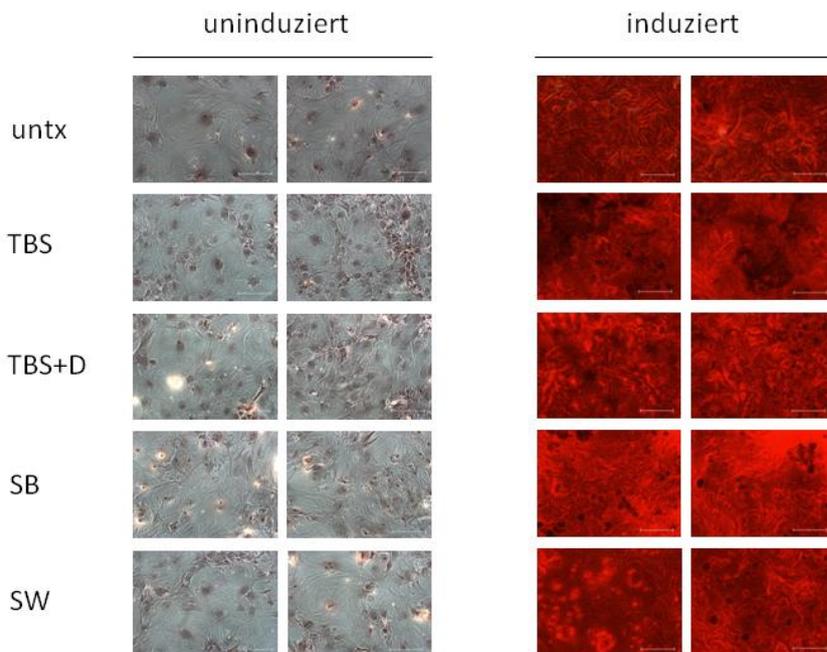
Die Untersuchung des Osteogenese-Potentials, also der Fähigkeit der mesenchymalen Stammzellen zur Knochenbildung, erfolgt sowohl durch Quantifizierung des für Knochen charakteristischen Calciums (Abbildung 4-20) als auch durch Alizarin-Färbung (Abbildung 4-21).



**Abbildung 4-20: Calciumproduktion durch lentiviral transduzierte, osteogen differenzierte IMSCs**

Mesenchymale Stammzellen des Kaninchens wurden mit entsprechenden lentiviralen Überständen infiziert. Die Osteogenese wurde durch Kultur in geeignetem Medium induziert bzw. durch Kultur in Kontrollmedium nicht induziert. Nach 14 Tagen wurde die produzierte Calciummenge quantifiziert. n=3.

Die Alizarinrot-Färbung dient dem Nachweis calciumhaltiger Zellprodukte, welche im Zuge der Matrixmineralisierung der Osteogenese gebildet werden.



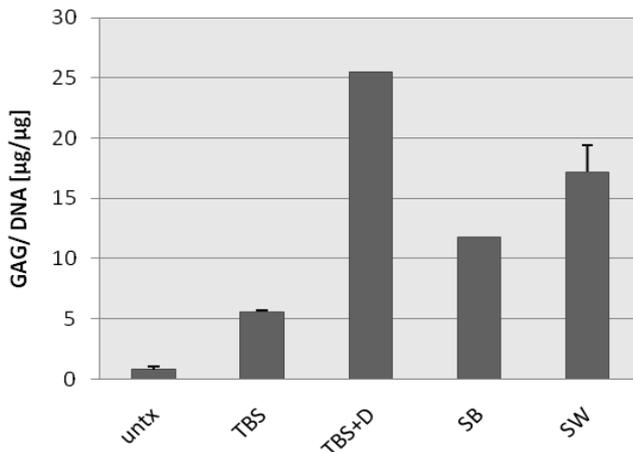
**Abbildung 4-21: Alizarinrot-Färbung lentiviral transduzierter, osteogen differenzierter IMSCs**

Mesenchymale Stammzellen des Kaninchens wurden mit entsprechenden lentiviralen Überständen infiziert und in Induktions- bzw. Kontrollmedium kultiviert. Nach 14 Tagen erfolgte die Färbung mit Alizarinrot. Maßstabsbalken = 200 µm.

Sowohl uninfizierte als auch infizierte IMSCs zeigten nach Kultur in geeignetem Medium zur Induktion der Osteogenese deutliche Färbung mit Alizarinrot. Nach Kultur in Kontrollmedium konnte kein Calcium nachgewiesen werden.

#### 4.3.4.2 Chondrogenese

Das Chondrogenese-Potential wurde durch Glykosaminoglykan (GAG)-Quantifizierung analysiert. Glykosaminoglykane werden während der Chondrogenese gebildet und sind schließlich Bestandteil der Extrazellulärmatrix von Knorpelgewebe.



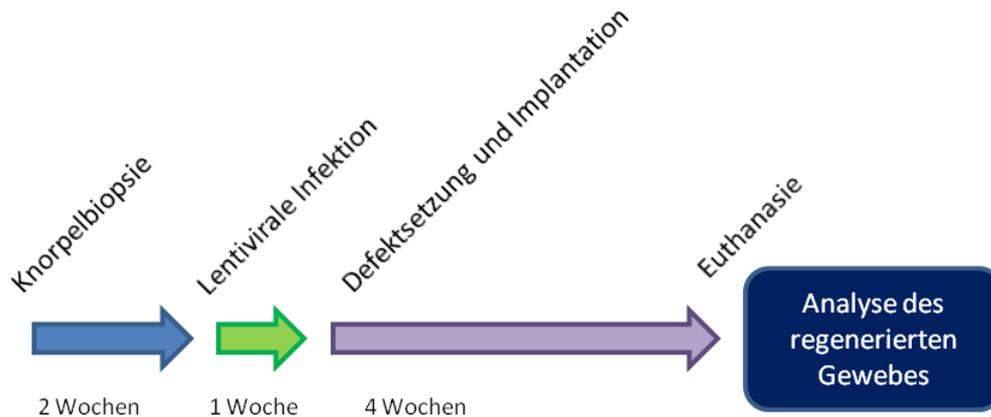
**Abbildung 4-22: GAG-Quantifizierung nach chondrogener Differenzierung lentiviral transduzierter MSCs**

Lentiviral transduzierte Zellen wurden für drei Wochen in Pelletkultur kultiviert. Die Pellets wurden anschließend mit Papain verdaut und die Chondroitinmenge quantifiziert. Alle Messwerte wurden auf den jeweiligen DNA Gehalt normiert. n=3.

Nach einem Papainverdau der Pelletkulturen wurde sowohl der GAG- als auch der jeweilige DNA-Gehalt für die Normierung quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass auch nach lentiviraler Transduktion IMSCs noch die Fähigkeit zur chondrogenen Differenzierung aufweisen. Zusätzlich zeigte sich, dass durch lentivirale Expression von Wachstumsfaktoren wie BMP-2 oder WISP-3 die chondrogene Differenzierung verstärkt wird. Dabei wiesen induzierte TBS infizierte mesenchymale Stammzellen des Kaninchens nach chondrogener Differenzierung (TBS+D) den höchsten GAG-Gehalt auf, jedoch zeigten auch uninduzierte Zellen (TBS) bereits einen geringen Anstieg des GAG-Gehalts.

#### 4.4 Tet-regulierte Genexpression *in vivo*

Im etablierten Knorpeldefektmodell des Kaninchens sollte überprüft werden, ob die *in vitro* gezeigte Funktionalität des lentiviral exprimierten BMP-2s auch *in vivo* zur *in situ* Geweberegeneration ausreichend ist. Es sollte außerdem gezeigt werden, dass das Tet on – System eine Regulation der BMP-2 Expression *in vivo* ermöglicht. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4-23 gezeigt.



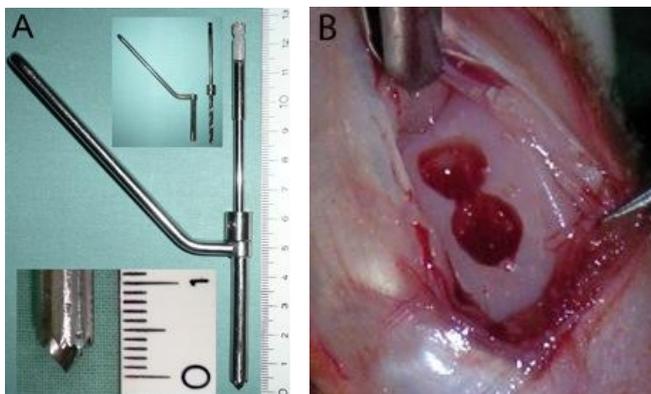
4 Gruppen, je 8 Tiere:

|      |  |          |
|------|--|----------|
| untx |  |          |
| TBS  |  | - Dox    |
| TBS  |  | 50% Dox  |
| TBS  |  | 100% Dox |

**Abbildung 4-23: Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs zur Knorpelregeneration durch BMP-2 exprimierende Chondrozyten**

Zu Beginn des Tierversuchs wurde jedem Tier eine Knorpelbiopsie entnommen und daraus Chondrozyten isoliert. Nach circa zwei Wochen Expansion *in vitro* erfolgte die lentivirale Infektion mit dem TBS-Konstrukt für die Gruppen zwei bis vier. Eine weitere Woche später wurden osteochondrale Doppeldefekte gesetzt und mit Zell-Fibrinkleber-Suspension gefüllt. Nach vier Wochen erfolgte schließlich die Extraktion des regenerierten Gewebes. Der Tierversuch umfasste vier Gruppen mit jeweils acht Tieren. Tiere der Gruppe eins wurden uninfizierte Zellen implantiert. Gruppe zwei, drei und vier erhielten TBS infizierte Zellen. Tiere der zweiten Gruppe bekamen kein Doxyzyklin (-dox). Die dritte Gruppe erhielt für die ersten zwei Wochen (50% Dox) Doxyzyklin im Trinkwasser (200 µg/ml). Nur die vierte Versuchsgruppe erhielt Doxyzyklin über die gesamte Versuchsdauer (100% Dox).

Lentiviral transduzierte, autologe Chondrozyten, die BMP-2 unter Kontrolle des Ein – Vektor – Tet on – Systems exprimieren werden dazu in osteochondrale Defekte der Trochlea von weiblichen, weißen Neuseeländern reimplantiert (Abbildung 4-24). Die operativen Eingriffe und die Anästhesie wurden von Fr. Gabriele Wexel durchgeführt.



**Abbildung 4-24: Knorpeldefektmodell im Kaninchen**

Mit Hilfe eines Stahlbohrers (A) mit einem Durchmesser von 3,6 mm wurden zwei überlappende, 3 mm tiefe Defekte gesetzt (B). Nachdem Thrombin vorgelegt wurde erfolgte die Füllung der Defekte mit einer Zell-Fibrinkleber-Suspension mit TBS infizierten Chondrozyten bzw. uninfizierten Chondrozyten als Kontrolle [Fotos: Gabriele Wexel].

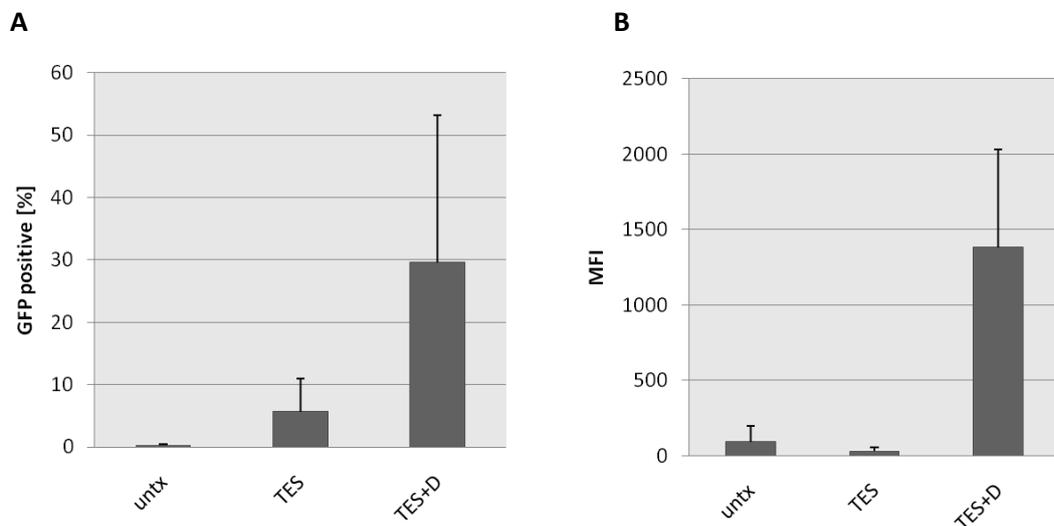
Über das Trinkwasser erhielten die Tiere der entsprechenden Gruppen Doxyzyklin in einer Konzentration von 200 µg/ml, um die tet-vermittelte BMP-2 Expression zu induzieren. Nach vier Wochen erfolgte die Euthanasie und die Untersuchung des regenerierten Gewebes.

#### 4.4.1 *In vitro* Analyse infizierter Zellen in Monolayer

Parallel wurden infizierte Zellen jedes Tieres auf ihre induzierbare Transgenexpression *in vitro* überprüft.

##### 4.4.1.1 eGFP Expression

Isolierte Chondrozyten aller Tiere wurden zur Kontrolle mit dem TREeGFPSFrTA Konstrukt infiziert, um die theroretische Induzierbarkeit der tet-vermittelten Expression zu bestätigen.



**Abbildung 4-25: Regulierte eGFP Expression in Kaninchenchondrozyten für den Tierversuch *in vitro***

TREeGFPSFrTA infizierte Kaninchenchondrozyten aller Tiere des Tierversuchs wurden *in vitro* bezüglich der Induzierbarkeit der regulierten eGFP Expression getestet. Uninfizierte, TES-infizierte uninduzierte und infizierte induzierte Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert um den Prozentsatz GFP positiver Zellen (A) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (B) zu bestimmen. n=32.

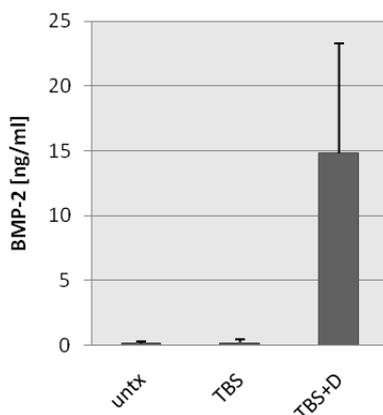
Die infizierten und ggf. induzierten Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 4-25). Trotz einer sehr hohen Variabilität zwischen den Messwerten der verschiedenen Tiere konnte

ein signifikanter Anstieg der Prozentzahl positiver Zellen nach Induktion TES infizierter Zellen ( $p < 0,05$ ) von  $5,7 \pm 5,2\%$  auf  $29,6 \pm 23,6\%$  gemessen werden.

Auch die Fluoreszenzintensität zeigte eine signifikante Induktion ( $p < 0,05$ ) um Faktor 58 ( $58,3 \pm 35,5$ ) auf durchschnittlich 1383 ( $1382,5 \pm 646,3$ ).

#### 4.4.1.2 BMP-2 Expression

TREBMP-2SFrtTA – infizierte Kaninchenchondrozyten wurden mittels BMP-2-Quantifizierung im Überstand von im Monolayer kultivierten Zellen bezüglich ihrer Induzierbarkeit getestet. Es sollte damit gezeigt werden, dass im Tierversuch nicht induzierte bzw. 50 % induzierte TREBMP-2SFrtTA infizierte Zellen grundsätzlich zur regulierten BMP-2 Expression fähig sind.



**Abbildung 4-26: Regulierte BMP-2 Expression in Kaninchenchondrozyten für den Tierversuch *in vitro***

TREBMP-2SFrtTA infizierte kCZ aller Tiere des Tierversuchs wurden *in vitro* bezüglich der Induzierbarkeit der regulierten BMP-2 Expression getestet. Die sekretierte BMP-2 Menge in 72 h Zellkulturüberständen wurde durch ELISA quantifiziert. Alle Messwerte wurden auf  $24\text{h}$  und  $1 \times 10^6$  Zellen normiert.  $n=32$ .

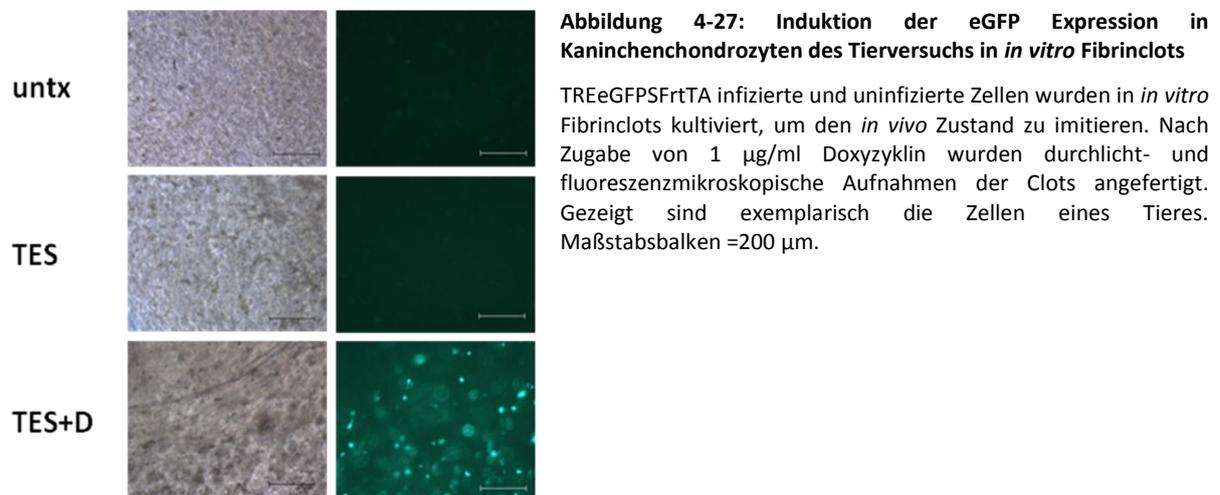
TREBMP-2SFrtTA infizierte Zellen zeigen nach Induktion mit Doxzyklin einen signifikanten ( $p < 0,05$ ), 75-fachen Anstieg ( $74,6 \pm 37,6$ -fach) der BMP-2 Expression gegenüber der BMP-2 Expression uninduzierter TBS Zellen (Abbildung 4-26). Die BMP-2 Expression uninfizierter Zellen überstieg nicht den Hintergrundlevel.

#### 4.4.2 *In vitro* Analyse infizierter Zellen in Fibrinclots

Um ein ähnliches Milieu verglichen mit der *in vivo* Situation zu simulieren wurden die infizierten Zellen in hoher Dichte in dreidimensionalen Fibrinclots kultiviert. Nach 10-tägiger Kultur wurden diese bezüglich Transgenexpression und Funktionalität des exprimierten Proteins analysiert.

##### 4.4.2.1 eGFP Expression

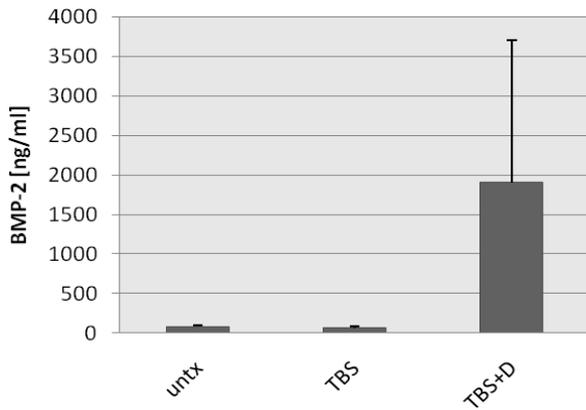
Die Induktion der eGFP Expression bei Kultur TREeGFPSFrtTA infizierter Kaninchenchondrozyten in Fibrinclots wurde fluoreszenzmikroskopisch überprüft (Abbildung 4-27).



Nach Zugabe von Doxyzyklin zum Medium ist eine Induktion der eGFP Expression auch in der 3 – D – Kultur erkennbar.

##### 4.4.2.2 BMP-2 Expression

Auch die induzierbare BMP-2 Expression TBS infizierter primärer Kaninchenchondrozyten wurde in Fibrinclots untersucht. Die Expression nach Induktion lag bei durchschnittlich 1,4 ng BMP-2/ml. Jedoch zeigten sich zwischen der BMP-2 Expression der einzelnen Clots sehr deutliche Schwankungen. Die Induktion TBS infizierter Zellen war signifikant ( $p=0,005$ ).

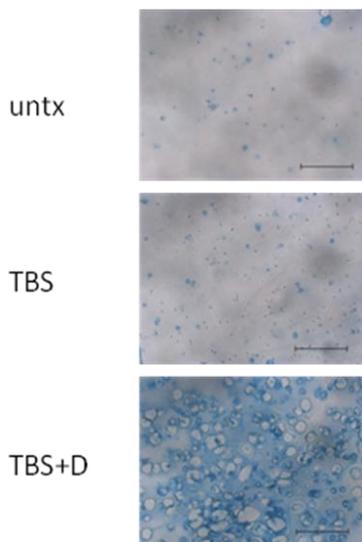


**Abbildung 4-28: Induktion der BMP-2 Expression in Kaninchenchondrozyten des Tierversuchs in *in vitro* Fibrinclots**

TREBMP-2SFrtTA infizierte und uninfectierte Zellen wurden in *in vitro* Fibrinclots kultiviert, um den *in vivo* Zustand zu imitieren. Nach Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin wurden die Menge an BMP-2 im Überstand gemessen.

#### 4.4.2.3 Proteoglykansynthese durch BMP-2 exprimierende Zellen in *in vitro* Clots

Auch in Fibrinclots sollte gezeigt werden, dass die regulierte lentivirale Expression von BMP-2 ausreichend ist um *downstream* Prozesse zu aktivieren. Dafür wurden Fibrinclots mit transduzierten Chondrozyten des Tierversuchs für zehn Tage kultiviert, anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet. Die geschnittenen Paraffinclots wurden mit Alzianblau gefärbt, um Proteoglykansynthese, ein Marker für Chondrogenese, zu detektieren (Abbildung 4-29).



**Abbildung 4-29: Nachweis BMP-2-induzierter Proteoglykansynthese in Fibrinclots**

TBS-transduzierte Chondrozyten des Tierversuchs wurden für zehn Tage in Fibrinclots kultiviert. Fixierte Clots wurden geschnitten und mit Alzianblau gefärbt, um Proteoglykane, die im Zuge der Chondrogenese synthetisiert werden, zu detektieren. Maßstabsbalken = 200 µm.

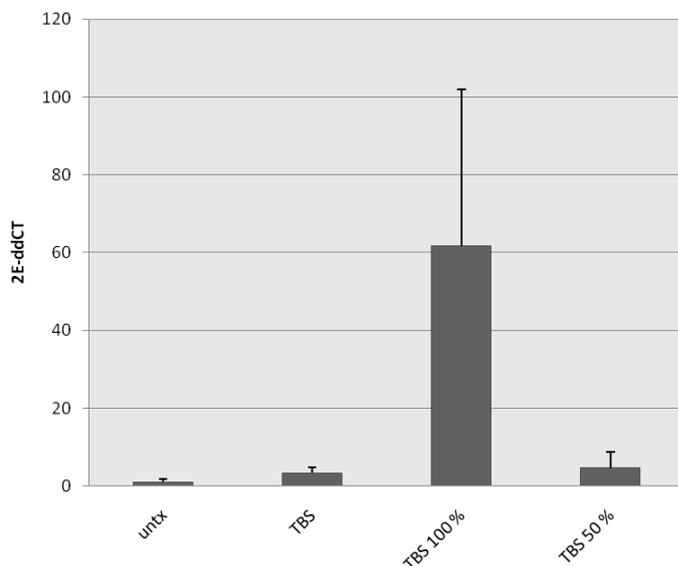
Nach Induktion der BMP-2 Expression durch Zugabe von Doxyzyklin konnte eine deutliche Proteoglykansynthese durch TBS infizierte Zellen in 3D-Kultur gezeigt werden. Uninfizierte und uninduzierte Clots zeigten keine Färbung mit Alzianblau.

### 4.4.3 Analyse des regenerierten Gewebes

Schließlich sollte das *in vivo* regenerierte Gewebe hinsichtlich seiner Qualität und Vergleichbarkeit zu nativem Knorpelgewebe untersucht werden.

#### 4.4.3.1 BMP-2 Expression

Um zu zeigen, dass die Regulation der BMP-2 Expression auch *in vivo* möglich ist, wurde die BMP-2 Genexpression des regenerierten Gewebes im Defekt auf RNA Ebene quantifiziert.



**Abbildung 4-30: Regulation der BMP-2 Expression *in vivo***

Autologe Kaninchenchondrozyten wurden *ex vivo* mit dem Ein – Vektor – BMP-2 Konstrukt infiziert. Kontrollzellen blieben uninfiziert. Die Zellen wurden in einer Fibrinklebersuspension in einen Doppeldefekt im Kniegelenk weiblicher, weißer Neuseeländer reimplantiert. Tiere, die TBS infizierte Zellen erhalten haben, blieben entweder uninduziert oder wurden durch Gabe von 200 µg/ml Doxzyklin im Trinkwasser induziert. Dabei erfolgte die Induktion über 4 Wochen (100%) oder die ersten zwei Wochen (50%). Nach vier Wochen wurde das regenerierte Gewebe hinsichtlich der BMP-2 Expression analysiert. Alle Werte wurden auf 18S normiert. n = 8.

Zunächst wurden dafür autologe Kaninchenchondrozyten *ex vivo* mit TREBMP-2SFrtTA- Lentiviren infiziert. Nach der Expansion *in vitro* wurden die Zellen in einen künstlich gesetzten, osteochondralen Doppeldefekt in Form einer Zell-Fibrinklebersuspension reimplantiert. Den Tieren der untx – Kontrollgruppe wurden uninfizierte Zellen implantiert. Drei Versuchsgruppen erhielten TBS- infizierte Zellen. Die TBS-Gruppe diente als Kontrolle und erhielt über die ganze Versuchsdauer kein Doxzyklin. Die Tiere der TBS 100 % Gruppe erhielten über die kompletten vier Wochen Trinkwasser, welches mit 200 µg/ml Doxzyklin versetzt wurde, wodurch die tet-vermittelte BMP-2 Expression induziert werden sollte. Eine zusätzliche TBS 50 % Gruppe sollte Aufschluss darüber geben, ob die tet-induzierte Genexpression *in vivo* wieder abgeschaltet werden kann. Diese Tiere erhielten Doxzyklin in den ersten zwei Wochen des Versuchs, nicht aber in der zweiten Versuchshälfte.

Die Messung der BMP-2 Expression im Reparaturgewebe ergab, dass eine signifikante Induktion der BMP-2 Expression ( $p=0,002$ ) nach Implantation von TBS Zellen um Faktor 26,5 erreicht werden kann (Abbildung 4-30). Zudem konnte gezeigt werden, dass die tet-vermittelte BMP-2 Expression *in vivo* nach der Wegnahme von Doxyzyklin innerhalb von zwei Wochen auf das Hintergrundlevel zurückgeht.

Die weitere Analyse der induzierbaren BMP-2 Expression im Defektgewebe auf Proteinebene durch ELISA ergab allerdings keine messbare BMP-2 Expression nach Induktion der Transgenexpression oder in den Kontrollen.

#### 4.4.3.2 Histologische Analyse des Reparaturgewebes im osteochondralen Defekt

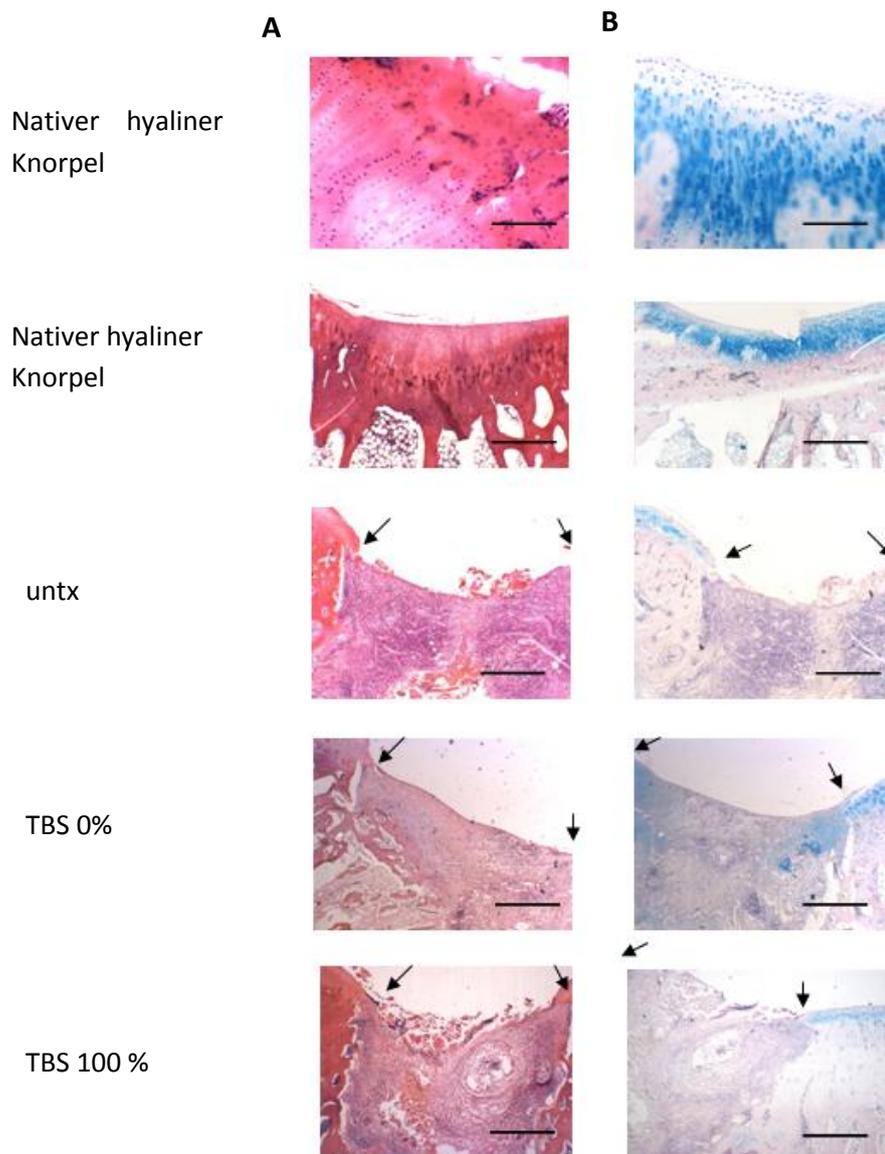
Bisher konnte lediglich das Regenerationsgewebe einzelner Tiere ausgewertet werden. Einen ersten Aufschluss über den Einfluss von lentiviral exprimiertem BMP-2 auf den Heilungsprozess sollte die histologische Untersuchung des Reparaturgewebes, welches im osteochondralen Defekt entstanden war, geben. Dazu wurden Paraffinschnitte der fixierten und entkalkten Knochenscheiben mit enthaltenem osteochondralen Defekt aller Gruppen, mit Hämatoxylin und Eosin bzw. Alzianblau gefärbt (Abbildung 4-31).

Eine knorpelspezifische, säulenartige Anordnung der Zellen, sowie eine Mineralisierung war im Reparaturgewebe aller Gruppen nicht zu erkennen. Gegenüber nativem hyalinen Knorpelgewebe wies das regenerierte Gewebe im osteochondralen Defekt eine ungeordnete Struktur mit einer hohen Dichte an neutrophilen Granulozyten auf. Die Detektion der eingebrachten Knorpelzellen im Reparaturgewebe war in diesem Versuchsaufbau nicht möglich.

Obwohl das entstandene Gewebe gegenüber dem nativen Knorpelgewebe deutlich abgesetzt ist, weist es jedoch keine nekrotischen Merkmale auf.

Die Gabe von Doxyzyklin, d.h. die Induktion der BMP-2 Expression hatte keinen Einfluss auf die Regeneration. Sowohl, nach Implantation uninfizierter Chondrozyten, als auch nach dem Einbringen TBS-infizierter Zellen und Induktion mit Doxyzyklin konnte keine Verbesserung der Qualität des Regenerationsgewebes oder eine Verbesserung der Einheilung erreicht werden.

Lediglich im Bereich des nativen Knorpels, jedoch nicht im Bereich des Defekts, konnten knorpelspezifische Proteoglykane mittels Alzianblau angefärbt werden. Auch dabei gab es keinen Unterschied zwischen Implantation uninfizierter und TBS-infizierter bzw. mit und ohne Induktion durch Doxyzyklin.



**Abbildung 4-31: HE- und Alzianblau-Färbung des Reparaturgewebes im osteochondralen Defekt**

Paraffinschnitte jedes Tieres wurden mit Hämatoxylin und Eosin (A) bzw. Alzianblau (B) gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Färbungen eines Tieres jeder Gruppe. Untx = Kontroll-Gruppe mit untransduzierten Zellen, TBS 0% = Gruppe mit TBS infizierten Zellen ohne Induktion mit Doxyzyklin, TBS 100% = Gruppe mit TBS infizierten Zellen, Induktion für vier Wochen. Die Pfeile kennzeichnen den Übergang des Defekts zu nativem Gewebe. Massstabsbalken = 100  $\mu$ m (nativer hyaliner Knorpel oben) bzw. 500  $\mu$ m (nativer hyaliner Knorpel unten, untx, TBS 0%, TBS 100 %).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Therapie von Knorpeldefekten

Die erfolgreiche Therapie von Knorpeldefekten stellt auch heute noch, aufgrund der mangelhaften Selbstheilungskapazität von Knorpelgewebe, eine große Herausforderung dar [103, 133, 134].

Konventionelle Therapien, wie die autologe Chondrozyten-Transplantation und Mikrofrakturierung, führen zwar zunächst zu zufriedenstellenden klinischen Ergebnissen, jedoch besteht das Reparaturgewebe häufig aus weichem Faserknorpel. Gegenüber nativem, hyalinen Knorpel weist Faserknorpel andere mechanische und chemische Eigenschaften, z. B. einen wesentlich geringeren Gehalt an knorpelspezifischem Kollagen Typ II, auf. In Folge dessen treten auf lange Sicht häufig ähnliche, degenerative Veränderungen auf, wie sie ohne Behandlung zu beobachten sind. Daher besteht die Notwendigkeit, bisherige Therapien zu optimieren [13, 14].

Optimalerweise sollte eine potentielle Knorpeltherapie einfach anzuwenden und kosteneffizient sein. Sie sollte eine hohe Erfolgsrate und wenig assoziierte Komplikationen aufweisen. Angestrebt wird ein gutes Wachstum der Chondrozyten im Defekt und die Entstehung von hyalinem Knorpel [1].

Verfahren wie Genterapie und *tissue engineering*, basierend auf autologen Chondrozyten oder mesenchymalen Stammzellen, welche in Chondrozyten differenzieren können, gewinnen daher mehr und mehr an Bedeutung [14, 135].

Die Applikation von rekombinanten Wachstumsfaktoren, wie z. B. *bone morphogenic proteins* (BMP) und *transforming growth factors  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), zeigte bereits, dass manche Wachstumsfaktoren, die Therapie von osteochondralen Defekten positiv beeinflussen können [13, 136].

Jedoch ist der Effekt lediglich transient. Für eine klinisch relevante Wirkung sind daher hohe Dosen und wiederholte Applikationen notwendig, welche mit hohen Kosten einhergehen und ein Infektionsrisiko für das Gelenkes beinhalten [137, 138].

Neben wenig effizienten non-viralen Genvektoren stellen virale Therapien eine vielversprechende Alternative zur Expression von therapeutischen Genen dar [135, 139, 140].

Der Transfer von Transgenen zu Gelenken zum Zwecke der Therapie mit adenoviralen [88, 97, 141-144], adeno-assoziierten [145], lentiviralen [146] und retroviralen Vektoren [88, 147, 148] wurde bisher in der Literatur beschrieben.

Gegenüber adenoviralen Vektoren zeigen Retroviren eine geringere Immunogenität und ermöglichen, aufgrund der Integration ins Wirtsgenom, eine stabile Transgenexpression. Die Infektion primärer Chondrozyten mit retroviralen Vektoren führt zu 80-90% positiven Zellen und

auch eine stabile Expression von BMP-2 nach retroviraler Transduktion wurde bereits *in vitro*, als auch *in vivo*, gezeigt [149]. Auch Carlberg hat eine hohe Transduktionsrate von über 90% beschrieben bei Infektion mesenchymaler Stammzellen mit retroviralen Vektoren [95].

Die Kombination von Wachstumsfaktoren mit *tissue engineering* erscheint vielversprechend für die Therapie von osteochondralen Läsionen [135]. Zellen, die durch *ex vivo* Modifikation die Überexpression von Wachstumsfaktoren erlauben, bevor sie für *tissue engineering* zum Einsatz kommen, führen zu verstärkter Matrix-Synthese [96, 140, 141, 150, 151]. Unterstützend werden verschiedene Trägermaterialien, wie z. B. Kollagen-Schwämme, Fibrinkleber und Hyaluronan, für Chondrozyten diskutiert, die das Ansiedeln der implantierten Zellen im Defekt erleichtern [152-155].

## 5.2 Lentivirus-vermittelte regulierte Expression von Transgenen in chondrogenen Zellen

Lentiviren, eine Unterart der Retroviren, besitzen die Fähigkeit neben sich teilenden auch ruhende Zellen infizieren zu können. Für gentherapeutische Zwecke wurden außerdem sicherere, selbstinaktivierende (SIN), lentivirale Vektoren etabliert. Sie enthalten eine Deletion im 3' LTR, welche Promotor- und Enhancerelemente umfasst. Das Risiko von Aktivierung ungewollter Genexpression nach Integration ins Wirtsgenom wird somit minimiert [64].

Auch selbstinaktivierende,  $\gamma$ -retrovirale Vektoren wurden konstruiert. Sie haben jedoch in Hinblick auf eine gentherapeutische Anwendung entscheidende Nachteile gegenüber entsprechender lentiviraler Vektoren: So weist das Integrationsmuster retroviraler Vektoren ins Wirtsgenom eine Anhäufung in oder nahe bei krebssassoziierte Genen auf, was zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie der Entstehung einer Krebserkrankung führen kann. Eine derartige Tendenz wurde für lentivirale Vektoren nicht festgestellt [156-158]. Ein weiterer Aspekt ist das geringe Sicherheitsrisiko bei der Produktion lentiviraler Vektoren. Durch das sog. *split genome* Verfahren, bei dem die benötigten viralen Gene durch unterschiedliche Plasmide kodiert werden, um das Entstehen pathogener Viren durch Rekombination zu vermindern, konnte sowohl die  $\gamma$ -retro-, als auch die lentivirale Virusproduktion sicherer gestaltet werden. Dabei kann durch das lentivirale Verpackungssystem der dritten Generation bei dem alle benötigten Sequenzen in *trans* durch drei Plasmide kodiert werden, im Vergleich zu zwei Plasmiden zur Retrovirusproduktion, eine Minimierung des Rekombinations-Risikos erreicht werden [63].

Um eine schädliche Dauerexpression eines integrierten Transgens nach lentiviraler Infektion zu vermeiden, erscheint die Anwendung eines regulierbaren Systems sinnvoll [119, 120]. Nicht-viral hat

sich bereits das Tet on – System als geeignet zur Expression von Transgenen in Chondrozyten herausgestellt [126].

Das Tet on – System erscheint für viele Anwendungsgebiete sinnvoller als das ursprüngliche Tet off – System, da die Expression des Transgens gezielt durch Gabe des Effektors induziert werden kann und nicht, wie es das Tet off – System voraussetzt, eine dauerhafte Gabe zur Unterdrückung der Genexpression nötig ist.

Die Regulation der Genexpression mittels Tet on – System zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und eine geringe Hintergrundaktivität aus [116]. Zudem ist es nicht toxisch [119, 120] und die Transgenexpression ist komplett reversibel [159].

Durch Verwendung von SIN Vektoren und *Tetracycline responsive elements* der zweiten Generation – TRE<sub>right</sub> - kann die *leakiness* tet-vermittelter Genexpression, d.h. eine Restaktivität im *off*-Zustand, minimiert werden [118].

Gegenüber dem nativen TRE liegen die 7 *tetO* Sequenzen von TRE<sub>right</sub> näher beieinander und potentielle Bindestellen für endogene Transkriptionsfaktoren wurden entfernt [www.clontech.com].

Des Weiteren kann durch Verwendung des rtTA2S-M2 – Transaktivators, der eine leicht geänderte Aminosäurefolge gegenüber rtTA aufweist, die Stabilität und Sensitivität gegenüber Doxyzyklin um ein Vielfaches erhöht werden [121].

Die Kontrolle der Expression des Transaktivators kann durch verschiedene, z.B. virale oder gewebespezifische Promotoren erfolgen [116]. Getestet wurden, im Rahmen dieser Arbeit, der virale *immediate early* Zytomegalievirus-Promotor (CMV), der Phosphoglyzerat-Haushaltspromotor (PGK) und der starke, virale *spleen focus forming virus*-Promotor (SF).

Die Anwendung verschiedener Promotoren ermöglichte den Vergleich der Stärke der Promotoren und sollte zelltypspezifische Unterschiede zeigen. Eine möglichst hohe Transgen-Expression sollte in erster Linie durch die starken, viralen Promotoren erfolgen. Da bei viralen Promotoren grundsätzlich die Möglichkeit des epigenetischen Silencings durch Methylierung besteht, wurde zusätzlich die Expression durch den ubiquitär aktiven Haushaltspromotor analysiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die tet-vermittelte Genexpression mit dem eGFP Reportergen optimiert. Dazu wurden sowohl der optimierte reverse Transaktivator (rtTA2S-M2) als auch TRE<sub>right</sub> verwendet.

Bereits in CMS5 – Zellen konnte gezeigt werden, dass der SF – Promotor, gegenüber dem analogen Konstrukt mit PGK-Promotor bei Verwendung des Zwei – Vektor – Systems, eine stärkere Induktion des Prozentsatzes GFP positiver Zellen nach Doxyzyklin-Gabe ermöglicht (Abbildung 4-1). Auch in der chondrogenen Zelllinie ATDC5 war die Induktion durch SF – Promotor getriebene Konstrukte stärker

als durch PGK-Promotor getriebene Konstrukte. Als am wenigsten geeignet zur Anwendung im Tet on – System in diesen Zellen erwies sich der CMV-Promotor.

Zur Anwendung tet-vermittelter Expression in primären Kaninchenchondrozyten *in vitro* erwies sich ebenfalls der SF – Promotor als am Geeignetsten zur Expression des Reportergens eGFP wohingegen der CMV – Promotor die geringste Induzierbarkeit und niedrigsten absoluten Werte nach Induktion aufwies. Verglichen mit der konstitutiven eGFP Expression ist die regulierte Expression nach Induktion jedoch bis zu Faktor 11 schwächer (Abbildung 4-5).

Des Weiteren kann zwischen Anwendung des Ein – und Zwei – Vektor – Tet on – Systems unterschieden werden. Als vorteilhafter erscheint dabei das Ein – Vektor – System, bei dem Transaktivator- und Response- Anteile auf einem Plasmid vorliegen [160].

Neben der Reduktion der benötigten Gesamtvirusmenge ist ein weiterer Vorteil des Ein – Vektor – Systems, dass sichergestellt wird, dass Responsekomponente und Transaktivator in derselben Zelle vorliegen.

In CMS5-Zellen konnte nach Verwendung des Ein – Vektor – Systems zur eGFP Expression und Induktion zwar ein prozentual höherer Anteil an positiven Zellen, vergleichbar mit konstitutiver Expression, und eine höhere MFI als mit dem analogen Zwei – Vektor – System erreicht werden, jedoch zeigte sich eine hohe Zahl GFP exprimierender Zellen ohne Zugabe von Doxzyklin (Abbildung 4-3).

Die Überlegenheit der Expression des Ein-Vektor-Systems gegenüber dem Zwei – Vektor – System konnte auf ATDC5-Zellen nicht eindeutig bestätigt werden. Zwar konnte mit dem Ein – Vektor – System ein höherer Prozentsatz GFP exprimierender Zellen nach Induktion erreicht werden, jedoch war die maximale, absolute, mittlere Fluoreszenzintensität nach Verwendung des Ein – Vektor – Systems höher. Die Induktionsfaktoren der Prozent positiven Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität durch Ein – und Zwei – Vektor-System unterschieden sich kaum (Abbildung 4-7).

In primären Kaninchenchondrozyten wurden nach Verwendung des Zwei-Vektor-Systems  $19,2 \pm 1,1\%$  eGFP exprimierende Zellen erreicht mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von  $434,7 \pm 57,6$ . Im Gegensatz dazu lag der Prozentsatz an eGFP positiven Zellen nach Infektion mit dem Ein – Vektor – System bei  $36,8 \pm 0,5\%$  und die mittlere Fluoreszenzintensität bei  $535,1 \pm 3,7$  (Abbildung 4-5).

Ein viel beschriebenes Problem, vor allem des Ein – Vektor – Systems, ist die Restaktivität im nicht induzierten Zustand [118].

Sie entsteht durch eine Hintergrundexpression durch intakte virale LTR Sequenzen. Durch Verwendung von SIN-Vektoren kann eine Restaktivität bereits verringert werden. Aber wie von Pluta et al. gezeigt, kann trotzdem, ohne Induktion, abhängig vom Zelltyp, eine bis zu 30-fach höhere  $\beta$ -gal-Expression verglichen mit Kontrollzellen, gemessen werden [118]. Weitere Versuche von Pluta

zeigten, dass durch Verwendung des TRE<sub>tight</sub> die Hintergrundexpression von lacZ und eGFP auf ein Minimum reduzieren kann [118].

Ein weiterer entscheidender Aspekt bei der Minimierung der Hintergrundexpression ist die Anordnung der benötigten Sequenzen auf dem Ein – Vektor – Plasmid. Dabei ist zu beachten, dass keine Aktivierung des TREs durch den konstitutiven Promotor des Transaktivators erfolgen kann [160].

Diese sog. *leakiness* wurde in der vorliegenden Arbeit, lediglich in CMS5-Zellen nach Infektion mit dem TES-Konstrukt, hinsichtlich des Prozentsatzes eGFP positiver Zellen beobachtet.

Nach Optimierung der tet-vermittelten Transgenexpression erwies sich das Ein – Vektor – System gegenüber dem Zwei – Vektor – System überlegen. Die optimalen Bedingungen wurden anschließend auf therapeutische Transgene, wie BMP-2 und WISP-3, übertragen.

### **5.2.1 Regulierte BMP-2 Expression in autologen Chondrozyten zur Therapie von Knorpeldefekten**

Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass die Transplantation von autologen Chondrozyten in einen Knorpeldefekt die Heilung der Knorpelläsion verbessert [15, 22, 161]. Die autologe Chondrozyten – Transplantation (ACT) ist heute eine häufig angewandte Methode zur Therapie von chondralen Defekten. Bisher kann jedoch noch keine vollständige Regeneration von Kollagen Typ II reichem, artikulären Knorpelgewebe erreicht werden.

Gleichzeitig wird rekombinantes BMP-2 Protein bereits erfolgreich zur Therapie von osteochondralen Defekten angewandt. Jedoch ist eine derartige Therapie durch einen hohen finanziellen und therapeutischen Aufwand limitiert [13]. Das BMP-2 Transgen erscheint daher aber als ein geeignetes Kandidatengen für eine gentherapeutische Herangehensweise, die die Produktion des Transgens *in situ* ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Kombination eines gen- und zelltherapeutischen Ansatzes, basierend auf BMP-2 exprimierenden Chondrozyten, zur Therapie von Knorpelschäden charakterisiert werden.

Durch retrovirale Expression in Kaninchenchondrozyten konnte bereits die Expression ausreichender Mengen an BMP-2 *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden um Funktionalität und damit die Verbesserung der Knorpelheilung, d. h. ein Anstieg des Proteoglykangehalts, des ICRS scores und der Kollagen Typ II Expression *in vivo* zu erreichen [78].

In der vorliegenden Arbeit sollte die regulierte, lentiviral vermittelte Expression des therapeutischen BMP-2 Transgens in Chondrozyten untersucht werden. Auf diese Weise kann die BMP-2 Expression nach Abschluss des Heilungsprozesses abgeschaltet werden und eine möglicherweise schädliche Dauerexpression wird verhindert.

Bereits in Vorversuchen in CMS5-Zellen zeigte sich, dass das Ein – Vektor – System auch zur BMP-2 Expression besser geeignet scheint als das Zwei-Vektor-System. Durch Verwendung des SF – Promotor getriebenen Konstrukts konnte nach Induktion eine maximale BMP-2 Expression von 9,8 ng BMP-2/ ml ( $9,8 \pm 2,3$  ng BMP-2/ ml, normiert auf  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 h) erreicht werden (Abbildung 4-6).

Die Analyse tet – regulierter BMP-2 Expression auf ATDC5 – Zellen ergab ebenfalls eine maximale, regulierbare BMP-2 Expression nach Verwendung des Ein – Vektor – Systems mit SF – Promotor getriebenem Transaktivator (Abbildung 4-7). Die erreichte BMP-2 Konzentration lag mit durchschnittlich 1,8 ng BMP-2/ ml ( $1,8 \pm 0,7$  ng BMP-2/ ml, normiert auf  $1 \times 10^6$  Zellen und 24 h) deutlich unter den BMP-2 Konzentrationen die in CMS-5 Zellen erreicht werden konnten.

Durch regulierte Genexpression erreichte BMP-2 Konzentration nach Induktion infizierter, primärer Kaninchenchondrozyten *in vitro* ist schließlich mit durchschnittlich circa 15 ng/ml ( $15,5 \pm 1,1$  Ein – Vektor – System bzw.  $14,6 \pm 0,4$  BMP-2 Zwei – Vektor – System, 24 h,  $1 \times 10^6$  Zellen; Abbildung 4-8) in vergleichbarer Größenordnung wie die funktionelle BMP-2 Konzentration, circa 20 ng/ml BMP-2, die bei konstitutiver Expression mit retroviralen Vektoren erreicht werden kann [149]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die BMP-2 Expression ausreichend ist, um eine Verbesserung der Knorpelqualität zu erreichen, jedoch keine vollständige Heilung möglich ist.

Durch Expression mit dem Ein – Vektor Tet on – Konstrukt konnte eine geringfügig höhere, maximale BMP-2 Expression, gegenüber dem Zwei – Vektor – System erreicht werden (TE+S = 14,6 ng/ml, TES = 15,5 ng/ml, Abbildung 4-8).

*Leakiness*, d.h. eine starke Hintergrund-Expression im abgeschalteten Zustand bei Verwendung des Ein – Vektor – Systems, wurde außer bei Verwendung des Konstrukts mit PGK getriebenem Transaktivator, nicht beobachtet.

Im Hinblick auf die mögliche humane Anwendung tet – regulierter BMP-2 Expression konnte außerdem gezeigt werden, dass auch in humanen Chondrozyten eine 26-fache Induktion der BMP-2 Expression erreicht werden kann (Abbildung 4-9). Die BMP-2 Expression nach Induktion ist dabei mit  $58,5 \pm 6,5$  ng BMP-2/ ml lediglich um Faktor drei geringer, als die konstitutive BMP-2 Expression ( $207,5 \pm 1,9$  ng BMP-2/ ml).

In humanen Chondrozyten kann somit durch regulierte Expression die 3,8-fach höhere Menge an BMP-2 verglichen mit Kaninchenchondrozyten erreicht werden, was möglicherweise auf eine bessere

Infizierbarkeit der humanen Zellen oder einer stärkeren Aktivität der verwendeten Promotoren in diesen Zellen hindeutet.

In Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die Kinetik der tet-regulierten BMP-2 Expression in primären Kaninchenchondrozyten untersucht (Abbildung 4-12). Die nähere Untersuchung der Kinetik tet – vermittelter BMP-2 Expression ergab einen Anstieg der BMP-2 Expression in den ersten vier Tagen nach Zugabe von Doxyzyklin bis an Tag fünf die maximale Induktion erreicht war. Durch Wegnahme von Doxyzyklin konnte bestätigt werden, dass die Tet – regulierte Expression vollständig reversibel ist und innerhalb weiterer vier Tage auf das Hintergrundlevel abgeschaltet werden kann. Die Kinetik des Abschaltens ist der Faktor aus den Halbwertszeiten von Doxyzyklin, des Transaktivators und des BMP-2 Proteins.

Da mit dem *spleen focus forming* Virus Promotor ein starker, viraler Promotor zur Expression des Transaktivators eingesetzt wurde, musste außerdem untersucht werden ob epigenetische Methylierung des Promotors, erkennbar anhand einer geringeren Transgen-Expressionsstärke, auftritt. Die Dauerinduktion der tet-vermittelten BMP-2 Expression über einen therapeutisch relevanten Zeitraum von 24 Tagen zeigte jedoch im Mittel kein Absinken der Genexpression durch Silencing (Abbildung 4-13). Es wird daher davon ausgegangen, dass keine Methylierung aufgetreten ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die tet-kontrollierte BMP-2 Expression erneut induziert werden kann, ohne einen deutlichen Verlust der Effizienz (Abbildung 4-14). Dies könnte bei mangelnder Effizienz der initialen Therapie oder bei erneut auftretenden Schäden sinnvoll sein.

Sowohl bei primären Kaninchenchondrozyten, als auch bei humanen Chondrozyten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die durch regulierte, lentivirale Expression gebildete Menge an BMP-2 ausreichend ist, um *downstream* Prozesse in Gang zu setzen (Abbildung 4-16 und Abbildung 4-17). So konnte, nach Induktion der tet - vermittelten BMP-2 Expression, eine deutlich gesteigerte Produktion von Proteoglykanen durch transduzierte Kaninchenchondrozyten und humanen Chondrozyten beobachtet werden.

Die Verwendung von Kaninchenchondrozyten erlaubte weiterhin die relative Quantifizierung der Proteoglykansynthese durch Extraktion des Alzianblau-Farbstoffes. Diese bestätigte eine bis zu 13-fachen Anstieg der Proteoglykansynthese nach tet-induzierter BMP-2 Expression.

In einem nächsten Schritt wurde die tet-regulierte BMP-2 Expression in einem etablierten Kaninchen - Defektmodell analysiert. Dafür wurden autologe, primäre Chondrozyten mit lentiviralen Überständen mit dem BMP-2 kodierenden Ein – Vektor – Konstrukt infiziert und in einer Fibrinklebersuspension in einen künstlich gesetzten, osteochondralen Defekt eingebracht.

Parallel erfolgte die Analyse der Induzierbarkeit der tet-vermittelten eGFP und BMP-2 Expression *in vitro* bei Zellen jedes Tieres.

Bereits dabei zeigte sich, dass die Expression von eGFP und BMP-2 in den Zellen verschiedener Donoren, nach Induktion durch Doxyzyklin, *in vitro* sehr stark variiert. Eine Gegenüberstellung der eGFP und BMP-2 Expression durch transduzierte Chondrozyten verschiedener Tiere befindet sich im Anhang.

Ein möglicher Grund dafür könnte die unterschiedliche Infizierbarkeit der Zellen sein. Dafür spricht der stark schwankende Prozentsatz eGFP positiver Zellen nach Induktion der Transgenexpression. Jedoch korreliert die Prozentzahl eGFP positiver Zellen nicht, wie zu erwarten wäre, mit der Höhe der mittleren Fluoreszenzintensität. Häufig besteht jedoch ein Zusammenhang zwischen der Höhe der mittleren Fluoreszenzintensität und der BMP-2 Expression.

Außerdem wurde *in vitro* gezeigt, dass auch in Fibrinclots eine Induktion der Doxyzyklin-vermittelten Genexpression sowie die Funktionalität des gebildeten BMP-2s möglich ist (Abbildung 4-27, Abbildung 4-28 und Abbildung 4-29).

Die Auswertung des nach vier Wochen entnommenen Reparaturgewebes ergab, dass durch Gabe von Doxyzyklin ins Trinkwasser eine 26,5 – fache Steigerung der BMP-2 Expression gegenüber nicht induzierten Proben erreicht werden kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Doxyzyklin - induzierte BMP-2 Expression nach zwei Wochen ohne Doxyzyklin – Gabe auf Hintergrundniveau lag. (Abbildung 4-30). Mit diesem Versuchsaufbau konnte jedoch nicht schlüssig bewiesen werden, dass die BMP-2 Expression der TBS 50% während der zweiwöchigen Induktion angestiegen war.

Auch *in vivo* waren große Schwankungen hinsichtlich der Messwerte verschiedener Tiere zu beobachten. Die Expressionsstärke *in vitro* ließ des Weiteren keine Rückschlüsse auf die Höhe der Expression *in vivo* zu. Aufschluss darüber gibt eine Gegenüberstellung der BMP-2 Expression durch transduzierte Chondrozyten verschiedene Tiere *in vitro* und *in vivo* (siehe Tabelle im Anhang).

Ein möglicher Grund für die fehlende Korrelation und die starken Schwankungen *in vivo* könnte eine unterschiedliche Anzahl angesiedelter Zellen im Defekt sein. Auch eine schwankende Aufnahme des mit Doxyzyklin versetzten Trinkwassers und eine unterschiedlich starke Induktion der BMP-2 Expression im Gelenk ist möglich.

Dass auf Proteinebene kein Doxyzyklin-induzierbarer Anstieg der BMP-2 Expression beobachtet werden kann, ist möglicherweise auf die bereits *in vitro* festgestellte, circa 10-fach geringere BMP-2 Expression in Fibrinclots, verglichen mit konstitutiver BMP-2 Expression durch Retroviren, zurückzuführen [Persönliche Mitteilung G. Wexel, unveröffentlichte Daten]. Daher lag die *in vivo* produzierte BMP-2 Menge vermutlich unterhalb des Detektionslimits des BMP-2 ELISAs.

Die Aufteilung der Tiere in die verschiedenen Gruppen erfolgte, ohne Kenntnis der *in vitro* Ergebnisse, rein zufällig. Die *in vitro* Ergebnisse zeigte jedoch nachträglich, dass sich durchschnittlich bis schwach exprimierende Tiere in der TBS+D Gruppe befanden. Ob stark *in vitro* exprimierende Tiere, wie z. B. die Tiere 10, 13 und 18, zu einer stärkeren Expression *in vivo* und somit zu einer auf Proteinebene messbaren BMP-2 Konzentration im regenerierten Gewebe geführt hätte ist daher unklar.

Des Weiteren erforderte der Versuchsaufbau, anders als nach Implantation konstitutiv, retroviral BMP-2 exprimierender Zellen, die effiziente Induktion der Transgenexpression *in vivo* durch Gabe von Doxyzyklin im Trinkwasser.

Vermutlich ist somit die *in situ* BMP-2 Expression auch zu gering um eine Verbesserung des Heilungsprozesses zu bewirken.

Histologisch wies das entstehende Gewebe keine knorpelspezifischen Eigenschaften, wie z. B die Synthese von Proteoglykanen, auf (Abbildung 4-31). Weder ungeordnete Knorpelzellen, wie es bei Faserknorpel zu erwarten wäre, noch säulenartig angeordnete Knorpelzellen, wie bei nativem hyalinem Knorpel, waren zu erkennen. Durch das Setzen des osteochondralen Defekts fand vermutlich ein Entzündungsprozess statt, wodurch der Defekt in erster Linie mit neutrophilen Granulozyten gefüllt war.

Es konnte kein histologischer Unterschied nach Implantation uninfizierter bzw. TBS infizierter sowie vor oder nach Induktion beobachtet werden.

Bei bisherigen Versuchen zur Therapie osteochondraler Defekt im Kaninchenknie, basierend auf rekombinantem BMP-2, wurden BMP-2 Mengen zwischen 1 µg und 40 µg in verschiedenen Trägermaterialien wie Alginatsphären, Kollagen- und Gelantine-Schwämme eingesetzt [13, 151, 162]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits geringe Mengen, z. B. 1 µg, ausreichend sind, um eine Verbesserung der Knorpelheilung zu erreichen [162].

*In vitro* konnte, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, durch regulierte, lentiviral vermittelte Expression eine BMP-2 Menge von 15 ng durch  $1 \times 10^6$  Zellen erreicht werden. Da für die Implantation  $5 \times 10^4$  Zellen verwendet wurden ist selbst im optimalen Fall, falls alle Zellen im Defekt anwachsen und im Gelenk induziert werden, die BMP-2 geringer als die verwendete Menge an rekombinantem BMP-2.

Es wird die Optimierung der Transduktion der autologen Zellen, evtl. durch Verlängerung der Infektionsdauer auf 24 h, und eventuell die Implantation einer größeren Zellzahl [163] nötig sein um die BMP-2 Konzentration im Defekt zu steigern. Weiterhin ist es sinnvoll die Knorpelregeneration nach einem längeren Zeitraum, z. B. 12 Wochen, zu beurteilen.

Zudem ist es sinnvoll dass Verbleiben der implantierten Zellen im Defekt zu überprüfen. Die Detektion implantierter Zellen könnte histologisch durch eine zusätzliche Gruppe mit eGFP transduzierten Zellen erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit ist die Markierung implantierter Zellen mit Kontrastmittel und die anschließende Detektion mittels Magnetresonanztomographie. Van Buul et al. konnten bereits zeigen, dass auf diese Weise, ein *in vivo* Nachweis implantierter humaner MSCs möglich ist [164].

Grundsätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass prinzipiell eine Induktion der Genexpression *in vivo* möglich ist, aber bisher noch zu wenig BMP-2 produziert wird um eine Verbesserung der Qualität des Regenerationsgewebes zu erreichen.

Neben der Knorpelbildung ist BMP-2 auch in der Knochenbildung involviert [88]. Grundsätzlich besteht daher durch starke BMP-2 Überexpression im Gelenk die Gefahr der ungewollten Knochenbildung im Gelenk. Durch die Anwendung transduzierter Knorpelzellen zur Überexpression und Implantation wird diese Gefahr gesenkt. Möglicherweise ist außerdem die Wahl anderer Transgene, wie z. B. *transforming growth factor beta 1* (TGF $\beta$ -1), die ebenfalls eine Verbesserung der Knorpelheilung und -qualität durch Reduktion der Kollagen Typ I Expression und Steigerung der Kollagen Typ II Expression herbeiführen, sinnvoll [136, 165, 166].

### **5.2.2 Regulierte Expression von Wachstumsfaktoren in mesenchymalen Stammzellen zur Therapie osteochondraler Defekte**

Bei verschiedenen Knochenerkrankungen konnte in klinischen Studien bereits Verbesserungen durch den Einsatz von patienteneigenen MSCs erreicht werden [167].

Neben dem osteogenen Differenzierungspotential können mesenchymale Stammzellen zusätzlich adipogen und chondrogen differenzieren. Aufgrund ihrer Fähigkeit Knorpelgewebe hervorbringen zu können erscheinen MSCs auch vielversprechend zur Therapie chondraler bzw. osteochondraler Defekte. Neben dem breiteren Anwendungsspektrum haben MSCs, gegenüber autologer Chondrozyten, außerdem den Vorteil der besseren Verfügbarkeit.

Zusätzlich können auch mesenchymale Stammzellen durch Gentherapie derart modifiziert werden, dass sie die stabile Expression von therapeutischen Transgenen ermöglichen, um die Reparatur und Regeneration von beschädigtem oder krankem Gewebe zu fördern [103, 104].

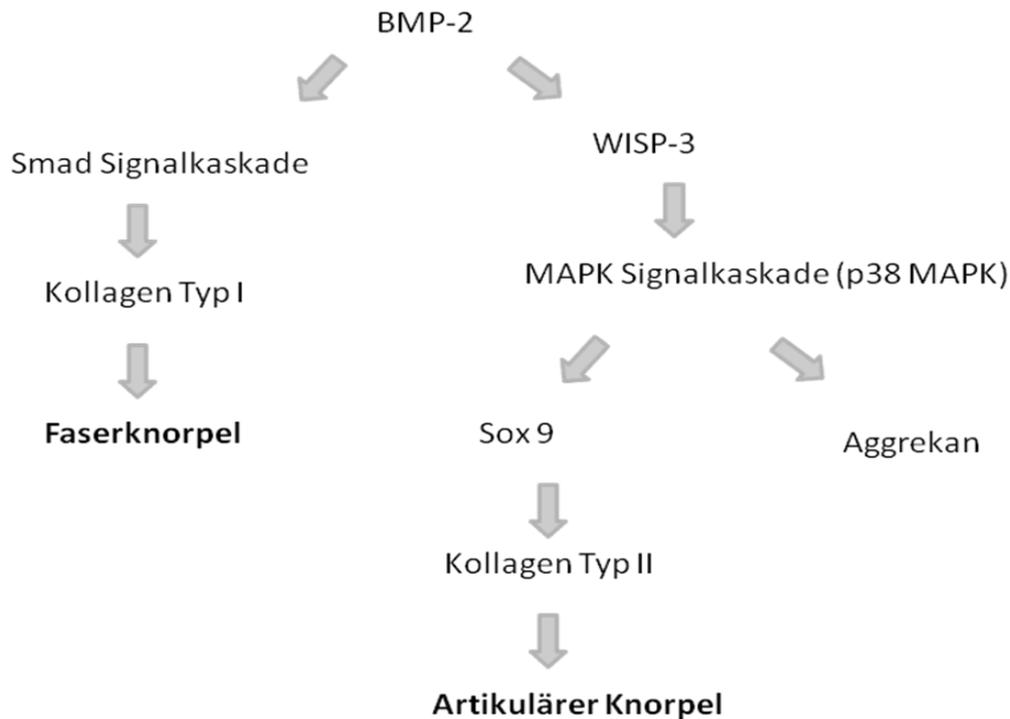
In diesem Zusammenhang erscheint der Einsatz lentiviraler Vektoren als besonders sinnvoll, da circa 20% der MSCs als quieszent (ruhend) beschrieben werden [168]. Im Gegensatz zu anderen, retroviralen Vektoren, haben sie die Möglichkeit auch sich nicht teilende Zellen effizient zu infizieren. Auch die regulierte, lentiviral vermittelte Expression von Transgenen, wie dem *keratinocyte growth factor* (KGF) zur Therapie von idiopathischer Lungenfibrose, in mesenchymalen Stammzellen konnte bereits gezeigt werden [169].

Unter Kontrolle des Tet on – Systems konnte im Laufe dieser Arbeit auf mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens eine 36-fache Steigerung der BMP-2 Expression nach Induktion auf RNA-Ebene (Abbildung 4-10) sowie eine 112-fache Steigerung auf Proteinebene (Abbildung 4-11) gezeigt werden. Die absolute Menge an sekretiertem BMP-2 lag dabei nach Induktion mit 27,3 ng BMP-2/ml um ein 1,8-faches höher als auf Kaninchenchondrozyten, ist jedoch deutlich geringer als die BMP-2 Konzentration nach konstitutiver lentiviraler (230 ng/ml, Abbildung 4-11) oder adenoviraler Expression in bovinene MSCs (bis zu 120 ng/ml) [104].

Infizierte IMSCs wiesen nach Induktion der BMP-2 Expression einen erhöhten Expressionslevel an knorpelspezifischen Typ II Kollagenen auf, welche Bestandteil von solidem, hyalinen Knorpel sind (Abbildung 4-18). In weichem Faserknorpel ist dieser Anteil im Allgemeinen zu gering, was eine schlechtere Knorpelqualität zur Folge hat. Es ist daher zu vermuten, dass die Expression von BMP-2 zur Verbesserung der Qualität des regenerierten Gewebes führen könnte.

In Bezug auf die Anwendung von mesenchymalen Stammzellen zur osteochondralen Therapie scheint auch die Expression des *Wnt-induced secreted protein 3* (WISP-3) von Bedeutung zu sein. Die Expression von WISP-3 ändert sich im Verlauf des Differenzierungsprozesses. Das Fehlen von WISP-3 – durch Mutationen im WISP-3 Gens – führt zu pseudorheumatoider Dysplasie, einer Erkrankung die u. a. mit dem Verlust von Knorpelgewebe einhergeht [170].

Interessant für die Anwendung zur Knorpeltherapie ist die durch WISP-3 induzierte Verstärkung der Kollagen Typ II Produktion über Aktivierung der MAPK Signalkaskade (Abbildung 5-1) [87, 94]. Bisheriges Regenerationsgewebe ist charakterisiert durch einen sehr geringen Gehalt an Kollagen Typ II, anders als in solidem, artikulären Knorpelgewebe [165]. Mit Überexpression von WISP-3 könnte somit durch erhöhte Kollagen Typ II Produktion möglicherweise die Verbesserung der Qualität des regenerierten Gewebes erreicht werden.



**Abbildung 5-1: Überblick über BMP-2 aktivierte *downstream* Prozesse**

BMP-2 aktiviert über die Smad-Signalkaskade die Synthese von Kollagen Typ I. Zusätzlich wird über die Aktivierung von WISP-3 und den MAPK Signalweg die Expression von Aggrecan, Sox9 und des knorpelspezifischen Kollagen Typ II induziert [87, 94, 171].

Durch lentivirale Transduktion lässt sich sowohl konstitutive WISP-3 Expression, als auch regulierte Expression durch das Tet on – System in mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens erreichen (Abbildung 4-19).

Inwieweit *downstream* Prozesse durch die WISP-3 Expression aktiviert werden, d.h. knorpelspezifische Genexpression induziert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, wird aber im weiteren Verlauf des Projektes eine wichtige Rolle spielen.

Die Differenzierungsfähigkeit der mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens in die osteogene und chondrogene Linie wird durch die lentivirale Infektion nicht beeinträchtigt (Abbildung 4-20, Abbildung 4-21 und Abbildung 4-22). Jedoch handelte es sich bei der Untersuchung um das Differenzierungspotential eines Zellpools an infizierten und nicht infizierten Zellen und es konnte nicht sichergestellt werden, dass die Differenzierung durch infizierte Zellen erfolgt. Die Analyse der Transduktionseffizienz von IMSC mit lentiviralen Vektoren ergab aber eine Infektion von über 90 % bei Infektion mit Polybren für 24 h (Abbildung 4-2), wodurch der Einfluss uninfizierter Zellen als gering einzuschätzen ist. Ein Nachweis über stammzellspezifische Oberflächenmarker ist, aufgrund fehlender Antikörper gegen kaninchenspezifische Oberflächenproteine, nicht möglich.

### 5.2.3 Erhöhte Sicherheit durch lentivirale SIN-Vektoren

Verschiedene integrierende Vektoren, wie z. B. Retro-, Lenti- und adenoassoziierte Viren, wurden bisher für gentherapeutische Ansätze in Betracht gezogen. Durch Integration ins Genom der transduzierten Zellen ermöglichen sie eine stabile Transgenexpression, unterscheiden sich jedoch in Effizienz und Integrationsmuster [172-177].

Als besonders vielversprechend erschien in der Vergangenheit die Anwendung von  $\gamma$ -Retroviren. Replikationsdefiziente, retrovirale Vektoren erschienen in präklinischen Studien als risikoarm [157].

In der Folge kam es jedoch nach Gentherapien zur Behandlung von *x-linked severe combined immunodeficiency* (SCID-X1), nach retroviral-vermitteltem Transfer des  $\gamma$ c-Gens in autologe CD34 Knochenmarkszellen, in mehreren Fällen zur Entstehung von Leukämie. Das veränderte Zellwachstum wurde durch die Vektor-Integration nahe dem LMO2-Protoonkogens ausgelöst, was zur Veränderung der Transkription und Expression von LMO2 führte [62].

Heute ist bekannt, dass die integrierten, retroviralen *long terminal repeats* (LTR), durch enthaltene Enhancer-Elemente, zu einer Hochregulierung der Expression flankierender Gene, unabhängig von deren Orientierung und Entfernung führen können. Retrovirale Vektoren integrieren häufig in oder nahe bei krebssassoziierten Genen, welche in Folge der Integration aktiviert werden [157, 158].

Da die starken, transkriptionellen Enhancer des LTRs mit der Aktivierung von Onkogene assoziiert wurden, konnte bereits durch Entfernung von Enhancer- und Promotorelementen die Genotoxizität retroviraler Vektoren verringert werden [156].

Im Vergleich zu lentiviralen Vektoren zeigen diese sog. selbstinaktivierenden (SIN) Retroviren jedoch, aufgrund des unterschiedlichen Integrationsmusters, weiterhin eine deutlich höhere Toxizität. Lentivirale Vektoren zeigen im Gegensatz zu retroviralen Vektoren keine Anhäufung von Integration in oder nahe bei krebssassoziierten Genen [156].

Schätzungen zufolge ist die Genotoxizität der *murine leukemia virus* (MLV-) abgeleiteten  $\gamma$ -Retroviren mit einer 10-fach höheren Dosis an HIV-abgeleiteten Lentiviren mit intaktem LTR vergleichbar [156].

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Transduktion mit lentiviralen SIN Vektoren, sogar bei einer großen Anzahl an Integrationen, die Tumorigenese nicht beschleunigt. Im Gegensatz dazu ist die Beschleunigung der Tumorentstehung durch retroviralen Vektoren dosisabhängig [157].

Durch Verwendung von lentiviralen SIN-Vektoren kann somit die Gefahr der Integrationsmutagenese minimiert werden [157].

Um Integrationsmutagenese völlig auszuschließen werden außerdem weitere Lösungsansätze verfolgt:

Integrationsdefiziente, lentivirale Vektoren sind aufgrund einer katalytisch inaktiven Integrase nicht in der Lage, sich ins Wirtsgenom zu integrieren. Sie liegen episomal im Zytoplasma vor.

Eine stabile Transgenexpression, über einen längeren Zeitraum hinweg, ist jedoch nicht mehr möglich. Daher ist deren Verwendung nicht für jede Zielsetzung geeignet.

Zusätzlich werden Methoden entwickelt, mit denen eine zielgerichtete Insertion integrationsdefizienter Vektoren ermöglicht wird. Lombardo et al. erweiterten die Anwendung integrationsdefizienter Lentiviren durch die Kombination mit Zinkfinger-nukleasen. Diese können zur Erkennung spezieller Sequenzen konstruiert werden und ermöglichen so die zielgerichtete Integration des Lentivirusgenoms [178].

Für das Projekt der vorliegenden Arbeit erschien der Einsatz lentiviraler SIN Vektoren zur stabilen Expression der Transgene am sinnvollsten. Da es sich um eine *ex vivo* Gentherapie handelt, könnte die Möglichkeit der Integrationsmutagenese zusätzlich, durch Analyse der Vektorintegration vor der Implantation, minimiert werden.

Grundsätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit die lentiviral-vermittelte, regulierte Expression von Reporter- und therapeutischen Transgenen in chondrogenen Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. Aufgrund der durchgeführten Optimierung der tet-vermittelten Expression ist im Folgenden die Anwendung mit weiteren therapeutischen Transgenen, wie z. B. *transforming growth factor beta – 1* (TGF $\beta$ -1) oder *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), möglich.

Weiterhin erscheint der Einsatz der lentiviralen, tet-vermittelten Transgenexpression in mesenchymalen Stammzellen als eine erfolgversprechende Alternative. Die Übertragbarkeit konnte in ersten Versuchen bereits gezeigt werden.

### 5.3 Ausblick

Da zwar eine Regulation der tet – induzierbaren Genexpression, nicht aber Funktionalität *in vivo* gezeigt werden konnte, wird ein nötiger Schritt sein, den induzierbaren BMP-2 Expressionslevel zu erhöhen. Ein möglicher Ansatz könnte die Verlängerung der Infektionsdauer auf 24 Stunden sein. Auf diese Weise konnte bereits eine effiziente Infektion von mesenchymalen Stammzellen des Kaninchens erreicht werden.

Des Weiteren bleibt zu überprüfen, ob weitere Transgene möglicherweise eine deutlichere Auswirkung auf die Knorpelregeneration zeigen. Nach Optimierung des lentiviralen Tet on – System in chondrogenen Zellen kann theoretisch jedes beliebige Transgen eingesetzt werden. In Frage kommen zum Beispiel TGF $\beta$  oder WISP-3, Transgene führt die bereits ein positiver Effekt auf die Expression von knorpelspezifischem Kollagen Typ II, und somit auf die Knorpelqualität, beschrieben wurde.

Mit *in vitro* Vorarbeiten zur tet-vermittelten WISP-3 Expression in mesenchymalen Stammzellen wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit begonnen. Weiterhin bleibt zu analysieren, inwieweit durch lentivirale Überexpression die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Richtung der chondrogenen Linie gefördert werden kann bzw. sich die Expression von WISP-3 auf die Aktivität verschiedener chondrogener Markergene, wie z. B. Kollagen Typ II, auswirkt. Um die Arbeit mit mesenchymalen Stammzellen zu erleichtern erscheint es sinnvoll, dazu zunächst immortalisierte MSCs herzustellen auf denen Vorversuche durchgeführt werden können.

In Hinblick auf die Anwendung der Therapie in der Humanmedizin muss außerdem sichergestellt werden, dass bisherige Ergebnisse auf humane Zellen übertragbar sind. Ansatzweise konnte dies mit der regulierten BMP-2 Expression und Funktionalität auf humanen Chondrozyten bereits gezeigt werden.

## ABKÜRZUNGEN

### *Vektoren für das Zwei - Vektor Tet on - System*

|    |           |                                           |
|----|-----------|-------------------------------------------|
| C  | CMVrtTA   | CMV – Promotor getriebener Transaktivator |
| P  | PGKrtTA   | PGK – Promotor getriebener Transaktivator |
| S  | SFrtTA    | SF – Promotor getriebener Transaktivator  |
| TE | TREeGFP   | Response – Konstrukt mit eGFP Transgen    |
| TB | TREBMP-2  | Response – Konstrukt mit BMP-2 Transgen   |
| TW | TREWISP-3 | Response – Konstrukt mit WISP-3 Transgen  |

### *Vektoren für das Ein – Vektor Tet on - System*

|     |                  |                                                                                            |
|-----|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| TES | TREeGFPSFrtTA    | Ein – Vektor – Konstrukt mit eGFP Transgen und SF – Promotor getriebenem Transaktivator    |
| TEP | TREeGFPPGKrtTA   | Ein – Vektor – Konstrukt mit eGFP Transgen und PGK – Promotor getriebenem Transaktivator   |
| TBS | TREBMP-2SFrtTA   | Ein – Vektor – Konstrukt mit BMP-2 Transgen und SF – Promotor getriebenem Transaktivator   |
| TBP | TREBMP-2PGKrtTA  | Ein – Vektor – Konstrukt mit BMP-2 Transgen und PGK – Promotor getriebenem Transaktivator  |
| TWP | TREWISP-3PGKrtTA | Ein – Vektor – Konstrukt mit WISP-3 Transgen und PGK – Promotor getriebenem Transaktivator |

### *Konstitutive Expression*

|    |           |                                                |
|----|-----------|------------------------------------------------|
| SE | SFeGFP    | eGFP Transgen durch SF – Promotor getrieben    |
| PE | PGKeGFP   | eGFP Transgen durch PGK – Promotor getrieben   |
| SB | SFBMP-2   | BMP-2 Transgen durch SF – Promotor getrieben   |
| PB | PGKBMP-2  | BMP-2 Transgen durch PGK – Promotor getrieben  |
| SW | SFWISP-3  | WISP-3 Transgen durch SF – Promotor getrieben  |
| PW | PGKWISP-3 | WISP-3 Transgen durch PGK – Promotor getrieben |

---

|                |                                                                                         |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| ACT            | Autologe Chondrozyten-Transplantation                                                   |
| ALP            | Alkalische Phosphatase                                                                  |
| Amp            | Ampicillin                                                                              |
| BMP            | <i>Bone morphogenic protein</i>                                                         |
| BMP-2          | <i>Bone morphogenic protein 2</i>                                                       |
| bp             | Basenpaar                                                                               |
| BSA            | Rinderserumalbumin                                                                      |
| CCN            | <i>cysteine-rich61/connective tissue growth factor/<br/>neuroblastoma overexpressed</i> |
| CMV            | Cytomegalovirus                                                                         |
| CsCl           | Cäsiumchlorid                                                                           |
| DMEM           | Dulbecco's modified Eagle's medium                                                      |
| DMMB           | Dimethylmethylenblau                                                                    |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid                                                                        |
| DNA            | <i>Desoxyribonucleic acid</i>                                                           |
| Dox            | Doxyzyklin                                                                              |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                                                 |
| EGFP           | <i>Enhanced green fluorescent protein</i>                                               |
| ELISA          | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>                                                |
| Env            | Hülle                                                                                   |
| EDTA           | Ethylendiamintetraacetat                                                                |
| FACS           | <i>Fluorescence activated cell sorter</i>                                               |
| Fe             | Eisen                                                                                   |
| FKS            | Fötales Kälberserum                                                                     |
| GAG            | Glykosaminoglykan                                                                       |
| Gag            | Gruppenspezifisches Antigen                                                             |
| GAPDH          | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase                                                |
| gp             | Glykoprotein                                                                            |
| h              | Stunde(n)                                                                               |
| HEK            | <i>Human embryonic kidney</i>                                                           |
| HBS            | HEPES gepufferte Salzlösung                                                             |
| HIV            | Humanes Immundefizienzvirus                                                             |
| HSV            | Herpes-Simplex-Virus                                                                    |
| IGF            | <i>Insulin-like growth factor</i>                                                       |

|          |                                                         |
|----------|---------------------------------------------------------|
| ITS      | Insulin, Transferrin, Selen                             |
| KAc      | Kaliumacetat                                            |
| LB       | Luria-Bertani                                           |
| IMSC     | Mesenchymale Stammzellen des Kaninchens                 |
| LP       | Lentivirale Partikel                                    |
| LTR      | <i>Long terminal repeat</i>                             |
| MAPK     | <i>Mitogen-activated protein kinase</i>                 |
| MNP      | Magnetische Nanopartikel                                |
| mRNA     | <i>Messenger ribonucleic acid</i>                       |
| MSC      | Mesenchymale Stammzellen                                |
| NWR      | weiße Neuseeländer ( <i>New Zealand White Rabbits</i> ) |
| PBS      | <i>Phosphate buffered saline</i>                        |
| PCR      | <i>Polymerase chain reaction</i>                        |
| PGK      | Phosphoglyzeratkinase                                   |
| PI       | Propidiumiodid                                          |
| Pol      | Polymerase                                              |
| PPT      | Polypurintrakt                                          |
| qRT-PCR  | quantitative Reverse Transkriptase PCR                  |
| Rev      | <i>Regulator of expression of virion proteins</i>       |
| Rpm      | <i>Rotations per minute</i>                             |
| RRE      | <i>Rev responsive element</i>                           |
| R-Region | Redundante Region                                       |
| RSV      | Rous-Sarkom-Virus                                       |
| RT-PCR   | Reverse Transkriptase PCR                               |
| rtTA     | Reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator          |
| SA       | Spleißakzeptor                                          |
| SD       | Spleißdonor                                             |
| SDS      | <i>Sodium dodecyl sulfate</i>                           |
| SF       | <i>Spleen focus forming virus</i>                       |
| SIN      | Selbstinaktivierend                                     |
| Smad     | Sma / Mad                                               |
| Sox9     | SRY ( <i>sex determining region Y</i> )- box 9          |
| TA       | Transaktivator                                          |
| TAE      | Tris-Acetat-EDTA                                        |

|             |                                                          |
|-------------|----------------------------------------------------------|
| Tat         | Transkriptionstransaktivator                             |
| TE          | Tris-EDTA                                                |
| Tet         | Tetrazyklin                                              |
| TGF $\beta$ | <i>Tumor growth factor <math>\beta</math></i>            |
| TRE         | Tetrazyklin responsives Element                          |
| Tris        | Trishydroxymethylaminomethan                             |
| TU          | Transduzierende Einheiten                                |
| U3-Region   | Unique 3'-Region                                         |
| U5-Region   | Unique 5'-Region                                         |
| VP16        | Virionprotein 16                                         |
| VSV.G       | Vesikuläres Stomatitisvirus Glykoprotein                 |
| WISP-3      | <i>Wnt-induced secreted protein 3</i>                    |
| WPRE        | <i>woodchuck post-transcriptional regulatory element</i> |

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1-1: Molekularer Knorpelaufbau ..... 4

Abbildung 1-2: Vorgehensweise zur autologen Chondrozyten-Transplantation..... 6

Abbildung 1-3: Mikrofrakturierung zur Therapie von Knorpeldefekten ..... 7

Abbildung 1-4: Nachweis der Differenzierungsfähigkeit mesenchymaler Stammzellen ..... 9

Abbildung 1-5: Anteil an gentherapeutischen klinischen Studien nach zugrundeliegenden  
Erkrankungen ..... 10

Abbildung 1-6: Aufbau eines lentiviralen Partikels ..... 13

Abbildung 1-7: Aufbau des Retrovirusgenoms..... 14

Abbildung 1-8: Der lentivirale Replikationszyklus ..... 16

Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des lentiviralen Provirus (A) und der drei Konstrukte für das  
Verpackungssystem der dritten Generation (B-D)..... 17

Abbildung 1-10: Schematischer Aufbau des Transferplasmids ..... 18

Abbildung 1-11: Aufteilung bisheriger klinischer Studien zur Gentherapie nach Transgen-Klassen .... 19

Abbildung 1-12: Schematischer Aufbau des BMP-2 Vorläuferproteins ..... 20

Abbildung 1-13: BMP-2 aktivierte Signalkaskaden ..... 21

Abbildung 1-14: Struktur der CCN Proteinfamilie ..... 23

Abbildung 1-15: Schematische Darstellung des Tet on – Systems..... 25

Abbildung 3-1: Neubauer Zahlkammer und Gitterübersicht zur Bestimmung der Zellzahl..... 45

Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Proviren zur konstitutiven und regulierten, lentiviralen  
Expression gewünschter Transgene ..... 55

Abbildung 4-2: Test verschiedener Infektionsverfahren zur Optimierung der Lentivirusinfektion  
mesenchymaler Stammzellen des Kaninchens (IMSC)..... 58

Abbildung 4-3: Tet-regulierte und konstitutive eGFP Expression in CMS5-Zellen..... 60

Abbildung 4-4: Tet-regulierte und konstitutive eGFP Expression in ATDC5-Zellen ..... 62

Abbildung 4-5: Tet-regulierte und konstitutive eGFP Expression in primären Kaninchenchondrozyten  
..... 64

Abbildung 4-6: Tet-regulierte und konstitutive BMP-2 Expression in CMS5-Zellen ..... 65

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 4-7: Tet-regulierte und konstitutive BMP-2 Expression in ATDC5-Zellen.....                                                 | 66 |
| Abbildung 4-8: Tet-regulierte und konstitutive BMP-2-Expression in primären Kaninchenchondrozyten.....                               | 66 |
| Abbildung 4-9: Regulierte und konstitutive BMP-2 Expression in humanen Chondrozyten .....                                            | 67 |
| Abbildung 4-10: Absolute Quantifizierung tet-induzierter BMP-2 Expression in IMSCs.....                                              | 68 |
| Abbildung 4-11: Tet-regulierte und konstitutive BMP-2 Expression in IMSCs.....                                                       | 68 |
| Abbildung 4-12: Kinetik tet-regulierter BMP-2 Expression durch Ein – und Zwei – Vektor System in primären Kaninchenchondrozyten..... | 69 |
| Abbildung 4-13: Stabile Tet-regulierte BMP-2 Expression in primären Kaninchenchondrozyten .....                                      | 70 |
| Abbildung 4-14: Wiederholte Induktion Tet-regulierter BMP-2 Expression auf Chondrozyten .....                                        | 71 |
| Abbildung 4-15: Alzianblau-Färbung auf infizierten ATDC5-Zellen.....                                                                 | 72 |
| Abbildung 4-16: Alzianblaufärbung auf infizierten Kaninchenchondrozyten .....                                                        | 73 |
| Abbildung 4-17: Alzianblaufärbung auf infizierten, humanen Chondrozyten .....                                                        | 74 |
| Abbildung 4-18: Kollagen Typ II Expression BMP-2 exprimierender mesenchymaler Stammzellen des Kaninchens .....                       | 74 |
| Abbildung 4-19: Konstitutive und tet-regulierte WISP-3 Expression in mesenchymalen Stammzellen                                       | 76 |
| Abbildung 4-20: Calciumproduktion durch lentiviral transduzierte, osteogen differenzierte IMSCs...                                   | 77 |
| Abbildung 4-21: Alizarinrot-Färbung lentiviral transduzierter, osteogen differenzierter IMSCs.....                                   | 77 |
| Abbildung 4-22: GAG-Quantifizierung nach chondrogener Differenzierung lentiviral transduzierter MSCs .....                           | 78 |
| Abbildung 4-23: Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs zur Knorpelregeneration durch BMP-2 exprimierende Chondrozyten .....              | 79 |
| Abbildung 4-24: Knorpeldefektmodell im Kaninchen .....                                                                               | 79 |
| Abbildung 4-25: Regulierte eGFP Expression in Kaninchenchondrozyten für den Tierversuch <i>in vitro</i>                              | 80 |
| Abbildung 4-26: Regulierte BMP-2 Expression in Kaninchenchondrozyten für den Tierversuch <i>in vitro</i> .....                       | 81 |
| Abbildung 4-27: Induktion der eGFP Expression in Kaninchenchondrozyten des Tierversuchs in <i>in vitro</i> Fibrinclots .....         | 82 |
| Abbildung 4-28: Induktion der BMP-2 Expression in Kaninchenchondrozyten des Tierversuchs in <i>in vitro</i> Fibrinclots.....         | 83 |

Abbildung 4-29: Nachweis BMP-2-induzierter Proteoglykansynthese in Fibrinclots..... 83

Abbildung 4-30: Regulation der BMP-2 Expression *in vivo* ..... 84

Abbildung 4-31: HE- und Alzianblau-Färbung des Reparaturgewebes im osteochondralen Defekt .... 86

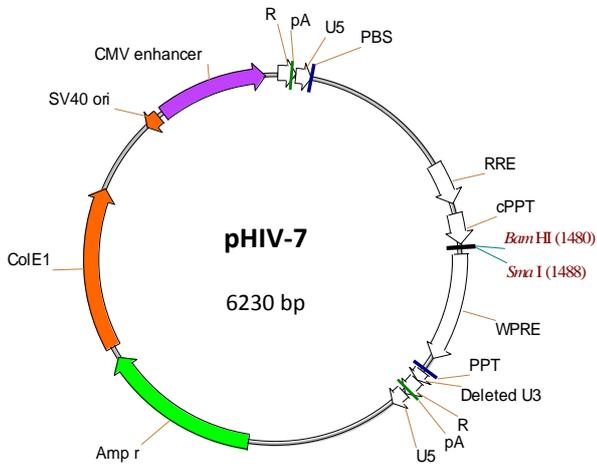
Abbildung 5-1: Überblick über BMP-2 aktivierte *downstream* Prozesse..... 98

**TABELLENVERZEICHNIS**

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 3-1: PCR-Programm zur Amplifikation von PGKrtTA .....              | 38 |
| Tabelle 3-2: PCR-Programm zum Nachweis der gag- bzw. env site .....        | 39 |
| Tabelle 3-3: Medienzusammensetzung .....                                   | 45 |
| Tabelle 3-4: Zusammensetzung der Differenzierungsmedien .....              | 49 |
| Tabelle 3-5: Pipettierschema zur Herstellung des PicoGreen-Standards ..... | 51 |

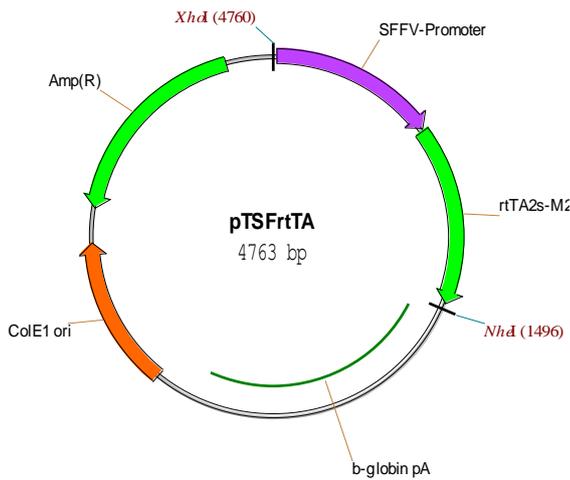
ANHANG

Donor- und Akzeptorvektoren für die Klonierung



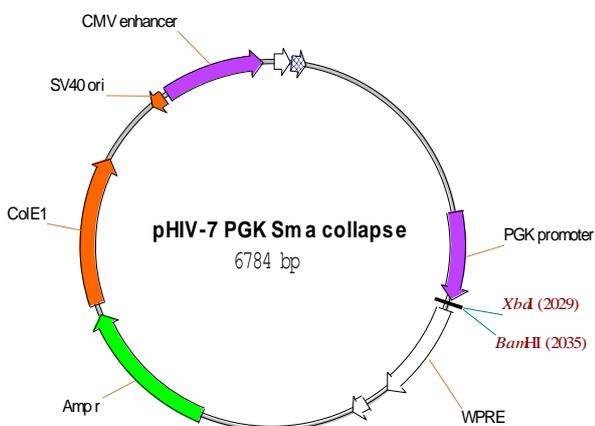
*pHIV-7*

Der Vektor pHIV-7 diente als Backbone für alle Vektoren zur lentiviralen Expression. Transgene wurden über die *Bam*HI oder *Sma*I Schnittstelle eingebracht.



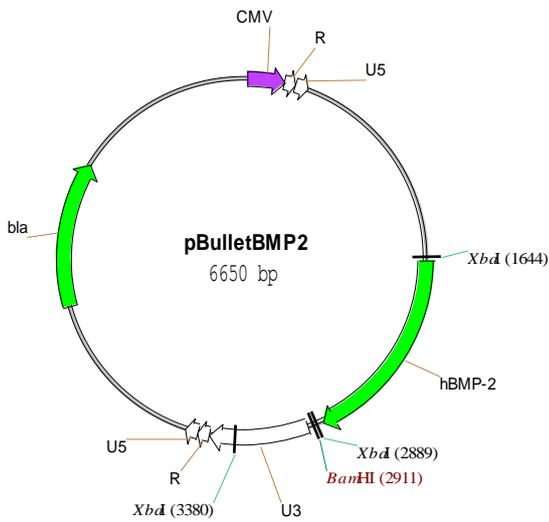
*pTSFrtTA*

*pTSFrtTA* diente zur Isolation des SF – Promotor getriebenen Transaktivators des Tet on – Systems. Durch Restriktionsverdau mit *Xho*I und *Nhe*I wurde das 1499 bp große SFrtTA-Fragment isoliert.



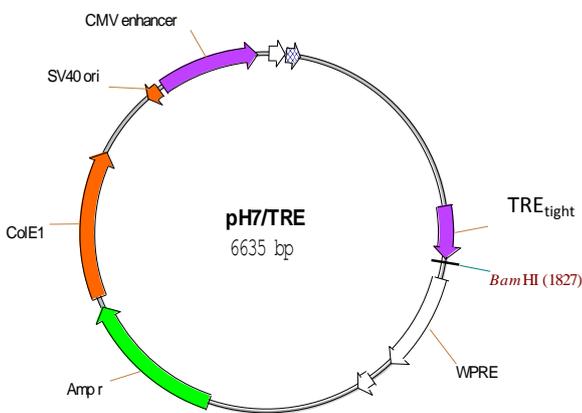
*pHIV-7 PGK Sma collapse*

Der *Xba*I linearisierte pHIV-7 PGK Sma collapse diente als Akzeptorvektor für die Herstellung des Vektors pHIV-7 PGK BMP-2. Für die Klonierung von pHIV-7 PGK rtTA wurde pHIV-7 PGK Sma collapse mit *Bam*HI linearisiert.



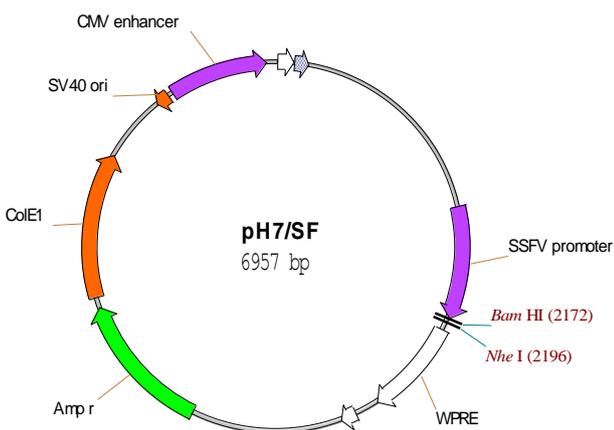
*pBulletBMP-2*

Das hBMP-2 Transgen wurde mittels *XbaI* aus *pBulletBMP-2* isoliert und für die Klonierung von pHIV-7 PGK BMP-2 verwendet.



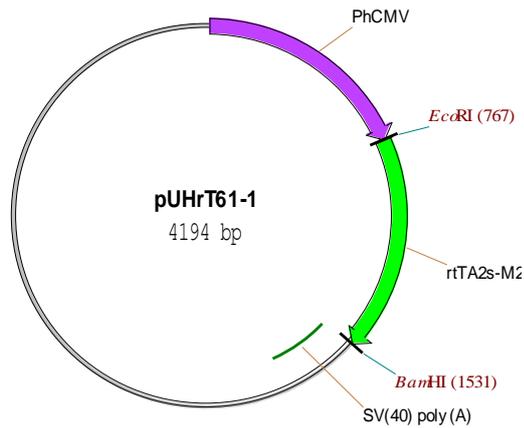
*pH7/TRE*

*pH7/TRE* diente als Ausgangsvektor aller Vektoren zur tet-vermittelten Transgenexpression. Über die *BamHI* Schnittstelle wurden die eingebrachten Transgene unter Kontrolle des *tetracycline responsive elements* (*TRE<sub>tight</sub>*) gestellt.



*pH7/SF*

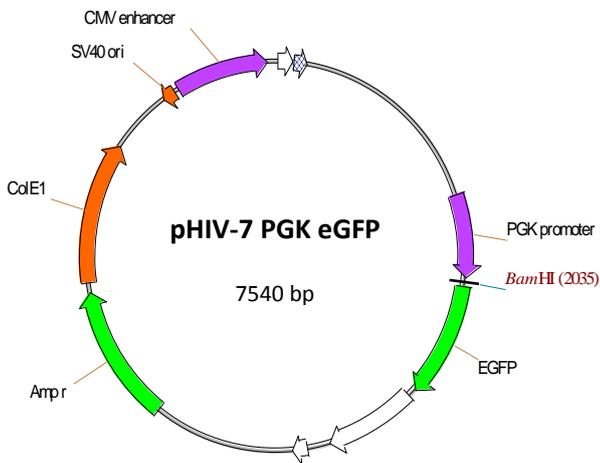
*pH7/SF* diente als Akzeptorvektor, um Transgene konstitutiv unter Kontrolle des SF – Promotors zu exprimieren. Das WISP-3 Transgen wurde über *BamHI* eingebracht.



*pUHRt61-1*

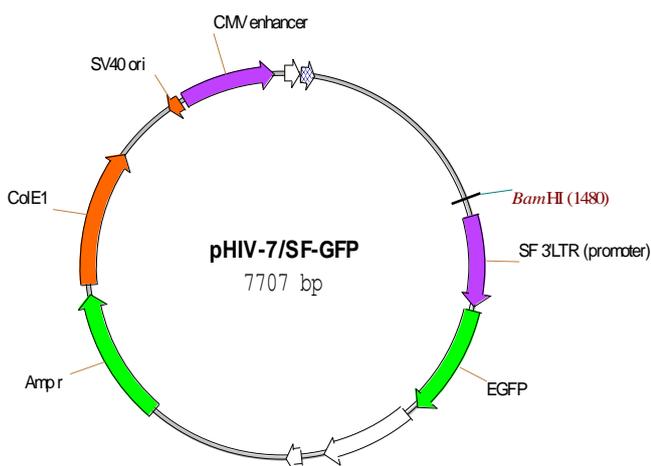
Durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *BamHI* konnte das rtTA2s-M2 Transgen aus dem Plasmid pUHRt61-1 isoliert und für die Klonierung von pHIV-7 PGK rtTA eingesetzt werden.

Konstitutive Expression



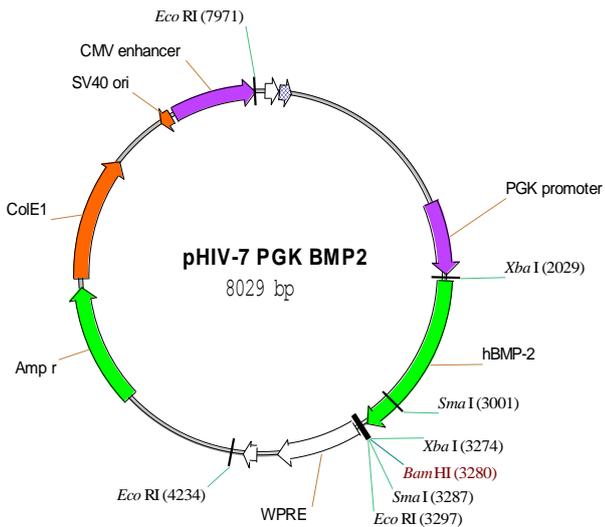
*pHIV-7 PGK eGFP*

Der Vektor pHIV-7 PGK eGFP ermöglichte die lentivirale Expression des eGFP Reportergens unter Kontrolle des PGK – Promotors.



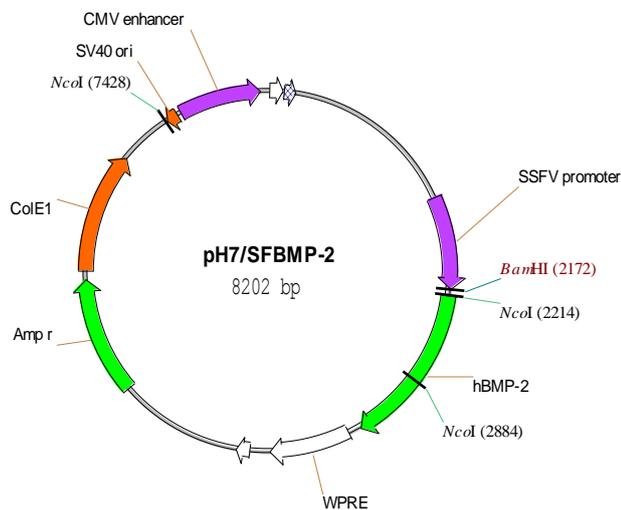
*pHIV-7/SF-GFP*

pHIV-7/SF-GFP wurde zur lentiviralen Expression des eGFP Reportergens unter Kontrolle des SF – Promotors verwendet.



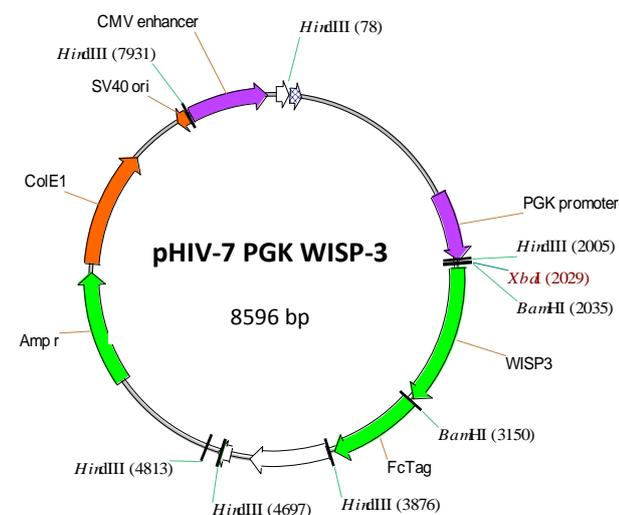
**pHIV-7 PGK BMP-2**

pHIV-7 PGK BMP-2 ermöglichte die lentivirale Expression des BMP-2 Transgens unter Kontrolle des PGK – Promotors. Der Vektor entstand durch *sticky end* Ligation des durch *XbaI* linearisierten pHIV-7 PGK sma collapse mit dem durch *XbaI* Verdau aus pBulletBMP-2 isolierten BMP-2 Transgen. Die Anwesenheit und Orientierung des Inserts wurde mittels Testverdaus mit *EcoRI* bzw. *SmaI* überprüft.



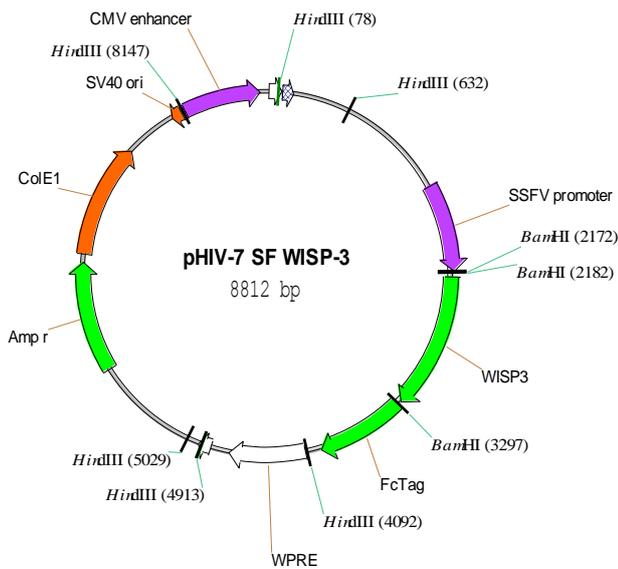
**pH7/SFBMP-2**

pH7/SFBMP-2 ermöglichte die Expression des BMP-2 Transgens unter Kontrolle des SF – Promotors.



**pHIV-7 PGK WISP-3**

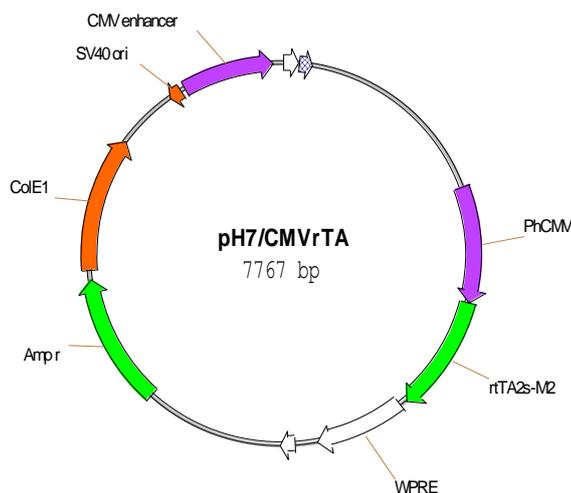
pHIV-7 PGK WISP-3 ermöglichte die konstitutive Expression des WISP-3 Transgens mit Fc-tag unter Kontrolle des PGK – Promotors. Durch Restriktionsdoppelveidau mit *XbaI* und *HindIII* konnte das WISP-3-Fc-tag Transgen isoliert und für die Klonierung von pHIV-7 SF WISP-3 eingesetzt werden.



*pHIV-7 SF WISP-3*

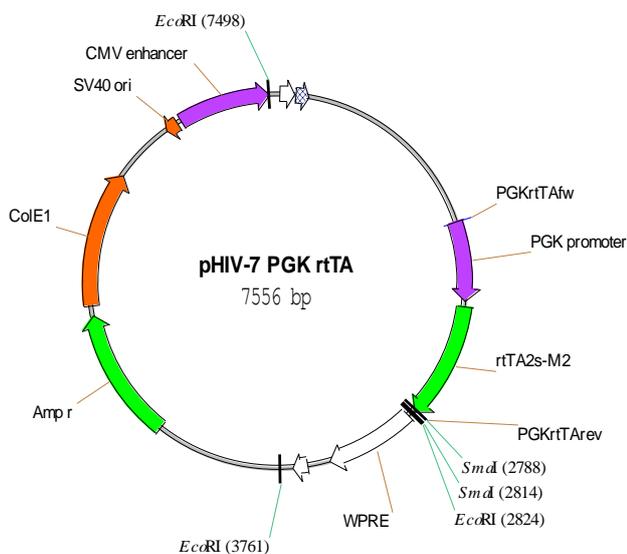
Der Vektor pHIV-7 SF WISP-3 erlaubte die Expression des WISP-3 Transgens mit Fc-tag unter Kontrolle des SF – Promotors. Er entstand durch Ligation des durch *Bam*HI-Verdau linearisierten pHIV-7 SF und des durch *Xba*I und *Hind*III Doppelverdau aus pHIV-7 PGK WISP-3 isolierten WISP-3-Fc-tag Inserts nach Auffüllen aller Enden mit Klenow-Enzym.

Regulierte Expression durch das Zwei – Vektor Tet on – System



*pH7/CMVrTA*

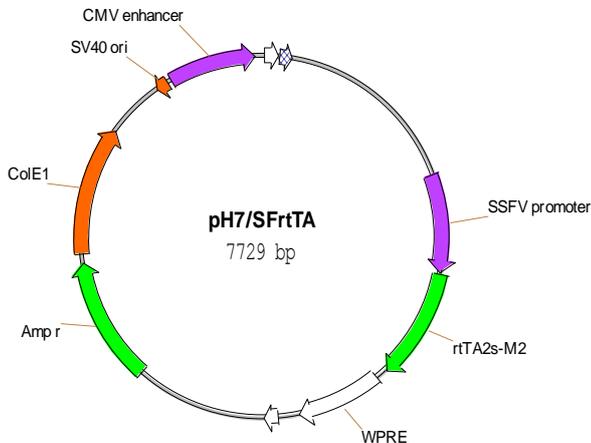
pH7/CMVrTA diente zur Expression des reversen Transaktivators (rtTA2s-M2) des Zwei – Vektor - Tet on – Systems unter Kontrolle des CMV – Promotors.



*pHIV-7 PGK rtTA*

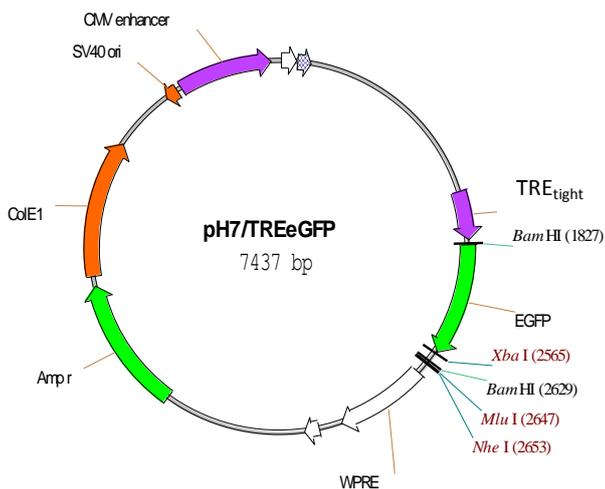
pHIV-7 PGK rtTA diente zur Expression des reversen Transaktivators (rtTA2s-M2) des Zwei – Vektor - Tet on – Systems unter Kontrolle des PGK – Promotors. Der Vektor wurde hergestellt durch Ligation des durch *Bam*HI- Verdau linearisierten pHIV-7 PGK Sma collapse mit dem rtTA-Insert, das durch Verdau mit *Eco*RI und *Bam*HI aus dem Vektor pUHrt61-1 isoliert wurde, nach Auffüllen aller Enden mit Klenow – Enzym.

Die Anwesenheit des Inserts wurde durch *EcoRI* Testverdau, die Orientierung mit *SmaI* überprüft. Durch PCR mit den Primern PGKrtTAfw und PGKrtTArev konnte das PGKrtTA Insert für weitere Klonierungen isoliert werden.



*pH7/SFrtTA*

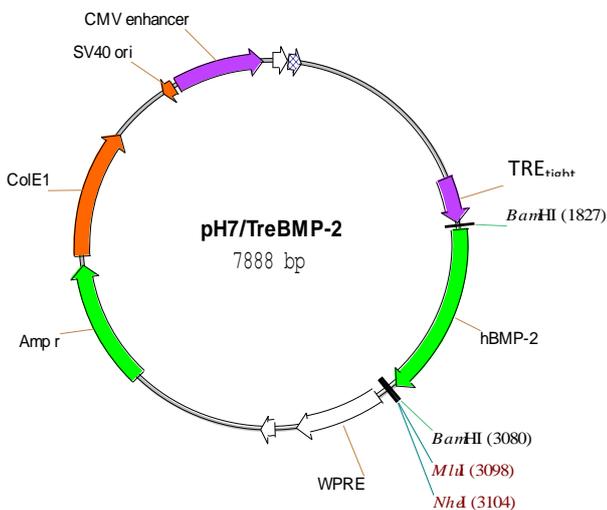
*pH7/SFrtTA* diente zur Expression des reversen Transaktivators (rtTA2s-M2) des Zwei – Vektor - Tet on – Systems unter Kontrolle des SF – Promotors.



*pH7/TREeGFP*

*pH7/TREeGFP* kodiert für das eGFP Transgen unter Kontrolle des *tetracycline responsive elements* (*TRE<sub>tight</sub>*). Er diente als Responsevektor für die Anwendung im Zwei – Vektor - Tet on – System.

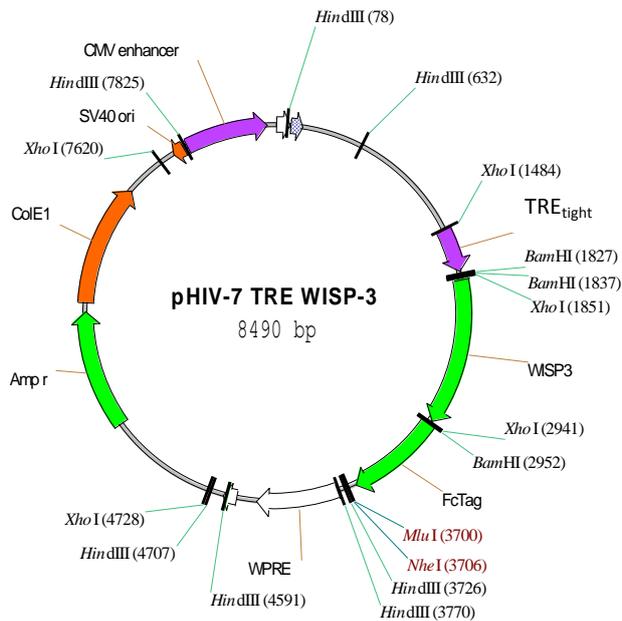
Der durch *XbaI* linearisierte Vektor wurde für die weitere Klonierung von *pH7/TREeGFP/SFrtTA* verwendet. Für die Herstellung von *pH7/TREeGFP/PGKrtTA* wurde *pH7/TREeGFP* mit *MluI* und *NheI* verdaut.



*pH7/TreBMP-2*

*pH7/TreBMP-2* kodiert für das BMP-2 Transgen unter Kontrolle des *tetracycline responsive elements* (*TRE<sub>tight</sub>*). Er diente als Responsevektor für die Anwendung im Zwei – Vektor - Tet on – System. Für die Klonierung von *pH7/TreBMP-2/SFrtTA* wurde er mit *NheI* linearisiert, für die Klonierung von

pH7/TreBMP-2/PGKrtTA mit *MluI* und *NheI* geschnitten.

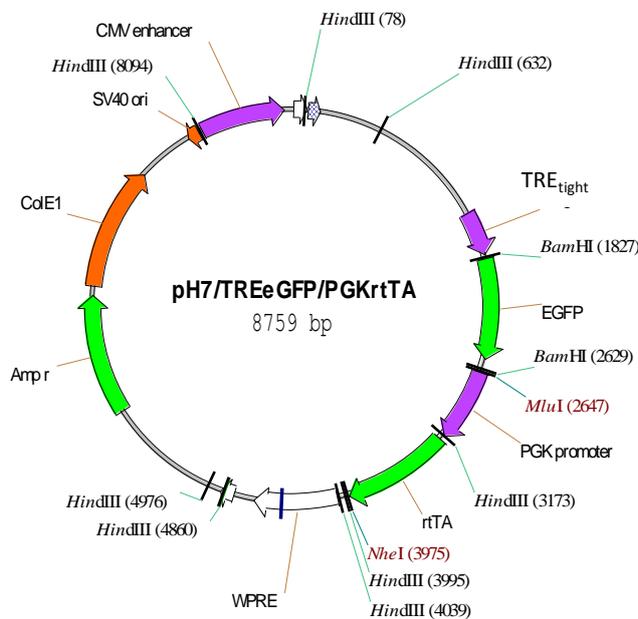


*pHIV-7 TRE WISP-3*

pHIV-7 TRE WISP-3 kodiert für das WISP-3 Transgen mit Fc-tag unter Kontrolle des *tetracycline responsive elements* (TRE<sub>tight</sub>). Er diente als Responsevektor für die Anwendung im Zwei – Vektor - Tet on – System. Der Vektor entstand durch *blunt end* Ligation des *BamHI* linearisierten pH7/TRE mit dem WISP-3 Insert, welches durch Verdau mit *XbaI* und *HindIII* aus pHIV-7 PGK WISP-3 isoliert wurde, nach Auffüllen aller Enden mit dem Klenow-Enzym. Die Anwesenheit des Inserts wurde durch

*BamHI*-Verdau überprüft, die Orientierung mit *XhoI*. Für die Klonierung von pHIV-7 TRE WISP-3 PGK rtTA wurde der Vektor mit *MluI* und *NheI* geschnitten.

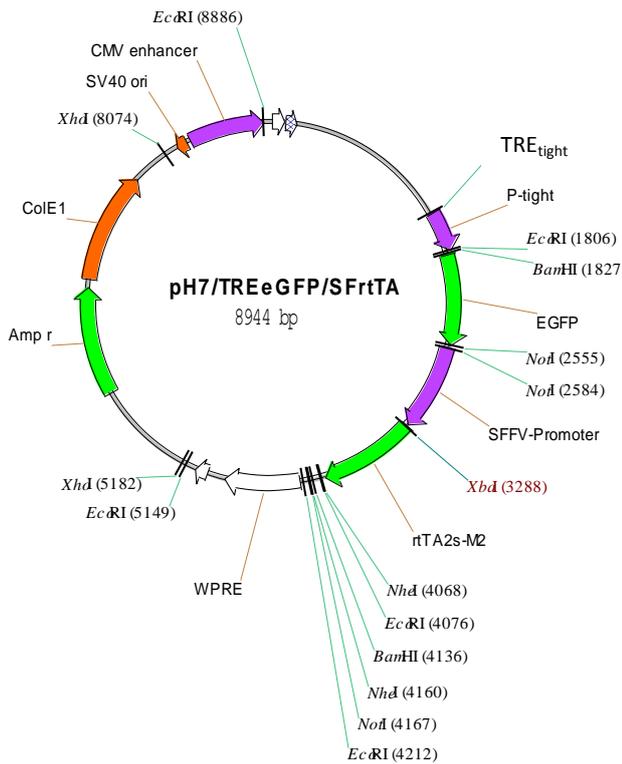
Regulierte Expression durch das Ein – Vektor Tet on - System



*pH7/TREeGFP/PGKrtTA*

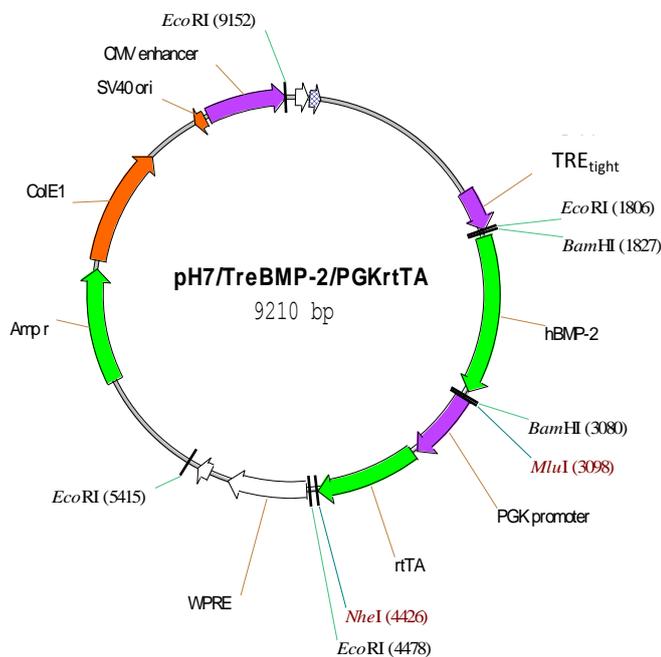
pH7/TREeGFP/PGKrtTA kodiert für das eGFP Transgen unter Kontrolle des *tetracycline responsive elements* (TRE<sub>tight</sub>), sowie für den reversen Transaktivator (rtTA) unter Kontrolle des PGK-Promotors. Der Vektor ermöglichte die regulierte eGFP Expression unter Kontrolle des Ein – Vektor – Tet on – Systems. Für die Herstellung des Vektors wurde das PGKrtTA Insert mittels PCR aus dem Vektor pHIV-7 PGK rtTA isoliert und durch *sticky end* Ligation in den *MluI* und

*NheI* geschnittenen pH7/TREeGFP eingebracht. Die Anwesenheit des Inserts wurde durch Testverdau mittels *HindIII* überprüft.



*pH7/TREeGFP/SFrtTA*

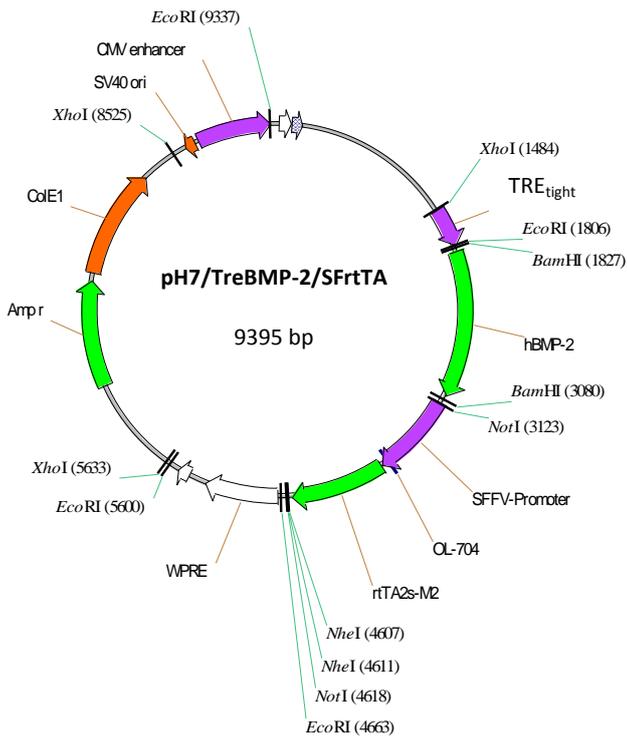
*pH7/TREeGFP/SFrtTA* kodiert für das eGFP Transgen unter Kontrolle des *tetracycline responsive elements* ( $TRE_{tight}$ ) sowie, für den reversen Transaktivator (rtTA) unter Kontrolle des SF – Promotors. Der Vektor ermöglichte die regulierte eGFP Expression unter Kontrolle des Ein – Vektor – Tet on – Systems. Für die Klonierung des Vektors wurde *pH7/TREeGFP* mit *XbaI* linearisiert und das *XhoI* und *NheI* geschnittene Insert aus *pTSFrtTA* nach Auffüllen aller Enden mit Klenow – Enzym durch *blunt end* Ligation eingebracht. Die Anwesenheit des Inserts wurde durch *EcoRI*-Verdau, die Orientierung durch *NotI*, überprüft.



*pH7/TreBMP-2/PGKrtTA*

*pH7/TreBMP-2/PGKrtTA* kodiert für das BMP-2 Transgen unter Kontrolle des *tetracycline responsive elements* ( $TRE_{tight}$ ), sowie für den reversen Transaktivator (rtTA) unter Kontrolle des PGK – Promotors. Der Vektor ermöglichte die regulierte BMP-2 Expression unter Kontrolle des Ein – Vektor – Tet on – Systems. Zur Herstellung des Vektors wurde *PGKrtTA* durch PCR aus dem Vektor *pHIV-7 PGK rtTA* isoliert und mit *MluI* und *NheI* verdaut. Anschließend wurde das Insert durch *sticky end* Ligation in den *MluI* und *NheI* verdauten Vektor *pHIV-7 TREBMP-3* eingebracht.

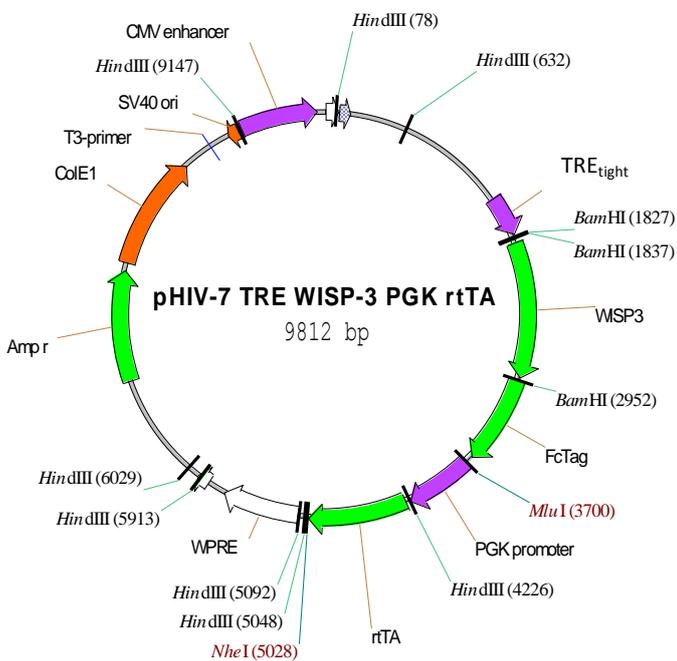
Die Anwesenheit des Inserts wurde durch Testverdau mit *EcoRI* überprüft.



wurde durch *EcoRI* Verdau überprüft, die Orientierung durch *NotI*.

*pH7/TreBMP-2/SFrtTA*

*pH7/TreBMP-2/SFrtTA* kodiert für das BMP-2 Transgen unter Kontrolle des *tetracycline responsive elements* ( $TRE_{tight}$ ), sowie für den reversen Transaktivator (rtTA) unter Kontrolle des PGK – Promotors. Der Vektor ermöglichte die regulierte BMP-2 Expression unter Kontrolle des Ein – Vektor – Tet on – Systems. Zur Herstellung des Vektors wurde das SFrtTA Insert durch Doppelverdau mit *XhoI* und *NheI* aus *pTSFrtTA* isoliert und in den durch *NheI* linearisierten Vektor *pH7/TreBMP-2*, nach Auffüllen aller Enden mittels Klenow-Enzym, durch *blunt end* Ligation eingebracht. Die Anwesenheit des Inserts



*pHIV-7 TRE WISP-3 PGK rtTA*

*pHIV-7 TRE WISP-3 PGK rtTA* kodiert für das BMP-2 Transgen unter Kontrolle des *tetracycline responsive elements* ( $TRE_{tight}$ ), sowie für den reversen Transaktivator (rtTA) unter Kontrolle des PGK – Promotors. Der Vektor ermöglichte die regulierte BMP-2 Expression unter Kontrolle des Ein – Vektor – Tet on – Systems. Der Vektor entstand durch *sticky end* Ligation des *MluI* und *NheI* geschnittenen *pHIV-7 TRE WISP-3* mit dem ebenfalls *MluI* und *NheI* geschnittenen PGKrtTA PCR-Fragment aus dem Vektor *pHIV-7 PGK rtTA*. Die Anwesenheit des Inserts wurde durch *HindIII* Testverdau überprüft.

Gegenüberstellung tet-regulierter eGFP und BMP-2 Expression in transduzierten Chondrozyten

Gegenüberstellung der tet-regulierten eGFP und BMP-2 Expression transduzierter Chondrozyten verschiedener Tiere nach Induktion durch Doxzyklin

| <b>Tier</b> | <b>eGFP</b> |            | <b>BMP-2</b> |
|-------------|-------------|------------|--------------|
|             | <b>%</b>    | <b>MFI</b> | <b>pg/ml</b> |
| <b>1</b>    | 70,25       | 1739,90    | 1205,98      |
| <b>2</b>    | 64,44       | 1412,92    | 1196,38      |
| <b>3</b>    | 61,54       | 1012,42    | 1390,19      |
| <b>4</b>    | 29,55       | 1093,33    | 1498,48      |
| <b>5</b>    | 7,33        | 496,09     | 705,26       |
| <b>6</b>    | 4,83        | 1120,15    | 1864,51      |
| <b>7</b>    | 9,52        | 466,49     | 447,43       |
| <b>8</b>    | 28,20       | 1012,99    | 1744,46      |
| <b>9</b>    | 24,39       | 882,91     | 881,88       |
| <b>10</b>   | 7,69        | 1535,09    | 6313,36      |
| <b>11</b>   | 4,34        | 1528,56    | 2446,20      |
| <b>12</b>   | 1,26        | 1755,53    | 2126,09      |
| <b>13</b>   | 7,37        | 1204,27    | 4459,89      |
| <b>14</b>   | 23,07       | 481,40     | 785,79       |
| <b>15</b>   | 10,98       | 511,35     | 1669,38      |
| <b>16</b>   | 0,46        | 897,53     | 1623,85      |
| <b>17</b>   | 20,77       | 1099,24    | 1933,35      |
| <b>18</b>   | 12,97       | 1120,21    | 3922,77      |
| <b>19</b>   | 8,71        | 1393,78    | 1859,63      |
| <b>20</b>   | 2,63        | 1123,75    | 85,62        |
| <b>21</b>   | 11,60       | 824,86     | 4716,75      |
| <b>22</b>   | 50,44       | 1552,63    | 2234,26      |
| <b>23</b>   | 66,28       | 1205,87    | 658,41       |
| <b>24</b>   | 61,62       | 2787,40    | 878,57       |
| <b>25</b>   | 51,43       | 2002,56    | 903,09       |
| <b>26</b>   | 59,49       | 1651,72    | 2464,05      |
| <b>27</b>   | 25,14       | 1622,43    | 1113,74      |
| <b>28</b>   | 57,59       | 3373,10    | 867,95       |
| <b>29</b>   | 29,42       | 2165,91    | 1016,73      |
| <b>30</b>   | 58,94       | 2059,10    | 1873,62      |
| <b>31</b>   | 50,41       | 1835,27    | 857,65       |
| <b>32</b>   | 49,27       | 1936,55    | 1287,56      |

Angegeben sind der Prozentsatz an GFP positiven Zellen sowie die mittlere Fluoreszenzintensität nach Induktion TES infizierter Chondrozyten verschiedener Tiere (1-32). Dem gegenüber gestellt ist die BMP-2 Expression TBS infizierter Chondrozyten aller Tiere nach Induktion in pg/ml je  $1 \times 10^5$  Zellen und 24 h.

Gegenüberstellung der tet-vermittelten BMP-2 Expression nach Induktion *in vitro* und *in vivo* der Tiere der TBS 100 % Gruppe

| <b>Tier</b> | <b>BMP-2 <i>in vitro</i></b> |             | <b>BMP-2 <i>in vivo</i></b> |
|-------------|------------------------------|-------------|-----------------------------|
|             | <i>Monolayer</i>             | <i>Clot</i> |                             |
| <b>1</b>    | 1205,98                      | 1846,55     | 122,64                      |
| <b>2</b>    | 1196,38                      | 3068,78     | 70,91                       |
| <b>5</b>    | 705,26                       | n.d.        | 56,27                       |
| <b>16</b>   | 1623,85                      | 79,29       | 32,36                       |
| <b>19</b>   | 1859,63                      | n.d.        | 41,94                       |
| <b>20</b>   | 85,62                        | n.d.        | 7,07                        |
| <b>24</b>   | 878,57                       | n.d.        | 116,66                      |
| <b>27</b>   | 1113,74                      | n.d.        | 45,25                       |

Dargestellt sind die Messwerte der tet-vermittelten BMP-2 Expression nach Induktion mit Doxyzyklin *in vitro* und *in vivo*. Verglichen wurden die BMP-2 Expression in pg/ml *in vitro* nach Kultur im Monolayer bzw. im Fibrinclot. Die *in vivo* Daten wurden durch relative Quantifizierung mittels quantitativer RT-PCR ermittelt und stellen den relativen Anstieg gegenüber dem Mittelwert der uninfizierten Kontrollgruppe dar.

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Angelika Schnieke vom Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere für die Betreuung der Arbeit am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TU München und Prof. Dr. Bernd Gänsbacher für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Experimentelle Onkologie am Klinikum rechts der Isar erstellen zu können danken.

Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. Martina Anton für die nette und kompetente Betreuung dieser Arbeit sowie allen Kollegen in der Arbeitsgruppe AG Anton für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die nicht nur fachliche Unterstützung. Bei Katja Dumler möchte ich mich zusätzlich für die Durchführung zahlreicher FACS-Messungen bedanken.

Des Weiteren danke ich allen Kollegen am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für die Hilfsbereitschaft die das Arbeiten in diesem Institut sehr angenehm gestaltete.

Bei Gabriele Wexel möchte ich mich für jegliche Art der Unterstützung in Hinblick auf Tierversuchsexperimente und Bereitstellung von Biopsien zu Zellisolation bedanken.

Von der Abteilung für Sportorthopädie der TU München möchte ich Dr. Stephan Vogt für jegliche Unterstützung im Zusammenhang mit diesem Projekt sowie Dr. Martina Knödler und Dr. Peter Prodingler für die Unterstützung bei der Durchführung des Tierversuchs danken.

Für die Unterstützung bei der Histologie möchte ich mich bei Prof. Stefan Milz von der anatomischen Anstalt der LMU sowie bei Gerti Payne bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Norbert Schütze für die Bereitstellung der WISP-3 cDNA bedanken.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für die Unterstützung die mir das Erreichen dieses Ziels erst ermöglicht hat und meinem Mann Christian für die aufgebrauchte Geduld.

Danke!

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Clair, B.L., A.R. Johnson, and T. Howard, *Cartilage repair: current and emerging options in treatment*. Foot Ankle Spec, 2009. **2**(4): p. 179-88.
2. Scott, J.E., *Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model*. J Physiol, 2003. **553**(Pt 2): p. 335-43.
3. Zernia, G. and D. Huster, *Collagen dynamics in articular cartilage under osmotic pressure*. NMR Biomed, 2006. **19**(8): p. 1010-9.
4. Richardson, S.M., et al., *Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering*. J Cell Physiol. **222**(1): p. 23-32.
5. Stockwell, R.A., *The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage*. J Anat, 1971. **109**(Pt 3): p. 411-21.
6. Richter, W., *Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration*. J Intern Med, 2009. **266**(4): p. 390-405.
7. Chen, F.H., K.T. Rousche, and R.S. Tuan, *Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(7): p. 373-82.
8. Noel, D., F. Djouad, and C. Jorgense, *Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair*. Curr Opin Investig Drugs, 2002. **3**(7): p. 1000-4.
9. Gelber, A.C., et al., *Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis*. Ann Intern Med, 2000. **133**(5): p. 321-8.
10. Alford, J.W. and B.J. Cole, *Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions*. Am J Sports Med, 2005. **33**(3): p. 443-60.
11. Alford, J.W. and B.J. Cole, *Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options*. Am J Sports Med, 2005. **33**(2): p. 295-306.
12. Knutsen, G., et al., *A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years*. J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(10): p. 2105-12.
13. Sellers, R.S., et al., *Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)*. J Bone Joint Surg Am, 2000. **82**(2): p. 151-60.
14. Messner, K. and J. Gillquist, *Cartilage repair. A critical review*. Acta Orthop Scand, 1996. **67**(5): p. 523-9.
15. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(14): p. 889-95.
16. Pelttari, K., et al., *Secretion of matrix metalloproteinase 3 by expanded articular chondrocytes as a predictor of ectopic cartilage formation capacity in vivo*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(2): p. 467-74.
17. Dorotka, R., et al., *Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(8): p. 655-64.
18. Dorotka, R., et al., *Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3617-29.
19. Nehrer, S., et al., *Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model*. Biomaterials, 1998. **19**(24): p. 2313-28.
20. Grigolo, B., et al., *Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits*. Biomaterials, 2001. **22**(17): p. 2417-24.
21. Chu, C.R., et al., *Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study*. J Biomed Mater Res, 1995. **29**(9): p. 1147-54.

22. Bartlett, W., et al., *Autologous chondrocyte implantation at the knee using a bilayer collagen membrane with bone graft. A preliminary report.* J Bone Joint Surg Br, 2005. **87**(3): p. 330-2.
23. Cucchiari, M. and H. Madry, *Gene therapy for cartilage defects.* J Gene Med, 2005. **7**(12): p. 1495-509.
24. Frisbie, D.D., et al., *Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture.* Clin Orthop Relat Res, 2003(407): p. 215-27.
25. Mithoefer, K., et al., *Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis.* Am J Sports Med, 2009. **37**(10): p. 2053-63.
26. Mithoefer, K., et al., *The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study.* J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(9): p. 1911-20.
27. Steinwachs, M.R., T. Guggi, and P.C. Kreuz, *Marrow stimulation techniques.* Injury, 2008. **39** Suppl 1: p. S26-31.
28. Kreuz, P.C., et al., *Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee.* Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(11): p. 1119-25.
29. Leo, A.J. and D.A. Grande, *Mesenchymal stem cells in tissue engineering.* Cells Tissues Organs, 2006. **183**(3): p. 112-22.
30. Daley, G.Q., *Stem cells: roadmap to the clinic.* J Clin Invest. **120**(1): p. 8-10.
31. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.* Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
32. McKay, R., *Stem cells in the central nervous system.* Science, 1997. **276**(5309): p. 66-71.
33. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells.* Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
34. Watt, F.M., *Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis.* Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(4): p. 410-7.
35. Daniels, J.T., et al., *Corneal stem cells in review.* Wound Repair Regen, 2001. **9**(6): p. 483-94.
36. Slack, J.M., *Developmental biology of the pancreas.* Development, 1995. **121**(6): p. 1569-80.
37. Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai, *Stem cells find their niche.* Nature, 2001. **414**(6859): p. 98-104.
38. Alonso, L. and E. Fuchs, *Stem cells of the skin epithelium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100** Suppl 1: p. 11830-5.
39. Hong, L., A. Colpan, and I.A. Peptan, *Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells.* Tissue Eng, 2006. **12**(10): p. 2747-53.
40. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 568-84.
41. Helder, M.N., et al., *Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine.* Tissue Eng, 2007. **13**(8): p. 1799-808.
42. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.* J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 341-7.
43. Wexler, S.A., et al., *Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not.* Br J Haematol, 2003. **121**(2): p. 368-74.
44. Mason, J.M., et al., *Expression of human bone morphogenetic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair.* Gene Ther, 1998. **5**(8): p. 1098-104.
45. Noth, U., et al., *Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells.* J Orthop Res, 2002. **20**(5): p. 1060-9.
46. Asakura, A., M. Komaki, and M. Rudnicki, *Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation.* Differentiation, 2001. **68**(4-5): p. 245-53.

47. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Tissue Eng*, 2001. **7**(2): p. 211-28.
48. De Bari, C., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(8): p. 1928-42.
49. Young, H.E., et al., *Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors*. *Anat Rec*, 2001. **264**(1): p. 51-62.
50. Sabatini, F., et al., *Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities*. *Lab Invest*, 2005. **85**(8): p. 962-71.
51. Zvaifler, N.J., et al., *Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals*. *Arthritis Res*, 2000. **2**(6): p. 477-88.
52. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. *Br J Haematol*, 2000. **109**(1): p. 235-42.
53. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. *Stem Cells*, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
54. Tatum, E.L., *Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine*. *Perspect Biol Med*, 1966. **10**(1): p. 19-32.
55. Smith, K.R., *Gene therapy: theoretical and bioethical concepts*. *Arch Med Res*, 2003. **34**(4): p. 247-68.
56. Morgan, R.A. and W.F. Anderson, *Human gene therapy*. *Annu Rev Biochem*, 1993. **62**: p. 191-217.
57. Somia, N. and I.M. Verma, *Gene therapy: trials and tribulations*. *Nat Rev Genet*, 2000. **1**(2): p. 91-9.
58. Pluta, K. and M.M. Kacprzak, *Use of HIV as a gene transfer vector*. *Acta Biochim Pol*, 2009. **56**(4): p. 531-95.
59. Edelstein, M.L., M.R. Abedi, and J. Wixon, *Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update*. *J Gene Med*, 2007. **9**(10): p. 833-42.
60. Hu, W.S. and V.K. Pathak, *Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(4): p. 493-511.
61. Laufs, S., et al., *Insertion of retroviral vectors in NOD/SCID repopulating human peripheral blood progenitor cells occurs preferentially in the vicinity of transcription start regions and in introns*. *Mol Ther*, 2004. **10**(5): p. 874-81.
62. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. *Science*, 2003. **302**(5644): p. 415-9.
63. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. *J Virol*, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
64. Schambach, A., et al., *Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors*. *Mol Ther*, 2007. **15**(6): p. 1167-73.
65. Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen, *Molekulare Virologie*. 2 ed. 2002: Spektrum akademischer Verlag. 734.
66. Klimatcheva, E., J.D. Rosenblatt, and V. Planelles, *Lentiviral vectors and gene therapy*. *Front Biosci*, 1999. **4**: p. D481-96.
67. Maddon, P.J., et al., *HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4*. *Cell*, 1988. **54**(6): p. 865-74.
68. Sakai, H., et al., *Integration is essential for efficient gene expression of human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol*, 1993. **67**(3): p. 1169-74.
69. Masuda, T., et al., *Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 att site: unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain*. *J Virol*, 1995. **69**(11): p. 6687-96.

70. Delenda, C., *Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression*. J Gene Med, 2004. **6 Suppl 1**: p. S125-38.
71. Mastromarino, P., et al., *Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH*. J Gen Virol, 1987. **68 ( Pt 9)**: p. 2359-69.
72. Burns, J.C., et al., *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90(17)**: p. 8033-7.
73. Kowolik, C.M., J. Hu, and J.K. Yee, *Locus control region of the human CD2 gene in a lentivirus vector confers position-independent transgene expression*. J Virol, 2001. **75(10)**: p. 4641-8.
74. Parolin, C., et al., *Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes*. J Virol, 1994. **68(6)**: p. 3888-95.
75. Naldini, L., et al., *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93(21)**: p. 11382-8.
76. Dougherty, J.P. and H.M. Temin, *A promoterless retroviral vector indicates that there are sequences in U3 required for 3' RNA processing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84(5)**: p. 1197-201.
77. Miyoshi, H., et al., *Development of a self-inactivating lentivirus vector*. J Virol, 1998. **72(10)**: p. 8150-7.
78. Ehnert, S., et al., *The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality?* Langenbecks Arch Surg, 2009. **394(6)**: p. 985-97.
79. Osborn, K.D., S.B. Trippel, and H.J. Mankin, *Growth factor stimulation of adult articular cartilage*. J Orthop Res, 1989. **7(1)**: p. 35-42.
80. Guerne, P.A., A. Sublet, and M. Lotz, *Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts*. J Cell Physiol, 1994. **158(3)**: p. 476-84.
81. Sah, R.L., et al., *Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants*. Arch Biochem Biophys, 1994. **308(1)**: p. 137-47.
82. Sato, K. and M.R. Urist, *Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture*. Clin Orthop Relat Res, 1984(183): p. 180-7.
83. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242(4885)**: p. 1528-34.
84. Haas, A.R. and R.S. Tuan, *Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function*. Differentiation, 1999. **64(2)**: p. 77-89.
85. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22(4)**: p. 233-41.
86. Bi, L.X., D.J. Simmons, and E. Mainous, *Expression of BMP-2 by rat bone marrow stromal cells in culture*. Calcif Tissue Int, 1999. **64(1)**: p. 63-8.
87. Jin, E.J., et al., *BMP-2-enhanced chondrogenesis involves p38 MAPK-mediated down-regulation of Wnt-7a pathway*. Mol Cells, 2006. **22(3)**: p. 353-9.
88. Musgrave, D.S., et al., *Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types*. Clin Orthop Relat Res, 2000(378): p. 290-305.
89. Cao, X. and D. Chen, *The BMP signaling and in vivo bone formation*. Gene, 2005. **357(1)**: p. 1-8.
90. Chubinskaya, S. and K.E. Kuettner, *Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35(9)**: p. 1323-40.
91. Kakudo, N., et al., *Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2*. Life Sci, 2006. **79(19)**: p. 1847-55.

92. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(698): p. 893-9.
93. Clement, J.H., et al., *Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells*. Int J Oncol, 2005. **27**(2): p. 401-7.
94. Grunder, T., et al., *Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12**(7): p. 559-67.
95. Carlberg, A.L., et al., *Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2*. Differentiation, 2001. **67**(4-5): p. 128-38.
96. Gooch, K.J., et al., *Bone morphogenetic proteins-2, -12, and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage*. Tissue Eng, 2002. **8**(4): p. 591-601.
97. Gelse, K., et al., *Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(2): p. 430-41.
98. Hoffmann, A., et al., *Perspectives in the biological function, the technical and therapeutic application of bone morphogenetic proteins*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **57**(3): p. 294-308.
99. Kingsley, D.M., *The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms*. Genes Dev, 1994. **8**(2): p. 133-46.
100. Kawabata, M., T. Imamura, and K. Miyazono, *Signal transduction by bone morphogenetic proteins*. Cytokine Growth Factor Rev, 1998. **9**(1): p. 49-61.
101. Liu, F., et al., *Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(7): p. 3479-86.
102. Nohe, A., et al., *The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5330-8.
103. Steinert, A.F., U. Noth, and R.S. Tuan, *Concepts in gene therapy for cartilage repair*. Injury, 2008. **39 Suppl 1**: p. S97-113.
104. Steinert, A.F., et al., *Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(5): p. 1127-39.
105. Sandhu, H.S., et al., *Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion*. Spine (Phila Pa 1976), 1996. **21**(18): p. 2115-22.
106. Brigstock, D.R., *The CCN family: a new stimulus package*. J Endocrinol, 2003. **178**(2): p. 169-75.
107. Perbal, B., *CCN proteins: multifunctional signalling regulators*. Lancet, 2004. **363**(9402): p. 62-4.
108. Perbal, B., *The CCN family of genes: a brief history*. Mol Pathol, 2001. **54**(2): p. 103-4.
109. Bork, P., *The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor*. FEBS Lett, 1993. **327**(2): p. 125-30.
110. Perbal, B., *NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues*. Mol Pathol, 2001. **54**(2): p. 57-79.
111. Schutze, N., et al., *Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation*. Cell Commun Signal, 2005. **3**(1): p. 5.
112. Sen, M., et al., *WISP3-dependent regulation of type II collagen and aggrecan production in chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 488-97.
113. Hurvitz, J.R., et al., *Mutations in the CCN gene family member WISP3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 94-8.
114. Lamb, R., et al., *Wnt-1-inducible signaling pathway protein 3 and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(11): p. 3548-53.
115. Crystal, R.G., *Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success*. Science, 1995. **270**(5235): p. 404-10.

116. Gossen, M., A.L. Bonin, and H. Bujard, *Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(12): p. 471-5.
117. Gossen, M., et al., *Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells*. Curr Opin Biotechnol, 1994. **5**(5): p. 516-20.
118. Pluta, K., et al., *Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters*. J Gene Med, 2005. **7**(6): p. 803-17.
119. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
120. Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.
121. Urlinger, S., et al., *Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7963-8.
122. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
123. DuBridge, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379-87.
124. Gansbacher, B., et al., *Retroviral vector-mediated gamma-interferon gene transfer into tumor cells generates potent and long lasting antitumor immunity*. Cancer Res, 1990. **50**(24): p. 7820-5.
125. Shukunami, C., et al., *Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(8): p. 1174-88.
126. Ueblacker, P., et al., *Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12**(9): p. 711-9.
127. Ausubel, F.M., *Current protocols in molecular biology*. 1999: John Wiley & Sons, Inc.
128. Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur*. 5 ed. 2002, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag. 316.
129. Neuhuber, B., et al., *Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype*. J Neurosci Res, 2004. **77**(2): p. 192-204.
130. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
131. Akiyama, H., et al., *TAK-778, a novel synthetic 3-benzothiepin derivative, promotes chondrogenesis in vitro and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(1): p. 131-8.
132. Altaf, F.M., et al., *Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells*. Eur Cell Mater, 2006. **12**: p. 64-9; discussion 69-70.
133. Curl, W.W., et al., *Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies*. Arthroscopy, 1997. **13**(4): p. 456-60.
134. Martinek, V., et al., *Treatment of osteochondral injuries. Genetic engineering*. Clin Sports Med, 2001. **20**(2): p. 403-16, viii.
135. Huard, J., et al., *Gene therapy and tissue engineering for sports medicine*. J Gene Med, 2003. **5**(2): p. 93-108.
136. Lee, K.H., et al., *Regeneration of hyaline cartilage by cell-mediated gene therapy using transforming growth factor beta 1-producing fibroblasts*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(14): p. 1805-13.
137. Axelrad, T.W. and T.A. Einhorn, *Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(5-6): p. 481-8.
138. Miyazaki, M., et al., *Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model*. Spine, 2008. **33**(8): p. 863-9.

139. Robbins, P.D. and S.C. Ghivizzani, *Viral vectors for gene therapy*. Pharmacol Ther, 1998. **80**(1): p. 35-47.
140. Martinek, V., F.H. Fu, and J. Huard, *Gene therapy and tissue engineering in sports medicine*. Phys Sportsmed, 2000. **28**(2): p. 34-51.
141. Alden, T.D., et al., *In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(13): p. 2245-53.
142. Baragi, V.M., et al., *Transplantation of adenovirally transduced allogeneic chondrocytes into articular cartilage defects in vivo*. Osteoarthritis Cartilage, 1997. **5**(4): p. 275-82.
143. Dinsler, R., et al., *Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes*. Histochem Cell Biol, 2001. **116**(1): p. 69-77.
144. Ikeda, T., et al., *Ex vivo gene delivery using an adenovirus vector in treatment for cartilage defects*. J Rheumatol, 2000. **27**(4): p. 990-6.
145. Madry, H., et al., *Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(4): p. 393-402.
146. Gouze, E., et al., *In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors*. Mol Ther, 2002. **5**(4): p. 397-404.
147. Ghivizzani, S.C., et al., *Direct retrovirus-mediated gene transfer to the synovium of the rabbit knee: implications for arthritis gene therapy*. Gene Ther, 1997. **4**(9): p. 977-82.
148. Hirschmann, F., et al., *Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(2): p. 109-18.
149. Vogt, S., et al., *Efficient and stable gene transfer of growth factors into chondrogenic cells and primary articular chondrocytes using a VSV.G pseudotyped retroviral vector*. Biomaterials, 2008. **29**(9): p. 1242-9.
150. Bobacz, K., et al., *Cartilage-derived morphogenetic protein-1 and -2 are endogenously expressed in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulate matrix synthesis*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(5): p. 394-401.
151. Lopiz-Morales, Y., et al., *In vivo comparison of the effects of rhBMP-2 and rhBMP-4 in osteochondral tissue regeneration*. Eur Cell Mater, 2010. **20**: p. 367-78.
152. Uebliacker, P., et al., *In vivo analysis of retroviral gene transfer to chondrocytes within collagen scaffolds for the treatment of osteochondral defects*. Biomaterials, 2007. **28**(30): p. 4480-7.
153. Solchaga, L.A., et al., *Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(4): p. 297-309.
154. Filova, E., et al., *Novel composite hyaluronan/type I collagen/fibrin scaffold enhances repair of osteochondral defect in rabbit knee*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008. **87**(2): p. 415-24.
155. Vogt, S., et al., *The influence of the stable expression of BMP2 in fibrin clots on the remodelling and repair of osteochondral defects*. Biomaterials, 2009. **30**(12): p. 2385-92.
156. Montini, E., et al., *The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy*. J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 964-75.
157. Montini, E., et al., *Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(6): p. 687-96.
158. Eyre, D.R., M.A. Weis, and J.J. Wu, *Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?* Eur Cell Mater, 2006. **12**: p. 57-63.

159. Lamartina, S., et al., *Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates*. Mol Ther, 2003. **7**(2): p. 271-80.
160. Barde, I., et al., *Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector*. Mol Ther, 2006. **13**(2): p. 382-90.
161. Saris, D.B., et al., *Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture*. Am J Sports Med, 2008. **36**(2): p. 235-46.
162. Tokuhara, Y., et al., *Repair of experimentally induced large osteochondral defects in rabbit knee with various concentrations of Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2*. Int Orthop, 2010. **34**(5): p. 761-7.
163. Concaro, S., et al., *Effect of cell seeding concentration on the quality of tissue engineered constructs loaded with adult human articular chondrocytes*. J Tissue Eng Regen Med, 2008. **2**(1): p. 14-21.
164. van Buul, G.M., et al., *Clinically translatable cell tracking and quantification by MRI in cartilage repair using superparamagnetic iron oxides*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17001.
165. Zhai, L.J., et al., *Mesenchymal stem cells display different gene expression profiles compared to hyaline and elastic chondrocytes*. Int J Clin Exp Med, 2011. **4**(1): p. 81-90.
166. Fortier, L.A., et al., *The Role of Growth Factors in Cartilage Repair*. Clin Orthop Relat Res, 2011.
167. Caplan, A.I., *Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics*. Tissue Eng, 2005. **11**(7-8): p. 1198-211.
168. Conget, P.A. and J.J. Minguell, *Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells*. J Cell Physiol, 1999. **181**(1): p. 67-73.
169. Aguilar, S., et al., *Bone marrow stem cells expressing keratinocyte growth factor via an inducible lentivirus protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e8013.
170. Davis, L., Y. Chen, and M. Sen, *WISP-3 functions as a ligand and promotes superoxide dismutase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(1): p. 259-65.
171. Dell'Accio, F., et al., *Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(5): p. R139.
172. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell, 2002. **110**(4): p. 521-9.
173. Wu, X., et al., *Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration*. Science, 2003. **300**(5626): p. 1749-51.
174. Mitchell, R.S., et al., *Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences*. PLoS Biol, 2004. **2**(8): p. E234.
175. Hematti, P., et al., *Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells*. PLoS Biol, 2004. **2**(12): p. e423.
176. De Palma, M., et al., *Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2307-15.
177. Nakai, H., et al., *AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice*. Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 297-302.
178. Lombardo, A., et al., *Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1298-306.