

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger)

**Tissue Engineering und Gentransfer zur Therapie osteochondraler Läsionen am  
Kniegelenk**

Gian Max Salzmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. V. Martinek
2. Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger

Die Dissertation wurde am 20.06.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 19.10.2005 angenommen.

meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALC	Alcianblau
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
β-Gal	Beta-Galaktosidase
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	complementary-Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
D	Dalton
dest.	destilliert
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
€	Euro
EDTA	Ethylen-Diamino-Tetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	et altera
EVG	Elastica-van-Gieson
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter System
FBS	Fetal Bovine Serum
FDG	Fluorescein-β-D Galactopyranosid

FGF	Fibroblast Growth Factor
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GAG	Glykosaminoglykane
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Salzsäure
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTLV	Human T-Cell Lymphotropic Virus
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-1	Interleukin 1
IP	Infektiöse Partikel
IRES	Interne Ribosomale Eintrittsstelle
IU	Infectious Unit
i.v.	Intravenös
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
lacZ	Beta-Galaktosidase-Gen
LacZ	Beta-Galaktosidase-Protein
LTR	Long Terminal Repeats
Mg	Magnesium
min	Minute
mm	Millimeter
mmol, µmol, nmol	Millimol, Mikromol, Nanomol
mM, µM, nM	Millimolar, Mikromolar, Nanomolar
mRNA/mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natronlauge
OATS	Osteochondrales Autologes Transfer-System
OP	Operation
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PGA	Polyglycolic Acid
pH	pH-Wert, Pondus Hydrogenii
Psi	Verpackungssequenz
rhBMP	Rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein
RIA	Radio Immuno Assay
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RCR	Replikationskompetente Retroviren
s.c.	subcutan
s	Sekunde
SIP	Smad Interacting Protein
tetlacZ	Induzierbares Beta-Galactosidase-Gen
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
U	Unit
U/l	Units pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VPC	Verpackungszelllinie
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid

## Inhaltsverzeichnis

Seite

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	7
<b>2.</b>	<b>Methoden und Materialien</b>	12
2.1.	Theoretische Überlegungen	12
2.2.	Anästhesie und Tierpflege	12
2.3.	OP-Methode der Zellbiopsie	13
2.3.1.	OP-Methode der Implantation	15
2.3.2.	Präparation der Femurkondylen	16
2.4.	Zellisolierung	16
2.4.1	Zellkultur	17
2.4.2.	Kollagen-Matrix-Besiedelung	17
2.4.3.	Zellkultur-Zeiten	19
2.5.	Retrovirusproduktion und Infektion	19
2.6.	Liposomale Transfektion	21
2.7.	Färbung mit dem Chromogen X-Gal	22
2.8.	Nachweis der Effizienz mittels FACS-Vantage	23
2.9.	ELISA	23
2.10.	Messung der alkalischen Phosphatase	24
2.11.	Histologien	24
2.12.	Histomorphologische Kontrolle	25
2.13.	Proliferationsuntersuchungen	25
2.14.	Verwendete Materialien	26
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	27
3.1.	Knorpelzellisolierung	27
3.2.	Zellkultur	27
3.3.	Tissue Engineering	29
3.3.1	Besiedelung von Chondrozyten auf die Matrices Verigen®, Tachotop® und Resorba®	30

3.4.	Retroviraler und nichtviraler Gentransfer an Chondrozyten in vitro	33
3.4.1.	Transfektionseffizienz nach liposomaler Transfektion mit dem Markergen lacZ in vitro	33
3.4.2.	Transduktionseffizienz nach retroviraler Infektion mit dem Markergen lacZ in vitro	33
3.4.3.	Transduktionseffizienz nach retroviraler Infektion mit dem Markergen EGFP in vitro	38
3.4.4.	BMP-2-Bildung nach retroviraler Infektion von Chondrozyten in vitro	40
3.4.5.	Steuerbare Genexpression nach liposomaler Transfektion mit dem induzierbaren Plasmid tetlacZ in vitro	42
3.5.	Alkalische Phosphatase	44
3.6.	In vivo Ergebnisse	44
3.6.1.	Unbehandelte Defekte	44
3.6.2.	Implantierte unbesiedelte Resorba®-Trägerschwämme	47
3.6.3.	Implantierte autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte	50
3.6.4.	Implantierte lacZ-markierte autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte	53
3.6.5.	Implantierte autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte mit BMP-2- produzierenden Chondrozyten	56
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	61
4.1.	Knorpel	61
4.2.	Bone Morphogenetic Proteins	64
4.2.1.	Die Wirkung des BMP-2	66
4.2.2.	Der BMP-2 Rezeptor	69
4.3.	Tissue Engineering	69
4.4.	Wachstumsfaktoren in Kombination mit Tissue Engineering	72
4.5.	Gentherapie und Methoden der heutigen Gentherapie	73
4.6.	Marker/Reportergene für den viralen Gentransfer	74
4.7.	Nonvirale Methoden	76
4.7.1.	Effektivität einer Transfektion isolierter adulter Chondrozyten mit Liposomen	77
4.7.2.	Transfektion mit dem Doxyzyklin induzierbaren Plasmid tetlacZ mittels Fugene®	78
4.8.	Virale Vektoren	79

4.8.1.	Retroviren	79
4.8.2.	Struktur und Infektionszyklus	80
4.8.3.	Züchtung rekombinanter Retroviren	81
4.8.4.	Effektivität einer Transduktion isolierter adulter Chondrozyten mit Retroviren	82
4.9.	Histochemische Untersuchung nach lacZ-Gentransfer	83
4.10.	Gentransfer am Knorpel mit Wachstumsfaktoren als Transgen	85
4.11.	Andere Ansätze in der Therapie von Knorpelschäden	85
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>114</b>

## 1. Einleitung

Für die normale Gelenkfunktion ist der hyaline Knorpel als Gleitfläche unerlässlich. Jedoch schon durch kleinste Schäden verursachte Aufbrüche der Gelenkfläche in der Belastungszone bedingen Gelenkknorpeldefekte, die bis heute ein therapeutisches Problem darstellen und in der Bevölkerung häufig anzutreffen sind. Verantwortlich dafür ist die mangelnde, allein dem Perichondrium zugeschriebene, Regenerationsfähigkeit des hyalinen Knorpels, dessen ausdifferenzierte Chondrozyten ihre Teilungsfähigkeit verloren haben. Knorpel reagiert auf oberflächliche Defekte, sei es akuter, chronischer oder degenerativer Natur, durch eine ineffiziente lokale Steigerung der Produktion von Glykosaminoglykanen und Kollagenen. Nur in tiefen Defekten mit Ausdehnung bis zum subchondralen Knochen kann sich über ein vom Markraum einspritzendes Granulationsgewebe unter entsprechender postoperativer Therapie bestenfalls mechanisch minderwertiger Faserknorpel bilden. Während einige Patienten trotz eines Knorpelschadens keine klinische Symptomatik aufweisen, entwickeln die meisten im Laufe der Zeit arthrotische Veränderungen im Bereich des betreffenden Gelenkes. Diese degenerativen Veränderungen schreiten fort und, falls keine adäquate Therapie erfolgt, entstehen ausgeprägte, generalisierte arthrotische Veränderungen.

Die unbefriedigende genuine Defektheilung des hyalinen Gelenkknorpels erklärt den Wunsch nach einem befriedigenden therapeutischen Konzept zur langfristigen Wiederherstellung der Gelenkfläche. Ziel einer Therapie ist die Wiederherstellung der Knorpeloberflächenkongruenz, normale Gelenkfunktion und freie schmerzlose Beweglichkeit sowie die Verhinderung einer weiteren Knorpeldegeneration.

Die zur Zeit in der klinischen Routine angewandten Verfahren führen weder zu einer Restitutio ad integrum noch zu einem langfristig befriedigenden Ergebnis. Zu den Therapieverfahren gehören: Lavage des Gelenkes (Jackson et al., 1997: 465), Débridement oder Shaving des Knorpels (Magnuson, 1974: 4), die Abrasionsarthroplastik (Johnson et al., 1986: 54), subchondrale Anbohrung (Insall, 1974: 61), die Mikrofrakturierung (Steadman et al., 1999: 26) oder Laseranwendung (Imhoff et al., 1995: 549; Thal et al., 1996: 92). Mit diesen Therapien ist nur eine symptomatische und meist nur kurz- bis mittelfristige Besserung zu erreichen, wie in zahlreichen klinischen Studien belegt wurde (Friedman et al., 1984: 200; Glinz, 1993: 371; Hubbard, 1996: 217; Messner und Maletius, 1996: 165; Jackson et al., 1997: 469; Buckwalter und Mankin, 1998: 477). Auch periostale oder perichondrale Grafts ersetzen keinen echten hyalinen

Knorpel, sondern fügen Gewebe mit chondrogenem Potential in den Defekt ein, das zur Entstehung von Reparationsgewebe führt.

Einer der heutigen Therapiestandards ist die Transplantation von autologem Knorpel-Knochen-Gewebe. Angewandtes Verfahren ist die Transplantation von Knorpel-Knochen-Zylindern, (OATS=autologes osteochondrales Transfer-System) (Hangody et al., 1998: 751; Bobic et al., 1999: 19; Imhoff et al., 1999a: 33; Imhoff et al., 1999b: 45). Probleme stellen aber die begrenzte Verfügbarkeit des zu transplantierenden Materials, die fehlende Integration in den umliegenden gesunden Knorpel und eine eventuelle Inkongruenz nach Transplantation dar. Ausserdem kann es bei dieser Operation zu einer Morbidität an der Entnahmestelle kommen (Desjardins et al., 1991: 434; Imhoff et al., 1999b: 45).

Eine Therapiealternative, die in den letzten Jahren entwickelt wurde, stellt die autologe Chondrozytentransplantation dar (Brittberg et al., 1994: 889). Hierbei werden biopsierte Chondrozyten nach Proliferation unter einen autologen Periostlappen injiziert oder auf eine Kollagenmatrix besiedelt. In Histologien aus Kontrollarthroskopien zeigte sich aber nur die Bildung hyalinartigen Gewebes mit Clusterbildung der Chondrozyten (Brittberg et al., 1996: 270; Burkart und Imhoff, 2000: 135). Außerdem ist das Regenerat weicher und biomechanisch nicht so belastbar wie echter hyaliner Knorpel. Weitere Probleme bestehen in der möglichen Bildung hypertrophen Gewebes an der Transplantationsstelle, der hohen Kontaminationsgefahr und nicht zuletzt der sehr hohen Kosten (ca. 5.000-10.000 €/Patient).

An letzter Stelle einer unterlassenen oder erfolgten Knorpelbehandlung steht die prothetische Versorgung. Während ältere Patienten mit Arthrose von einem künstlichen Gelenkersatz profitieren, kann diese Behandlung jüngeren Personen wegen der noch begrenzten Überlebensdauer der Implantate nur in äußersten Fällen angeboten werden. Es besteht daher ein erheblicher Bedarf an Behandlungsalternativen, die besonders für junge Patienten eine langfristige Besserung versprechen.

Es steht somit außer Frage, dass neue, biologische Alternativen zur Behandlung von Knorpelläsionen gefunden werden müssen.

In den letzten Jahren ist das Tissue Engineering aufgekommen, welches die Entwicklung und Manipulation von im Labor gezüchteten Zellen mit der Absicht, defekte oder verletzte Teile des Körpers in ihrer Funktion zu unterstützen oder gar zu ersetzen, anstrebt (Bujia et al., 1994: 577). Dessen Weiterentwicklung, durch mit autologen Chondrozyten besiedelte dreidimensionale

Gewebekomplexe, das Design und die Funktion des menschlichen Gewebes kopierend, herzustellen, erweist sich als sinnvoller Therapieansatz für die Zukunft (Temenoff et al., 2000: 431). Als Fremdmaterial sind z.B. Kollagen-Typ 1-Schwämme, wie sie kommerziell zur Hämostase für Operationen erhältlich sind, gut geeignet. Unter diesen Bedingungen sollen die Knorpelzellen in vitro ihre morphologischen, phänotypischen als auch funktionellen Eigenschaften, welche in zweidimensionaler Kultur im Prozess der Dedifferenzierung weitgehend verloren gehen, beibehalten (Cao et al., 1998: 475). Außerdem soll eine Akkumulation von Matrixprodukten in der Umgebung der Zellen erreicht werden (Bujia et al., 1994: 577). In dieser Verbindung mit biokompatiblen Trägersubstanzen können dreidimensionale Zell-Material-Konstrukte mit knorpelähnlichen Eigenschaften hergestellt werden.

Parallel zur Knorpelzelltransplantation erscheint die Anwendung von Wachstumsfaktoren als förderlich, da einige von ihnen das zellbiologische Verhalten wie Proliferation, Matrixsynthese und Differenzierung modifizieren und stimulieren können (Mason et al., 1998: 1098; Moller et al., 2000: 75; Shuler et al., 2000: 585; Smith et al., 2000: 1156). Der Einsatz dieser Zytokine am Ort des Defektes verspricht ein verbessertes Wachstumsverhalten und damit eine entscheidende Verbesserung der Knorpelheilung. Besonders vielversprechend für die Knorpeltherapie erscheint der Einsatz von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2). Aus verschiedenen experimentellen Arbeiten geht hervor, dass dieser Wachstumsfaktor sowohl das Wachstum und die Differenzierung von mesenchymalen Zellen, als auch die Proliferation und Syntheseleistung von Chondrozyten stimuliert (Sato und Urist, 1984: 180; Riley et al., 1996: 39; Sailor et al., 1996: 937). Daneben kann BMP-2 durch seinen stimulatorischen Effekt auf die Knochenbildung auch den subchondralen Knochen bei osteochondralen Defekten wieder aufbauen (Wozney und Rosen, 1998: 26).

Probleme, die bei der Anwendung von rekombinanten Wachstumsfaktoren zur Knorpeltherapie auftreten, sind zum einen die kommerzielle Verfügbarkeit reiner, aktiver Wachstumsfaktoren in körpereigener Form, zum anderen die biologische Verfügbarkeit, weil diese Peptide in vivo einem raschen enzymatischen Abbau unterliegen (Neidel, 1992: 73). Deshalb lässt sich mit einer einfachen Applikation noch kein Dauereffekt in der Knorpelheilung erreichen. Um einen konstanten Wirkspiegel dieser Zytokine im Gewebe zu erreichen, müssten entweder hohe Dosen oder mehrmalige Injektionen verabreicht werden, was nicht zuletzt aufgrund der Risiken wie Infektion, immunologischen oder toxischen Geschehen unpraktikabel erscheint. Oft ist auch die Zugänglichkeit des Schadens für Injektionen eingeschränkt.

An dieser Stelle bieten sich gentherapeutische Methoden an, durch die das gezielte Einbringen eines fremden Gens, welches z.B. für Wachstumsfaktoren codiert, in Körperzellen möglich wird (Kang et al., 1997: 139; Gelse et al., 2003: 305). Hiermit wird den Zellen eine zusätzliche Funktion verliehen und so z.B. ein Zytokin in situ produziert. Arbeitsgerät der Gentherapie sind Vektoren, die Fremd-DNA in Zellen einbringen können. Hier finden Retroviren, Adenoviren, adeno-assoziierte Viren oder auch der nicht-virale Gentransfer durch Liposomen oder Genkanonen etc. Anwendung (Evans et al., 2000: 214). Nicht-virale Vektoren weisen jedoch im Vergleich zu viralen bedeutend niedrigere Gentransfereffizienzen auf und erscheinen so im Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen weit weniger sinnvoll (Madry und Trippel, 2000: 286). Nach erfolgreicher Transduktion der Fremd-DNA bleibt deren Regulierung unklar. Hierbei bleibt offen, ob durch die gentherapeutische Manipulation ausreichend oder zu viel Protein produziert wird, wann und wie lange die Genexpression andauert, ob deren Aktivität ausreicht, um einen Effekt zu erzielen, und ob sie eventuell eine immunologische Reaktion hervorruft. Eine ständige Bildung von Wachstumsfaktoren in situ könnte zu einer malignen Transformation oder einer überschießenden Gewebsneubildung führen (Donahue et al., 1992: 1125; Robbins et al., 1998: 35).

Solch eine Transformation könnte durch eine steuerbare Genexpression, welche durch die Entwicklung induzierbarer Genexpressionssysteme möglich ist, verhindert werden (Mills et al., 2001: 1461). Die steuerbare transgene Expression erweist sich als sinnvoll, da z.B. ein Wachstumsfaktor als Genprodukt lediglich in Phasen der Reparatur gebraucht wird (Lamartina et al., 2002: 199). Konstitutive, unregulierte Expression könnte durch chronische Überexpression des Zytokins zu einer unerwünschten abnormalen Regulation von Zellwachstum und möglichen Nebenwirkungen führen. Deshalb erscheint die zeitliche Kontrolle über die Applikation eines Wachstumsfaktors gegenüber konstitutiver Genexpression als vorteilhaft.

Ziel der Versuche, über die die vorliegende Arbeit berichtet, war es, das Tissue Engineering am Knorpel in der autologen Chondrozytentransplantation unter Verwendung von dreidimensionaler Zellkultur-Gerüste und Gentechnologie, zu etablieren. In dem Versuchsansatz sollte eine Heilung durch die Methode der Chondrozytentransplantation, ergänzt durch das stabile, effiziente und konstitutive Einbringen von Wachstumsfaktoren an den Ort des Defektes, optimiert werden.

Im ersten Teil wurde in vitro unter Verwendung verschiedener Trägermaterialien die dreidimensionale Zellkulturmethode im Sinne des Tissue Engineering erprobt.

Im zweiten Teil wurde mittels der Markergene lacZ und EGFP in vitro eine stabile retrovirale Transduktion und in Vorversuchen eine steuerbare Genexpression nach Transfektion an Chondrozyten untersucht. Nach dreidimensionaler Besiedelung der transduzierten Chondrozyten auf eine Kollagen-Matrix wurde der Nachweis einer Genexpression in vivo durch Implantation der Konstrukte in das Kniegelenk von New Zealand White Kaninchen über einen längeren Zeitraum erbracht. Gleichzeitig wurde durch die Kombination mit Tissue Engineering die Heilungseigenschaft transplantiertes tissue-engineerter autologer Chondrozyten-Matrix-Konstrukte erprobt.

Im dritten Teil der Arbeit wurde in Anfängen die Anwendung und Wirkung des Wachstumsfaktors BMP-2 untersucht. Die transduzierten, auf Kollagengerüste gesiedelten, Chondrozyten sollten von dem von ihnen produzierten BMP-2 zur Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese stimuliert werden (Autostimulation). Daneben sollte der eingebrachte Wachstumsfaktor die am Defekt liegenden ortsständigen Zellen zur Differenzierung (Trans-Wirkung) anregen.

Dieser hier beschriebene Therapieansatz, der Tissue Engineering mit der Anwendung gentherapeutischer Methoden vereinigt, stellt einen der möglichen Schritte der Behandlung von Knorpelläsionen in Zukunft dar.

## **2. Methoden und Materialien**

### **2.1. Theoretische Überlegungen**

In der hier beschriebenen Arbeit wird ein neuer Ansatz zur Therapie von Knorpelläsionen vorgestellt: osteochondrale Defekte im Kniegelenk sollen mit einem durch Tissue Engineering in vitro gezüchteten Konstrukt, bestehend aus einer Matrix und gentechnisch veränderten autologen Chondrozyten behandelt werden. Es werden drei Teilzielsetzungen verfolgt: im ersten Teil der Arbeit sollen in vitro unter Verwendung unterschiedlicher Trägermaterialien die verschiedenen Methoden des Tissue Engineering untersucht werden. Im zweiten Teil soll anhand der Markergene lacZ und EGFP die Durchführbarkeit und die Strategie der Gentherapie in Knorpelzellen in vitro und in vivo, in Kombination mit Tissue Engineering, etabliert und untersucht werden. Parallel soll die Effizienz der einzelnen Vektoren für das Einbringen des Fremdgens in die Zielzelle verglichen werden. Zudem soll in Grundzügen die steuerbare Genexpression in vitro untersucht werden. Im dritten Teil der Studie wird als Fremd-DNA das für den Wachstumsfaktor BMP-2 kodierende Gen in Chondrozyten eingeschleust und nach Kultivierung dieser transduzierten Zellen auf einem dreidimensionalen Trägermaterial in vivo implantiert. Ein solcher Wachstumsfaktor, der durch heterologe Genexpression direkt am Defekt gebildet wird, könnte nicht nur die eingebrachten Knorpelzellen, sondern auch einwandernde Zellen zur Bildung von neuem, hyalinem Knorpel stimulieren.

### **2.2. Anästhesie und Tierpflege**

Die für die Versuche verwendeten Knorpelzellen stammen aus weiblichen Kaninchen der Rasse New Zealand White bezogen von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden gemäß FELASA-Richtlinien konventionell in V2A-Käfigen unter kontrollierten Temperatur- und Licht-Bedingungen gehalten. Die Quarantäne-Zeit betrug sieben Tage. Es herrschten angemessene Schlaf-Bedingungen sowie freier Zugang zu Trinkwasser und Nahrung. Die Tiere kamen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1,4 kg ins Labor. Zum Zeitpunkt des ersten Eingriffs, der Biopsie, wogen die Tiere im Schnitt 1,8 kg. Zum Zeitpunkt der Implantation betrug das Gewicht der Tiere durchschnittlich 3 kg und zum Zeitpunkt der Opferung wogen die Tiere im Schnitt 3,5 kg.

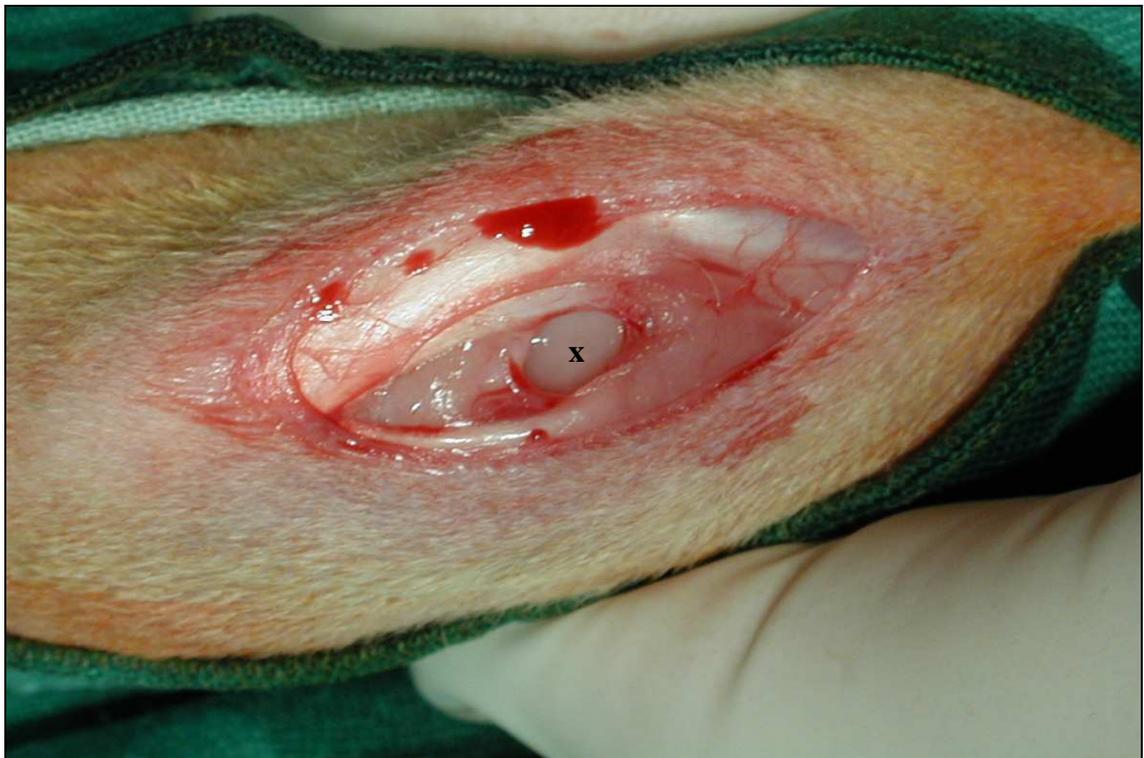
Im Verlauf der Operationen wurde nach einer kurzen Allgemeinuntersuchung eine Kanüle in die Ohrtrandvene gelegt. Nach Injektionsnarkose von 0,25 mg/kg KG Medetomidin und 17 mg/kg KG S-Ketamin in die lange Sitzbeinmuskulatur schliefen die Tiere innerhalb von 5-8 min ein. Anhand des Muskeltonus ließ sich die Narkosetiefe gut bestimmen. Im nächsten Schritt erfolgte die Intubation durch einen Endotrachealtubus bei der das Tier in Rückenlage mit rekliniertem Kopf positioniert wurde. Um eine Verbesserung der Analgesie sowie einen stabileren Narkoseverlauf zu erreichen, erfolgte die intravenöse Injektion von 30 mg/kg KG Metamizol im Verdünnungsverhältnis 1:3 ergänzt durch die subcutane Injektion von 4 mg/kg KG Carprofen. Während der Operation erhielten die Kaninchen durch einen vor die Nase gehaltenen Schlauch Sauerstoff. Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere durch intramuskuläre Antagonisierung von 0,25 mg/kg KG Atipamenzol (bzw. äquivalente Menge zu der des Medetomidin) ausgeleitet. Nach 5-10minütiger Aufwachphase erfolgte die Extubation. Um eine postoperative Analgesie zu gewährleisten, bekamen die Tiere im Verlauf der Aufwachphase 0,003 mg/kg KG Buprenorphin subcutan injiziert. Antibiotisch erhielten die Kaninchen oral 0,5-1 ml/kg KG Sulfonamid oder Trimethoprim. Beide Substanzen zeigen keine knorpeltoxischen Eigenschaften. Im postoperativen Management erhielten die Tiere je nach Bedarf einmal täglich subcutan entweder Buprenorphin zwei Tage postoperativ, Carprofen fünf Tage postoperativ oder Trimethoprim fünf Tage postoperativ. Die Fäden wurden zehn Tage nach der jeweiligen Operation gezogen. Im Prozess der Opferung wurde den Tieren zur Sedierung intravenös durch eine Braunüle Propofol verabreicht. Die Euthanasie erfolgte durch schnelle i.v. Gabe von 5 ml Pentobarbital.

### **2.3. OP-Methode der Zellbiopsie**

Aus dem sich in Rückenlage befindlichen Kaninchen wurde aus dem linken Kniegelenk in einer etwa 10minütigen Operation die Biopsie gewonnen. Dabei wurde das Knie über eine ca. 1 cm lange anteromediale Arthrotomie eröffnet, die Patella nach lateral luxiert und der Knorpel aus den Randgebieten der Femurkondylen, außerhalb der Belastungszonen der tibiofemorale Gelenke, steril entnommen (Abb. 2). In der Regel wurden, mittels eines Skalpells, durch vorsichtige Abschabung drei Knorpelschuppen (je ca. 3 x 3 mm) gewonnen, welches einer ungefähren Zellzahl von 100.000 Knorpelzellen entspricht. Diese Proben wurden direkt in Medium (D-MEM, 10 % FCS, 2 mmol/l Glutamin, Penicillin 100 IU/ml, Streptomycin 100 µg/ml) gegeben und ca. zehn Minuten nach der Operation weiterbehandelt. Die Gelenkkapsel wurde schichtweise mit resorbierbaren Einzelknopfnähten und die Haut mit einer Donati-Rückstichnaht verschlossen. Zusätzlich wurde die verschlossene Naht mit einem Sprühverband versiegelt.



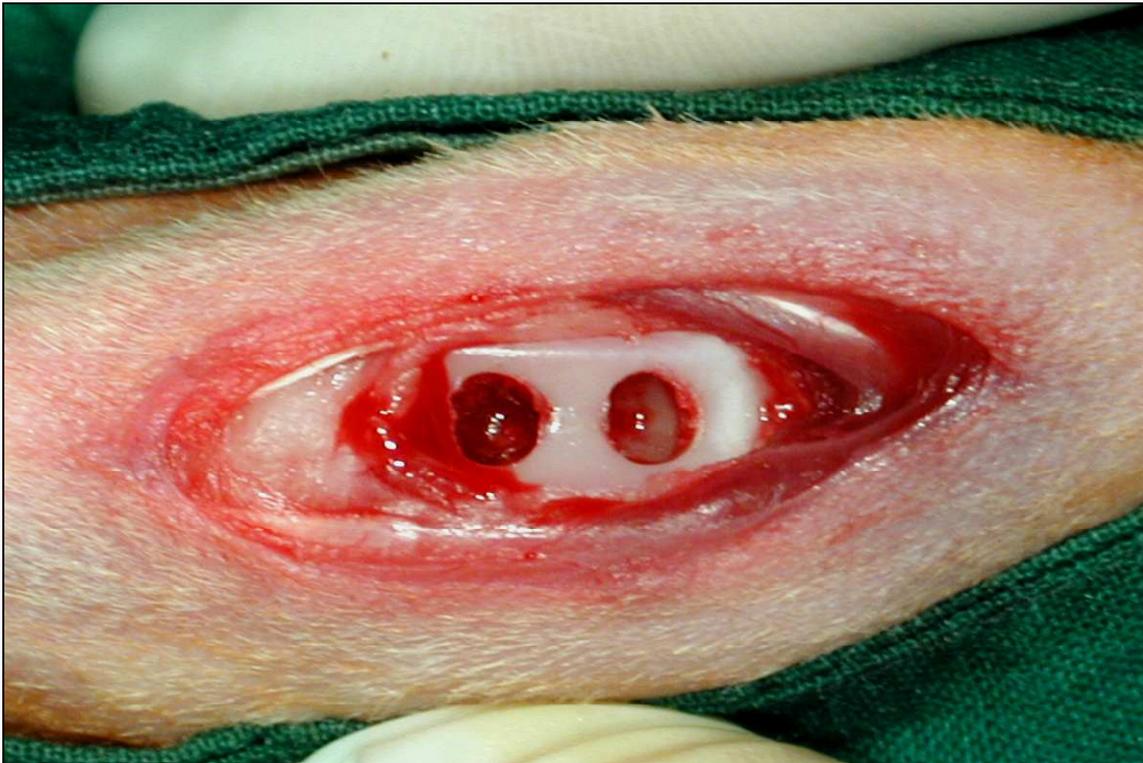
**Abbildung 1:** Aufsicht auf das Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens nach dem Hautschnitt. Hier wird die Patellasehne sichtbar.



**Abbildung 2:** Aufsicht auf das eröffnete Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens. Hier ist nach Luxation der Patella die Knorpeloberfläche (x) der Trochlea femoris erkennbar.

### 2.3.1. OP-Methode der Implantation

Nachdem die zellbesiedelten Konstrukte erstellt waren, wurde auf der kontralateralen Seite zur Biopsie ebenfalls eine anteromediale Kniegelenksarthrotomie durchgeführt, die Patella nach lateral luxiert und die Trochlea dargestellt. In 90° Knieflexion wurden mit einem motorisierten Bohrer in der Trochlea femoris ein oder zwei standardisierte osteochondrale Defekte von 3,5 mm Durchmesser und 3,5 mm Tiefe gesetzt (Abb. 3). Nach gründlicher Reinigung der Defekte mit NaCl wurden diese mit dem etwas größeren Kollagengerüst in Press-fit Technik gefüllt oder leer gelassen. Für die Implantation standen entweder mit transduzierten Knorpelzellen (lacZ und BMP-2) besiedelte, mit unbehandelten Knorpelzellen besiedelte oder unbesiedelte Resorba®-Kollagenschwämme zur Verfügung. Anschließend wurden die Kniegelenke schichtweise wieder verschlossen. Die zu implantierenden Schwämme wurden bis kurz vor der Implantation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem 50 ml-tube in 20 ml Medium zwischengelagert.



**Abbildung 3:** Aufsicht auf das eröffnete Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens. Erkennbar sind zwei osteochondrale Defekte im Bereich der Trochlea femoris. Diese werden im nächsten Schritt der Operation mit einer Kollagen-Matrix befüllt oder unbehandelt belassen.

### **2.3.2. Präparation der Femurkondylen**

Das Kniegelenk des zuvor euthanasierten Tieres wurde hierbei steril großzügig eröffnet und der distale Femur freipräpariert, sowie durch Durchtrennung sämtlicher Muskeln, Bänder, Gefäße und Nerven von Tibia und Fibula komplett getrennt. Darauf wurde mit einer Knochensäge der gesamte distale Femur abgesetzt, präparatorisch weitgehend von Weichteilen befreit, und in 6 %igem Formaldehyd bis zur histologischen Aufbereitung mindestens 72 Stunden bei +8 °C gelagert. Im Falle der lacZ-markierten Zellen wurden die Kondylen zuerst für 10 min in 1 molarer Mg-Lösung inkubiert und im folgenden in ca. 40 ml X-gal-Lösung lichtgeschützt für ca. vier Stunden im Brutschrank inkubiert und erst danach in 6 %iges Formaldehyd eingelegt.

### **2.4. Zellisolierung**

Alle hier folgenden Schritte zur Etablierung der Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die in Komplett-Medium gelagerten Knorpelstücke wurden in der Zellkultur in eine 10 cm-Schale, gefüllt mit 10 ml PBS, gegeben. Mit einem Skalpell wurden die Biopsate auf mehrere ca. 0,5 mm x 0,5 mm Stücke mechanisch zerkleinert und in einen mit 20 ml Trypsin befüllten 50 ml-Tube gegeben. Im Anschluß wurden die Knorpelstücke auf einem Schüttler bei 37 °C und 120 U/min für 20 min angedaut. Anschließend folgte eine 5minütige Zentrifugation bei 900 U/min, damit sich die Zellen als Pellet am Grunde des Tubes absetzten. Nach nun 25minütiger Trypsin-Behandlung wurde dieses abgesaugt und die Zellen in einem 20 ml Kollagenase-Medium-Gemisch (50 µg Kollagenase in 20 ml Komplett-Medium steril gefiltert mit einem 20 µm Filter) suspendiert und wiederum bei 37 °C und 120 U/min für ca. 20 h auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 min lang bei 900 U/min zentrifugiert und das Medium-Kollagenase-Gemisch abgesaugt. Das verbleibende Pellet wurde in 10 ml Komplett-Medium resuspendiert und in ein 25 cm<sup>2</sup> Zellkultur Monolayer-Flask gegeben. Danach wurden die Zellen für 2-3 Tage unbehandelt im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Luft kultiviert, um sich auf den Boden der Flasks zu setzen und sich an die zweidimensionale Kultur zu adaptieren.

### **2.4.1. Zellkultur**

Nachdem die frisch gewonnenen Zellen nach ca. 2-3 Tagen am Boden des Flask adhären waren, wurde das Medium zum ersten Mal gewechselt. Hierbei wurde das Medium bei schräg gehaltener Flasche vorsichtig mit einer sterilen Glaspipette vom Rand abgesaugt. Im folgenden wurde die Zellkulturflasche ein-bis zweimal mit PBS (je nach Größe 25 cm<sup>2</sup>: 10 ml PBS; 75 cm<sup>2</sup>: 15 ml PBS; 150 cm<sup>2</sup>: 20 ml PBS) gewaschen, um das Medium komplett zu entfernen. Im Zuge des ersten Mediumwechsels nach Biopsie wurden hier zusätzlich Zell- und Gewebereste abgesaugt. Danach wurde mittels einer Einmal-Pipette (je nach Größe 25 cm<sup>2</sup>: 7 ml Medium; 75 cm<sup>2</sup>: 12 ml Medium; 150 cm<sup>2</sup>: 20 ml Medium) frisches Medium vorsichtig auf die Zellen gegeben. Das Medium wird bei +8 °C im Kühlschrank gelagert. Vor Benutzung für die Zellkultur wurde es ca. eine Stunde lang bei 37 °C Raumtemperatur erwärmt. Gleiches gilt für das PBS und das Trypsin. Im folgenden wurde das Medium alle 2-3 Tage nach immer dem gleichen Schema gewechselt. Bevor eine Zellkulturflasche eine konfluente Bewachsung zeigte, wurden die Zellen gesplittet. Hierbei wurde wie beim Mediumwechsel dasselbe abgesaugt und die Zellen ein-zweimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen, je nach Adhärenz an den Kulturboden, für ca. 2-5 min mit Trypsin inkubiert (je nach Größe 25 cm<sup>2</sup>: 1 ml Trypsin; 75 cm<sup>2</sup>: 3 ml Trypsin; 150 cm<sup>2</sup>: 5 ml Trypsin). Durch leichtes Beklopfen der Kulturschalen konnte man den Vorgang verkürzen. Die Kulturen wurden während der Trypsinisierung ständig unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sie sich schon vom Boden abgelöst hatten, um eine zu lange zellschädliche Behandlung mit Trypsin zu vermeiden. Wenn sich die meisten Zellen gelöst hatten, wurde die Wirkung des Trypsin durch Zugabe von Medium gestoppt, und die Zellen meist 1:3 auf jeweils neue Kulturflaschen verteilt. Je nach Zelllinie bzw. Proliferationsverhalten wurden die Zellen einmal pro Woche oder einmal in zwei Wochen gesplittet. Bei gutem Wachstumsverhalten der Zellen gewinnt man aus einer 150 cm<sup>2</sup> Flasche innerhalb einer Woche drei 150 cm<sup>2</sup> Flaschen. Auf diese Art und Weise kann man die Knorpelzellen, je nach Individualität der jeweiligen Zelllinie, über einen langen Zeitraum in Kultur halten.

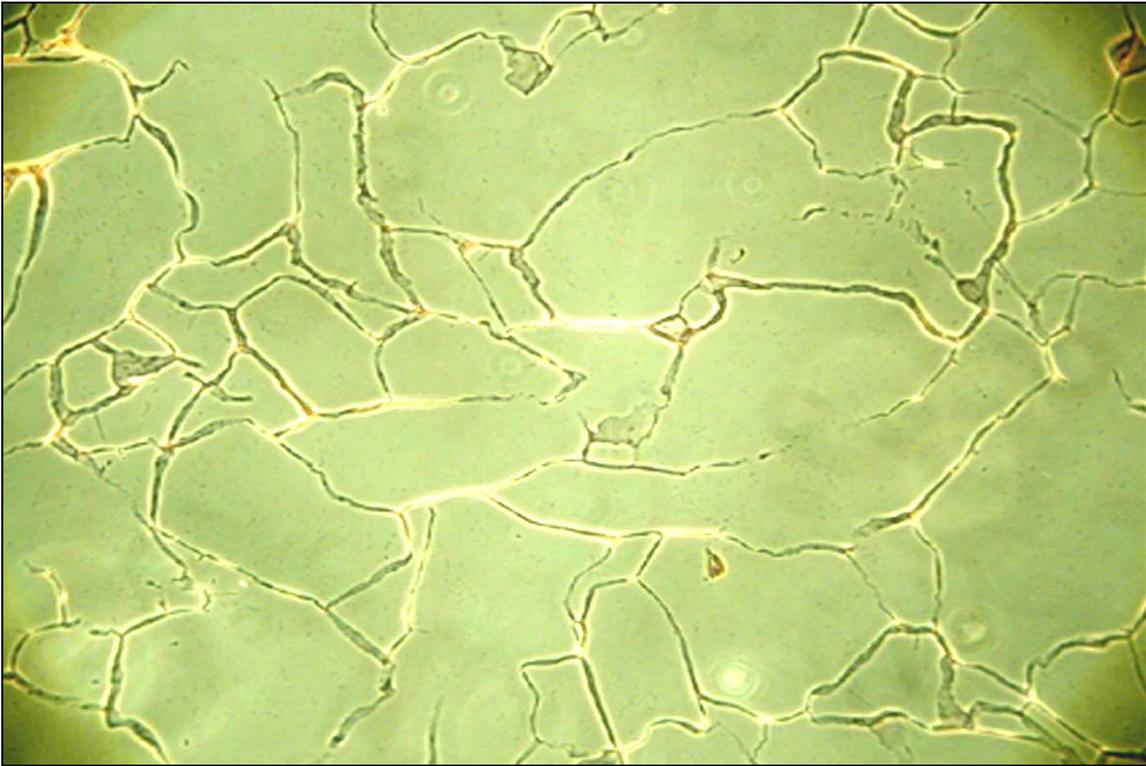
### **2.4.2. Kollagen-Matrix-Besiedelung**

Die Zellen wurden *in vitro* auf verschiedene Kollagen-Matrices gebracht. Verwendet wurden hierbei Tachotop®, Verigen® und Resorba® (Abb. 4). *In vivo* implantiert wurden lediglich unbesiedelte bzw. besiedelte Resorba®-Matrices. Das equine Kollagengerüst Tachotop® verfügt über die geringste, Verigen® über eine mittlere und Resorba® über die höchste Porendichte mit

2,8 mg nativen Kollagenfibrillen pro 1 cm<sup>2</sup> (Abb. 5). Ca. 800.000 Zellen wurden vom Monolayer gelöst und zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet in ca. 50 µl Medium suspendiert. Nun wurde das Medium-Zellgemisch in eine feine 1 ml-Luer Spritze aufgezogen und mittels einer sehr feinen Nadel (0,4 mm x 19 mm) vorsichtig in ein ca. 5 mm x 5 mm x 5 mm großes Matrix-Stück injiziert. Der Injektionsvorgang wurde mehrfach wiederholt, um eine optimale Besiedelung des Gerüsts zu erreichen. Nun wurden die Schwämme in eine unbeschichtete 60 mm Kulturschale gebracht und 5 ml Medium zugegeben. Nach einer 2-3wöchigen Kulturzeit standen die besiedelten Matrices zur Implantation bereit. Auch hier wurde im folgenden alle 2-3 Tage das Medium gewechselt.



**Abbildung 4:** Makroskopische Ansicht einer Resorba®-Kollagen-Matrix.



**Abbildung 5:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines unbesiedelten Resorba®-Kollagen-Gerüsts.  
Vergrößerung 100fach

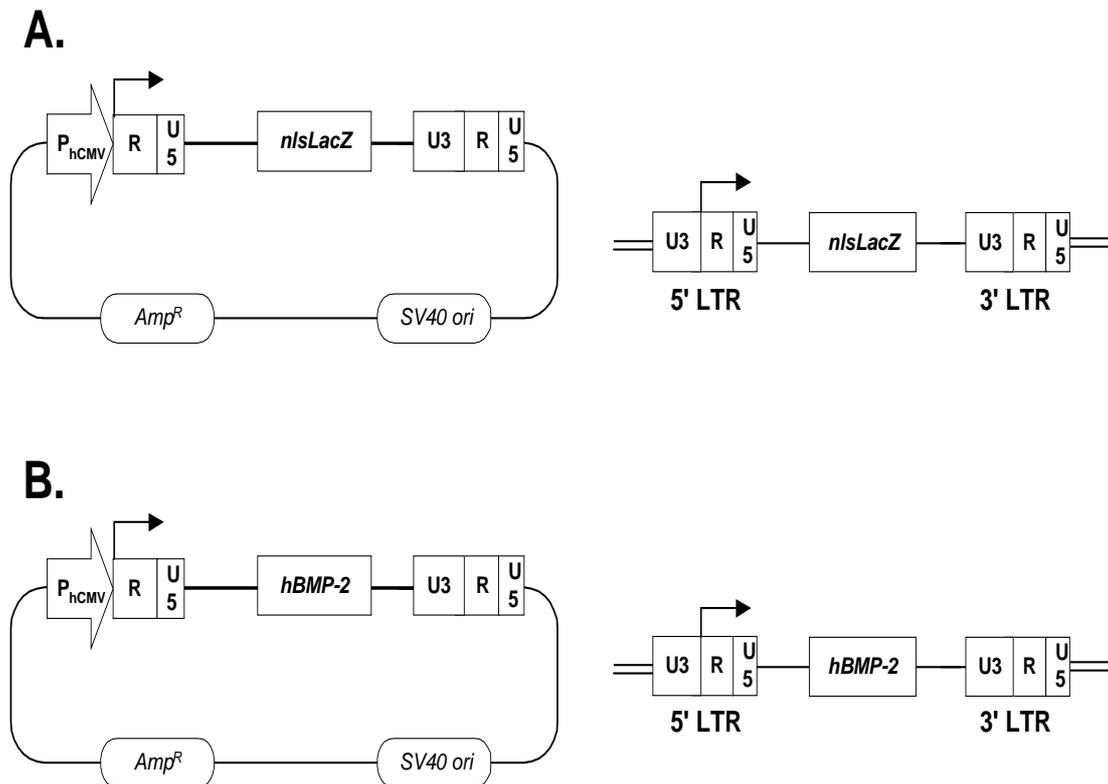
### **2.4.3. Zellkultur-Zeiten**

Es wurde immer der gleiche Zeitplan für die Zellkultur eingehalten. Nach Biopsie 6-10 Stunden zum Lösen der Zellen aus ihrer Matrix. Folgend 2-3 Tage zur Adhärenz der Zellen an die zweidimensionale Kulturflasche. Ca. 5 Tage zur Proliferation, um eine ausreichende Menge für die Infektion zu haben. Infektionsablauf ca. 3 Tage und darauf ca. 2 Wochen Proliferationszeit bis zur Besiedelung von mindestens zwei Matrices. In der Folge 2-3 Wochen in Kultur auf dem Kollagengerüst und darauf die Implantation. Verbleiben der Konstrukte in vivo bis zur Opferrung ca. 3 Wochen. Die Zellkultur-Zeit betrug demnach ca. 6 Wochen, der gesamte Ablauf ca. 9 Wochen.

### **2.5. Retrovirusproduktion und Infektion**

Retrovirale Partikel wurden mittels transienter Transfektion von 293T Zellen generiert. Als retrovirales Backbone wurden Vektoren basierend auf dem Vektor pBullet verwendet (von R.

Willemsen zur Verfügung gestellt). pBullet ist ein Derivat des MFG-Vektors. Hierbei handelt es sich um einen auf dem MoMLV-Retrovirus basierenden Vektor, welcher durch eine Deletion U3 Region der 3'LTR zu den selbstinaktivierenden Vektoren gehört. Als Transgen wurden nlsLacZ (pBulletLZ), eGFP (pBulletEGFP) oder hBMP2 (pBulletBMP2) verwendet. Als *gag-pol*-Plasmid wurde pHit60 verwendet. Die viralen Partikel wurden durch VSV.G pseudotypisiert. Hierdurch wurde die Infektionsrate im Vergleich zu einem amphotropen Envelope deutlich verbessert. Die Generierung sogenannter rekombinanter replikationskompetenter Viren wurde durch die Verwendung eines selbstinaktivierenden Vektors und eines Mehrplasmidsystems verhindert. Die transiente Transfektion erfolgt mittels Calcium Phosphat Präzipitation der drei oben genannten Plasmide. Hierfür wurden am Vortag der Transfektion die Zellen ausplattiert, am Tag nach der Transfektion das Medium gewechselt und der virushaltige Zellüberstand etwa 40 h nach Transfektion abgenommen. Bei der retroviralen Infektion wurde der virushaltige Zellüberstand durch einen 45 µm Filter filtriert und anschließend entweder frisch für eine Infektion verwendet, oder zur Lagerung bei -80 °C tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt für eine Infektion verwendet. Solche gefrorenen Überstände wurden dann in einem 22 °C Wasserbad aufgetaut und innerhalb von 60 min verwendet. Die Infektion erfolgte nach Zusatz von 8 mg Polybrene/ml Überstand und dauerte zwei Stunden. Dann wurde der virushaltige Überstand mit frischem Medium aufgefüllt. Nach 48 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen in Kultur genommen bzw. analysiert. Zur Infektion wurden jeweils 24 h vor Infektion ca. 250.000 Zellen auf 25 cm<sup>2</sup> Flasks ausgesät. Der retrovirale Vektor wurde freundlicherweise vom Institut für experimentelle Onkologie des Klinikums rechts der Isar, München zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 6:** Darstellung der Plasmide pBulletLZ (A) und pBulletBMP2 (B). Rechts ist der schematische Aufbau des Plasmids dargestellt. Die Transgenexpression wird von dem Promotor PhCMV gesteuert. Start und Richtung sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der linke Teil zeigt eine Darstellung der Plasmide nach retroviraler Integration in das Zellgenom (Provirus). Die Transgenexpression wird von dem retroviralen Promotor der 5'LTR gesteuert. Start und Richtung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. PhCMV: intermediate early Promotor des humanen Cytomegalievirus, R, U5, U3: Abschnitte der Mo-MLV LTR; *nlsLacZ*: Gen der  $\beta$ -Galaktosidase- mit Kernlokalisierungssignal; *hBMP-2*: Gen des humanen Bone Morphogenic Protein-2; *SV40 ori*: origin of replication des Simian Virus 40;  $Amp^R$ : Gen für die Ampicillinresistenz, LTR: long terminal repeat des Mo-MLV.

## 2.6. Liposomale Transfektion

Am ersten Tag wurden die Zellen ausgesät. Pro Zelllinie, jeweils ca. 200.000 Zellen in einer 60 mm Schale, wurden drei Transfektionen durchgeführt. Eine Kontrolle ohne DNA und zwei Transfektionen mit DNA, wobei im Rahmen der Induktionsversuche eine davon als Kontrolle nicht induziert wird. Am zweiten Tag, dem Tag der Transfektion, wurde 2 h vorher das Medium gewechselt. In einer 24-well Platte wurde 300  $\mu$ l Opti-Mem mit 10  $\mu$ l Lipofectamine® pro Transfektion gemischt, sowie in der gleichen Platte 300  $\mu$ l Opti-Mem mit 5  $\mu$ l DNA. Beide Ansätze wurden zusammen pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und die Kultur zweimal mit PBS gewaschen. Nun wurde das DNA-Lipofectamine®-Gemisch in die Mitte der Zellkultur gegeben und dann bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  kultiviert. Nach 5-6 h wurde das Gemisch abgesaugt, einmal mit Medium gewaschen und 4 ml

Medium dazugegeben. Im Falle der induzierbaren Genexpression wurden die Zellen am vierten Tag induziert. Hierbei wurde das Medium abgesaugt und 5 ml Medium sowie 5 µl Doxyzyklin dazugegeben. Bei der konstitutiven Transfektion wurden, auch am vierten Tag, die Zellen aus der Kulturschale gelöst und mit 3 ml Medium resuspendiert. Im zweiten Schritt wurden jeweils 1 ml der gelösten Zellen in 9 ml Medium (Medium + 50 µl G418 mit einer Konzentration von 200 mg/ml) gelöst und auf drei 10 cm Schalen verteilt. Im weiteren Verlauf wurde das Selektionsmedium alle 3 Tage solange gewechselt bis in den Schalen der Negativkontrolle (ohne DNA) keine lebenden Zellen mehr nachzuweisen waren. Auf den Transfektionsplatten konnte man sich mit Klonierungszyklindern aus den gebildeten Kolonien der transfizierten Zellen Klone picken. Dabei wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und auf jede zu pickende Kolonie ein autoklavierter Klonierungszylinder gesetzt. In diesen wurde 50 µl Trypsin gegeben und 3 min inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 50 µl Medium resuspendiert und vermischt mit 1 ml Medium in eine 24-well Platte gegeben. Die Zellen wurden bis zum Einfrieren hochgezüchtet.

Im Falle der Transfektion des induzierbaren Plasmids tetlacZ, unter Verwendung des Vektors N2-AP mittels des Transfektions-Kits Fugene®, wurde zu Beginn in ein 10 ml Tube 100 µl serumfreies Medium gegeben. Hinzu kamen 12 µl Fugene®. Beide Komponenten wurden vorsichtig vermischt. Als nächstes wurden 4 µl DNA hinzugegeben und erneut vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 min bei Raumtemperatur wurde der Fugene®-Ansatz gleichmäßig auf ca. 250.000 Zellen, kultiviert in einer 60 mm Platte, verteilt. Nach 6-8 h Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das serumfreie Medium durch Komplettmedium ersetzt und die Zellen im Verlauf normal weiter kultiviert.

## **2.7. Färbung mit dem Chromogen X-Gal**

36 Stunden nach der Transfektion oder Transduktion der Chondrozyten wurden ca. 300.000 auf 60 mm Schalen ausgesäte Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer Fixierlösung (471 ml PBS + 27 ml 37 %iges Formaldehyd + 2 ml 50 %iges Glutaraldehyd) für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie erneut zweimal mit PBS gewaschen und mit der X-Gal-Färbelösung (0,044 M HEPES, pH 7,4, 15 mM NaCl, 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,625 mg/ml X-Gal in 100 % DMSO, 3 mM K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>), 3 mM K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>), alles gelöst in dest. Wasser, für 10 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> angefärbt. Im Lichtmikroskop konnte die Transfereffizienz dann kontrolliert werden. Gelagert wurden die fixierten Zellen lichtgeschützt bei +4 °C und konnten jederzeit wieder im Lichtmikroskop begutachtet werden.

## **2.8. Nachweis der Effizienz mittels FACS-Vantage**

Um die Effizienz der Infektion quantitativ genau nachweisen zu können, verwendeten wir die FACS-(fluorescens-activated cell sorter) Analyse, eine automatisierte Durchführung der Immunzytometrie im Durchflussverfahren. Sowohl die EGFP- als auch die lacZ-Effizienz kann damit nachgewiesen werden. Ca. 300.000 Zellen wurden mittels Trypsin aus der Kulturschale gelöst und im Falle des EGFP-Nachweises lediglich mit 2 ml sog. FACS-Puffer (50 ml PBS + ca. 2 % FCS) in ein FACS-Reagenzglas gebracht und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Auch bei dem lacZ-Nachweis wurden ca. 300.000 Zellen verwendet. Diese jedoch wurden erst in 100 µl FACS-Puffer gelöst und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Zuvor wurde die FACS-Lösung vorbereitet: Das bei -20 °C gelagerte fluorescein-β-D galactopyranosid (FDG), Bestandteil des Fluo Reporter lacZ Flow Cytometry Kit, wurde zu Beginn im Wasserbad bei 37 °C 10 min erwärmt. Die Verdünnung hierbei betrug 1:10 mit destilliertem Wasser. Dann wurden 100 µl FACS-Lösung zu den lacZ-markierten Zellen, gelöst in 100 µl FACS-Puffer, gegeben, kurz mittels Vortex durchmischt und darauf für 1 min bei 37 °C im Wasserbad lichtgeschützt inkubiert. Die Zwischenlagerung bis zur Analyse erfolgte auch hier lichtgeschützt auf Eis. Das gleiche Prozedere wurde mit nicht-infizierten Zellen als Negativ-Kontrolle durchgeführt.

Zur Verwendung des FACS-Vantage wird auf das FACS-Vantage Reference Manual (Februar 1997) verwiesen.

## **2.9. ELISA**

Die Menge an BMP-2 in vitro wurde aus dem Medium-Überstand der Zellkultur mittels eines BMP-2 Immunoassay-ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) gemessen. Dieser Assay verfolgt eine quantitative Sandwich Enzym Immunoassay Technik (Abe et al., 1989: 223). Am ersten Tag der Vorbereitungen auf den eigentlichen Meßvorgang wurden ca. 250.000 Zellen auf ein 25 cm<sup>2</sup>-Flask gebracht und unter üblichen Bedingungen weiter kultiviert. Am zweiten Tag wurde zu einer bestimmten Uhrzeit das Medium abgesaugt und 5 ml Medium dazugegeben. Am dritten Tag, genau 24 h später, wurden die 5 ml Medium in ein 10 ml-Tube gegeben und 10 min bei 10 °C und 3000 U/min zentrifugiert. Aus dem zentrifugierten Überstand wurden 2 ml Medium auf 4 Kryo-Röhrchen verteilt und umgehend bei -80 °C tiefgefroren oder alternativ gleich gemessen. Es wurden jeweils eine infizierte und eine nicht-infizierte Zelllinie zur Bearbeitung herangezogen. Bei der Messung wurden in eine 96 well Polystyrene Mikroplatte, die mit monoklonalen Antikörpern gegen BMP-2 ausgekleidet war, der zuvor gewonnene Überstand

gegeben. Das in dem Überstand enthaltene BMP-2 band sich an diese immobilisierten Antikörper und blieb bei Auswaschung des well in der Platte. Im nächsten Schritt wurden enzymgebundene monoklonale Antikörper auf die Platte gegeben. Wieder wurde das 96 well gewaschen und im entscheidenden Schritt eine Substrat-Lösung zugegeben, worauf sich das Gemisch proportional zu der Menge an enthaltenem BMP-2 anfärbte. Mittels eines Cytometers ließ sich der genaue Anteil an BMP-2 quantifizieren.

## **2.10. Messung der alkalischen Phosphatase**

Die alkalische Phosphatase wurde aus dem Zell-Lysat der Zellkultur gemessen. Aus einer bestimmten Zellzahl, in der Regel 250.000 Zellen, wurden nach einmaligem Waschen mit PBS mit einem Cell-scraper die Zellen vorsichtig vom Monolayer gelöst und in ein 10 ml tube gegeben. Nach Zentrifugation bei 1500 U/min für 5 min und 10 °C wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit einem Lyse-Puffer resuspendiert und im Vortex vermischt. Anschließend wurde die Probe bei –20 °C konserviert und stand für die Messung der alkalischen Phosphatase bereit. Die Messung erfolgte am Institut für klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar, München. Es wurden jeweils eine infizierte und eine nicht-infizierte Zelllinie zur Bearbeitung herangezogen.

## **2.11. Histologien**

Zwei verschiedene Zellzustände wurden histologisch kontrolliert. Einmal die Femurkondylen der geopferten Kaninchen, sowie die besiedelten Matrices. Beide Proben wurden vor der eigentlichen histologischen Bearbeitung mindestens 72 h in 6 %igem Formaldehyd gelagert. Im Falle der Matrices wurden diese nach Einbettung in Paraffin mit dem Mikrotom in 7 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger gebracht und entweder mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-, Alcianblau- oder Elastica-van-Gieson-Färbung angefärbt. Im Falle der Femurkondylen wurden diese für ca. 6 Wochen in einer 10 %igen EDTA-Lösung entkalkt. Anschließend, ebenfalls nach Einbettung in Paraffin, mit dem Mikrotom in 7 µm oder 9 µm dicke Scheiben geschnitten, auf einen Objektträger gebracht und für ca. 12 h getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Histologien entparaffiniert und wiederum für einige Stunden getrocknet. Abschließend wurde die jeweilige histologische Anfärbung durchgeführt.

## **2.12. Histomorphologische Kontrolle**

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen aufgrund ihrer Morphologie, ihres Differenzierungsgrades, ihrer Vitalität und ihren funktionellen Eigenschaften am Institut für Pathologie und pathologische Anatomie des Klinikums rechts der Isar, München untersucht und begutachtet.

## **2.13. Proliferationsraten-Untersuchungen**

In Langzeit-Untersuchungen wurden alle zwei Wochen zu gleichen Zeitpunkten 200.000 Zellen auf ein 75 cm<sup>2</sup>-Flask gebracht. Hierbei wurden exemplarisch einige der in den Versuchen angewandten Populationen untersucht. Eine Woche nach Aussat wurde die Zellzahl erneut bestimmt und erlaubte Beurteilungen über das Proliferationsverhalten der einzelnen Populationen, sowie der Zelllinien untereinander.

## 2.14. Verwendete Materialien

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
allbuffer	Sigma, München
Collagenase A	Roche, Mannheim
D-MEM	Biochrom, Berlin
EDTA	Sigma, München
ELISA-Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
FCS	PAN Biotech, Frankfurt/Main
FDG (Fluo Reporter lacZ Cytometry Kit)	Molecular Probes, Leiden, Holland
Formaldehyd	Sigma, München
Fugene®	Roche, Mannheim
HCl	Merck, Darmstadt
Lipofectamine®	Invitrogen, Carlsbad, USA
Magnesium	Merck, Darmstadt
PBS	Biochrom, Berlin
Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin)	Sigma, München
Resorba®-Kollagen	Resorba Clinicare, Nürnberg
Tachotop®-Kollagen	Nycomed, Unterschleißheim
Trypsin	Biochrom, Berlin
Verigen®-Kollagen	Verigen, Leverkusen
X-Gal	Boehringer, Mannheim
Zellkulturmaterial	Josef Peske, Aindling

### **3. Ergebnisse**

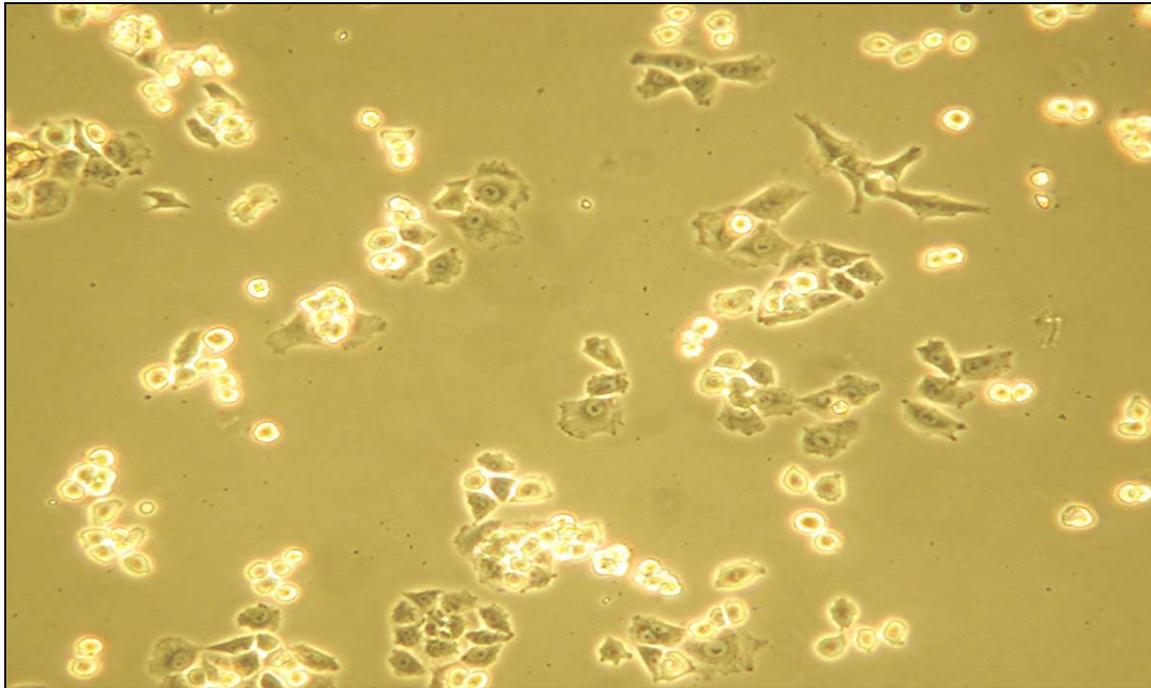
#### **3.1. Knorpelzell-Isolierung**

Die von der Gelenkfläche des distalen Femurs gewonnenen Chondrozyten konnten erfolgreich aus ihrer Matrix isoliert und in eine zweidimensionale Kultur gebracht werden. In dieser Form ließen sich die Zellen in Einzelfällen bis Passage 20 in vitro kultivieren. Ebenso ließen sich auf eine dreidimensionale Matrix besiedelte Chondrozyten über Monate in vitro in Kultur halten.

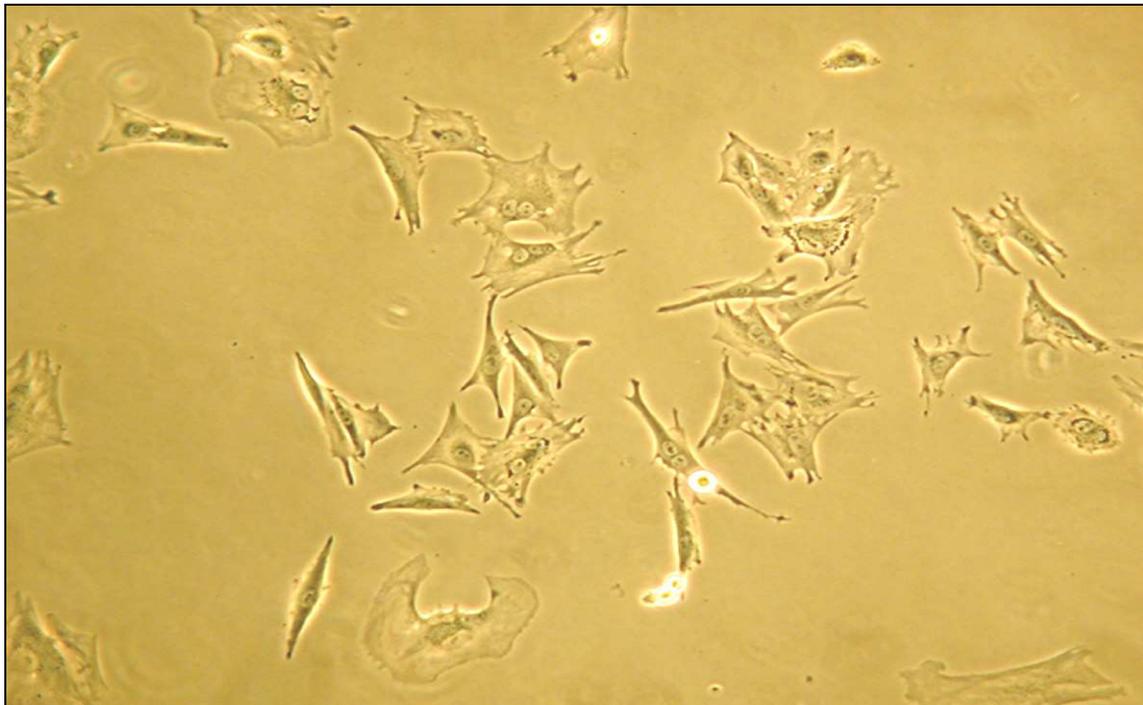
#### **3.2. Zellkultur**

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich Chondrozyten über einen monatelangen Zeitraum ohne Veränderung der Proliferationsrate in einer zweidimensionalen Kultur halten ließen. Auch nach retroviraler Infektion oder nichtviraler Transfektion konnte keine Änderung des Wachstumsverhaltens oder der Morphologie in der Zellkultur beobachtet werden. In den ersten Tagen nach der Isolierung stellten sich die Knorpelzellen in der zweidimensionalen Kultur im adhärenen Zustand an die Zellkulturflasche in vitro rund konfiguriert und ohne Zellausläufer dar (Abb. 7A). Nach drei bis fünf Tagen hypertrophierten die Zellen im Prozess der Dedifferenzierung fibroblastenartig und bildeten Zellausläufer (Abb. 7B). Die morphologischen Veränderungen waren nach ca. zwei Wochen abgeschlossen und die Zellen blieben von diesem Zeitpunkt an im gleichen Differenzierungszustand. Die Proliferationsrate blieb unverändert. In dieser dedifferenzierten Form ließen sich die Zellen je nach Individualität der Zelllinie bei einer Splittingrate von in der Regel 1:3 einmal pro Woche für zwei bis fünf Monate kultivieren. Bevor die Zellen nach längerer Zeit in Kultur aufhörten sich zu teilen, wiesen sie erneut eine morphologische Veränderung auf. In diesem Prozess nahmen die Zellen um das zwei- bis dreifache an Größe zu um dann im folgenden die Mitoserate vollständig einzustellen und zu Grunde zu gehen (Abb. 7C).

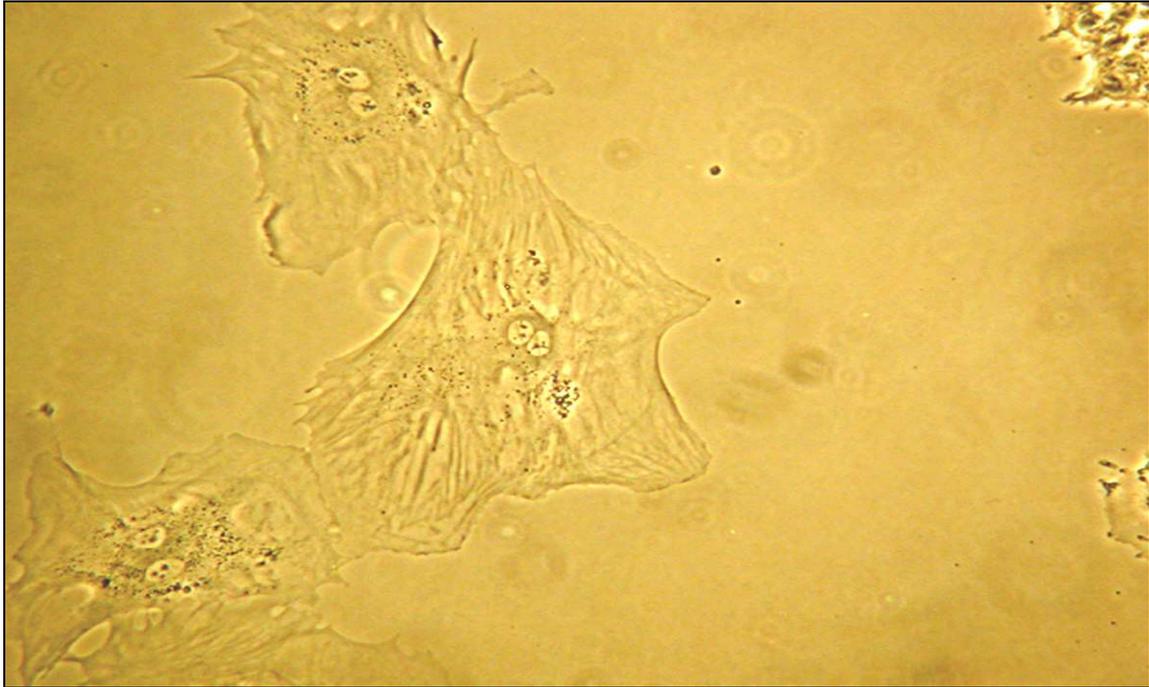
**Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen adulter Chondrozyten in Monolayer-Kultur**



**A** Lichtmikroskopische Aufnahme adulter Chondrozyten in zweidimensionaler Zellkultur nach Isolierung aus dem Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens. Zustand drei Tage nach Isolierung. Phänotypisch Knorpelzellen. Klein, rund und keine Zellausläufer. Vergrößerung 100fach



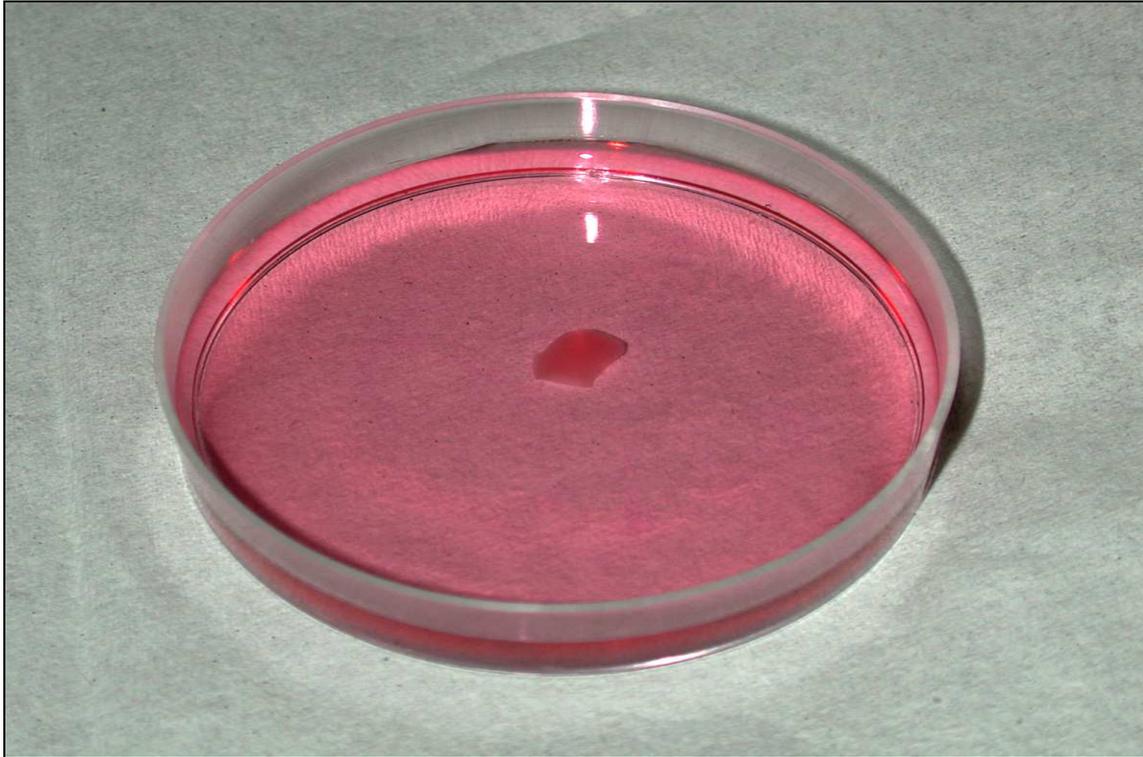
**B** Lichtmikroskopische Aufnahme adulter Chondrozyten eine Woche nach Isolierung. Erste Zeichen der Dedifferenzierung. Vergrößerung 100fach



C Lichtmikroskopische Aufnahme adulter Chondrozyten vier Monate nach Isolierung. Dargestellte Zellen weisen sehr wenige bis keine Mitoseraten mehr auf. Sie zeigen eine hypertrophe und völlig dedifferenzierte Morphologie. Vergrößerung 100fach

### 3.3. Tissue Engineering

Die im folgenden besprochenen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, Chondrozyten auf einem dreidimensionalen Trägermaterial zu kultivieren (Abb. 8). In diesem Zustand konnten die Zellen über einen monatelangen Zeitraum in Kultur gehalten werden. Dort waren sie in der Lage sich zu integrieren und eine milde Matrixproduktion zu etablieren. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Gerüst wurde erreicht. Durch das Aufbringen auf eine solche Matrix verfolgten wir in unseren Versuchen das Ziel, die Chondrozyten über einen längeren Zeitraum differenziert in Kultur zu halten, wie es Benya und Mitarbeiter (1982: 215) oder Cao und Mitarbeiter (1998: 475) zuvor schon bewiesen hatten. Durch eine Verhinderung des Prozesses der Dedifferenzierung sollten so die Chondrozyten in guter funktioneller Verfassung der Transplantation zur Verfügung stehen. Während Chondrozyten in zweidimensionaler Monolayer-Kultur zur Proliferation in der Lage sind, war dies unter den Bedingungen der dreidimensionalen Kultivierung nicht mehr möglich.



**Abbildung 8:** Aufnahme des dreidimensionalen Trägermaterials Resorba®, das mit adulten Chondrozyten besiedelt wurde, welche aus dem Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens isoliert wurden. In dieser Form wurde das Knorpelzell-Matrix-Konstrukt in das Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens implantiert.

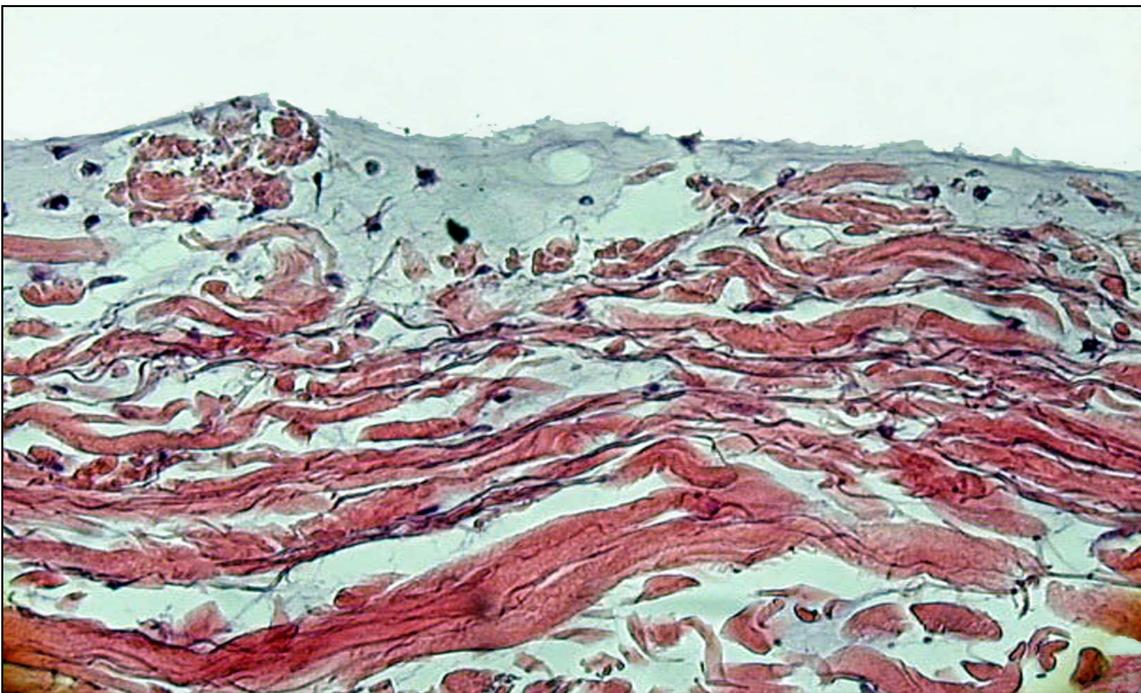
### 3.3.1. Besiedelung der Chondrozyten auf die Matrices Verigen®, Tachotop® und Resorba®

Chondrozyten ließen sich *in vitro* gut auf die Kollagenmatrix Verigen® besiedeln und zeigten lichtmikroskopisch eine Integration und eine Verteilung in diese. Auf Grund des Aufbaus der Matrix, die nur eine Besiedelung in den oberen Bereichen erlaubte, weil in den tieferen Schichten ein unbesiedelbares Kollagennetzwerk mögliche Implantation verbessern soll, stellte sich die Zahl der besiedelten Zellen als sehr gering dar (Abb. 9). Besonders für eine eventuelle Implantation ist diese Zahl deutlich zu klein. Dieses Trägermaterial wurde lediglich für *in vitro* Versuche mit unbehandelten Chondrozyten herangezogen.

Chondrozyten ließen sich *in vitro* ebenfalls gut auf die Kollagenmatrix Tachotop® besiedeln und zeigten lichtmikroskopisch eine Integration und eine Verteilung in diese (Abb. 10). Die Zahl der besiedelten Zellen stellte sich jedoch auch bei dieser Substanz als nicht ausreichend dar. Besonders weil diese Matrix eine zu geringe Porendichte aufweist, zeigt sie so keine Möglichkeit einer Besiedelung höherer Zellzahlen.

Dieses Trägermaterial wurde lediglich für in vitro Versuche mit unbehandelten Chondrozyten herangezogen.

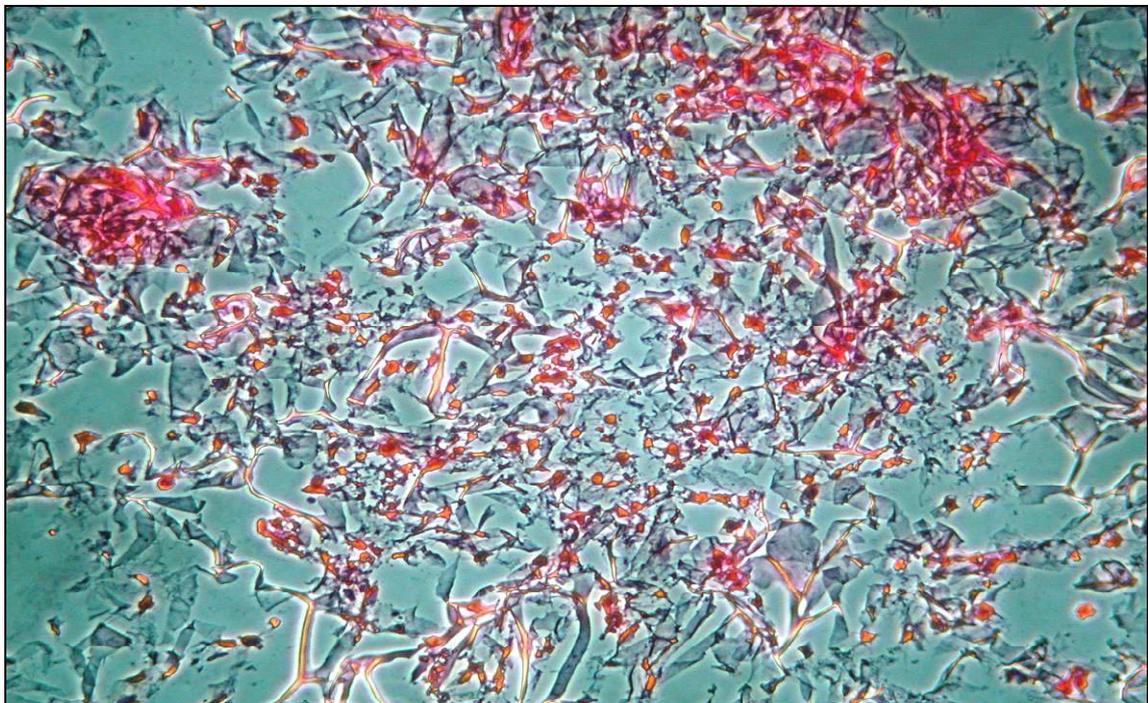
Die besten Ergebnisse bei der Kollagen-Matrix-Besiedelung mit Chondrozyten in vitro zeigte die Verwendung des Trägermaterials Resorba®. Neben einer einfacheren und effektiveren Besiedelung zeigten die Zellen hier auf Grund der optimalen Materialeigenschaften und einer höheren Faserdichte die beste Integration (Abb. 11). Bereits in vitro konnte eine leichte Matrixproduktion der Chondrozyten erkannt werden. Zudem konnten in diesem Fall auch höhere Zellzahlen, welche eine optimale Integration und Funktionalität des Konstruktes in vivo garantieren, injiziert werden. Besonders die gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb dieser Matrix weist auf gute Eigenschaften für eine Implantation hin. Auf die Resorba®-Matrix wurden unbehandelte und retroviral transduzierte (lacZ, BMP-2) Chondrozyten gebracht. Beide Gruppen zeigten auf dem Träger gleiche Eigenschaften. Die mit dem Markergen lacZ infizierten Zellen in der dreidimensionalen Kultur ließen sich mit gleichen Ergebnissen, wie die in zweidimensionaler Kultur gefärbte Zellen, anfärben. Die Genexpression wurde standardisiert über einen zweimonatigen Zeitraum regelmäßig verfolgt und zeigte unveränderte Stabilität.



**Abbildung 9:** Lichtmikroskopische Aufnahme adulter Chondrozyten, die nach Isolierung aus dem Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens auf dem dreidimensionalen Träger Verigen® kultiviert wurden. Es zeigt sich eine Woche nach Besiedelung lediglich in den oberen Schichten eine Verteilung und Integration der Zellen innerhalb des Trägers. Vergrößerung 40fach



**Abbildung 10:** Lichtmikroskopische Aufnahme adulter Chondrozyten, die nach Isolierung aus dem Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens auf dem dreidimensionalen Träger Tachotop® kultiviert wurden. Es zeigt sich innerhalb des Trägers eine Woche nach Besiedelung eine sehr geringe Zellzahl auf Grund der geringen Faserdichte. Vergrößerung 40fach



**Abbildung 11:** Lichtmikroskopische Aufnahme adulter Chondrozyten, die nach Isolierung aus dem Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens auf dem dreidimensionalen Träger Resorba® kultiviert wurden. Es zeigt sich eine Woche nach Besiedelung eine gleichmäßige Verteilung einer hohen Zellzahl, sowie eine sehr gute Integration der Zellen in das Trägermaterial. Eine leichte Matrixproduktion der Zellen ist erkennbar. Vergrößerung 40fach

### **3.4. Retroviraler und nichtviraler Gentransfer an Chondrozyten in vitro**

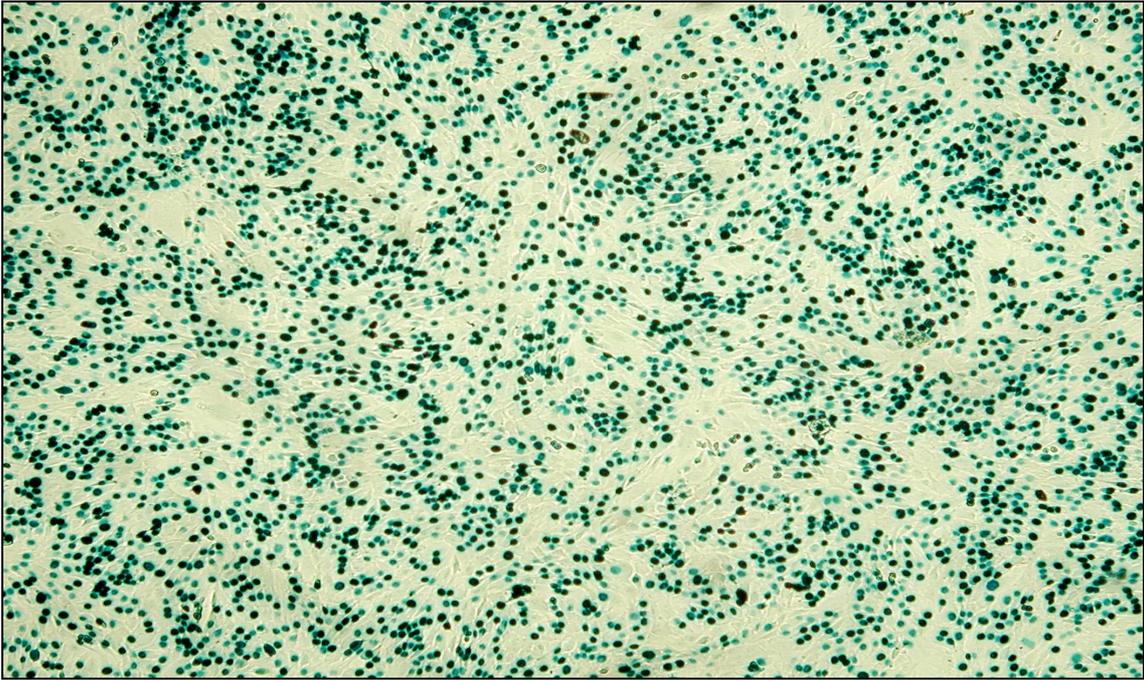
Die im folgenden besprochenen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, in vitro Reportergene sowohl mittels viraler als auch mittels nichtviraler Vektoren in Chondrozyten einzuschleusen und diese zu exprimieren. Die Expression in vitro konnte länger als drei Monate aufrechterhalten werden. Sowohl die Markergene lacZ und EGFP, als auch das für den Wachstumsfaktor BMP-2 codierende Gen wurden erfolgreich retroviral in Chondrozyten eingebracht und konnten nachweislich in vitro und in vivo exprimieren. Der in vivo Nachweis für EGFP wurde nicht erbracht. Auch nicht-virale Transfektionen mit dem Markergen lacZ durch liposomale Transfektion zeigte eine Funktionstüchtigkeit des Systems in vitro. Auch das induzierbare Plasmid tetlacZ wurde mittels FuGene® nichtviral integriert und zeigte eine Genexpression in vitro. Sämtliche hier beschriebene Gentransfer-Versuche wurden an primären Chondrozyten untersucht. Frisch isolierte Knorpelzellen wurden im Verlauf der Zellkultur als Chondrozyten-Population bzw. Zelllinie bezeichnet.

#### **3.4.1. Transfektionseffizienz nach liposomaler Transfektion mit dem Markergen lacZ in vitro**

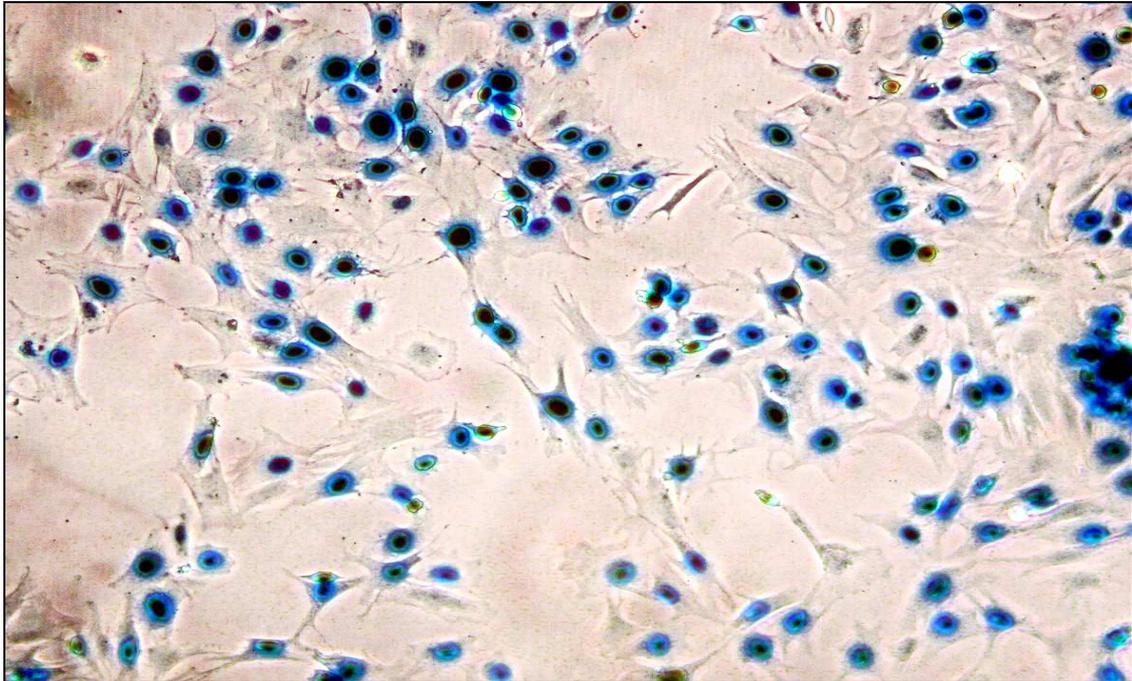
Bei der nichtviralen, liposomalen Transfektion mit Lipofectamine® zeigten sich Effizienzen von ca. 0,1 % in vitro. Der Nachweis wurde durch X-Gal-Färbung einmalig lichtmikroskopisch geliefert und im weiteren Verlauf nicht weiter untersucht. Bei der nichtviralen Transfektion mit FuGene® zeigten sich Effizienzen von 9 % in vitro. Auch hier wurde die Effizienz nur einmalig nach X-Gal-Färbung lichtmikroskopisch untersucht und nicht weiter verfolgt.

#### **3.4.2. Transduktionseffizienz nach retroviraler Infektion mit dem Markergen lacZ in vitro**

Bei den Versuchen zeigten sich bezüglich der Infektion mit dem Markergen lacZ, welches für das Protein  $\beta$ -Galactosidase exprimiert, primäre Transduktionseffizienzen von durchschnittlich 85 %. Die Spanne lag bei neun verschiedenen Zell-Populationen zwischen 63 % und 98 % erreichter Effizienzen (Abb. 13). In vitro wurde die Effizienz durch FACS-Analyse und durch Anfärbung mit dem Chromogen X-Gal nachgewiesen. Im Fall der X-Gal-Färbung ließ sich anhand der blau angefärbten Zellkerne lichtmikroskopisch abschätzen, wie hoch die Transduktionseffizienz war (Abb.12).



**A**



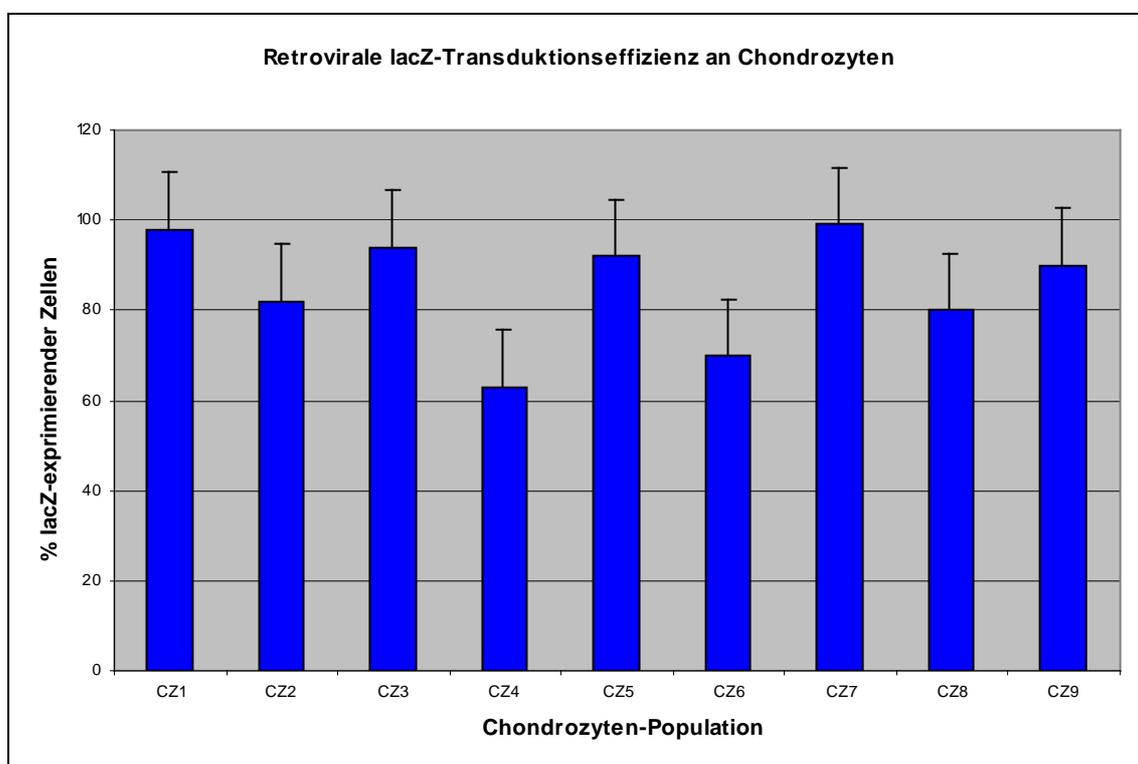
**B**

**Abbildung 12:** Lichtmikroskopische Aufnahmen adulter Chondrozyten, die nach Isolierung aus dem Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens retroviral mit dem Markergen lacZ transduziert wurden.

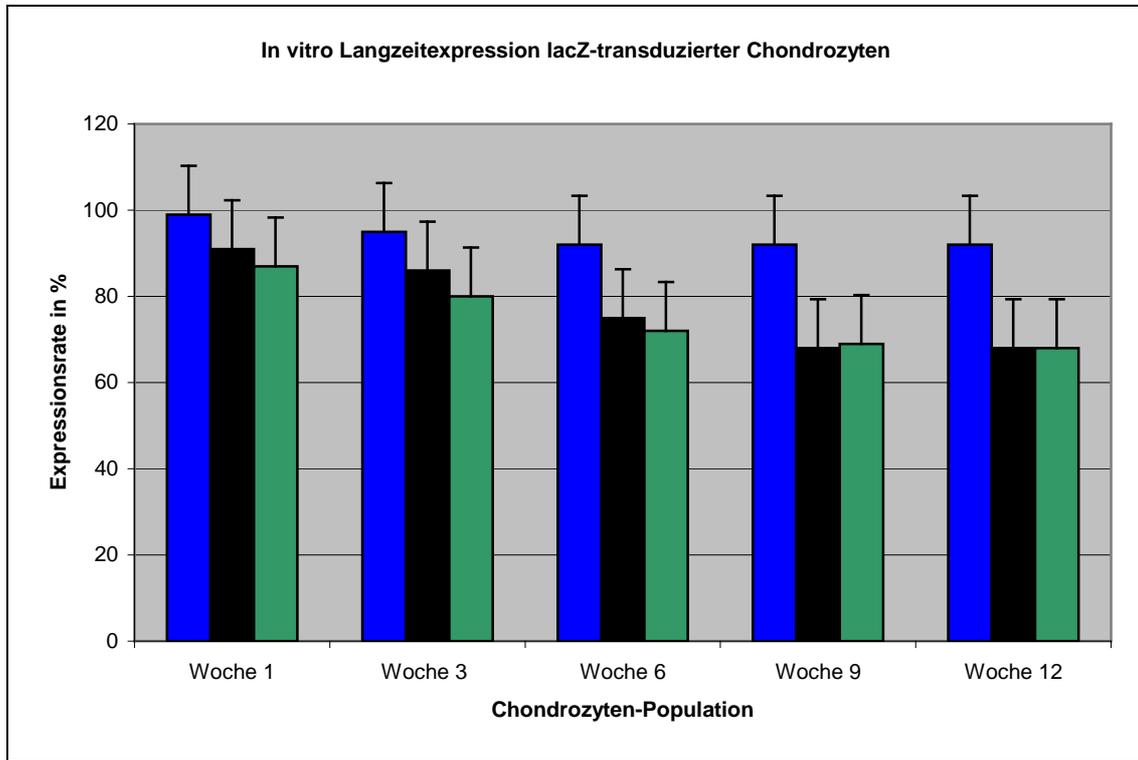
Die Zellen, die das lacZ-Gen exprimiert haben, zeigen eine positive, blaue Anfärbung nach Zugabe von X-Gal-Färbelösung. Bei der Aufnahme 72 h nach Infektion kann die Expression auf über 90 % geschätzt werden.

**A:** Vergrößerung 40fach **B:** Vergrößerung 100fach

Genauere Zahlen lieferte die FACS-Analyse. Zur Transduktion angewandte Titermengen zwischen 500.000 und 1000.000 IP/ml erwiesen sich als geeignet. Sowohl frisch isolierte, als auch schon länger in Kultur gehaltene Chondrozyten ließen sich ohne Unterschiede mit der gleichen Effizienz infizieren. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Transduktion wurde drei Tage nach Infektion eine X-Gal-Färbung durchgeführt. Als Langzeit-Verlaufskontrolle wurde die Stabilität durch FACS-Analyse und X-Gal-Färbung über einen dreimonatigen Zeitraum im Abstand von drei Wochen an festgelegten Zeitpunkten regelmäßig verfolgt (Abb. 14). Dabei stellte sich heraus, dass die Transgenexpression in keiner der drei untersuchten Populationen im Vergleich zu dem gewonnenen Wert aus der ersten Messung um mehr als 20 % abnahm. Eine Population wies in Woche 12 eine stabile Restexpression von über 90 % des Ausgangswertes auf. Die Proliferationsrate blieb auch drei Monate nach der Infektion unverändert.



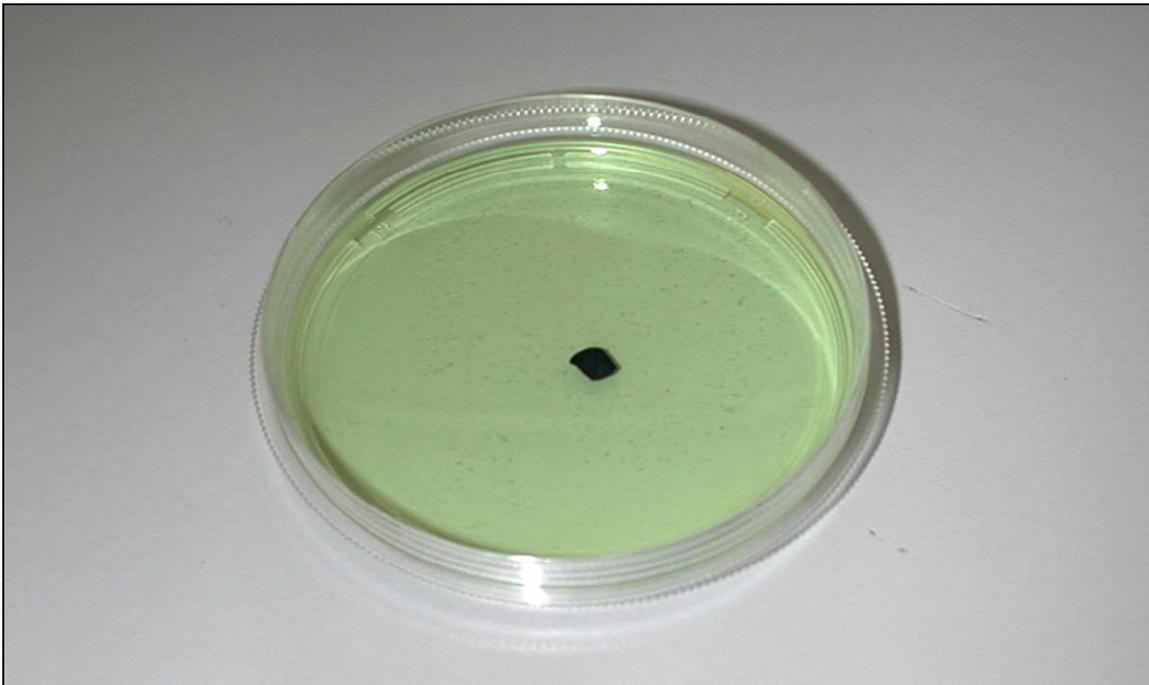
**Abbildung 13:** Darstellung retroviral erzielter lacZ-Transduktionseffizienzen an neun verschiedenen Chondrozyten-Populationen (Zelllinie) eine Woche nach Transduktion. Die durchschnittliche Transduktionseffizienz beträgt 85 %. Gezeigte Daten wurden per FACS-Analyse eine Woche nach Infektion je einmal pro Population ermittelt. Standardabweichung 13.



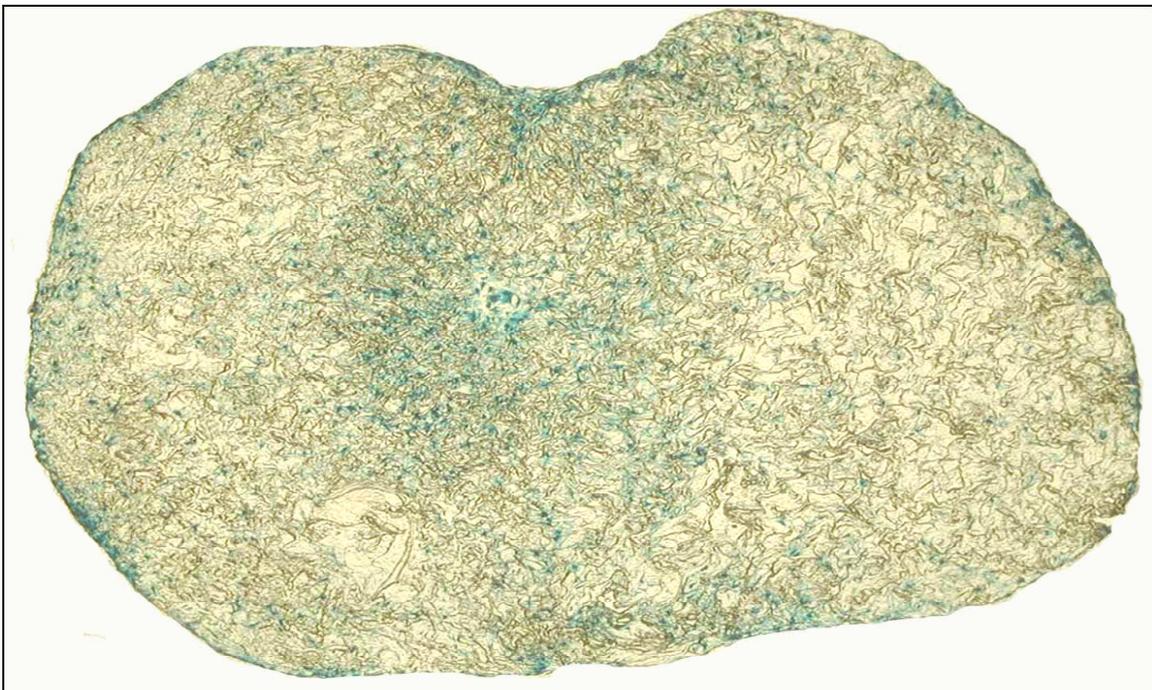
**Abbildung 14:** Darstellung der lacZ-Langzeitexpression von drei verschiedenen Chondrozyten-Populationen (Zelllinie) über einen beobachteten Zeitraum von 12 Wochen. Es zeigt sich eine stabile Expression des Transgens. Gezeigte Daten wurden per FACS-Analyse ermittelt. Standardabweichung 11.

Auch auf die dreidimensionale Trägersubstanz Resorba® besiedelte, für das Markergen lacZ exprimierende Chondrozyten, zeigten lichtmikroskopisch nach X-Gal-Färbung über einen Zeitraum von zwei Monaten eine unveränderte Genexpression (Abb. 15).

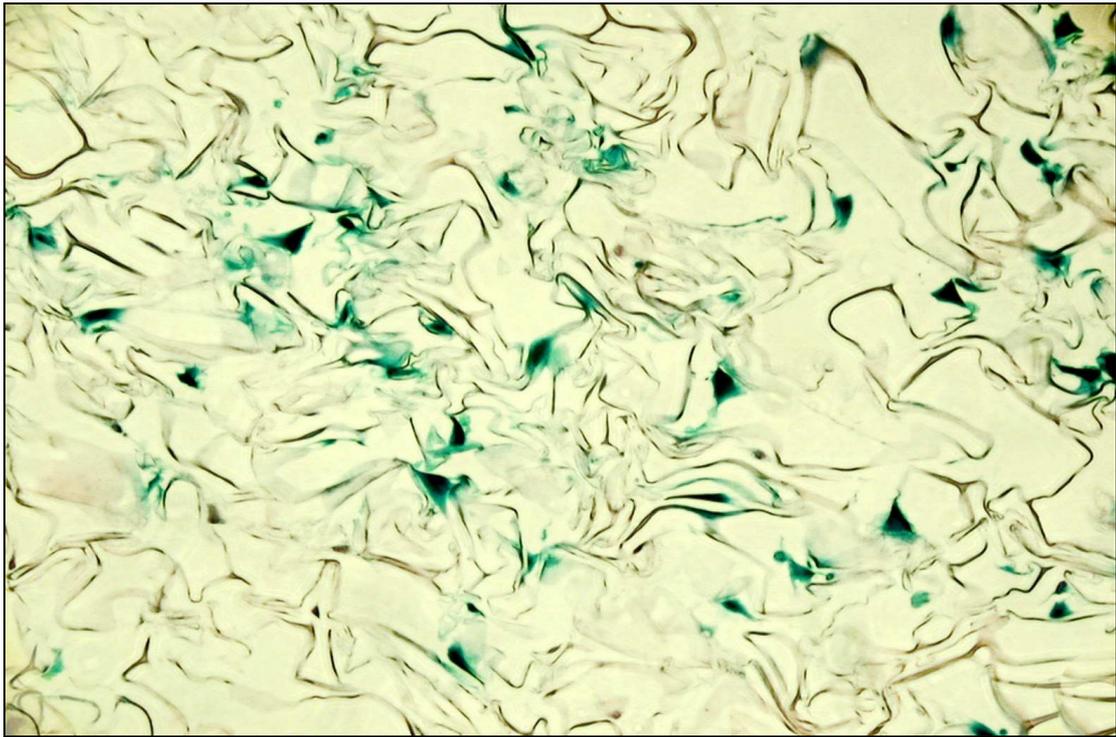
**Abbildung 15: Histologische Schnitte des makroskopisch gezeigten Kollagengerüsts**



- A** Aufnahme des dreidimensionalen Trägermaterials Resorba®, das mit adulten, lacZ-transduzierten Chondrozyten besiedelt wurde. Nach Zugabe des Chromogens X-Gal zeigt sich 14 Tage nach der Infektion und sieben Tage nach Besiedelung des Kollagens eine gleichmäßige Anfärbung der sich in dreidimensionaler Umgebung befindlichen Chondrozyten.



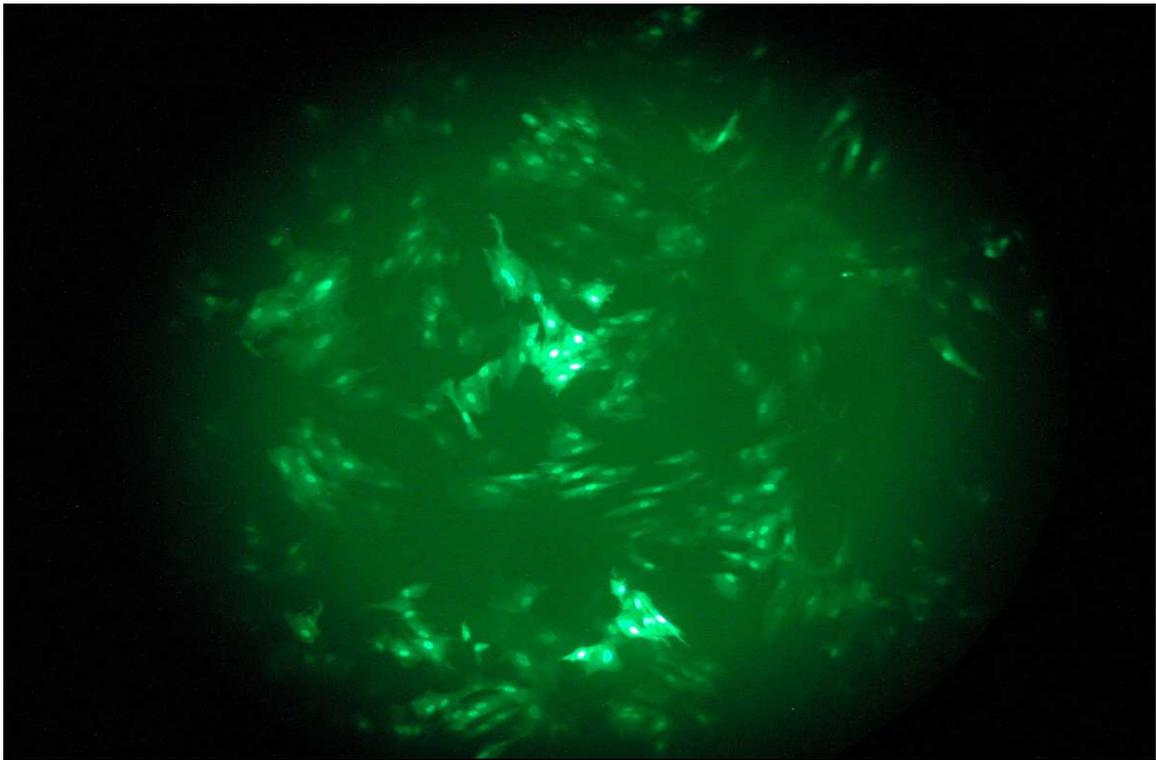
- B** In der lichtmikroskopischen Aufnahme des in A abgebildeten Gerüsts zeigt sich die gute Verteilung sowie hohe Expressionsrate der dreidimensional kultivierten Chondrozyten. Vergrößerung 10fach



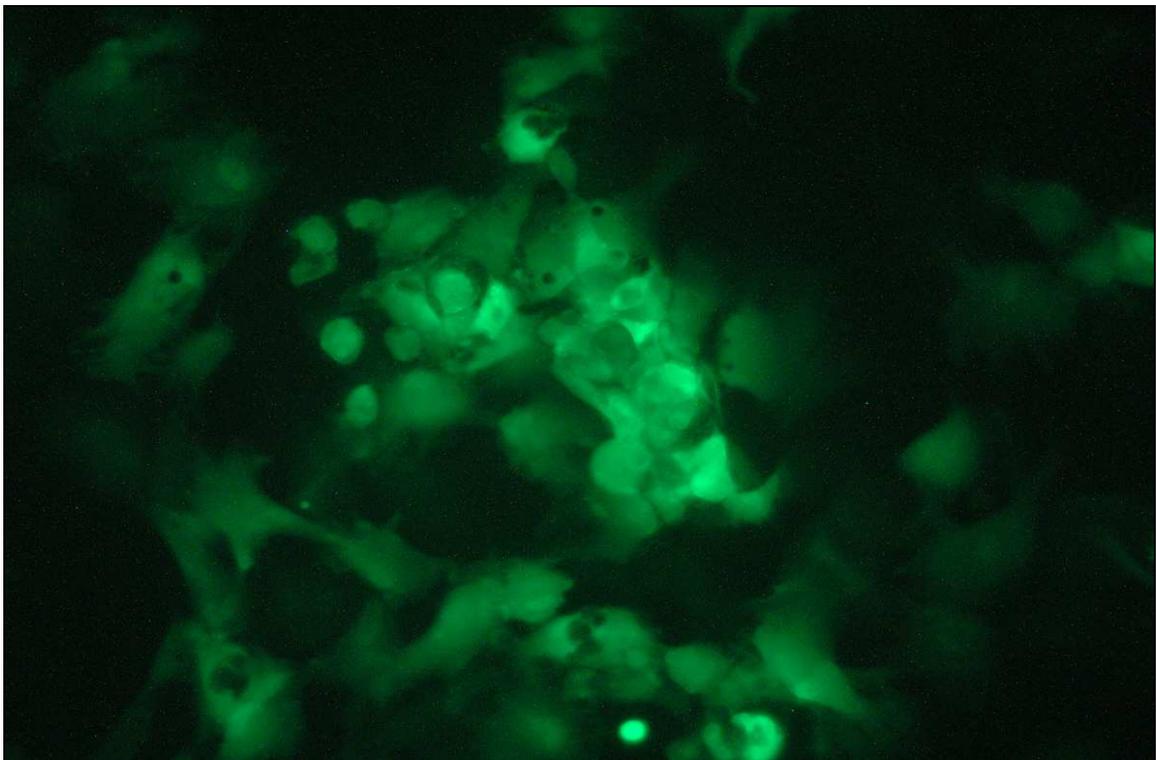
C In stärkerer Vergrößerung wird die gute Integration und Expression der in der Matrix kultivierten Chondrozyten deutlich. Zudem sind keine funktionellen oder morphologischen Änderungen aufzufinden.  
Vergrößerung 100fach

### 3.4.3. Transduktionseffizienz nach retroviraler Infektion mit dem Markergen EGFP in vitro

Bei der Transduktion mit dem Markergen EGFP zeigten sich Effizienzen von durchschnittlich 75 %, nachgewiesen durch optische Kontrolle mit dem Fluoreszenzmikroskop (Abb. 16) und mittels der FACS-Analyse. In dieser Versuchsgruppe fanden gleiche Titer wie bei der Infektion mit dem Markergen lacZ Anwendung. Auch in diesem Fall gab es keine Zeichen für Unterschiede bezüglich der Transduktionseffizienz zwischen frisch isolierten oder schon länger in Kultur gehaltenen Chondrozyten. Im Falle des EGFP blieb die Effizienz für zwei Monate stabil, jedoch verringerten die Zellen ihre Proliferationsrate bis schließlich nach ca. zehn Wochen keine Mitosen mehr nachweislich waren und die Kulturen zu Grunde gingen.



**A**



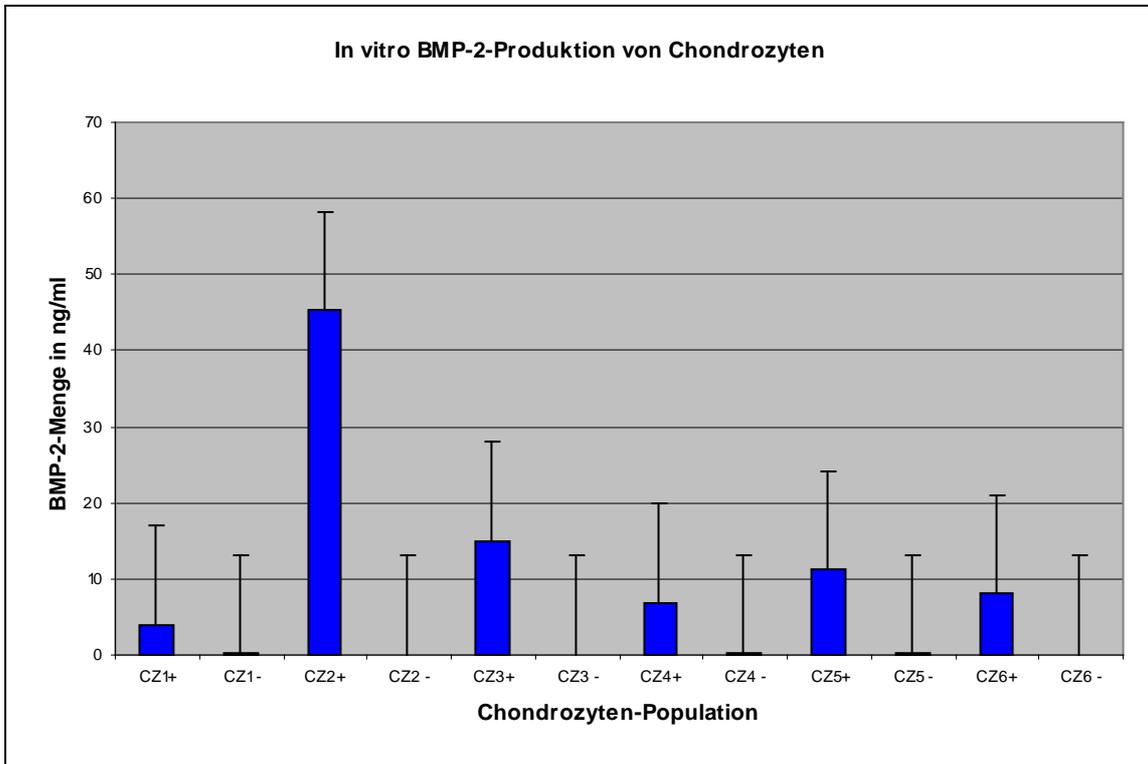
**B**

**Abbildung 16:** Lichtmikroskopische Aufnahmen adulter Chondrozyten, die nach Isolierung aus dem Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens retroviral mit dem Markergen EGFP transduziert wurden. 72 h nach Transduktion fluoreszieren Zellen, die das Gen exprimiert haben. Die Effizienz kann hier auf 75 % geschätzt werden. **A:** Vergrößerung 40fach **B:** Vergrößerung 100fach

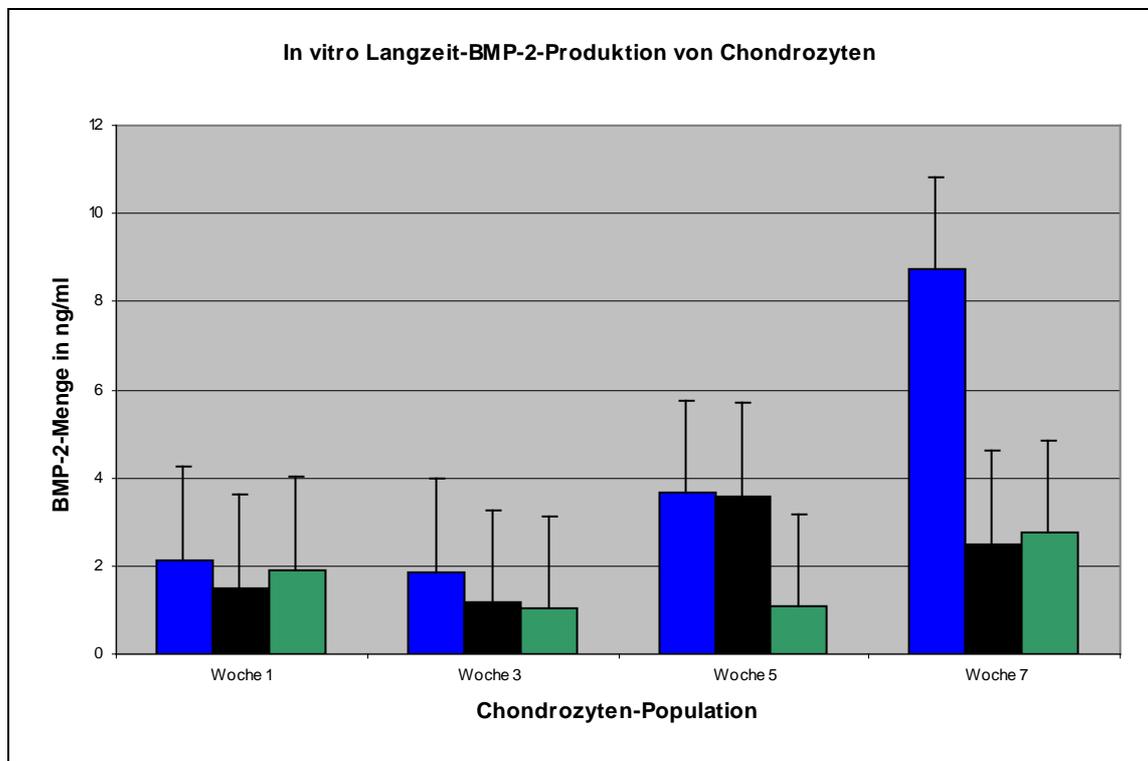
#### **3.4.4. BMP-2-Bildung nach retroviraler Infektion von Chondrozyten in vitro**

Chondrozyten, die das Zytokin BMP-2 exprimieren sollten, wurden ausschließlich retroviral transduziert. Es wurden gleiche Titer wie bei der Transduktion mit lacZ und EGFP angewandt. Nachweis für eine erfolgreiche Transduktion war die Produktion von BMP-2 in vitro, welche mittels des enzyme-linked immuno sorbent assay-Tests (ELISA) bestimmt wurde. Drei Tage nach der Transduktion wurde nach einem standardisierten Schema der Zellkulturüberstand abgenommen und daraus mittels ELISA die produzierte Menge an BMP-2 gemessen. Sechs infizierte Zelllinien, je 250.000 Zellen zur Messung ausgesät, produzierten in 24 h in vitro im Schnitt 15 ng/ml BMP-2 (Abb. 17A). Die interindividuelle Produktion an BMP-2 zwischen den einzelnen Zelllinien lag zwischen minimal 4 ng/ml und maximal 45 ng/ml BMP-2. In den angelegten Negativkontrollen konnte kein BMP-2 nachgewiesen werden. Ebenso wie bei dem Markergen lacZ, wurde auch hier über einen siebenwöchigen Zeitraum die Langzeit-Expression der Fremd-DNA an drei verschiedenen Chondrozyten-Populationen regelmäßig zu festgelegten Zeitpunkten überwacht. Die intraindividuelle Produktion an BMP-2 variierte im Verlauf des Langzeit-Versuchs teilweise um den Faktor vier. Jedoch waren alle drei Zelllinien in der Lage über den gesamten beobachteten Zeitraum BMP-2 zu produzieren (Abb. 17B).

Um die Produktion von BMP-2 auch an sich in dreidimensionaler Kultur befindlichen Chondrozyten über einen zweimonatigen Zeitraum zu prüfen, wurde nach genanntem Schema ein ELISA aus diesem Zellkulturmedium gemessen. Die so entstandenen Ergebnisse sind vergleichbar mit denen aus zweidimensionaler Zellkultur.



**Abbildung 17 A:** Darstellung der Produktion an BMP-2 von sechs verschiedenen Chondrozyten-Populationen (Zelllinien) eine Woche nach Transduktion. Gezeigte Ergebnisse wurden pro Population je einmal mittels ELISA bestimmt. Die Bezeichnung + steht für transduzierte Zellen. Die Bezeichnung – steht für nicht-transduzierte Zellen. Standardabweichung 13.



**Abbildung 17 B:** Darstellung der Langzeit-Produktion an BMP-2 von drei verschiedenen Chondrozyten-Populationen über einen Zeitraum von 7 Wochen. Zum Zeitpunkt der Messung wurde mittels ELISA pro Population ein Wert bestimmt. Standardabweichung 2.

Bei sämtlichen Nachweisen einer Effizienz, gleich welchem Gentransfer die Zellen unterlagen, wurden Negativkontrollen angesetzt. Im Falle der lacZ-markierten Zellen zeigte sich nach Anfärbung durch X-Gal in der Negativkontrolle lichtmikroskopisch keine blau gefärbte Zelle. In der FACS-Analyse ließen sich keine genexprimierenden Zellen nachweisen. Bei EGFP-markierten Zellen zeigten die Versuche gleiche Ergebnisse wie bei lacZ-markierten Zellen. Die Negativkontrollen der BMP-2-produzierenden Zelllinien zeigten im ELISA-Test keinen Nachweis von BMP-2.

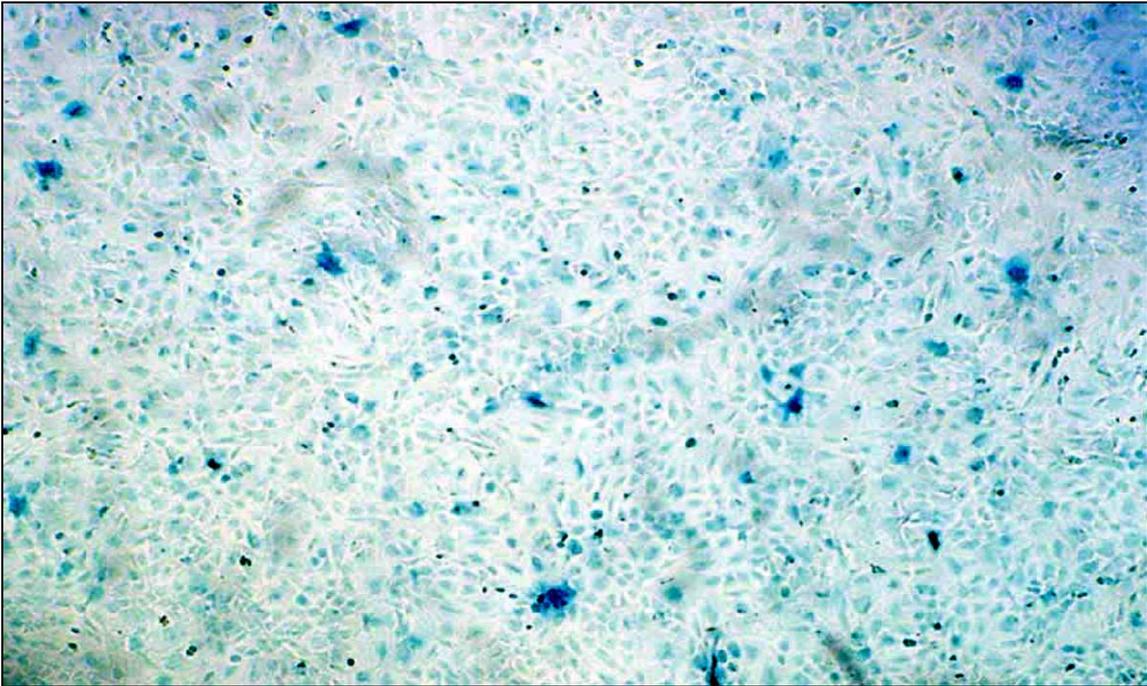
Sowohl retroviral transduzierte, als auch nichtviral transfizierte Chondrozyten zeigten im gesamten Verlauf der zweidimensionalen Zellkultur im Vergleich zu nicht genetisch veränderten Chondrozyten keine Unterschiede in Bezug auf Morphologie, Proliferationsrate oder funktionellen Eigenschaften, wie z.B. Adhärenz zur Zellkulturflasche. Auch die den Wachstumsfaktor BMP-2-produzierenden Chondrozyten zeigten lichtmikroskopisch in zweidimensionaler Kultur keinerlei Unterschiede im Vergleich zu nichtinfizierten Chondrozyten.

Lediglich mit dem Markergen EGFP transduzierte Chondrozyten wiesen nach fünf bis acht Wochen in Kultur keine Teilungsfähigkeit mehr auf.

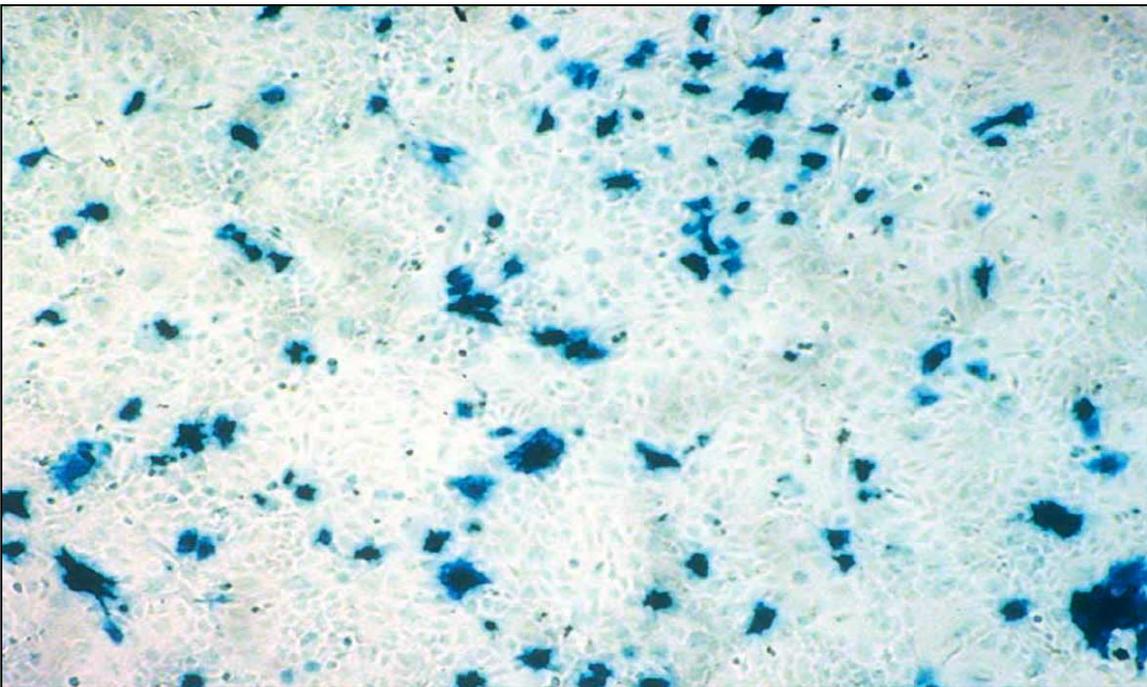
Auch in der dreidimensionalen Zellkultur zeigten sich keine Unterschiede in Bezug auf Morphologie oder Vitalität zwischen retroviral transduzierten, nicht-viral transfizierten oder nichtinfizierten Chondrozyten (Abb. 11 und 15C).

#### **3.4.5. Steuerbare Genexpression nach liposomaler Transfektion mit dem induzierbaren Plasmid tetlacZ in vitro**

Nach liposomaler Transfektion durch Fugene® mit dem induzierbaren Plasmid tetlacZ betrug die Expressionsrate in der Zellkultur im nicht-induzierten Zustand bei sehr schwacher X-Gal-Färbung der Zellkerne nach FACS-Analyse ca. 0,8 % in vitro (Abb. 18A). Angewandte Titer betragen 2-6 µg DNA pro Zellkulturplatte, das Verhältnis Fugene®:DNA betrug 3:1. 24 h nach Induktion durch 1 µg/ml Doxyzyklin zeigte sich eine höhere Expressionsrate von ca. 6,6 % der Zellen (Abb. 18B).



**A**



**B**

**Abbildung 18:** Lichtmikroskopische Aufnahmen adulter Chondrozyten, die nach Isolierung aus dem Kniegelenk eines New Zealand White Kaninchens nichtviral durch Fugene® mit dem induzierbaren Plasmid tetlacZ transfiziert wurden. Zellen, die das Gen exprimieren, stellen sich nach Markierung mit der Färbelösung X-Gal blau dar. In A Effizienz der Transfektion vor und in B 24 h nach Induktion mit 1 µg/ml Doxyzyklin. Sowohl die Zahl als auch die Intensität der Expression steigen nach Induktion deutlich.

**A und B:** Vergrößerung 40fach

### **3.5. Alkalische Phosphatase**

Zur Messung der alkalischen Phosphatase wurden einmalig sechs verschiedene Chondrozyten-Populationen herangezogen. Sowohl BMP-2 produzierende als auch zur Kontrolle nichtinfizierte Chondrozyten. Lediglich in einer aus sechs Proben der BMP-2-Gruppe ließ sich alkalische Phosphatase in Höhe von 305 U/l nachweisen.

### **3.6. In vivo Ergebnisse**

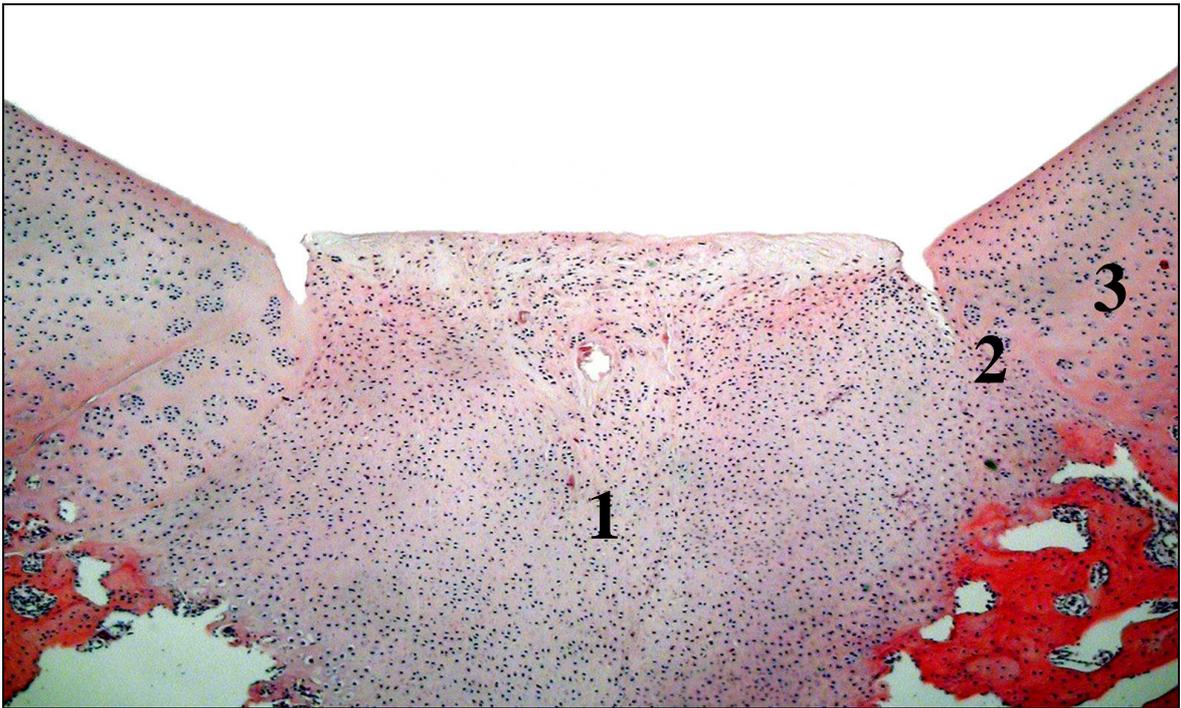
Die im folgenden besprochenen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, mit Fremd-DNA in vitro infizierte und transfizierte Chondrozyten auf eine dreidimensionale Matrix kultiviert, in vivo zu transplantieren und dort das Transgen zu exprimieren. Die Genexpression in vivo war drei Wochen nach Implantation noch immer nachweisbar.

Für die in vivo Versuche wurden Kaninchen der Rasse New Zealand White herangezogen. Die weiblichen Tiere vertrugen sowohl die Anästhesie als auch die Operation bei Biopsie und Implantation sehr gut. Einige Tage nach der Biopsie konnten sie sich in schmerzfreiem Zustand gut im Käfig bewegen. Auch im Zeitraum nach der Implantation zeigten die New Zealand White Kaninchen eine rasche Schmerzfreiheit, eine uneingeschränkte Beweglichkeit sowie einen guten Allgemeinzustand. Im Rahmen der Opferung zeigte das arthrotomierte Kniegelenk keine Zeichen von Entzündungen oder einschränkenden narbigen Prozessen.

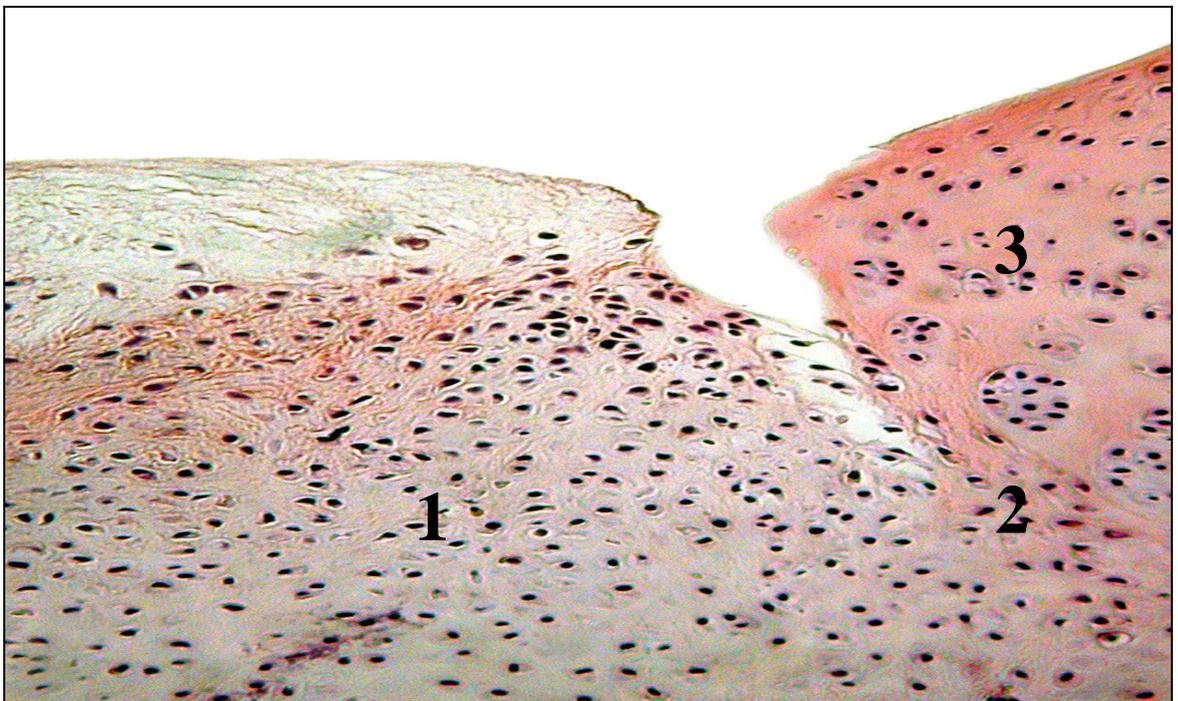
#### **3.6.1. Unbehandelte Defekte**

Unbehandelte, also leer gelassene, osteochondrale Defekte zeigten drei Wochen nach Defekt-Entstehung in der histologischen Aufbereitung eine Auffüllung dessen mit minderwertigem faserknorpelartigem Bindegewebe (Abb. 19A und B). Jedoch konnte ein Einsproßen von Chondrozyten in den Randbereichen und aus der Tiefe des Defektes nachgewiesen werden (19B). Kollagenfasern und Glykosaminoglykane ließen sich nur in geringen Mengen nachweisen (Abb. 19C und D).

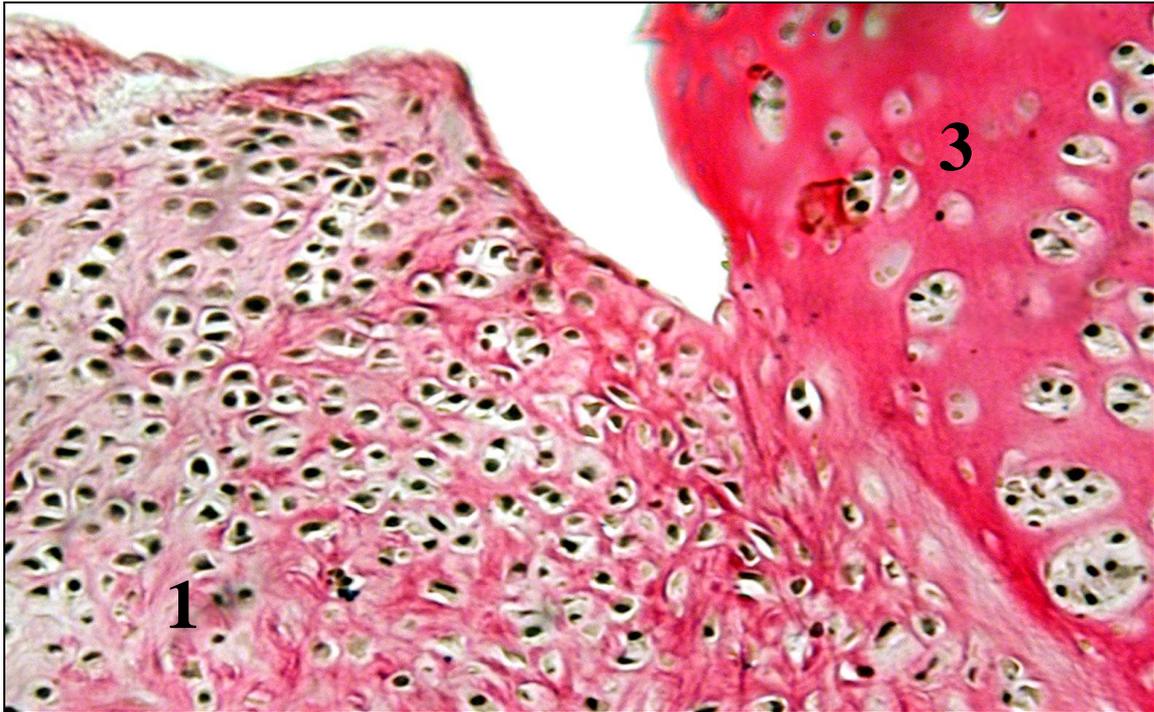
**Abbildung 19: Histologische Schnitte leer belassener osteochondraler Defekte**



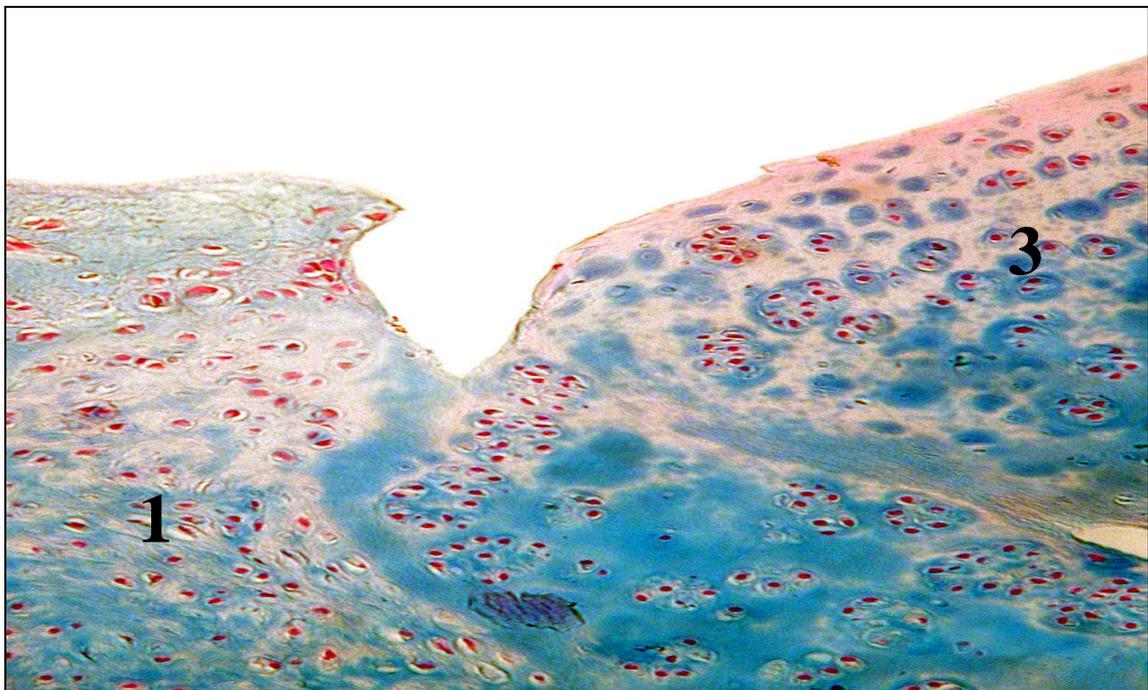
- A** Im lichtmikroskopischen Bild zeigt sich nach H.E.-Färbung besonders am Übergang (2) die Differenz von randständigem unversehrtem Knorpel (3) und im Defekt befindlichen faserknorpelartigem Bindegewebe (1). H.E., Vergrößerung 40fach



- B** In stärkerer Vergrößerung zeigt sich am Übergang (2) die Differenz von randständigem unversehrtem Knorpel (3) und im Defekt befindlichen faserknorpelartigem Bindegewebe (1). Am Übergang zum nativen Knorpel lässt sich ein Einsprießen von Chondrozyten erkennen (2). H.E., Vergrößerung 100fach



- C** Nach Elastica-van-Gieson-Färbung stellt sich Kollagen rot dar. Es zeigt sich im unversehrten Knorpel (3) rechts im Bild eine starke Rotfärbung auf Grund des hohen Kollagengehaltes. Im Bereich des Defektes (1) links im Bild gelingt ein nur sehr geringer Nachweis von Kollagen. EVG, Vergrößerung 100fach

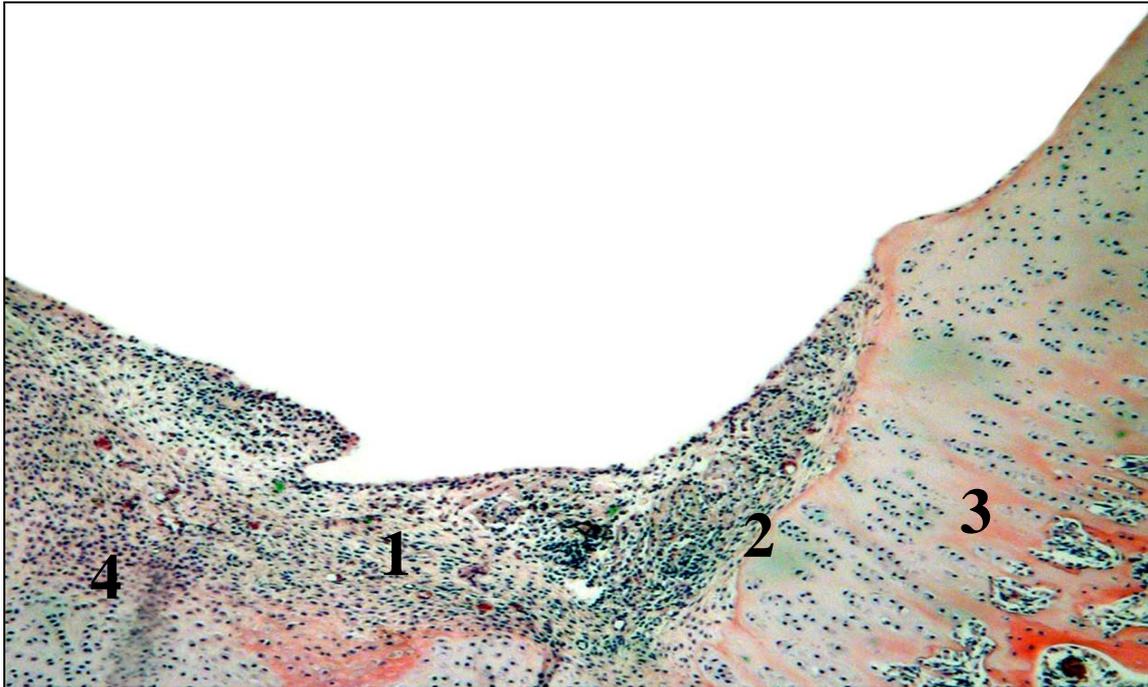


- D** Nach Alcianblau-Färbung stellen sich Glykosaminoglykane blau dar. Es zeigt sich im Gegensatz zum unversehrten Knorpel (3) rechts im Bild ein nur geringer Gehalt an Glykosaminoglykanen im Bereich des Defektes (1) links im Bild. ALC, Vergrößerung 100fach

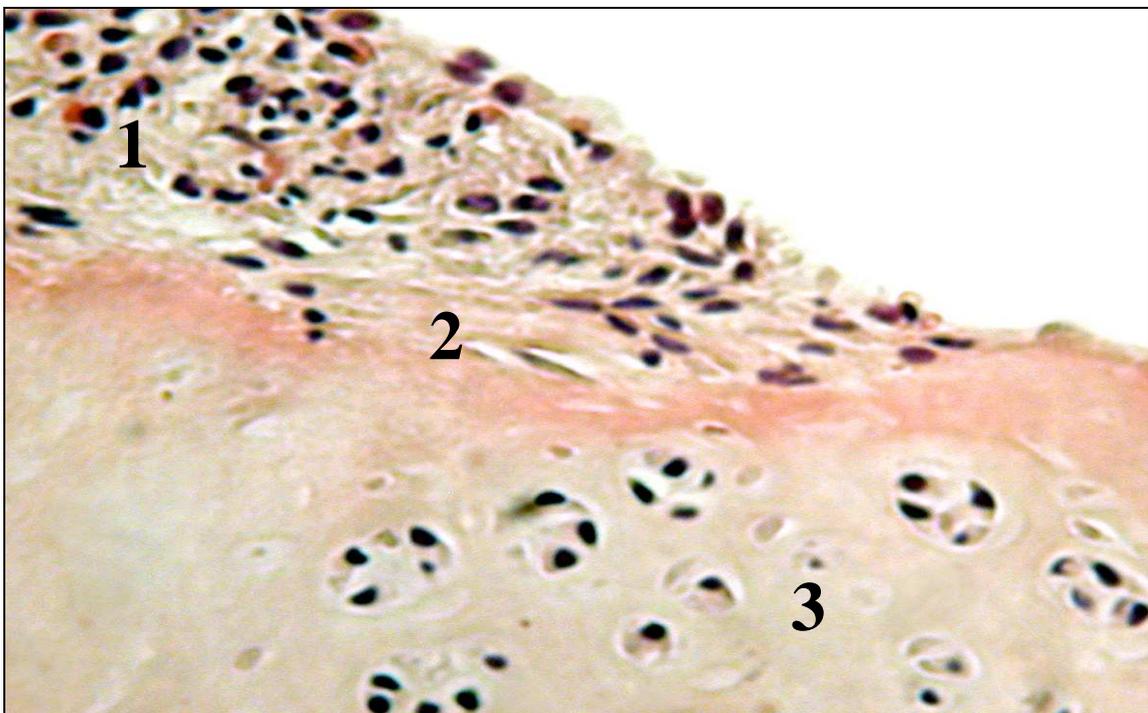
### **3.6.2. Implantierte unbesiedelte Resorba®-Trägerschwämme**

Die in die osteochondralen Defekte implantierte unbesiedelte Trägersubstanz Resorba® zeigte drei Wochen nach Implantation eine Integration in das umliegende Gewebe (Abb. 20A und B). Es konnte eine leichte Resorption des implantierten Konstruktes dokumentiert werden. Die im Defekt befindlichen Lymphozyten lassen auf eine stattgefundene immunologische Reaktion des Organismus auf das Fremdmaterial schließen (20A). Sowohl in den Randbereichen, als auch in der Tiefe des Defektes war ein Einsprießen von Chondrozyten in die Kollagen-Matrix nachweisbar (20D). Sowohl der Kollagen- als auch der Glykosaminoglykangehalt war im Bereich des Defektes niedrig (Abb. 20C und D).

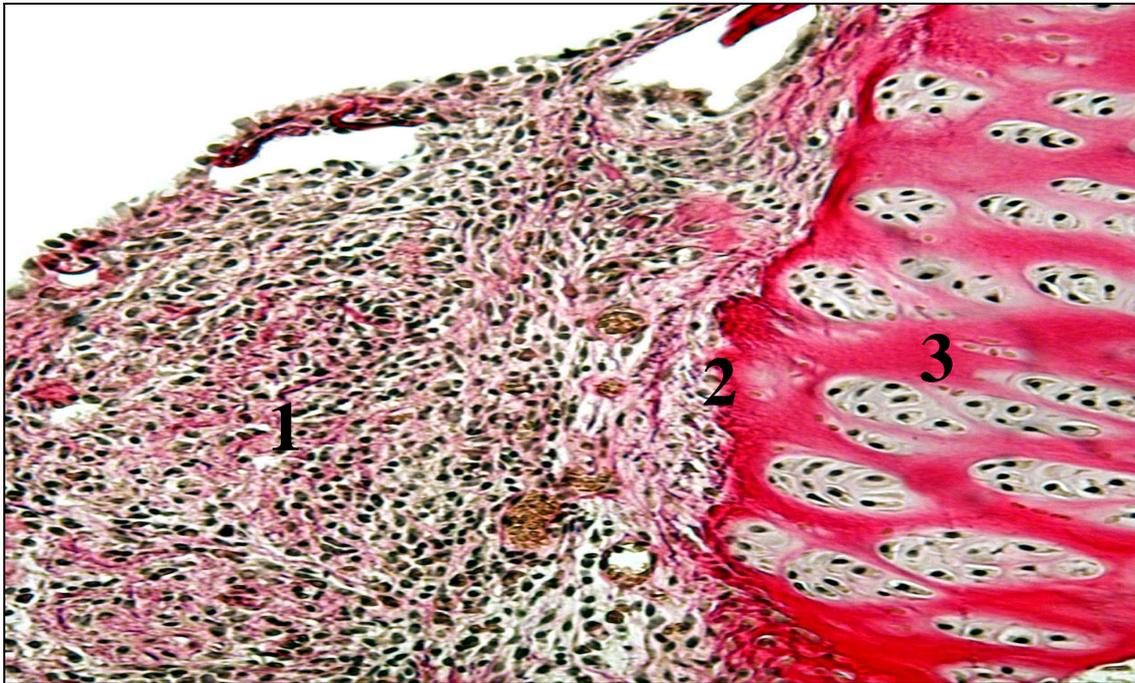
**Abbildung 20: Histologische Schnitte implantierter unbesiedelter Matrices**



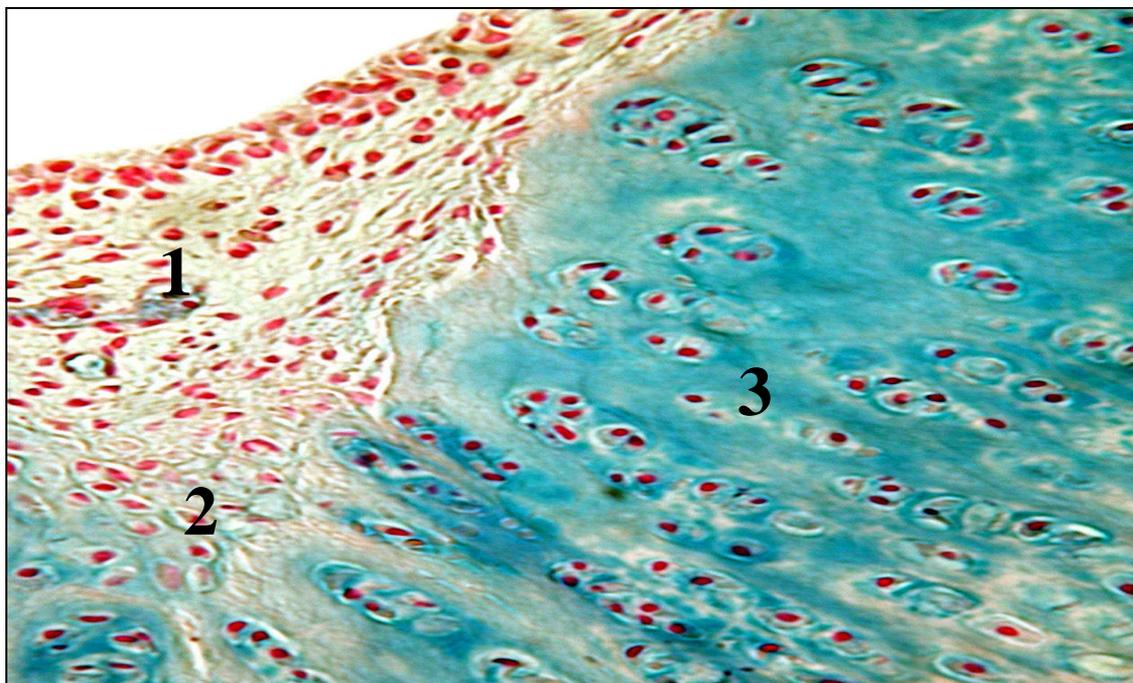
- A** Im lichtmikroskopischen Bild zeigt sich nach H.E.-Färbung besonders am Übergang die Differenz (2) von randständigem unversehrtem Knorpel (3) und im Defekt befindlichen Kollagengerüst (1). Eine immunologische Reaktion auf die Trägersubstanz ist erkennbar (4). H.E., Vergrößerung 40fach



- B** In stärkerer Vergrößerung zeigt sich nach H.E.-Färbung besonders am Übergang (2) die Differenz von randständigem unversehrtem Knorpel (3) und im Defekt befindlichen Kollagengerüst (1), welches eine gute Integration aufweist. H.E., Vergrößerung 100fach



- C** Nach Elastica-van-Gieson-Färbung stellt sich Kollagen rot dar. Es zeigt sich im unversehrten Knorpel (3) rechts im Bild eine starke Rotfärbung auf Grund des hohen Kollagengehaltes. Im Bereich des Defektes (1) links im Bild ist lediglich an den Übergangszonen (2) ein sehr geringer Kollagengehalt erkennbar. EVG, Vergrößerung 100fach

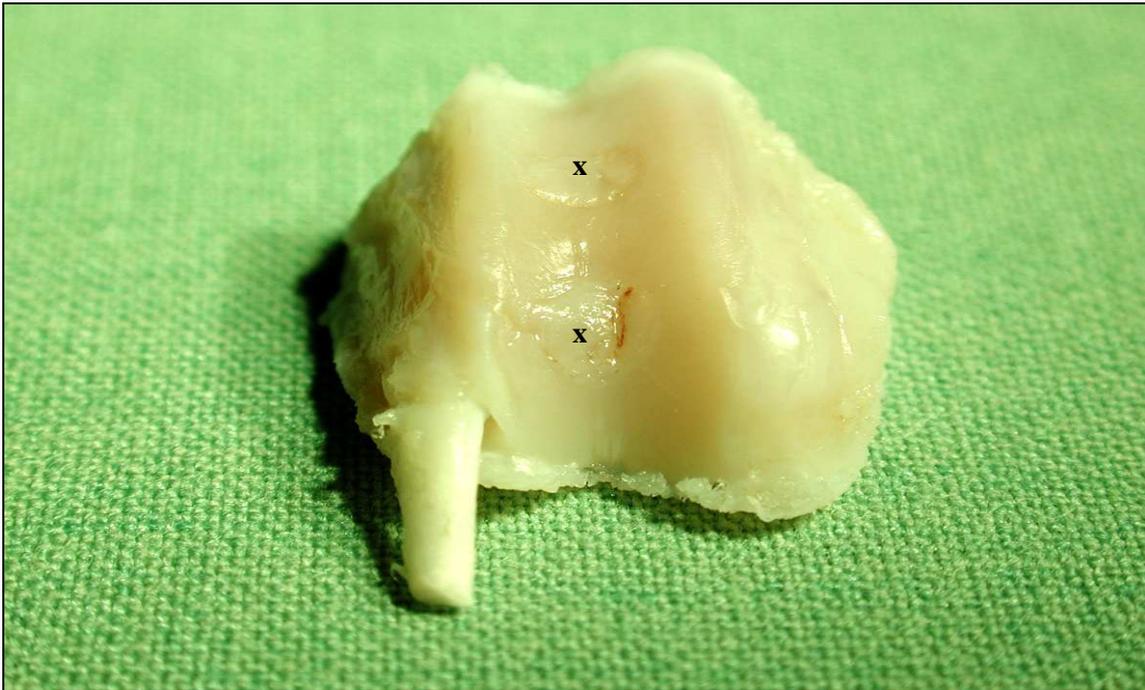


- D** Nach Alcianblau-Färbung stellen sich Glykosaminoglykane blau dar. Es zeigt sich im Gegensatz zum unversehrten Knorpel (3) rechts im Bild ein nur sehr geringer Gehalt an Glykosaminoglykanen im Bereich des Defektes links im Bild (1). Jedoch lässt sich ein Einsprießen von Chondrozyten aus der Tiefe des Defektes nachweisen (2). ALC, Vergrößerung 100fach

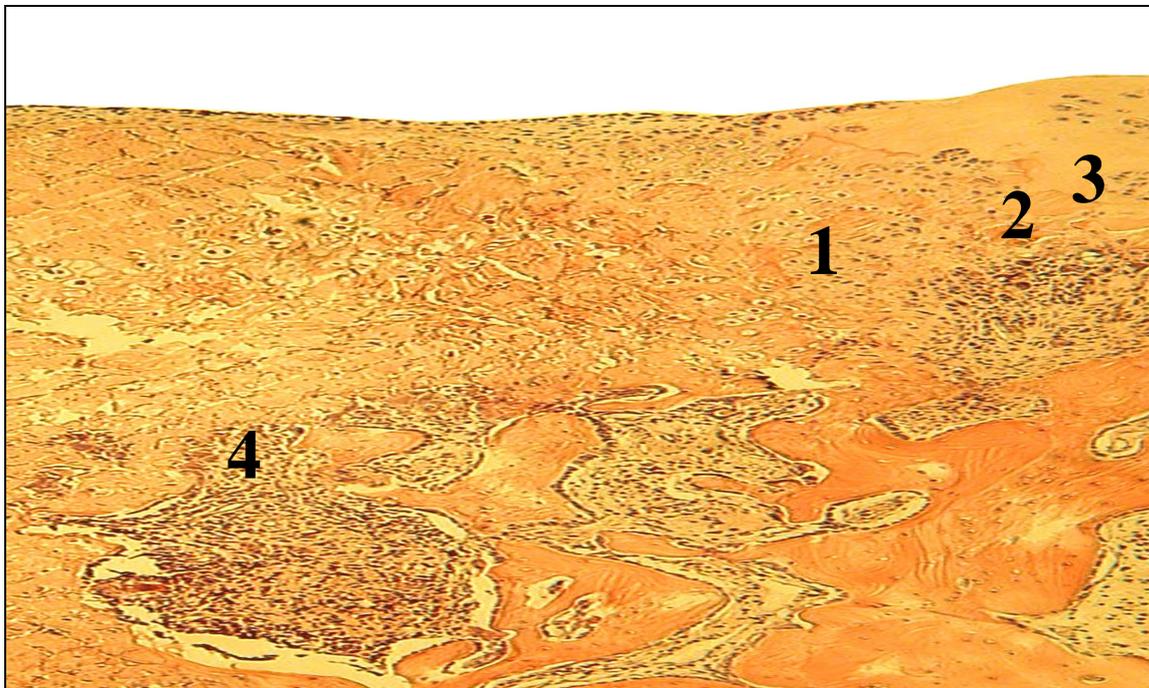
### **3.6.3. Implantierte autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte**

Auf dem dreidimensionalen Trägermaterial Resorba® kultivierte autologe Chondrozyten zeigten, als Zell-Matrix-Konstrukte in osteochondrale Defekte implantiert, drei Wochen nach der Implantation makroskopisch eine glatte Knorpeloberfläche, sowie eine gute Integration der Konstrukte (Abb. 21A). In der histologischen Aufarbeitung zeigte sich eine Vitalität der Zellen (Abb. 21C). Die Zellzahl konnte bezüglich der Heilung des Defektes als ausreichend bezeichnet werden, obwohl Bereiche mit niederen Zellzahlen erkennbar waren. Das Konstrukt wies eine Integration im umliegenden Knorpel auf und es konnte eine Matrixbildung nachgewiesen werden (Abb. 21B und C). Vergleichbar den histologischen Ergebnissen der unbesiedelten Gruppe, ließen auch hier im Defekt befindliche Lymphozyten auf eine abgelaufene immunologische Reaktion des Organismus schließen (Abb. 21B). Eine Produktion von Kollagenen und Glykosaminoglykanen im Defekt ließ sich nachweisen (Abb. 21D und E).

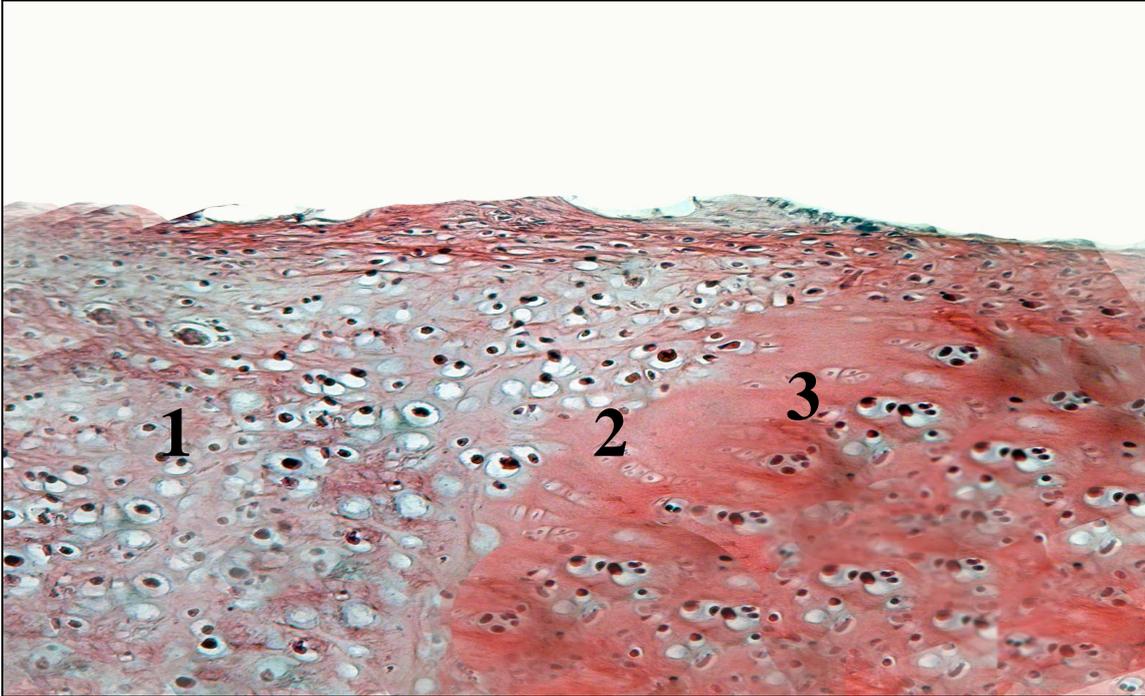
## Abbildung 21: Histologische Schnitte implantierter besiedelter Matrices



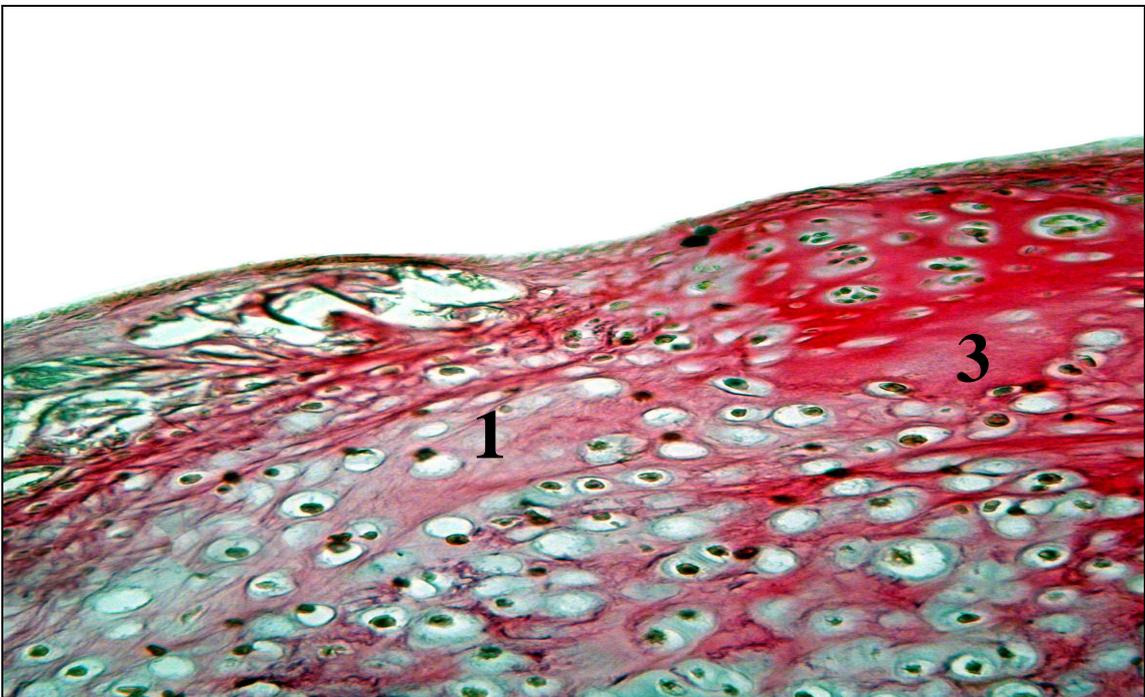
- A** Makroskopischer Blick auf die Gelenkfläche des explantierten distalen Femurkondylus eines New Zealand White Kaninchens. Im Bereich der Trochlea femoris befinden sich zwei mit autologen Knorpelzell-Matrix-Konstrukten aufgefüllte Defekte (x) drei Wochen nach deren Implantation. Es zeigt sich eine gute Integration der Konstrukte sowie eine glatte Knorpeloberfläche des Kniegelenks.



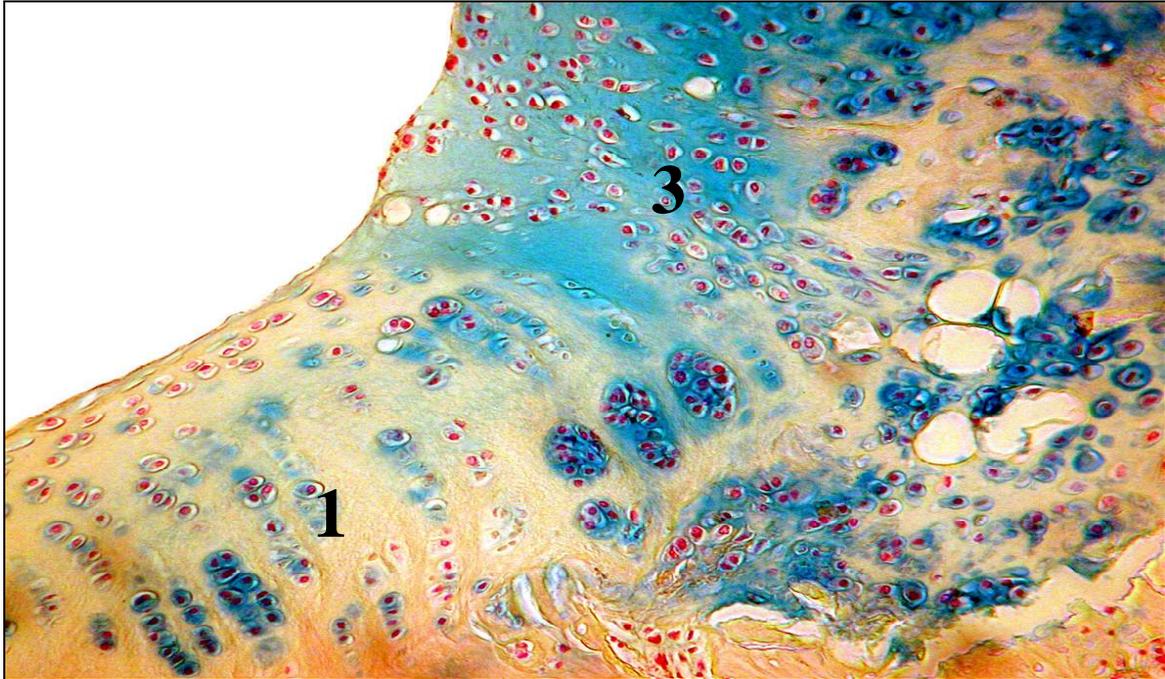
- B** Im lichtmikroskopischen Bild wird nach H.E.-Färbung auf der rechten Seite des Defektes (1) der Übergang (2) zum unversehrten Knorpel (3) deutlich. In der Tiefe des Defektes ist eine immunologische Reaktion erkennbar (4). H.E., Vergrößerung 40fach



- C** In stärkerer Vergrößerung wird der Unterschied zwischen unversehrtm Knorpel (3) rechts im Bild und implantiertem Gerüst (1) links im Bild deutlich. Es ist eine gute Integration (2) des Konstruktes, sowie eine hohe Zahl vitaler Zellen erkennbar. H.E., Vergrößerung 100fach



- D** Nach Elastica-van-Gieson-Färbung stellt sich Kollagen rot dar. Es ist eine milde Matrixproduktion innerhalb des Defektes (1) links im Bild zu erkennen. Rechts im Bild zum Vergleich unversehrter Knorpel (3). EVG, Vergrößerung 100fach



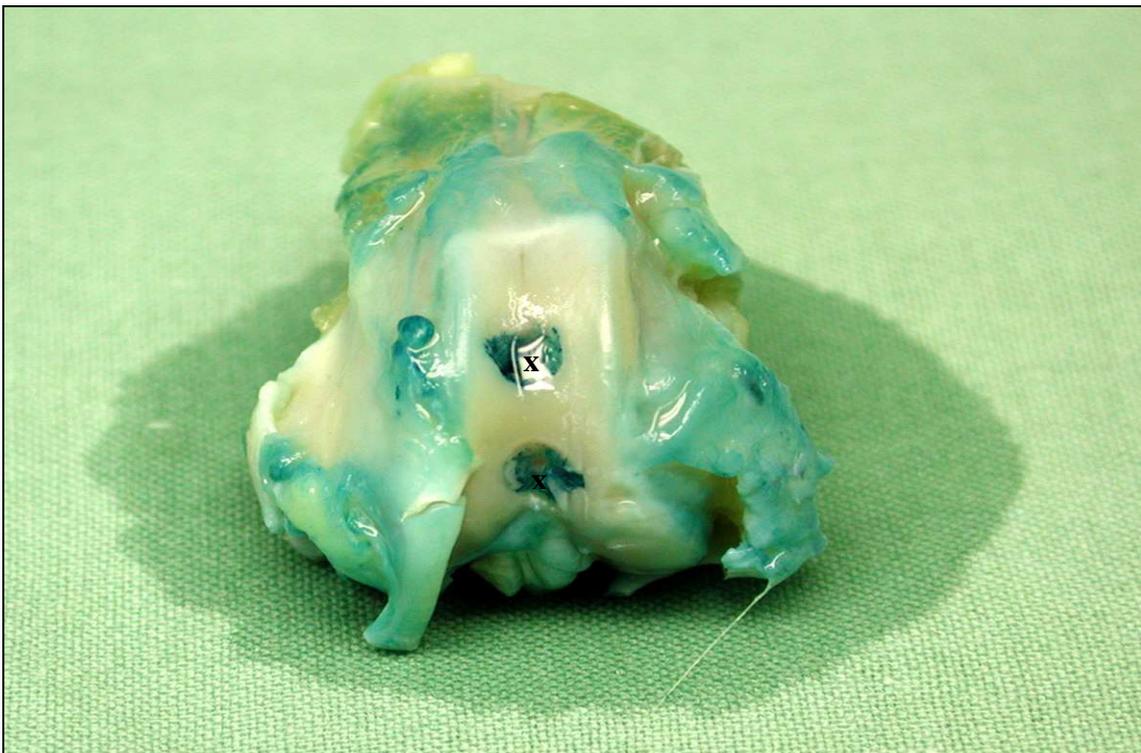
**E** Nach Alcianblau-Färbung stellen sich Glykosaminoglykane blau dar. Es zeigt sich, dass im Bereich des Defektes (1) links im Bild eine leichte Glykosaminoglykan-Produktion stattgefunden hat. Rechts im Bild zum Vergleich unversehrter Knorpel (3). ALC, Vergrößerung 100fach

### 3.6.4. Implantierte lacZ-markierte autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte

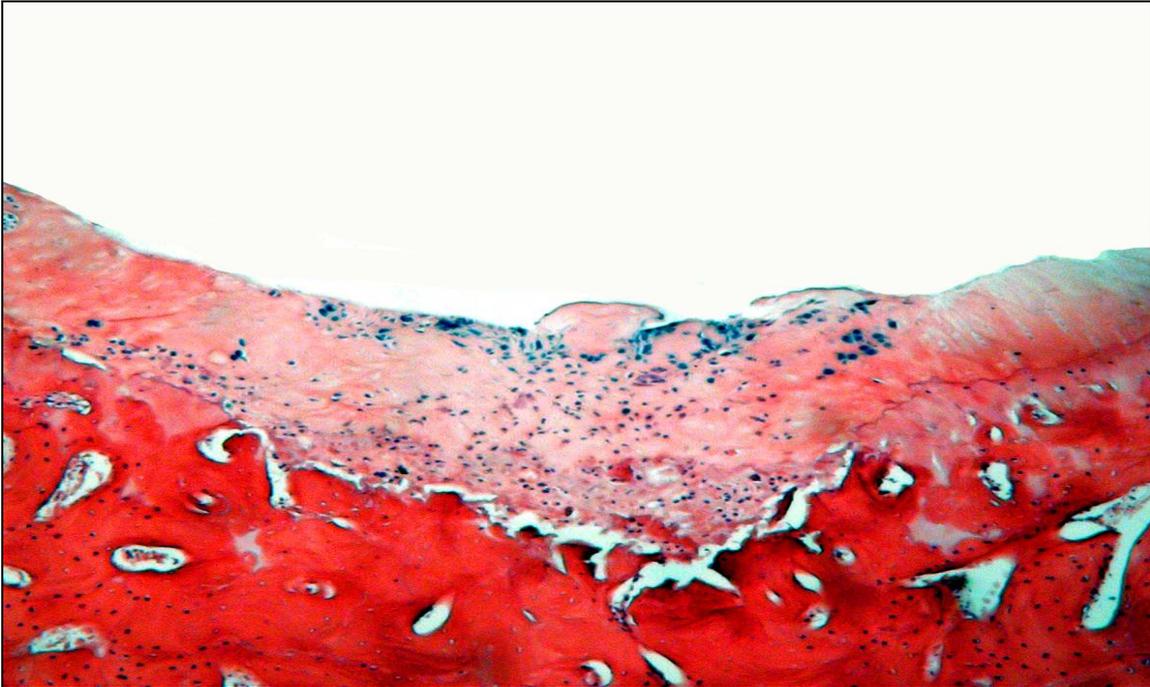
Auf dem dreidimensionalen Trägermaterial Resorba® kultivierte, autologe, lacZ-infizierte, Chondrozyten zeigten, als Zell-Matrix-Konstrukte in osteochondrale Defekte implantiert, drei Wochen nach der Implantation makroskopisch eine gute Integration der Konstrukte bei glatter Knorpeloberfläche (Abb. 22A). In der histologischen Aufarbeitung wurde eine Vitalität einer hohen transplantierten Zellzahl, sowie eine gute Integration des Konstruktes erkennbar (Abb. 22B). Noch drei Wochen nach Implantation war durch histologische X-Gal-Anfärbung eine Genexpression im Defekt nachweisbar. Aussagen über die gebliebene Effizienz der Expression konnten nicht gemacht werden, da Chondrozyten aus den Randbereichen und der Tiefe des Defektes in das eingebrachte Konstrukt einwandern. Diese Zellen lassen sich X-Gal-technisch nicht anfärben, da sie kein lacZ-Gen tragen. Des weiteren dringt die Färbelösung nicht in alle Bereiche innerhalb des Defektes ein und lässt genexprimierende Zellen teilweise ungefärbt. Trotzdem zeigten die Zellen sowohl in der Tiefe des Defektes, am Übergang zum gesunden Knorpel oder an der Oberfläche eine Genexpression (Abb. 22C). Bei Zellen, die keine Expression aufwiesen, bleibt die Frage offen, ob die Expression nicht mehr aktiv war, der Nachweis in der Nachbearbeitung nicht geglückt war oder es sich um eingewanderte Zellen handelt. Vergleichbar

vorhergehender Gruppen ließ sich in den Histologien der Defekte, die mit retroviral transduzierten Zellen gedeckt wurden, anhand der Lymphozyten ebenfalls eine immunologische Reaktion nachweisen (auf gezeigten Bildern nicht erkennbar). Fraglich ist, ob diese wiederum durch das Kollagenvlies hervorgerufen wurde oder auf die lacZ-exprimierende Fremd-DNA zurückzuführen ist.

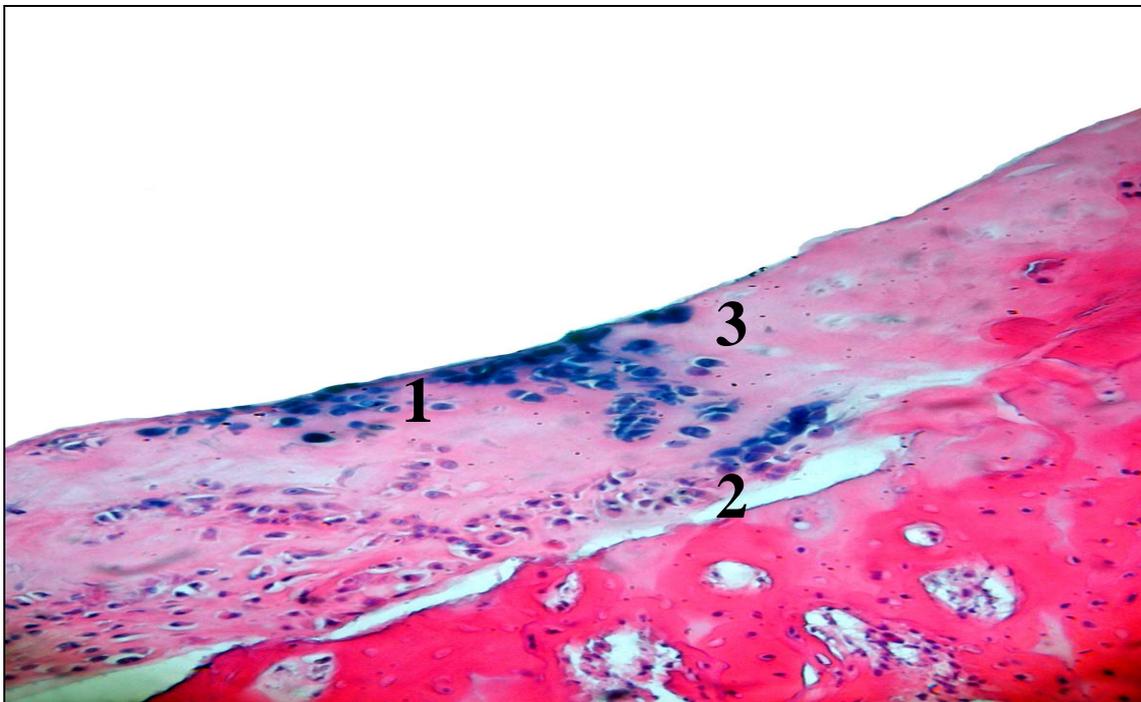
**Abbildung 22: Histologische Schnitte lacZ-markierter implantierter Matrices**



- A** Makroskopischer Blick auf die Gelenkfläche des explantierten distalen Femurkondylus eines New Zealand White Kaninchens. Im Bereich der Trochlea femoris befinden sich zwei Defekte (x), die durch das Markergen lacZ exprimierende, autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte gedeckt wurden. Drei Wochen nach Implantation zeigt sich auch hier eine gute Integration der Konstrukte, eine glatte Knorpeloberfläche sowie eine selektive Anfärbung der Implantate.



**B** Im lichtmikroskopischen Bild ist nach Zugabe des Chromogens X-Gal und H.E.-Färbung eine gute Verteilung der exprimierenden Zellen im Bereich des Defektes zu erkennen. H.E., Vergrößerung 40fach



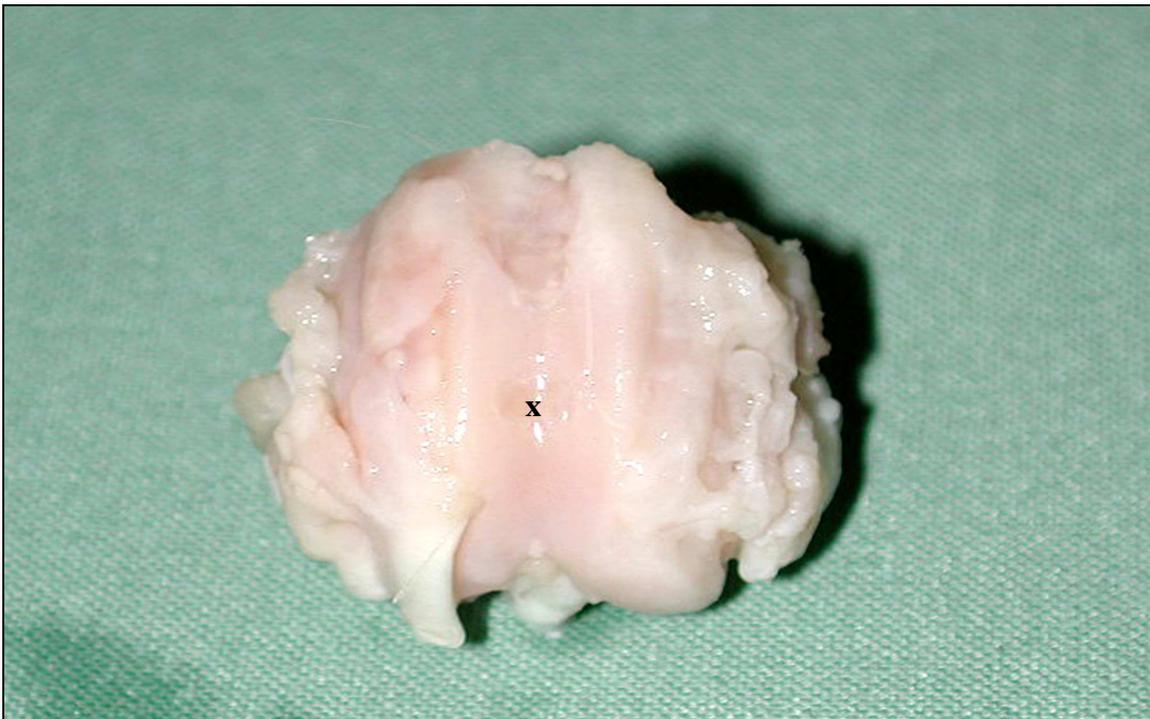
**C** In stärkerer Vergrößerung zeigen sich sowohl an der Oberfläche (1) als auch in der Tiefe (2) und den Randbereichen (3) des Defektes nach X-Gal-Färbung exprimierende Zellen. H.E., Vergrößerung 100fach

### **3.6.5. Implantierte autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte mit BMP-2-produzierenden Chondrozyten**

Die auf dem Trägermaterial Resorba® kultivierten, in osteochondrale Defekte implantierten, für den Wachstumsfaktor BMP-2 exprimierenden Chondrozyten, zeigten in den Versuchen die beste Heilung des gesetzten Defektes (Abb. 23). Makroskopisch zeigte sich drei Wochen nach Implantation wieder eine gute Integration der Konstrukte bei sich glatt darstellender Knorpeloberfläche (Abb. 23A). Lichtmikroskopisch wurde eine Vitalität sowie eine optimale, dem umliegenden unversehrten Knorpel zu vergleichende, Zellzahl gefunden (Abb. 23B). Zellfreie Areale wurden im Bereich der Implantation nicht gefunden. Morphologisch konnten die Zellen als ausdifferenzierte Chondrozyten bezeichnet werden (Abb. 23D). Die ursprüngliche Trägersubstanz war nahegehend vollständig resorbiert.

Das Konstrukt zeigte eine sehr gute Integration in den Defekt im Bereich aller Randzonen (Abb. 23C). Knorpelhöfe und Chondrone waren erkennbar. Die Zellen im Defekt ordneten sich teilweise tangential ausgerichtet säulenförmig an, was auf eine mechanisch funktionelle Organisation hinweist und so im umliegenden unversehrten Knorpel ebenfalls erkennbar ist (Abb. 23D). Die implantierten Chondrozyten zeigten eine gute Kollagen- und Glykosaminoglykan-Matrixbildung (Abb. 23E-H). Eine immunologische Reaktion war, wie sie sich in den anderen Gruppen auch gezeigt hatte, erkennbar (Abb. 23B).

**Abbildung 23: Histologische Schnitte eines implantierten BMP-2-transduzierten Chondrozyten-Matrix-Konstruktes**



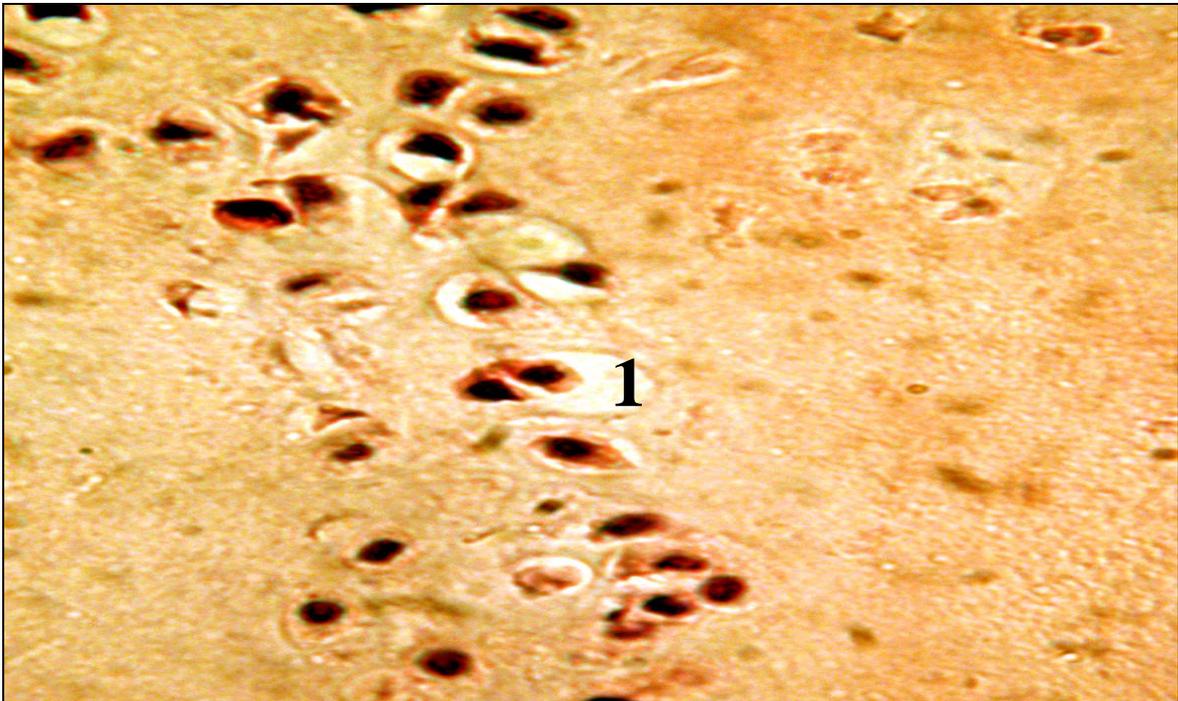
- A** Makroskopischer Blick auf die Gelenkfläche des explantierten distalen Femurkondylus eines New Zealand White Kaninchens. Im Bereich der Trochlea femoris befindet sich ein Defekt (x), der mit einem BMP-2-produzierenden autologen Knorpelzell-Matrix-Konstrukt gedeckt wurde. Drei Wochen nach Implantation zeigt sich eine sehr gute Integration des Konstruktes und eine glatte Knorpeloberfläche des Kniegelenks.



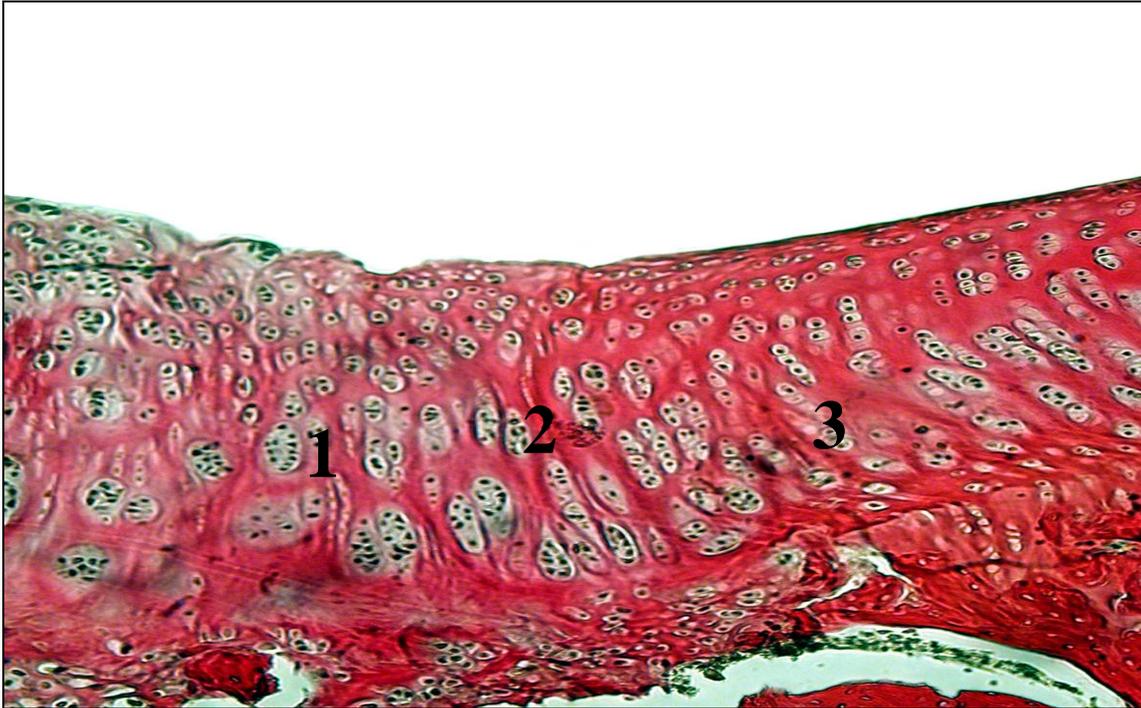
- B** Im lichtmikroskopischen Bild zeigt sich nach H.E.-Färbung eine gute Heilung des gesamten Defektes, eine optimale Verteilung der transplantierten Zellen (1) in den umliegenden Knorpel (3), eine gute Integration des Konstruktes (2), sowie eine glatte, wiederhergestellte Knorpeloberfläche. Eine leichte immunologische Reaktion wird erkennbar (4). H.E., Vergrößerung 40fach



**C** In stärkerer Vergrößerung stellt sich die gute Integration (2) des implantierten Konstruktes in den umliegenden Knorpel (3) dar. Im Bereich des Defektes (1) ist eine hohe Zahl transplantierter Chondrozyten erkennbar. H.E., Vergrößerung 100fach



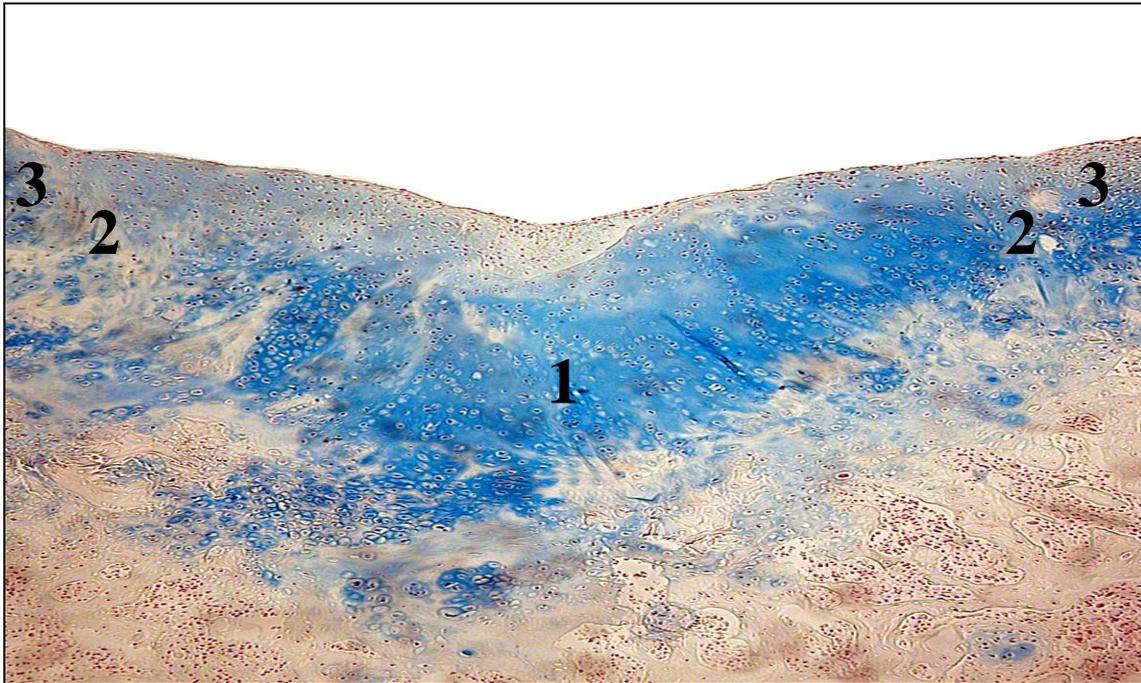
**D** In einem Ausschnitt aus der Mitte des Defektes zeigt sich die tangentielle Ausrichtung der in einem Knorpelhof (1) liegenden transplantierten Chondrozyten. H.E., Vergrößerung 200fach



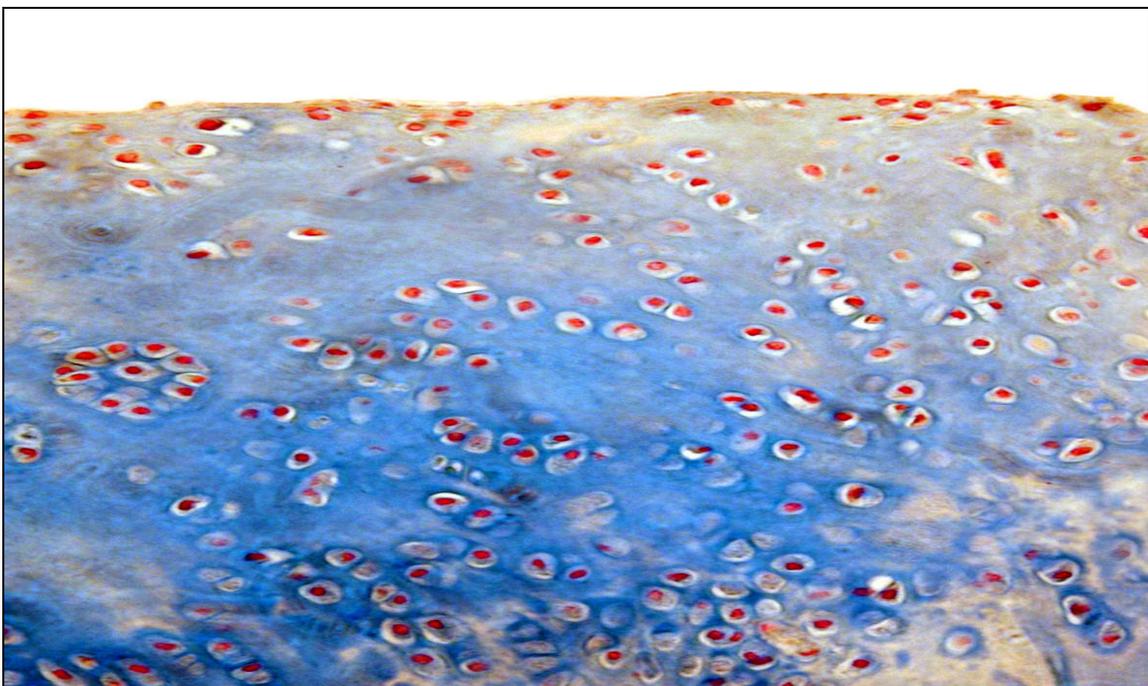
**E** Nach Elastica-van-Gieson-Färbung stellt sich Kollagen rot dar. Im Bereich des Defektes (1) links im Bild ist eine deutliche Rotfärbung erkennbar. Der Übergang (2) zu nativem Knorpel (3) ist durch dessen intensivere Anfärbung rechts im Bild gut zu erkennen. EVG, Vergrößerung 100fach



**F** In einem Ausschnitt aus der Mitte des Defektes wird die starke Rotfärbung auf Grund des hohen Kollagengehaltes deutlich. EVG, Vergrößerung 200fach



- G** Nach Alcianblau-Färbung stellen sich Glykosaminoglykane blau dar. Im gesamten Bereich des Defektes wird eine Blaufärbung deutlich. Der Übergang (2) von unversehrtm Knorpel (3) rechts und links im Bild zu Implantat (1) Bildmitte ist auf Grund einer gleich intensiven Anfärbung und guten Integration schwer auszumachen. ALC, Vergrößerung 40fach



- H** In einem Ausschnitt aus der Mitte des Defektes wird durch die gleichmäßig intensive Blaufärbung der hohe Glykosaminoglykangehalt deutlich. ALC, Vergrößerung 100fach

## **4. Diskussion**

In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass es möglich ist, das Markergen lacZ, sowie das für den Wachstumsfaktor BMP-2 codierende Gen mittels nichtviraler und viraler Methoden ex vivo in Chondrozyten einzuschleusen und zu exprimieren. Die transgenen Knorpelzellen wurden auf ein Kollagen-Typ 1 Trägermaterial besiedelt und in künstliche Knorpeldefekte implantiert. Dort zeigten die Chondrozyten unter dem Einfluß des BMP-2 Redifferenzierung, Proliferation und gesteigerte Matrixsynthese. Gepaart mit der Behandlungsmethode des Tissue Engineering kann eine gute Defektheilung erreicht werden.

Ferner wird die Effektivität eines Gentransfers sowohl durch Retroviren als auch durch nichtvirale Methoden anhand von Marker- und Reportergenen beschrieben. In Ansätzen wird in vitro die induzierbare Gentherapie untersucht.

### **4.1. Knorpel**

Kein Gewebe des Körpers ist höheren mechanischen Belastungen in Form von Druck-, Reibungs- und Torsionsbeanspruchungen ausgesetzt als der Gelenkknorpel. Für Aufbau und Erhalt der für solche Belastungen prädestinierten Knorpelmatrix aus Kollagenen und Proteoglykanen ist der Gelenkchondrozyt mit der Fähigkeit ausgestattet, über Jahrzehnte hinweg ohne messbare Teilung, Differenzierungs- und Alterungsvorgänge anabole und katabole Prozesse zur Erneuerung der Knorpelmatrix abzuwickeln (von der Mark et al., 1990: 2).

Gelenkknorpel entwickelt sich aus dem Mesenchym. Während seiner Entwicklung ist der Knorpel noch über Blutgefäße versorgt (Rudert et al., 1993: 237). Im ausdifferenzierten Zustand ist hyaliner Knorpel ein nervenfreies und gefäßloses Gewebe, das sich aus seinen Zellen, den Chondrozyten, und der extrazellulären Matrix, einem makromolekularen Gerüst, zusammensetzt (Tillmann, 1990: 338). Gelenkknorpel erhält seine Form und mechanischen Eigenschaften von seiner Matrix (Buckwalter et al., 1994: 192). Die Chondrozyten sind in der Matrix eingebettet und machen nur einen Anteil von 1 bis 10 % des Knorpelvolumens aus. In kleinen Tieren, wie auch Kaninchen, ist dieser Anteil bedeutend höher (Stockwell, 1967: 753 und 1978: 7). Diese Tatsache erleichtert die Versuche an Chondrozyten, die von Kaninchen stammen und könnte den Transfer auf den Menschen in der Zukunft erschweren. Chondrozyten sind sowohl für die Synthese als auch für den Abbau von Kollagenen und Proteoglykanen zuständig. Der Knorpelstoffwechsel erfolgt vorwiegend anaerob. Die Chondrozyten werden über die Synovialflüssigkeit und zum

geringen Teil aus den Gefäßen des subchondralen Knochens versorgt (Tillmann, 1990: 338). Die Knorpelmatrix besteht hauptsächlich aus Kollagenen, Proteoglykanen und Wasser. Die Interaktion der Makromoleküle mit der flüssigen Komponente verleiht dem Konstrukt seine mechanischen Eigenschaften der Steifigkeit und Spannkraft. (Guilak et al., 2000: 1663). Kollagene sind neben dem gebundenen Wasser, welches ca. 80 % des Gewichtes von hyalinem Knorpel ausmacht, der Hauptbestandteil der Matrix. Das arkadenförmig angeordnete Netz aus kollagenen Fasern liefert die Zugfestigkeit und Festigkeit gegenüber Scherkräften. Kollagen-Typ 2 macht 90 bis 95 % des Kollagens aus. Weiterhin enthält der Knorpel die Kollagene Typ 5, 6, 9, 10, 11 (Burgeson et al., 1992: 250). Dedifferenzierte Knorpelzellen produzieren deutlich mehr Kollagen-Typ 1 und 10 als differenzierte, weswegen diese Größen als Marker für den Differenzierungszustand herangezogen werden (Benya et al., 1982: 215). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Matrix sind die Proteoglykane. Sie bestehen aus einem Proteinkern und einer oder mehrerer angehängter Glykosaminoglykanketten. Diese Ketten enthalten Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatan-sulfat (Hardingham et al., 1992: 861; Rosenberg, 1992: 45). Sie sorgen aufgrund ihres hohen Wasserbindungsvermögens für die Druckelastizität des Knorpels (Athanasίου et al., 1991: 330). Das größte und am stärksten vertretene Proteoglykan des Knorpels ist das Aggrecan (Roughley et al., 1994: 385). Zuletzt kann noch eine größere Gruppe von nicht-kollagen Proteinen und Glykoproteinen im Knorpel gefunden werden, jedoch ist deren Funktion bisher nur wenig verstanden (Heinegard et al., 1992: 95).

Gelenkknorpel lässt sich in vier hochorganisierte Zonen aufteilen (Buckwalter et al., 1998: 477). In der oberflächlichen Tangentialfaserzone liegen die Knorpelzellen spindelförmig angeordnet. Ein hoher Gehalt an Kollagenen und ein niedriger an Proteoglykanen liegt in dieser Zone vor. In der zweiten Übergangszone runden sich die Zellen langsam ab und liegen teilweise zu mehreren in Chondronen. In der Radiärzone, der breitesten Zone des hyalinen Knorpels, liegen die Zellen in Säulen zusammengefasst. Die Kollagenfibrillen haben hier den größten Durchmesser. Die Proteoglykankonzentration ist am höchsten und die des Wassers am niedrigsten (Rudert et al., 1998: 309). Zwischen der untersten und letzten, der mineralisierten Zone des Knorpels, befindet sich die Tidemark, dessen Funktion bisher noch nicht geklärt werden konnte (Oegema et al., 1997: 324). Kalziumkristalle sind in dieser Zone in die Matrix eingelagert. Häufig sind hier untergehende Zellen erkennbar. Alle vier Zonen sind, durch eine scharfe Grenze geteilt, dem subchondralen Knochen aufgelagert (Rudert et al., 1998: 311).

Hyaliner Knorpel bedeckt die Gelenkfläche echter Gelenke. Er gewährleistet ein praktisch reibungsfreies Gleiten der Gelenkpartner, er hat eine stoßdämpfende Funktion und dient der Kraftübertragung zwischen den Skelettelementen. In Verbindung mit der Synovialflüssigkeit

weist er einen extrem niedrigen Reibungswiderstand auf. Seine biomechanischen Eigenschaften können als viskoelastisch bezeichnet werden (Rudert et al., 1998: 314).

Die Degeneration oder der progressive Verlust der normalen Struktur und Funktion von hyalinem Knorpel führt zu dem klinischen Leitbild der Osteoarthrose. Verlust von Knorpelgewebe vergesellschaftet mit dem Versuch der Knorpelreparatur, dem Umbau und der Sklerose des subchondralen Knochens sowie dem häufigen Auftreten von Knochenzysten und Osteophyten zeichnen das Bild dieser Krankheit (Dieppe et al., 1995: 1; Felson et al., 1995: 727).

Im Rahmen der Osteoarthrose kommt es zu einer chronisch fortschreitenden Zerstörung des Gelenkknorpels und damit zum Funktionsverlust des Gelenksystems (Messner et al., 1996: 523). Neben der Degradation von molekularen Komponenten kommt es auch zur Destabilisierung und Zerstörung von supramolekularen Strukturen wie des Kollagennetzwerks oder der Knorpelgrundsubstanz. Beides führt zur mikroskopischen Matrixzerstörung und letztlich zum makroskopisch sichtbaren Knorpelverlust (Knorpelabrieb) (Maletius, 1999: 711). Für die Zerstörung der Knorpelmatrix spielt neben mechanischen Belastungen v.a. auch der enzymatische Abbau von Matrixmolekülen eine Rolle. Wichtig scheint zusätzlich auch eine mangelnde oder fehlgesteuerte Matrixneusynthese zu sein. Entsprechende in-situ Analysen konnten hierbei zeigen, dass gerade in den Knorpelzonen progredierender Matrixzerstörung, die zunächst in der frühen Osteoarthrose verstärkt exprimierenden anabolen Matrixgene, vermindert exprimiert werden (Bruckner et al., 1994: 378). Im Zusammenspiel führt dies zur osteoarthrotischen Knorpelmatrixzerstörung auf molekularer (z.B. Proteoglykandegradation), makromolekularer (z.B. Kollagennetzwerkdestabilisierung), mikroskopischer (z.B. Fibrillierung) und makroskopischer (z.B. Knorpelabrieb) Ebene (Maletius, 1999: 711).

Da hyaliner Knorpel nicht vaskularisiert ist, fällt seine Reaktion auf Schädigung im Vergleich zu anderen Geweben anders aus (Mankin, 1982: 460). Hinzukommend sind die Chondrozyten in ihrer Matrix fixiert, was eine Heilung durch Migration zum Ort der Schädigung unmöglich macht. Bei oberflächlichen Knorpelverletzungen konnten in der angrenzenden Knorpelschicht eine Nekrosezone mit sog. Geisterzellen in Chondrozytenlakunen gesehen werden (Burkart et al., 2000: 135). Eine lediglich kurzlebige metabolische und enzymatische Knorpelantwort, aus der jedoch nicht genügend Zellen oder Matrixproduktion resultierte, um solch einen Minimaldefekt zu heilen, konnte beobachtet werden (Fuller et al., 1972: 193). Diese Zellproliferation führt zum Auftreten von Chondrozytenhaufen. Dieses als Cluster bezeichnete Phänomen konnte auch bei Arthrosepatienten oftmals gesehen werden (Buckwalter et al., 1997: 873; Ghadially et al., 1977: 125). Solche oberflächlichen Knorpelverletzungen zeigen keinerlei Heilungstendenz, können jedoch abhängig von ihrer Größe unverändert bestehen und müssen nicht zwangsläufig zu degenerativen Gelenkveränderungen führen (Thompson, 1975: 239; Mankin, 1982: 460). Selbst

junge Kaninchen, denen ein chondraler Defekt zugeführt wurde, zeigten keine Knorpelheilung (Fuller et al., 1972: 193). Kommt es zu einer Verletzung der vaskularisierten subchondralen Zone, so wird der Defekt mit einem Fibrinpfropf gefüllt, verbunden mit einer Zelleinwanderung aus dem Blut und dem Knochenmark (Buckwalter et al., 1994: 192). Dies sind undifferenzierte mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (Shapiro et al., 1993: 532). In den tieferen Zellschichten des Defektes wird Knochen zur Reparatur der subchondralen Zone gebildet. Im Knorpeldefekt selbst kann man eine Metaplasie zu hyalinartigem Knorpelgewebe erkennen (Shapiro et al., 1993: 535).

Kollagen-Typ 2 und rundlich erscheinende Chondrozyten treten 2 Wochen nach Schädigung auf. Jedoch ist zugleich Kollagen-Typ 1 mit einem Anteil von 20-35 % nachweisbar (Buckwalter et al., 1988: 87). Im Verlauf nimmt der Anteil an Proteoglykanen ab und der Aufbau einer oberflächlichen tangentialen Knorpelfaserschicht bleibt aus (Mitchell et al., 1976: 230). Eine Verbindung der Kollagenfasern des angrenzenden gesunden Knorpels mit denen des Reparationsgewebes findet nicht statt (Wakitani et al., 1994: 579; Brittberg et al., 1996: 270). Vertikale Scherkräfte können nun über Mikrobewegungen zwischen Restknorpel und Reparaturgewebe zur Arthrose führen. Zellen und Matrix erfahren innerhalb von 6-12 Monaten eine Umwandlung zu minderwertigem Faserknorpel. Oberflächliche Auffasserrungen und azelluläre Bezirke, die nach längerer Zeit beobachtet werden können, führen nachfolgend zur Arthrose (Furukawa et al., 1980: 79; Buckwalter et al., 1988: 87; Shapiro et al., 1993: 532).

#### **4.2. Bone Morphogenetic Proteins**

Marshall R. Urist fand heraus, dass demineralisierte Knochenstücke entweder subcutan oder intramuskulär implantiert, Knochenwachstum hervorrufen (Urist, 1965: 893 und 1971: 1392). Die Suche nach den für diesen Effekt verantwortlichen Faktoren führte zur Identifikation einer Familie von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) (Wang et al., 1988: 9484; Wozney et al., 1998: 26). Mit dieser Information wurde es möglich, verschiedene Formen an BMP zu reproduzieren und in der rekombinanten Gentechnologie zu verwenden. Später wurden sie als Induktoren der enchondralen Ossifikation am Knochen identifiziert (Reddi, 1992: 850).

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten 13 verschiedene BMP-Moleküle identifiziert werden (Schmitt et al., 1999: 269). Die BMPs 1-9 wurden durch Screening menschlicher cDNA identifiziert. Das Gen, welches für BMP-2 codiert, befindet sich auf Chromosom Nummer 20. Defekte in dieser Region führen nachgewiesen zur autosomal dominant vererblichen Fibrodysplasia Ossificans Progressiva.

Die BMPs 2-9 sind auf Grund der Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen Teil der Transforming Growth Factor- $\beta$ -Familie (TGF- $\beta$ ) (Kingsley, 1994: 16; Hogan, 1996: 432). Proteine der TGF- $\beta$ -Familie werden als großes Vorläuferprotein synthetisiert. Dieses besteht aus einem Signalpeptid, einer Prodomäne und einer carboxy terminal region. Das Signalpeptid ist für die Sekretion des Proteins verantwortlich, die Prodomäne ist für die Proteinfaltung, Dimerbildung und Regulation der biologischen Aktivität notwendig. Das reife Protein besteht aus der verhältnismäßig kurzen carboxy terminal region. BMPs bilden über Cystein-Disulfidbrücken miteinander Homo-oder Heterodimere. Von diesen wird die carboxy terminal region intrazellulär als aktive Form proteolytisch abgespalten (Kingsley, 1994: 18). Das Vorläuferprotein des humanen BMP-2 ist 396 Aminosäuren groß mit einem Molekulargewicht von 44702 D (SWISS-PROT Datenbank, P12642). Das reife BMP-2-Peptid des Kaninchens ist der humanen Form homolog (SWISS-PROT Datenbank, O46564). In der aktiven Form besteht jedes Monomer aus 114 Aminosäuren mit einem Gewicht von 32.000 D.

Durch heterotetramere Serin/Threonin Kinase Rezeptoren und durch intrazelluläre Signalproteine (Smads) lösen BMPs zelluläre Effekte aus (Koenig et al., 1994: 5961; Nohno et al., 1995: 22522). BMP 2, 4 und 7 binden an den gleichen Rezeptortyp (Schmitt et al., 1999: 269). Es wird diskutiert, dass Hox und Sonic Hedgehog Proteine als DNA-Bindungsproteine in BMP-Signalwege involviert sind (Kellner et al., 2002: 561).

BMPs initiieren nach Bindung an den Zelloberflächenrezeptor ein Zellsignal durch einen transmembranären Rezeptor-Komplex, den Bone Morphogenetic Protein Receptor (BMPR). Dieser besteht aus Rezeptor Typ 1 (BMPR-1A oder BMPR-1B) und Typ 2 (BMPR2) (Liu et al., 1995: 3479). Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich bezüglich ihres molekularen Gewichts, ihrer Fähigkeit bestimmte Liganden zu binden und der Präsenz einer Glycerin/Serin-reichen Region auf Rezeptor Typ 1. Durch Rezeptor-Bindung entsteht nach Aktivierung des BMP-Dimers durch intrazelluläre Glykosylation ein Heterotetramer (Schmitt et al., 1999: 271). Durch verschiedene Zusammensetzungen der Proteine können sowohl Glykosylations-Variationen, als auch Homo-und Heterodimere entstehen, welche die Aktivität und den Effekt der BMPs beeinflussen (Wozney et al., 1998: 27). Im folgenden phosphoryliert der Rezeptor Typ 2 die Glycerin/Serin-reiche Region des Rezeptor Typ 1. Rezeptor Typ 1 phosphoryliert die MH2 Region (Smad homology domain) von Smad1, 5 und 8. Smad6 und 7 sind eventuell imstande den Phosphorylierungsvorgang durch Kopplung an Rezeptor Typ 1 zu stoppen. Die Smads1, 5 oder 8 bilden nach Phosphorylierung mit Smad4 entweder ein Hetero-Oligomer und translozieren zum Nucleus oder stoppen die Kaskade durch Bindung an Smad6 oder 7. Smad5 wird spezifisch durch BMP-2 aktiviert und assoziiert mit Smad4. Sobald sich die Smads im Inneren des Kerns befinden, aktivieren sie die Gentranskription. Die Interaktion zwischen der DNA und den Smads wird

durch ein Smad Interacting Protein (SIP) moduliert (Schmitt et al., 1999: 272). Es wird vermutet, dass Rezeptor Typ 2 durch Autophosphorylierung kompetitiv zu Rezeptor Typ 1 kontinuierlich arbeitet, jedoch unabhängig kein Zellsignal auslösen kann. Rezeptor Typ 1 dagegen arbeitet lediglich spezifisch. Die Expression von BMP-Rezeptoren an der Zelloberfläche wird benötigt, um den differenzierten Phänotyp beizubehalten (Enomoto-Iwamoto et al., 1998: 409). Durch die extrazellulären BMP-Antagonisten Noggin, Chordin, Gremlin, Dan und Cerberus werden die biologischen Effekte reguliert (Brunet et al., 1998: 1455; Hsu et al., 1998: 673).

#### **4.2.1. Die Wirkung des BMP-2**

Aus verschiedenen experimentellen Arbeiten geht hervor, dass BMP-2 sowohl das Wachstum und die Differenzierung von mesenchymalen Zellen, als auch die Proliferation und Syntheseleistung von Chondrozyten stimuliert (Sato und Urist, 1984: 180; Chen et al., 1991: 509; Duprez et al., 1996: 448; Riley et al., 1996: 39; Sailor et al., 1996: 937). Diese Eigenschaft erweist sich als sinnvoll, da Regeneration eine Rekapitulation von Embryogenese und Morphogenese ist (Caplan et al., 1997: 254). Schmitt et al. beschrieben (1999: 271), dass Mäuse ohne BMP 2, 4 und 7 während der Embryogenese oder kurz nach der Geburt sterben. Mäuse, die kein BMP-2 besaßen, zeigten Entwicklungsabnormalitäten an Schädel, Hinterlauf und Niere. In der Vergangenheit wurden rekombinante BMPs schon häufiger eingesetzt und zeigten die Fähigkeit, Defekte an Schädel-, Mandibular- und langen Knochen zu regenerieren (Toriumi et al., 1991: 1101; Yasko et al., 1992: 659; Marden et al., 1994: 1127). In der Zellkultur ist BMP-2 imstande die phänotypische Expression von Chondrozyten *in vitro* stabil zu halten (Sailor et al., 1996: 937; Erickson et al., 1997: 371). Daneben kann BMP-2 durch seinen parakrinen stimulatorischen Effekt auf die Knochenbildung auch den subchondralen Knochen bei osteochondralen Defekten wieder aufbauen (Wozney und Rosen, 1998: 27).

In den Versuchen von Gooch et al. (2002: 591) bewiesen sich BMPs als Wachstumsfaktoren, indem sie die Wachstumsrate von *in vitro* kultivierten Chondrozyten steigern konnten. Unter dem Einfluß von BMP-2 über einen Zeitraum von vier Wochen konnte das Totalgewicht von auf Trägermaterialien besiedelten Chondrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe um 121 % gesteigert werden. Sowohl eine gesteigerte Zellzahl als auch eine erhöhte Menge an Glykosaminoglykanen waren der Grund für diese Gewichtszunahme. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Erickson und Mitarbeiter (1997: 371) als sie einen allgemeinen anabolen Effekt der BMPs durch Proteinsynthesesteigerung, quantifiziert durch Messung der Menge an mRNA, nachweisen

konnten. Enomoto-Iwamoto et al. wiesen (1998: 409) nach, dass in vitro die Glykosaminoglykan-Produktion von Chondrozyten durch Zugabe von BMP-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert werden konnte. In in vitro Versuchen aus unserem Labor mit BMP-2-transduzierten Chondrozyten konnte keine Steigerung der Proliferationsrate nachgewiesen werden. Jedoch auf einem Trägermaterial besiedelte, in Defekte implantierte Chondrozyten, die nach Gentransfer BMP-2 produzierten, konnten in vivo eine stärkere Matrixproduktion etablieren als angelegte Kontrollen. Diese Ergebnisse entnahmen wir unseren histologischen Schnitten.

Zugleich zeigten BMPs in anderen Versuchsreihen einen Einfluß auf die Morphogenese von verschiedenen Zellen. Mehrere Studien zeigen, dass mesenchymale Zellen in vitro unter dem Einfluß von BMP-2 einen chondrogenen Phänotyp exprimierten (Chen et al., 1991: 509; Boyan et al., 1992: 286). Multipotente Zellen produzierten nach der Wirkung von BMP für Knorpelzellen charakteristische extrazelluläre Matrix-Komponenten (Wang et al., 1988: 9484). Durch BMPs konnte in vitro in ausdifferenzierten Chondrozyten im Vergleich zur Kontrolle sowohl die Produktion von Kollagen-Typ 2 als auch die von Aggrecan gesteigert werden (Luyten et al., 1994: 224). Valcourt et al. (2002: 33545) konnten in ihren Versuchen ebenfalls die Produktion von Kollagen-Typ 2, sowohl Typ 2a als auch Typ 2b, in vitro durch den Einfluß von BMP-2 aufrechterhalten. Chondrozyten dedifferenzieren in zweidimensionaler Kultur innerhalb weniger Tage und verlieren in diesem Prozess die Fähigkeit der Expression von Kollagen-Typ 2 (Benya et al., 1982: 215; Binette et al., 1998: 207). Zugleich wird die Expression von Kollagen-Typ 1 gesteigert (Kaps et al., 2002: 149). In den in dieser Arbeit angefertigten Histologien zeigten, auf ein Kollagengerüst besiedelte und im nächsten Schritt implantierte, BMP-2 produzierende Chondrozyten, ebenfalls eine Kollagen-Typ 2 Produktion im Defekt. In einer anderen Studie konnte unter dem Einfluß von BMP-2 die Synthese von Proteoglykanen gesteigert und deren Abbau gemindert werden (Hiraki et al., 1991: 1373; Luyten et al. 1992: 224). Auch eine Aktivität der alkalischen Phosphatase unter BMP-2-Einfluß wurde in vitro gezeigt (Hiraki et al., 1991: 1376; Erickson et al., 1997: 374). Einen Anstieg der alkalischen Phosphatase in der Zellkultur zeigte auch eine Probe in den von uns unternommenen Messungen an Zellkulturüberstand von BMP-2-produzierenden Chondrozyten. Einen weiteren Effekt zeigte rekombinantes BMP-2, indem durch dessen Einfluß die Konzentration an BMP-2 autostimulatorisch in der Zellkultur anstieg. Gleichen Effekt zeigte das rhBMP-2 auf die Synthese von BMP-4 (Erickson et al., 1997: 375). Außerdem war rhBMP-2B in der Lage die chemotaktische Anziehung von humanen Monozyten in vitro zu induzieren. Grund für diesen Effekt sind BMP-Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten. Bei steigender Konzentration an BMP konnten die Monozyten zur Produktion von TGF- $\beta$  angeregt werden. TGF- $\beta$  ist ein Wachstumsfaktor für Matrixproduktion,

im besonderen Kollagen-Typ 2. Monozyten, die wiederum durch TGF- $\beta$  stimuliert werden, sezernieren eine Reihe von chemotaktischen und mitogenen Zytokinen. Diese rekrutieren endotheliale und mesenchymale Zellen, welche zur Synthese von Kollagen und assoziierten Matrix-Komponenten angeregt werden. In Kombination mit der Rekrutierung von Monozyten reguliert TGF- $\beta$  Chemotaxis, mesenchymale Proliferation, Differenzierung, Angiogenese und kontrollierte Synthese von extrazellulärer Matrix (Cunningham et al., 1992: 11740). Zuletzt agieren sie als Inhibitoren der fibroblast growth factors (FGF) während der Proliferation mesenchymaler Zellen (Niswander et al., 1993: 820).

Als spezifisch für Knorpelheilung tauglicher Wachstumsfaktor in vivo erwies sich das BMP in der Behandlung von osteochondralen Defekten, die mit rhBMP-2 imprägnierten Kollagengerüsten gedeckt wurden. Diese zeigten histologisch eine signifikant schnellere und verbesserte Steigerung von neuem Gewebe im Vergleich zu unbehandelten Defekten. Kriterien waren Integration in die Randzonen des Defektes, zelluläre Morphologie, Architektur innerhalb und an der Oberfläche des Defektes sowie Neubildung der Tidemark (Frenkel et al., 2000: 980; Sellers et al., 1997: 1452 und 2000: 151). In den Versuchen aus unserem Labor zeigten besiedelte, implantierte Trägermaterialien, dessen Zellen BMP-2 produzierten, im Vergleich zu angelegten Kontrollen eine deutlich stärkere Produktion an Kollagenen und Glykosaminoglykanen. Nakase et al. (2003: 278) untersuchten Kniegelenkshistologien, die aus neonatalem wachsendem hyalinen Knorpel, aus normalem adultem hyalinen Knorpel sowie aus mild und stark osteoarthrotisch geschädigtem Knorpel gewonnen wurden auf die Präsenz von BMP-2-mRNA und BMP-2-Protein. Im neonatalen Knorpel konnte BMP-2-mRNA nachgewiesen werden, im adulten jedoch nur sehr gering. In mild osteoarthrotisch geschädigtem Knorpel gelang der Nachweis von BMP-2-mRNA sowohl in sich in Clustern befindlichen als auch in allein stehenden Zellen. Der Nachweis gelang in oberflächlichen und mittleren Schichten, jedoch nicht in tiefen. In stark osteoarthrotisch geschädigtem Knorpel wurde allerdings in allen Schichten BMP-2-mRNA nachgewiesen. Durch beschleunigte Formation des subchondralen Knochens nach BMP-2-Einfluß kann eine erhöhte biomechanische Stabilität erreicht werden, welche die Organisation des ihm aufliegenden Knorpels unterstützt und eine eventuelle Instabilität durch beispielsweise Fissuren verhindert (Sellers et al., 1997: 1452).

### **4.2.2. Der BMP-2-Rezeptor**

BMPs üben ihre biologische Wirkung durch Interaktion mit einem Zelloberflächenrezeptor, dem Bone Morphogenetic Protein Rezeptor (BMPR), aus. Dieser Rezeptor besteht aus Heterodimeren oder Heterotetrameren von Typ 1- und Typ 2-Rezeptoren (Koenig et al., 1994: 5961; Liu et al., 1995: 3479; Nohno et al., 1995: 2252). Beide Rezeptortypen besitzen intrazelluläre Serin/Threonin Kinase Domänen, die für den Signalweg notwendig sind, sowie heterotrimere Komplexe, die für Ligandenbindung und ebenfalls den Signalweg zuständig sind. Enomoto-Iwamoto et al. (1998: 409) konstruierten einen BMP-Rezeptor, welcher keine intrazelluläre Kinase Domäne besitzt. Solch ein Rezeptor bindet BMPs, aber eine Signalweiterleitung bleibt aus (Ishikawa et al., 1995: 26). Dadurch konnte bewiesen werden, dass Chondrozyten, die einen künstlichen, nicht funktionierenden BMP-Rezeptor Typ 2 (DN-BMPR 2) auf ihrer Oberfläche tragen im Gegensatz zur Kontrollgruppe unter BMP- (auch BMP-2) Einfluß, ihre Fähigkeit verlieren, Kollagen-Typ 2 und Aggrecan zu produzieren. Die Produktion von Kollagen-Typ 1 wurde gesteigert und die Zellen nahmen eine fibroblastenartige Form an. Für den Typ 1A und 1B Rezeptor (BMPR 1A und 1B) wurden gleiche Ergebnisse, jedoch mit weitaus geringerem Effekt erzielt (Enomoto-Iwamoto et al., 1998: 410). Es wird vermutet, dass der BMP 1B Rezeptor mit anderen Rezeptoren interagiert (Rosenzweig et al., 1995: 7632; Streit et al., 1999: 51) und so im besonderen mesenchymale Differenzierung bewirkt, während der BMP Typ 2 Rezeptor eine größere Rolle bezüglich ausdifferenzierten Chondrozyten spielt. BMP-Signale, im besonderen im Bezug auf den Rezeptor Typ 2 (BMPR 2), sind demnach notwendig, um eine Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten beizubehalten. Diese den DN-BMPR 2-Rezeptor tragenden Chondrozyten wurden vom Monolayer in Suspensions-Kultur gebracht. Auch unter den geänderten zellkulturellen Bedingungen konnten die Chondrozyten keine normale Proteoglykan-Produktion etablieren, wobei dieses Phänomen von Benya et al. (1982: 215) zuvor schon beschrieben wurde.

### **4.3. Tissue Engineering**

Die National Science Foundation legte 1988 folgende Definition für Tissue Engineering fest: „Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebeersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen.“ Innerhalb der

letzten Jahre ist dieses neuartige Gebiet von einer Definition zur Herstellung klinischer Produkte gewachsen.

Tissue Engineering ist die Entwicklung und Manipulation von im Labor gezüchteten Molekülen, Zellen, Geweben oder Organen mit der Absicht defekte oder verletzte Teile des Körpers in ihrer Funktion zu unterstützen oder gar zu ersetzen. Zellen werden schon länger außerhalb des Körpers gezüchtet oder kultiviert. Jedoch die Möglichkeit dreidimensionale Gewebekomplexe, das Design und die Funktion des menschlichen Gewebes kopierend, herzustellen, ist eine sehr junge Entwicklung. Dieses Forschungsgebiet verbindet die Bereiche Zellbiologie, Biomaterialforschung und Chirurgie mit der Absicht, lebende Ersatzgewebe und Organe herzustellen. Es ist möglich, jede denkbare Art menschlichen Gewebes, Leber, Knochen, Muskel und auch Knorpel, zu bilden. Kommerziell hergestellte Haut ist bereits zur Behandlung von Patienten mit z. B. diabetischen Ulzera verfügbar.

Neueste wissenschaftliche, biologische und materielle Fortschritte bringen das Tissue Engineering an die vorderste Front der Knorpel-Reparatur-Techniken (Temenoff et al., 2000: 431). Eine geeignete Methode zur in vitro Herstellung von Knorpelgewebe mit lebenden Zellen ist nur durch moderne Gewebekulturmethode möglich, die die Erhaltung der phänotypischen Charakteristiken von Chondrozyten erlauben (Bujia et al., 1994: 577).

Verschiedene Systeme zum Tissue Engineering am Knorpel kamen bisher in experimentellen Studien zur Anwendung: von isolierten Chondrozyten, die als Zellsuspension unter einen Periostlappen injiziert wurden (Brittberg et al., 1994: 889) bis hin zu dreidimensionalen Gerüsten unterschiedlicher Materialien, auf denen Zellen gezüchtet wurden (Benya und Shaffer, 1982: 215; Sittering et al., 1996: 237; O'Driscoll, 1998: 1795; Freed et al., 1999: 46; Rudert et al., 1999: 68; Sittering et al., 1999: 130). Bereits näher untersuchte Scaffolds zur Anzucht von Chondrozyten sind Agarose-Gele (Benya und Shaffer, 1982: 215), Polydioxanon, Polyglactin, PLLA oder PLGA (Sittering et al., 1994: 451; Rudert et al., 1999: 68), Hyaluronsäure (Brun et al., 1999: 683), Alginat (Domm et al., 2000: 91), Fibrin (Hendrickson et al., 1994: 485), Kollagen-Gele (Kimura et al., 1984: 231; Wakitani et al., 1994: 579) oder Kollagene (Sams und Nixon, 1995: 47; Frenkel et al., 1997: 831; Nehrer et al., 1998: 2313; Fuss et al., 2000: 303; Lee et al., 2000: 998).

Das Kollagen als Trägermaterial bekam auf Grund seiner guten Eigenschaften bei der Verwendung mit Knorpelzellen große Aufmerksamkeit unter den Matrices und kam schon in mehreren Studien zur Anwendung. Grundsätzlich reduziert die Verwendung von Matrices eine Morbidität an der Entnahmestelle drastisch und stellt zugleich ein Transportsystem für Chondrozyten dar, an welches diese sich anhaften können (Thomson et al., 1995: 511). Auch in

unseren Versuchen zeigten künstliche Resorba®-Kollagen-Typ 1-Scaffolds im Vergleich zu den anderen angewandten Trägermaterialien Tachotop® und Verigen® die besten Eigenschaften während ihrer Anwendung beim Tissue Engineering.

Die Gruppe von Kimura et al. (1984: 231) fand heraus, dass Chondrozyten, für sechs Wochen in Kollagen-Gel eingebettet, ihre phänotypische Differenzierung sowie die Produktion von Glykosaminoglykanen beibehalten konnten. Ein besonderer Vorteil des Kollagens besteht darin, dass es von zellulären Enzymen erkannt wird. Durch die sich so eröffnende Möglichkeit des Um- oder Abbaus wird Platz frei für das einwachsende Gewebe (Speer et al., 1979: 326). Im Vergleich zu anderen Trägermaterialien stimulierten Kollagen-Implantate transplantierte Zellen sogar zur Kollagenproduktion (Grande et al., 1997: 211). Durch Tissue Engineering stießen Caplan et al. (1997: 254) auf eine Rekapitulation von Embryogenese bei auf Kollagen besiedelte, in Defekte implantierte, Zellen.

An Tiermodellen sind bereits verschiedene Verfahren des Tissue Engineering untersucht und publiziert worden. Meist verbesserte sich das histologische Bild der Läsionen, eine Restitutio ad integrum oder eine Füllung der Defekte mit reinem hyalinen Knorpel konnte aber bisher nicht erreicht werden (Robinson et al., 1993: 75; Freed et al., 1994: 891; Hendrickson et al., 1994: 485; Vacanti et al., 1994: 485; Hunziker und Rosenberg, 1996: 721; Nehrer et al., 1998: 2313).

Werden Chondrozyten aus ihrer Matrix gelöst, zeigen sie in zweidimensionaler Kultur im Prozess der Dedifferenzierung eine fibroblastenartige Morphologie. Sie produzieren Kollagen-Typ 1 und stoppen die Produktion charakteristischer Moleküle wie Kollagen-Typ 2 und Proteoglykan (West et al., 1979: 491; Oegema et al., 1981: 1015). In dreidimensionaler Kultur dagegen behalten sie ihre phänotypische Morphologie, Differenzierung und Funktion bei. Auf diese Art und Weise ermöglichen dreidimensionale Trägermaterialien die Kultur von Chondrozyten ohne den Verlust von wichtigen Eigenschaften durch Dedifferenzierung (Cao et al., 1998: 475). Benya und Mitarbeiter (1982: 215) bewiesen, dass in zweidimensionaler Kultur dedifferenzierte Chondrozyten, die in eine dreidimensionale Kultur gebracht wurden, Redifferenzierung zeigten. Der Augenschein lag in diesen Versuchen auf der Produktion von Kollagen-Typ 2 und Proteoglykan. In unserem Labor zeigten auf einen dreidimensionalen Träger gebrachte Chondrozyten unter zellkulturellen Bedingungen ebenfalls eine knorpelzellartige Morphologie, sowie eine milde Matrixproduktion. Es konnten oben angesprochene Forschungsergebnisse reproduziert werden.

Frenkel und Mitarbeiter (1997: 831) verglichen das Ausheilungspotential von leeren Defekten mit dem von unbesiedelten und mit dem von mit Chondrozyten besiedelten Trägermaterialien an einem Kaninchenmodell. Das beste histologische Ergebnis erzielte das besiedelte Implantat. Sowohl der Proteoglykangehalt als auch die Kollagen-Typ 2 Menge waren in der besiedelten Gruppe gleich den Werten wie sie in gesundem Knorpel zu finden sind. Die anderen zwei Gruppen wiesen keine vergleichbare Regeneration auf. Eine Reihe anderer Arbeiten zeigte ähnliche Ergebnisse (Wakitani et al., 1989: 74; Sams et al., 1995: 47; Chen et al., 1997: 396; Riesle et al., 1998: 313). Im Vergleich zu leer gelassenen Defekten oder lediglich mit unbesiedelten Kollagen-Matrices gedeckte Defekte an Kaninchen aus unseren Versuchen, zeigten Defekte, die mit BMP-2-produzierenden Chondrozyten, auf eine Kollagen-Matrix besiedelt, gedeckt wurden, eine deutlich bessere Ausheilung. Eigenschaften, die nur die Histologien der besiedelten transgenen Gruppe zeigten, waren eine hohe Zahl differenzierter Chondrozyten, Glykosaminoglykan- und Kollagen-Produktion sowie eine funktionelle Anordnung der transplantierten Zellen im Defekt.

Zu guter letzt konnte eine gute mechanische Stabilität durch Tissue Engineering erreicht werden. Duda et al. (2000: 673) bewiesen, dass in vitro hergestellte Knorpelzell-Matrix-Konstrukte bis zu 50 % der Stabilität von nativem Knorpel erreichten.

Diese besprochenen Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass durch solch ein dreidimensionales Kultur-Modell eine in vitro-Herstellung von Knorpelgewebe für die Transplantation möglich und sinnvoll anwendbar ist.

#### **4.4. Wachstumsfaktoren in Kombination mit Tissue Engineering**

In einer Studie von Blunk et al. (2002: 73) wurde der Effekt von vier verschiedenen Wachstumsfaktoren auf durch Tissue Engineering hergestellten Knorpel untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Fähigkeit des Konstruktes, die Wachstumsrate zu steigern und die Konzentration an Glykosaminoglykanen (GAG) und Kollagen zu erhöhen. Unter dem Einfluß der verschiedenen Zytokine zeigten die auf ein künstliches Trägermaterial, polyglycolic acid (PGA), besiedelte Chondrozyten innerhalb von 4 Wochen eine Steigerung des Gewichts um das 1,5-2,9fache. Außerdem konnten, mit Unterschieden zwischen den einzelnen Faktoren, die extrazellulären Matrixkomponenten gesteigert werden. Jakob et al. (2001: 368) besiedelten in ihren Versuchen, nach einer kurzen Phase in Monolayer-Kultur, ebenfalls Chondrozyten auf eine dreidimensionale

Matrix und setzten diese dann der Wirkung von verschiedenen Wachstumsfaktoren aus. Sowohl das Verhältnis von Kollagen-Typ 2 zu Kollagen-Typ 1 stieg zugunsten des Kollagen-Typ 2 als auch das Verhältnis von Aggrecan zu Versican stieg zugunsten des Aggrecan. In beiden Fällen stieg der Markeranteil, der phänotypisch differenzierte Chondrozyten ausmacht. Durch diese Studien wird bewiesen, dass Wachstumsfaktoren die Komposition von tissue-engineertem Knorpel signifikant verbessern können und sogar schon dedifferenzierte Chondrozyten zu redifferenzieren in der Lage sind. Eine Produktion von extrazellulären Matrixkomponenten zeigt sich als besonders sinnvoll, wenn Knorpelzellen, ihrer natürlichen Umgebung nahekommend, auf einem dreidimensionalen Träger kultiviert werden. Denn nur dann kann eine wirkliche Vernetzung und Interaktion der Zellen, an allen Seiten ihrer Oberflächen, sowie der Matrixkomponenten untereinander ein funktionierendes Konstrukt garantieren. Auf diese Art und Weise potenzieren sich die Effekte des Tissue Engineering und des Wachstumsfaktors gegenseitig.

#### **4.5. Gentherapie und Methoden der heutigen Gentherapie**

Gentherapie im einfachsten Sinne bedeutet die Korrektur bzw. Auswechslung eines defekten Gens durch ein normales. Praktisch heißt dies, dass das intakte Gen in die genetisch defekten Zellen eingeschleust und zur Expression gebracht werden muß, um die Fehlfunktionen des defekten Gens auszugleichen. Auf einem Papier, das 1932 auf dem sechsten Internationalen Genkongreß unter dem Namen „Gentechnik“ (genetic engineering) erschien, wurde dieser Begriff zeitgleich mit anderen Autoren zum ersten Mal verwendet. „Genetic Engineering“ wurde als die Anwendung genetischer Prinzipien auf die Zucht von Tieren und Pflanzen definiert.

1966 sagte Tatum in New York voraus, dass Viren benutzt werden könnten, um Gene zu übertragen. Aposhian beschrieb 1969 die Bedeutung des Erbgutes so: „Wenn jemand den Zweck eines Medikamentes darin sieht, die normale Funktion eines bestimmten Prozesses im Körper wiederherzustellen, dann könnte die DNA als das ultimative Medikament betrachtet werden.“

In den 80er Jahren entwickelten unabhängig voneinander drei verschiedene Gruppen rekombinante Retroviren als Vektoren für Transgene (Shimotohno und Temin, 1981: 67; Tabin et al., 1982: 426; Wei et al., 1981: 935). Diese wurden weiterentwickelt und für klinische Studien verwendet.

Sinn der Gentherapie ist es, in situ ein Protein, z.B. einen Wachstumsfaktor, produzieren zu lassen, um so eine Heilung zu erreichen. Jedoch ist die Halbwertszeit solcher Proteine nach

Injektion oder operativer Platzierung im Körper meist sehr kurz und verspricht so nur einen geringen Effekt. Aus diesem Grund bedient man sich der Alternative des Gentransfers der für diese Proteine codierenden Gene in bestimmte Gewebe, um damit einen konstanten Wirkspiegel zu gewährleisten (Makarov et al., 1996: 402; Otani et al., 1996: 3558). Hannallah et al. (2003: 753) postulierten, dass Gentherapie das Potential habe, die Behandlung von muskuloskeletalen Krankheiten zu revolutionieren. Neben der therapeutischen Anwendung für verschiedene andere Erkrankungen haben gentherapeutische Techniken auch ein großes therapeutisches Potential in orthopädischen Fragestellungen. Die Rolle der Gentherapie in diesem Fach wächst im Besonderen, da die Kenntnis über Proteine, die Wachstum und Regeneration von Knorpel und Knochen beeinflussen, zunehmend größer wird. Lewthwaite et al. (1994: 467) injizierten erfolglos eine Bolus-Injektion von rekombinantem Interleukin-1 (IL-1) Protein in Kaninchen, in der Absicht, Arthritis zu verhindern. Makarov et al. (1996: 402) transferierten das gleiche Protein durch Gentherapie in Kaninchen und konnten so das Ausmaß und die Rekurrenz der Arthritis verhindern. Gerade für Proteine wie das BMP-2 ist eine Verabreichung mittels genetischer Methoden notwendig, da eine therapeutisch wirksame Dosis bei direkter Applikation im Vergleich zur durch Gentherapie erreichten Dosis millionenfach höher wäre (Yasko et al., 1992: 659; Kirker-Head et al., 1995: 222; Bostrom et al., 1996: 272; Johnson et al., 2000: 61). Zusätzlich lassen sich durch Gentherapie spezifische Zellen erreichen, was die Effektivität zusätzlich steigert (Sandhu et al., 1999: 217). Ein idealer Vektor zur Übertragung von DNA in Chondrozyten sollte zu einer hohen Genexpression in der Wirtszelle führen, d.h. effizient sein. Er sollte weder immunogen noch toxisch sein und einen stabilen Einbau des Transgens gewährleisten. Ferner sollte der Vektor sein rekombinantes Genom spezifisch einbauen, d.h. nicht mutagen durch zufällige Integration in andere Zellen sein.

In den Versuchen vorliegender Arbeit wurden im Falle der viralen Methode Retroviren als Vektoren verwendet. Bei der nonviralen Methode wurde die liposomale Transfektion angewandt.

#### **4.6. Marker/Reportergene für den Gentransfer**

Um die erreichte Transfereffizienz der infizierten oder transfizierten Zellen abzuschätzen, wurden sogenannte Markergene verwendet. Eines dieser Markergene war das lacZ-Gen. Das Reportergen lacZ, welches für das Protein  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) codiert, wird schon lange zur Kontrolle der Gentransfereffektivität an Zellen *in vitro* oder an Gewebe *in vivo* angewandt (Couffinhal et al., 1997: 929). Durch Zugabe von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid), einem unphysiologischen Substrat, das von der Beta-Galaktosidase gespalten wird und dunkelblaue

Reaktionsprodukte ergibt, können so infizierte Zellen angefärbt und histochemisch nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Genen (Gorman et al., 1982: 1044), die zum Transport von Genexpression in ganzen Zellkulturen verwendet werden, erlaubt das lacZ-Gen die Analyse zellulären und topographischen Ausmaßes des Gentransfers.

Für denselben Zweck eignen sich Selektionsmarker, z.B. das Green Fluorescent Protein (GFP), das nach Expression in den Zielzellen unter UV-Licht fluoresziert. Dieses aus der Qualle *Aequorea victoria* gewonnene Protein ist weniger sensitiv im Nachweis von exprimierten Genen als die Beta-Galaktosidase. Durch Einführung von chromophoben Mutationen konnte aber eine Variante des GFP, das sogenannte Enhanced GFP (EGFP) entwickelt werden, das 35-mal heller ist. Es ist etwa 16-24 h nach Transfer nachweisbar und weist eine höhere Sensitivität auf als die Methode der X-Gal-Färbung (Zhang et al., 1996: 707). Die Methode der lacZ-Markierung und deren anschließende Analyse durch FACS wurde schon von Nolan et al. (1988: 2603) beschrieben. Markergene dienten schon in einigen Studien zur Quantifizierung von Transfereffizienzen.

Die Versuche von Reinecke et al. (1997: 412), Shuler et al. (2000: 585) und Moller et al. (2000: 75) zeigten die Funktionalität des Transgens an viral mit dem lacZ-Gen transduzierten Chondrozyten in vitro. Auch Adachi et al. (2002: 1920) bedienten sich dem lacZ-Gen in ihren in vitro und in vivo Versuchen an Chondrozyten. Um eine Transfektionseffizienz zu quantifizieren zogen Dinser et al. (2001: 69) für ihre Versuche das EGFP-Gen heran. In vitro konnte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop die Expressionsrate kontrolliert werden. Ebenso Hirschmann et al. (2002: 109) verwendeten das GFP-Gen bei Versuchen an Chondrozyten in vitro. Musgrave et al. (2002: 120) transduzierten in vitro Skelettmuskelzellen viral mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-tragenden Gen. Es konnte nach Injektion dieser Zellen in vivo eine Transgenexpression nachgewiesen werden. In einer anderen Studie wurden isolierte Chondrozyten viral mit einem lacZ-tragenden Gen infiziert. Nach Besiedelung auf eine Kollagen-Typ 1 Matrix wurden die transduzierten Zellen wieder in die Kaninchen implantiert. In der histologischen Aufarbeitung konnte eine, wenn auch abnehmende, Expression nachgewiesen werden (Baragi et al., 1997: 275). Ebenfalls in den von uns unternommenen Versuchen konnte für das Transgen lacZ eine Expression im Defekt nachgewiesen werden. Eine Aussage über den prozentualen Anteil exprimierender Zellen konnte nicht gemacht werden.

#### 4.7. Nonvirale Methoden

Transfektion beschreibt den Prozess, in dem eukaryotische Zellen fremde DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen. Die direkte Genübertragung in Tierzellen ist zwar möglich, aber nicht besonders effizient. Jedoch sind nonvirale Transfermethoden auf Grund einer minimalen Immunogenität sicherer als virale Methoden und zudem einfacher in der Produktion. Verschiedene Verfahren zum nichtviralen Gentransfer stehen in der Anwendung zur Verfügung.

Bei der Technik der Mikroinjektion werden DNA-Moleküle mit Hilfe einer feinen Glaskapillare unmittelbar in den Kern der Zelle injiziert. Diese Methode ist sicher und möglich bei Tier- und Pflanzenzellen, eignet sich aber nicht für die Anwendung bei großen Zellzahlen.

Eine andere Möglichkeit, DNA zu übertragen, ist die liposomale Transfektion. Hierbei kommt es zu einer Komplexbildung der negativ geladenen Fremd-DNA mit positiv geladenen Lipidpartikeln, den uni- oder multilamellaren Liposomen, die mit der Membran der Empfängerzelle verschmelzen und dabei das genetische Material endozytotisch in die Zelle entlassen. Dieses Verfahren ist weder toxisch noch immunogen, erlaubt aber keinen gezielten Transfer in bestimmte Zellen und kann nur kleinere DNA-Partikel transportieren.

Der Transfer eines Fremdgens kann auch erreicht werden durch Bombardements der Zellen mit stark beschleunigten Gold- oder Wolframpartikeln, die mit DNA überzogen sind und aus einer Partikelkanone abgeschossen werden. Der Durchmesser der Partikel beträgt hierbei ca. 1  $\mu\text{m}$ . Allerdings kann man mit dieser Methode nur oberflächliche Gewebeschichten erreichen.

Mit Liganden-DNA-Komplexen erreicht man eine höhere Zellspezifität des Gentransfers, allerdings ebenfalls bei geringerer Effizienz als mit den viralen Vektoren. Hierbei wird die Fremd-DNA an Liganden von Oberflächenrezeptoren der Zielzelle gebunden. Bindet der Komplex dann mit dem Liganden an seinen Rezeptor, wird er endozytotisch in die Zielzelle aufgenommen. Mit dieser Methode stellt sich das Problem, dass die aufgenommene DNA von zelleigenen Lysosomen abgebaut werden kann.

Bei der Kalziumphosphat-Technik wird die DNA in der Form von feinkörnigen Kalziumphosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endozytose aufgenommen. Das Präzipitat erhält man durch Mischung einer DNA/Kalziumchlorid-Lösung mit einer Lösung, die Phosphat-Ionen enthält.

Beim Elektroporationsverfahren werden die Zellmembranen der in Suspension befindlichen, exponentiell wachsenden Empfängerzellen, durch kurze (10  $\mu\text{s}$ ) elektrische Pulse hoher Feldstärke (ca. 12,5 kV/cm) für hochmolekulare Moleküle durchlässig gemacht, bevor man sie der DNA-Lösung aussetzt. Dieses Verfahren, das auch als Elektrotransfektion bezeichnet wird, eignet sich für eine Vielzahl von Zellarten und Spezies und ist in vielen Fällen auch dann anwendbar, wenn

andere Methoden versagen. Eine Variante der Transfektionstechniken ist der sogenannte Chromosomen-vermittelte Gentransfer, bei dem nicht DNA, sondern Chromosomen in die Zellen eingeschleust werden. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigt die Machbarkeit eines nonviralen Gentransfers, jedoch wird zugleich klar, dass alle genannten nonviralen Mechanismen bezüglich der Transfektionseffizienz noch nicht voll befriedigen können.

Wolff et al. (1990: 1465) transfizierten Skelettmuskel erfolgreich durch Injektion nackter DNA. Jedoch blieb die Transfektionseffizienz sehr niedrig. Sowohl Goomer et al. (2000: 189 und 2001: 248) als auch Madry und Trippel (2000: 286) verwendeten Liposomen zum Gentransfer an Chondrozyten in vitro. Doch blieb auch in diesen Arbeiten die Expressionsrate mit 0,5 % sehr niedrig. Rodin et al. (2000: 197) machten sich zur Transfektion am Knorpel eine sogenannte Genkanone zu Nutze, jedoch zeigten auch ihre Versuche niedrige Erfolgsraten.

#### **4.7.1. Effektivität einer Transfektion isolierter adulter Chondrozyten mit Liposomen**

Unter den nichtviralen Gentransfermethoden ist die Transfektion mit Liposomen die am häufigsten verwendete Methode (Caplen et al., 1995: 603). Für Liposomen sind die wohl ausführlichsten pharmakokinetischen Studien unter den Gentransfersystemen durchgeführt worden (Ledley, 1995: 1129). Es ist eine große Bandbreite an verschiedenen Transfersystemen, die die Methode der liposomalen Transfektion verfolgen, verfügbar. Die Technik beruht auf den elektrischen Ladungseigenschaften der DNA, kationischer Lipide und der Zelloberfläche. Die Transgenexpression wird mit durchschnittlich 1-3 Wochen angegeben (Zhu et al., 1993: 209). In Versuchen aus unserem Labor wurde die Transgenexpression bei beiden verwandten Systemen nur einmalig initial untersucht und es können so keine Aussagen über die Stabilität der Transfektion über einen längeren Zeitraum gemacht werden. Alton et al. (1993: 135) konnten nach Applikation eines DC-chol-DOPE-Aerosols und dem  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen bei Mäusen eine Blaufärbung, als Ausdruck einer erfolgreichen Transfektion, von mindestens 40 % des respiratorischen Epithels von Trachea und Hauptbronchien nachweisen. Yamamoto et al. (1999: 241) konnten in ihren Versuchen nach liposomaler (Lipofectamine®) Transfektion in vitro eine Effizienz von bis zu 80 % an 293T Zellen erreichen. Neuhuber et al. (2002) zeigten in vitro eine Expressionsrate nach Transfektion von 20-30 % an Skelettmuskelzellen. Im Vergleich zu unseren Versuchen führte seine Gruppe die Transfektion an der gleichen Population jedoch mehrmals aus. Liposomen wurden in der Vergangenheit auch zum Gentransfer an Chondrozyten in vitro angewandt (Goomer et al., 2000: 189 und 2001: 248; Madry und Trippel, 2000: 286). Madry und Trippel (2000: 287) konnten unter Verwendung des Transfersystems Lipofectamine® am

humanen hyalinen Knorpel eine Genexpression von ca. 0,5 % *in vitro* nachweisen. Diese Ergebnisse sind denen aus unseren Arbeiten vergleichbar. In unseren Versuchen wurde eine sehr niedrige Transfektionseffizienz von lichtmikroskopisch abgeschätzt 0,1 % erreicht. Auf Grund dieser niedrigen Expressionsraten wurde die Methode der liposomalen Transfektion mit Lipofectamine® nicht weiter verfolgt und lediglich zum Vergleich herangezogen. Deutlich bessere Ergebnisse konnten wir in unseren Versuchen mit der Verwendung des Gentransfersystems Fugene® erzielen. Expressionsraten stiegen dabei auf 9 % exprimierende Zellen. Diese Ergebnisse liegen in den Bereichen, die andere Arbeitsgruppen erreichen konnten. Für Chondrozyten, aus Kaninchenknorpel gewonnen, konnten Madry und Trippel (2000: 287) mit dem Gentransfersystem „Fugene®“ eine Transfektionseffizienz von 9 % zeigen. Eine Toxizität an den Zellen war nicht nachweisbar. Dinser et al. (2001: 69) transfizierten Chondrozyten ebenfalls mit Fugene®. Die Expression, quantifiziert durch EGFP, betrug *in vitro* 42 %. Die Methode der liposomalen Transfektion lässt sich sicher optimieren.

#### **4.7.2. Transfektion mit dem Tetrazyklin-induzierbaren Plasmid tetlacZ mittels Fugene®**

Die Methode der induzierbaren Gentherapie wurde in hier dargestellten Versuchen nur in Grundzügen bearbeitet. Bedeutender Vorteil der induzierbaren Gentherapie besteht darin, dass die Applikation des zur Reparatur benötigten Proteins zu bestimmten Zeitpunkten ermöglicht wird und so eine nicht benötigte Produktion, die zu unkontrolliertem Wachstum führen könnte, ausbleibt. Verschiedene induzierbare Genexpressionssysteme wurden beschrieben (Mills et al., 2001: 1461). In dieser Arbeit wurde das induzierbare Plasmid tetlacZ durch nichtviralen Gentransfer auf die Chondrozyten übertragen. Die Induktion geschah durch Doxyzyklin. Lamartina et al. (2002: 199) zeigten in ihren Versuchen *in vitro* und *in vivo* eine gute Kontrolle der Transgenexpression nach nicht-viraler Transfektion induzierbarer Gene, sowie im Vergleich zur Kontrolle eine gesteigerte Genexpression nach Induktion. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Koponen et al. (2003: 459) unter Anwendung von Lentiviren. In den von uns unternommenen Versuchen *in vitro* konnte ebenfalls die Expressionsrate nach Induktion gesteigert werden. Das tet-kontrollierte System wurde zuvor schon in verschiedenen Zellen (Howe et al., 1995: 14168), in transgenen Mäusen (Furth et al., 1994: 9302; Shockett et al., 1995: 6522), im Photorezeptor-System (Chang et al., 2000: 4281), im Herzen (Fishman et al., 1994: 1864), im Gehirn (Haberman et al., 1998: 1604; Mansuy et al., 1998: 257) und im Skelettmuskel (Dhawan et al., 1995: 233; Lamartina et al., 2002: 199) beschrieben.

## 4.8. Virale Vektoren

Der Gentransfer mit Hilfe viraler Vektoren ist effizienter als der mit nonviralen Methoden. Werden Viren verwendet, muß man sie verändern, so dass sie sich in der Zielzelle nicht mehr replizieren können und somit nicht selbst weitere Zellen infizieren. Die für die Vermehrung fehlenden Funktionen werden bei der Synthese dieser Viren entweder durch Helferviren bereitgestellt oder durch sogenannte Verpackungszelllinien (KB-, HeLa, HEK-, oder 293-Zellen), die ein in ihr Genom integriertes, mutiertes Provirus tragen, ersetzt. Als virale Vektoren können Retroviren, Adenoviren, Vaccinia-Viren oder Herpes-Simplex-Viren eingesetzt werden. In den Versuchen aus dieser Arbeit wurde lediglich auf Retroviren zurückgegriffen.

### 4.8.1. Retroviren

Retroviren wurden 1910 erstmals von Rous beschrieben (Rous-Sarkom). Sie sind Mitglied der Familie der Retroviridae. Als einzige RNA-Viren besitzen sie onkogenes Potential. Nach morphologischen Kriterien lassen sich die Subfamilien Spumavirinae, Oncovirinae und Lentivirinae abgrenzen. Zuletzt angesprochene Klasse verspricht durch die Fähigkeit auch sich nicht teilende Zellen zu infizieren, bei sonst mit Retroviren vergleichbaren Eigenschaften, eine klinische Zukunft, welche auch schon angewandt wurde (Kafri, 2001: 316; Trono, 2001: 19). Der Nachweis von Retroviren gelang bisher in Bandwürmern, Insekten, Fischen, Reptilien, Vögeln und Säugern. Als erstes infektiöses menschliches Retrovirus wurde 1978 HTLV 1 (human T-cell lymphotropic virus Typ 1) isoliert. Retroviren verursachen Leukämien, Lymphome, Sarkome und andere Tumoren mesodermaler Herkunft (Mamma, Leber, Niere) sowie Autoimmunkrankheiten und Immundepression (z.B. HIV).

Retrovirale Vektoren wurden in mehr als 2/3 aller bisher durchgeführten klinischen Studien verwendet (Herrmann et al., 1996: 145). Retroviren sind umhüllte, kugelförmige einzelsträngige RNA-Viren, die nach der Infektion der Wirtszelle, virale Proteine (reverse Transkriptase) nutzen, um RNA in DNA umzuwandeln, um diese anschließend in das Genom dieser einzuschleusen. Die meisten retroviralen Vektoren basieren auf dem Moloney Murin Leukämie Virus, der nur sich aktiv teilende Zellen infizieren kann. Retroviren haben eine lange Geschichte bei Infektionen zwischen verschiedenen Spezies (Weiss et al., 1998: 391 und 1999: 171). Sie sind verantwortlich für eine Reihe von zoonotischen Geschehnissen (Transmission von infektiösem Agens von Tier zu Mensch), wodurch klar wird, dass sie dazu imstande sind, DNA in den Menschen zu tragen (Weiss et al., 1998: 391). Das retrovirale Genom ist relativ simpel und macht es einfach,

rekombinante virale Vektor-Partikel, die unfähig zur Replikation sind, zu reproduzieren (Shinnick et al., 1981: 543; Romano et al., 1999: 361). Retrovirale Vektoren wurden schon in klinischen Studien zur Krebsbehandlung (Romano et al., 1999: 361), bei monogenen Krankheiten (Romano et al., 1999: 361) und zur Behandlung von AIDS (Cooper et al., 1999: 294) angewandt. Auch zum in vitro Transfer von Genen in Knorpelzellen wurden retrovirale Vektoren in der Vergangenheit angewandt (Evans et al., 1996: 1261; Kang et al., 1997: 139; Mason et al., 1998: 1098). Die für die Wachstumsfaktoren codierenden Gene BMP-2, IGF-1 und TGF- $\beta$  wurde in vitro in Chondrozyten transferiert, wodurch anschließend eine gesteigerte Proteoglykan-Synthese in der Zellkultur nachgewiesen werden konnte (Smith et al., 2000: 1156).

Da die meisten retroviralen Vektoren auf dem Moloney Murin Leukämie Virus basieren, können sie lediglich sich aktiv teilende Zellen infizieren. Folgedessen kann dieser Virus nicht zur direkten Gentherapie an sich nicht mehr teilenden, postmitotischen Zellen, wie z.B. Chondrozyten in vivo, verwendet werden (Nita et al., 1996: 820). Ein weiterer Nachteil der Retroviren besteht in ihrem onkogenen Potential. Die Gefahr geht dabei von replikationskompetenten Retroviren (RCR) mit dem Risiko der Vektor-induzierten malignen Transformation aus. Tatsächlich wurde die Entstehung aggressiver T-Zell-Lymphome in 3 von 5 Primaten dokumentiert, die hämatopoetische Stammzellen erhalten hatten, welche mit RCR-positiven Virusproben kontaminiert waren (Donahue et al., 1992: 1125).

Jedoch besitzen Retroviren einige große Vorteile im Vergleich zu anderen Vektorsystemen. Sie verfügen zum einen über eine sehr gute in vitro-Transfereffizienz für ein weites Spektrum proliferierender Zellen und erzielen zum anderen durch die Integration in das Genom der Wirtszelle eine Langzeitexpression des Transgens, da es durch die Integration in das Genom der Zielzelle eine Weitergabe an Tochterzellen gewährleistet (Varmus, 1982: 812; Mulligan, 1993: 926; Kang et al., 1997: 139; Robbins und Ghivizzani, 1998: 35). Vor allem die Langzeitexpression wurde bisher durch kein anderes Vektorsystem erreicht. Bezüglich der Transduktionseffizienz waren bisher nur Adenoviren in der Lage, gleiche Ergebnisse zu erzielen. Des weiteren besitzen sie ein nur sehr niedriges antigenes und immunogenes Potential, welches sie zusätzlich neben der Langzeitexpression gegenüber z.B. Adenoviren überlegen macht.

#### **4.8.2. Struktur und Infektionszyklus**

Retroviren sind im Durchmesser 80-140 nm groß. An den zwei Hüllproteinen befinden sich 8 nm lange Glykoproteinrezeptoren (sog. Spikes oder Enterhaken). Im Inneren sind vier unglykolysierte Strukturproteine zu erkennen. Der Innenkörper (core) ist von einem ikosaedrischen Kapsid

umhüllt und beinhaltet zwei identische, helikal-symmetrische Einzelstrang-RNA-Moleküle. Diese enthalten 50 Gene sowie daran angeheftet 20-70 Moleküle der reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase). Die Information des infektiösen Virus ist in drei Genen gespeichert: 5-gag-pol-env-3. Das Gag-Gen kodiert für innere Proteine, das Pol-Gen für die reverse Transkriptase und das Env-Gen für die Hüllproteine. Im Verlauf der Replikation katalysieren diese Hüllproteine, abhängig von der zu infizierenden Zellart, eine Fusion zwischen Virushülle und Zelloberflächenrezeptor der Wirtszelle. Nach einer solchen Membranverschmelzung wird das Virus internalisiert, der Core gelangt ins Cytoplasma und von dort aus in den Zellkern. Die einsträngige Virus-RNA wird von der reversen Transkriptase in eine doppelsträngige cDNA-Zwischenstufe transkribiert. Diese wird als Provirus in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Der Core kann bei Oncovirinae (anders als bei Lentivirinae) eine intakte Nuklearmembran nicht passieren, daher ist eine Zellteilung für die erfolgreiche Fortführung des viralen Lebenszyklus erforderlich. Die Integration des Provirus in das Genom erfolgt zufällig, möglicherweise mit einer leichten Häufung in transkriptionell aktive Bereiche. Es entsteht immer die Abfolge LTR-Gene-LTR. Die beiden identischen Long terminal repeats (LTR) begrenzen das integrierte Provirus auf beiden Seiten und beinhalten regulatorische Sequenzen (Promoter, Enhancer, Poly-A-Schwanz). Dazwischen liegen die viralen Gene gag, pol und env. Aus Full-length-Transskriptionsprodukten werden gag- und gag-pol-Polyproteine translatiert, aus einem kleineren gespleißten Transkript entsteht env. Ein weiteres Full-length-Transkript wird als genomische RNA verpackt. Die genomische RNA bindet über ihre 5' gelegene Verpackungssequenz (Psi) an das gag-Polyprotein, während die gag- und gag-pol-Polyproteine oligomerisieren. Die gebildeten Komplexe verlassen die Zelle über einen als Budding bezeichneten Prozess, bei dem das Kapsid von Bereichen der Plasmamembran, in die sich die viralen Hüllproteine eingelagert haben, umschlossen wird. Infektiösität erreichen die Viren dann durch Protease-vermitteltes Schneiden der gag- und gag-env-Polyproteine in ihre einzelnen Bestandteile. Dieser gesamte Prozeß der Virusproduktion scheint die Wirtszelle nicht zu beeinträchtigen. Beobachtungen aus unserem Labor zeigten, dass Chondrozyten durch die Infektion in ihrer Funktion und Vitalität nicht beeinflusst wurden.

#### **4.8.3. Züchtung rekombinanter Retroviren**

Da sich Viren nur in Zellen vermehren können, bedient man sich auch in der Gentherapie der Zellkultur zur Virusreproduktion. Bei der Herstellung einer Virus-produzierenden Zelllinie wird ein volles retrovirales Genom, dem jedoch die Verpackungssequenz fehlt, auf eine andere Zelllinie

transient transfiziert (z.B. 293T Zellen). Für die Fremdgene der Versuche in dieser Arbeit wurde der Promotor des Cytomegalie-Virus (CMV) verwendet.

Die transiente Transfektion erfolgte in der hier beschriebenen Arbeit mittels Calcium Phosphat Präzipitation. Es wurden Viruspartikel gebildet, die leer bleiben. Eine solche Zelllinie nennt man Verpackungszelllinie (VPC). Es wurde ein retrovirales Plasmid transfiziert, bei welchem gag, pol und env durch das Transgen ersetzt wurden und das aufgrund seiner erhaltenen Verpackungssignalsequenz von den leeren Viruspartikeln gebunden werden kann. Die VPC geben Viren in den Zellkulturüberstand ab, die eine Zielzelle einmalig infizieren können und auch zur Integration ins Wirtszellgenom mit Expression eines Transgens befähigt sind, aber keine neuen Virusstrukturelemente aufbauen können, also replikationsinkompetent sind. Die Aufnahmekapazität für Fremd-DNA beträgt bis zu 8 kb, was, je nach Gengröße, 1-3 Transgenen entspricht. Die Expression kann von einem einzelnen Promoter, gewöhnlich der 5'-LTR, gesteuert werden.

#### **4.8.4. Effektivität einer Transduktion isolierter adulter Chondrozyten mit Retroviren**

Schon in mehreren Studien wurde die Methode des viralen Gentransfers an Chondrozyten *in vitro* beschrieben (Arai et al., 1997: 1787; Wehling et al., 1997: 1092; Doherty et al., 1998: 153; Evans et al., 2000: 16). Auch Retroviren im besonderen wurden zur Knorpelbehandlung herangezogen (Evans et al., 1996: 1261; Kang et al., 1997: 139; Mason et al., 1998: 1098). Reinecke et al. (1997: 412) infizierten erfolgreich isolierte adulte Chondrozyten retroviral mit dem Markergen lacZ *in vitro*. Hirschmann et al. (2002: 109) infizierten isolierte Chondrozyten mit einem GFP-tragenden Gen retroviral. Erzielte Transduktionseffizienzen lagen zwischen 60-90 %. In zweidimensionaler Kultur konnte die Expression über 8 Monate aufrechterhalten werden. Die in unserem Labor erreichten Effizienzen betragen für das Gen EGFP im Schnitt 75 % und decken sich mit den eben angesprochenen Ergebnissen. Jedoch gingen unsere Zellkulturen auf Grund der Toxizität des von uns verwendeten EGFP nach ca. 2 Monaten zugrunde. Adachi et al. (2002: 1920) isolierten Chondrozyten und infizierten sie *ex vivo* retroviral mit lacZ. Die erreichten Effizienzen betragen initial zwischen 93 % und 95 %. Diese Ergebnisse entsprechen denen aus unseren Versuchen, wobei wir Effizienzen von durchschnittlich 85 % erreichen konnten. Nach 4 Wochen reduzierte sich die Effizienz in den Versuchen von Adachi et al. (2002: 1926) auf 76-84 %. Eine Reduktion der Effizienzrate ist auch in einigen anderen Arbeiten schon beschrieben worden. Diese Expressionsreduktion trat im besonderen bei der Arbeit mit Primärkulturen auf. Cytosin-Methylierung und sogenannte somno-Komplexe scheinen ursächlich zu sein (Pannell et al., 2001:

205; Swindle et al., 2002: 449; Iba et al. 2003: 99). Ebenso in unseren Versuchen konnte eine Reduktion der Effizienzrate nach 4 Wochen beobachtet werden, jedoch fielen die Expressionsraten auch nach 12 Wochen Beobachtungszeitraum nicht mehr als 20 % vom initial gemessenen Ausgangswert ab. Im zweiten Teil ihrer Versuche implantierten Adachi et al. (2002: 1920) die Chondrozyten in künstliche osteochondrale Defekte von Kaninchen. Eine Genexpression konnte nach Opferung in der histologischen Aufbereitung erkannt werden. In gleichem Versuchsaufbau kamen wir bei unseren Arbeiten zu ähnlichen Ergebnissen. Aussagen über eine genaue Expressionsrate konnten nicht getätigt werden. Gründe hierfür bestehen unter anderem in der Einwanderung nicht-transduzierter Zellen aus ortsständigem Knorpel der Randbereiche, welche keine Genexpression zeigen können, in Zonen der implantierten Zellen. Solch eine Vermischung bringt notwendigerweise falsch niedrige Ergebnisse hervor. Andere Autoren kamen nach retroviralem Gentransfer an Chondrozyten in vitro nicht über 31 % (Musgrave et al., 2000: 290). Goto et al. (1999: 918) zeigten an isolierten Meniskuszellen eine Expressionsrate zwischen 10 und 20 %, nachgewiesen mit Hilfe des Markergens lacZ. Baltzer et al. (1999: 419) zeigten eine lacZ-Effizienz nach Infektion durch einen Retrovirus an isolierten Osteoblasten in vitro von 60 %.

Carlberg et al. (2001: 128) infizierten mesenchymale Zellen retroviral mit einem BMP-2 tragenden Gen. Die Transduktionseffizienz betrug immunhistochemisch nachgewiesen 90-95 %. Die Funktionalität des Zytokins zeigte sich durch Produktion von Aggrecan und Kollagen-Typ 2 in der Zellkultur. Auch in unseren Versuchen unternahmen wir retrovirale Transduktionen mit dem BMP-2-tragenden Gen an in vitro kultivierten Chondrozyten. Der Nachweis über Transduktionseffizienzraten wurde nicht unternommen. Jedoch produzierten die Zellen über einen beobachteten Zeitraum von 3 Monaten in vitro BMP-2. Ikeda et al. (2000: 990) beschrieben die erfolgreiche Kultivierung transduzierter Chondrozyten auf künstlichem Trägermaterial. Auch in unserem Labor gelang die Besiedelung künstlicher Matrices durch transduzierte Chondrozyten. Des weiteren konnten die sich auf der Matrix befindlichen Zellen eine Genexpression zeigen.

#### **4.9. Histochemische Untersuchung nach lacZ-Gentransfer**

Lichtmikroskopische Analyse der lacZ-Genexpression beruht auf einer Blaufärbung, die sich nach Behandlung der Zellen mit dem Substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal) ergibt. Solch eine histochemische Anfärbung zeigt nicht, ob das Genprodukt anwesend ist, sondern ob es aktiv ist (Couffinhal et al., 1997: 929). Diese Hypothese sagt aus, dass die erfolgreiche Genexpression nach X-Gal-Färbung falsch niedrig angegeben werden kann. Bezogen

auf in vitro Versuche aus unserem Labor kann diese Aussage nicht unterstützt werden, da wir zumindest in den ersten zwei Monaten nach Transduktion Effizienzzraten von durchschnittlich 85 % erreichten. Jedoch kann diese Hypothese bezüglich der von uns unternommenen in vivo Untersuchungen unterstützt werden. In Histologien, die drei Wochen nach Implantation lacZ-markierter Chondrozyten angefertigt wurden, zeigten nach X-Gal-Färbung nicht 85 % der Zellen eine Expression, wie es die in vitro-Versuche erwarten ließen. Couffinhall et al. (1997: 929) wandten die X-Gal-Färbemethode nach in vivo Transfektion von nackter DNA, die für lacZ codiert, an. Eine Transfektionseffizienz von lediglich 0,015 % wurde durch die X-Gal-Färbemethode erreicht. Jedoch nach immunhistochemischer Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper anti- $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) zeigte sich eine Transfektionseffizienz von 0,64 %. Das entspricht einer 42,9fach höheren Anzahl an Zellen, die als positiv erkannt wurden. Zabner et al. (1994: 585) und Rios et al. (1995: 2241) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Im besonderen Transfektionseffizienzen nach nichtviralem Gentransfer (Nabel et al., 1993: 844; Isner et al., 1996: 370), die durch X-Gal-technische Anfärbung kontrolliert wurden, können bei erreichten Effizienzen von kleiner 0,1 % in Frage gestellt werden. Gründe für solche falsch niedrige Ergebnisse mögen darin liegen, dass für einen optimalen Färbevorgang durch X-Gal gewisse Variablen erfüllt sein müssen. Neben einer hohen enzymatischen Aktivität des Proteins, muß sowohl die Temperatur im optimalen Bereich liegen, als auch der Zeitpunkt des Färbevorgangs genau richtig gewählt werden (Fire, 1992: 151). Zumindes in vitro kann die Sensitivität durch FACS-Analyse nach Behandlung mit FDG (Nolan et al., 1988: 2603; Fiering et al., 1991: 291; Zabner et al., 1994: 585) verbessert werden. Zum Nachweis eines erfolgreichen Gentransfers wurden in unseren Versuchen lediglich die X-Gal-Färbemethode für in vitro und in vivo Versuche angewandt. Die FACS-Analyse nur für in vitro Versuche. Neben den oben angesprochenen Problemen bei der X-Gal-Färbung in vivo tritt bei den in unseren Versuchen angefärbten Kaninchen-Knie-Präparaten des weiteren das Problem der Eindringtiefe der Färbereagens auf. Die von den Knorpelzellen, auch wenn in dieser Versuchsreihe nur minderwertig, aufgebaute extrazelluläre Matrix verhindert ein Eindringen des X-Gal in die Tiefe des Defektes und lässt so die Frage nach bestehender Transduktion an in der Tiefe befindlichen Zellen offen. Daraus kann geschlossen werden, dass die von uns gezeigten in vivo Ergebnisse, die eine erfolgreiche Transduktion durch lacZ zeigen, wahrscheinlich falsch niedrige Ergebnisse präsentieren. Die guten histologischen Resultate bei unseren in vivo Implantaten mit BMP-2-transduzierten Zellen lassen den Schluß zu, dass erzielte Transduktionsraten höher waren, als sie die in vivo Vorversuche mit lacZ-markierten Zellen erwarten ließen. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass Vergleichshistologien ohne die Wirkung von BMP-2 deutlich schlechter ausfielen.

#### **4.10. Gentransfer am Knorpel mit Wachstumsfaktoren als Transgen**

Die Tatsache, dass Chondrozyten in vivo ausschließlich eingebettet in ihrer extrazellulären Matrix aufzufinden sind, macht einen in vivo Gentransfer sehr schwierig (Ikeda et al., 1998: 1666). Gleiches Problem stellt sich bei der direkten Applikation von Wachstumsfaktoren (Howell et al., 1997: 124). Mehrere Studien zeigten jedoch, dass isolierte adulte Chondrozyten sehr gut ex vivo transduziert werden können und erfolgreich wieder transplantiert wurden (Baragi et al., 1995: 2454; Kang et al., 1997: 139; Doherty et al., 1998: 153). Am Knorpel wurde der Gentransfer bereits in einigen anderen Studien zuvor beschrieben (Evans et al., 1996: 1261; Kang et al., 1997: 139; Mason et al., 1998: 1098). Ebenfalls die Anwendung von bestimmten Wachstumsfaktoren durch viralen Transfer in der Therapie des Knorpelschadens wurde in einigen Studien zuvor publiziert (Arai et al., 1997: 1787; Smith et al., 2000: 1156). Shuler et al. (2000: 585) zeigten in ihren Versuchen, dass isolierte, viral für das TGF- $\beta$ 1-Gen codierende, infizierte Chondrozyten in vitro den Wachstumsfaktor exprimieren konnten. Moller et al. (2000: 75) infizierten isolierte Chondrozyten retroviral in vitro. Die nun das TGF- $\beta$  1-Gen tragenden Zellen zeigten in vitro biologische Reaktionen auf den Wachstumsfaktor.

Mason et al. (1998: 1098) benutzten einen retroviralen Vektor, um mesenchymale Zellen mit einem für den Wachstumsfaktor BMP-7 tragenden Gen zu transduzieren. Diese Zellen wurden, auf ein Trägermaterial besiedelt, verwendet, um osteochondrale Defekte am Kaninchen zu decken. Im Vergleich mit Kontrollen wurde eine verbesserte Heilung erreicht. Unter gleichen Versuchsbedingungen, jedoch adulte Chondrozyten und den Wachstumsfaktor BMP-2 verwendend, zeigten die Versuche aus unserem Labor vergleichbare Ergebnisse. Die Arbeitsgruppen um Hidaka et al. (2001: 751), in diesem Fall jedoch BMP-7 einsetzend, kamen mit den gleichen Methoden zu ähnlichen Resultaten. Musgrave et al. (2002: 6) transduzierten viral Skelettmuskelzellen mit dem BMP-2 tragenden Gen in vitro. Diese Zellen wurden wieder in vivo injiziert und produzierten dort BMP-2. Carlberg et al. (2001: 128) zeigten, dass retroviral mit dem BMP-2-Gen transduzierte mesenchymale Zellen in vitro einer chondrogenetischen Differenzierung unterlagen. Diese Versuche unterstreichen das Potential von sowohl Retroviren als auch das von BMP-2.

#### **4.11. Andere Ansätze für die Therapie von Knorpelschäden**

Bei der Verwendung von Wachstumsfaktoren gibt es bereits mehrere Ansätze, die experimentell untersucht wurden. Neben dem von uns verwendeten BMP-2 wurden der transforming growth

factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), der insuline-like growth factor (IGF-I), der platelet-derived growth factor (PDGF), interleukin-4 (IL-4), das bone morphogenetic 4 und 7 (BMP-4 und BMP-7) und der fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in der Knorpelzellbehandlung verwendet. Bezüglich ihrer Wirkung auf einzelne bestimmte Komponenten der extrazellulären Matrix zeigten sie teilweise verschiedene Effekte. Ebenso deren Applikation wurde auf verschiedenen Schritten wie der unsere erreicht. Hauptsächlich wurden die Zellen durch direkte Gabe von rekombinatem Wachstumsfaktor beeinflusst oder durch virale Transduktion mittels Adenoviren zur Eigensynthese gebracht. Beim Tissue Engineering verwenden neueste Arbeiten gehäufte Bioperfusionskammern. Einige arbeiten lediglich mit Durchfluß-Technik, andere unter Verwendung hydrostatischer oder mechanischer Drücke, wodurch das Knorpelzell-Matrix-Konstrukt in vitro dem Milieu in vivo näher gebracht werden soll.

Der in dieser Arbeit angewandte Versuchsaufbau, retrovirale Transduktion für BMP-2 und anschließendes Tissue Engineering, zeigt eine sinnvolle Kombination der Matrix-gekoppelten Transplantation autologer Chondrozyten mit einer effizienten, gentechnisch ermöglichten, Anwendung eines Wachstumsfaktors, dessen Wirkung nachweislich förderlich in der Heilung von Knorpeldefekten ist.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Versuch das für den Wachstumsfaktor BMP-2 codierende Gen mit Hilfe von retroviralen Vektoren ex vivo in Chondrozyten einzuschleusen und nach Transplantation der autologen Knorpelzellen dieses in vivo zu exprimieren. Durch Tissue Engineering wurden, sich in dreidimensionaler Umgebung befindliche transduzierte Knorpelzellen, zur Transplantation generiert. In Vorversuchen wurde die Transduktionseffizienz und die Stabilität eines solchen Gentransfers durch die Markergene lacZ und EGFP in vitro und in vivo etabliert, sowie mit Methoden eines nichtviralen Gentransfers verglichen. In Grundzügen wurde in vitro die induzierbare Gentherapie untersucht.

Geschädigter Knorpel zeigt kein eigenes Heilungspotential. Entstandene Defekte enden meist in schmerzhaften arthrotischen Veränderungen und bereiten noch immer therapeutische Probleme.

Ein sinnvolles Therapieverfahren des Knorpeldefektes stellt die Knorpelzelltransplantation dar. Probleme in der autologen Chondrozytentransplantation bestehen jedoch in der zweidimensionalen Kultur der Knorpelzellen. Bereits nach kürzester Zeit bilden, die sich nach Biopsie ursprünglich rund und klein darstellenden Chondrozyten, Zellausläufer und weisen eine fibroblastenartig, hypertrophe, flache Morphologie auf. Dieser Prozeß der Dedifferenzierung stellt eine der größten Herausforderungen in der zellkulturellen Arbeit mit Knorpel dar. Um dem entgegenzuwirken, wurde eine dreidimensionale Zellkulturmethode im Sinne des Tissue Engineering eingeführt. Mit dieser Methode können Chondrozyten ihrer natürlichen Umgebung, der extrazellulären Matrix, nahekommend, kultiviert werden. Auf diese Art und Weise kann in vitro dem Prozeß der Dedifferenzierung entgegengewirkt und sogar eine Redifferenzierung erreicht werden. Dreidimensional engineerter Knorpel zeigt so schon weit vor Transplantation eine genuine Phänotypie und hält so das Potential zu einer weit besseren Defektheilung inne, als sie von zweidimensional kultivierten Zellen zu erwarten wäre. Die dreidimensionale Kulturmethode erwies sich in unseren Versuchen als ein gut funktionierendes Verfahren. In der Art kultivierte Chondrozyten zeigten im Verlauf phänotypisch bessere Eigenschaften als dedifferenzierende Zellen aus zweidimensionaler Kultur. In vitro konnten Merkmale wie Redifferenzierung und Matrixsynthese beobachtet werden. In vivo konnten diese tissue-engineerten Konstrukte als guter Transferträger differenzierter Chondrozyten, sowie durch eine gute Integration in das Empfängergewebe in der Heilung künstlicher osteochondraler Defekte überzeugen.

Als ergänzendes Therapieverfahren verspricht die Anwendung von Wachstumsfaktoren weitere Möglichkeiten in der Behandlung von Knorpeldefekten. Durch sie erzielte Effekte können sowohl die sich ortsständig im Defekt befindlichen Chondrozyten, als auch durch autologe Chondrozytentransplantation eingebrachte Knorpelzellen durch eine Vielzahl von förderlichen Faktoren eine Knorpelheilung erbringen. Ein Hauptproblem stellt jedoch ihre Applikation an den Ort des Defektes dar. Als Lösung ermöglicht die Gentherapie eine sehr effiziente Verwendung solcher Wachstumsfaktoren. Das Problem der Gentherapie wiederum besteht in dem Transfer des Fremdgens. Nonvirale Transfermethoden erweisen sich auf Grund einer minimalen Immunogenität sicherer als virale Methoden und sind zudem einfacher in der Produktion, jedoch stellen sehr niedrige Transfereffizienzen ihren therapeutischen Nutzen in Frage. Virale Methoden gewährleisten eine weit höhere Transfereffizienz, sind aber auf Grund von in der Vergangenheit aufgetretenen Nebenwirkungen risikobehaftet. In dieser Arbeit ausschließlich verwendete Retroviren erzeugen nach ihrem Gebrauch fast keine immunologische oder antigene Reaktion auf transduzierte Zielzellen und gewährleisten zugleich eine stabile und hocheffiziente Transduktion einer großen Menge an Fremd-DNA. Um die Effektivität des Gentransfers an Chondrozyten zu quantifizieren, wurden in dieser Arbeit Marker- bzw. Reportergene verwendet. Dazu wurden adulte Chondrozyten isoliert und *in vitro* mit für die Markergene lacZ- und EGFP-codierenden Genen retroviral transduziert oder nonviral transfiziert. Eine anschließende Färbung mit X-Gal, bzw. eine Analyse durch FACS zeigte eine positive Reaktion von durchschnittlich 85 % der Chondrozyten nach retroviraler Transduktion im Falle des lacZ und im Schnitt 75 % im Falle des EGFP. Die untersuchte Langzeitexpression des Transgens lacZ erwies sich über einen Zeitraum von 12 Wochen als stabil. Nach liposomaler Transfektion mit lacZ konnte *in vitro* eine Effizienz von maximal 9 % erreicht werden. In Grundzügen wurde die induzierbare Gentherapie angewandt, welche in Zukunft eine Regulation der Expression von Wachstumsfaktoren, die am Gewebe auch zu überschießendem Wachstum führen können, ermöglichen könnte. *In vitro* zeigten 6,6 % der induzierten Chondrozyten nach X-Gal-Färbung eine Genexpression, während in der nicht-induzierten Kontroll-Gruppe nach X-Gal-Färbung weniger als 0,8 % der Chondrozyten eine Genexpression zeigten.

Für die *in vivo*-Gentransfer-Versuche wurden lediglich lacZ-transduzierte Chondrozyten verwendet. Diese lacZ-markierten Zellen wurden dreidimensional auf einem Kollagengerüst kultiviert und *in vivo* implantiert. Noch drei Wochen nach Implantation konnte histologisch eine Genexpression im Defekt nachgewiesen werden.

Ziel des letzten Teils der Arbeit war die Kombination von Tissue Engineering des Knorpels in Verbindung mit der effizienten Applikation eines Wachstumsfaktors durch Gentherapie. Schon

diverse Wachstumsfaktoren haben sich in ihrer Wirkung auf Knorpelzellen ausgezeichnet. In dieser Arbeit wurde das Bone Morphogenetic Protein-2 verwandt. Es zeigt Einfluß auf Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese von Knorpelzellen. Das BMP-2-Gen wurde ausschließlich ex vivo retroviral auf die Zielzellen übertragen. Transduzierte Knorpelzellen produzierten in vitro über einen beobachteten Zeitraum von 3 Monaten BMP-2. Genaue Aussagen über die quantitative Transduktionseffizienz konnten nicht gemacht werden. Ebenso wie in den Vorversuchen wurden das BMP-2-Gen tragende autologe Zellen dreidimensional auf einem Kollagengerüst kultiviert und für drei Wochen in vivo implantiert. Im Vergleich zu angelegten Kontrollen zeigten diese Konstrukte die beste Heilung der künstlich gesetzten osteochondralen Defekte. Eine gute Integration des implantierten Konstruktes, eine hohe Zahl transplantierte differenzierter vitaler Chondrozyten, sowie eine Matrixsynthese im Defekt konnten beobachtet werden. Ergebnisse aus diesem Versuchsteil wurden jedoch lediglich unter Anwendung verschiedener Färbemethoden histologisch begutachtet. Folgeversuche mit Analytik der Matrixbildung durch gentherapeutisch manipulierte Zellen, sowie die Untersuchung biomechanischer Aspekte der Chondrozyten-Trägermaterial-Konstrukte müssen abgewartet werden, um eine weitere Aussage über einen möglichen positiven Effekt von BMP-2 auf die Heilung osteochondraler Defekte zuzulassen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass der Gentransfer mittels Retroviren eine effiziente und durchführbare Methode zur Einschleusung von Transgenen in Chondrozyten in vitro darstellt. Der so integrierte Wachstumsfaktor BMP-2 verspricht durch seine Wirkung auf Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese der transplantierten Chondrozyten eine gute Knorpeldefektheilung. Ergänzt durch die dreidimensionale Kultur im Sinne des Tissue Engineering erfährt die autologe Transplantation von Knorpelzellen eine sinnvolle Modifikation und verspricht die Applikation des Wachstumsfaktors sinnvoll zu ergänzen.

In Zukunft wird es vielleicht möglich sein, durch die parallele Anwendung von zwei oder mehr Wachstumsfaktoren die Ergebnisse am Gewebe zu verbessern. Gleichzeitig könnte die Methode der induzierbaren Gentherapie die regulierte Applikation von Wachstumsfaktoren im Sinne einer Homöostase besser auf das Zielgewebe anpassen. Auch das Tissue Engineering kann eventuell durch eine optimale Anwendung einer druckgesteuerten Bioperfusionskammer dem genuine Knorpel sehr ähnliche Konstrukte bilden, ex vivo-Zeiten deutlich verkürzen und evtl. eine Kultur unter zweidimensionalen Bedingungen völlig überflüssig machen.

Der gentherapeutisch ermöglichte Einsatz von Wachstumsfaktoren und das Tissue Engineering werden auch in Zukunft eine sinnvolle Alternative in der Therapie des Knorpelschadens darstellen und kann sich eventuell irgendwann in der klinischen Routine etablieren.

## 6. Literaturverzeichnis

Abe Y, Miyake M, Miyazaki T, Horiuchi A, Sagawa T, Ono H, Kimura S. Nonspecific reaction in the sandwich immunoassay for human tumor necrosis factor-alpha (hTNF-alpha). *Clin Chim Acta* 1989, 15:223-9

Adachi N, Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han CW, Niyibizi C, Huard J. Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J Rheumatol* 2002, 29:1920-30

Alton EW, Middleton PG, Caplen NJ, Smith SN, Steel DM, Munkonge FM, Jeffery PK, Geddes DM, Hart SL, Williamson R. Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nat Genet* 1993, 5:135-42

Arai Y, Kubo T, Kobayashi K, Takeshita K, Takahashi K, Ikeda T, Imanishi J, Takigawa M, Hirasawa Y. Adenovirus vector-mediated gene transduction to chondrocytes: in vitro evaluation of therapeutic efficacy of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 gene transduction. *J Rheumatol* 1997, 24:1787-95

Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 1991, 9:330-40

Baltzer AW, Whalen JD, Stefanovic-Racic M, Ziran B, Robbins PD, Evans CH. Adenoviral transduction of human osteoblastic cell cultures: a new perspective for gene therapy of bone diseases. *Acta Orthop Scand* 1999, 70:419-24

Baragi VM, Renkiewicz RR, Jordan H, Bonadio J, Hartman JW, Roessler BJ. Transplantation of transduced chondrocytes protects articular cartilage from interleukin 1-induced extracellular matrix degradation. *J Clin Invest* 1995, 96:2454-60

Baragi VM, Renkiewicz RR, Qiu L, Brammer D, Riley JM, Sigler RE, Frenkel SR, Amin A, Abramson SB, Roessler BJ. Transplantation of adenovirally transduced allogeneic chondrocytes into articular cartilage defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 1997, 5:275-82

Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982, 30:215-24

Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R. Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J Orthop Res* 1998, 16:207-16

Blunk T, Sieminski AL, Gooch KJ, Courter DL, Hollander AP, Nahir AM, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 2002, 8:73-84

Bobic V. Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions. *Orthopade* 1999, 28:19-25

Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T, Smith J, Wozney J, Schildhauer T. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop* 1996, 327:272-82

Boyan BD, Schwartz Z, Swain LD, Khare AG, Heckman JD, Ramirez V, Peters P, Carnes DL Jr. Initial effects of partially purified bone morphogenetic protein on the expression of glycosaminoglycan, collagen, and alkaline phosphatase in nonunion cell cultures. *Clin Orthop* 1992, 278:286-304

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994, 331:889-95

Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 1996, 326:270-83

Bruckner P, van der Rest M. Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech* 1994, 28:378-84

Brun P, Cortivo R, Zavan B, Vecchiato N, Abatangelo G. In vitro reconstructed tissues on hyaluronan-based temporary scaffolding. *J Mater Sci Mater Med* 1999, 10:683-8

Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 1998, 280:1455-7

Buckwalter JA, Rosenberg LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev* 1988, 1:87-112

Buckwalter JA, Mow VC, Ratcliffe A. Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. *J Am Acad Orthop Surg* 1994, 2:192-201

Buckwalter JA, Lane NE. Athletics and osteoarthritis. *Am J Sports Med* 1997, 25:873-81

Buckwalter JA and Mankin HJ Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998, 47: 477

Bujia J, Sittinger M, Hammer C, Burmester G. Culture of human cartilage tissue using a perfusion chamber. *Laryngorhinootologie* 1994, 73:577-80

Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop* 1992, 282:250-72

Burkart A, Imhoff AB. Diagnostic imaging after autologous chondrocyte transplantation. Correlation of magnetic resonance tomography, histological and arthroscopic findings. *Orthopade* 2000, 29:135-44

Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C, Vacanti CA. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998, 9:475-87

Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 1997, 342:254-69

Caplen NJ, Kinrade E, Sorgi F, Gao X, Gruenert D, Geddes D, Coutelle C, Huang L, Alton EW, Williamson R. In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther* 1995, 2:603-13

Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, Tuan RS, Hall DJ. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* 2001, 67:128-38

Chang, MA, Horner, JW, Conklin, BR, DePinho RA, Bok D, Zack DJ. Tetracycline-inducible system for photoreceptor-specific gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41:4281-7

Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. Chondrocyte transplantation and experimental treatment options for articular cartilage defects. *Am J Orthop* 1997, 26:396-406

Chen P, Carrington JL, Hammonds RG, Reddi AH. Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor beta 1 and beta 2. *Exp Cell Res* 1991, 195:509-15

Cooper CR, Hanson LA, Diehl WJ, Pharr GT, Coats KS. Natural selection of the Pol gene of bovine immunodeficiency virus. *Virology* 1999, 255:294-301

Couffinhal T, Kearney M, Sullivan A, Silver M, Tsurumi Y, Isner JM. Histochemical staining following LacZ gene transfer underestimates transfection efficiency. *Hum Gene Ther* 1997, 8:929-34

Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89:11740-4

Desjardins MR, Hurtig MB, Palmer NC. Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse. *Vet Surg* 1991, 20:434-45

Dhawan J, Rando TA, Elson SL, Bujard H, Blau HM. Tetracycline-regulated gene expression following direct gene transfer into mouse skeletal muscle. *Somat Cell Mol Genet* 1995, 21:233-40

Dieppe P. Osteoarthritis and molecular markers. A rheumatologist's perspective. *Acta Orthop Scand Suppl* 1995, 266:1-5

Dinser R, Kreppel F, Zaucke F, Blank C, Paulsson M, Kochanek S, Maurer P. Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem Cell Biol* 2001, 116:69-77

Doherty PJ, Zhang H, Tremblay L, Manolopoulos V, Marshall KW. Resurfacing of articular cartilage explants with genetically-modified human chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 1998, 6:153-9

Domm C, Fay J, Schunke M, Kurz B. Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure. *Orthopade* 2000, 29:91-9

Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S, Agricola B, Byrne E, Raffeld M, Moen R, et al. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 1992, 176:1125-35

Duda GN, Haisch A, Endres M, Gebert C, Schroeder D, Hoffmann JE, Sittinger M. Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo. *J Biomed Mater Res* 2000, 53:673-7

Duprez DM, Coltey M, Amthor H, Brickell PM, Tickle C. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. *Dev Biol* 1996, 174:448-52

Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Mukudai Y, Kawakami Y, Nohno T, Higuchi Y, Takemoto S, Ohuchi H, Noji S, Kurisu K. Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J Cell Biol* 1998, 140:409-18

Erickson DM, Harris SE, Dean DD, Harris MA, Wozney JM, Boyan BD, Schwartz Z. Recombinant bone morphogenetic protein (BMP)-2 regulates costochondral growth plate chondrocytes and induces expression of BMP-2 and BMP-4 in a cell maturation-dependent manner. *J Orthop Res* 1997, 15:371-80

Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, Herndon JH, Kang R, Bahnson AB, Barranger JA, Elders EM, Gay S, Tomaino MM, Wasko MC, Watkins SC, Whiteside TL, Glorioso JC, Lotze MT, Wright TM. Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 1996, 7:1261-80

Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, Shuler FD, Mi Z, Robbins PD. Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop* 2000, 379 Suppl:214-9

Evans CH and Robbins PD. Gene therapy in orthopaedics. *Orthop Nurs* 2000, 19:16-22

Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, Katz LM, Lightfoot R Jr, Paulus H, Strand V, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995, 38:727-35

Fiering SN, Roederer M, Nolan GP, Micklem DR, Parks DR, Herzenberg LA. Improved FACS-Gal: flow cytometric analysis and sorting of viable eukaryotic cells expressing reporter gene constructs. *Cytometry* 1991, 12:291-301

Fire A. Histochemical techniques for locating Escherichia coli beta-galactosidase activity in transgenic organisms. *Genet Anal Tech Appl* 1992, 9:151-8

Fishman GI, Kaplan ML, Buttrick PM. Tetracycline-regulated cardiac gene expression in vivo. *J Clin Invest* 1994, 93:1864-8

Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1994, 28:891-9

Freed LE, Martin I, Vunjak-Novakovic G. Frontiers in tissue engineering. In vitro modulation of chondrogenesis. *Clin Orthop* 1999, 367 Suppl:46-58

Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br* 1997, 79:831-6

Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg* 2000, 105:980-90

Friedman MJ, Berasi CC, Fox JM, Del Pizzo W, Snyder SJ, Ferkel RD. Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clin Orthop* 1984, 182:200-5

Fuller JA, Ghadially FN. Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage. *Clin Orthop* 1972, 86:193-205

Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:9302-6

Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 1980, 62:79-89

Fuss M, Ehlers EM, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Anat Anz* 2000, 182:303-10

Gelse K, von der Mark K, Schneider H. Cartilage regeneration by gene therapy. *Curr Gene Ther* 2003, 3:305-17

Ghadially JA, Ghadially R, Ghadially FN. Long-term results of deep defects in articular cartilage. A scanning electron microscope study. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977, 25:125-36

Glinz W. Techniques in arthroscopic surgery in degenerative meniscus and joint surface damage of the knee joint. *Chirurg* 1993, 64:371-8

Gooch KJ, Blunk T, Courter DL, Sieminski AL, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Bone morphogenetic proteins-2, -12, and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage. *Tissue Eng* 2002, 8:591-601

Goomer RS, Maris TM, Gelberman R, Boyer M, Silva M, Amiel D. Nonviral in vivo gene therapy for tissue engineering of articular cartilage and tendon repair. *Clin Orthop* 2000, 379 Suppl:189-200

Goomer RS, Deftos LJ, Terkeltaub R, Maris T, Lee MC, Harwood FL, Amiel D. High-efficiency non-viral transfection of primary chondrocytes and perichondrial cells for ex-vivo gene therapy to repair articular cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, 9:248-56

Gorman CM, Moffat LF, Howard BH. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1982, 2:1044-51

Goto H, Shuler FD, Lamsam C, Moller HD, Niyibizi C, Fu FH, Robbins PD, Evans CH. Transfer of lacZ marker gene to the meniscus. *J Bone Joint Surg Am* 1999, 81:918-25

Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res* 1997, 34:211-20

Guilak F, Mow VC. The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. *J Biomech* 2000, 33:1663-73

Haberman RP, McCown TJ, Samulski RJ. Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer. *Gene Ther* 1998, 5:1604-11

Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics* 1998, 21:751-6

Hannallah D, Peterson B, Lieberman JR, Fu FH, Huard J. Gene therapy in orthopaedic surgery. *Instr Course Lect* 2003, 52:753-68

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992, 6:861-70

Heinegard DK, Pimentel ER. Cartilage matrix proteins. *Articular Cartilage and Osteoarthritis* 1992, 95-111

Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H, Lust G. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res* 1994, 12:485-97

Herrmann M, Hagenhofer M, Kalden JR. Retroviruses and systemic lupus erythematosus. *Immunol Rev* 1996, 152:145-56

Hidaka C, Quitariano M, Warren RF, Crystal RG. Enhanced matrix synthesis and in vitro formation of cartilage-like tissue by genetically modified chondrocytes expressing BMP-7. *J Orthop Res* 2001, 19:751-8

Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, Sanma Y, Bentz H, Rosen DM, Asada A, Suzuki F. Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1991, 6:1373-85

Hirschmann F, Verhoeyen E, Wirth D, Bauwens S, Hauser H, Rudert M. Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein. *Osteoarthritis Cartilage* 2002, 10:109-18

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 1996, 6:432-8

Howe JR, Skryabin BV, Belcher SM, Zerillo CA, Schmauss C. The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J Biol Chem* 1995, 270:14168-74

Howell TH, Fiorellini J, Jones A, Alder M, Nummikoski P, Lazaro M, Lilly L, Cochran D. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997, 17:124-39

Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1998, 1:673-83

Hubbard MJ. Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study. *J Bone Joint Surg Br* 1996, 78:217-9

Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 1996, 78:721-33

Iba H, Mizutani T, Ito T. SWI/SNF Chromatin remodelling complex and retroviral gene silencing. *Rev Med Virol* 2003, 13:99-110

Ikeda T, Kubo T, Arai Y, Nakanishi T, Kobayashi K, Takahashi K, Imanishi J, Takigawa M, Hirasawa Y. Adenovirus mediated gene delivery to the joints of guinea pigs. *J Rheumatol* 1998, 25:1666-73

Ikeda T, Kubo T, Nakanishi T, Arai Y, Kobayashi K, Mazda O, Ohashi S, Takahashi K, Imanishi J, Takigawa M, Hirasawa Y. Ex vivo gene delivery using an adenovirus vector in treatment for cartilage defects. *J Rheumatol* 2000, 27:990-6

Imhoff A, Ledermann T. Arthroscopic subacromial decompression with and without the Holmium:YAG-laser. A prospective comparative study. *Arthroscopy* 1995, 11:549-56

Imhoff AB, Burkart A, Ottl GM. Transfer of the posterior femoral condyle. First experience with a salvage operation. *Orthopade* 1999, 28:45-51

Imhoff AB, Ottl GM, Burkart A, Traub S. Autologous osteochondral transplantation on various joints. *Orthopade* 1999, 28:33-44

Insall J. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop* 1974, 101:61-7

Ishikawa T, Yoshioka H, Ohuchi H, Noji S, Nohno T. Truncated type II receptor for BMP-4 induces secondary axial structures in *Xenopus* embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 216:26-33

Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996, 348:370-4

Jackson RW, Gilbert JE, Sharkey PF. Arthroscopic debridement versus arthroplasty in the osteoarthritic knee. *J Arthroplasty* 1997, 12:465-9

Jakob M, Demartean O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem* 2001, 81:368-77

Johnson EE, Urist MR. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop* 2000, 371:61-74

Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 1986, 2:54-69

Kafri T. Lentivirus vectors: difficulties and hopes before clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* 2001, 3:316-26

Kang R, Marui T, Ghivizzani SC, Nita IM, Georgescu HI, Suh JK, Robbins PD, Evans CH. Ex vivo gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular cartilage defects: a feasibility study. *Osteoarthritis Cartilage* 1997, 5:139-43

Kaps C, Bramlage C, Smolian H, Haisch A, Ungethum U, Burmester GR, Sittinger M, Gross G, Haupl T: Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum* 2002, 46:149-62

Kellner K, Lang K, Papadimitriou A, Leser U, Milz S, Schulz MB, Blunk T, Gopferich A. Effects of hedgehog proteins on tissue engineering of cartilage in vitro. *Tissue Eng* 2002, 8:561-72

Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop* 1984, 186:231-9

Kingsley DM. What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet* 1994, 10:16-21

Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME. Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop* 1995, 318:222-30

Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1994, 14:5961-74

Koponen JK, Kankkonen H, Kannasto J, Wirth T, Hillen W, Bujard H, Yla-Herttuala S. Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2-M2S shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2003, 10:459-66

Lamartina S, Roscilli G, Rinaudo CD, Sporeno E, Silvi L, Hillen W, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G, Toniatti C. Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum Gene Ther* 2002, 13:199-210

Ledley FD. Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 1995, 6:1129-44

Lee KY, Peters MC, Anderson KW, Mooney DJ. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature* 2000, 408:998-1000

Lewthwaite J, Blake SM, Hardingham TE, Warden PJ, Henderson B. The effect of recombinant human interleukin 1 receptor antagonist on the induction phase of antigen induced arthritis in the rabbit. *J Rheumatol* 1994, 21:467-72

Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 1995, 15:3479-86

Luyten FP, Yu YM, Yanagishita M, Vukicevic S, Hammonds RG, Reddi AH. Natural bovine osteogenin and recombinant human bone morphogenetic protein-2B are equipotent in the

maintenance of proteoglycans in bovine articular cartilage explant cultures. *J Biol Chem* 1992, 267:3691-5

Luyten FP, Chen P, Paralkar V, Reddi AH. Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor-beta 1, and activin A enhance the cartilage phenotype of articular chondrocytes in vitro. *Exp Cell Res* 1994, 210:224-9

Madry H, Trippel SB. Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther* 2000, 7:286-91

Magnuson PB. The classic: Joint debridement: surgical treatment of degenerative arthritis. *Clin Orthop* 1974, 101:4-12

Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN, Anderle SK, Brown RR, Baldwin AS Jr, Haskill JS, Schwab JH. Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:402-6

Maletius W, Messner K. Eighteen- to twenty-four-year follow-up after complete rupture of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* 1999, 27:711-7

Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982, 64:460-6

Mansuy MI, Winder DG, Moallem TM, Osman M, Mayford M, Hawkins RD, Kandel ER. Inducible and reversible gene expression with the rtTA System for the study of memory. *Neuron* 1998, 21:257-65

Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res* 1994, 28:1127-38

Mason JM, Grande DA, Barcia M, Grant R, Pergolizzi RG, Breitbart AS. Expression of human bone morphogenetic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Ther* 1998, 5:1098-104

Messner K and Gillquist J. Cartilage repair. A critical review. *Acta Orthop Scand*. 1996, 67:523-9

Messner K, Maletius W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand* 1996, 67:165-8

Mills AA. Changing colors in mice: an inducible system that delivers. *Genes Dev* 2001, 15:1461-7

Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am* 1976, 58:230-3

Moller HD, Fu FH, Niyibizi C, Studer RK, Georgescu HJ, Robbins PD, Evans CH. TGF-beta-1 gene transfer in joint cartilage cells. Stimulating effect in extracellular matrix synthesis. *Orthopade* 2000, 29:75-9

Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993, 260:926-32

Musgrave DS, Bosch P, Lee JY, Pelinkovic D, Ghivizzani SC, Whalen J, Niyibizi C, Huard J. Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. *Clin Orthop* 2000, 378:290-305

Musgrave DS, Pruchnic R, Bosch P, Ziran BH, Whalen J, Huard J. Human skeletal muscle cells in ex vivo gene therapy to deliver bone morphogenetic protein-2. *J Bone Joint Surg Br* 2002, 84:120-7

Musgrave DS, Fu FH, Huard J. Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic surgery. *J Am Acad Orthop Surg* 2002, 10:6-15

Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC, Maciag T, Nabel GJ. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993, 362:844-6

Nakase T, Miyaji T, Tomita T, Kaneko M, Kuriyama K, Myoui A, Sugamoto K, Ochi T, Yoshikawa H. Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte. *Osteoarthritis Cartilage* 2003, 11:278-84

Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 1998, 19:2313-28

Neidel J.J. No improvement of joint cartilage healing after trauma by the administration of insulin-like growth factor I, epidermal growth factor and fibroblast growth factor in rabbits. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1992, 130:73-8

Neuhuber B, Huang DI, Daniels MP, Torgan CE. High efficiency transfection of primary skeletal muscle cells with lipid-based reagents. *Muscle Nerve* 2002, 26:136-40

Niswander L, Martin GR. FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* 1993, 361:68-71

Nita I, Ghivizzani SC, Galea-Lauri J, Bandara G, Georgescu HI, Robbins PD, Evans CH. Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 1996, 39:820-8

Nohno T, Ishikawa T, Saito T, Hosokawa K, Noji S, Wolsing DH, Rosenbaum JS. Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* 1995, 270:22522-6

Nolan GP, Fiering S, Nicolas JF, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of *Escherichia coli* LacZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85:2603-7

O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1998, 80:1795-812

Oegema TR Jr, Thompson RC Jr. Characterization of a hyaluronic acid-dermatan sulfate proteoglycan complex from dedifferentiated human chondrocyte cultures. *J Biol Chem* 1981, 256:1015-22

Oegema TR Jr, Carpenter RJ, Hofmeister F, Thompson RC Jr. The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microsc Res Tech* 1997, 37:324-32

Otani K, Nita I, Macaulay W, Georgescu HI, Robbins PD, Evans CH. Suppression of antigen-induced arthritis in rabbits by ex vivo gene therapy. *J Immunol* 1996, 156:3558-62

Pannell D, Ellis J. Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors. *Rev Med Virol* 2001, 11:205-17

Reddi AH. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1992, 4:850-5

Reinecke JA, Wehling P, Robbins P, Evans CH, Sager M, Schulze-Allen G, Koch H. In vitro transfer of genes in spinal tissue. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1997, 135:412-6

Riesle J, Hollander AP, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Collagen in tissue-engineered cartilage: types, structure, and crosslinks. *J Cell Biochem* 1998, 71:313-27

Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop* 1996, 324:39-46

Rios CD, Ooboshi H, Piegors D, Davidson BL, Heistad DD. Adenovirus-mediated gene transfer to normal and atherosclerotic arteries. A novel approach. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15:2241-5

Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 1998, 80:35-47

Robinson D, Efrat M, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z. Implants composed of carbon fiber mesh and bone-marrow-derived, chondrocyte-enriched cultures for joint surface reconstruction. *Bull Hosp Jt Dis* 1993, 53:75-82

Rodin DV, Kolesnikov VA, Zelenina IA, Zelenin AV, Deyev SM. The quantitative characteristics of efficiency of ballistic transfection of chimeric antibody genes. *Immunol Lett* 2000, 74:197-200

Romano L, Venturi G, Catucci M, De Milito A, Valensin PE, Zazzi M. Evaluation of cell-free and cell-associated peripheral blood human immunodeficiency virus type 1 RNA response to antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1999, 179:361-6

- Rosenberg LC. Structure and function of dermatan sulfate proteoglycans in articular cartilage. *Articular Cartilage Osteoarthritis* 1992, 45-63
- Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:7632-6
- Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 1994, 28:385-97
- Rudert M, Tillmann B. Detection of lymph and blood vessels in the human intervertebral disc by histochemical and immunohistochemical methods. *Anat Anz* 1993, 175:237-42
- Rudert M, Wirth CJ. Cartilage regeneration and substitution. *Orthopade* 1998, 27:309-21
- Rudert M, Hirschmann F, Wirth CJ. Growth behavior of chondrocytes on various biomaterials. *Orthopade* 1999, 28:68-75
- Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J Orthop Res* 1996, 14:937-45
- Sams AE, Nixon AJ. Chondrocyte-laden collagen scaffolds for resurfacing extensive articular cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* 1995, 3:47-59
- Sandhu JS, Gorczynski RM, Waddell J, Nguyen H, Squires J, Waddell J, Boynton EL, Hozumi N. Effect of interleukin-6 secreted by engineered human stromal cells on osteoclasts in human bone. *Bone* 1999, 24:217-27
- Sato K and Urist MR. Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture. *Clin Orthop* 1984, 7:180
- Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 1999, 17:269-78

Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1997, 79:1452-63

Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, Beckwith K, Morris EA. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am* 2000, 82:151-60

Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993, 75:532-53

Shimotohno K, Temin HM. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* 1981, 26:67-77

Shinnick TM, Lerner RA, Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* 1981, 293:543-8

Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N, Schatz DG. A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:6522-6

Shuler FD, Georgescu HI, Niyibizi C, Studer RK, Mi Z, Johnstone B, Robbins RD, Evans CH. Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of a transforming growth factor beta1 gene into articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2000, 18:585-92

Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 1994, 15:451-6

Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 1996, 17:237-42

Sittinger M, Perka C, Schultz O, Haupl T, Burmester GR. Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z Rheumatol* 1999, 58:130-5

Smith P, Shuler FD, Georgescu HI, Ghivizzani SC, Johnstone B, Niyibizi C, Robbins PD, Evans CH. Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1. *Arthritis Rheum* 2000, 43:1156-64

Speer DP, Chvapil M, Volz RG, Holmes MD. Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants. *Clin Orthop* 1979, 144:326-35

Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Orthopade* 1999, 28:26-32

Stockwell RA. The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat* 1967, 101:753-63

Stockwell RA. Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1978, 12:7-13

Streit A, Stern CD. Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mech Dev* 1999, 82:51-66

Swindle CS, Klug CA. Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors. *J Hematother Stem Cell Res* 2002, 11:449-56

Tabin CJ, Hoffmann JW, Goff SP, Weinberg RA. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Mol Cell Biol* 1982, 2:426-36

Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000, 21:431-40

Thal R, Danziger MB, Kelly A. Delayed articular cartilage slough: two cases resulting from holmium: YAG laser damage to normal articular cartilage and a review of the literature. *Arthroscopy* 1996, 12:92-4

Thompson RC Jr. An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzyme responses within the joint. *Clin Orthop* 1975, 107:239-48

Thomson AW, Lu L, Woo J, Rao AS, Starzl TE, Demetris AJ. Exposure to type-I collagen induces maturation of mouse liver dendritic cell progenitors. *Adv Exp Med Biol* 1995, 378:511-8

Tillmann B. Embryonic development of the hip joint. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1990, 128:338-40

Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991, 117:1101-12

Trono D. Lentiviral vectors for the genetic modification of hematopoietic stem cells. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2001, 33:19-28

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965, 150:893-9

Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1971, 50:1392-406

Vacanti CA, Kim W, Schloo B, Upton J, Vacanti JP. Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures. *Am J Sports Med* 1994, 22:485-8

Valcourt U, Gouttenoire J, Moustakas A, Herbage D, Mallein-Gerin F. Functions of transforming growth factor-beta family type I receptors and Smad proteins in the hypertrophic maturation and osteoblastic differentiation of chondrocytes. *J Biol Chem* 2002, 277:33545-58

von der Mark K, Gluckert K. Biochemical and molecular biologic aspects of early detection of human arthroses. *Orthopade* 1990, 19:2-15

Varmus HE. Form and function of retroviral proviruses. *Science* 1982, 216:812-20

Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br* 1989, 71:74-80

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994, 76:579-92

Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85:9484-8

Wehling P, Schulitz KP, Robbins PD, Evans CH, Reinecke JA. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. *Spine* 1997, 22:1092-7

Wei CM, Gibson M, Spear PG, Scolnick EM. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 1981, 39:935-44

Weiss RA. Retroviral zoonoses. *Nat Med* 1998, 4:391-2

Weiss RA, Griffiths D, Takeuchi Y, Patience C, Venables PJ. Retroviruses: ancient and modern. *Arch Virol Suppl* 1999, 15:171-7

West CM, Lanza R, Rosenbloom J, Lowe M, Holtzer H, Avdalovic N. Fibronectin alters the phenotypic properties of cultured chick embryo chondroblasts. *Cell* 1979, 17:491-501

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990, 247:1465-8

Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 1998, 346:26-37

Yamamoto M, Okumura S, Schwencke C, Sadoshima J, Ishikawa Y. High efficiency gene transfer by multiple transfection protocol. *Histochem J* 1999, 31:241-3

Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 1992, 74:659-70

Zabner J, Couture LA, Smith AE, Welsh MJ. Correction of cAMP-stimulated fluid secretion in cystic fibrosis airway epithelia: efficiency of adenovirus-mediated gene transfer in vitro. *Hum Gene Ther* 1994, 5:585-93

Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 227:707-11

Zhu N, Liggitt D, Liu Y, Debs R. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 1993, 261:209-11

## 7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Intraoperative Aufsicht auf die Patellasehne
- Abbildung 2 Intraoperative Aufsicht auf das eröffnete Kniegelenk
- Abbildung 3 Intraoperative Aufsicht auf zwei osteochondrale Defekte in der Trochlea femoris
- Abbildung 4 Resorba®-Kollagen-Matrix, makroskopisch
- Abbildung 5 Resorba®-Kollagen-Matrix, mikroskopisch
- Abbildung 6 Darstellung der Plasmide pBulletLZ und pBulletBMP-2
- Abbildung 7 Chondrozyten in Monolayer-Kultur
- Abbildung 8 Besiedelte Resorba®-Kollagen-Matrix, makroskopisch
- Abbildung 9 Besiedelte Verigen®-Matrix, mikroskopisch
- Abbildung 10 Besiedelte Tachotop®-Matrix, mikroskopisch
- Abbildung 11 Besiedelte Resorba®-Matrix, mikroskopisch
- Abbildung 12 lacZ-transduzierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur
- Abbildung 13 Kastengrafik lacZ-Effizienz
- Abbildung 14 Kastengrafik lacZ-Langzeitexpression
- Abbildung 15 lacZ-transduzierte Chondrozyten auf Resorba®-Matrix besiedelt
- Abbildung 16 fluoreszierende EGFP-transduzierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur
- Abbildung 17 Kastengrafik BMP-2-Produktion
- Abbildung 18 tetlacZ-transfizierte Chondrozyten in Monolayer-Kultur
- Abbildung 19 Unbehandelte Defekte
- Abbildung 20 Implantierte unbesiedelte Resorba®-Trägerschwämme
- Abbildung 21 Implantierte autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte
- Abbildung 22 Implantierte lacZ-markierte autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte
- Abbildung 23 Implantierte autologe Knorpelzell-Matrix-Konstrukte mit BMP-2-produzierenden Chondrozyten

## **8. Danksagung**

Für die Überlassung des Themas, Hinweise und Anregungen und die Forschungsmöglichkeiten in dem Labor für Sportorthopädie möchte ich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Vladimir Martinek sehr herzlich danken. Gleicher Dank geht auch an Herrn Univ.-Prof. Dr. Bernd Gänsbacher für Hinweise, Anregungen und Forschungsmöglichkeiten in dem Labor für experimentelle Onkologie.

Ganz besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. Peter Ueblacker für seine ununterbrochene Hilfestellung.

Sehr hilfreich und gern angenommen waren auch die Ratschläge von Herrn PD Dr. rer. nat. Achim Krüger, Herrn Dr. rer. nat. Christian Plank und Herrn Dr. med. Dr. vet. Thomas Brill.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Bettina Wagner, Frau Elisabeth Kennerknecht, Frau Tilla Hennig, Frau Christine Heinze, Frau Gerlinde Stejskal, Herrn Stefan Nitschke und Herrn Klaus Bräun für ihre Ratschläge und ihre immer zuverlässige und freundliche Hilfsbereitschaft danken.

Größter Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mir das Studium und vieles mehr ermöglicht haben.