

Abteilung für Sportorthopädie der  
Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff)

**Analyse des BMP2-Einflusses auf die  
Knorpelregeneration mittels  
quantitativer RT-PCR in vitro  
und in vivo**

Jonas Christian François Wilisch

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. St. W. Vogt
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 16.12.2010 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 23.11.2011 angenommen.

Meinen Lieben

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>4</b>
1.1 Gelenkknorpel.....	4
1.1.1 Aufbau und Funktion.....	4
1.1.2 Sox9.....	9
1.1.3 Cbfa1 resp. Runx2.....	12
1.1.4 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2).....	13
1.2 Knorpelschäden.....	16
1.2.1 Ätiologie.....	16
1.2.2 Einteilungen.....	17
1.3 Regenerationsmöglichkeiten und therapeutische Ansätze.....	23
1.3.1 Stammzellrekrutierende Verfahren resp. Mikrofrakturierung.....	24
1.3.2 Autologe und Matrix-induzierte Chondrozytenimplantation (ACI/MACI).....	25
1.3.3 Knorpel-Knochen-Transplantationen z.B. Osteochondral Autograft Transplantation (OATS).....	26
1.3.4 Ausblick.....	29
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	31
1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
1.5.1 Die Entwicklung der molekularen DNA-Analytik.....	34
1.5.2 Funktionsweise der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
1.5.3 Primerdesign.....	38
1.5.4 Quantitative PCR.....	40
1.5.5 Real-Time-PCR.....	41
1.5.6 Reverse Transkription (RT-PCR).....	47
<b>2 Material und Methodik.....</b>	<b>51</b>
2.1 Förderung.....	51
2.2 Tierversuche.....	51
2.2.1 Begründung.....	51
2.2.2 Tierart.....	52
2.2.3 Herkunft/Züchtungsort.....	52
2.2.4 Tierhaltung.....	53
2.2.5 Versuchsgruppen.....	54
2.2.6 Operatives Vorgehen.....	54
2.3 Zellkultivierung sowie Vektor-Generierung und -Transduktion.....	58
2.3.1 Generierung des nicht-viralen Vektors und Einschleusung.....	59

2.3.2	Generierung des viralen Vektors und Zelltransduktion.....	59
2.3.3	Chondrozytenisolierung, Zellkultur und Präparation der Fibrin-Clots.....	60
2.4	RNA-Analysen.....	61
2.4.1	Genequenzen.....	61
2.4.2	Primer und Sonden.....	66
2.4.3	RNA-Isolierung.....	68
2.4.4	Reverse Transkription.....	69
2.4.5	Quantitative PCR.....	69
2.5	Statistische Auswertung.....	69
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>70</b>
3.1	Analyse der mit hBMP2-pBullet-transduzierten Chondrozyten.....	70
3.1.1	hBMP2-pBullet in vitro – qRT-PCR der Zellkultur.....	70
3.1.2	hBMP2-pBullet in vivo – qRT-PCR 12 Wochen nach Implantation.....	71
3.2	Analyse der mit hBMP2-COPROG transfizierten Chondrozyten.....	72
3.2.1	hBMP2-COPROG in vivo – qRT-PCR 12 Wochen nach Implantation.....	72
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

- % – Prozent
- °C – Grad Celsius
- µg – Mikrogramm
- µl – Mikroliter
- 293T-Zellen – HEK (Human Embryonic Kidney)-Zellen welche zusätzlich das SV40-large T-Antigen exprimieren
- ACI – Autologe Chondrozyten-Implantation
- AMV – Avian Myeloblastosis Virus
- AT – Adenin Thymin (komplementäre DNA-Basen)
- BMP2 – Bone Morphogenetic Protein 2 (hBMP2 – humanes BMP2)
- Bp – Basenpaare
- CD – Campomele Dysplasie
- cDNA – komplementäre DNA (nach reverser Transkription von RNA)
- Col – Kollagen, z.B. Col2 für Kollagen Typ 2
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DNA – Desoxyribonukleinsäure
- dsDNA – Doppelstrang-DNA
- EDTA – Ethylendiamintetraacetat
- et al. – et altera
- EZM – Extrazelluläre Matrix
- Fam – Reporterfluorofor der RNA-Sonden
- GAG-Ketten – Glycosaminoglykanketten
- GC – Guanin Cytosin (komplementäre DNA-Basen)
- HA – Hyaluron-Säure
- hBMP2-COPROG – hBMP2-Copolymer-protected-Gene-Vector

- hBMP2-pBullet – viraler hBMP2-Vektor, ein Derivat des MoMLV-Vektors
- HD – Homeodomain
- HMG-box – High mobility group box
- HSS-score – Hospital for Special Surgery score
- i.v. – intravenös
- ICRS – International Cartilage Repair Society
- Ihh – Indian Hedgehog
- IU – International unit
- kg – Kilogramm
- l – Liter
- LTR – Lange terminale Repetitionen der Virus-RNA
- m – Meter
- m<sup>2</sup> – Quadratmeter
- MACI – Matrix induzierte autologe Chondrozyten Implantation
- mg – Milligramm
- Mg<sup>2+</sup> – Magnesium
- min – Minute
- ml – Milliliter
- mm – Millimeter
- MoMLV – Moloney Murine Leukemia Virus
- mRNA – Messenger Ribonukleinsäure
- MRT – Magnetresonanztomographie
- MSZ – Mesenchymale Stammzelle
- NaCl – Natriumchlorid
- NCBI – National Center for Biotechnology Information
- NFQ – Non-fluorescent Quencher

- NZW – Weiße Neuseeländer Kaninchen
- OATS – Osteochondrale Autografttransplantation (Osteochondrales Autologes Transfer-System)
- OD – Osteochondrosis dissecans
- Oligo-dT – Basensequenz aus 15-25-Desoxythymidinen
- PBS – Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch phosphate buffered saline)
- PCR – Polymerasekettenreaktion
- pH – pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii
- PTHrP – parathyreoid related Peptid
- qRT-PCR – quantitative RT-PCR
- RNase – Ribonuklease
- rRNA – ribosomale Ribonukleinsäure
- RT-PCR – PCR mit vorausgegangener reverser Transkription
- s.c. – subcutan
- SCID-X1 – Severe Combined Immunodeficiency
- SEM – Standard Error of the Mean, Standardfehler
- SIN-Vektor – Self inactivating Vector
- Tet-System – Über Tetracyclin regulierbares Vektorsystem
- TGF $\beta$  – Transforming growth factor  $\beta$
- Tm – Schmelztemperatur
- tRNA – Transfer-Ribonukleinsäure
- UV – Ultraviolett
- VSV.G. – Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (Hüllprotein)
- ZNS – Zentrales Nervensystem
- ZPF – Zentrum für präklinische Forschung (am Klinikum rechts der Isar)

## **1 Einleitung**

### **1.1 Gelenkknorpel**

#### **1.1.1 Aufbau und Funktion**

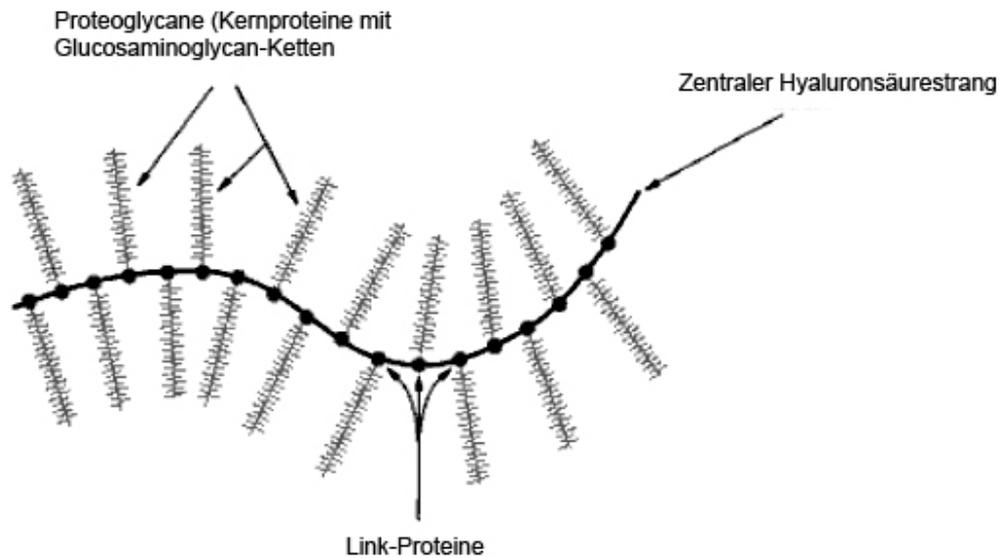
Der hyaline Gelenkknorpel ist ein avaskuläres und alymphatisches Gewebe. Er ist nicht innerviert und besitzt keine Basalmembran. Knorpel ist ein zellarmes Gewebe. Die Chondrozyten, welche die Grundsubstanz des Knorpelgewebes bilden und somit die Fähigkeit der mechanischen Dämpfung und des fast reibungslosen Gleitens ermöglichen, werden ausschließlich durch Diffusion ernährt und unterliegen keiner immunologischen Erkennung. Feingeweblich findet man neben Chondrozyten dessen Extrazelluläre Matrix (EZM). Diese besteht aus Kollagenfasern und Proteoglykanen, wobei der Anteil der Knorpelzellen nur etwa 1–10% der gesamten Knorpelmasse ausmacht. Kollagene sind Tripelhelices-formende Polypeptidketten. Proteoglykane sind an das Kollagennetzwerk gebunden bzw. mechanisch in ihm gefangen.

Der Hauptanteil des Matrixgerüsts des hyalinen Knorpels besteht aus Kollagen-Typ-II-Fasern (Col2). Im Gegensatz hierzu besteht der Faserknorpel zum Großteil aus Kollagen Typ I (Col1). Daneben findet sich in weit

geringeren Anteilen Kollagen Typ V, IX, und XI. Auf der Fähigkeit der Proteoglykane, freies Wasser zu binden, beruhen die typischen viskoelastischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels. Für die Elastizität und Resistenz gegen Scherkräfte sind die Kollagenfibrillen verantwortlich. Die Schichtdicke des hyalinen Gelenkknorpels ist je nach Topographie unterschiedlich und kann im Bereich der Patella 7-8 mm erreichen (Fritz, Gaissmaier et al. 2006).

Chondrozyten sind für die Synthese und den Umsatz der EZM des Knorpels verantwortlich. Diese bildet wiederum eine Umgebung, die eine geregelte Ernährung der Chondrozyten und die biomechanischen Fähigkeiten des Knorpels bedingt. Reife, humane Chondrozyten sind meist runde, ca. 13 µm große, in der EZM gelegene Zellen (Lin, Willers et al. 2006). Sie bauen die EZM auf und ab und erhalten so ein Gleichgewicht zwischen der zellulären Umgebung und der Struktur des Knorpelgewebes. Die zwei wichtigsten Makromoleküle der EZM sind das Col2 und ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan, welches als Aggrecan bezeichnet wird (Knudson and Knudson 2001; Lin, Willers et al. 2006) (Abbildung 1). Durch die negative Ladung der Proteoglykan-Seitenketten (Glykosaminoglykane wie Chondroitinsulfat) wird Wasser im Knorpelgewebe gebunden und der Widerstand gegen von außen einwirkende Kräfte erhöht. Aggrecanmonomere bestehen aus einem

zentralen Protein („Core“-Protein) und an dieses kovalent gebundene polyanionische Glykosaminoglykanketten (GAG-Ketten). Die Monomere bilden ein Netzwerk, indem sie sich untereinander über Hyaluronsäure (HA) und andere Proteine verbinden und so die Zwischenräume zwischen den Kollagenfasern ausfüllen (Knudson and Knudson 2001). HA ist ein GAG welches aus  $\beta$ -glykosidisch miteinander verknüpften Glukuronyl- $\beta$ -N-Acetylglukosamin-Disaccharid-einheiten besteht, wobei bis zu 100.000 Einheiten aufeinander folgen können. HA bindet über Bindungsproteine und CD44-Zelloberflächenproteine an Chondrozyten. Über diese hat sie eine wichtige Rolle in der strukturellen Organisation und Funktion des Knorpels, der Zelladhäsion, -migration sowie der -differenzierung (Knudson and Knudson 1993; Lin, Willers et al. 2006).



**Abb. 1** Modifiziert aus Horton, Moran et al. 2008:

Proteoglykane bestehen aus einem Core-Protein und an dieses kovalent gebundene polyanionische Glykosaminoglykanketten (GAG-Ketten). Die Monomere bilden ein Netzwerk, indem sie sich untereinander über Hyaluronsäure und anderen Bindungsproteine verbinden und so die Zwischenräume zwischen den Kollagenfasern ausfüllen.

Chondrozyten stammen von multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSZ) ab. Diese können sich außer in Chondrozyten in weitere Zellen differenzieren, wie Osteoblasten, Fibroblasten, Adipozyten und Myoblasten. Die Chondrogenese der chondralen Ossifikation startet mit der Kondensation der MSZ, die mit der Expression von Zell-Zell-Adhensionsmolekülen, wie z.B. N-Cadherin, Col1 sowie HA, verbunden ist. Hierdurch wird die EZM gebildet, die als Anlage der zu bildenden Knochen fungiert (DeLise, Fischer et al. 2000; Stanton, Underhill et al. 2003) (Abbildung 2).

Mit dem Übergang der Chondrozytenvorläuferzellen zu den Chondroblasten startet die Expression chondrozytenspezifischer Gene wie der des Transkriptionsfaktors Sox9, Col2 und Aggrecans. Diese wird während der Differenzierung in proliferierende/reife Chondrozyten fortgesetzt. Col2 und Sox9 bilden Markerproteine dieser Phase. Mit dem Beginn der Expression von Cbfa1/Runx2 verlassen Chondrozyten den Zellzyklus und wandeln sich über die Phase der prähypertrophen in hypertrophe Chondrozyten um. Diese sind durch ihr großes Zellvolumen und die Expression von Col10 charakterisiert (de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001; DeLise, Fischer et al. 2000; Stanton, Underhill et al. 2003) (Abbildung 3).

Chondrozyten aus Gelenkknorpel sind von mineralisierendem Knorpel aus der chondralen Ossifikation unterscheidbar, auch wenn diese sich aus denselben Stammzellen entwickeln. So sind Chondrozyten aus Gelenkknorpel zwar metabolisch aktiv und exprimieren Col2, 6, 9 und 11 sowie Aggrecan, besitzen jedoch keine signifikante Proliferation. Im Gegensatz zum mineralisierenden Knorpel verharret die Differenzierung der Gelenkchondrozyten im Stadium der reifen Chondrozyten. (Drissi, Zuscik et al. 2005). Eine wichtige Rolle spielt dabei der Wachstumsfaktor Sox9.

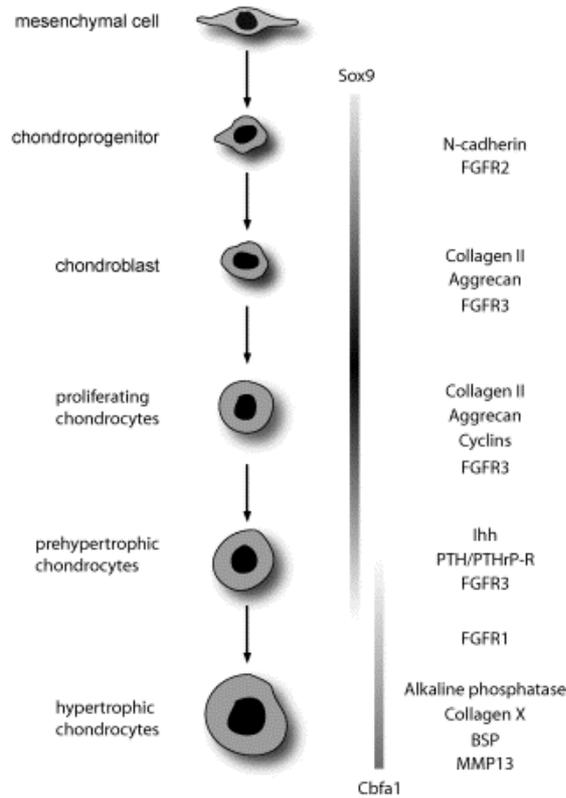


Abb. 2 aus Stanton, Underhill et al. 2003: Schematische Darstellung der Chondrogenese

### 1.1.2 Sox9

Sox9 gehört zur Familie der Sox-Transkriptionsfaktoren. Diese sind durch eine High-mobility-group-(HMG)-Box-DNA-Bindungsdomäne charakterisiert. Der Name stammt von der großen Homologie zwischen den HMG-Boxen der Sox-Familie und der des SRY-Faktors ab, welche auch als SRY-Box bekannt ist. Der SRY-Faktor spielt eine Rolle in der Geschlechtsdeterminierung. Sox9 ist ein typischer Transkriptionsfaktor. Es bindet an eine potente

Aktivierungsdomäne und an eine spezifische Sequenz in einer kleinen Furche der DNA (Wegner 1999).

Sox9 hat zwei bedeutende Rollen in der Chondrogenese. Diese wurden durch die Untersuchung der Campomele-Dysplasie (CD) etabliert, einer genetischen Krankheit, die mit einer eigentümlichen Verbiegung und Verkrümmung der Extremitäten einhergeht. Radiologisch und morphologisch charakteristisch sind eine Abknickung der langen Röhrenknochen mit senkrecht zur Längsachse verlaufenden Knochenbälkchen sowie Veränderungen des Säulenknorpels und unreife Chondrozyten. Die Erkrankung ist autosomal-rezessiv vererblich und immer mit anderen Missbildungen kombiniert, die unter Umständen zum Tode führen (Herz- und ZNS-Missbildungen, urogenitale Missbildungen, Gonadendysgenese). Die Mutation liegt in und um das Sox9-kodierende Gen, wodurch Sox9 während der Embryogenese nicht oder nur ungenügend exprimiert wird (de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001; Meyer, Sudbeck et al. 1997; Wagner, Wirth et al. 1994). Genetisch manipulierte Mäuse, denen ein Allel des Sox9-Gens fehlt, bilden den Phänotyp der CD aus. Es findet sich eine verringerte und verspätete mesenchymale Kondensation, welche zu einer Hypoplasie der enchondralen Knochen führt. Zudem wurde eine Längenzunahme der Zone der hypertrophen Chondrozyten beobachtet, welche mit einer verfrühten

Mineralisierung einhergeht. Da in der hypertrophen Zone keine Expression des Sox9-Gens stattfindet, kann man davon ausgehen, dass die Vermehrung der hypertrophen Chondrozyten sowie deren Mineralisierung durch die Haploinsuffizienz der Sox9-Gen-Expression bedingt ist. Sox9 scheint eine inhibitorische Funktion auf die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten zu haben (Bi, Huang et al. 2001; de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001).

Die essentielle Rolle, die Sox9 für die Kondensation der Chondrozyten und somit für die Einleitung der Differenzierung dieser spielt, wurde in einer Versuchsreihe von Bi et al. im Jahre 1999 dargestellt. Es zeigte sich, dass Sox9<sup>-/-</sup>-Zellen aus dem Verbund der kondensierenden Chondrozyten ausgeschlossen wurden und diese Zellen kein Col2a1, Col9a2, Col11a2 und Aggrecan bildeten. Zudem bildeten in derselben Versuchsreihe induzierte Teratome zwar alle üblicherweise vorhandenen Gewebetypen, jedoch kein Knorpelgewebe (Bi, Deng et al. 1999).

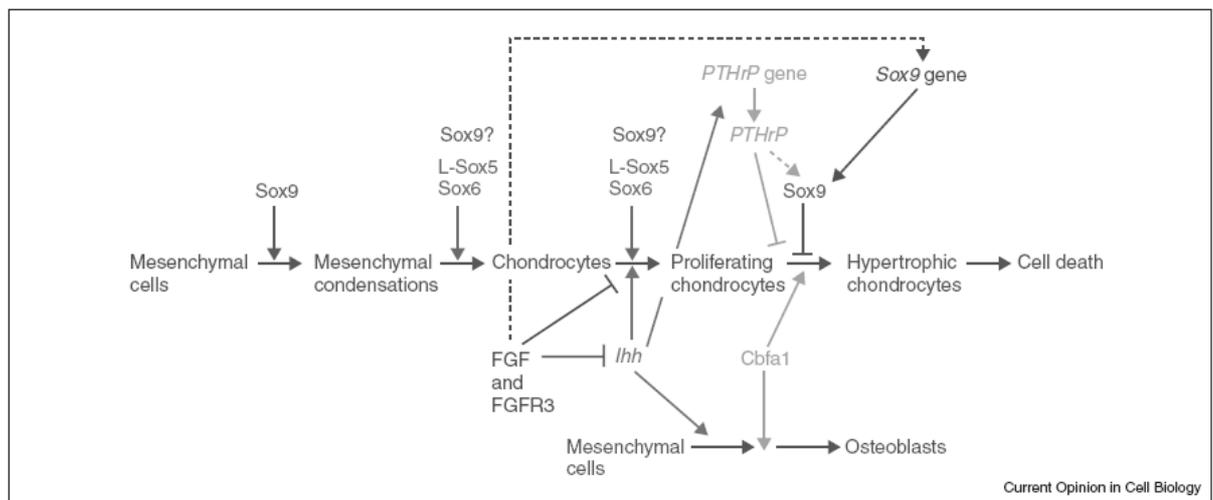
Anzumerken ist die Boosterfunktion von L-Sox5 und Sox6 während der mesenchymalen Kondensation. Diese werden mit Sox9 coexprimiert, bilden Homo- und Heterodimere und erhöhen die Expression von Col2a1 und Aggrecan (de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001)(Abbildung 3).

### 1.1.3 Cbfa1 resp. Runx2

Cbfa1 (core binding factor 1), welches auch Runx2 genannt wird, gehört zur Familie der Runt-Domänen-Transkriptionsfaktoren. Es wird vor allem in Osteoblasten, aber auch in hypertrophen Chondrozyten sowie zu Beginn der chondrogenetischen, mesenchymalen Kondensation exprimiert (de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001).

Cbfa1 hat eine Schlüsselrolle in der Knochenbildung. Wird es nur ungenügend exprimiert, wie es bei der autosomal-dominant vererbten cleidocranialen Dysplasie der Fall ist, werden bestimmte Knochen wie die Clavicula nicht oder ungenügend gebildet. Zudem kommt es zu Verknöcherungsstörungen des Schädels, zu Kleinwuchs sowie zu überzähligen Zähnen (Froster and Matzen 2007). Cbfa1<sup>-/-</sup> Tiere überleben die Geburt nicht. Diese bilden lediglich Knorpelstrukturen ohne knöcherne Anteile, welche der Atemmechanik nicht standhalten. Cbfa1 spielt eine wichtige Rolle in der Einleitung der Differenzierung der pluripotenten MSZ zur Knochenzelllinie und der Progression und Aufrechterhaltung der Reifung zu Osteozyten. Es besitzt zudem die Fähigkeit, den Übergang der proliferierenden Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten zu stimulieren. Cbfa1 ist in diesem Fall Gegenspieler von Sox9. Eine dritte Funktion besitzt Cbfa1 in der Proliferation von Blutgefäßen in die mineralisierte Matrix der

hypertrophen Chondrozyten, so dass es zur Vaskularisierung des entstehenden Knochens beiträgt (de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001; Stein, Lian et al. 2004)(Abbildung 3).



**Abb. 3** aus de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001: Zusammenfassung der Wirkungsmechanismen verschiedener Transkriptionsfaktoren in der Chondrogenese. Die gestrichelten Linien entsprechen Ergebnissen aus in-vitro-, die anderen aus in-vivo-Studien.

#### 1.1.4 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)

BMPs gehören zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren in der Osteo- und Chondrogenese und besitzen eine Rolle in der embryonalen Entwicklung des Herzens und der Neuralleiste. Sie gehören der Superfamilie der „transforming growth factors  $\beta$ “ (TGF $\beta$ ) an. Ihre Erstbeschreibung stammt von Marshall Urist aus dem Jahre 1965 (Urist 1965). Er zeigte, dass es möglich ist, an ektooper Stelle Knochen zu generieren. Das verantwortliche Protein konnte

damals jedoch noch nicht identifiziert werden. Dieselbe Forschungsgruppe isolierte Ende der 70er Jahre ein Glykoprotein, welches diese Fähigkeit besaß (Urist, Nogami et al. 1976). Die Proteinstruktur selbst blieb bis zur Sequenzierung des BMP3 und der Klonierung des BMP2 und -4 in den 80ern unbekannt (Luyten, Cunningham et al. 1989; Wozney, Rosen et al. 1988). Heute sind ca. 20 Subtypen der BMP-Familie bekannt. BMPs agieren direkt auf Zielzellen und beeinflussen deren Proliferation, Differenzierung und ihr Apoptoseverhalten. Zudem spielt es eine Rolle in der Morphogenese. Der BMP2-Gradient im Gewebe dient als Leitstruktur für die dreidimensionale Zellanordnung (Granjeiro, Oliveira et al. 2005; Rosen 2006).

BMPs binden an spezifische Rezeptoren der Gruppe der Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren. Diese gliedern sich in die Subtypen I und II. BMPs binden an 3 Typ-I-Rezeptoren, BMPR-1A oder ALK-3, BMPR-1B oder ALK-6 und ActR-1A oder ALK-2 sowie 3 Typ-II-Rezeptoren, BMPR-II, ActR-2 und ActR-2B. Die Rezeptoren bilden nach Bindung einen heterotetramerischen Rezeptor-Komplex und starten eine Signalkaskade über Smad-Moleküle. Dies sind Transduktionsproteine, die homolog zu einem Protein der Drosophila „mothers against decapentaplegic“ (Mad) und dem C. elegans protein (Sma) sind und so ihren Namen erhielten (Chen, Zhao et al. 2004; Granjeiro, Oliveira et al. 2005).

BMP2 gehört zu den essentiellen Wachstumsfaktoren der Osteo- und Chondrogenese und erwies sich auch für die Therapie von Knorpelschäden in vivo bereits als geeigneter Wachstumsfaktor (Carlberg, Pucci et al. 2001; Gooch, Blunk et al. 2002; Musgrave, Bosch et al. 2000). Zahlreiche Studien wurden hierzu veröffentlicht. So beschrieben Sato et al. aus Urist's Arbeitsgruppe bereits 1984 die BMP2-abhängige Differenzierung von Muskelzellen in Knorpelzellen (Sato and Urist 1984). Lengner beschrieb, wie embryonale Mausfibroblasten mithilfe von BMP2 in einem in vitro Model eine chondrogenetische Differenzierung vollzogen (Lengner, Lepper et al. 2004). Sellers et al. verwendeten mit rekombinantem hBMP2 angereicherte Kollagenschwämme für die Versorgung osteochondraler Defekte im Kaninchenmodell (Sellers, Peluso et al. 1997; Sellers, Zhang et al. 2000). Sie konstatierten in histologischen Untersuchungen neben der beschleunigten Formation des subchondralen Knochens auch eine verbesserte Qualität des gebildeten Knorpelgewebes. Auch Frenkel et al. beobachteten in ihrer Kaninchenstudie die positive Wirkung von hBMP2 auf die Knorpelregeneration (Frenkel, Saadeh et al. 2000).

## **1.2 Knorpelschäden**

### **1.2.1 Ätiologie**

Partielle Schäden des hyalinen Knorpels sind häufige Verletzungen, in deren Folge sich eine Arthrose der betroffenen Gelenke entwickeln kann (Hayes, Brower et al. 2001; Mankin 1982). In einer 2004 erschienenen Studie wurden die Knie von 993 Patienten arthroskopiert und die Befunde nach dem International Cartilage Repair Society (ICRS) Score eingeteilt (Aroen, Loken et al. 2004). Hiernach wurde bei 66% der Patienten ein Knorpelschaden gefunden, 11% hatten einen tiefgreifenden Schaden (Stadium 3-4), und in 6% der Fälle war der Schaden größer als 2 cm<sup>2</sup>. Eine zweite Studie mit 1000 Patienten berichtete über 61% Knorpelschäden (Hjelle, Solheim et al. 2002). In einer retrospektiv angelegten Studie aus den USA wurden 31.516 Arthroskopien des Kniegelenks ausgewertet, die von 136 Chirurgen in einem Zeitraum von 4 Jahren durchgeführt wurden. Hier wiesen 63% einen Knorpelschaden auf. Vollschichtige (Grad 4) Defekte lagen in 19% der Fälle vor (Curl, Krome et al. 1997). Als Folge eines Knorpelschadens treten häufig Schmerzen und Bewegungseinschränkungen auf, die die Lebensqualität der betroffenen Patienten beeinträchtigen.

Die Ursachen für Knorpeldefekte können vielseitig sein. Neben Traumata und chronischer Überbelastung bei Sportlern, Fehlstellungen und/oder

Gelenkinstabilität führen auch entzündliche Prozesse zu Knorpelschäden. So bewirken Erkrankungen wie Osteonekrosen, Osteochondrosis dissecans (OD), bakterielle oder chronische Arthritiden sowie Hyperurikämie, Hyperparathyreoidismus und Hypothyreose Knorpeldegenerationen. Diese können wiederum in der Folge Veränderungen der Gelenke i.S. einer Arthrose verursachen. Oft sind die Gründe multifaktoriell. Ein Initial kleiner Schaden kann über Regenerationsprozesse die Bildung minderwertigen Faserknorpels bewirken. Dies führt zu einem Elastizitätsverlust des Gelenkknorpels und Demaskierung weiterer kollagener Fasern. Schub- und Scherkräfte an den Gelenkflächenrändern bedingen die Ausbildung von Osteophyten. Die eingeschränkte Funktion des Knorpels und die dadurch bedingten Umbauvorgänge und Entzündungsreaktionen bilden einen Circulus vitiosus und fördern so die Entstehung der Osteoarthrose und damit die Generalisierung der initial lokalen Schädigung.

### **1.2.2 Einteilungen**

Eine erste Klassifikation der Knorpelschäden wurde von Outerbridge in einem 1961 erschienen Artikel zur Ursachenforschung der Chondromalacia patellae beschrieben. Diese Einteilung verwendet direkt visuelle und palpatorische Kriterien (Outerbridge 1961). Diese können während einer Arthroskopie

ermittelt werden und ermöglichen, Knorpelschäden bereits in frühen Stadien zu diagnostizieren und bei Beschwerden frühzeitig zu therapieren.

**Grad 0** = Normalbefund, intakter Knorpel mit glatter, weißer Oberfläche und Konsistenz

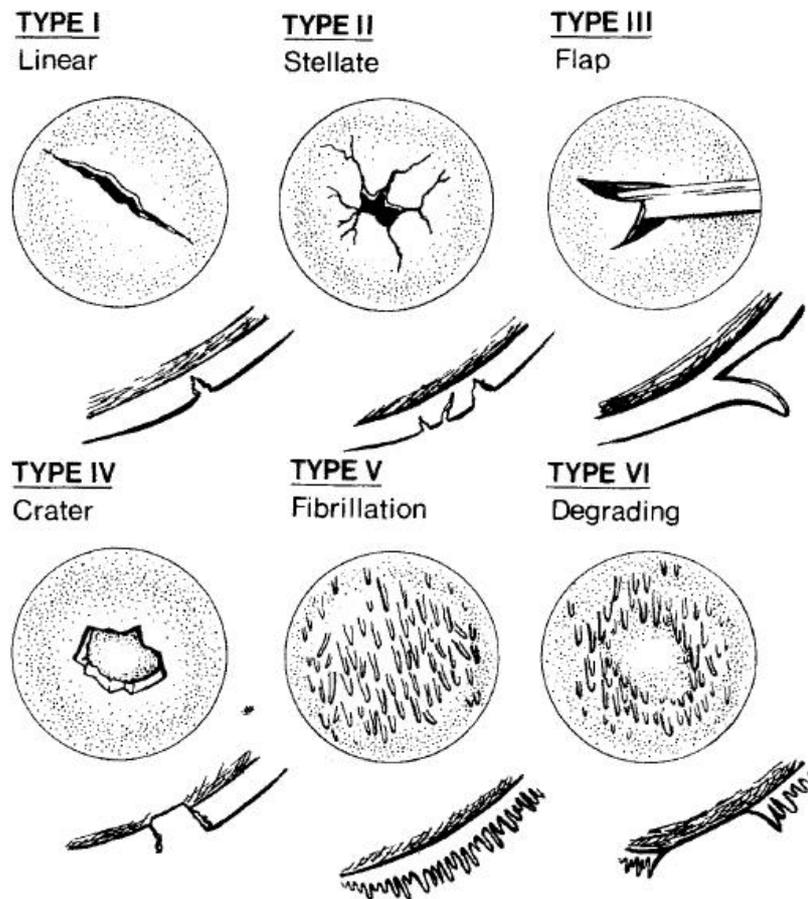
**Grad 1** = Erweichung, aber glatt erhaltene Oberfläche ohne Fibrillation

**Grad 2** = Aufgefaserter Oberfläche mit Einrissen und deutlicher Fibrillation

**Grad 3** = Tiefe Fissuren, Ulzera oder Krater mit instabilen oder unterminierten Rändern. Der subchondrale Knochen ist noch nicht erreicht

**Grad 4** = Vollschichtiger Knorpelverlust bis auf den subchondralen Knochen

Eine weitere arthroskopische Einteilung stammt aus dem Jahre 1988 (Abbildung 4). Bauer und Jackson beschrieben sechs verschiedenen Läsionstypen des Knorpels der Femurkondylen (Bauer und Jackson 1988).



**Abb. 4** Modifiziert aus Bauer und Jackson 1988:

Typ I oder lineare Knorpelfraktur (Linear): isolierte lineare Knorpelfraktur, die bis zum subchondralen Knochen reichen kann.

Typ II oder sternförmige Läsion (Stellate): mehrere divergierende Frakturlinien, z.T. mit Ausbruch eines zentralen Flakes

Typ III oder lappenförmiger Ausriss (Flap): Ausriss einer Knorpellamelle, die jedoch noch mit dem umgebenden Knorpel verbunden ist.

Typ IV oder Kratertyp (Crater): Ausriss und Ablösen eines Knorpelstücks vom subchondralen Knochen

Typ V oder Fibrillationstyp (Fibrillation): feine, faserförmige Aufrauung der Knorpeloberfläche ohne Ablösung

Typ VI oder degenerativer Typ (Degradation): der Knorpel ist erweicht, kleinere und größere Knorpelstücke sind abgelöst

Imhoff teilte osteochondrale Läsionen des Knies je nach Befund im Röntgen, MRT und Arthroskopie in fünf Stadien ein (Imhoff und König 2003) (Abbildung 5).

Einteilung der osteochondralen Läsionen am Knie unter Berücksichtigung von Röntgen, Magnetresonanztomographie und Arthroskopie				
Stadium	Röntgen	MRT	Arthroskopie	Befund
I A	Eventuell verminderte Knochendichte	Bone bruise, geringere Signalintensität T1, Ödem T2, kein Grenzzaum	Intakter Knorpel	Knochenkontusion
I B	Unauffällig	Eventuell Verdickung des Gelenkknorpels	Knorpel weich/uneben	Knorpelerweichung
II A	Verminderte Knochendichte	Niedrige Signalintensität T1/T2, Signalanstieg nach i.v.-Gd., niedrige Signalintensität T1, Grenzzaum, Knorpelalteration	Knorpel demarkiert, aber intakt	Demarkation ohne Sklerose, Knorpel intakt
II B	Verminderte Knochendichte, Abgrenzung durch Sklerose	Idem, kein Signalanstieg nach i.v.-Gd.	Knorpel demarkiert, aber intakt	Demarkation mit Sklerose, großer Herd, Knorpel intakt
III A	Partiell gelöstes Fragment	Niedrige Signalintensität T1/T2, Signalanstieg nach i.v.-Gd. im Herd, hohe Signalintensität T2, Grenzzaum, Knorpeldefekt	Herd partiell gelöst, Knorpel intakt	Partielle Ablösung, vitales Fragment, Knorpel intakt, ohne Sklerose
III B	Partiell gelöstes Fragment, Sklerosezone	Idem, aber kein Signalanstieg n. i.v.-Gd.	Herd partiell gelöst, Knorpel nicht intakt	Partielle Ablösung, avitales Fragment oder malazischer Knorpel, deutliche Sklerose
IV A	Komplett gelöstes Fragment mit/ohne Dislokation	Hohe subchondrale Signalintensität, Grenzzaum, Knorpeldefekt, Signalanstieg im Herd nach i.v.-Gd.	Freies Dissekat	Vitales freies Fragment, keine Sklerose
IV B	Komplett gelöstes Fragment mit/ohne Dislokation	Idem, kein Signalanstieg im Herd nach i.v.-Gd.	Freies Dissekat	Avitales freies Fragment, deutliche Sklerose
V A	Zystische verminderte Knochendichte, keine Sklerose	Hohe Signalintensität T2 (Anfangsphase)	Knorpel intakt oder Knorpelmalazie	Zyste ohne Sklerose
V B	Idem, Sklerosezone	Idem, Grenzzaum, niedrige Signalintensität T1/T2	Idem	Zyste mit Sklerose

**Abb. 5** aus Imhoff und König 2003: Einteilung osteochondraler Läsionen des Knies

Aufgrund der unzureichenden Korrelation zwischen den Läsionstypen, der Symptomatik und der Entstehung einer Arthrose sowie zur besseren Vergleichbarkeit von Studien wurde von der ICRS (International Cartilage Repair Society) ein Bogen zur systematischen Beurteilung von Knorpelschäden und des Heilungsprozesses entwickelt. Dieser besteht aus

einem Patientenfragebogen, in dem die Krankheitsgeschichte und die subjektiven Beschwerden ermittelt werden. Ein zweiter Teil wird vom behandelnden Arzt bearbeitet. Er enthält eine Patientenanamnese sowie die Dokumentation der klinischen und radiologischen Untersuchung. Zudem wurde ein arthroskopisches Kartierungs- und Klassifikationssystem der Knorpelschäden entwickelt. Die Klassifikation reicht von Grad 0 – keine Läsion bis zum Grad 4 – Läsionen die bis zum subchondralen Knochen reichen (Brittberg, Aglietti et al. 2000; Brittberg and Winalski 2003) (Abbildung 6). Zur Kontrolle eines Therapieerfolges hat die ICRS ein standardisiertes Beurteilungssystem entwickelt (Cartilage Repaire Assessment). Hierbei werden je nach verwendeter Operationstechnik der Grad des prozentuellen Anteils der Defektheilung oder der prozentuelle Anteil der überlebenden Transplantatfläche erhoben. Zudem wird die Integration in das umgebene Gewebe und das makroskopische Erscheinungsbild untersucht. Die drei Gruppen werden mit 0 bis 4 Punkten bewertet und zusammen gerechnet. 12 Punkte (Grad I) entsprechen einem normalen, 11-8 Punkte (Grad II) einem annähernd normalen, 7-4 Punkte (Grad III) einem abnormen und 3-1 Punkte (Grad IV) einem äußerst abnormen Knorpel (Brittberg, Aglietti et al. 2000).

Bis zum heutigen Tage fehlt eine einheitliche Klassifikation. Es bestehen lediglich mehrere Systeme nebeneinander. Eine einheitliche Klassifikation

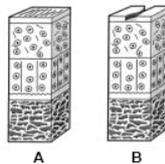
wäre zur Erforschung und Verbesserung der Diagnose- und Therapieoptionen wünschenswert.

**ICRS Grade 0 - Normal**



**ICRS Grade 1 – Nearly Normal**

Superficial lesions. Soft indentation (A) and/or superficial fissures and cracks (B)



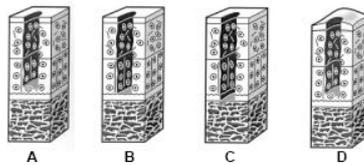
**ICRS Grade 2 – Abnormal**

Lesions extending down to <50% of cartilage depth

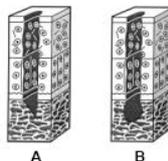


**ICRS Grade 3 – Severely Abnormal**

Cartilage defects extending down >50% of cartilage depth (A) as well as down to calcified layer (B) and down to but not through the subchondral bone (C). Blisters are included in this Grade (D)



**ICRS Grade 4 – Severely Abnormal**



Copyright © ICRS

**Abb. 6** aus: Brittberg, Aglietti et al. 2000: Gradeinteilung der Knorpelschäden nach der International Cartilage Repair Society (ICRS)

### **1.3 Regenerationsmöglichkeiten und therapeutische Ansätze**

Die Regenerationsfähigkeit des Knorpels ist eingeschränkt. Dies liegt an der fehlenden Blutgefäß- und Nervenversorgung. Als Folge ist seine Reaktion auf Schädigung ineffizient und Gelenkknorpel regeneriert nach Verletzungen meist nur unvollständig. Selbst bei Affektion des subchondralen Knochens kann sich, durch ein aus Blutgefäßen aus dem Markraum einspritzendes Granulationsgewebe, bestenfalls mechanisch minderwertiger Faserknorpel bilden. Dieser neigt zur schnellen Degeneration mit konsekutiver Entwicklung einer Osteoarthrose (O'Driscoll 1998).

Der genaue weitere Verlauf eines Knorpelschadens ist jedoch nur schwer voraussehbar, da die Prävalenz von Knorpeldefekten nicht genau zu ermitteln ist. Kleine Schäden sind in radiologischen Untersuchungen nicht sicher diagnostizierbar, meist werden Knorpelschäden erst durch eine begleitende Schmerzsymptomatik auffällig. Die unter Punkt 1.2.1 von Aroen, Hjelle und Curl beschriebenen Studien sowie die von Linden im Jahre 1977 zum Verlauf der Osteochondrosis dissecans (OD) weisen jedoch darauf hin, dass Knorpelschäden vor allem bei jungen Patienten lange symptomlos bleiben und eine Osteoarthrose sich wenn überhaupt erst verspätet bildet. Knorpelschäden bei älteren Patienten würden im Vergleich schon nach

kürzerer Zeit zu Symptomen und zu degenerativen Prozessen führen. Eine Therapie ist nach heutigem Stand nur bei symptomatischen Knorpelschäden indiziert (Aroen, Loken et al. 2004; Curl, Krome et al. 1997; Fritz, Gaissmaier et al. 2006; Hjelle, Solheim et al. 2002; Linden 1977).

Zur Therapie von Knorpelläsionen werden in der Klinik aktuell drei verschiedene Prinzipien angewandt: Stammzellrekrutierende Verfahren, Knorpelzell-transplantation und Knorpel-Knochen-Transplantationen.

### **1.3.1 Stammzellrekrutierende Verfahren resp. Mikrofrakturierung**

Aufgrund der geringen Proliferationsrate der Chondrozyten und der fehlenden Vaskularisation kommt es nur selten zur spontanen Heilung eines Knorpelschadens. Erreicht die Wunde den subchondralen Knochen, kann es über die Bildung eines Wundhämatoms und Rekrutierung von Stammzellen zur Bildung von Faserknorpel kommen (Fritz, Gaissmaier et al. 2006). Dieses Prinzip wird bei der Mikrofrakturierung ausgenutzt. Von Steadman et al. erstbeschrieben, wird nach dem Debridement des Knorpelschadens der subchondrale Knochen präpariert. Hierzu werden in einem Abstand von 3-4 mm ca. 4mm tiefe Löcher mit einer Ahle eingeschlagen und so die Oberfläche eröffnet. Es bildet sich ein Hämatom und Wachstumsfaktoren werden freigegeben (Steadman, Rodkey et al. 1997). So können sich aus

mesenchymalen Stammzellen Chondrozyten-ähnliche Zellen bilden, die jedoch auch im besten Fall lediglich Faserknorpel synthetisieren. Einen wichtigen Anteil an der Therapie hat die Nachsorge. Diese beinhaltet passive Übungen und eine Entlastung für mind. 6 Wochen. Die Kurzzeitergebnisse sind gut. Angenommen wird, dass es vor allem bei jungen Patienten mit kleinen Defekten, die nicht über den subchondralen Knochen hinausgehen, zu einer subjektiven Beschwerdelinderung kommt (Kellett, Boscainos et al. 2006; Smith, Knutsen et al. 2005). Ein verwandtes Verfahren ist die 1959 von Pridie beschriebene Knochen-Anbohrung mit ähnlichen Ergebnissen (Pridie 1959).

### **1.3.2 Autologe und Matrix-induzierte Chondrozytenimplantation (ACI/MACI)**

Chondrozyten werden in einer ersten Operation, meist aus der supra-lateralen Femurkondylenkante, der Notch oder aus dem Rand des Knorpelschadens, entnommen. Diese werden in einem Labor unter Verwendung von Methoden des „Tissue Engineerings“ angezüchtet und in einem zweiten Eingriff mit Hilfe eines Periostlappens (Autologe Chondrozyten-Implantation, kurz ACI) oder eines Scaffolds, z.B. einer Kollagenmatrix, (Matrix-induzierte autologe Chondrozytenimplantation, kurz MACI) in den Defekt reimplantiert. Indikationen für dieses Therapieverfahren

sind bei aktiven und sportlichen Patienten Defekte  $>1,5 \text{ cm}^2$  der Grade III und IV nach Outerbridge. Aber auch größere Schäden können mit dieser Methode behandelt werden. Die klinischen Ergebnisse sind mit denen der Mikrofrakturierung zu vergleichen, wenn auch der gebildete Knorpel mehr hyaline Merkmale besitzt (Brittberg, Lindahl et al. 1994; Kellett, Boscainos et al. 2006; Peterson, Brittberg et al. 2002; Smith, Knutsen et al. 2005). Zudem ist anzumerken, dass vor oder während des ersten Eingriffs eine mögliche Ursache wie Gelenkfehlstellungen, Meniskusschäden oder Bandinstabilitäten behandelt werden müssen, um die mechanischen Bedingungen für die erfolgreiche Therapie sicher zu stellen. Die Nachbehandlung beinhaltet reine passive Bewegungen für 6 Wochen und eine schrittweise Aufbelastung ab der 7. Woche. Rotationssportarten sollten mindestens ein Jahr unterbleiben (Kellett, Boscainos et al. 2006; Smith, Knutsen et al. 2005).

### **1.3.3 Knorpel-Knochen-Transplantationen z.B. Osteochondral Autograft Transplantation (OATS)**

Bei der Knorpel-Knochen-Transplantation z.B. OATS wird während einer Arthrotomie oder Arthroskopie aus einer Donorregion ein Knorpelknochenzylinder entnommen und an die Stelle des Defektes transplantiert. Als Donorregion dienen meist die supra-lateralen/medialen Femurkondylen. Der Durchmesser des entnommenen Zylinders ist etwas

größer als der des ausgestanzten Defektbereichs, welches eine Press-Fit-Insertion ermöglicht.

Der Vorteil dieser Technik liegt in der Qualität des Transplantats, welches aus lebendem hyalinen Knorpel und Knochen besteht. Der Nachteil ist jedoch die Morbidität der Donorseite. Diese füllt sich zwar zum Teil mit Faserknorpel auf, die biologische Qualität entspricht jedoch nicht der des ursprünglichen Knorpels. Zudem sind die Spenderregionen limitiert. Es ist darauf zu achten, dass der Zylinder genau mit dem umgebenden Knorpel abschließt.

Indikationen für diese Technik sind Knorpelschäden des Knies der Grade III/IV nach Outerbridge, die einen Durchmesser von 3 cm nicht überschreiten, sowie fokale Osteonekrosen oder Defekte bei Osteochondrosis dissecans Grad III/IV. Behandelt werden können aber auch Knorpelschäden des Capitulum und der Trochlea humeri (Ellenbogen) sowie des Talus (Sprunggelenk).

Mehrere Studien zeigten gute bis exzellente Ergebnisse bei 75 bis über 90% der Patienten, auch wenn nur wenige Langzeitergebnisse veröffentlicht wurden (Kelleff, Boscainos et al. 2006; Smith, Knutsen et al. 2005). Gudas et al. verglich in einer prospektiven randomisierten Studie aus dem Jahre 2006 die Ergebnisse von OATS-Operationen mit denen der Mikrofrakturierung anhand von 57 Sportlern. Die Patienten wurden in zwei Gruppen

randomisiert. Bei Patienten der ersten Gruppe wurde eine Mikrofrakturierung, in der zweiten Gruppe eine OATS-Operation durchgeführt. Die Patienten wurden anhand des modifizierten Hospital for Special Surgery (HSS) und des ICRS-Scores evaluiert. Die Untersuchungen zeigten nach dem modifizierten HSS und dem ICRS-Score gute bis exzellente Ergebnisse bei 96% in der OATS-Gruppe im Vergleich zu 52% in der Gruppe der Mikrofrakturierung. Nach durchschnittlich 6,5 Monaten konnten nach OATS-Operation 93%, nach Mikrofrakturierung 52% der Athleten das sportliche Niveau, welches sie vor der Verletzung hatten, wieder erlangen (Gudas, Stankevicius et al. 2006).

Zur Behandlung größerer Defekte wurde im Jahre 2002 durch Agneskirchner et al. die Mega-OATS-Technik beschrieben. Diese Technik vereint einen Femurkondylentransfer mit einer Press-Fit-Verankerung. Hierzu wird zunächst der posteriore Femurkondylus abgetrennt und aus diesem mit Hilfe eines Hohlbohrers ein Zylinder ausgesägt. Dieser wird dann an die Stelle des zuvor ausgefrästen Knorpel-Knochendefektes eingesetzt. Die ersten Ergebnisse sind vielversprechend. Braun et al. konnte eine signifikante Verbesserung des Lysholm „Knee Score“ fünf Jahre nach der Operation zeigen (Braun, Minzlaff et al. 2008). Dieses zeigt auch die im Jahre 2005 veröffentlichte Studie von Karataglis (Karataglis and Learmonth 2005). Jedoch ist zu beachten, dass die Indikation zu diesem Verfahren sehr streng

gestellt werden muss. Es sollten lediglich junge Patienten (<50 LJ) behandelt werden, da sonst gehäuft Komplikationen bezüglich der Einheilung des Zylinders auftreten. Zudem sollte bei Patienten mit Tätigkeiten in hockender oder kniender Position von dieser Therapie abgesehen werden (Brucker, Agneskirchner et al. 2002).

#### **1.3.4 Ausblick**

In Erforschung sind zurzeit Therapieoptionen, die auf Methoden des „Tissue Engineerings“ beruhen. Hierbei wird in vitro biologisches Ersatzgewebe unter Kontrolle der physikalisch-chemischen sowie mechanischen Parameter synthetisiert (Stoltz, Bensoussan et al. 2006). Eine wichtige Rolle spielen dabei Wachstumsfaktoren, Zytokine, die eine zusätzliche Stimulation zur Differenzierung, Migration, Proliferation und Matrixsynthese der Zellen bewirken. In Kombination mit gentherapeutischen Methoden können nach Implantation die Proliferation, Synthese und Differenzierung der Zellen über die Expression von Genen und die Synthese von Wachstumsfaktoren gesteuert werden (Cucchiaroni and Madry 2005). Der Vorteil gentherapeutischer Methoden gegenüber matrixassoziierten oder direkter Applikation von Wachstumshormonen durch Injektion liegt in den geringeren

regionalen und systemischen Nebenwirkungen bei länger anhaltendem Effekt.

Unterschieden werden zwei Typen von Vektorsystemen zur Transduktion von Genen, virale und nicht-virale Vektoren. Der Vorteil der nicht-viralen Vektoren (Plasmide) ist die einfache Durchführbarkeit, geringe Immunogenität und minimale onkogene Potenz. Die viralen Vektoren zeichnen sich dagegen durch eine im Vergleich deutlich höhere Transduktionsrate aus, weswegen sie häufig in der Forschung verwendete Vehikel des Gentransfers darstellen (Gardlik, Palffy et al. 2005; Lundstrom and Boulikas 2003; Ueblacker, Wagner et al. 2004; Vogt, Ueblacker et al. 2008).

Als besonders effizientes und stabiles Vektorsystem stellte sich der VSV.G pseudotyped retroviral vector (pBullet) heraus. Vogt et al. ermittelten eine Transduktionsrate von über 90%, wobei die Expression der Reportergene auch nach 52 Wochen hoch war (Vogt, Ueblacker et al. 2008).

#### **1.4 Ziele dieser Arbeit**

Knorpelschäden sind häufige Verletzungen, die zu Morbidität und einem starken Leidensdruck führen können. Es wurden mehrere Methoden, wie die Mikrofrakturierung, autologe Chondrozyten-Implantation (ACI) und die osteochondrale Autografttransplantation (OATS), experimentell und klinisch entwickelt und erprobt. Sie finden klinische Anwendung, führen jedoch entweder zu einer nicht vollständigen Heilung des hyalinen Knorpels oder zu einer iatrogenen Läsion bei der Gewebeentnahme (siehe hierzu auch Punkt 1.3).

Zur weiteren Untersuchung und Entwicklung therapeutischer Verfahren und Behandlung von Knorpelschäden ist die Kenntnis molekularer Mechanismen und das Zusammenspiel der verschiedenen Wachstumsfaktoren eine unabdingbare Voraussetzung. BMP2 gehört zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren in der Osteo- und Chondrogenese und erwies sich auch für die Therapie von Knorpelschäden in vivo bereits als geeigneter Wachstumsfaktor (Frenkel, Saadeh et al. 2000; Lengner, Lepper et al. 2004; Sato and Urist 1984; Sellers, Peluso et al. 1997; Sellers, Zhang et al. 2000). Jedoch wurde lediglich die Kurzzeitwirkung von BMP2, nicht jedoch der Effekt

nach stabiler Transduktion und stabiler Expression des für BMP2 kodierenden Gens untersucht. Der Langzeiteffekt bleibt somit unklar.

Eine Analysemethode intrazellulärer Vorgänge ist die RT-PCR. Diese vereinigt die reverse Transkription (RT) der RNA mit einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Sie weist eine hohe Sensitivität auf, wodurch es möglich ist, die Transkription von Genen weniger Zellen annähernd in vivo zu analysieren. Wird eine semiquantitative oder Real-Time-PCR verwendet, ist zudem neben einer qualitativen auch eine quantitative Aussage möglich.

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse von BMP2-überstimulierten Knorpelregeneraten mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) sowohl in vitro als auch in vivo in einem Kaninchenmodell.

Während der vorbereitenden Literaturrecherche kristallisierten sich fünf Marker heraus, die in der Chondrogenese eine wichtige Rolle spielen oder spezifisch für verschiedene Stadien derselben sind:

- **Kollagen Typ I** als Bestandteil des reparaturbedingten Faserknorpels
- **Kollagen Typ II** als essentieller Bestandteil des hyalinen Knorpels und als Marker der Proliferationsphase der Chondrogenese
- **Kollagen Typ X** als Marker des hypertrophen Knorpels

- **Sox9**, ein Transkriptionsfaktor, der für die Reifung der mesenchymalen Zellen zu reifen Chondrozyten eine essentielle Rolle besitzt und gleichzeitig den Übergang in die hypertrophe Phase bremst.
- **Cbfa1/Runx2**, ein Transkriptionsfaktor, der die Fähigkeit besitzt, die Differenzierung zu hypertrophierten Chondrozyten zu fördern und damit einen Gegenspieler zu Sox9 bildet.

Zusätzlich wurde die Expression von BMP2, einem der wichtigsten Wachstumsfaktoren in der Osteo- und Chondrogenese mit osteo- und chondroinduktivem Potential, untersucht

Für diese Arbeit wurden zunächst Primer und Sonden der fünf erstgenannten Markerproteine etabliert. Mit Hilfe der qRT-PCR konnte nun die Wirkung des Transkriptionsfaktors BMP2 auf die Chondrogenese und die regenerative Fähigkeit am Kaninchenmodell analysiert werden. Hierfür wurde isolierten und proliferierten Chondrozyten das Gen des Wachstumsfaktors BMP2 mithilfe von zwei Vektorsystemen transduziert. Zum einen über eine Plasmid-DNA (COPROG), zum anderen über ein virales Vektorsystem (pBullet). Zunächst wurde die Proteinsynthese viral transduzierter Chondrozytenkulturen nach 7 und 10 Tagen mittels der in dieser Arbeit etablierten qRT-PCR untersucht. Des Weiteren wurden Chondrozyten nach

Zellkultur in Knorpel-Knochendefekte reimplantiert und die Transkription der Markerproteine im entstandenen Regeneratknorpel analysiert.

## **1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

### **1.5.1 Die Entwicklung der molekularen DNA-Analytik**

Noch in den 70er Jahren war die Desoxyribonukleinsäure eines der am schwersten zu analysierenden Moleküle. Untersuchungen des Informationsgehalts der Basensequenz waren nur indirekt möglich, z. B. dem Informationsfluss folgend durch RNA- resp. Protein-Sequenzierungen oder durch genetische Analysen an geeigneten Organismen.

Mit der Entdeckung von Restriktionsendonukleasen wurde die direkte Untersuchung der DNA stark vereinfacht. Kartierungen von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen erlaubten das Auffinden von Unterschieden im Erbgut verschiedener Individuen und eine Assoziation bestimmter Befunde auf der Ebene der DNA mit phänotypischen Ausprägungen.

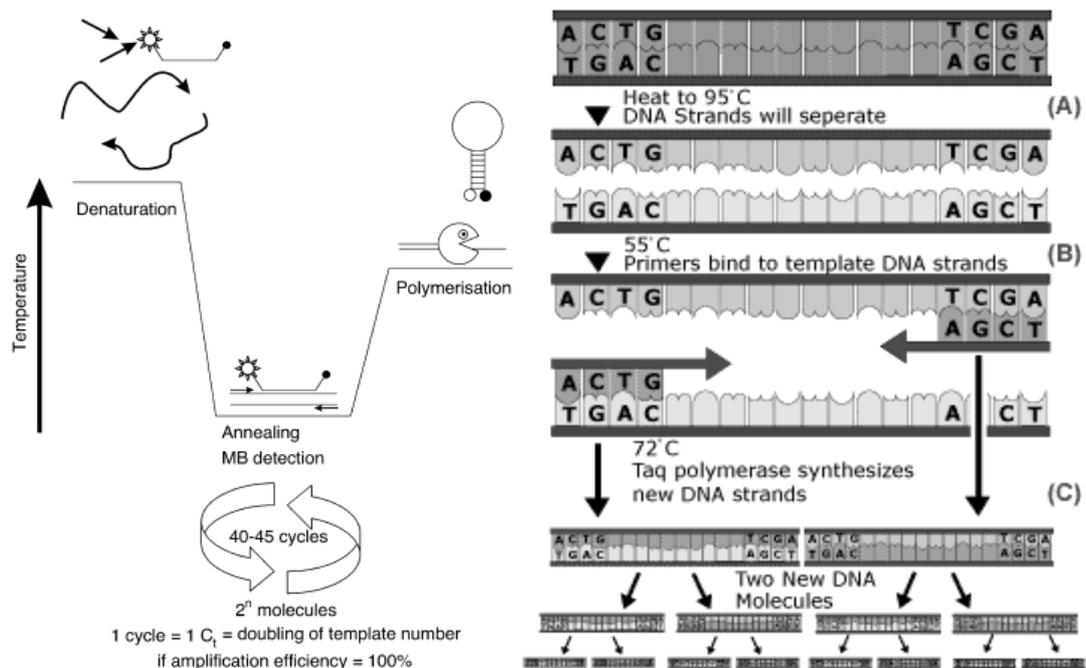
Die Untersuchung der DNA vereinfachte sich erheblich mit dem Aufkommen einfacher technischer Verfahren zur Vervielfältigung definierter DNA-Sequenzen, wodurch diese einer Analyse zugänglich wurden. Mit Hilfe der

Polymerase-Kettenreaktion konnte innerhalb von wenigen Stunden aus nur einem einzigen DNA-Molekül praktisch jeder beliebige Abschnitt milliardenfach kopiert werden. Heute ist diese als „PCR“ bezeichnete Methode wohl eines der wichtigsten biochemischen Verfahren der molekularen DNA-Analytik und deren unverzichtbare Grundlage. In einer Vielzahl von Varianten wird die PCR nicht nur zur Vervielfältigung von Sequenzabschnitten verwendet, sondern auch zur Quantifizierung der Expressionsaktivität anhand der Menge der in der Probe initial vorhandenen RNA-Stränge. Diese quantitativen Untersuchungen haben eine große Bedeutung bei Expressionsstudien, der Analyse der Genaktivität. Hierzu ist zunächst die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) notwendig (RT-PCR).

### **1.5.2 Funktionsweise der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, spezifische Sequenzbereiche aus geringsten Nukleinsäuren-Ausgangsmengen und zudem schnell in vitro zu amplifizieren und sie so einer Analyse oder Weiterverarbeitung zugänglich zu machen. Das Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion ist in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt. Ein doppelsträngiges DNA-Molekül wird durch Hitzeeinwirkung aufgeschmolzen (denaturiert). Die Einzelstränge dienen in der Folge als

Matrize für die enzymatisch katalysierte Polymerisation von Desoxyribonukleotiden, wodurch wieder doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen.



**Abb. 7** aus Bustin 2005: Schematische Repräsentation eines PCR-Zyklus. (Hier einer Real-Time PCR mit Molecular-Beacon-Sonden). Die Temperatur wird zunächst erhöht, so dass die DNA-Doppelstränge denaturieren. Hiernach wird die Temperatur auf die Annealing-Temperatur gesenkt, so dass die Primer komplementär an die Zielsequenz binden. Nun wird die Temperatur erneut auf die für die DNA-Polymerase spezifische Temperatur erhöht und die Sequenz repliziert.

**Abb. 8** aus NBII: Die Doppelstrang-DNA wird durch Hitzeeinwirkung denaturiert. Die Primer bilden die Startpositionen für die Replikation durch die DNA-Polymerase. Wird der Zyklus mehrmals wiederholt, steigt die Anzahl der primerpaarspezifischen Sequenz exponentiell.

Die als Primer bezeichneten Oligodesoxyribonukleotide definieren dabei den zu kopierenden Sequenzabschnitt, indem sie an Orten komplementärer Sequenz mit der Ziel-DNA hybridisieren und als Starter für die Polymerisation dienen. Hierfür wird nach der Denaturierung der DNA-Doppelstrangmoleküle die Temperatur verringert (Annealing-Temperatur), wodurch sich die Primer an die Sequenzen binden.

Nun wird die Temperatur erneut erhöht und eine DNA-Polymerase repliziert die Sequenz. Dieser Zyklus wird mehrmals wiederholt, so dass die Produktmenge exponentiell ansteigt. Dieser Prozess der exponentiellen Produktbildung wird von verschiedenen Faktoren begrenzt und erreicht schließlich einen Plateauwert.

Die biochemische Amplifikation von DNA *in vitro* wurde erstmals 1971 von Kleppe et al. beschrieben (Kleppe, Ohtsuka et al. 1971). 1988 verwendete Kary B. Mullis zum ersten Mal eine hitzestabile DNA-Polymerase und bekam 1993 für die Erfindung der PCR den Nobelpreis (Saiki, Gelfand et al. 1988; Saiki, Scharf et al. 1985).

Damit wurde eine schnelle, einfache und automatisierbare *in-vitro*-Amplifikation definierter DNA-Fragmente aus geringen Mengen heterogener DNA möglich. Eine Übersicht zu Anwendungen der PCR-Technik geben

spezielle Übersichtsartikel (Arnheim and Erlich 1992; Bej, Mahbubani et al. 1991; Bloch 1991; Erlich 1989)

### **1.5.3 Primerdesign**

Um Primer auszuwählen, muss zunächst die geeignete Zielsequenz bekannt sein. Gensequenzen können aus verschiedenen Gendatenbanken ermittelt werden. Hierzu gehören die Datenbanken des „National Center for Biotechnology Information“ kurz NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) oder Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Die Gensequenzen werden in verschiedenen Formaten angegeben. Der Vorteil der NCBI-Datenbank ist die Masse an vorhandenen Sequenzen. Diese ist bei Ensembl nicht gegeben. Deren Vorteil liegt jedoch in der Fülle an Informationen, die zu den Sequenzen bereitgestellt werden. So werden z.B. errechnete Exon-Introngrenzen angegeben.

Das Primerdesign ist von mehreren Faktoren abhängig, die beachtet werden müssen:

1. Die beiden Primer eines Primerpaares sollten eine ähnliche Schmelztemperatur ( $T_m$ ) besitzen. Diese ist bei Sequenzen einer Länge von weniger als 25 Basenpaaren (bp) annäherungsweise zu errechnen. Hierfür wird einer GC-Bindung  $4^\circ\text{C}$  und einer AT-Bindung

2°C als Beitrag zur Schmelztemperatur zugewiesen (Thein and Wallace 1986).

2. Die Primer sollten eine Länge von 18-22 bp besitzen.
3. Das PCR-Produkt sollte zwischen 100-1000 bp lang sein.
4. Handelt es sich um eine Untersuchung von mRNA, ist es wichtig, die Primer möglichst Intronübergreifend auszuwählen, so dass sie von einem Exon zum nächsten reichen. Ist dies nicht möglich, können die Primerpaare so platziert werden, dass sie jeweils auf verschiedenen Exons liegen. So kann verhindert werden, dass fälschlicherweise DNA-Sequenzen repliziert werden und ein falsch positives Ergebnis liefern.
5. Zudem sollte beachtet werden, dass die Primer keine Homo- und Heterodimere oder Hairpins bilden können. Hierfür sollten Sequenzen mit mehr als 4 homologen bp verhindert werden.
6. Um die Spezifität der Primer sicher zu stellen, sollten diese mit Sequenzen der Spezies auf Homologien verglichen werden. Dieses ist mithilfe des „Basic Local Alignment Search Tool“ kurz BLAST des NCBI möglich ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

Hilfestellung bei der Ermittlung der Primer bieten verschiedene Programme wie z.B. „PrimerSelect“ des Produkts „Lasergene“ der Firma „DNASTAR“. Es

gibt viele weitere. Diese ermöglichen, Sequenzen aus Datenbanken herunter zu laden, verschiedene Kriterien und die Lokalisation der gewünschten Primer anzugeben und dann aus einer Liste die Primer auszuwählen.

Die oben genannten Regeln sind jedoch nicht absolut, so dass die Primer überprüft und der Versuchsaufbau angepasst werden muss. Dieses ist durch die Modifikation vier essentieller Parameter einer PCR möglich: 1. die  $Mg^{2+}$ -Konzentration, 2. die Annealing-Temperatur, 3. der pH-Wert und 4. die Zyklenzahl.

#### **1.5.4 Quantitative PCR**

Eine bedeutende Anwendung der PCR ist die Quantifizierung von bestimmten Nukleinsäuren in einer Probe. Die in den Proben vorhandenen Mengen an Nukleinsäuren sind in der Regel so gering (von einem Molekül bis zu einigen Millionen Molekülen), dass ihre direkte Quantifizierung nur mit unverhältnismäßig großem Aufwand oder auch gar nicht möglich wäre. Die PCR bietet eine einfache Möglichkeit, die Menge der zu quantifizierenden Sequenzen durch ihre Amplifikation einer quantitativen Analyse zugänglich zu machen. Hierfür stehen im Wesentlichen drei unterschiedliche Methoden zur Verfügung.

Bei der „Limitierenden Verdünnungstechnik“ werden serielle Verdünnungen der Probe in die PCR eingesetzt und bestimmt, bei welcher Verdünnungsstufe sich im Mittel nur noch eine einzige Kopie der Zielsequenz im Reaktionsansatz befindet. Die Anzahl der benötigten Reaktionsansätze steigt schnell mit den Anforderungen an die Genauigkeit der Bestimmung. Die Genauigkeit leidet bei sehr geringen initialen Templatekopienzahlen (Sykes, Neoh et al. 1992).

In der kompetitiven PCR wird ein Kompetitor koamplifiziert. Dieser muss mit der Probe eine möglichst ähnliche Sequenz aufweisen und mit identischer Effizienz amplifiziert werden. Hierdurch kann über die Endmenge des Kompetitors auf die Ausgangsmenge der zu untersuchenden Probe geschlossen werden (Gilliland, Perrin et al. 1990; O'Connell, Goode et al. 1998; Raeymaekers 1995; Zimmermann and Mannhalter 1996).

Ein weiteres Verfahren ist die Real-Time-PCR.

### **1.5.5 Real-Time-PCR**

Dieses ist wohl das meistgenutzte Verfahren. Hier wird die Produktakkumulation in Echtzeit (Real-Time) verfolgt. Dieses geschieht störungsfrei über Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit der

Produktmenge generiert wird und zur Quantifizierung ausgenutzt werden kann (Arya, Shergill et al. 2005).

Die Quantifizierung der initialen Kopiezahl ist über verschiedene Rechenmodelle möglich. Dabei kann die relative und absolute Menge berechnet werden. Anzumerken ist jedoch, dass die absolute Messung von vielen Störgrößen beeinflusst wird und somit leicht ungenau werden kann. So ist die genaue Menge eines zugefügten Standards zu ermitteln und sicher zu gehen, dass dieser nicht durch andere DNA bzw. RNA kontaminiert ist. Auch die Haltbarkeit des Standards muss beachtet werden. Zudem ist die Effizienz der Polymerase und ggf. der reversen Transkriptase bei Untersuchungen von RNA von Wichtigkeit, da sonst nach reverser Transkription nicht auf die absolute RNA-Menge geschlossen werden kann.

Mehrere Vektoren stehen zur Verfügung. Einer der ersten Fluoreszenzfarbstoffe ist Ethidiumbromid. Er gehört zu den Doppelstrang-DNA (dsDNA)-bindenden Farbstoffen. Ethidiumbromid kann durch UV-Licht angeregt werden. Die Intensität korreliert mit der Menge synthetisierter dsDNA.

Ein weiterer, heute häufig genutzter Fluoreszenzfarbstoff ist „SYBER-Green I“. Dieser Cyaninfarbstoff hat eine ca. 100mal stärkere Affinität zu dsDNA als Ethidiumbromid und kann durch Blaulicht angeregt werden. Geschieht dies,

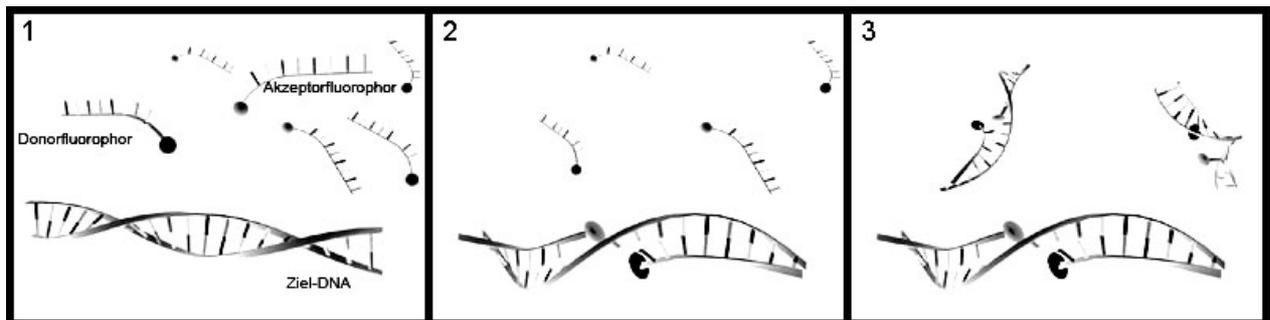
verstärkt sich die Fluoreszenz im gebundenen Zustand um das 1000fache gegenüber dem freien Zustand. SYBER-Green I ist somit sehr gut geeignet, um doppelsträngige Produkte zu quantifizieren (Arya, Shergill et al. 2005; Kubista, Andrade et al. 2006).

Eleganter und sequenzspezifisch ist die Quantifizierung in Echtzeit unter Verwendung von fluorophormarkierten Oligonukleotiden, so genannter Sonden (Cardullo, Agrawal et al. 1988). Gemessen wird hierbei entweder die Zunahme des Resonanzenergietransfers von einem Donor- auf einen Akzeptorfluorophor (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer, kurz „FRET“) oder die Abnahme der Löschung (Quench) einer Reporter-Fluoreszenz (Arya, Shergill et al. 2005; Cardullo, Agrawal et al. 1988; Kubista, Andrade et al. 2006).

Zu den bekanntesten Varianten von Real-time-Detektionssystemen, die FRET zur Generierung sequenzspezifischer Fluoreszenzsignale nutzen, zählen:

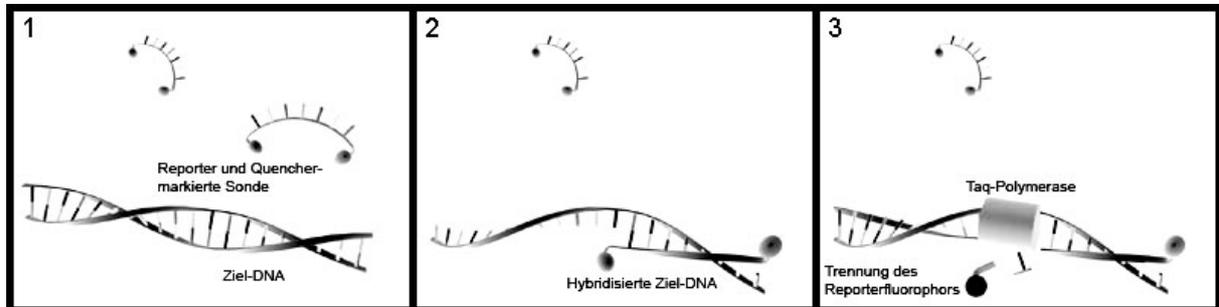
- **Hybridisierungssonden:** Hybridisierungssonden bestehen aus einem Sondenpaar. Sie hybridisieren auf der Zielsequenz an nah beieinander gelegenen Stellen. Die erste Sonde hat an Ihrem Ende ein Donorfluorophor, die zweite ein Akzeptorfluorophor. Angeregt wird sie durch Licht einer Wellenlänge, die vom Donorfluorophor absorbiert wird.

Nach Hybridisierung kommt es zum FRET, und die übertragene Energie wird als Fluoreszenzlicht abgegeben (Arya, Shergill et al. 2005; Kubista, Andrade et al. 2006) (Abbildung 9).



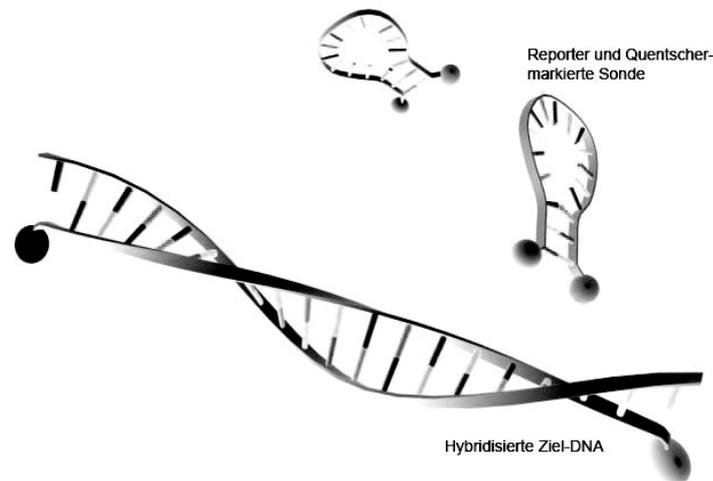
**Abb. 9** Modifiziert aus Jähnichen "LightCycler Probes.jpg" 2005: Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der Real-Time-PCR und Hybridisierungssonden. Das Sondenpaar hybridisiert an nah beieinander gelegenen Stellen, so dass es zwischen dem Donor auf der einen Sonde und dem Akzeptor auf der Anderen zu einem FRET kommt.

- **Hydrolysesonden resp. TaqMan-Sonden:** TaqMan-Sonden sind an einem Ende mit einem Reporterfluorophor und zentral mit einem Quencher versehen. Im freien Zustand wird die Fluoreszenz durch den Quencher unterdrückt. Hybridisiert die Sonde auf der Zielsequenz, wird sie während der Verlängerung des Primers durch die hier verwendete Taq-DNA-Polymerase hydrolysiert. Der Quencher wird räumlich von dem Reporterfluorophor getrennt und dessen Fluoreszenz kann gemessen werden (Arya, Shergill et al. 2005; Holland, Abramson et al. 1991; Kubista, Andrade et al. 2006) (Abbildung 10).



**Abb. 10** Modifiziert aus Jähnichen "TaqMan Probes.jpg" 2005: Nach Hybridisierung der TaqMan-Sonde wird diese durch eine Taq-DNA-Polymerase hydrolysiert. Der Quencher wird räumlich von dem Reporterfluorfor getrennt und die entstehende Fluoreszenz gemessen.

- **Molecular Beacons:** Diese Sonden sind am 3'- sowie am 5'-Ende mit einem Reporterfluorophor bzw. einem Quencher versehen. Die endständigen Nukleotidsequenzen beider Enden sind zueinander komplementär, der Mittelteil ist für die Zielsequenz spezifisch. Im freien Zustand liegen sie so in einer Stem-Loop-Struktur vor. Hybridisieren die Sonden an die Zielsequenz, werden Reporterfluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt, wodurch es zur Fluoreszenz kommt (Arya, Shergill et al. 2005; Kubista, Andrade et al. 2006; Tyagi, Bratu et al. 1998; Tyagi and Kramer 1996) (Abbildung 11).



**Abb. 11** Modifiziert aus Jähnichen "Molecular Beacons.jpg" 2005: Im freien Zustand liegen Molecular-Beacon-Sonden in einer Stem-Loop-Struktur vor. Nach Hybridisierung werden der Reporterfluorophor und der Quencher voneinander getrennt und es kommt zu Fluoreszenz.

- **Scorpion Primer:** Scorpion-Primer bestehen ähnlich den Molecular Beacons aus einem Reporterfluorophor, einem Quencher und einer einen Loop bildenden Sequenz. Zudem ist ihnen ein sequenzspezifischer Primer angehängt. Wird dieser während des PCR-Zyklus verlängert, kann der Mittelteil der Loopsequenz an den synthetisierten DNA-Strang binden und so den Reporter von dem Quencher trennen. Eine Reporter-Fluoreszenz kann somit beobachtet werden (Arya, Shergill et al. 2005) (Abbildung 12).

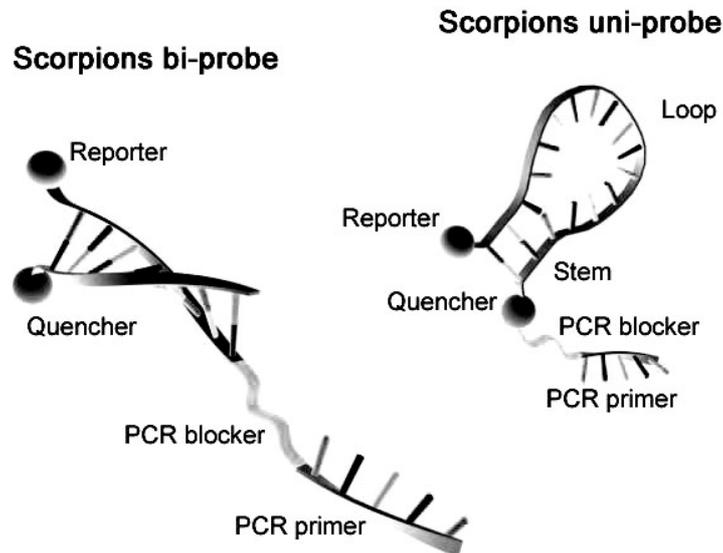


Abb. 12 Modifiziert aus Jähnichen "Scorpions Probes.jpg" 2005

### 1.5.6 Reverse Transkription (RT-PCR)

Möchte man die Genaktivität messen, muss zunächst die Total RNA in cDNA mittels einer reversen Transkriptase (RT) umgeschrieben werden.

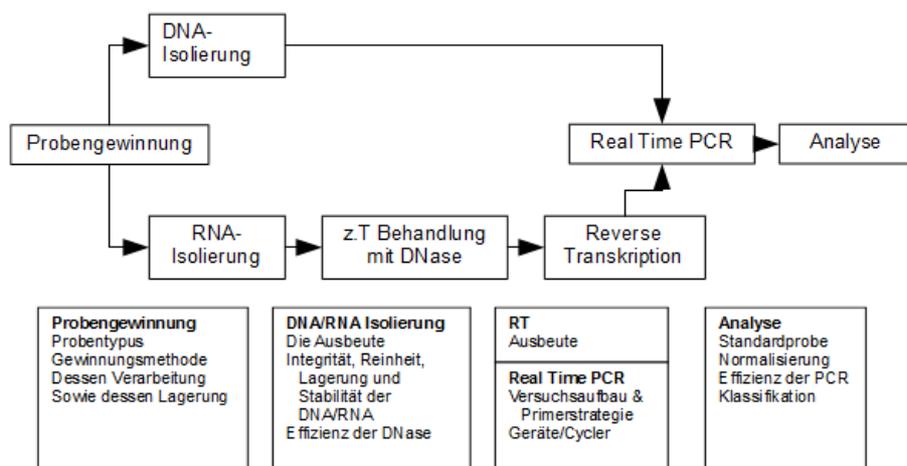


Abb. 13 modifiziert:aus Kubista, Andrade et al. 2006: Schema der DNA/RNA-Analyse von der Probengewinnung bis zur Ergebnissanalyse. Die Variations- bzw. Fehlerquellen sind angegeben.

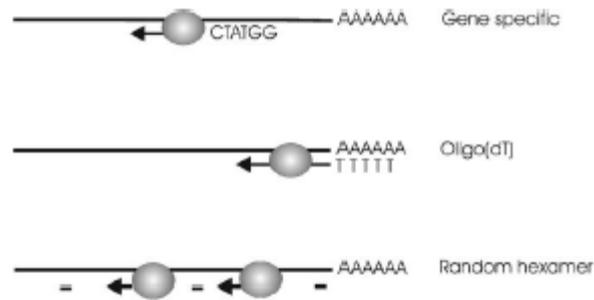
Dieser Schritt spielt eine wichtige Rolle für die adäquate Quantifizierung der Aktivität. Eine schematische Darstellung der einzelnen Schritte sowie derer Variations- und Fehlerquellen sind in Abbildung 13 dargestellt.

Die verwendeten RT stammen zumeist aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) oder dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV). Sie unterscheiden sich untereinander in ihrer Größe und ihrem Temperaturoptimum. Die Transkription ist auch ohne Primer möglich, die Ausbeute ist allerdings niedriger. Als Primer werden drei verschiedene Typen verwendet: sequenzspezifische Primer, Oligo(dT)-Primer oder „Random“ Hexamere (Abbildung 14).

- **Sequenzspezifische Primer** werden oft verwendet, wenn eine geringe Anzahl an RNA analysiert werden sollen. Der Nachteil liegt hier in der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der RNA, die nur schwer vorausgesagt werden kann und nicht nur von der Sequenz, sondern auch von der Temperatur abhängig ist. So müssen oft zunächst mehrere Primer getestet werden, um zum Schluss den auszuwählen, der die größte Ausbeute ermöglicht.
- **Oligo(dT)-Primer** bestehen aus einer Aneinanderreihung von Thymidin-Basen. Sie binden an den Poly(A)-Schwanz, der an vielen 3'-Enden eukaryotischer mRNA zu finden ist und führen so zu einer

Transkription des gesamten Messengers. Dies ist vor allem von Interesse, wenn die cDNA geklont werden soll. Nachteilig wirkt sich aus, dass nur mRNA, aber keine tRNA oder rRNA transkribiert werden, die so auch nicht als interner Standard verwendet werden können. Zudem steht auch hier die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der mRNA einer adäquaten Hybridisierung im Wege oder die Transkription erreicht nicht immer die primerspezifische Sequenz für die darauf folgende PCR.

- **Random Hexamere** sind Oligomere, die aus sechs Basen bestehen und in allen möglichen Basenkombinationen vorliegen. Es werden auch längere Oligomere verwendet (z.B. Random Nanomere). Diese binden stärker, benötigen aber auch längere, zugängliche Sequenzabschnitte. Random Hexamere ermöglichen die Transkription aller RNA-Typen. Sie ermöglichen zudem, schlecht erhaltene oder kleine Proben umzuschreiben. Anzumerken ist auch hier, dass die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur die Effizienz verringern kann.



**Abb. 14** aus Kubista, Andrade et al. 2006: Primingstrategien der reversen Transkription.

Die Effizienz der reversen Transkription ist sehr unterschiedlich, bei selben Versuchsbedingungen und –protokoll aber vergleichbar. Sie hängt von den gewählten Primern, den Versuchsbedingungen, der Präparation der Proben und der RNA-Isolierung aus dem Gewebe ab. Bei letzterer ist es wichtig, dass keine Ribonukleasen (RNasen) in die Proben gelangen. Diese befinden sich in allen lebenden Zellen und können die isolierte RNA schnell verdauen (Bustin and Mueller 2005; Kubista, Andrade et al. 2006).

## **2 Material und Methodik**

### **2.1 Förderung**

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projektes.

(DFG-Geschäftszeichen: MA 2454/2-1, 2-2)

### **2.2 Tierversuche**

Die Tierhaltung sowie die Tierversuche wurden im Zentrum für präklinische Forschung (ZPF) am Klinikum rechts der Isar unter der Leitung von Tierärztin Gabriele Wexel durchgeführt (das ZPF gehörte vor 2005 zum Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung, als Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie)

#### **2.2.1 Begründung**

Da es sich um ein komplexes Geschehen handelt, ist die Untersuchung der Behandlung von osteochondralen Defekten im Hinblick auf eine Heilung vom intakten Gesamtorganismus abhängig. Es sind verschiedene Gewebestrukturen, hauptsächlich hyaliner Knorpel und subchondraler

Knochen, in den Heilungsprozess involviert. Diese Gewebestrukturen und ihre Regeneration sind auf die speziellen Umgebungsverhältnisse in einem Gelenk angewiesen. Diese sind aktuell nicht durch Modelle nachbildbar. Im Rahmen der Voruntersuchungen zur Entwicklung und Erprobung der Behandlungsverfahren wurden die existierenden Methoden in der Zellkultur schon ausgeschöpft. Die Ergebnisse dort waren positiv, so dass der nächste logische Schritt die Untersuchung im Tiermodell war.

Die Nutzung der Tiere für die beschriebenen Versuche wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-25-05).

### **2.2.2 Tierart**

Als Versuchstiere wurden ausgewachsene (3,5-4 kg Körpergewicht, geschlossene Epiphysenfugen), weibliche weiße Neuseeländer Kaninchen (NZW) verwendet.

### **2.2.3 Herkunft/Züchtungsort**

Charles River WIGA Deutschland GmbH, Sandhofer Weg 7, D-97633 Sulzfeld

#### **2.2.4 Tierhaltung**

Die Kaninchen wurden in speziellen Tierhaltungsräumen (Hell/Dunkel-Lichtprogramm mit Dämmerlichtphasen) unter konventionellen Hygienebedingungen gehalten. Die Unterbringung erfolgte in Einzelkäfigen mit Sitzschalen aus Kunststoff und gelochtem Boden (Grundfläche 0,43 m<sup>2</sup>). Nach dem 2. Eingriff erfolgte die Unterbringung für zwei Wochen in Einzelkäfigen aus V2A-Stahl (Grundfläche 0,36 m<sup>2</sup>), ebenfalls mit gelochtem Boden. So konnte verhindert werden, dass die operierte Gliedmaße in den ersten zwei Wochen zu stark belastet wurde. Die Käfige wurden zweimal in der Woche gereinigt und die Kotbleche ausgetauscht. Zusätzlich wurden einmal in der Woche die Käfige komplett gereinigt und autoklaviert. Als Futter erhielten die Tiere pelletiertes Alleinfuttermittel (ad libitum), Heu, getrocknetes Brot und Möhren. Wasser, das täglich gewechselt wurde, stand den Tieren ebenfalls ad libitum zur Verfügung.

Nach Lieferung der Kaninchen wurden diese gewogen und einer tierärztlichen allgemeinen Untersuchung unterzogen, um den aktuellen Gesundheitszustand festzustellen und eventuelle Verletzungen durch den Transport auszuschließen. Danach wurde den Kaninchen eine mindestens 7-tägige Eingewöhnungszeit gewährt. Der Verlauf des Gesundheitszustandes

wurde durch weitere tierärztliche Untersuchungen, Kontrolle des Körpergewichtes und Kontrolle des Blutbildes überwacht.

### 2.2.5 Versuchsgruppen

Versuchsgruppen				Kontrollgruppe			
Anzahl	Gruppengröße	Tierzahl	Reservetiere	Anzahl	Gruppengröße	Tierzahl	Reservetiere
2	8	16	2	1	8	8	1

- **BMP2 non viral:** Matrix + autologe Chondrozyten + nicht-viraler BMP2-Vektor (hBMP2-COPROG)
- **BMP2 retroviral/RV:** Matrix + *ex vivo* retroviral BMP2-transduzierte autologe Chondrozyten (hBMP2-pBullet)
- **Kontrolle:** Matrix + autologe Chondrozyten

### 2.2.6 Operatives Vorgehen

#### Blutentnahme

Vor den beiden Eingriffen und vor der Euthanasie wurde den Tieren im Wachzustand aus der Ohrarterie 5 ml Blut entnommen. Das Blut diente der Erstellung eines kleinen Blutbildes, Differentialblutbildes und der Serumgewinnung. Das Serum wurde später zur Suspension der Chondrozyten verwendet. Die Blutabnahme erfolgte im Wachzustand, da

durch die Blutdrucksenkung in Narkose eine Blutabnahme aus peripheren Gefäßen erschwert ist und für den Versuch das Serum möglichst frei von Medikamenten- und Narkotikarückständen sein sollte.

### **Eingriffe**

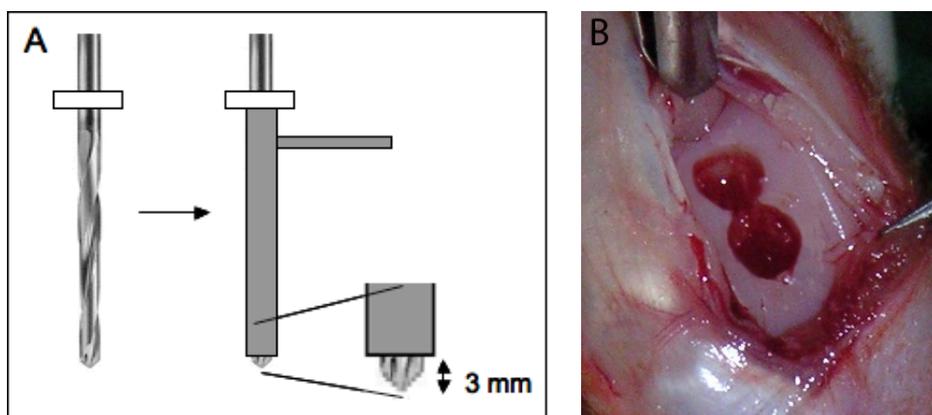
Die Tiere wurden vor den Eingriffen nicht nüchtern gehalten. Zur Verlaufskontrolle und zur Medikamentendosierung wurden die Tiere vor jedem Eingriff gewogen.

**Erster Eingriff:** Am Tag -14 erfolgte unter Vollnarkose der erste, 10-minütige Eingriff am rechten Knie. Hierbei handelte es sich um eine mediale Arthrotomie unter sterilen Bedingungen. Die Patella wurde lateral luxiert und aus der Trochlea patellaris des Femurs hyaliner Knorpel entnommen.

Das Knorpelbiopsat wurde zur Isolierung und Anzucht der autologen Chondrozyten in der Zellkultur verwendet. Die Gelenkkapsel, die Unterhautfaszie und die Haut wurden jeweils durch eine Naht verschlossen. Nach der Operation wurde das Knie mit einem Sprühverband versehen, eine Immobilisation erfolgte nicht.

**Zweiter Eingriff:** Nach weiteren zwei Wochen, am Tag 0, erfolgte unter Vollnarkose der zweite, etwa 20-minütige Eingriff am linken Knie. Auch hier wurde eine mediale Arthrotomie unter sterilen Bedingungen durchgeführt und

die Patella ebenfalls zur Darstellung der Trochlea patellaris nach lateral luxiert. Danach wurden in die Trochlea zwei 3 mm tiefe ineinander übergehende Defekte mit einem Bohrer (Durchmesser 3,6 mm) gesetzt (Abbildung 15).



**Abb. 15** Präparation eines standardisierten osteochondralen Defektes. Es wurde eine mediale parapatellare Arthrotomie durchgeführt und die Patella nach lateral luxiert. Hierfür wurde ein Stahlbohrer (3,6 mm Durchmesser) mit einer Anschlagvorrichtung (A) verwendet. Es wurden 2 Defekte von 3 mm Tiefe in die Trochlea, 1 cm proximal der Knorpel/Knochengrenze der Notch gesetzt (B).

Der Markraum des Femurs wurde dabei nicht eröffnet. Der so entstandene Defekt wurde, je nach Gruppe, mit dem entsprechenden Fibrin-Chondrozyten-(Vektor)-Gemisch gefüllt. Diese war in allen Fällen ohne Blutbeimischung möglich. Nachdem der Fibrinkleber sich verfestigt hatte, wurde das Gelenk, wie bei dem ersten Eingriff, verschlossen und mit einem Spühverband versehen. Auch hier erfolgte keine Immobilisation.

### **Narkose, intraoperative Analgesie und Antibiose**

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einprozentigem Propofol in einer Dosierung von 10 mg/kg intravenös (i.v.) nach Bedarf. Die Narkose wurde mit zweiprozentigem Propofol in einer Dosierung von 1,5 mg/kg/min i.v. nach Bedarf über einen Perfusor aufrechterhalten.

Zur intraoperativen Analgesie erhielten die Tiere nach Wirkung Fentanyl-Boli i.v. und als intraoperative Antibiose 0,5 ml Borgal® 24 %, verdünnt mit NaCl auf 2 ml i.v.

Die Tiere wurden nach der Einleitung intubiert und mit 100 % Sauerstoff beatmet. Die Narkose-Überwachung erfolgte über Kapnographie und Pulsoximetrie. Die Temperatur wurde regelmäßig überprüft und die Tiere, falls erforderlich, über eine Wärmematte gewärmt.

### **Postoperative Analgesie und Antibiose**

Nach der Operation erhielten die Tiere für 3 Tage, alle 24 Stunden Carprofen 4 mg/kg subcutan (s.c.) sowie für mindestens 2 Tage, alle 12 Stunden Buprenorphin 0,03 mg/kg s.c. Bei Bedarf wurde diese Therapie verlängert.

Die antibiotische Therapie wurde für 3 Tage im Abstand von 24 Stunden mit Borgal® 24 % (Sulfadoxinum 200 mg/ml, Trimethoprimum 40 mg/ml) 0,5

ml/Tier s.c., verdünnt mit NaCl auf 2 ml, durchgeführt. Bei Bedarf wurde der Zeitraum verlängert.

### **Euthanasie**

Am Tag 84 (nach 12 Wochen) erfolgte der 3. Eingriff resp. die Euthanasie der Tiere. Diese wurden gewogen, mit einprozentigem Propofol i.v. narkotisiert und mit einer Überdosis Pentobarbital i.v. euthanasiert. Die behandelten Gelenke wurden äußerlich und nach Eröffnung des Gelenkes makroskopisch untersucht und fotografiert. Hiernach wurde der distale Teil des Femurs entnommen und der Defekt in zwei gleich große Teile aufgeteilt. Der erste Anteil wurde für histologische Untersuchungen verwendet, der zweite zur Bestimmung von BMP2, Col1, Col2, Col10, Sox9 und Cbfa1/Runx2 mittels quantitativer RT-PCR.

### **2.3 Zellkultivierung sowie Vektor-Generierung und -Transduktion**

Die unter diesem Punkt beschriebenen Vorgehensweisen wurden in Kollaboration mit Tierärztin Gabriele Wexel und dem Zentrum für präklinische Forschung (ZPF) am Klinikum rechts der Isar, München, durchgeführt.

### **2.3.1 Generierung des nicht-viralen Vektors und Einschleusung**

Der nicht-virale Vektor wurde wie zuvor von Schillinger et al. beschrieben generiert und eingeschleust (Schillinger, Wexel et al. 2008). Der so entstandene Copolymer-protected polyethylenimine(PEI)-DNA Vektor wurde als hBMP2-COPROG bezeichnet.

### **2.3.2 Generierung des viralen Vektors und Zelltransduktion**

Als retroviraler Vektor wurde der VSV.G pseudotypisierte Vektor verwendet. Generiert wurde dieser, wie von Anton et al. beschrieben, durch transiente Transduktion von 293T Zellen (Anton, Wagner et al. 2004). Als Provirus wurde ein Vektor basierend auf dem Vektor pBullet (von R. Willemsen, Institut für Immunologie, Rotterdam zur Verfügung gestellt) verwendet. pBullet ist ein Derivat des Moloney Murine Leukemia Virus Vector (MoMLV). Der virale Überstand wurde zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert. Einen Tag vor der retroviralen Transduktion wurden die Chondrozyten in 60 mm Platten ausgesät. Zur retroviralen Transduktion wurden 750 µl des viralen Überstandes in 8 µg/ml Polybrene verwendet. Dieses wurde dem Zellkulturmedium der Zielzellen zugegeben. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden 4 ml frischen Mediums hinzugefügt. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen in Kultur genommen. Der so

entstandene Vektor wurde hBMP2-pBullet bezeichnet (Vogt, Ueblacker et al. 2008).

### **2.3.3 Chondrozytenisolierung, Zellkultur und Präparation der Fibrin-Clots**

Die Chondrozyten wurden wie von Ueblacker et al. beschrieben isoliert (Ueblacker, Wagner et al. 2007). Die so erhaltenen Chondrozyten wurden in 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät, bis zu einer 80%igen Dichte kultiviert und erneut in 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen oder 60-mm-Petrischalen ausgesät. Kontrollen und BMP2-transduzierte Zellen wurden gleichermaßen behandelt und alle 5 Tage in einem Verhältnis von 1:3 gesplittet.

Während des Eingriffs zur Chondrozytenimplantation wurden die Kulturen trypsinisiert (0,25% Trypsin-EDTA für 3 min, Trypsinisierung wurde durch DMEM-Zugabe gestoppt), die Zellen in PBS gewaschen und in Mikrozentrifugierröhrchen überführt (100.000/Röhrchen). Die Zellen wurden nun durch Zentrifugation verdichtet und mit 34 µl autologem Serum resuspendiert. In jeden doppelten Defekt wurden 100.000 Zellen in autologem Serum implantiert.

Kurz vor der Implantation wurden 50 µl des Fibrinogenklebers TISSUCOL® (Baxter AG, Wien, Österreich) mit dem Chondrozyten-Serumgemisch vermischt.

Zur Bildung eines Fibrin-Clots wurden 16 µl Thrombinlösung (500 IU/l) in den Defekt inokuliert und unverzüglich die Fibrinogen-Zell-Suspension beigefügt. Nach Clotbildung wurde die Gelenkhöhle wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben verschlossen.

Parallel zu den Tierversuchen wurden mit dem Überstand für jedes Tier in-vitro-Clots der Kontroll- und hBMP2-pBullet-transduzierten Chondrozyten erstellt. Diese dienten als in-vitro-Kontrolle der Transduktion und des Effektes. Diese wurden histologisch, elektronenmikroskopisch, immunhistochemisch sowie mittels qRT-PCR untersucht. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der qRT-PCR vorgestellt.

### **2.4 RNA-Analysen**

#### **2.4.1 Gensequenzen**

Die Sequenzen wurden mithilfe der NCBI-Gendatenbank ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – Zugriff Donnerstag, 15.12.2005, 22:00). Da die Ergebnisse der NCBI-Datenbank keine Angaben über die Lokalisation der Exongrenzen erlauben, wurden diese mit Sequenzen anderer Spezies der Ensembl-Datenbank verglichen. Diese geben kalkulierte Exongrenzen an (<http://www.ensembl.org> – Zugriff Freitag, 16.12.2005, 21:30). Bei Homologie

der Gensequenzen konnten so die Exongrenzen auf den Kaninchengenen ermittelt werden.

In der Zwischenzeit wurden auf ensembl.org Sequenzen der Kaninchengene veröffentlicht. Zur Validierung der Methode wurden im Nachhinein diese mit den hier beschriebenen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die gefunden Exongrenzen mit den von Ensembl errechneten übereinstimmen.

Bei den unten aufgelisteten Sequenzen handelt es sich um mRNA-Sequenzen. Die Introns werden nicht angegeben. Ein „X“ markiert die Exongrenzen.

- **Kollagen I**

NCBI-Sequenz: D49399.1

```
ggctttcctggagagaaaggtccctctggagaggctggtactgctXggacctcctggcaccccaggctctc  
agggtcttctggtgctcctggcattctgggccttcccggctccagaggtgaacgtggtctccagggtgtgctg  
gtgctttgXggtgaacctggtcctcttggcatcgaggccctcctggggctcgtggtccccctggtgctgtggg  
cagtctggagtcaacggtgctcctggtgaagccggtcgtgatXggcaacctgggagcgatggtcctcc  
aggtcgcatggtcagcctggacacaagXgggagaacgtggttaccctggcaatgctggtcctgttggtgct  
gcaggagcacctggtcctcaaggctccgtgggccccactggcaaacatggaaaccgtggtgaacctXg  
gccctgctggttctattggtcccgtcgggtgctgctggtccaagaggccctagtXggtccacaaggcatccgg  
ggtgacaagggagagcctggtgacaagggggcccagaggcttctcctggcataaagggacacaacggatt
```

gcaaggtcttcccgggtctcgctXggtcaacatggtgatcaaggtgctcccggcgctgtgggtcccgctggcc  
ccaggXggccctgctggtcctaccggccctgctggcaaagacggccgctctggacatcccggcacagtt  
ggacctgctggccttcgaggttctcagggtagccaaggtcctgctXggccctcccgggtcc

- **Kollagen II**

NCBI-Sequenz: AF050170.1

ccccggccctgtcggtcctctggcaaagacggcgccaatggaatcccaggacccatcgggccccccg  
gtccccgcgacggtcaggcgaaactggccctgctXggtcctcctggaatcccggaccccctggacctc  
caggacccccggccccggcatcgacatgtgcgcctttgctggcctaggccagagagagaagggcccc

- **Kollagen X**

NCBI-Sequenz: AF247705.1

cttcattccctatgccataaagagtaaagXgtataccagtgagaggagaacaaggtattcctggaccgcc  
aggccctgctggaccccaggggcaccaggctccttctggaccaccaggaaaaccaggctatggaacc  
cgggactgcaaggagagccagggttgccaggacctcaggactatcagccactggaagccaggtttg  
ccaggactcccaggaaaacaaggggagagaggaccaagtggaccgaaaggagacattgggcccagct  
ggtctaccaggaccaggggcccaccaggggcacctggaatcccaggaccagctggcatttctgtgcca  
ggaaaacctggacaacagggacttacaggagccccaggccccggccttctggagaaaaggggtgc  
accaggagcccctggtgtgagtggacagaaaggggaaacaggatatggtgctcctggcccccagggtg  
agaggggccttcaggccctcagggtccatgggaccacctggccctcctggagtggggaaaagagggtg  
agaatgggttccagggc

- **Sox9**

NCBI-Sequenz: AY598935.1

tgaatctcctggacccctcatgaagatgaccgacgagcaggagaagggcctgtccggcgccccagcc  
ccaccatgtccgaggactcggcgggctcgccctgccgctcgggctccggctccgacaccgagaatacac  
ggccccaggagaacacgttccccaagggcgagccggacctcaagaaggagagcgaagaggacaag  
ttccccgtgtgcatccgagggcggctcagccaggtgctcaagggctacgactggacgctggtgcccatgc  
ccgtgcgctcaacggctccagcaagaacaagccccacgtcaagcggcccatgaacgcctcatggtgt  
ggcgcgaggcggcgcgaggaagctggccgaccagtacccgcacctgcacaacgccgagctcagca  
agaccctcgggaagctctggaXgactgctgaacgagagcgagaagcggcccttctgtggaggaggcg  
agcggctgctgtgcagcacaagaaagaccaccggactacaagtaccagccgcggcggaggaagtc  
ggtgaagaacgg

- **Cbfa1/Runx2**

NCBI-Sequenz: AY598934.1

tgatgacactgccacctctgacttctgcctctggccttccactctcagtaagaagagccaggcaXggtgcttc  
agaactgggccccttttcagaccccaggcagttccaagcatttcacctcactgagagccgcttccaac  
ccacgaatgcactatccagccaccttacttacaccccgccagtcacctcaggcatgtccctcggtatgtccg  
ccaccaccactaccatacctacctgccaccacctacccggctcttcccaaagccagagt

- **BMP2**

NCBI-Sequenz: M22489.1

ggggacttctgaactgcagggagaataactgcgccccactttgcccgggtgcctttgcccagcgga  
gcctgctcgccatctccgagccccaccgcccctccactcctcggcctgcccgacactgagacgctgtcc  
cagcgtgaaaagagagactgcgcgccggcaccgaggagaaggaggaggcaaagaaaaggaacg  
gacattcggctcctgcccaggtcctttgaccagagttttccatgtggacgctcttcaatggacgtgtccccg  
cgtgcttcttagacggactgcggtctcctaaaggctgacatggtggccgggacccgctgtcttctagcgttg  
ctgcttcccaggctcctcctgggcccggcggctggcctcgttccggagctgggccgaggaagttcgcggc  
ggcgtcgtcgggcccccctcatcccagccctctgacgaggtcctgagcaggttcgagttgcggctgctca  
gcatgttcggcctgaaacagagaccacccccagcagggacgccgtggtgccccctacatgctagacc  
tgtatcgcaggcactcaggtcagccgggctcaccgccccagaccaccggttgagagggcagccagc  
cgagccaacactgtgcgagcttccacatgaagaatcttgaagaactaccagaaacgagtgggaaa  
acaaccggagattcttcttaatttaagttctatccccacggaggagttatcacctcagcagagcttcaggtt  
ttccgagaacagatgcaagatgctttaggaacaatagcagttccatcaccgaattaatattatgaaatca  
taaacctgcaacagccaactcgaaattccccgtgaccagacttttgacaccaggttggtgaatcagaat  
gcaagcaggtgggaaagtttgatgtcaccgctgtgatgcggaggactgcacagggacacgccaac  
catggattcgtggtggaagtggcccacttgaggagaaacaagggtgtctcaagagacatgttaggataa  
gcaggtctttgaccaagatgaacacagctggtcacagataaggccattgctagtaactttggccatgatg  
gaaaaggcatcctctccacaaaagagaaaaacgtcaagccaacacaaacagcggaaacgcctta

agtcagctgtaagagacacccttgtacgtggacttcagtgacgtgggtggaatgactggattgtggctcc  
ccgggtatcacgcctttactgccacggagaatgccctttcctctggctgatcatctgaactccactaatca  
tgccattgtcagacgttggcaactctgttaactctaagattcctaaggcatgctgtgtcccacagaactca  
gtgctatctgatgctgtaccttgacgagaatgaaaaggttgattaaagaactatcaggacatggttgtgga  
gggtgtgggtgtcgctagtagcagcaaaaataatacataaatatatata

#### **2.4.2 Primer und Sonden**

Die Primer und TaqMan-Sonden wurden von Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Frankfurter Straße 129 B, 64293 Darmstadt, Deutschland, bezogen. Die Sequenzen mit den Exonübergängen wurden zur Synthese der Primer und Sonden bereitgestellt. Standardbedingungen für die Assays von Applied Biosystems sind 40 Zyklen bestehend aus 15 Sekunden bei 95°C (Schmelze und Denaturierung) und 1 Minute bei 60°C (Annealing und Replikation).

Im Folgenden werden die Primer und Sonden dargestellt. Der Reporterfluorophor wird mit FAM, der non-fluorescent-Quencher mit NFQ angegeben.

- **Kollagen I**

Forward – AACGGTGCTCCTGGTGAAG

Revers – GCGACCTGGAGGACCAT

Sonde – Fam-TCGTGATGGCAACCCT-NFQ

- **Kollagen II**

Forward – GGACG TTCAGGCGAAACTG

Revers – CAAAGGCGCACATGTCGAT

Sonde – Fam-CCCTGCTGGTCCTCC-NFQ

- **Kollagen X**

Forward – TGCCATAAAGAGTAAAGGTATAACCAGTGA

Revers – GGTCCAGAAGGACCTGGGT

Sonde – Fam-CCAGGAATACCTTGTTCTCC-NFQ

- **Sox9**

Forward – CAAGACCCTCGGGAAGCT

Revers – CCGCCTCCTCCACGAA

Sonde – Fam-CTCGTTCAGCAGTCTCCA-NFQ

- **Cbfa1/Runx2**

Forward – TGGCCTTCCACTCTCAGTAAGAA

Revers – GGGATGAAATGCTTGGGAACTG

Sonde – Fam-CCAGGCAGGTGCTTCA-NFQ

- **BMP2**

Assay ID: Hs00154192\_m1

Der Assay für BMP2 war bereits im Katalog von Applied Biosystems gelistet, so dass er direkt bestellt werden konnte. Die genauen Sequenzen wurde uns aus kommerziellen Gründen nicht mitgeteilt.

### **2.4.3 RNA-Isolierung**

Zur Isolierung der RNA aus dem Knorpelgewebe wurde das „RNeasy® Micro Kit“ der Qiagen GmbH, Qiagen-Straße 1, 40724 Hilden, Deutschland verwendet.

Der Knorpel wurde mit einem sterilen Skalpell vom Knochen abgehoben und in einen autoklavierten, RNase-freien Mörser überführt. Nach Zugabe von Flüssigstickstoff wurde das Gewebe zerkleinert. Mit diesem Material wurde weiter nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

#### **2.4.4 Reverse Transkription**

Die reverse Transkription erfolgte nach der offiziellen Anleitung des Herstellers in 20µl Reaktionsansatz, inkl. 2 µg Random-Hexamere und „Superscript II®“ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany).

#### **2.4.5 Quantitative PCR**

Die quantitative PCR wurde, wie von Arlt et al. beschrieben, unter Verwendung von TaqMan-Assays in 96 well optical plates durchgeführt und jede Probe 3 Mal gemessen (Arlt, Kopitz et al. 2002). Die mRNA-Werte wurden zur 18S-RNA in Bezug gesetzt.

#### **2.5 Statistische Auswertung**

Die Daten wurden als Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler (mean  $\pm$  standard error SEM) mehrerer Versuchsreihen dargestellt. Jeder Test wurde dreifach durchgeführt. Zur Ermittlung der Signifikanz zwischen den Gruppen wurde ein t-Test verwendet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant gewertet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Analyse der mit hBMP2-pBullet-transduzierten Chondrozyten**

#### **3.1.1 hBMP2-pBullet in vitro – qRT-PCR der Zellkultur**

Zunächst wurden die in Fibrin-Clots wachsenden Zellkulturen mittels qRT-PCR auf die Expression der Gene BMP2, Col1, -2, -10, Cbfa1 und Sox9 untersucht (Kontrolle und hBMP2-pBullet). Die Messungen fanden am 7. und 10. Tag nach der Chondrozytenisolierung statt. Die mRNA-Werte wurden zur Kontrolle in Bezug gesetzt und der Quotient aus beiden ermittelt (Probe/Kontrolle) (Abbildung 16). Für alle analysierten Gene fanden sich an beiden Stichtagen eine signifikante Erhöhung des RNA-Niveaus:

Die BMP2-Expression war an beiden Stichtagen gegenüber der Kontrollgruppe deutlich signifikant erhöht, und obwohl die Col2-Expression verstärkt war, fand sich auch eine signifikante Erhöhung des Expressionsniveaus der Gene für Col10 und Cbfa1. Auch Col1 und Sox9 wurden an beiden Stichtagen gegenüber der Kontrollgruppe verstärkt expremiert.

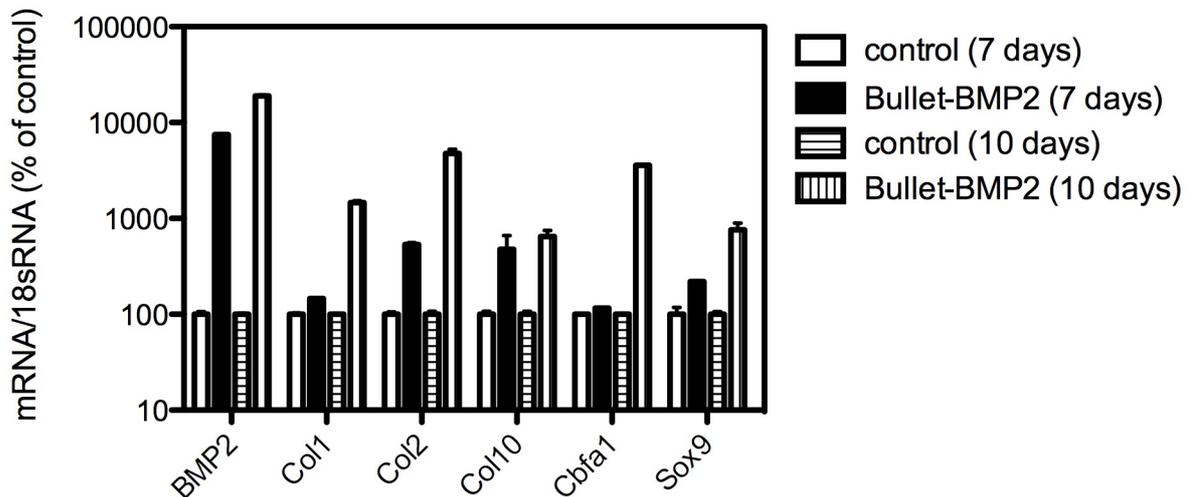


Abb. 16 Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse der in Fibrin-Clots wachsenden Zellkulturen (Kontrolle und pBullet-hBMP2, Tag 7 und 10 nach Chondrozytenentnahme) (n=3, mean±SEM, p<0.05)

### 3.1.2 hBMP2-pBullet in vivo – qRT-PCR 12 Wochen nach Implantation

Die Expression der für BMP2, Col1, -2, -10, Cbfa1 und Sox9 codierenden Gene des Regeneratknorpels wurde 12 Wochen nach Implantation mittels qRT-PCR gemessen. Die mRNA-Werte wurden zur Kontrolle in Bezug gesetzt und der Quotient aus beiden ermittelt (Probe/Kontrolle) (Abbildung 17).

Die Expression des hBMP2-Gens lag 12 Wochen nach Implantation um den Faktor 10 über dem Niveau der Kontrollgruppe (p=0,0029). Es zeigte sich zudem eine Erhöhung der Col1 und Col10-Expression (6,24 bzw. 4,74; p=0,0143 bzw. 0,0327). Die Col2-Aktivität war gegenüber der Kontrollgruppe

um den Faktor 0,09 signifikant verringert ( $p=0,0072$ ). Die Sox9-Aktivität als typischer Faktor des Smad-Weges war hingegen erhöht (3,92;  $p=0,0333$ ). Die Expression des Transkriptionsfaktors Cbfa1, welcher den Übergang in die hypertrophe Phase und Knochenbildung stimuliert, blieb unverändert.

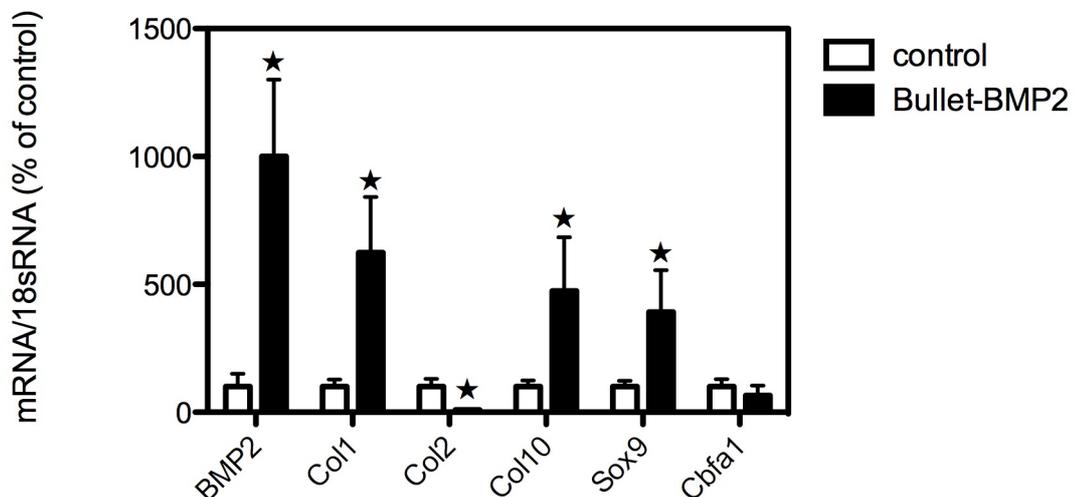


Abb. 17 Quantitative RT-PCR Analyse (Kontrolle und pBullet-hBMP2) des Regeneratknorpels aus osteochondralen Defekten des Kaninchenmodells nach 12 Wochen ( $n=8$ ,  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ,  $\star: p < 0.05$ ).

### 3.2 Analyse der mit hBMP2-COPROG transfizierten Chondrozyten

#### 3.2.1 hBMP2-COPROG in vivo – qRT-PCR 12 Wochen nach Implantation

Idem zur hBMP2-pBullet-Gruppe wurde auch der mit hBMP2-COPROG-transfizierten Chondrozyten behandelte Regeneratknorpel nach 12 Wochen auf die Expression der Gene für BMP2, Col1, -2, -10, Cbfa1 und Sox9 hin

mittels qRT-PCR analysiert. Die mRNA-Werte wurden zur Kontrolle in Bezug gesetzt und der Quotient aus beiden ermittelt (Probe/Kontrolle).

Es fand sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Erhöhung der hBMP2-Expression in der hBMP2-COPROG/Plasmid-Gruppe (Abbildung 18). Eine verstärkte Aktivität der BMP2-abhängigen Gene war nicht zu detektieren. Weder die Genexpression der als Markergene der proliferierenden Phase geltenden Col2 und Sox9, noch die der Markergene hypertropher Chondrozyten und des Faserknorpels, Col1, -10 und Cbfa1, zeigten gegenüber der Kontrollgruppe eine erhöhte Aktivität.

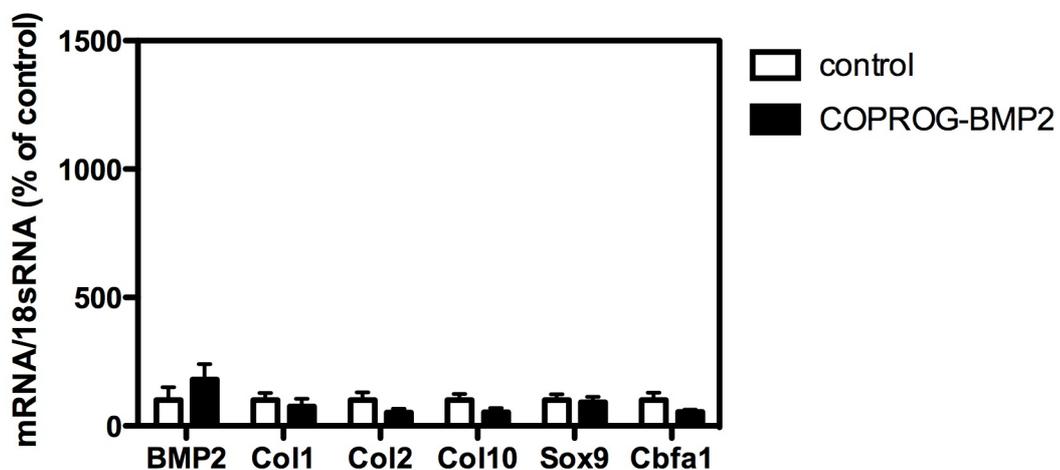


Abb. 18 Quantitative RT-PCR-Analyse (Kontrolle und hBMP2-COPROG/Plasmid) des Regeneratknorpels aus osteochondralen Defekten des Kaninchenmodells nach 12 Wochen (n=6, mean±SEM, p<0.05).

## 4 Diskussion

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein avaskuläres und alymphatisches Gewebe mit nur geringem spontanen Regenerationsvermögen. Partielle Schäden des hyalinen Knorpels sind häufige Verletzungen, in deren Folge sich eine Arthrose der betroffenen Gelenke entwickeln kann (Hayes, Brower et al. 2001; Mankin 1982). Die klinischen Ergebnisse der zum heutigen Tage vorhandenen Therapieoptionen sind nicht zufriedenstellend. Entweder besteht das regenerierte Gewebe lediglich aus Faser- bzw. bestenfalls aus hyalin-ähnlichem Knorpel, oder die Therapie geht mit einer Morbidität der Gewebeentnahmestelle einher (autologe osteochondrale Transplantation) (Huard, Li et al. 2003).

Gentherapie und „Tissue Engineering“ haben sich zu viel versprechenden Gebieten der Forschung und Therapie von Knorpeldefekten entwickelt. Es zeigte sich, dass der Wachstumsfaktor BMP2 essentiell in der Osteo- und Chondrogenese ist und sich auch für die Therapie von Knorpelschäden in vivo einsetzen lässt (Frenkel, Saadeh et al. 2000; Lengner, Lepper et al. 2004; Sato and Urist 1984; Sellers, Peluso et al. 1997; Sellers, Zhang et al. 2000).

Um weitere Informationen über die Langzeitwirkung dieses Wachstumsfaktors und dessen zeitabhängigen Einfluss auf die Regeneration von Knorpel zu erlangen, wurde in dieser Arbeit die Expression verschiedener Markerproteine nach Langzeit-BMP2-Überstimulation *in vitro* und *in vivo* mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Verwendet wurden die Markerproteine Col1, -2 und -10 sowie der Wachstumsfaktor BMP2 und die Transkriptionsfaktoren Cbfa1 und Sox9. Kollagene sind Bestandteile der EZM und typisch für verschiedene Stadien der Chondrozytendifferenzierung. Col1 wird vornehmlich im Faserknorpel gebildet. Im Gegensatz hierzu besteht der hyaline Knorpel während der Proliferations-/Reifungsphase vor allem aus Col2 (Fritz, Gaissmaier et al. 2006). Nach Erreichen der hypertrophen Phase der Chondrogenese, dem Übergang zur Osteogenese, bilden die Zellen vermehrt Col10 (de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001).

Zur Analyse des maximalen Effektes war ein effizientes und stabiles Transfersystem notwendig. Scherer et al. konnten eine effiziente Transfektion von Genen über den COPROG-Vektor zeigen (Scherer, Schillinger et al. 2002). Untersucht wurde nun zunächst die Wirkung einer BMP2-Stimulation nach Transfektion des Genes über den COPROG-Vektor. Die Expression der Markerproteine und -transkriptionsfaktoren wurde zwölf Wochen nach

Implantation in einen Knorpeldefekt mithilfe der quantitativen RT-PCR gemessen.

Die Untersuchungen konnten die von Scherer et al. 2002 gezeigte effiziente Transfektion eines Genes durch diesen Vektor in der Langzeitanalyse nicht bestätigen (Scherer, Schillinger et al. 2002). Zwölf Wochen nach Reimplantation der mit dem hBMP2-COPROG-Vektor behandelten Chondrozyten konnte keine Erhöhung der Kollagenproduktion festgestellt werden. Auch die Transkriptionsfaktoren zeigten keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe. Weiter bestätigten die histologischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe die Ergebnisse. Der ICRS-Score war gegenüber der Kontrollgruppe unbeeinflusst. Die COPROG-Methode liefert bisher keine stabile Genexpression und zeigte in unseren Versuchen keine Wirkung auf das Regeneratgewebe. So ist sie zurzeit für einen therapeutischen Einsatz ungeeignet. Hier müssen zunächst Verbesserungen der Transfektionsstabilität, aber auch der Effizienz erzielt werden.

In vorausgegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass eine hohe, lang anhaltende und stabile Transduktion des hBMP2-Genes mittels des VSV.G-pseudotypierten MoMLV-retroviralen Vektors „pBullet“ in primäre Chondrozyten möglich ist und diese Methode bezüglich Effizienz, Stabilität

und Expression äußerst effektiv ist (Vogt, Ueblacker et al. 2008). In den von Vogt et al. durchgeführten Versuchen mit dem retroviralen hBMP2-pBullet-Vektor konnte eine verstärkte Proliferationsrate in primären Chondrozyten bis zum 7. Tag gezeigt werden. Hiernach sank diese wieder auf mit der Kontrollgruppe vergleichbare Werte. Damit wurde *in vitro* eine gewünschte Reduktion des Wachstumsfaktoreffektes auf die Chondrozytenproliferation nach Zellkonfluenz erreicht (Vogt, Ueblacker et al. 2008). In der Tat ist eine der Herausforderungen zur erfolgreichen Regeneration eines Knorpeldefektes zunächst die Induktion der Zellproliferation. Sowohl die Induktion als auch die Inhibition der Proliferation durch BMP2 wurden beschrieben (De Luca, Barnes et al. 2001); (Wong, Tang et al. 2003). Zudem ist BMP2 an der Differenzierung von Stammzellen zu Chondro- und Osteoblasten beteiligt (Carlberg, Pucci et al. 2001; Gooch, Blunk et al. 2002; Musgrave, Bosch et al. 2000). Proliferation und Differenzierung stehen sich in der Knorpeltherapie jedoch gegenüber. Zunächst ist es notwendig, die Proliferation der Chondrozyten zu induzieren, um ausreichend Zellmaterial zu erhalten. Erst anschließend sollte die Differenzierung der Zellen erfolgen. Genau dieser zeitlicher Ablauf zeigte sich in den oben zitierten *in-vitro*-Versuchen (Vogt, Ueblacker et al. 2008).

PBullet weist zwar eine hohe Effizienz auf, seine Verwendung beinhaltet jedoch – wie jedes virale Vektorsystem – auch das Risiko einer malignen Transformation. Es kommt nach dem Transfer zu einer wochen- bis monatelangen Expression des Genproduktes. Die Expositionsdauer ist möglicherweise viel länger, als es für die Therapie von Knorpelschäden notwendig ist (Vogt, Martinek et al. 2005) und möglicherweise kann die Dauerepression von Wachstumsfaktoren eine maligne Neoplasie auslösen bzw. fördern. Außerdem kann es durch insertionelle Mutagenese durch Integration von Promotor- oder Enhancer-Elementen in das Wirtsgenom zur Aktivierung von Protoonkogenen kommen, die so zur Ausbildung maligner Tumore führen (Yi, Hahm et al. 2005). Die hohe Relevanz dieser Nebenwirkung wurde durch Hacein-Bey-Abina et al. beschrieben. 2003 berichteten sie erstmalig über die Entstehung monoklonaler lymphoproliferativer Pathologien bei zwei Kindern, die an „Severe Combined Immunodeficiency“ (SCID-X1) litten und an einer klinischen Studie zur Gentherapie mit einem retroviralen Vektor teilgenommen hatten. Zwei weitere Patienten erkrankten in den Folgejahren (Hacein-Bey-Abina, Garrigue et al. 2008; Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003). Mögliche Lösungsansätze zur Verhinderung der Tumorneogenese wurden beschrieben, u. A. das Tetracyclin-regulierbare (tet)-System, „Suicide“-Gene oder auch „self-

inactivating“- (SIN)-Vektoren. Das tet-System ermöglicht es, die Genexpression pharmakologisch über Tetracyclin oder Doxycyclin zu steuern (Gossen and Bujard 1992; Gossen, Freundlieb et al. 1995). Dessen Funktionsfähigkeit in Chondrozyten wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt (Ueblacker, Wagner et al. 2004). Durch die Einbringung von Suicide-Genen können Zellen im Falle neoplastischen Wachstums durch pharmakologische Aktivierung zur Apoptose geführt werden (Agarwal, Nikolai et al. 2006; Bondanza, Valtolina et al. 2006). Die selbstinaktivierenden SIN-Vektoren machen eine insertionelle Mutagenese unwahrscheinlicher. Ihnen fehlen in den langen terminalen Repetitionen (LTRs) der Virus-RNA aktive Enhancer-/Promotorregionen, die für die Aktivierung von Onkogenen in der Nachbarregion des Integrationsortes verantwortlich gemacht werden (Logan, Haas et al. 2004; Yu, von Ruden et al. 1986). Solche Vektorsysteme ermöglichen eine stabile, effiziente und steuerbare Expression und könnten in Zukunft die Therapie verschiedenster Krankheiten revolutionieren.

Die Wirkung einer langanhaltenden und stabilen BMP2-Exposition des Regeneratknorpels konnte mithilfe des hBMP2-pBullet Vektors untersucht werden. Die in-vitro-Experimente zeigten zunächst eine erfolgreiche Transduktion und Expression des für BMP2 kodierenden Gens. Das Expressionsniveau war, wie für alle Analysen der mit hBMP2-pBullet

behandelten Chondrozyten, gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die erhöhte Expression von Col2, Col10 und Sox9 am 7., sowie die weitere Steigerung am 10. Tag der Col2- und Sox9-Expression weist auf eine verstärkte Proliferation der Chondrozyten hin. Ab dem 10. Tag kam es zur weiter verstärkten Expression von Col1 und Cbfa1, was einerseits als Übergang in die hypertrophe Phase und Einleitung der Osteogenese (Cbfa1) interpretiert werden kann und andererseits aber auch die Entstehung von Faserknorpel widerspiegelt (Col1).

Die Langzeit/in-vivo-Ergebnisse bestätigten diesen Trend. Die hoch signifikant erhöhte Expression von Col1 und Col10 deutet auf die Ausbildung von Faserknorpel sowie hypertropher Chondrozyten hin. Die Expressionsrate von Col2 war erniedrigt. Ein positiver Effekt von BMP2 auf die Knorpelregeneration zeigte sich in der RT-PCR daher nach zwölf Wochen nicht mehr, im Gegensatz zur Histologie. Aufgrund der Expressionsanalysen ist die weitere Verbesserung der Gewebequalität bezüglich Formation eines hyalinen Knorpels eher unwahrscheinlich.

Weiter zeigte sich zwölf Wochen nach Reimplantation eine kontinuierliche Erhöhung des Sox9-mRNA-Niveaus. Sox9 gilt sowohl als Aktivator des Übergangs der MSZ in die Phase der mesenchymalen Kondensation und somit als Aktivator der Proliferation, als auch als Inhibitor der Differenzierung

zu hypertrophen Chondrozyten (de Crombrugge, Lefebvre et al. 2001). Die Induktion von Sox9 durch BMP2 wurde in mehreren Studien beschrieben (Hoffmann, Czichos et al. 2002; Jin, Lee et al. 2006; Lengner, Lepper et al. 2004). Das Signal wird über die BMPR1A- und BMPR1B-Rezeptoren vermittelt und dann über den BMP2/p38-Pfad und den BMP2/Smad-Pfad weitergeleitet. Während der BMP2/p38-Pfad die Expression und die Aktivität von Sox9 reguliert, steuert der BMP2/Smad-Pfad lediglich seine Aktivität (Pan, Yu et al. 2008; Yoon, Ovchinnikov et al. 2005). Unsere Ergebnisse zeigen, dass das sezernierte BMP2 funktionsfähig ist und dass dieser Mechanismus über mindestens zwölf Wochen anhält.

Cbfa1 wurde in den in-vitro-Experimenten am 10. Tag verstärkt exprimiert. In vivo zeigte sich nach zwölf Wochen keine Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die genaue Ursache dieser Dynamik kann zu diesem Zeitpunkt nicht sicher ermittelt werden. Cbfa1 ist ein wichtiger Faktor der Differenzierung von reifen zu hypertrophen Chondrozyten und gehört zu den essentiellen Transkriptionsfaktoren der Osteogenese. Zudem ist Cbfa1 ein zentraler Mediator des BMP2-Signals. Es ist bekannt, dass BMP2 seine Expression stimuliert und zur Cbfa1-abhängigen Induktion des osteoblastischen Phänotyps benötigt wird. Cbfa1 seinerseits erhöht die Sensibilität der Zellen auf das BMP2-Signal. BMP2 reguliert zahlreiche

Homeodomain-(HD)-Proteine, die unter anderem die Cbfa1-Expression beeinflussen. So wird in der frühen Embryogenese die Expression von Cbfa1 durch das HD-Protein Nkx3.2 inhibiert (Lengner, Hassan et al. 2005; Lian, Stein et al. 2006). Weiter regulieren die HD-Proteine Msx2, Dlx3 und Dlx5 durch Bindung an derselben knochenzugehörigen Promotorregion die Cbfa1-Expression. Hierbei inhibiert Msx2 die Expression, Dlx3 und Dlx5 aktivieren diese (Lian, Stein et al. 2006). Inwiefern direkte Interaktionen für dieses Ergebnis verantwortlich sind, kann hier nicht ermittelt werden. Es deutet jedoch ebenfalls auf die herabgesetzte Wirkung von BMP2 auf die chondrale Differenzierung nach zwölf Wochen und eine konsekutive Ausbildung von hypertrophen Chondrozyten und Aktivierung der Osteogenese hin.

Die Ergebnisse korrelieren mit der histologischen Aufarbeitung und Einteilung nach dem ICRS-Score. Die Analyse der hBMP2-pBullet-Gruppe zeigte eine Verbesserung der Knorpelqualität in den ersten 4 Wochen, insbesondere die Qualität der Matrix und des subchondralen Knochens war gesteigert. Der Qualitätsunterschied vergrößerte sich sogar nach zwölf Wochen, wobei sich zusätzlich eine Qualitätsverbesserung der Oberflächenstruktur zeigte. Die Zellverteilung war der des hyalinen Knorpels ähnlich. Dies bestätigt die positive Wirkung der stabilen BMP2-Stimulation auf die Knochen-Knorpelregeneration. Eine vollständige Heilung, insbesondere der

Knorpeldefekte, gelang jedoch nicht. Dieses spiegelt sich in der Abnahme der Col2-Expression in der RT-PCR wieder.

Dass die Gewebestimulation durch BMP2 das Risiko der Ausbildung von Osteophyten birgt, wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Nakase, Miyaji et al. 2003; Scharstuhl, Vitters et al. 2003; van Beuningen, Glansbeek et al. 1998; Zoricic, Maric et al. 2003). In unseren Versuchen zeigten sich in der Kontrollgruppe sowie bei mit hBMP2-pBullet behandelten Kaninchen nach vier und vor allem nach zwölf Wochen degenerative Veränderungen inklusive Osteophytenbildungen. Mitverursachend könnte der operative Zugangsweg sein. Es wurde eine mediale parapatellare Arthrotomie durchgeführt. Wir beobachteten eine Induration der Narbe, ein Effekt, der in der von Fahlgren et al. durchgeführten Studie zur Osteoarthrose nach Kapselinzision bereits beschrieben ist (Fahlgren, Chubinskaya et al. 2006). Zudem ist anzunehmen, dass die erhöhte und verlängerte BMP2-Stimulation und der Übertritt von BMP2 aus dem Regeneratgewebe in die Synovia partiell eine Rolle spielt. Aufgrund der geringen Präparatmenge der Synovia konnten jedoch keine weiteren Untersuchungen erfolgen. Nichtsdestotrotz konnten erhöhte Werte sezernierten BMP2s im Überstand der Fibrin-Clots in vitro gemessen werden. Eine systemische Wirkung wurde durch Serumanalysen ausgeschlossen. Ein weitere Erklärung könnten zudem auswandernde Zellverbände mit ektopem

Wachstum von transduzierten Zellen sein. Eine solche Auswanderung wurde in vorherigen Studien mit dem lacZ-Markergen jedoch nicht beschrieben (Ueblacker, Wagner et al. 2007). Wie auch immer, wie oben beschrieben zeigte sich auch in der Kontrollgruppe die Tendenz zu Osteophytenbildung.

In dieser Versuchsreihe hat sich die qRT-PCR als sicheres und effizientes Analysemittel erwiesen. Zur RT-PCR ist zunächst die Extraktion der RNA notwendig. Trotz der Zellarmut und der festen Struktur des Knorpels gelang es, ausreichend RNA zu isolieren und diese nach Etablierung der Primer und Sonden erfolgreich zu untersuchen. Die verwendeten Primer sind Intron-übergreifend, so dass falsch positive Ergebnisse durch DNA-Replikation ausgeschlossen wurden. Die gewählten Markerproteine sind für die verschiedenen Stadien der Chondrogenese spezifisch, die Ergebnisse der RT-PCR korrelieren weitestgehend mit den in unserer Arbeitsgruppe histologisch und immunhistochemisch erhaltenen (Vogt, Wexel et al. 2009). Auf diese Weise konnten die Primer und Sonden zur detaillierten qRT-PCR-Analyse von Knorpelregenerat validiert werden.

Weitere Untersuchungen sind zur Entwicklung gentherapeutischer Verfahren im Hinblick auf die Behandlung von Knorpelschäden notwendig. Eine Untersuchung des Effektes von Stimulation durch andere Wachstumsfaktoren wie „Indian hedgehog“ (Ihh) und „parathyroid hormon related peptide“

(PTHrP), welche die Rate der den Zellzyklus verlassenen Chondrozyten verringern und den Übergang zu hypertrophen Chondrozyten hemmen, könnte zu neuen Erkenntnissen und einer Qualitätsverbesserung des Knorpelregenerats führen (de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001). Einsatz neuer Vektoren wie der SIN-Vektoren könnte zudem das Risiko der insertionellen Mutagenese verringern. Zusätzlich könnte durch steuerbare Systeme (z.B. tet-Vektoren) die Genexpression gezielt kontrolliert werden (Wubbenhost, Dumler et al. 2010).

## 5 Zusammenfassung

Die zufriedenstellende Therapie von Knorpelschäden stellt ein bis heute ungelöstes Problem dar. Neue Strategien sind der Einsatz genetisch manipulierter Knorpelzellen. BMP2 hat sich in vorangegangenen Untersuchungen als essentieller Wachstumsfaktor der Osteo- und Chondrogenese erwiesen und wird bereits therapeutisch für die Heilung von großen Knochendefekten verwendet. Effiziente und stabile Vektorsysteme wurden entwickelt, welche die Transduktion von BMP2 ermöglichen. Für diese Arbeit wurden der nicht-virale Vektor „hBMP2-COPROG“ sowie der VSV.G-pseudotypisierte MoMLV-retrovirale Vektor „hBMP2-pBullet“ verwendet. Das hiermit stimulierte Gewebe wurde nach in-vitro- und in-vivo-Wachstum mittels qRT-PCR analysiert.

Die qRT-PCR wurde als sicheres und effizientes Analysemittel bestätigt. Es zeigte sich, dass BMP2 lediglich bei stabiler und langanhaltender Expression einen Einfluss auf die Knorpelregeneration hat. Stimulation durch hBMP2-pBullet bewirkte zunächst eine Verstärkung der Proliferation und Verbesserung der Qualität des gebildeten Knorpels. Bis zur zwölften Wochen nach Implantation stieg der Qualitätsunterschied weiter an. Es wurden jedoch zunehmend Chondrozyten-hypertrophe Charakteristika festgestellt mit einer

Abnahme der Col2-Produktion. Im Gegensatz hierzu zeigte sich der hBMP2-COPROG-Vektor insuffizient in der Langzeitstimulation und der Qualitätsverbesserung des Regeneratknorpels.

Die hier verwendeten retroviralen Vektoren sind für den klinischen Einsatz zurzeit nicht geeignet. Schwerwiegende Komplikationen wie die Ausbildung einer insertionellen Mutagenese durch virale Gentherapie wurden beschrieben. Zudem steigert die langanhaltende Expression von BMP2 möglicherweise auch das Risiko der Tumorinduktion durch den Wachstumsfaktor selber.

Mögliche Lösungen wären steuerbare und selbstinaktivierende Vektoren wie tet- und SIN-Vektoren. Eine Stimulation durch andere Wachstumsfaktoren wie Ihh und PTHrP könnte zu neuen Erkenntnissen und einer Qualitätsverbesserung des Knorpelregenerats führen. Die qRT-PCR würde, mithilfe der hier etablierten Primer und Sonden, eine sichere und effiziente Untersuchung ermöglichen.

## 6 Literaturverzeichnis

1

Agarwal, S., Nikolai, B., Yamaguchi, T., Lech, P. and Somia, N. V. "Construction and use of retroviral vectors encoding the toxic gene barnase." *Mol Ther* **14** (2006): 555-63.

2

Anton, M., Wagner, B., Haubner, R., Bodenstein, C., Essien, B., Bönisch, H., Schwaiger, M., Gansbacher, B. and Weber, W. "Use of the norepinephrine transporter as a reporter gene for non-invasive imaging of genetically modified cells." *J Gene Med* **6** (2004): 119-26.

3

Arlt, M., Kopitz, C., Pennington, C., Watson, K. L., Krell, H. W., Bode, W., Gansbacher, B., Khokha, R., Edwards, D. R. and Kruger, A. "Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model." *Cancer Res* **62** (2002): 5543-50.

4

Arnhem, N. and Erlich, H. "Polymerase chain reaction strategy." *Annu Rev Biochem* **61** (1992): 131-56.

5

Aroen, A., Loken, S., Heir, S., Alvik, E., Ekeland, A., Granlund, O. G. and Engebretsen, L. "Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies." *Am J Sports Med* **32** (2004): 211-5.

6

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. and Patel, H. R. "Basic principles of real-time quantitative PCR." *Expert Rev Mol Diagn* **5** (2005): 209-19.

7

Bauer, M. and Jackson, R. W. "Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification." *Arthroscopy* **4** (1988): 97-102.

8

Bej, A. K., Mahubani, M. H. and Atlas, R. M. "Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **26** (1991): 301-34.

9

Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. "Sox9 is required for cartilage formation." *Nat. Genet.* **22** (1999): 85-89.

### 10

Bi, W., Huang, W., Whitworth, D. J., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. "Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (2001): 6698-703.

### 11

Bloch, W. "A biochemical perspective of the polymerase chain reaction." *Biochemistry* **30** (1991): 2735-47.

### 12

Bondanza, A., Valtolina, V., Magnani, Z., Ponzoni, M., Fleischhauer, K., Bonyhadi, M., Traversari, C., Sanvito, F., Toma, S., Radrizzani, M., La Seta-Catamancio, S., Ciceri, F., Bordignon, C. and Bonini, C. "Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes." *Blood* **107** (2006): 1828-36.

### 13

Braun, S., Minzlaff, P., Hollweck, R., Wortler, K. and Imhoff, A. B. "The 5.5-year results of MegaOATS--autologous transfer of the posterior femoral condyle: a case-series study." *Arthritis Res Ther* **10** (2008): R68.

### 14

Brittberg, M., Aglietti, P., Gambardella, R., Hangody, L., Hauselmann, H. J., Jakob, R. P., Levine, D., Lohmander, S., Mandelbaum, B. R., Peterson, L. and Staubli, H. U. (2000). "ICRS Cartilage Injury Evaluation Package." International Cartilage Repair Society (ICRS) from [http://www.cartilage.org/\\_files/contentmanagement/ICRS\\_evaluation.pdf](http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf) Retrieved 02.05.2009.

### 15

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

### 16

Brittberg, M. and Winalski, C. S. "Evaluation of cartilage injuries and repair." *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 2** (2003): 58-69.

### 17

Brucker, P., Agneskirchner, J. D., Burkart, A. and Imhoff, A. B. "Mega-OATS. Technique and outcome." *Unfallchirurg* **105** (2002): 443-9.

### 18

Bustin, S. A. and Mueller, R. "Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis." *Clin Sci (Lond)* **109** (2005): 365-79.

### 19

Cardullo, R. A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P. C. and Wolf, D. E. "Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (1988): 8790-4.

### 20

Carlberg, A. L., Pucci, B., Rallapalli, R., Tuan, R. S. and Hall, D. J. "Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2." *Differentiation* **67** (2001): 128-38.

### 21

Chen, D., Zhao, M. and Mundy, G. R. "Bone morphogenetic proteins." *Growth Factors* **22** (2004): 233-41.

### 22

Cucchiari, M. and Madry, H. "Gene therapy for cartilage defects." *J Gene Med* **7** (2005): 1495-509.

### 23

Curl, W. W., Krome, J., Gordon, E. S., Rushing, J., Smith, B. P. and Poehling, G. G. "Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies." *Arthroscopy* **13** (1997): 456-60.

### 24

de Crombrughe, B., Lefebvre, V. and Nakashima, K. "Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation." *Curr Opin Cell Biol* **13** (2001): 721-7.

### 25

De Luca, F., Barnes, K. M., Uyeda, J. A., De-Levi, S., Abad, V., Palese, T., Mericq, V. and Baron, J. "Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2." *Endocrinology* **142** (2001): 430-6.

### 26

DeLise, A. M., Fischer, L. and Tuan, R. S. "Cellular interactions and signaling in cartilage development." *Osteoarthritis Cartilage* **8** (2000): 309-34.

### 27

Drissi, H., Zuscik, M., Rosier, R. and O'Keefe, R. "Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis." *Mol Aspects Med* **26** (2005): 169-79.

### 28

Erllich, H. A. "Polymerase chain reaction." *J Clin Immunol* **9** (1989): 437-47.

### 29

Fahlgren, A., Chubinskaya, S., Messner, K. and Aspenberg, P. "A capsular incision leads to a fast osteoarthritic response, but also elevated levels of activated osteogenic protein-1 in rabbit knee joint cartilage." *Scand J Med Sci Sports* **16** (2006): 456-62.

### 30

Frenkel, S. R., Saadeh, P. B., Mehrara, B. J., Chin, G. S., Steinbrech, D. S., Brent, B., Gittes, G. K. and Longaker, M. T. "Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling." *Plast Reconstr Surg* **105** (2000): 980-90.

### 31

Fritz, J., Gaissmaier, C., Schewe, B. and Weise, K. "Cartilage repair in the knee joint." *Unfallchirurg* **109** (2006): 563-74; quiz 575-6.

### 32

Froster, U. G. and Matzen, P. Angeborene Anomalien - Generalisierte Osteochondrodysplasien des Skeletts - Dysplasia cleidocranialis in "Kinderorthopädie". P. Matzen Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag. München, 2007, 1: 328-330.

### 33

Gardlik, R., Palfy, R., Hodosy, J., Lukacs, J., Turna, J. and Celec, P. "Vectors and delivery systems in gene therapy." *Med Sci Monit* **11** (2005): RA110-21.

### 34

Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. and Bunn, H. F. "Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (1990): 2725-9.

### 35

Gooch, K. J., Blunk, T., Courter, D. L., Sieminski, A. L., Vunjak-Novakovic, G. and Freed, L. E. "Bone morphogenetic proteins-2, -12, and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage." *Tissue Eng* **8** (2002): 591-601.

### 36

Gossen, M. and Bujard, H. "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (1992): 5547-51.

### 37

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H. "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." *Science* **268** (1995): 1766-9.

### 38

Granjeiro, J. M., Oliveira, R. C., Bustos-Valenzuela, J. C., Sogayar, M. C. and Taga, R. "Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use." *Braz J Med Biol Res* **38** (2005): 1463-73.

### 39

Gudas, R., Stankevicius, E., Monastyreckiene, E., Pranys, D. and Kalesinskas, R. J. "Osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint in athletes." *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **14** (2006): 834-42.

### 40

Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., Asnafi, V., MacIntyre, E., Dal Cortivo, L., Radford, I., Brousse, N., Sigaux, F., Moshous, D., Hauer, J., Borkhardt, A., Belohradsky, B. H., Wintergerst, U., Velez, M. C., Leiva, L., Sorensen, R., Wulffraat, N., Blanche, S., Bushman, F. D., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M. "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1." *J Clin Invest* **118** (2008): 3132-42.

### 41

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M. "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science* **302** (2003): 415-9.

### 42

Hayes, D. W., Jr., Brower, R. L. and John, K. J. "Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair." *Clin Podiatr Med Surg* **18** (2001): 35-53.

### 43

Hjelle, K., Solheim, E., Strand, T., Muri, R. and Brittberg, M. "Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies." *Arthroscopy* **18** (2002): 730-4.

### 44

Hoffmann, A., Czichos, S., Kaps, C., Bachner, D., Mayer, H., Kurkalli, B. G., Zilberman, Y., Turgeman, G., Pelled, G., Gross, G. and Gazit, D. "The T-box transcription factor Brachyury mediates cartilage development in mesenchymal stem cell line C3H10T1/2." *J Cell Sci* **115** (2002): 769-81.

### 45

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. and Gelfand, D. H. "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (1991): 7276-80.

### 46

Huard, J., Li, Y., Peng, H. and Fu, F. H. "Gene therapy and tissue engineering for sports medicine." *J Gene Med* **5** (2003): 93-108.

### 47

Imhoff, A. B. and König, U. "Arthroskopie—qualifizierte Stadieneinteilung der osteochondralen Läsion (OCL) am Knie, Diagnostik und Klassifikation." *Arthroskopie* **16** (2003): 23-28.

### 48

Jin, E. J., Lee, S. Y., Choi, Y. A., Jung, J. C., Bang, O. S. and Kang, S. S. "BMP-2-enhanced chondrogenesis involves p38 MAPK-mediated down-regulation of Wnt-7a pathway." *Mol Cells* **22** (2006): 353-9.

### 49

Karataglis, D. and Learmonth, D. J. "Management of big osteochondral defects of the knee using osteochondral allografts with the MEGA-OATS technique." *Knee* **12** (2005): 389-93.

### 50

Kellett, C. F., Boscainos, P. J. and Gross, A. E. "Surgical options for articular defects of the knee." *Expert Rev Med Devices* **3** (2006): 585-93.

### 51

Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. and Khorana, H. G. "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases." *J Mol Biol* **56** (1971): 341-61.

### 52

Knudson, C. B. and Knudson, W. "Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease." *Faseb J* **7** (1993): 1233-41.

### 53

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

### 54

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. and Zoric, N. "The real-time polymerase chain reaction." *Mol Aspects Med* **27** (2006): 95-125.

### 55

Lengner, C. J., Hassan, M. Q., Serra, R. W., Lepper, C., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B. and Stein, G. S. "Nkx3.2-mediated Repression of Runx2 Promotes Chondrogenic Differentiation." *J. Biol. Chem.* **280** (2005): 15872-15879.

### 56

Lengner, C. J., Lepper, C., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S. and Lian, J. B. "Primary mouse embryonic fibroblasts: a model of mesenchymal cartilage formation." *J Cell Physiol* **200** (2004): 327-33.

### 57

Lian, J. B., Stein, G. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Hassan, M. Q., Gaur, T., Lengner, C. J. and Young, D. W. "Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis." *Rev Endocr Metab Disord* **7** (2006): 1-16.

### 58

Lin, Z., Willers, C., Xu, J. and Zheng, M. H. "The chondrocyte: biology and clinical application." *Tissue Eng* **12** (2006): 1971-84.

### 59

Linden, B. "Osteochondritis dissecans of the femoral condyles: a long-term follow-up study." *J Bone Joint Surg Am* **59** (1977): 769-76.

### 60

Logan, A. C., Haas, D. L., Kafri, T. and Kohn, D. B. "Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration." *J Virol* **78** (2004): 8421-36.

### 61

Lundstrom, K. and Boulikas, T. "Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials." *Technol Cancer Res Treat* **2** (2003): 471-86.

### 62

Luyten, F. P., Cunningham, N. S., Ma, S., Muthukumaran, N., Hammonds, R. G., Nevins, W. B., Woods, W. I. and Reddi, A. H. "Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation." *J Biol Chem* **264** (1989): 13377-80.

### 63

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

### 64

Meyer, J., Sudbeck, P., Held, M., Wagner, T., Schmitz, M. L., Bricarelli, F. D., Eggermont, E., Friedrich, U., Haas, O. A., Kobelt, A., Leroy, J. G., Van Maldergem, L., Michel, E., Mitulla, B., Pfeiffer, R. A., Schinzel, A., Schmidt, H. and Scherer, G. "Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations." *Hum Mol Genet* **6** (1997): 91-8.

### 65

Musgrave, D. S., Bosch, P., Lee, J. Y., Pelinkovic, D., Ghivizzani, S. C., Whalen, J., Niyibizi, C. and Huard, J. "Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types." *Clin Orthop Relat Res* (2000): 290-305.

### 66

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

### 67

O'Connell, J., Goode, T. and Shanahan, F. "Quantitative measurement of mRNA expression by competitive RT-PCR." *Methods Mol Biol* **92** (1998): 183-93.

### 68

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

### 69

Outerbridge, R. E. "The etiology of chondromalacia patellae." *J Bone Joint Surg Br* **43-B** (1961): 752-7.

### 70

Pan, Q., Yu, Y., Chen, Q., Li, C., Wu, H., Wan, Y., Ma, J. and Sun, F. "Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter." *J Cell Physiol* **217** (2008): 228-41.

### 71

Peterson, L., Brittberg, M., Kiviranta, I., Akerlund, E. L. and Lindahl, A. "Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability." *Am J Sports Med* **30** (2002): 2-12.

### 72

Pridie, K. H. "A method of resurfacing osteoarthritis knee joints. In: Proceedings of the British Orthopaedic Association." *J Bone Joint Surg Br* **41-B** (1959): 616-639.

### 73

Raeymaekers, L. "A commentary on the practical applications of competitive PCR." *Genome Res* **5** (1995): 91-4.

### 74

Rosen, V. "BMP and BMP Inhibitors in Bone." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1068** (2006): 19-25.

### 75

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239** (1988): 487-91.

### 76

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230** (1985): 1350-4.

### 77

Sato, K. and Urist, M. R. "Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture." *Clin Orthop Relat Res* (1984): 180-7.

### 78

Scharstuhl, A., Vitters, E. L., van der Kraan, P. M. and van den Berg, W. B. "Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis." *Arthritis Rheum* **48** (2003): 3442-51.

### 79

Scherer, F., Schillinger, U., Putz, U., Stemberger, A. and Plank, C. "Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo." *J Gene Med* **4** (2002): 634-43.

### 80

Schillinger, U., Wexel, G., Hacker, C., Kullmer, M., Koch, C., Gerg, M., Vogt, S., Ueblacker, P., Tischer, T., Hensler, D., Wilisch, J., Aigner, J., Walch, A., Stemberger, A. and Plank, C. "A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors." *Pharm Res* **25** (2008): 2946-62.

### 81

Sellers, R. S., Peluso, D. and Morris, E. A. "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* **79** (1997): 1452-63.

**82**

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

**83**

Smith, G. D., Knutsen, G. and Richardson, J. B. "A clinical review of cartilage repair techniques." *J Bone Joint Surg Br* **87** (2005): 445-9.

**84**

Stanton, L. A., Underhill, T. M. and Beier, F. "MAP kinases in chondrocyte differentiation." *Dev Biol* **263** (2003): 165-75.

**85**

Steadman, J., Rodkey, W., Singleton, S. and Briggs, K. "Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results." *Operative Techniques in Orthopaedics* **7** (1997): 300-304.

**86**

Stein, G. S., Lian, J. B., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Javed, A., Zaidi, S. K., Young, D. W., Choi, J. Y. and Pockwinse, S. M. "Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression." *Oncogene* **23** (2004): 4315-29.

**87**

Stoltz, J. F., Bensoussan, D., Decot, V., Ciree, A., Netter, P. and Gillet, P. "Cell and tissue engineering and clinical applications: an overview." *Biomed Mater Eng* **16** (2006): S3-S18.

**88**

Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J. and Morley, A. A. "Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution." *Biotechniques* **13** (1992): 444-9.

**89**

Thein, S. L. and Wallace, R. B. The Use of Synthetic Oligonucleotides as Specific Hybridization Probes in the Diagnosis of Genetic Disorders in "Human Genetic Diseases: A Practical Approach". K.E. Davies IRL Press Oxford, 1986: 33-50.

**90**

Tyagi, S., Bratu, D. P. and Kramer, F. R. "Multicolor molecular beacons for allele discrimination." *Nat Biotechnol* **16** (1998): 49-53.

**91**

Tyagi, S. and Kramer, F. R. "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization." *Nat Biotechnol* **14** (1996): 303-8.

**92**

Ueblacker, P., Wagner, B., Kruger, A., Vogt, S., DeSantis, G., Kennerknecht, E., Brill, T., Hillemanns, M., Salzmann, G. M., Imhoff, A. B., Plank, C., Gansbacher, B. and Martinek, V. "Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects." *Osteoarthritis Cartilage* **12** (2004): 711-9.

**93**

Ueblacker, P., Wagner, B., Vogt, S., Salzmann, G., Wexel, G., Kruger, A., Plank, C., Brill, T., Specht, K., Hennig, T., Schillinger, U., Imhoff, A. B., Martinek, V. and Gansbacher, B. "In vivo analysis of retroviral gene transfer to chondrocytes within collagen scaffolds for the treatment of osteochondral defects." *Biomaterials* **28** (2007): 4480-7.

**94**

Urist, M. R. "Bone: formation by autoinduction." *Science* **150** (1965): 893-9.

**95**

Urist, M. R., Nogami, H. and Mikulski, A. "A bone morphogenetic polypeptide." *Calcif Tissue Res* **21 Suppl** (1976): 81-7.

**96**

van Beuningen, H. M., Glansbeek, H. L., van der Kraan, P. M. and van den Berg, W. B. "Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation." *Osteoarthritis Cartilage* **6** (1998): 306-17.

**97**

Vogt, S., Martinek, V., Ueblacker, P., Wexel, G., Gansbacher, B. and Imhoff, A. B. Retroviral BMP2 gene transfer into chondrocytes for the treatment of osteochondral lesions in a rabbit model. in "ETES, Book of Abstracts 2005". München, 2005.

**98**

Vogt, S., Ueblacker, P., Geis, C., Wagner, B., Wexel, G., Tischer, T., Kruger, A., Plank, C., Anton, M., Martinek, V., Imhoff, A. B. and Gansbacher, B. "Efficient and stable gene transfer of growth factors into chondrogenic cells and primary articular chondrocytes using a VSV.G pseudotyped retroviral vector." *Biomaterials* **29** (2008): 1242-9.

**99**

Vogt, S., Wexel, G., Tischer, T., Schillinger, U., Ueblacker, P., Wagner, B., Hensler, D., Wilisch, J., Geis, C., Wubbenhorst, D., Aigner, J., Gerg, M., Kruger, A., Salzmann, G. M., Martinek, V., Anton, M., Plank, C., Imhoff, A. B. and Gansbacher, B. "The influence of the stable expression of BMP2 in fibrin clots on the remodelling and repair of osteochondral defects." *Biomaterials* **30** (2009): 2385-92.

**100**

Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E. and et al. "Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9." *Cell* **79** (1994): 1111-20.

**101**

Wegner, M. "From head to toes: the multiple facets of Sox proteins." *Nucleic Acids Res* **27** (1999): 1409-20.

**102**

Wong, G. A., Tang, V., El-Sabeawy, F. and Weiss, R. H. "BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284** (2003): E972-9.

**103**

Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Miotsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. and Wang, E. A. "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." *Science* **242** (1988): 1528-34.

**104**

Wubbenhorst, D., Dumler, K., Wagner, B., Wexel, G., Imhoff, A., Gansbacher, B., Vogt, S., Anton, M. "Tetracycline-regulated bone morphogenetic protein 2 gene expression in lentivirally transduced primary rabbit chondrocytes for treatment of cartilage defects." *Arthritis Rheum.* **62** (2010): 2037-46.

**105**

Yi, Y., Hahm, S. H. and Lee, K. H. "Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions." *Curr Gene Ther* **5** (2005): 25-35.

**106**

Yoon, B. S., Ovchinnikov, D. A., Yoshii, I., Mishina, Y., Behringer, R. R. and Lyons, K. M. "Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (2005): 5062-7.

**107**

Yu, S. F., von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F. and Gilboa, E. "Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83** (1986): 3194-8.

**108**

Zimmermann, K. and Mannhalter, J. W. "Technical aspects of quantitative competitive PCR." *Biotechniques* **21** (1996): 268-72, 274-9.

**109**

Zoricic, S., Maric, I., Bobinac, D. and Vukicevic, S. "Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans." *J Anat* **202** (2003): 269-77.

## 7 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1 modifiziert aus Horton, Moran et al. 2008:**

Schematische Darstellung der Proteoglycane

Horton, H. R., Moran, L. A., Gray Scrimgeour, K., Rawn, J. D. and Perry, M. D. Kohlenhydrate - Glykokonjugate in "Biochemie". Pearson Studium. München, (2008) **4**: 327.

**Abbildung 2 aus Stanton, Underhill et al. 2003:**

Schematische Darstellung der Chondrogenese

Stanton, L. A., Underhill, T. M. and Beier, F. "MAP kinases in chondrocyte differentiation." *Dev Biol* **263** (2003): 165-75.

**Abbildung 3 aus de Crombrughe, Lefebvre et al. 2001:**

Zusammenfassung der Wirkungsmechanismen verschiedener Transkriptionsfaktoren in der Chondrogenese

de Crombrughe, B., Lefebvre, V. and Nakashima, K. "Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation." *Curr Opin Cell Biol* **13** (2001): 721-7.

**Abbildung 4 modifiziert aus Bauer and Jackson 1988:**

Einteilung der Knorpelschäden nach Bauer

Bauer, M. and Jackson, R. W. "Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification." *Arthroscopy* **4** (1988): 97-102.

**Abbildung 5 aus Imhoff and König 2003:**

Einteilung Osteochondraler Läsionen des Knies nach Imhoff

Imhoff, A. B. and König, U. "Arthroskopie — qualifizierte Stadieneinteilung der osteochondralen Läsion (OCL) am Knie, Diagnostik und Klassifikation." *Arthroskopie* **16** (2003): 23-28.

**Abbildung 6 aus Brittberg, Aglietti et al. 2000:**

Einteilung der Knorpelschäden nach dem ICRS-score

Brittberg, M., Aglietti, P., Gambardella, R., Hangody, L., Hauselmann, H. J., Jakob, R. P., Levine, D., Lohmander, S., Mandelbaum, B. R., Peterson, L. and Staubli, H. U. (2000). "ICRS Cartilage Injury Evaluation Package." International Cartilage Repair Society (ICRS) from [http://www.cartilage.org/\\_files/contentmanagement/ICRS\\_evaluation.pdf](http://www.cartilage.org/_files/contentmanagement/ICRS_evaluation.pdf). Retrieved 02.05.2009.

**Abbildung 7 aus Bustin 2005:**

Schematische Repräsentation eines PCR-Zyklus

Bustin, S. A. Real-Time PCR in "Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics". J Fuchs and M Podda Informa Healthcare 2004, 2005: 1117-1125.

**Abbildung 8 aus NBII:**

Schematische Repräsentation der DNA-Replikation während einer PCR

NBII. "Genetic Analysis in the Laboratory - "Making" DNA - Polymerase Chain Reaction (PCR)." National Biological Information Infrastructure (NBII) at [www.nbii.gov](http://www.nbii.gov) from [http://www.nbii.gov/portal/server.pt/community/genetic\\_analysis\\_in\\_the\\_laboratory/402/\\_making\\_\\_dna/566](http://www.nbii.gov/portal/server.pt/community/genetic_analysis_in_the_laboratory/402/_making__dna/566) Retrieved 05.05.2007.

**Abbildung 9 modifiziert aus Jähnichen "LightCycler Probes.jpg" 2005:**

Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der Real-Time PCR und Hybridisierungssonden

Jähnichen, S. (2005). "LightCycler Probes.jpg." from [http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:LightCycler\\_Probes.jpg&filetimestamp=20050924091224](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:LightCycler_Probes.jpg&filetimestamp=20050924091224) Retrieved 10.05.2007, 22:30.

**Abbildung 10 modifiziert aus Jähnichen "TaqMan Probes.jpg" 2005:**

Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der Real-Time-PCR und TaqMansonden

Jähnichen, S. (2005). "TaqMan Probes.jpg." from [http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:TaqMan\\_Probes.jpg](http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:TaqMan_Probes.jpg) Retrieved 10.05.2007, 22:30.

**Abbildung 11 modifiziert aus Jähnichen "Molecular Beacons.jpg" 2005:**

Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der Real-Time-PCR und Molecular Beacons

Jähnichen, S. (2005). "Molecular Beacons.jpg." from [http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Molecular\\_Beacons.jpg](http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Molecular_Beacons.jpg) Retrieved 10.05.2007, 22:30.

**Abbildung 12 modifiziert aus Jähnichen "Scorpions Probes.jpg" 2005:**

Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der Real-Time PCR und Scorpion Probes

Jähnichen, S. (2005). "Scorpions Probes.jpg." from [http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Scorpions\\_Probes.jpg](http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Scorpions_Probes.jpg) Retrieved 10.05.2007, 22:30.

**Abbildung 13 modifiziert aus Kubista, Andrade et al. 2006:**

Schema der Variations- bzw. Fehlerquellen der DNA/RNA-Analyse

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. and Zoric, N. "The real-time polymerase chain reaction." Mol Aspects Med **27** (2006): 95-125.

**Abbildung 14 aus Kubista, Andrade et al. 2006:**

Primingstrategien der reversen Transkription

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. and Zoric, N. "The real-time polymerase chain reaction." *Mol Aspects Med* **27** (2006): 95-125.

**Abbildung 15:**

Präparation eines standardisierten osteochondralen Defektes

**Abbildung 16:**

RT-PCR-Analyse der in Fibrin-Clots wachsenden Zellkulturen

**Abbildung 17:**

Quantitative RT-PCR-Analyse (Kontrolle und pBullet-hBMP2) des Regeneratknorpels aus osteochondralen Defekten des Kaninchenmodells nach zwölf Wochen.

**Abbildung 18:**

Quantitative RT-PCR-Analyse (Kontrolle und hBMP2-COPFROG/Plasmid) des Regeneratknorpels aus osteochondralen Defekten des Kaninchenmodells nach zwölf Wochen.

## **8 Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Vogt für die Überlassung des Themas, seiner ununterbrochenen Hilfestellung und freundlichen Beratung bei allen durchgeführten Experimenten.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher danke ich für die Überlassung der Räumlichkeiten für die Laborarbeiten im Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung.

Ich danke Frau Tierärztin Gabriele Wexel für ihre unverzichtbare Mitarbeit bei den Tierversuchen sowie Herrn Dipl. Biol. Michael Gerg für die Unterstützung bei der qRT-PCR-Analyse sowie ihre immer zuverlässige und freundliche Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Dr. med. Sarah Furchert bedanke ich mich herzlich für Ihre wertvollen Tipps bei der Verfassung der Arbeit und das Korrekturlesen.

Größter Dank gilt meiner Ehefrau Yamina, meinen beiden Töchtern, Elisa und Louise, sowie meiner gesamten Familie.

## 10 Veröffentlichungen

Die vorliegende Arbeit wurde in zwei Artikeln veröffentlicht:

Schillinger, U., Wexel, G., Hacker, C., Kullmer, M., Koch, C., Gerg, M., Vogt, S., Ueblacker, P., Tischer, T., Hensler, D., Wilisch, J., Aigner, J., Walch, A., Stemberger, A. and Plank, C. "A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors." *Pharm Res* **25** (2008): 2946-62

Vogt, S., Wexel, G., Tischer, T., Schillinger, U., Ueblacker, P., Wagner, B., Hensler, D., Wilisch, J., Geis, C., Wubbenhorst, D., Aigner, J., Gerg, M., Kruger, A., Salzmann, G. M., Martinek, V., Anton, M., Plank, C., Imhoff, A. B. and Gansbacher, B. "The influence of the stable expression of BMP2 in fibrin clots on the remodelling and repair of osteochondral defects." *Biomaterials* **30** (2009): 2385-92