

Abteilung für Sportorthopädie der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
Leiter: Univ.-Prof. Dr. A. B. Imhoff

**Etablierung eines in-vitro Modells zur Untersuchung der Effizienz und
Dauerhaftigkeit des Gentransfers mit Hilfe des retroviralen Vektors *bullet* in der
stabilen Zelllinie ATDC5 sowie in adulten Chondrozyten des Kaninchens**

Christopher Daniel Geis

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff
2. apl. Prof. Dr. A. Krüger
3. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 23.01.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.09.2008 angenommen.

Meinen Eltern.
In Dankbarkeit und Liebe.

Inhalt

1 Einleitung	7
1.1 Chondrale und Osteochondrale Läsionen	7
1.2 Heutige Verfahren in der Knorpeltherapie	10
1.2.1 Stammzellrekrutierende Verfahren	10
1.2.2 Autologe und allogene osteochondrale Transplantationen	11
1.2.3 Autologe Chondrozytentransplantation	11
1.3 Neue Ansätze in der Knorpeltherapie	13
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit	16
2 Grundlagen	17
2.1 Knorpel	17
2.2 Reaktion des Knorpels auf Schädigung	20
2.3 Wachstumsfaktoren in der Knorpeltherapie	21
2.3.1 Bone Morphogenetic Proteins	22
2.4 Tissue Engineering:	25
2.5 Gentherapie:	27
2.5.1 Non-virale Methoden:	27
2.5.2 Virale Methoden:	28
2.5.3 Nachweis des Transgens mit Hilfe von Reportergenen	29
2.5.4 Retroviren	30
2.5.4.1 Grundlagen	30
2.5.4.2. Struktur und Infektionszyklus	32
3 Material und Methoden	34
3.1 Material	34
3.2 Methoden	36
3.2.1 Zellkultur	36
3.2.2 Knorpelbiopsie	39
3.2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	39
3.2.2.2 Narkose und postoperative Versorgung	40
3.2.2.3 Operationstechnik	40
3.2.3 Produktion des retroviralen Vektors und Transduktion der Zielzellen	41
3.2.4 Durchflußzytometrie: FACS-Analyse	42
3.2.5 ELISA zur Bestimmung der BMP2-Konzentration	45
3.2.6 MTT-Assay	45
3.2.7 Alzianblau-Färbung	46
3.2.8 Ermittlung der DNA-Masse	47
3.2.9 Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase	47

4 Ergebnisse:	49
4.1 Effektive und stabile Gentransduktion von Markergenen mit Hilfe des retroviralen Vektors <i>bullet</i>	49
4.2 Expression von <i>BMP2</i>	55
4.3 Effekte von <i>BMP2</i> auf die Chondrogenese	57
4.3.1 Zellmorphologie	57
4.3.2 Proliferation	58
4.3.3 Proteoglykansynthese	61
4.3.4 Alkalische Phosphatase	64
5 Diskussion	66
5.1 Effizienter und stabiler Gentransfer mittels <i>bullet</i>	66
5.2 <i>BMP2</i> : Wirkung auf Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese	68
5.3 Sicherheitsaspekte des retroviralen Gentransfers und Ausblick	71
6 Zusammenfassung	74
7 Literaturverzeichnis	76
8 Abbildungsverzeichnis	97
9 Danksagung	98
10 Lebenslauf	99
11 Veröffentlichung	101

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
€	Euro
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ACI	autologe Chondrozytenimplantation
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALC	Alcianblau
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMPR	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> Rezeptor
ca.	circa
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
D	Dalton
dest.	destilliert
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	et altera
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter System</i>
FDG	Fluorescein-β-D-Galactopyranosid
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FKS	Fötale Kälberserum
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GAG	Glykosaminoglykane
Gd	Gadolinium
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde
hBMP2	humanes BMP2
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immunschwächevirus
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV	<i>Human T-Cell Lymphotropic Virus</i>
i.a.	intraartikulär
i.v.	intravenös
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>

IL-1	Interleukin 1
IU	<i>Infectious Unit</i>
kB	Kilobasen
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
lacZ	Beta-Galaktosidase-Gen bzw. Protein
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
Luc	Leuchtkäfer-Luziferase
MACI	Matrix-assoziierte autologe Chondrozytenimplantation
Mg	Magnesium
min	Minute
min.	mindestens
mm	Millimeter
mM, μ M, nM	Millimolar, Mikromolar, Nanomolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mmol, μ mol, nmol	Millimol, Mikromol, Nanomol
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
OATS	Osteochondrales Autologes Transfer-System
OD	optische Dichte (Extinktion)
OP	Operation
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PGA	Polyglykolsäure
pH	ph-Wert, Pondus Hydrogenii
Psi (Ψ)	Verpackungssequenz
RCR	Replikationskompetente Retroviren
rhBMP	Rekombinantes humanes BMP
RIA	<i>Radio Immuno Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
s.c.	subkutan
SIP	<i>Smad Interacting Protein</i>
Smad	Smad-Proteine (Transkriptionsfaktoren)
Smurf	<i>Smad Ubiquitin Regulatory Factor</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
U	<i>Unit</i>
U/l	<i>Units pro Liter</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VPC	Verpackungszelllinie
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galaktosid
β -Gal	Beta-Galaktosidase

1 Einleitung

1.1 Chondrale und Osteochondrale Läsionen

Knorpelschäden sind ein häufig anzutreffendes Krankheitsbild in der Orthopädie und Unfallchirurgie mit weitreichenden Folgen [10, 45, 84]. Diese chondralen bzw. osteochondralen Läsionen entstehen oftmals als Folge von Traumata, kommen jedoch auch als langfristige Konsequenz von anatomischen Deformitäten, Gelenkinstabilität oder neuromuskulären Funktionsstörungen vor [32, 141]. Die Lebensqualität der betroffenen Patienten leidet aufgrund der Schmerzen und der Bewegungseinschränkung. Zudem sind traumatisch bedingte Knorpelschäden allgemein anerkannte Ursachen einer vorzeitigen Arthrose, für die das Risiko nach isolierten Knorpeldefekten im Jugendalter gegenüber der Durchschnittsbevölkerung dreifach erhöht ist [33, 131]. Die langwierige Behandlung verursacht hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Bauer und Jackson etablierten eine gängige deskriptive Klassifizierung von Knorpelschäden nach arthroskopischen Befund [15]. Diese Einteilung beschreibt die arthroskopische Morphologie des Schadens. Sie unterscheidet zwischen traumatischen und degenerativen Knorpelläsionen. Typ I-IV sind traumatischer, Typ V und VI degenerativer Genese (Abbildung 1).

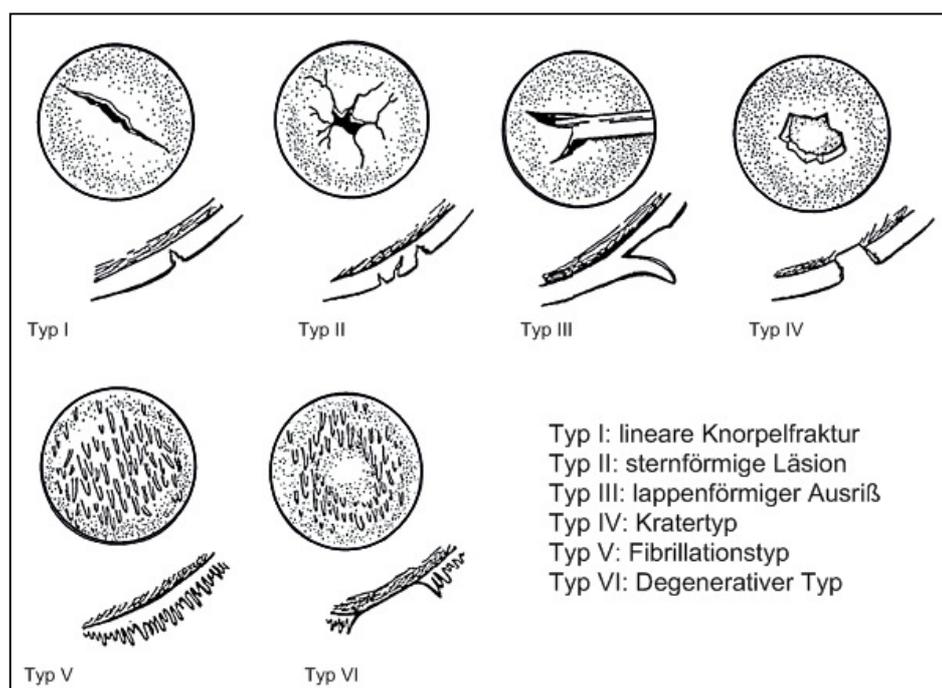


Abbildung 1:
Klassifikation
von Knorpel-
schäden nach
[15]

Die Einteilung der osteochondralen Läsionen am Knie nach Imhoff unterscheidet je nach Befund in Röntgen, MRT und Arthroskopie fünf Stadien (Tabelle 1).

Stadium	Röntgen	MRT	Arthroskopie	Befund
I A	Eventuell verminderte Knochendichte	Bone bruise, geringere Signalintensität T1, Ödem T2, kein Grenzsaum	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, Grenzsaum, 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, Grenzsaum, 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, Grenzsaum, 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, Grenzsaum, niedrige Signalintensität T1/T2	Idem	Zyste mit Sklerose

Tab. 1: Einteilung der osteochondralen Läsionen am Knie nach kombiniertem Befund von Röntgen, Magnetresonanztomographie und Arthroskopie (nach [94])

Die Regenerationsfähigkeit des Knorpels ist eingeschränkt. Dies liegt begründet in seiner fehlenden Blutgefäß- und Nervenversorgung. Als Folge ist seine Reaktion auf Schädigung ineffizient und insbesondere adulter Gelenkknorpel regeneriert nach Verletzungen meist nur unvollständig. Selbst bei Affektion des subchondralen Knochens kann sich durch ein von Blutgefäßen aus dem Markraum einsprühendes Granulationsgewebe bestenfalls mechanisch minderwertiger Faserknorpel bilden. Dieser neigt zur schnellen Degeneration mit konsekutiver Entwicklung einer Osteoarthritis [148].

Zur Therapie von Knorpelläsionen sind in der Klinik aktuell drei verschiedene Prinzipien etabliert: Stammzellrekrutierende Verfahren, Knorpel-Knochen-Transplantationen und Knorpelzelltransplantation.

1.2 Heutige Verfahren in der Knorpeltherapie

1.2.1 Stammzellrekrutierende Verfahren

Viele Verfahren zur Behandlung von Knorpelschäden bauen auf dem Prinzip der Nutzung des körpereigenen Heilungspotentials durch die Einwanderung von adulten Stammzellen auf. Diese Stammzellen werden aus dem Blut, Knochenmark, Perichondrium oder Periost rekrutiert und sollen die Bildung eines Knorpelersatzgewebes induzieren.

Beim bereits Anfang der 1940er Jahre etablierten Débridement wird lediglich das nekrotische Knorpelgewebe bis zum subchondralen Knochen reseziert [73, 120]. Dies wird heute oft kombiniert mit Lavage, partieller Meniskektomie, Entfernung freier Gelenkkörper und kleiner Osteophyten [129]. Pridie publizierte 1959 die Möglichkeit der Weiterführung des Débridements mit der großzügigen Anbohrung des subchondralen Knochens im Bereich des chondralen Defektes [154]. Bei der von Johnson Ende der 1970er Jahre eingeführten Abrasionsarthroplastik wird nach Débridement eine großflächige Blutung des subchondralen Knochens mittels einer Fräse provoziert [98]. Bei der Mikrofrakturierung [182], einer Modifikation der Pridie-Bohrung werden nach Débridement im Abstand von 2-3 mm mittels spezieller Meißel mehrere ca. 4 mm tiefe Löcher in den subchondralen Knochen eingebracht. Weitere Techniken transplantieren als Stammzellquelle Perichondrium- oder Periostlappen in den Defekt [85, 86].

In verschiedenen Studien zeigten sich zwar bei den genannten Methoden über einen limitierten Zeitraum akzeptable klinische Resultate [24, 181]. Die Langzeitresultate sind jedoch nicht zufriedenstellend [90, 91]. Zudem ergaben histologische Untersuchungen, dass das entstehende Ersatzgewebe überwiegend faserknorpelartig ist und dementsprechend seine mechanischen Eigenschaften nicht an die Qualität des originären Knorpelgewebes heranreichen [6, 23, 32, 57, 105, 177, 208]. Für keines der beschriebenen Verfahren konnte gezeigt werden, dass beständiger hyaliner Knorpel gebildet wird.

1.2.2 Autologe und allogene osteochondrale Transplantationen

Die bekanntesten Verfahren hierbei sind die 1993 von Matusue erstmals beschriebene Mosaikplastik, die OATS- (Osteochondral Autograft Transfer System) und MEGA-OATS-Technik [27, 93, 95, 128].

Bei diesen Methoden werden verschieden große Knorpel-Knochen Fragmente von mechanisch wenig beanspruchten Gebieten in das Gebiet des Defektes transplantiert, wobei bei OATS und Mega-OATS die *press-fit* Technik angewandt wird. Auch die Transplantation von Leichen-Allografts ist möglich, jedoch in Deutschland kein etabliertes Verfahren [46]. Um eine vermehrte Belastung bei Achsenfehler zu vermeiden werden die Eingriffe oftmals mit einer Korrekturosteotomie kombiniert.

Anders als bei den oben dargestellten stammzellrekrutierenden Verfahren ist bei Knorpel-Knochen-Transplantationen der Defekt initial mit hyalinem Knorpel gedeckt. Auch klinisch zeigen sich in vielen Studien gute Resultate [27, 75, 87, 211]. Problematisch ist jedoch die begrenzte Verfügbarkeit von zur Transplantation geeignetem Knorpelgewebe und die Morbidität an der Entnahmestelle [13, 157]. Auch ist fraglich, ob Knorpel aus mechanisch wenig belasteten Gebieten in der Lage ist, der größeren Beanspruchung in der neuen Umgebung auf Dauer standzuhalten oder zur Degeneration neigt. So zeigte Tibesku in einer Schafstudie, dass schon drei Monate nach Implantation von Knorpel-Knochen-Zylindern histologisch Anhaltspunkte für eine Degeneration sichtbar waren [189]. Er beobachtete auch, dass am Defektrand lediglich der Knochen einheilte, während im Knorpelanteil eine Integration nicht erfolgte. Letzteres hatte auch schon Horas 2003 am Menschen festgestellt [87].

1.2.3 Autologe Chondrozytentransplantation

Bei der klassischen autologen Chondrozytentransplantation (ACT) wird Knorpel arthroskopisch entnommen und die Knorpelzellen nach Expansion in Zellkultur unter einen autologen Periostlappen in den Defekt injiziert [26]. In neueren Verfahren, z.B. der Matrix-induzierten ACT (MACT) werden verschiedene mit Chondrozyten besetzte Matrices zur Deckung des Defektes verwendet [14, 41]. In klinischen Studien können gute Ergebnisse vor allem bei jungen Patienten vorgewiesen werden [126, 151]. Histologisch ist jedoch auch hier evident, dass das Reparaturgewebe kein hyaliner

Knorpel ist [37, 105, 162]. Des Weiteren besteht die Problematik der ACT in der Gefahr der Kontamination, der Hypertrophie des transplantierten Gewebes und nicht zuletzt auch in den hohen Kosten (ca. 5.000-10.000€/Patient).

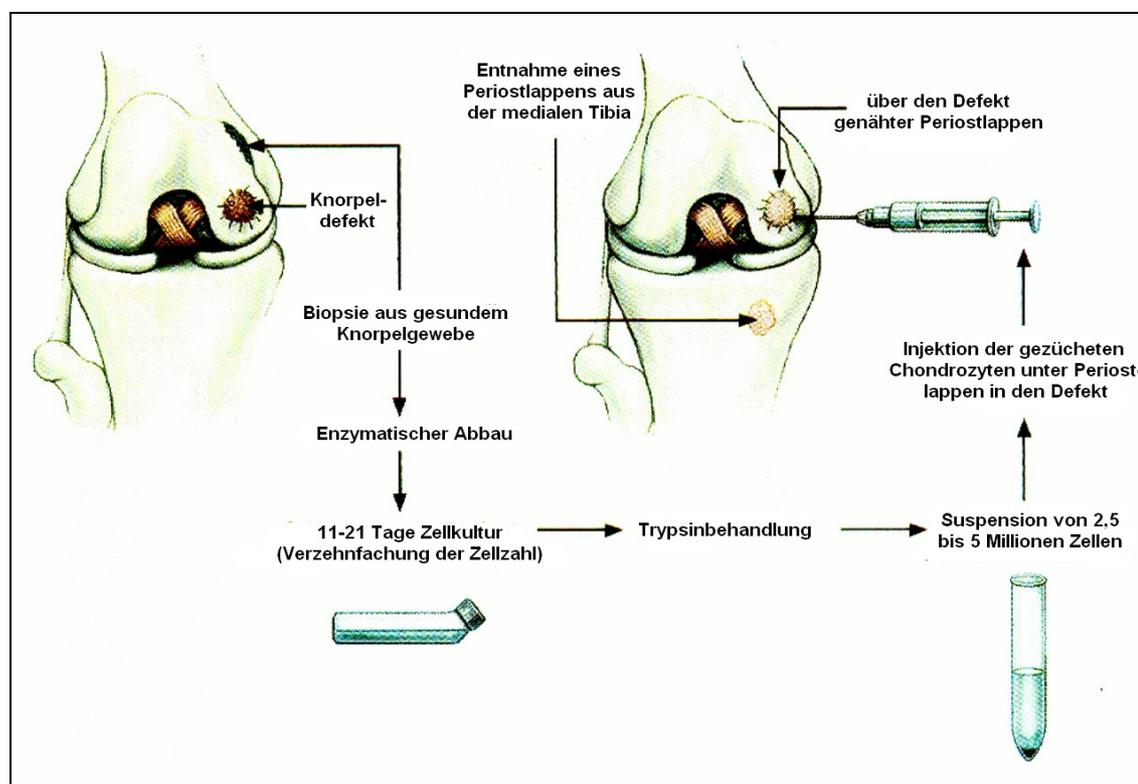


Abbildung 2: Die Technik der autologen Chondrozytenimplantation nach Brittberg 1994

Chondrozyten werden nach Biopsie und enzymatischem Verdau der umgebenden Matrix *in-vitro* amplifiziert. In einer zweiten Operation werden die kultivierten Zellen nach ca. zwei Wochen unter einem Periostlappen in den Defekt eingebracht. Modernere Verfahren wie die MACI verwenden zur Sicherung der Zellen z.T. Matrices unterschiedlicher Arten an Stelle des Periostlappens. (modifiziert nach: [26])

Mit all diesen heute in der klinischen Praxis verwendeten Therapieverfahren für Läsionen von Gelenkknorpel konnte bisher keine *restitutio ad integrum* und auch kein langfristig zufriedenstellendes Ergebnis erreicht werden [25, 91, 141, 180]. Aus diesem Grund werden sie vor allem zum Zeitgewinn vor Implantation eines prothetischen Gelenkersatzes eingesetzt [148]. Da dies jedoch nur eine Ultima ratio darstellen kann, ist die Suche nach neuen, biologischen Therapieverfahren ein wichtiges Ziel in der Orthopädie und Unfallchirurgie.

1.3 Neue Ansätze in der Knorpeltherapie

Die Verwendung von Wachstumsfaktoren in Verbindung mit *Tissue Engineering* ist eine viel versprechende Methode für die Behandlung von Knorpelschäden [19, 89, 127, 130]. Das *Tissue Engineering* basiert auf der *ex-vivo* Herstellung biologischer Ersatzgewebe unter Kontrolle der physikalisch-chemischen sowie mechanischen Parameter in der Zellkultur [185]. In verschiedene Trägermaterialien eingelagerte Chondrozyten sollen unter diesen Bedingungen der dreidimensionalen Kultur Phänotyp und Funktion auch nach zunächst erfolgtem enzymatischem Abbau der sie umgebenden Matrix beibehalten [35]. Somit können dreidimensionale Zellkonstrukte gebildet werden, die nach Wiedereinsetzen in den Organismus die Knorpeldefekte wieder auffüllen können. Zugegebene Wachstumsfaktoren können hierbei eine zusätzliche Stimulation von Chondrozyten bzw. mesenchymalen Progenitorzellen zu Differenzierung, Migration, Proliferation und Matrixsynthese bewirken [64, 147, 205]. So können sie einen entscheidenden Effekt auf die Knorpelheilung haben [91, 195]. Wachstumsfaktoren sind ein Teil der großen Familie der Zytokine und können von ortsspezifischen Zellen wie Chondrozyten, Endothelzellen und Mesenchymzellen oder von einwandernden Reparatur- und Entzündungszellen wie adulten Stammzellen und Immunzellen nach entsprechender Signalwirkung gebildet werden [127, 145].

Ein besonders Erfolg versprechender Wachstumsfaktor in der Knorpelheilung ist das zur Familie der *Transforming-growth-factors beta* (TGF- β) gehörende *Bone-Morphogenetic-Protein 2* (BMP2). In verschiedenen Studien konnte seine Eignung für die Knorpelregeneration bereits gezeigt werden [38, 76, 149, 160, 170]. *In vivo* zeigte BMP2 in mehreren Tierstudien die Fähigkeit, die Heilung von osteochondralen Defekten zu beschleunigen, mit einer verbesserten histologischen Morphologie des gebildeten Knorpelersatzgewebes [138, 176, 187]. Durch seine anabole Wirkung auch auf Knochengewebe ist er zudem in der Lage, den Aufbau des subchondralen Knochens bei osteochondralen Defekten entscheidend zu fördern [214].

Ein Problem besteht jedoch in der Applikation der Wachstumsfaktoren [51]. Zur Entfaltung des therapeutischen Effektes ist ein ausreichender Wirkspiegel über einen längeren Zeitraum notwendig. Anfangs wurden diese Wachstumsfaktoren lokal in das Gelenk appliziert oder sogar systemisch verabreicht. Problematisch hierbei ist die kurze Halbwertszeit der Substanzen. So zeigte Sellers, dass rekombinantes *hBMP2* nach Injektion ins Kniegelenk von Kaninchen schon nach 5,6 Tagen nur noch zur Hälfte und nach 14 Tagen überhaupt nicht mehr nachweisbar ist [176]. Es müssen also wiederholte Injektionen vorgenommen werden, um einen konstanten Wirkspiegel aufrechtzuerhalten. Dies wiederum erhöht die Infektionsgefahr. Infolgedessen wurden bereits vielfältige Strategien untersucht, um die Konzentration der Zytokine am Wirkungsort stabil zu halten, wie z.B. osmotische Pumpen oder Heparin [89, 97, 208]. Ein anderer Nachteil dieser Applikationsform ist, dass die Wirkung der injizierten Substanz nicht nur lokal den Defekt, sondern auch das umliegende Gewebe im Gelenk betrifft und dort unerwünschte Wirkungen wie z.B. Osteophytenbildung hervorrufen kann [59].

Die Vorteile einer Kombination von *Tissue Engineering* und gentherapeutischen Methoden in diesem Zusammenhang liegen in der kontinuierlichen lokalen Expression des therapeutischen Gens im Bereich des Defektes und den geringen regionalen und systemischen Nebenwirkungen [51, 89, 201]. Die in ihrer Erbinformation veränderten transplantierten Zellen können durch das Transgen eine Funktion dazu gewinnen, z.B. durch Synthese eines Wachstumsfaktors. Doch der Erfolg der Gentherapie ist stark abhängig von der Entwicklung von Vektoren, die einen selektiven und effizienten Gentransfer an den Zielort mit minimaler Toxizität garantieren [142]. Bei der Übertragung des gewünschten Gens über die Zellmembranen in den Nukleus unterscheidet man *virale* und *non-virale* Methoden [58]. Der Vorteil der non-viralen Vektoren wie z.B. Liposomen ist die einfache Durchführbarkeit, geringe Immunogenität und minimale onkogene Potenz [119]. 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 [116, 161, 200]. In der Knorpeltherapie wurden in vorangegangenen Studien adenovirale, adeno-assoziierte,

lentivirale und retrovirale Vektoren verwendet [12, 48, 59, 69, 83, 92, 111, 118, 136]. Jedoch konnte in keiner der Arbeiten ohne Zwischenschaltung eines Selektionsschrittes eine Transduktionsrate von über 90% an primären Chondrozyten erreicht werden. Auch ist dem Autor keine Studie bekannt, die die Expression des Transgens über einen Zeitraum von mehr als sechs Monaten verfolgt hätte.

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde ein VSV.G pseudotypisierter retroviraler Vektor für den Gentransfer in stabile Zelllinien und primäre Chondrozyten verwendet. Es wurde die Effizienz und Langzeitstabilität des Vektorsystems und seine Eignung für weiterführende *in-vitro* und *in-vivo* Experimente untersucht.

Als stabile Zelllinie für die retrovirale Transduktion wurden ATDC5-Zellen, eine chondrogene Zelllinie von AT805-Teratokarzinomzellen der Maus, verwendet. Diese proliferieren *in-vitro* unter Annahme einer fibroblastenartigen Morphologie rasch und bilden eine konfluente Monolayer-Schicht bis das Wachstum infolge von Kontaktinhibition sistiert. Das Hinzufügen von Insulin oder Wachstumsfaktoren induziert jedoch zelluläre Kondensation und Chondrogenese [5, 179].

Primäre Chondrozyten wurden aus dem Kniegelenk von New Zealand White Kaninchen gewonnen und die umgebende Matrix durch Kollagenase A verdaut. Im Anschluss wurden sie mit demselben retroviralen Vektorsystem transduziert.

Im ersten Teil der Versuche wurde mittels der Markergene *eGFP* und *lacZ* die Effektivität und Dauerhaftigkeit des retroviralen Vektorsystems untersucht. Im zweiten Teil wurde die synthetisierte Menge des Wachstumsfaktors BMP2 nach retroviraler Transduktion des therapeutischen Gens im Zeitverlauf studiert. Im dritten Teil der Arbeit wurden dann die Auswirkungen von BMP2 auf die Zellproliferation und die Chondrogenese eruiert. Zu diesem Zwecke erfolgte die Analyse der Synthese von knorpelzellspezifischen Genprodukten.

2 Grundlagen

2.1 Knorpel

Hyaliner Knorpel bedeckt die Oberflächen der synovialen Gelenke über dem subchondralen Knochen. Er ist das zentrale mechanische Element für die Beweglichkeit des Gelenkes und liefert durch seine hohe Elastizität und Reißfestigkeit die Voraussetzung für jahrzehntelange uneingeschränkte Funktionalität der Gelenke. Er besteht aus Chondrozyten sowie einem Matrixgewebe aus Kollagenen, Proteoglykanen und nicht-kollagenen Proteinen mit einem Wassergehalt von 80% [124].

Chondrozyten beziehen ihre Nährstoffe nach Abschluss des Skelettwachstums durch Diffusion aus der Synovia und subchondralen Gefäßen. Ihr Stoffwechsel ist überwiegend anaerob. Sie machen nur ein Prozent des Gewebevolumentums aus und sind für die Synthese, Umbau und Abbau der Komponenten der sie umgebenden Matrix verantwortlich [31, 33].

Das arkadenartig angeordnete Netz aus kollagenen Fasern liefert die Zugfestigkeit und Resistenz gegenüber Scherkräften. Im Fall des Gelenkknorpels besteht es neben Kollagen V, VI, IX und XI zu 90-95% aus Kollagen Typ 2 Fasern [36]. Dies unterscheidet ihn vom Faserknorpel, der hauptsächlich aus Kollagen Typ I Anteilen besteht (Abbildung 3)

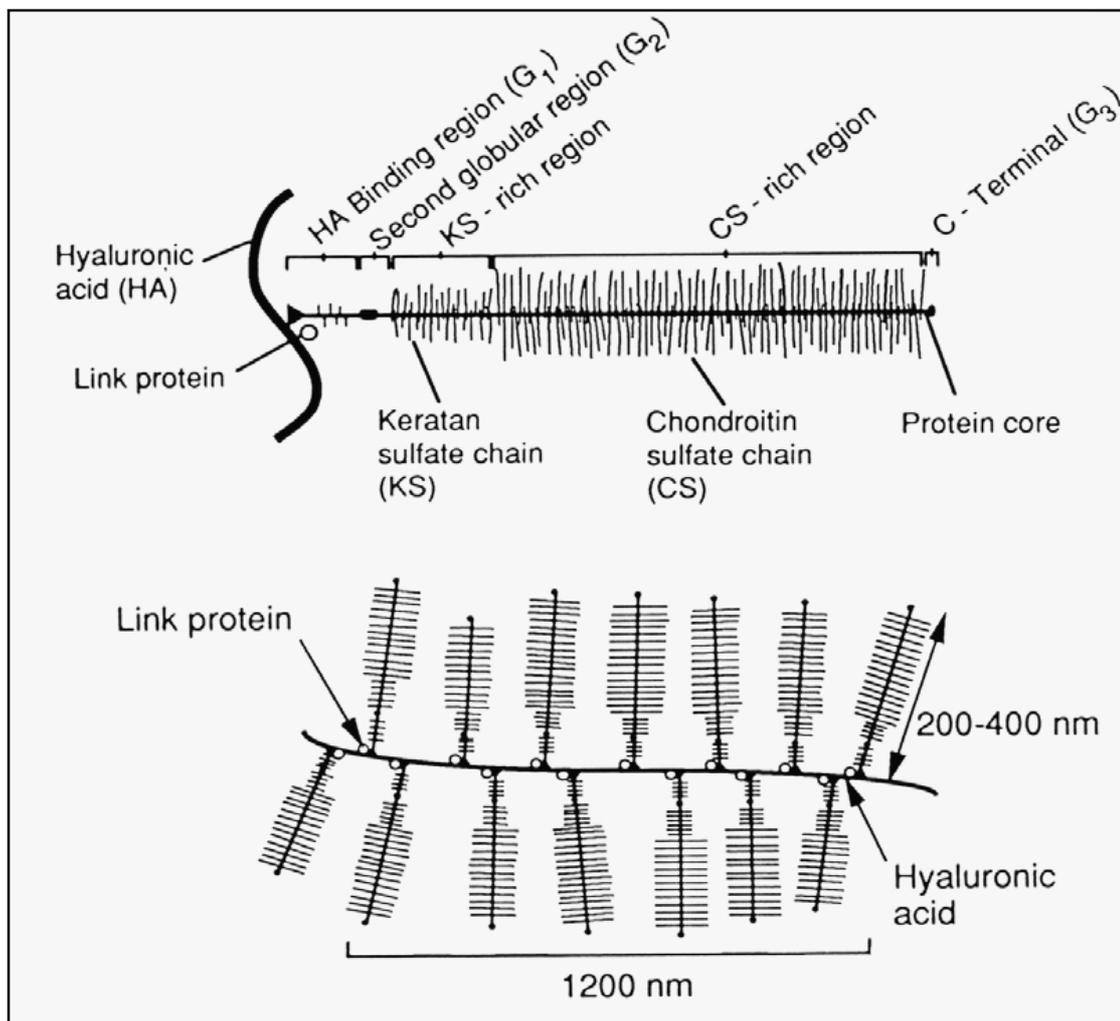


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proteoglykanstruktur

Proteoglykane bestehen aus einem Proteinkern und kovalent gebundenen Glykosaminoglykanketten (GAG). Über ein Link-Protein sind sie mit Hyaluronsäure verbunden. Die GAG sind durch ihre multiplen hydrophilen Enden in der Lage, Wasser zu binden und tragen so zur viskoelastischen Funktion des Knorpels bei (modifiziert nach [1]).

Proteoglykane sind an das Kollagenetzwerk gebunden bzw. mechanisch in ihm gefangen. Sie machen 35-45% des Trockengewichtes von Knorpel aus. Zusammengesetzt sind sie aus einem Proteinkern und einer oder mehreren Glykosaminoglykanketten. Diese Ketten aus Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure, Keratansulfat und Dermatansulfat sorgen durch die Bindung von Wasser für die Druckelastizität des Knorpels [11]. Aggrecan füllt als größtes und häufigstes Proteoglykan einen großen Teil des interfibrillären Raums aus. Den nicht-kollagenen Proteinen und Glykoproteinen wird eine Rolle bei Zell-Matrix-Interaktionen und der Organisation der Matrix zugeschrieben [31]. Zusammen mit der Synovialflüssigkeit erlaubt der hyaline Knorpel eine annähernd reibungsfreie Bewegung der Gelenke. Er sorgt für Verteilung und Dämpfung von mechanischer Last und minimiert auf diese Weise Spitzenbelastungen des subchondralen Knochens [152]. Man unterscheidet vier hochorganisierte Zonen (Abbildung 4), die in ihrem Zusammenspiel diese mechanischen Eigenschaften ausmachen [77].

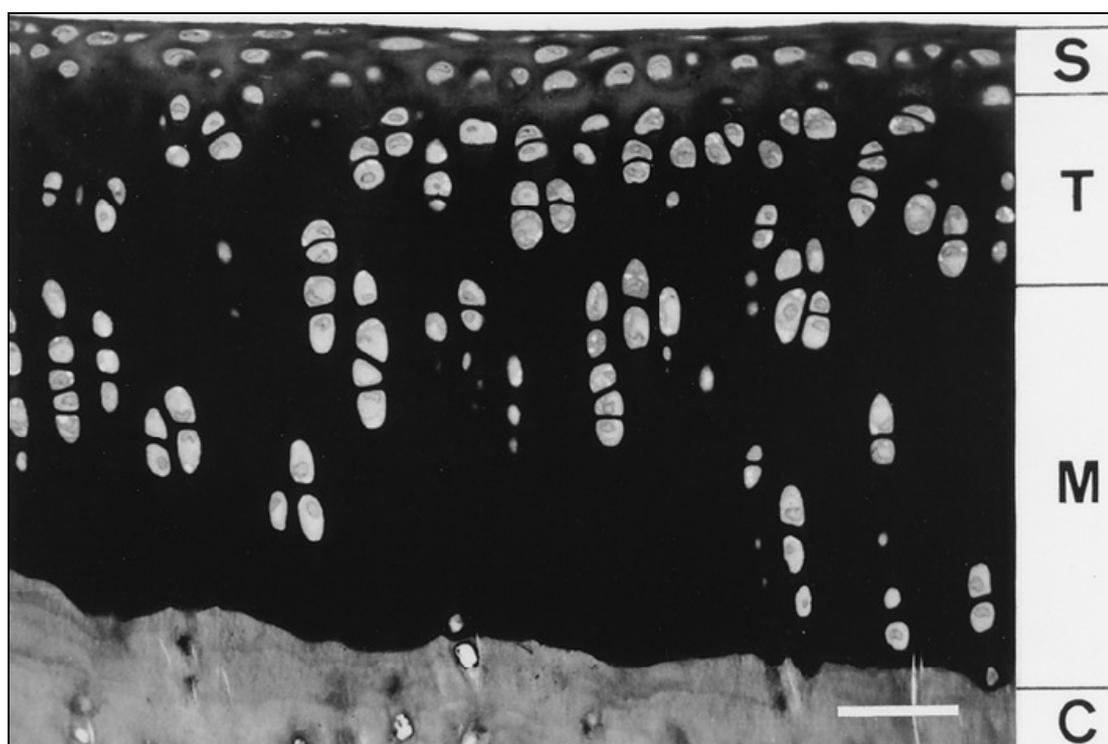


Abbildung 4: Histologische Struktur des Gelenkknorpels

Der Gelenkknorpel ist aus vier Schichten (oberflächliche (S), Übergangs- (T), mittlere (M) und kalzifizierte (C) Schicht) aufgebaut. Diese besitzen unterschiedliche mechanische Eigenschaften, was sich u.a. im Verlauf der Kollagenfasern, der Zellmorphologie sowie in der unterschiedlichen Matrixzusammensetzung der einzelnen Zonen widerspiegelt (Balken = 50 μm , aus [31]).

2.2 Reaktion des Knorpels auf Schädigung

Die Reaktion von adultem Knorpel auf Schädigung unterscheidet sich von der anderer Gewebe [123]. Dies liegt begründet in der Tatsache, dass er weder über Blut- oder Lymphgefäße, noch über eine nervale Versorgung verfügt [148]. Die Chondrozyten zeigen nach Abschluss des Wachstums eine kaum nachweisbare Zellproliferationsrate [209]. Durch die als Diffusionsbarriere fungierende extrazelluläre Matrix ist die Migration von Chondrozyten und Reparaturzellen erschwert [31]. Grundlage eines jeden Reparaturprozesses im Organismus sind jedoch Zellteilung, DNA-Replikation und Proteinsynthese zur Bereitstellung eines Ersatzgewebes [123].

Oberflächliche Verletzungen des Knorpels ohne Verbindung zum subchondralen Knochen heilen nicht spontan [158]. Dies erklärt sich durch die fehlende Verfügbarkeit von Progenitorzellen aus Blut und Knochenmark, die eine Reparatur initiieren könnten. Es kommt zur Nekrose von Chondrozyten am Rand des Defektes, die sich im Auftreten von sogenannten Geisterzellen in Chondrozytenlakunen manifestiert [37]. Überlebende Chondrozyten zeigen eine gesteigerte Proliferation und Synthese von Knorpelmatrixkomponenten, was mikroskopisch zum Auftreten von Chondrozytenhaufen, sogenannten Clustern führt [4, 56]. Diese Reaktion ist jedoch nur von kurzer Dauer und führt in der Regel nicht zu einer Heilung des Defektes [123]. Lediglich bei sehr kleinen Defekten des Knorpelgewebes wurde eine *restitutio ad integrum* durch Neusynthese von Proteoglykanen beobachtet [30]. Oberflächliche Läsionen können über Jahre unverändert bestehen und führen nicht notgedrungen zu Osteoarthrose [188].

Für die Heilung von größeren Defekten spielt der subchondrale Knochen eine entscheidende Rolle. Aus ihm können adulte Stammzellen des Knochenmarks bzw. des Blutes in den Defekt einwandern und die Reparation in die Wege leiten [177]. Die Läsion wird mit einem Blut-Fibrin-Pfropf aufgefüllt. Nach Organisation des Hämatoms und Differenzierung der eingewanderten Progenitorzellen wird der subchondrale Knochen wieder aufgebaut, während im Bereich der Knorpelschicht neues Knorpelgewebe gebildet wird [34]. Dieses ist jedoch meist mechanisch minderwertig,

mit einem im Vergleich zum originären hyalinen Knorpel erhöhten Anteil an Kollagen Typ 1 Fasern [3, 57]. Der Anteil an Proteoglykanen nimmt im Verlauf ab und die oberflächliche Knorpelzone mit den charakteristischen tangential verlaufenden Kollagenfasern kann nicht wiederhergestellt werden [132]. Zudem findet keine Integration des gebildeten Ersatzgewebes mit dem gesunden Gewebe an den Defekträndern statt [177, 210]. Es kommt zur weiteren Degeneration des Ersatzgewebes mit langfristigem Übergang in die Osteoarthritis [33, 57, 91, 148, 177].

Die Osteoarthritis ist gekennzeichnet durch eine Verschiebung des physiologischen Gleichgewichtes zwischen anabolen und katabolen Stoffwechselprozessen im Gelenk [28, 133]. Proinflammatorische Zytokine wie *Interleukin-1* (IL-1) und *Tumornekrosefaktor- α* (TNF- α) überwiegen, protektive Zytokine, wie z.B. Wachstumsfaktoren treten in den Hintergrund. Dadurch kommt es zur Degradation der Matrix durch Suppression der Synthese von Proteoglykanen und Typ 2-Kollagen sowie durch gesteigerte Synthese von Matrixmetalloproteinasen und Aggrecanasen [62]. Der Verlust von molekularen Strukturen wie den Proteoglykanen führt zur mikroskopisch sichtbaren Demaskierung der fibrillären Knorpelstrukturen, zur makroskopisch sichtbaren Rissbildung und schließlich zum Knorpelabrieb mit unregelmäßiger Konturierung der Oberfläche („Usurierung“) [122]. Es kommt zur Osteoarthritis, die neben dem Knorpel selbst auch die Gelenkkapsel, Synovia und den subchondralen Knochen betrifft, im Sinne der Entstehung von Osteophyten, Synovialitis, Kapselfibrose, subchondraler Sklerose und „Geröllzysten“ [102, 194].

2.3 Wachstumsfaktoren in der Knorpeltherapie

Wachstumsfaktoren sind ein wichtiger Bestandteil der orthopädischen Forschung. Zu den untersuchten Substanzen zählen *Bone Morphogenetic Proteins*, *Insulin-like Growth Factors (IGF)* und der *Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)*. Bisherige Arbeiten belegten bereits für *IGF1*, *BMP2*, *bFGF* und *TGF- β 1* in *in-vivo* Studien eine positive Auswirkung auf die Knorpelregeneration [44, 175, 199, 204]. In den dazu verwendeten Tierstudien wurde in histologischen Schnitten von Knorpeldefekten nach Behandlung

mit diesen Wachstumsfaktoren gezeigt, dass das Reparaturgewebe Charakteristika von hyalinem Knorpel besitzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Wachstumsfaktor BMP2, ein Mitglied der *Transforming-Growth-factor-Beta-(TGF- β -)* Familie, verwendet. Diese umfasst die *TGF- β s* selbst, *Inhibine*, *Aktivine*, *Nodal*, *Glial Derived Neurotrophic Factor*, *Growth/Differentiation Factors (GDF)*, die *Müllerian-inhibiting Substanz* und die *Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)* mit Ausnahme von *BMP1* [156]. Ihnen gemeinsam ist eine ähnliche Aminosäuresequenz, die Signaltransduktion via Serin/Threonin-Kinasen sowie intrazelluläre Signalkaskaden über Smad-Proteine.

2.3.1 Bone Morphogenetic Proteins

Der Effekt von *Bone Morphogenetic Proteins* wurde bereits in den 1960er Jahren bekannt, als Urist entdeckte, dass demineralisierte Knochenstücke nach subkutaner oder intramuskulärer Implantation Knochenwachstum induzieren [202]. Es dauerte jedoch bis in die 1980er, bis die verantwortlichen Proteine identifiziert werden konnten [117, 215].

Bis heute konnten ca. 20 Mitglieder der *BMP*-Familie ausgemacht werden [40]. Die Signalweiterleitung nach extrazellulärer Ligandenbindung erfolgt durch transmembranäre Serin/Threonin Kinase Rezeptoren, die in zwei Subtypen aufgeteilt werden (BMPR-I und BMPR-II) [106, 112]. Diese Subtypen wiederum kommen in jeweils drei verschiedenen Variationen vor. Nach Bindung an den oberflächlichen Rezeptor bildet sich ein heterotetramerer Rezeptorkomplex aus zwei Paaren BMPR I und II Komplex [174]. Durch Phosphorylierung werden nun Smad-Proteine aktiviert, die nach Translokation in den Kern zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Gene induzieren [40]. Die BMP-Signalkaskade wird auf vielfältige Weise reguliert. Daran beteiligt sind u.a. intrazellulär die *Smad Ubiquitin Regulatory Factors (Smurf)*, *Tob*, *Smad6* und *Smad Interacting Protein (SIP)* sowie extrazellulär *Noggin*, *Chordin*, *Gremlin*, *Dan* und *Cerberus* [29, 88].

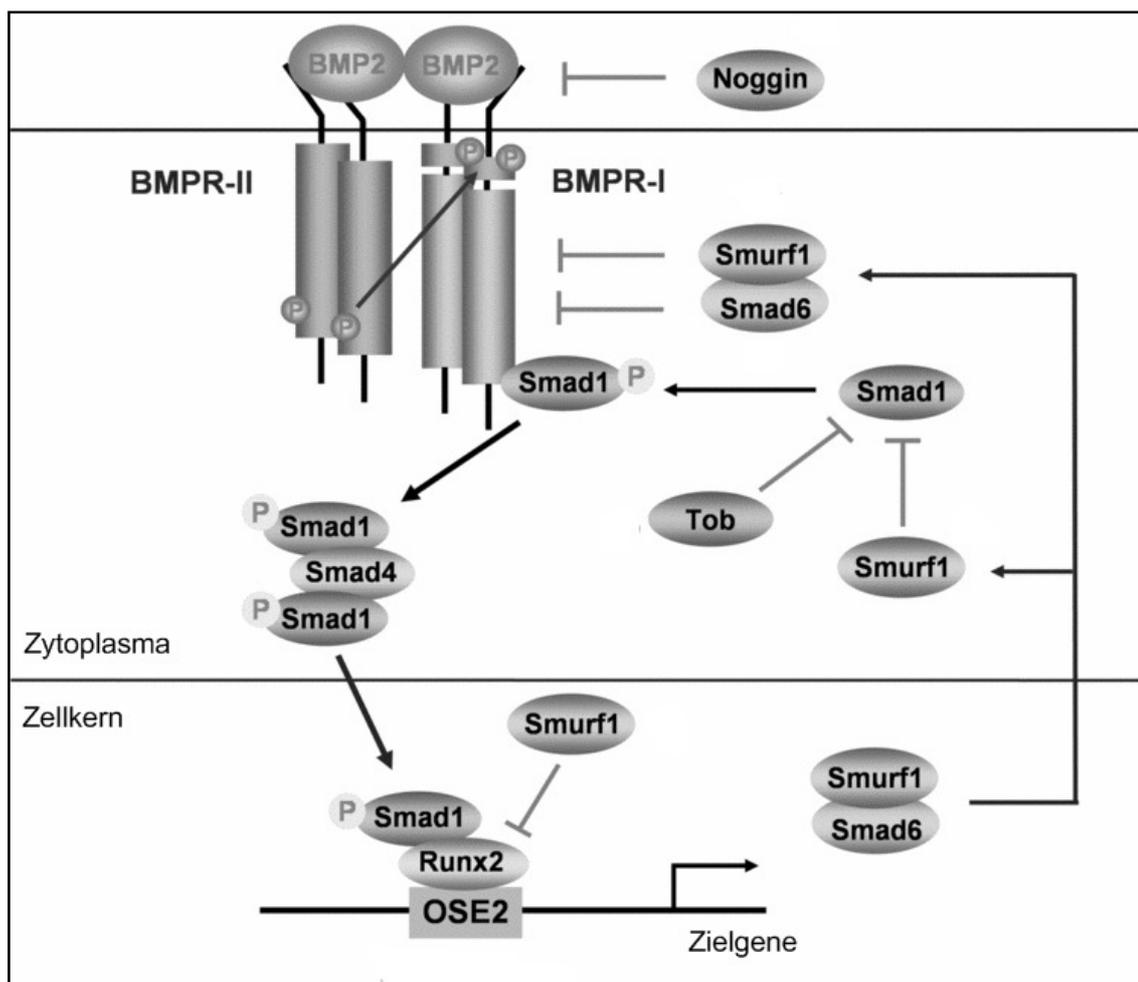


Abbildung 5: BMP-Signalkaskade

Die Wirkung von *BMP2* wird durch Typ I und II Rezeptoren und die nachfolgenden Signalmoleküle Smad 1, 5 und 8 vermittelt. Nach Komplexbildung mit *Smad4* erfolgt die Translokation in den Nucleus, wo die Zielgene exprimiert werden. Die *BMP2*-Effekte werden u.a. durch die Proteine *Noggin*, *Smurf* und *Smad6* reguliert (Darstellung modifiziert nach [40]).

Bone morphogenetic Proteins spielen schon in der embryonalen Entwicklung des Organismus bei der Bildung von Herz-, Nerven-, Knochen- und Knorpelgewebe eine entscheidende Rolle [40]. Mäuse ohne *BMP2*, 4 und 7 sterben während der Embryogenese oder kurz nach der Geburt [174]. *BMP2*-Knockout-Mäuse zeigten Malformationen an Amnion und Chorion sowie Störungen der Herzentwicklung, wie Zhang und Mitarbeiter in ihrer Studie feststellten [223].

Auch in die Heilung von Stützgewebsdefekten sind BMPs involviert. So fanden Tsuji et al heraus, dass Mäuse ohne die Fähigkeit der *BMP2*-Expression in den Extremitäten Spontanfrakturen erleiden, ohne Initiation einer Heilung [196]. Tierexperimentelle Studien zeigten die Fähigkeit von *BMPs*, Läsionen an Schädel-, Mandibular- und langen

Knochen zu regenerieren [18, 125, 193, 219]. In der Arbeit von Betz zeigte *BMP2* eine akzelerierende Wirkung auf die Heilung von Knochendefekten kritischer Größe in den Femora von ausgewachsenen Ratten.

BMP2 erwies sich auch für die Heilung von Knorpelschäden *in-vivo* bereits als geeigneter Wachstumsfaktor. Sellers und Mitarbeiter verwendeten Kollagenschwämme angereichert mit rekombinantem *hBMP2* für die Versorgung osteochondraler Defekte im Kaninchenmodell [175, 176]. Sie konstatierten in histologischen Untersuchungen unter *BMP2*-Einfluss neben der beschleunigten Formation des subchondralen Knochens auch eine verbesserte Qualität des gebildeten Knorpelgewebes. Kriterien hierfür waren Integration an den Defekträndern, Morphologie der Zellen sowie des Defektes innen und an der Oberfläche sowie Neubildung der Tidemark. Ähnliches beobachteten auch Frenkel et al in ihrer Kaninchenstudie [54]. Eine Studie von Nakase et al legt eine Rolle von *BMP2* bei der körpereigenen Antwort auf Knorpelschäden in Folge von Arthrose nahe: Es wurden humane Kniegelenksbiopsien aus neonatalem, gesundem adulten sowie arthrotisch geschädigtem hyalinen Knorpel histologisch untersucht. Im gesunden adulten Knorpel war kein *BMP2* vorhanden, während im neonatalen sowie im arthrotisch veränderten Knorpel *BMP2* nachzuweisen war. Die Autoren schlossen daraus auf eine Rolle von *BMP2* bei anabolen und regenerativen Vorgängen in arthrotisch geschädigten Knorpelzellen [137].

Der nächste Schritt besteht nun darin, sich dieses Wissen für therapeutische Interventionen am Menschen zu Nutzen zu machen. Erste Ansätze in der Knochenheilung gibt es bereits: So existieren klinische Studien über die Anwendung von *BMP2* bzw. *BMP7* bei Pseudarthrosen, Spondylodese und offenen Tibiafrakturen [55, 70, 74, 114]. *BMP2* und *BMP7* sind inzwischen auch kommerziell als rekombinantes Protein erhältlich (Infuse® und OP-1®).

2.4 Tissue Engineering:

Die erste Verwendung des Begriffs *Tissue Engineering* wurde dokumentiert im Herbst 1987 bei einem Meeting der US-amerikanischen *National Science Foundation* in Washington [140]. Im Jahr 1993 definierte Langer in der Zeitschrift *Science* das Tissue Engineering als „Interdisziplinäres Gebiet, das die Prinzipien der Ingenieurs- und Biowissenschaften anwendet zur Entwicklung biologischer Ersatzmaterialien, die die Funktion eines Gewebes oder eines ganzen Organes wiederherstellen, aufrechterhalten oder verbessern“ [109].

Bei dieser Technik können Zellen *in-vitro* mit Hilfe biokompatibler Trägermaterialien („*scaffolds*“ oder „*Matrices*“) dreidimensional expandiert werden. Als Zelllinien für die Einbringung in die Scaffolds kommen differenzierte Zellen und adulte oder embryonale Stammzellen aus autologer und allogener Quelle in Betracht. Es existiert eine Vielzahl verschiedener *Matrices* aus biologischem und synthetischem Material. Diese können mit biologisch aktiven Substanzen wie z.B. Wachstumsfaktoren angereichert werden. Das Zellgerüst wird nach Kultivierung im Labor an der gewünschten Stelle in den Körper transplantiert. Das Potential des Tissue Engineering liegt in der Möglichkeit des biologischen Ersatzes, der Reparatur und/oder Regeneration eines Gewebes oder sogar eines ganzen Organs. Erste Anwendungen am Menschen konnten bereits verzeichnet werden. So berichteten Vacanti und Mitarbeiter 2001 im *New England Journal of Medicine* nach traumatischem Abriss der Endphalanx des Daumens bei einem Patienten vom Ersatz mittels per Tissue Engineering gezüchteten Knochen. Nach Biopsie am Radius wurden Periostzellen neun Wochen *in-vitro* kultiviert und anschließend auf einer Matrix aus porösem Hydroxylapatit wieder in den Körper eingebracht. Histologische Untersuchungen 10 Monate nach der Operation zeigten die Bildung von Lamellenknochen [203]. Andere potentielle Einsatzgebiete von Tissue Engineering liegen in der plastischen Chirurgie, der Therapie von Krebs, Herzinfarkt, Diabetes, gastroenterologischen, urologischen und neurologischen Erkrankungen [81, 185, 212].

Auch in der Therapie von Knorpelschäden bietet das Tissue Engineering neue Ansatzmöglichkeiten. Dabei wurde in experimentellen Studien das Verfahren der Autologen Chondrozyten Implantation von Brittberg dahingehend weiterentwickelt, dass man nun die Zellen nun auf dreidimensionalen Gerüsten unterschiedlicher Art in den Knorpel einbrachte. Als zelluläre Grundlage haben sich autologe Chondrozyten und multipotente Stammzellen durchgesetzt [79, 198, 217]. Zu den klinisch bereits angewendeten Trägermaterialien zählen Kollagene tierischen Ursprungs (Kollagen 1 und 3) als Vlies, Gel oder Membran sowie Hyaluronan und Polymere wie PLLA oder PGLA als Vlies [25, 25, 79, 197]. An Tiermodellen kam man auf diese Weise zu einer Verbesserung des histologischen Bildes der Läsionen [78, 139, 163, 217]. So isolierten Ito et al Chondrozyten aus dem Humeruskopf von Kaninchen und transplantierten sie diesen nach zwei Wochen Kulturzeit auf einem Kollagen/PLLA-Netz in artifizielle osteochondrale Defekte von vier Millimeter Durchmesser. In der histologischen Untersuchung nach vier und zwölf Wochen konnte Knorpelgewebe mit einem hohen Kollagen 2 Anteil nachgewiesen werden [96]. Auch die am Menschen bereits routinemäßig angewendete *Matrix-induced Chondrocyte Implantation (MACI)* zeigt zwar gute klinische Resultate, die Frage nach der Langzeitstabilität des gebildeten Ersatzgewebes bleibt jedoch offen [14, 17, 224]. Zudem konnte in keiner der Studien die Bildung von genuinem hyalinem Knorpel nachgewiesen werden.

Eine sinnvolle Ergänzung des Prinzips des Tissue Engineering liegt in der Kombination mit der Gentherapie [104]. Die Rationale dieser Verbindung besteht im Transfer von mit einem therapeutischen Gen manipulierten Zellen in den Bereich eines Gewebedefektes. Diese können dann vor Ort durch kontinuierliche Expression des Transgens die Heilung vorantrieben. Eine potentielle Einsatzmöglichkeit in der Heilung von Knorpeldefekten besteht in der Einschleusung von Genen, die für katabole Proteine des Knorpelstoffwechsels kodieren, wie z.B. Wachstumsfaktoren.

2.5 Gentherapie:

Die Gentherapie steht für die Alternierung der genetischen Information einer Zelle durch gezieltes Einbringen eines fremden Gens [43]. Hierdurch können defekte Gene ersetzt werden bzw. den Zellen eine neue Funktion verliehen werden. Somit eröffnet die Gentherapie neue Behandlungsmöglichkeiten für Erb- und auch für erworbene Krankheiten. Dazu zählen gehören monogene Störungen wie z.B. die Mukoviszidose aber auch polygene Erkrankungen wie die Koronare Herzkrankheit, neurologische und autoimmune Krankheiten sowie nicht zuletzt auch Krebs [58]. Das gemeinsame Ziel aller genterapeutischer Methoden ist die stabile Expression eines Transgenes in einem Zielgewebe für den benötigten Zeitraum, um so eine Heilung zu erreichen.

Die Gentherapie teilt sich in die zwei Kategorien *in-vivo* und *ex-vivo* auf. Unter ersterem versteht man das Einbringen von Vektoren für den Gentransfer direkt in den Körper, z.B. durch Injektion eines an einen Adenovirus gekoppelten Wachstumsfaktorgens [18, 65]. Bei der *ex-vivo* Methode werden dem Organismus entnommene Zellen im Labor genetisch verändert, um dann wieder in den Körper eingebracht zu werden. Bei beiden Methoden muss das Gen auf dem Weg in den Zellkern sowohl die Plasmamembran als auch die Kernmembran überwinden. Um dies zu ermöglichen existieren verschiedene Praktiken. Trägermoleküle, die das Transgen beinhalten und bei der Aufnahme in die Zielzelle behilflich sind nennt man Vektoren. Man unterscheidet hier grundsätzlich zwischen *nicht-viralen* und *viralen* Vektoren.

2.5.1 Non-virale Methoden:

Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA mittels non-viraler Methoden in eukaryotische Zielzellen. Sie stellt eine einfache und vor allem sichere Technik des Gentransfers dar. Dank der Möglichkeit, das Transgen relativ leicht in großem Umfang zu produzieren und der geringen Immunogenität und Toxizität sind non-virale Vektoren beliebte Hilfsmittel der Gentherapie. Des Weiteren zeichnen sie sich durch eine geringe onkogene Potenz aus [116].

Das einfachste non-virale Verfahren bedient sich so genannter nackter DNA für den Gentransfer in die Zielzelle. So konnte jedoch nur eine geringe Transfektionsrate und eine kurzzeitige Expression des Transgens erreicht werden [146]. Deswegen suchte man nach Möglichkeiten, den Transfer über die Zellmembranen zu erleichtern. Die *Elektroporation* nutzt elektrische Impulse, um die Permeabilität der Membran temporär zu erhöhen [71]. Bei der „gene-gun“- Technik wird die DNA an kleine Goldpartikel gebunden und dann mit Hilfe von verdichteten Helium unter großem Druck mit hoher Geschwindigkeit in die Zelle geschossen [107]. Spezielle kationische Liposomenanordnungen (z.B. Lipofectamin®) binden die negativ geladene DNA in einem Komplex und können sie so in das Innere der Zelle penetrieren lassen [121]. Der gemeinsame Nachteil all dieser nicht-viralen Verfahren ist jedoch die damit erzielbare geringe Transfektionsrate [58, 67, 159]. Diese macht einen zeitaufwändigen Selektionsschritt vor der Reimplantation der Zellen unumgänglich. Aus diesem Grund wurden in Rahmen dieser Arbeit ausschließlich virale Vektoren eingesetzt.

2.5.2 Virale Methoden:

Für den viralen Gentransfer werden Vektoren auf der Basis von Adenoviren, adeno-assoziierten Viren (AAV), Lentiviren, Herpes-Simplex-Viren und Retroviren eingesetzt [161]. Die Effizienz des Gentransfers ist auf diese Weise höher als bei den non-viralen Methoden. Man muss die Viren jedoch genetisch so verändern, dass sie keine Gefahr mehr für den Organismus darstellen. Dies erreicht man bis zu einem gewissen Grad durch Deletion der viralen Gene für die Replikation und Infektion. An Stelle dieser Gene kann dann z.B. ein therapeutisches Gen eingebracht werden. Für die Herstellung einer großen Zahl von Viren, wie es für die Gentherapie nötig ist, braucht man nun eine so genannte Verpackungszelllinie (KB-, HeLa, HEK-, oder 293T-Zellen). Diese enthalten die Gene gag, pol und env (Helfergenom), jedoch ohne die Verpackungssequenz Ψ . Das Plasmid des retroviralen Vektors enthält mindestens das Transgen, die 5'- und 3'-LTRs und Ψ , ist jedoch dahingehend modifiziert, dass die für die Replikation benötigten Gene gag, pol und env deletiert sind. Nach transienter Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem Plasmid werden von diesem Transkripte hergestellt, die sowohl translatiert als auch als genomische RNA in neue Virionen

verpackt werden. Diese werden von der Verpackungszelllinie abgegeben und können die Zielzelle einmalig infizieren, sind aber replikationsinkompetent.

In dieser Arbeit erfolgte der Gentransfer mittels eines modifizierten Retrovirus.

2.5.3 Nachweis des Transgens mit Hilfe von Reporter Genen

Die Kontrolle des Gentransfers in die Zielzelle erfolgt durch Reportergene, die in die Zellen eingebracht werden. Diese Markergene kodieren für Enzyme, deren Produkte nachgewiesen werden können oder für ein Protein, welches detektiert wird. Es wurden verschiedene Reportersysteme entwickelt, die sich dadurch auszeichnen müssen, dass sie physiologisch nicht in der Zelle vorhanden, einfach und sensitiv nachzuweisen sowie nicht toxisch sind [155]. Dazu zählen die *Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)*, die *Leuchtkäfer-Luziferase (Luc)*, die *β -Galactosidase (LacZ)* und das *Green Fluorescent Protein (GFP)* [9]. In dieser Arbeit wurden *lacZ* und *eGFP* als Markergene verwendet, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

Das *lacZ*-Gen von *Escherichia coli (E.coli)* kodiert für das Enzym β -Galactosidase. Dieses Enzym kann durch Zugabe verschiedener Substrate nachgewiesen werden. Bei der 1963 von Pearson entwickelten *X-Gal-Färbung* entsteht nach Spaltung eines farblosen Substrates (5-Brom-4-Chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid) ein dunkelblauer Farbstoff. Somit können infizierte Zellen angefärbt und histochemisch nachgewiesen werden [150]. Mit Hilfe der X-Gal-Färbung kann die Lokalisation transgener Zellen auch *in-vivo* nachgewiesen werden. Die Stabilität des Farbstoffes erlaubt den Nachweis der Genexpression auch in histologischen Gelenkpräparaten. Die ursprüngliche Form des *lacZ* führt zu einer Anfärbung des Zellplasmas in der X-Gal-Färbung. Durch Co-Transduktion einer kurzen Signalsequenz des Simian Virus 40 (SV 40), der *nuclear leading sequence (nls)*, können Zellen mit einer großen Kern-Plasma-Relation wie z.B. Chondrozyten besser markiert werden [22]. Eine weitere Nachweismethode der β -Galactosidase ist die Messung mittels *Fluorescein-di- β -D-galactopyranosid (FDG)* im Durchflusszytometer. Hier kann durch Entwicklung eines fluoreszierenden Produktes mittels *Fluorescence-Activated Cell Sorting* die Transduktionseffizienz des Gentransfers bestimmt werden [144]. Ein mögliches Problem beim Nachweis mit *lacZ*

kann das Vorhandensein endogener Galactosidasen in bestimmten Zelltypen darstellen [169].

Das *Green Fluorescent Protein (GFP)* kann ohne Zugabe eines Substrates direkt im Fluoreszenzmikroskop, UV-Licht oder der Durchflusszytometrie nachgewiesen und quantifiziert werden [166]. Es handelt sich um ein aus der Qualle *Aequorea Victoria* gewonnenes Protein, das nach Anregung durch UV-Licht grünes Licht ($\lambda=509\text{nm}$) emittiert [100]. Zwar ist es in hoher Konzentration toxisch, jedoch zeigt die Verwendung *GFP*-exprimierender transgener Tiere die gute Verträglichkeit dieses Reportergens. [39, 113]. Die Fluoreszenz des *Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP)* ist durch genetische Modifikation der Fluorophorregion um das 35fache höher als die des *GFP* [222], was einen sensitiveren Transgennachweis ermöglicht als *lacZ*. Ein möglicher Nachteil von *GFP/eGFP* ist die Gefahr der Akkumulation in der Zelle, die durch die hohe Halbwertszeit von mehr als 24h bedingt ist. Dies kann unter Umständen zu Maskierung von Expressionsveränderungen führen [39]. Des Weiteren ist der Anwendungsbereich von *GFP/eGFP* durch die *in-vivo* schlecht nachzuweisende Fluoreszenz eingeschränkt.

2.5.4 Retroviren

2.5.4.1 Grundlagen

Retroviren wurden erstmals 1911 von Rous an Hühnern beschrieben (Rous-Sarkom-Viren). Sie sind Mitglied der Familie der Retroviridae und besitzen als einzige RNA-Viren onkogenes Potential. Sie werden nach morphologischen Kriterien in die Subfamilien Spumavirinae, Oncovirinae und Lentivirinae eingeteilt. Von Letzteren verspricht man sich eine klinische Zukunft durch ihre Fähigkeit auch sich nicht teilende Zellen zu infizieren, bei sonst mit Retroviren vergleichbaren Eigenschaften [99, 164]. Retroviren sind im Tierreich weit verbreitet. Sie konnten in Bandwürmern, Insekten, Fischen, Reptilien, Vögeln und Säugern nachgewiesen werden. Als erstes menschliches Retrovirus wurde 1980 HTLV 1 (Human T-cell Lymphotropic Virus Typ 1) von Robert Gallo isoliert. Heute sind vier humane Retroviren bekannt: HTLV 1 und 2 sowie Humanes Immundefizienz Virus 1 und 2 (HIV 1 und HIV 2). Retroviren verursachen

Leukämien, Lymphome, Sarkome und andere Tumoren mesodermaler Herkunft (Mamma, Leber, Niere) sowie Autoimmunkrankheiten und Immundepression (z.B. AIDS).

In klinischen Studien sind retrovirale Vektoren die bislang am häufigsten verwendeten Vektoren [80]. Retroviren sind behüllte, kugelförmige einzelsträngige (+) RNA-Viren, die sich nach der Infektion der Wirtszelle mit Hilfe viraler Proteine in das Genom der infizierten Wirtszelle integrieren. Im Verlauf dieses Prozesses muss RNA in DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mittels des viralen Enzyms Reverse Transkriptase, dem die Retroviren Ihren Namen verdanken. Das retrovirale Genom ist einfach aufgebaut. Dadurch fällt es leicht, rekombinante virale Vektor-Partikel, die unfähig zur Replikation sind, zu reproduzieren [165, 178, 178]. In klinischen Studien wurden retrovirale Vektoren bereits zur Krebstherapie, bei monogenen Krankheiten und zur Behandlung von AIDS angewandt [42, 165]. Auch in vitro wurden retrovirale Vektoren zum Transfer von Genen in Knorpelzellen in der Vergangenheit angewandt [52, 101, 115]. Li und Mitarbeiter transferierten die für Wachstumsfaktoren codierenden Gene *TGFβ1*, *Fibroblast Growth Factor 2* und *Platelet-Derived Growth Factor* mit Hilfe retroviraler Vektoren in vitro in Chondrozyten und beobachteten anschließend in der Zellkultur eine gesteigerte Matrixsynthese-Synthese [111].

Der Mehrzahl der retroviralen Vektoren basiert auf dem *Moloney Murine Leukämie Virus*, der die Kernmembran der Wirtszelle nicht aktiv überwinden kann. Deswegen können diese Vektoren nur sich teilende Zellen während der Mitose infizieren. In Folge dessen kann dieser Virus nicht zur direkten Gentherapie an sich nicht mehr teilenden, postmitotischen Zellen, wie z.B. Chondrozyten in vivo, verwendet werden [143]. Weitere Nachteile der Retroviren bestehen im niedrigen maximal zu erreichenden Vektortiter sowie in ihrem onkogenen Potential. Durch Rekombination kann es zur Bildung von replikationskompetenten Retroviren (RCR) kommen, mit der Gefahr der malignen Transformation durch insertionelle Mutagenese. So wurde die Entstehung von T-Zell-Lymphomen in drei von fünf Primaten dokumentiert, die hämatopoetische

Stammzellen erhalten hatten, welche mit RCR-positiven Virusproben kontaminiert waren [49].

Retroviren zeichnen sich jedoch auch durch einige große Vorteile gegenüber anderen Vektorsystemen aus. Diese sind zum einen die sehr gute Transfereffizienz *in-vitro* für eine weites Spektrum proliferierender Zellen und zum anderen Langzeitexpression des Transgens. Diese ist zu erklären mit der Integration in das Genom der Wirtszelle und die konsekutive Weitergabe der Erbinformation an Tochterzellen [101, 135, 206]. Vor allem die Langzeitexpression wurde bisher durch kein anderes Vektorsystem erreicht. Bezüglich der Transduktionseffizienz waren bisher nur Adenoviren in der Lage, gleiche Ergebnisse zu erzielen. Das geringe immunogene und antigene Potential der Retroviren macht sie jedoch neben der Langzeitexpression u.a. den Adenoviren überlegen.

2.5.4.2. Struktur und Infektionszyklus

Die infektiösen Partikel (Virionen) der Retroviren sind im Durchmesser 100-120 nm groß. Sie bestehen aus einem ikosaedrischen Kapsid, das von einer Hüllmembran umgeben ist, sowie einen Kern („Core“) innerhalb des Kapsids. Die Hüllmembran wurde aus der Plasmamembran der Wirtszelle abgeschnürt und ist von den viralen Hüllproteinen durchsetzt. Diese bestehen aus einem Transmembranprotein und einem Glykoprotein, welches an den zellulären Rezeptor bindet. Der Core enthält weitere Proteine sowie zwei identische Kopien Plus-Strang-RNA, welche als Dimer vorliegen [153].

Das Genom der Retroviren besteht aus ca. 50 Genen sowie den daran angehefteten 20-70 Molekülen der Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase). Die Information des infektiösen Virus ist in drei Genen gespeichert: 5'-gag-pol-env-3'. Das *gag*-Gen (gruppenspezifische Antigen) kodiert für die Proteine der inneren Kapsel, das *pol*-Gen für die Reverse Transkriptase, Integrase und die virale Protease und das *env*-Gen für die Hüllproteine. Komplizierte Retroviren enthalten weitere Gene.

Der Infektionszyklus beginnt mit der Adsorption des Virions an die Rezeptoren der Wirtszelle mit Hilfe der Glykoprotein-Untereinheit der Hüllproteine. Nach Membranverschmelzung wird das Virus internalisiert, der Core gelangt ins Cytoplasma. Die einsträngige Virus-RNA wird von der aktivierten Reversen Transkriptase in eine

doppelsträngige cDNA-Zwischenstufe (Provirus) transkribiert. Nach Transport des Cores in den Nucleus vermittelt die virale Integrase die Integration der Provirus-DNA in das zelluläre Genom. Dabei ist der Ort der Integration zufällig und kann prinzipiell in allen Teilen des Genoms liegen, mit einer Häufung in transkriptionell aktiven Bereichen [172]. Der Core kann bei Oncovirinae - anders als bei Lentivirinae - eine intakte Kernmembran nicht passieren, daher ist mitotische Aktivität mit Auflösung der Kernmembran für die erfolgreiche Fortführung des viralen Lebenszyklus erforderlich. Bei der Integration entsteht immer die Abfolge LTR-Gen-LTR. Die beiden identischen Long terminal repeats (LTR) begrenzen das Provirus auf beiden Seiten und beinhalten wichtige Steuerungselemente wie Promotor, Enhancer, und Polyadenylierungssignal. Dazwischen liegen die viralen Gene *gag*, *pol* und *env*. Nach Transkription und Translation durch zelleigene Strukturen entstehen die viralen Proteine als Vorläuferformen (*gag*- und *gag/pol*-Polyproteine) sowie die virale genomische RNA. Das Verpackungssignal Ψ ist im Anschluss verantwortlich für die spezifische Zusammenlagerung von viraler genomischer RNA und den synthetisierten Strukturproteinen. Die entstandenen Komplexe verlassen die Zelle über einen als *Budding* bezeichneten Prozess. Hierbei wird das Kapsid von Bereichen der Plasmamembran umschlossen, in die sich zuvor die viralen Hüllproteine eingelagert hatten. Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt dann durch Protease-vermittelte Spaltung der *gag*-und *gag-env*-Polyproteine [20]. Dieser gesamte Prozess der Virusproduktion scheint die Wirtszelle nicht zu beeinträchtigen [115]. Beobachtungen aus unserem Labor zeigten, dass sowohl ATDC5-Zellen als auch Chondrozyten auch nach der Infektion ihre Funktion und Vitalität beibehielten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Alcian-Blau	Carl Roth KG, Karlsruhe
BMP-2 Immunoessay	Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, USA
Brutschränke	Heraeus HeraCell (Kendro, Hanau)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D-MEM F12 1:1	Gibco, Karlsruhe
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Dulbecco´s PBS (1x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin
Einmal-Kunststoff-Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Costar Corning Inc., New York, USA
FACS-Gerät	FACS-Vantage (Beckton Dickinson, San Jose, USA)
FACS-Röhrchen mit integriertem Zellsieb	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich
Falcon-Röhrchen (15ml, 50ml)	TPP, Schweiz
FDG (Fluo Reporter <i>lacZ</i> Cytometry Kit)	Molecular Probes, Leiden, Holland
Fetales Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Fluoreszenzmikroskop mit integrierter Digitalkamera	Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena) Digitalkamera Aria (Contax, Reading, UK) incl. Axiovision 4.2 Software
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Hydrochlorid	Carl Roth KG, Karlsruhe
Insulin-Transferrin-Natriumselenit	Fa. Gibco, Karlsruhe
Kollagenase A	Roche, Mannheim
Kryoröhrchen	Carl Roth KG, Karlsruhe
Kühlschrank	Siemens

L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Mehr-Felder-Zellkulturplatten (12-Felder, 96-Felder)	TPP, Schweiz
Mikroliter-Pipetten (20µl, 100µl, 1000µl)	Carl Roth KG, Karlsruhe
Mikroskop	Wilovert S (Hund, Wetzlar)
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Photometer	Merck, Darmstadt
Pipette, elektrisch	Pipetboy acu, Integra Biosciences, Fernwald
Pipettenspitzen (20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Sorenson Bioscience, Salt Lake City, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank	Heraeus Herasafe HS12 (Kendro, Hanau)
Trypanblau	Carl Roth KG, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Zellkulturplatten (35 mm, 60 mm) und – flaschen (25 cm ² , 75 cm ³)	TPP, Schweiz
Zentrifuge	Rotixa/A (Hettrich Zentrifugen, Tuttlingen)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Als stabile Zelllinie dienten ATDC5-Zellen der European Collection of Cell Cultures (ECACC). Als zweite Zelllinie wurden primäre Chondrozyten verwendet, gewonnen aus der *trochlea patellaris* von ausgewachsenen Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer (Charles River, Sulzfeld). Die Kaninchen waren zum Zeitpunkt der Entnahme im Durchschnitt zehn Wochen alt und wogen 4,0 kg.

Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter aseptischen Bedingungen in einer sterilen Werkbank mit laminarer Verdrängungsströmung. Die Zellen wurden in Plastikkulturflaschen, Plastikkulturschalen und 12-Feld-Kulturplatten in feuchter Atmosphäre (95% Luft, 5% CO₂, 37°C) im Brutschrank kultiviert. Es wurden sterilisierte Instrumente verwendet sowie auf Keimfreiheit der verwendeten Materialien und eine den sterilen Bedingungen angepasste Arbeitsweise geachtet. Hatten die Zellen eine ausreichende Dichte im Kulturmedium erreicht, erfolgte die Aussaat auf 12-Feld-Kulturplatten bzw. die Zellen wurden für die Langzeit-Versuche gesplittet und erneut auf 60mm-Kulturplatten ausgesät. Zur Überprüfung der Zellviabilität wurden Anfärbungen mit 0,4% Trypanblau durchgeführt. Ein Wechsel des Zellmediums wurde gemäß der Stoffwechselsituation durchgeführt. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Isolierung und Zellkultur von adulten Chondrozyten

Nach steriler Entnahme von vier bis fünf Knorpel-Chips aus dem Knie der Kaninchen (siehe 3.2.2 Knorpelbiopsie) erfolgte eine Zwischenlagerung in Vollmedium. Noch am gleichen Tag wurden die Chips mittels Skalpell in einer 10cm Petrischale mit 10ml PBS mechanisch zerkleinert (1x1mm Chips) und in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 10ml 0,25% Trypsin wurden die Knorpelfragmente 30 min bei 37°C geschüttelt (120 rpm) und der Überstand nach vier Minuten Zentrifugation bei 900 rpm verworfen. Nun wurden 20ml Kollagenase-Lösung (=50mg Kollagenase A in 20ml Vollmedium) zugegeben und 12h bei 37°C geschüttelt (120 rpm). Nach Zentrifugation (4 min, 900 rpm) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5ml Vollmedium

resuspendiert und die Zellen auf 25cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Erreichen von 80% Konfluenz wurden die Zellen auf 60mm-Kulturplatten übersiedelt und jeden fünften Tag im Verhältnis 1:3 gesplittet.

Zellkultur von ATDC5-Zellen

Die sehr schnell proliferierenden ATDC5-Zellen wurden zu 1×10^6 auf 60mm-Zellkulturplatten ausgesät. Unter diesen Bedingungen erreichten sie nach drei Tagen Konfluenz und wurden im Verhältnis 1:4 gesplittet. Danach erfolgte entweder die weitere Kultur auf 60mm- oder 35mm-Platten bzw. die Aussaat auf 12- oder 96-Feld-Kulturplatten (initiale Zelldichte 6×10^4 bzw. 1×10^4) zum Zwecke der Messung der verschiedenen biologischen und chemischen Parameter.

Mediumwechsel der Zellen

Das bei +4°C im Kühlschrank gelagerte Medium sowie das PBS wurden etwa eine Stunde auf Raumtemperatur erwärmt. Das alte Medium wurde bei schräg gehaltener Platte mit Hilfe einer sterilen Glaspipette vom Rand abgesaugt. Anschließend wurde das Zellkulturgefäß ein- bis zweimal mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu beseitigen. Bei den Chondrozyten konnten hiermit im Rahmen des ersten Mediumwechsels auch zusätzlich Zell- und Gewebereste abgesaugt werden. Danach wurde mittels Einmal-Pipette frisches Medium vorsichtig am Rand der Vertiefung der Zellkulturplatte auf die Zellen gegeben.

Splitten der Zellen

Zunächst wurden Zellmedium, PBS und Trypsin/EDTA-Lösung auf Raumtemperatur erwärmt. Daraufhin wurde das Medium wie beim Mediumwechsel aus der Kulturplatte abpipettiert und verworfen sowie die Zellen ein bis zwei Mal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 0,25% Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation bei 37°C für 2-5 Minuten, je nach Adhärenz an den Flaschenboden, wurden die Zellen vom Boden abgelöst (Trypsinmenge je nach Größe 12-well: 0,5ml Trypsin, 35mm: 1 ml Trypsin, 60mm: 3 ml Trypsin). Durch sanftes Beklopfen konnte man den Vorgang beschleunigen. Die Kulturen wurden während der Exposition mit Trypsin ständig unter dem Mikroskop auf Ablösung geprüft, da eine zu lange Trypsin-Einwirkung den Zellen schaden kann. Nach erfolgter Ablösung wurde die Zellsuspension in ein

Zentrifugenröhrchen überführt und die Wirkung von Trypsin und EDTA durch Zugabe von 6 ml Vollmedium abgebrochen. Nach drei Minuten Zentrifugation bei 1000 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in Vollmedium resuspendiert. Nun wurden die Zellen je nach gewünschter Zelldichte gesplittet und mit einer ausreichenden Menge an Zellmedium auf die gewünschten Kulturgefäße ausgesät.

Aussaat der Zellen auf 12-Feld-Kulturplatten

Nach Erwärmung von Zellmedium, PBS und Trypsin/EDTA-Lösung auf Raumtemperatur wurde das alte Medium abpipettiert und verworfen. Nun wurde zwei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation bei 37°C abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Wirkung von Trypsin abgebrochen durch Zugabe von 6ml Zellmedium. Nach Zentrifugation (1000 rpm, 3 min., Raumtemperatur) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet resuspendiert. Nun wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und nach Zugabe von Medium bis zur gewünschten Konzentration die Zellen in der vorgesehenen Anzahl (z.B. 6×10^4) auf 12-Feld-Kulturplatten ausgesät.

Einfrieren der Zellen:

Zunächst wurde die Gefrierlösung aus 50% Vollmedium, 40% FKS, 10% DMSO hergestellt. Die Zellen wurden nun nach ihrer Ablösung und der Abzentrifugation von Trypsin/EDTA (vgl. Arbeitsschritte Splitten der Zellen) in 1ml Gefrierlösung resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt, welches dann zur Gewährleistung einer langsamen und gleichmäßigen Abkühlung zunächst in einer Plastikbox mit Ethanol bei -80°C über Nacht eingefroren wurde. Zur endgültigen Lagerung wurden die Kryoröhrchen schließlich in flüssigem Stickstoff eingebracht.

Auftauen der Zellen:

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigem Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37°C möglichst rasch aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension zusammen mit 4ml des zuvor auf Raumtemperatur erwärmten Vollmediums in Plastikkulturplatten ausgesät. Wegen der möglichen toxischen Wirkung

der in der Gefrierlösung enthaltenen DMSO wurde am ersten Tag nach Wiederauftauen stets ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zusammensetzung des Zellmediums für ATDC5-Zellen:

Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM/F12 1:1 ohne Glutamin, versetzt mit:

- 5% Fötalem Kälberserum (FKS)
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin

Zusammensetzung des Zellmediums für Chondrozyten:

Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM, versetzt mit

- 10% Fötalem Kälberserum (FKS)
- 1% L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin

3.2.2 Knorpelbiopsie

3.2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Tierversuche wurden ausgewachsene (3,5–4 kg Körpergewicht, geschlossene Epiphysenfugen) Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer, bezogen von der Firma Charles River, Sulzfeld, verwendet. Sie wurden durchgeführt im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) am Klinikum rechts der Isar unter der Leitung von Tierärztin Gabriele Wexel (das ZPF gehörte vor 2005 zum Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforchung, als Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie).

Die Haltung der Tiere erfolgte in speziellen Tierhaltungsräumen (Hell/Dunkel-Lichtprogramm mit Dämmerlichtphasen) gemäß den FELASA-Richtlinien unter konventionellen Hygienebedingungen in Einzelkäfigen aus V2A-Stahl. Die Käfige verfügten über einen gelochten Boden, um eine postoperative Überlastung der operierten Gliedmaße zu vermeiden. Als Futter erhielten die Tiere pelletiertes Alleinfuttermittel (ad libitum, Altromin 2123, Altromin GmbH, Lage), Heu, getrocknetes Brot und Möhren, sowie täglich gewechseltes Wasser (ad libitum).

Die Nutzung der Tiere für die beschriebenen Versuche wurde der Regierung von Oberbayern innerhalb eines genehmigungspflichtigen Tierversuchsvorhabens angezeigt.

3.2.2.2 Narkose und postoperative Versorgung

Die Tiere wurden für die Eingriffe nicht nüchtern gehalten. Nach einer kurzen Allgemeinuntersuchung und dem Wiegen wurde eine Kanüle in die Ohrtrandvene gelegt. Es erfolgte die Narkoseeinleitung mit 1% Propofol i.v. (10mg/kg KG) nach Bedarf. Anhand des Muskeltonus ließ sich die Narkosetiefe gut bestimmen. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit 2% Propofol mittels Perfusor (1,5mg/kg KG/min i.v.). Nach der Einleitung erfolgte die Intubation durch einen Endotrachealtubus für die das Tier in Bauchlage mit rekliniertem Kopf positioniert wurde und die Beatmung mit 100% Sauerstoff. Intraoperativ erhielten die Tiere zur Analgesie nach Bedarf Fentanyl-Boli i.v. und als Antibiose Borgal 24% (0,5ml pro Tier, verdünnt mit NaCl auf 2ml i.v.). Die Kontrolle der Vitalparameter erfolgte mittels Kapnographie, Pulsoximetrie und Temperaturmessung. Nach Beendigung der Operation erfolgte nach 5-10minütiger Aufwachphase die Extubation. Postoperativ wurden die Tiere mit Carprofen (4mg/kg KG s.c. alle 24h, drei Tage lang) und Buprenorphin (0,03mg/kg KG s.c. alle 12h, min. zwei Tage lang) analgesiert. Des weiteren erfolgte antibiotische Abdeckung mit Borgal 24% (0,5ml/Tier s.c., verdünnt mit NaCl auf 2ml, alle 24h, min. drei Tage lang).

3.2.2.3 Operationstechnik

Aus dem auf dem Rücken gelagerten Kaninchen wurde aus dem linken Kniegelenk in einer etwa 10minütigen Operation das Knorpelgewebe gewonnen. Unter Vollnarkose wurde das Kniegelenk nach steriler Abdeckung mittels anteromedialer Arthrotomie eröffnet und die Kniescheibe nach lateral luxiert. Aus der *trochlea patellaris* des Femurs, außerhalb der Belastungszonen der tibiofemorale Gelenke, wurden hyaline Knorpelchips steril entnommen. In der Regel wurden mit Hilfe eines Skalpell durch vorsichtiges Schaben drei Knorpelschuppen (ca. 3mm x 3mm) entnommen, was einer Zellzahl von ungefähr 100.000 Knorpelzellen entspricht. Diese konnten im Anschluß zur Anzucht in der Zellkultur aus dem Biopsiematerial isoliert werden (s. 3.2.1 Zellkultur). Die Gelenkkapsel wurde schichtweise mit resorbierbaren

Einzelknopfnähten und die Haut mit Donati-Rückstichnaht verschlossen. Es erfolgte keine postoperative Immobilisation des betroffenen Gelenkes. Das Nahtmaterial wurde am 10. postoperativen Tag entfernt.



Abbildung 6: Operationssitus: Knorpelentnahme aus der Trochlea ossis femoris des Kaninchens

3.2.3 Produktion des retroviralen Vektors und Transduktion der Zielzellen

Der retrovirale Vektor wurde durch transiente Transfektion von 293T Zellen, wie in einer vorangegangenen Arbeit beschrieben, generiert [7]. Als retrovirales Backbone wurden Vektoren basierend auf dem Vektor *bullet* verwendet (freundlicherweise von R. Willemsen, Institut für Immunologie, Rotterdam zur Verfügung gestellt). *bullet* ist ein Derivat des MFG-Vektors. Hierbei handelt es sich um ein auf dem *Mouse Moloney Retrovirus Vektor (MoMLV)* basierendes Genkonstrukt, welches durch eine Deletion in der U3 Region der 3'LTR zu den selbstinaktivierenden Vektoren gehört. Als Transgen wurden *nslacZ (bulletLZ)*, *eGFP (bullet-eGFP)* oder *hBMP2 (bulletBMP2)* verwendet. Als gag-pol-Plasmid wurde pHit60 des MoMLV verwendet. Die Virionen wurden durch VSV.G pseudotypisiert. Durch diese Maßnahme konnte die Infektionsrate im Vergleich zu einem amphotropen Envelope deutlich verbessert werden. Die Generierung replikationskompetenter Viren wurde durch die Verwendung eines selbstinaktivierenden Vektors und eines Mehrplasmidsystems verhindert.

Mittels Calcium Phosphat Präzipitation in die 293T-Zellen wurde die transiente Transfektion der drei oben genannten Plasmide durchgeführt. Hierfür wurden am Vortag der Transfektion die Zellen auf 60mm-Platten ausgesät und 24h später transfiziert. 18 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium durch 5ml neues Medium ersetzt und der virushaltige Zellüberstand etwa 40 h nach Transfektion abgenommen. Für die retrovirale Infektion wurde der virushaltige Zellüberstand durch einen 45 µm Filter filtriert und anschließend entweder frisch für eine Infektion verwendet, oder zur Lagerung bei -80 °C tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt für eine Infektion verwendet. Solche gefrorenen Überstände wurden dann in einem 22°C Wasserbad aufgetaut und innerhalb von 60 min verwendet. Für die retrovirale Infektion wurden 250.000 ATDC5-Zellen bzw. Chondrozyten am Vortag auf 60 mm Platten ausgesät. Nach Zusatz von 8 µg Polybrene/ml erfolgte die Transduktion durch Addition von 750µl virushaltigen Überstand zum Zellkulturmedium der Zielzellen. Nach zwei Stunden wurden 4 ml frisches Medium hinzugefügt. Nach 48 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen in Kultur genommen bzw. weiteren Analysen unterzogen. Der retrovirale Vektor wurde freundlicherweise vom Institut für experimentelle Onkologie des Klinikums rechts der Isar, München, zur Verfügung gestellt.

3.2.4 Durchflußzytometrie: FACS-Analyse

Die FACS-Analyse wurde im FACS-Labor des Zentrums für präklinische Forschung (ZPF) von Prof. Dr. med. Gänsbacher durchgeführt.

Zytometrie ist die Messung physikalischer oder chemischer Charakteristika von Zellen. Bei der Durchflußzytometrie werden Messungen an suspendierten Einzelzellen in einem Flüssigkeitsstrom innerhalb eines so genannten „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS) durchgeführt. Mittels FACS-Analyse können Zellcharakteristika wie Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) und die relative Fluoreszenzstärke einer Zelle gemessen werden. Hierfür werden die Einzelzellen an einem Argon-Laserstrahl vorbeigeführt. Dieser wird zum einen durch die Zellen gestreut und liefert so die Werte für die Zellgröße und Granularität. Zum anderen

werden in den Zellen vorhandene Fluorochrome (wie z. B. Fluoreszein und *eGFP*) angeregt und führen zur Emission von Fluoreszenz charakteristischer Wellenlänge. Diese Fluoreszenz wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und dokumentiert. Somit kann das Verhältnis von *eGFP*-positiven Zellen zur Gesamtzahl der Zellen dargestellt werden. Eine Messung umfasste 10 000 bzw. 20 000 im FACS detektierte Ereignisse. Verwendet wurde das Gerät FACS-Vantage der Fa. Beckton Dickinson, San Jose, USA. Die Auswertung erfolgte durch die zugehörige Software Cell Quest Version 3.1f.

Nachweis der *eGFP* Genexpression mittels FACS-Analyse

Zur quantitativen Bestimmung der Effizienz und der Dauerhaftigkeit der retroviralen Transduktion wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe von *bullet* mit dem Gen für *eGFP* (Enhanced Green Fluorescence Protein), einem Fluorochrom bzw. mit *nlslacZ*, einem anderen Markergen transduziert und in Langzeitkultur genommen.

eGFP-Zellen lassen sich mittels Durchflusszytometrie ohne zusätzliche Probenbehandlung analysieren. *eGFP* emittiert nach Anregung durch einen Argon Laser (488 nm Wellenlänge) fluoreszierendes Licht der Wellenlänge $\lambda=509$ nm. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Kanal FL1. Für ATDC5-Zellen wurde der Anteil der *eGFP*-synthetisierenden Zellen an der Gesamtzellzahl mittels FACS nach 0, 3, 6, 9, 12, 15, 26, 32 und 52 Wochen bestimmt.

Für die FACS-Analyse von *nlslacZ* ist ein Zwischenschritt notwendig. Die β -Galactosidase der *nlslacZ*-Zellen überführt das hinzugegebene Substrat fluorescein- β -D-galactopyranosid (FDG) in mehreren Reaktionsschritten in den stark fluoreszierenden Farbstoff Fluoreszein, welcher mit dem FACS-Gerät erfasst werden kann. Die Transduktionsrate wurde bei den *nlslacZ*-Chondrozyten nach 1, 3, 6, 9, 12 und 15 Wochen durch Messung im Messkanal FL1 bestimmt. Bei jeder Messung wurden die jeweiligen nicht-transduzierten Ausgangszelllinien als Negativkontrolle mitgemessen.

Vorbereitung von Zellen für die FACS-Analyse:

a) ATDC5-Zellen:

Zunächst wurden alle Arbeitsschritte gemäß Abschnitt „Splitten der Zellen“ durchgeführt. Im Folgenden wurde der Anteil der Zellsuspension für die Fortführung der Zellkultivierung abgezweigt und der Rest zentrifugiert (1000 rpm, 3 min, RT). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in FACS-Puffer (s. unten) resuspendiert und die Zellsuspension zu je 2 ml auf drei FACS-Zellröhrchen, die über ein integriertes Zellsieb verfügen, verteilt. Die FACS-Röhrchen wurden lichtgeschützt auf Eis gelagert und nach Zugabe von 1,5µM Propidiumiodid zur Vermeidung der Bildung von Zellklumpen wurde zeitnah eine FACS-Analyse durchgeführt.

b) Chondrozyten:

Auch beim *lacZ*-Nachweis wurden die Zellen wie oben beschrieben gesplittet und der Anteil für die Weiterführung der Zellkultur abgezweigt. Das Zellpellet wurde dann in 100 µl FACS-Puffer gelöst und lichtgeschützt auf Eis gelagert. Zuvor wurde die FACS-Lösung vorbereitet: Das bei -20 °C gelagerte fluorescein-β-D-galactopyranosid (FDG), Bestandteil des Fluo Reporter *lacZ* Flow Cytometry Kit, wurde zu Beginn im Wasserbad bei 37°C 10 min erwärmt. FDG wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dann wurden 100 µl FACS-Lösung zu den in Suspension befindlichen *lacZ*-markierten Zellen gegeben und kurz mittels Vortex durchgemischt. Es folgte eine einminütige lichtgeschützte Inkubation bei 37°C im Wasserbad. Die Zwischenlagerung bis zur Analyse erfolgte auch hier lichtgeschützt auf Eis. Das gleiche Prozedere wurde mit nicht-infizierten Zellen als Negativ-Kontrolle durchgeführt. Die Verwendung des FACS-Vantage erfolgte gemäß des FACS-Vantage Reference Manual.

Zusammensetzung des FACS-Puffers:

PBS, versetzt mit

- 4% FKS
- 10 mM HEPES-Puffer, pH 7.2

3.2.5 ELISA zur Bestimmung der BMP2-Konzentration

Die Konzentration von BMP2 im Zellkulturüberstand von ATDC5-Zellen und Chondrozyten wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) bestimmt. Diese funktionieren nach dem Prinzip der double-antibody sandwich Technik.

Es wurden 6×10^4 ATDC5-Zellen bzw. Chondrozyten pro Bohrloch auf 12-Feld-Kulturplatten ausgesät und der Überstand in regelmäßigen Abständen abgenommen. Mediumwechsel erfolgte je nach Stoffwechselsituation jeden Tag bis jeden dritten Tag. Genau 24 Stunden (bei ATDC5-Zellen, 72h bei Chondrozyten) vor Abnahme des Überstandes für die Messung wurde das alte Medium abgesaugt und 1 ml neues Medium hinzugegeben. Nach Abnahme wurde der Überstand in einem 5 ml Tube 10 Minuten bei 10°C und 1000 rpm zentrifugiert. Das zentrifugierte Medium wurde dann nach der Aliquotierung in Eppendorfgefäße bei -80°C gelagert bis zur Durchführung des spezifischen ELISA. Es wurde jeweils eine mit *bulletBMP2* sowie eine mit *bullet-eGFP* infizierte Zelllinie gemessen. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Messung wurde der zuvor gewonnene Überstand auf 96-well Mikroplatten gegeben, die mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern gegen BMP2 ausgekleidet waren. Das im Überstand enthaltene BMP2 band an diese Antikörper und blieb beim darauf folgenden Waschschrift auf der Platte. Nun wurden enzymgebundene gegen den ersten Antikörper gerichtete monoklonale Antikörper zugegeben. Nach erneutem Waschen erfolgte die Zugabe einer Substratlösung, die sich proportional zum enthaltenen BMP2 anfärbt. Nun konnte mit Hilfe eines Photometers und der vom Hersteller mitgelieferten Standardreihe die BMP2-Konzentration quantifiziert werden.

3.2.6 MTT-Assay

Zur Ermittlung der Proliferationsrate der transduzierten Zellen wurde ein MTT-Assay [134] durchgeführt. Das Messprinzip beruht auf der Reduktion des wasserlöslichen gelben Tetrazoliums Salzes MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zum lilafarbenen unlöslichen Formazan durch metabolisch

aktive Zellen. Das Formazan wird anschließend in Lösung gebracht und die optische Dichte kann im Photometer bei 570 nm bestimmt werden. Durch Vergleich mit der Kontrolle kann auf eine erhöhte Proliferationsrate bzw. Apoptose- oder Nekroserate geschlossen werden.

Als Probenmaterial wurden 1×10^4 zuvor mit *bulletBMP2* bzw. *bullet-eGFP* transduzierte ATDC5-Zellen und Chondrozyten auf 96-Loch Mikroplatten ausgesät. Messpunkte waren nach 3, 5, 7 und 14 Tagen. Der MTT-Assay wurde 48h nach Aussaat nach Protokoll des Herstellers (Vybrant®, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) durchgeführt.

3.2.7 Alzianblau-Färbung

Zur Bestimmung des Proteoglykan-Gehalts der Zellmatrix wurden je 6×10^4 ATDC5-Zellen bzw. Chondrozyten auf 12-Feld-Kulturplatten ausgesät. Nach 3, 7, (10), 14, (17), 20, 24 und 28 Tagen wurde nach Fixation mit Guanidine-HCl eine Alzianblau-Färbung durchgeführt. Es wurden jeweils drei Felder mit Wildtyp, *bulletBMP2*-Zellen und *bullet-eGFP*-Zellen verwendet. Eine zusätzliche Kontrolle bildeten nicht-transduzierte Zellen, deren Kulturmedium mit Insulin/Transferrin/Natriumselenit (5µg/ml, 5 µg/ml, 5ng/ml) versetzt wurde.

Protokoll Alzianblau-Färbung:

Zellmedium und PBS wurden auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Abnahme und Verwerfen des gebrauchten Mediums wurden die Zellen zwei Mal mit 1ml PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 300µl 5% Paraformaldehyd fixiert. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen zwei Mal mit 1ml PBS gewaschen, danach wurde die Färbung mit 200µl Alzianblau (0,1% in 0,1N HCl) durchgeführt. Nach 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Alzianblau abpipettiert und es erfolgten erneut drei Waschschrte mit 1ml PBS. Nun wurde der verbliebene Farbstoff mit 200µl 6M Guanidine HCl herausgelöst. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die entstandene Lösung in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und bis zur Messung im Kühlschrank bei 4°C zwischengelagert. Zur Auswertung wurde die Lösung auf eine 96-Feld-Platte

aufgetragen und die Extinktion bei 620nm photometrisch erfasst. Die Ergebnisse wurden auf das DNA-Level der Zellen normalisiert (siehe 2.2.8).

Zusammensetzung der Alcian-Blau-Färbelösung:

0,1% Alcian-Blau

99,9% 0,1N HCL

3.2.8 Ermittlung der DNA-Masse

Zum Zwecke der Normalisierung wurden die Ergebnisse der Alcianblau-Färbung auf die Masse der in den Zellen enthaltenen DNA bezogen. Hierzu wurde die DNA-Masse von Wildtyp, bulletEGFP und bullet BMP2 Zellen mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Deutschland) bestimmt und als Divisor bei der Normalisierung des Proteoglykangehalts der Zellen verwendet.

3.2.9 Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Als Marker für den Effekt von BMP2 auf die Zielzellen wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase erfasst. Die AP katalysiert die chemische Reaktion von 4-Nitrophenylphosphat mit Wasser zu Phosphat und 4-Nitrophenolat. Die Geschwindigkeit der 4-Nitrophenolat-Zunahme wird photometrisch erfasst und ist der AP-Aktivität im Probenmaterial direkt proportional.

Die Messung erfolgte im Kulturüberstand von retroviral mit *BMP2* bzw. *eGFP* transduzierten ATDC5-Zellen und Chondrozyten, die zu 6×10^4 auf 12-Feld-Kulturplatten ausgesät worden waren. An den Tagen 4, 7, 10, 13 und 20 bzw. 6, 10, 16 und 22 wurde die Aktivität der AP gemäß dem Protokoll des Herstellers (Ecoline 25, Alkalische Phosphatase, Merck, Darmstadt) gemessen. Dazu wurden 20 µl Überstand mit 1000 µl Substratlösung (s.u.) für 30 Minuten inkubiert und die Steigerung der Extinktion (E) bei 405nm alle 3 Minuten protokolliert. Für die Berechnung der Extinktion wurde dann die höchste in 30 min erfasste Extinktionsänderung herangezogen. Die Berechnung der Enzymaktivität A erfolgte an Hand der Formel A

$$(U/l) = (\Delta E/\text{min}) \times 2754$$

Zusammensetzung der Substratlösung

0,1 M Diethanolamin-HCl-Puffer, pH 9,8

1 mM Magnesiumchlorid

10 mg/ml 4-Nitrophenylphosphat

4 Ergebnisse:

4.1 Effektive und stabile Gentransduktion von Markergenen mit Hilfe des retroviralen Vektors *bullet*

Ein effizienter und stabiler Transfer von therapeutischen Genen in die Zielzellen ist Voraussetzung für erfolgreiche Gentherapie. Um die Effizienz und Langzeitstabilität des VSV.G pseudotypisierten Vektors *bullet* zu überprüfen wurden die Markergene *nls-lacZ* und *Enhanced Fluorescent Protein (eGFP)* verwendet.

Zunächst wurde das retrovirale Vektorsystem an ATDC5-Zellen ausgetestet. Hierbei handelt es sich um Teratokarzinomzellen der SV129-Maus, die unter Einfluß von Insulin oder Wachstumsfaktoren wie z.B. *BMP2* eine chondrogene Differenzierung annehmen. ATDC5-Zellen wurden mit *bullet-eGFP* infiziert. Nach Transduktion wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hier zeigte sich bei den *bullet-eGFP*-Zellen eine klar zu erkennende Emission grünen Lichtes (Abbildung 7), während bei den nicht-transduzierten Kontrollzellen keine Fluoreszenz zu sehen war.

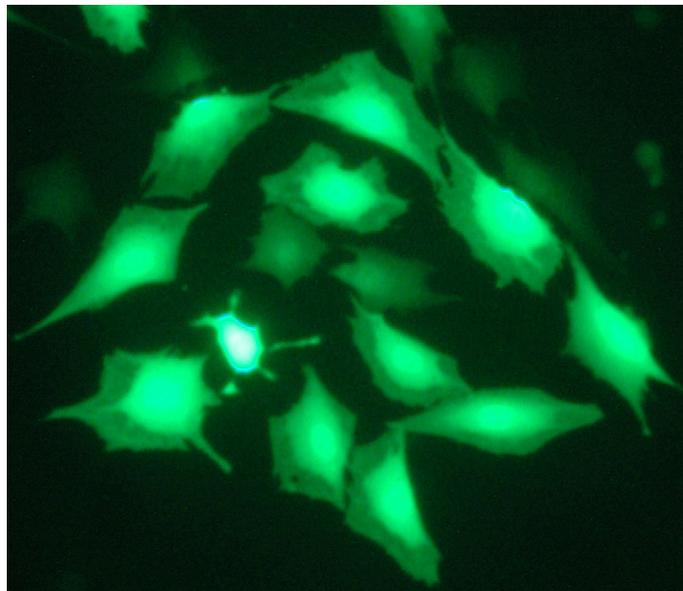


Abbildung 7: Durchführbarkeit des retroviralen Gentransfers an ATDC5-Zellen

ATDC5-Zellen wurden mit *bullet-eGFP* transduziert. Daraufhin wurden die Zellen zur Sicherstellung einer erfolgreichen Transduktion unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Im Ausschnitt mit 100facher Vergrößerung ist die durch die Expression von *eGFP* hervorgerufene Fluoreszenz der Zellkörper und vor allem der Zellkerne deutlich zu erkennen.

Zur Quantifizierung der Effizienz des retroviralen Gentransfers wurde nach Transduktion der ATDC5-Zellen mit *eGFP* eine FACS-Analyse vorgenommen. Hierbei kann der Anteil der fluoreszierenden Zellen an der untersuchten Gesamtzahl bestimmt werden. Der Anteil dieser Zellen entspricht dem Anteil der transduzierten Zellen. Es zeigte sich im Messkanal FL1 bei über 95% der *bullet-eGFP*-Zellen eine deutlich erhöhte Signalstärke. Die nicht-transduzierten Kontrollzellen blieben fast ausnahmslos im untersten Bereich der Signalintensität (Abbildung 8).

Die durchschnittliche initiale Transduktionsrate für den Gentransfer mit *bullet* betrug bei ATDC5-Zellen 98,3% (n=3, SD \pm 0,6%).

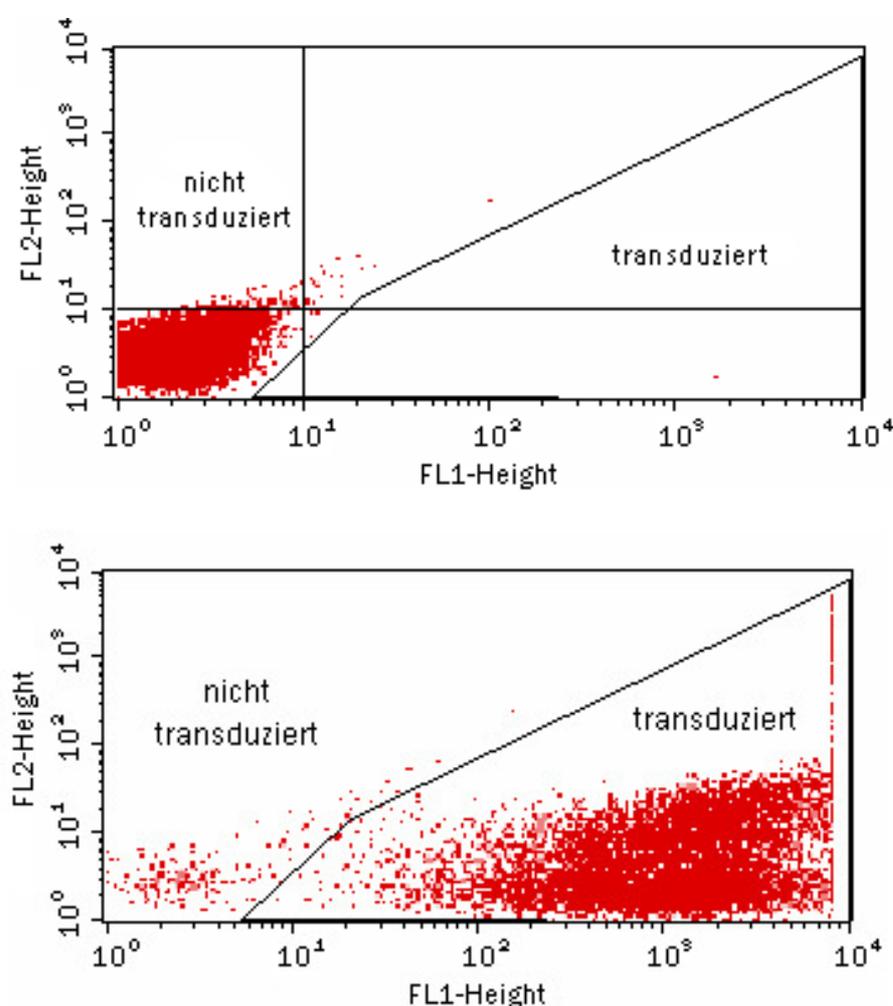


Abbildung 8: Effektivität des retroviralen Vektors *bullet* bei ATDC5-Zellen

ATDC5-Zellen wurden mit *bullet-eGFP* transduziert. Anschließend wurde zur Quantifizierung der Effizienz des Vektors eine FACS-Analyse durchgeführt. In den Diagrammen ist entlang der Abszisse im Messkanal FL1 die Signalintensität der *eGFP*-Fluoreszenz aufgeführt. Die Abbildung zeigt nicht-transduzierte Kontrollzellen (oben) im Vergleich zu den transduzierten ATDC5-Zellen (unten).

Im Folgenden sollte die Stabilität des retroviralen Gentransfers überprüft werden. Dazu wurden die ATDC5-Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten. „Splitting“ der Zellen und Wiederaussaat auf 75cm²-Kulturflaschen erfolgte kurz vor Erreichen von Konfluenz. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen einer FACS-Analyse unterzogen. Es zeigte sich im gesamten Zeitverlauf eine im Vergleich zum Anfang nahezu unverändert hohe *eGFP*-Expression der *bullet-eGFP*-Zellen. Die nicht-transduzierten Kontrollzellen blieben mit ihrer Signalstärke weiterhin im basalen Bereich. Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der FACS-Analyse nach 52 Wochen Kulturzeit. In Abbildung 10 wird die im Zeitverlauf über 52 Wochen konstant hohe *eGFP*-Expression demonstriert.

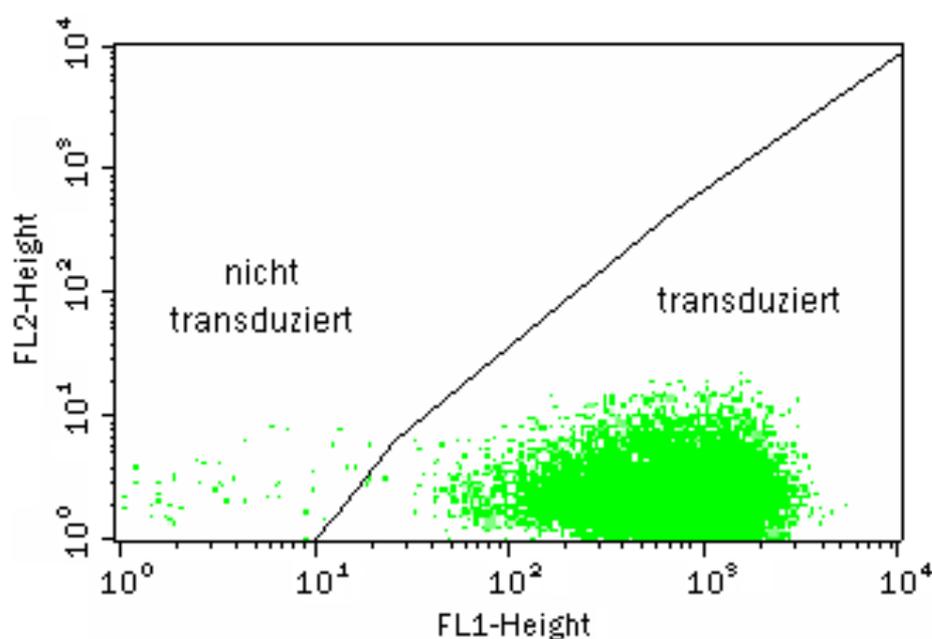


Abbildung 9: Stabile *eGFP*-Expression in ATDC5-Zellen nach Transduktion mit *bullet-eGFP*

ATDC5-Zellen wurden nach retroviraler Transduktion mit *bullet-eGFP* über insgesamt ein Jahr in Kultur gehalten. Die Expression des Markergens war im Verlauf sehr konstant. Die Abbildung zeigt die FACS-Analyse der retroviral transduzierten ATDC5-Zellen nach 52 Wochen Kulturzeit. *eGFP*-positive Zellen kommen rechts auf der Abszisse zu liegen. Der Anteil der *eGFP*-positiven Zellen nach 52 Wochen war 94,7% (n=3, Mittelwert \pm 0,6% Standardabweichung).

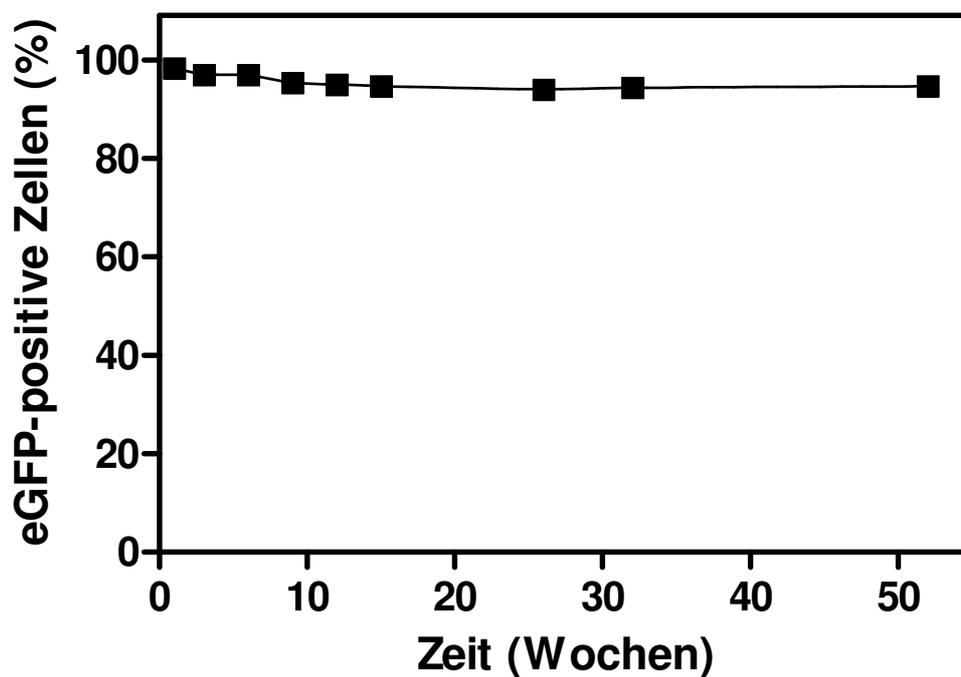


Abbildung 10: Zeitverlauf der *eGFP*-Expression in ATDC5-Zellen

ATDC5-Zellen wurden nach Transduktion mit *bullet-eGFP* über insgesamt ein Jahr in Kultur gehalten. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde eine FACS-Analyse zur Überprüfung der Stabilität der Genexpression durchgeführt. Die Abbildung zeigt den Zeitverlauf der detektierten *eGFP*-positiven Zellen mit Messpunkten bei 0, 3, 6, 9, 12, 15, 26, 32 und 52 Wochen (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$).

Als Nächstes sollte die Effizienz und Dauerhaftigkeit des retroviralen Vektorsystems an nativen Chondrozyten bestätigt werden. Knorpelmaterial wurde durch Biopsie aus Kaninchenknien gewonnen. Nach enzymatischem Abbau der umgebenden Matrix wurden die Zellen in Kultur gebracht und durch *bulletLZ* mit dem Reportergen *nls-lacZ* infiziert. Die Transduktionseffizienz von *bulletLZ* wurde nach Zugabe von FDG wiederum zu bestimmten Zeitpunkten mit FACS-Analyse quantifiziert. Im Messkanal FL1 ergab sich bei den transduzierten Zellen eine ausgeprägte Signalerhöhung, während die Kontrollzellen kein Signal zeigten. Initial betrug die Rate der *nls-lacZ*-positiven Zellen 92,3% (Standardabweichung $\pm 6,1\%$). Diese war auch nach 15 Wochen mit 75,7% (Standardabweichung $\pm 14,2\%$) noch sehr hoch (Abbildung 12). Nach diesem Zeitpunkt stellten die Zellen ihre mitotische Aktivität ein, weswegen eine längere Betrachtung in der Zellkultur nicht möglich war.

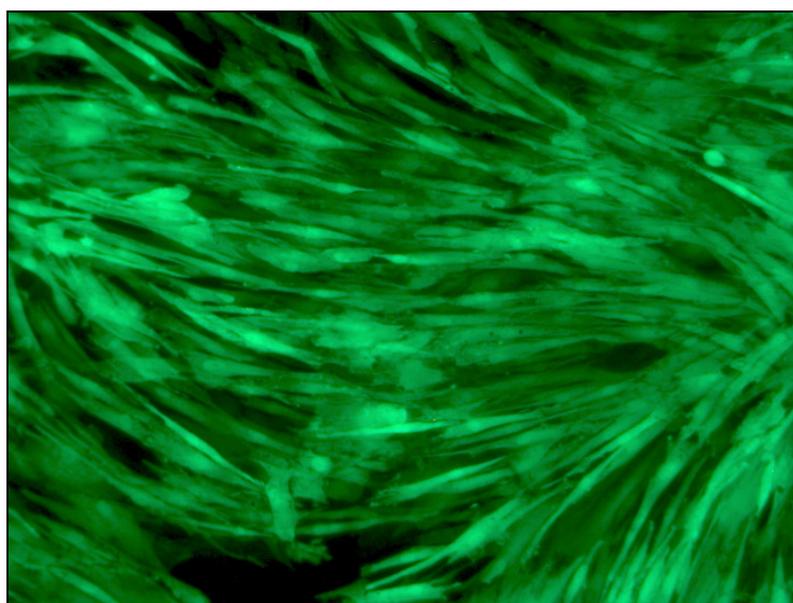


Abbildung 11: Durchführbarkeit des retroviralen Gentransfers an Chondrozyten

Chondrozyten wurden mit *bullet-eGFP* transduziert. Daraufhin wurden die Zellen zur Sicherstellung einer erfolgreichen Transduktion unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Im Ausschnitt mit 100facher Vergrößerung ist die durch die Expression von *eGFP* hervorgerufene Fluoreszenz der Zellen deutlich zu erkennen.

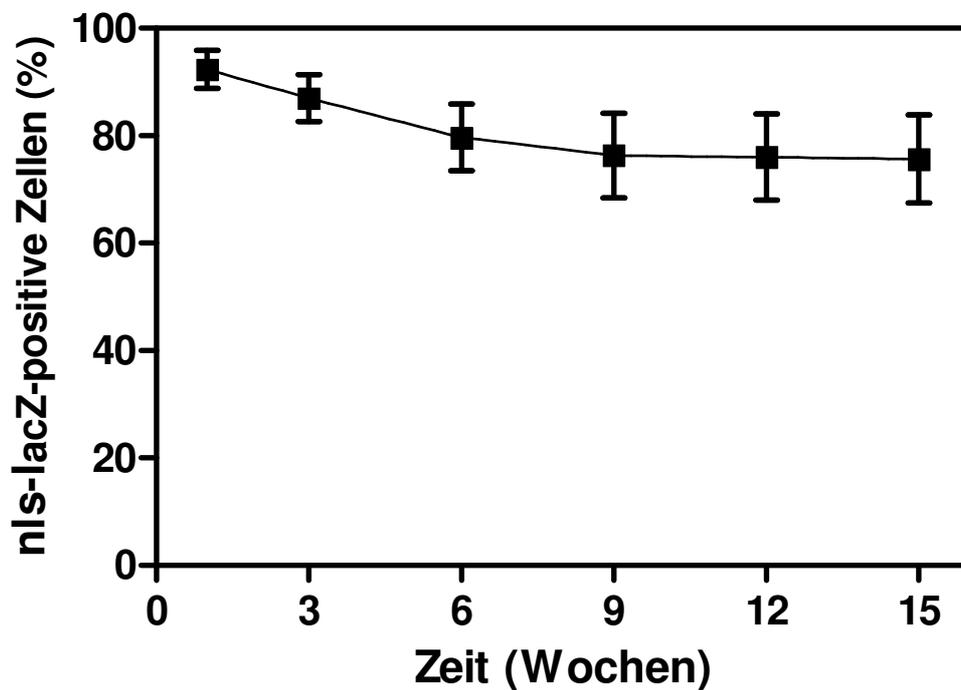


Abbildung 12: Initiale Transduktionsrate und Langzeitstabilität des Gentransfers mit *bulletLZ* in primären Chondrozyten

Chondrozyten wurden aus Kaninchenknien gewonnen und in Zellkultur gebracht. Eine FACS-Analyse mit FDG wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Gezeigt wird der Zeitverlauf der detektierten *eGFP*-positiven Zellen mit Messpunkten bei 0, 3, 6, 9, 12, 15 Wochen (Mittelwert \pm SD, $n=3$).

4.2 Expression von *BMP2*

Nach der erfolgreichen Austestung des retroviralen Vektors mit *nslacZ* und *eGFP* sollte nun die Stabilität der Expression des therapeutischen Gens *BMP2* untersucht werden.

Zu diesem Zwecke wurden ATDC5-Zellen und primäre Chondrozyten nach retroviraler Transduktion mit *bulletBMP2* in Dreifachbestimmung auf 12-Feld-Kulturplatten ausgesät. Mediumwechsel erfolgte für Chondrozyten jeden dritten Tag, bei den schnell wachsenden ATDC5-Zellen jeden Tag. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die *BMP2*-Konzentration im Überstand mit Hilfe eines *BMP2*-Immunoassay bestimmt. In beiden Zelllinien wurde die erfolgreiche Expression des Transgens durch Synthese des Genproduktes deutlich. In ATDC5-Zellen war die *BMP2*-Konzentration mit 100-150 ng/ml höher als in Chondrozyten, bei denen die Spannweite 10-30 ng/ml betrug. Die *BMP2*-Konzentration im Zellkulturüberstand von ATDC5-Zellen zeigte innerhalb der ersten Woche eine Steigerung. Nach Konfluenz der Zellen war sie dann konstant. In adulten Chondrozyten stieg die *BMP2*-Konzentration über einen Zeitraum von 14 Tagen. Danach war kein signifikanter Anstieg mehr festzustellen (Abbildung 13). Bei den mit *bullet-eGFP* transduzierten Kontrollzellen konnte kein *BMP2* im Überstand detektiert werden.

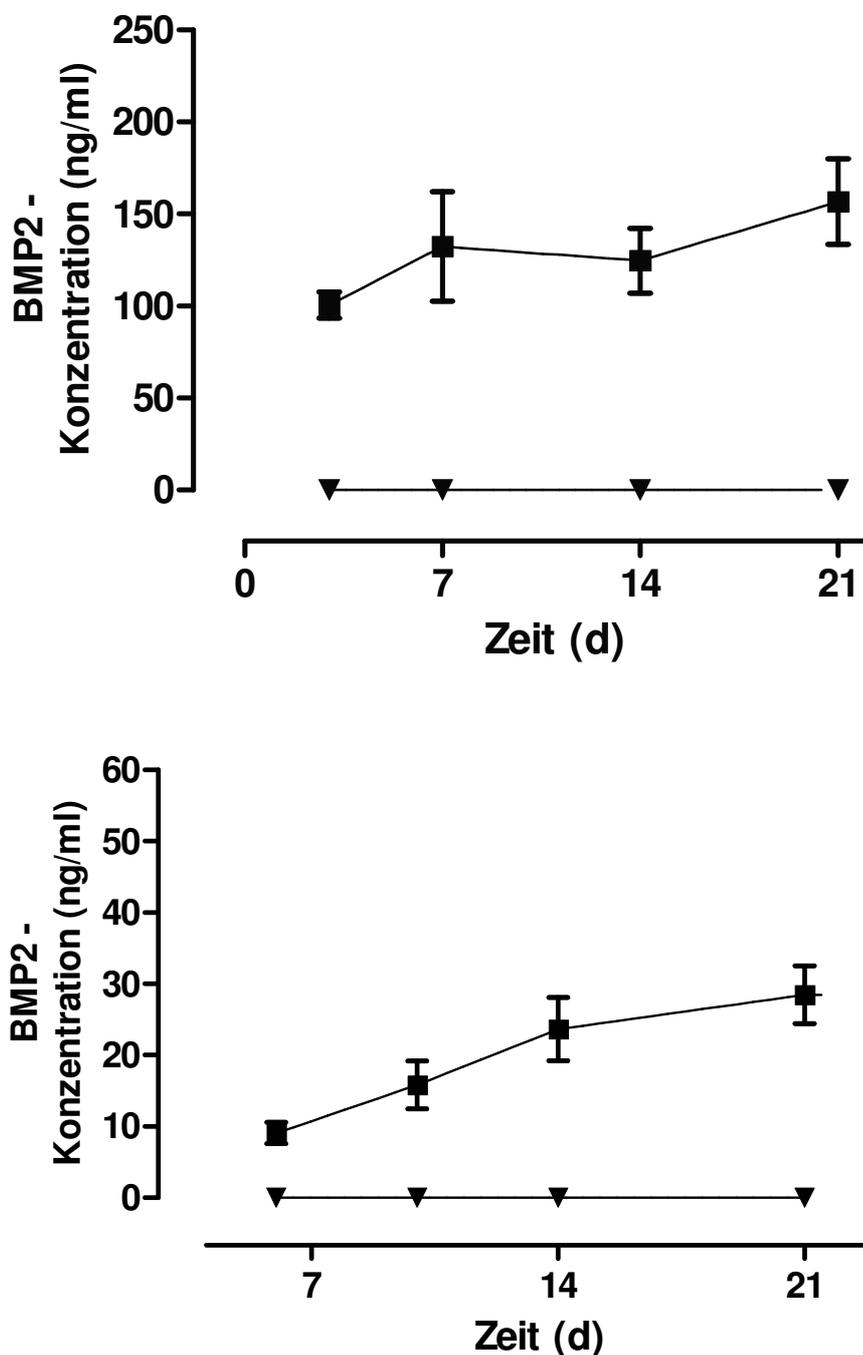


Abbildung 13: BMP2-Bestimmung im Zellkulturüberstand von ATDC5-Zellen (oben) und primären Chondrozyten (unten)

ATDC5-Zellen bzw. adulte Chondrozyten wurden nach vorangegangener retroviraler Transduktion mit *bulletBMP2* in Dreifachbestimmung auf 12-Feldkulturplatten ausgesät. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die BMP2-Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten *bullet-eGFP* Zellen. Die Abbildung zeigt auf der Ordinate die mittlere BMP2-Konzentration in ng/ml aufgetragen gegen die Zeit in Tagen auf der Abszisse (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

4.3 Effekte von *BMP2* auf die Chondrogenese

4.3.1 Zellmorphologie

a) ATDC5-Zellen

ATDC5-Zellen weisen als embryonale Karzinomzellen eine Reihe von Charakteristika von Chondroprogenitorzellen auf. Bei Exposition mit Insulin bilden sie knorpelähnliche Knötchen (Chondrogenese) und zeigen eine sequentielle chondrozytäre Reifung. Aus diesem Grund wurde die Morphologie der Zellen in dieser Arbeit genau beobachtet. ATDC5-Zellen zeigten nach Transduktion mit *bulletBMP2* nach circa 7 Tagen Kulturzeit die typische Formation der knorpelartigen Knötchen. Wildtypzellen und *bullet-eGFP* Zellen zeigten hingegen keine Knötchen. Im Vergleich zu Zellen, deren Kulturmedium mit Insulin-Transferrin-Natriumselenit angereichert wurde, zeigten die *BMP2*-Zellen eine deutlich stärkere Knötchenbildung.

b) Adulte Chondrozyten

Chondrozyten zeigen nach Gewinn aus dem Gelenk und Abbau der umschließenden Matrix in zweidimensionaler Kultur gewöhnlich eine Dedifferenzierung mit Entwicklung eines fibroblastenartigen Phänotyps. Die Zellen erscheinen dann abgeflacht und lang gestreckt mit einer Vielzahl sichtbarer Ausläufer. Diese Dedifferenzierung nimmt im Verlauf mit der Zeit und der Zahl der Zellpassagen zu. Sie erlaubt auf der einen Seite eine schnelle Proliferation der Zellen, wie sie zum Beispiel bei der Autologen Chondrozyten Implantation (ACI) zur Auffüllung des Defektes benötigt wird. Auf der anderen Seite sollte die Proliferation nach einer Weile sistieren, um den Zellen die Möglichkeit zur Redifferenzierung zu geben. Aus diesem Grund wurde neben biochemischen Parametern die Zellmorphologie der Chondrozyten vor und nach Transduktion regelmäßig im Lichtmikroskop kontrolliert.

Die mit *bulletBMP2* transduzierten adulten Chondrozyten zeigten zu Beginn der Kultur eine den Kontrollzellen ähnliche Morphologie. Nach etwa zwei Wochen verloren sie ihren chondrogenen Phänotyp zugunsten eines fibroblastenartigen Aussehens. Nach vier Wochen in Kultur konnte wiederum eine Änderung des Phänotyps festgestellt werden. Die *BMP2*-Zellen erschienen nun chondrozytenartig abgerundet und ohne Ausläufer.

Die Kontrollzellen (Wildtyp, *bullet-eGFP*) blieben hingegen phänotypisch unverändert fibroblastenartig. Abbildung 14 zeigt die typische Zellmorphologie nach vier Wochen Kulturzeit.

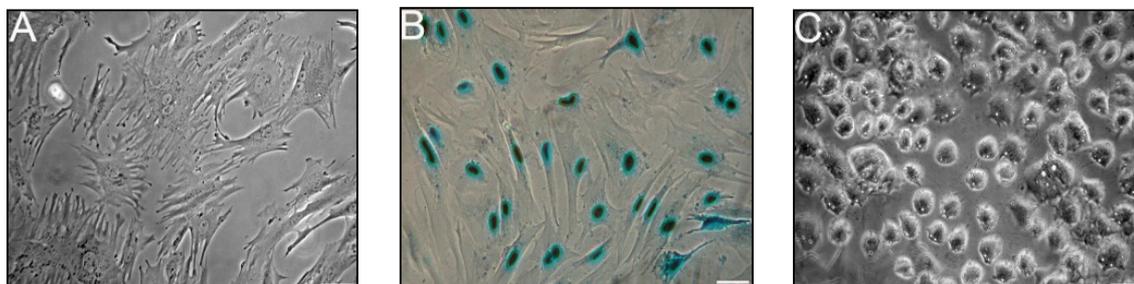


Abbildung 14: Zellmorphologie von Wildtyp (A), *bulletLZ* (B) und *bulletBMP2* (C) Chondrozyten

Adulte Chondrozyten wurden nach Transduktion mit *bulletBMP2* bzw. *bulletLZ* in Kultur genommen und in regelmäßigen Abständen im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die Photographien zeigen die typische Morphologie der Zellen nach vier Wochen Kulturzeit. *BulletLZ* und Wildtypzellen haben eine für Fibroblasten typische Morphologie angenommen, während *bulletBMP2*-Zellen keinen fibroblastenartigen Phänotyp zeigen und abgerundet erscheinen (Lichtmikroskop, Balken entspricht 50µm).

4.3.2 Proliferation

Die Effekte einer konstitutiven Expression des therapeutischen Gens BMP-2 auf die transgenen Zielzellen wurden anhand verschiedener biochemischer Indikatoren überprüft. Zunächst wurde nach Transduktion mit *bulletBMP2* der Einfluss der autokrinen Stimulation der Zellen durch Synthese und Sekretion des Wachstumsfaktors auf die Zellproliferationsrate untersucht. Dazu wurden ATDC5-Zellen und adulte Chondrozyten in Dreifachbestimmung auf 12-Feld-Kulturplatten ausgesät und ein MTT-Assay durchgeführt. Als Kontrolle dienten ATDC5-Zellen bzw. primäre Chondrozyten, die mit *bullet-eGFP* transduziert wurden.

Ein deutlicher Anstieg der Zellzahl konnte für ATDC-Zellen bis Tag 5 und für adulte Chondrozyten bis Tag 7 festgestellt werden (Abbildung 16). Nach diesem Zeitraum zeigte die Proliferationsrate nur noch eine geringe Abweichung von den jeweiligen *bullet-eGFP* Kontrollzellen.

Ein weiteres Indiz für die erhöhte Proliferationsrate und Stoffwechselaktivität der Zellen mit Wachstumsfaktoren ist der erhöhte Verbrauch an Kulturmedium, welcher in sämtlichen Experimenten mit diesen Zellen beobachtet wurde (Abbildung 15). Der Indikator im Medium nimmt in alkalischem Milieu rote Farbe und in saurem Milieu gelbe Farbe an. Bei *rv-BMP2*-Zellen wurde aufgrund des gesteigerten Zellstoffwechsels schneller ein Farbumschlag beobachtet als bei Zellen ohne Wachstumsfaktor.



Abbildung 15: Erhöhte Stoffwechselaktivität von *bulletBMP2* Zellen

Ein im Vergleich zu den Kontrollzellen früherer Farbumschlag des Indikators konnte bei den *BMP2*-Zellen beobachtet werden. Die Abbildung zeigt exemplarisch *ATDC5*-Zellen in einer 12-Feldkulturplatte am 3. Tag nach Mediumwechsel (links: *bullet-eGFP*, rechts: *bulletBMP2*).

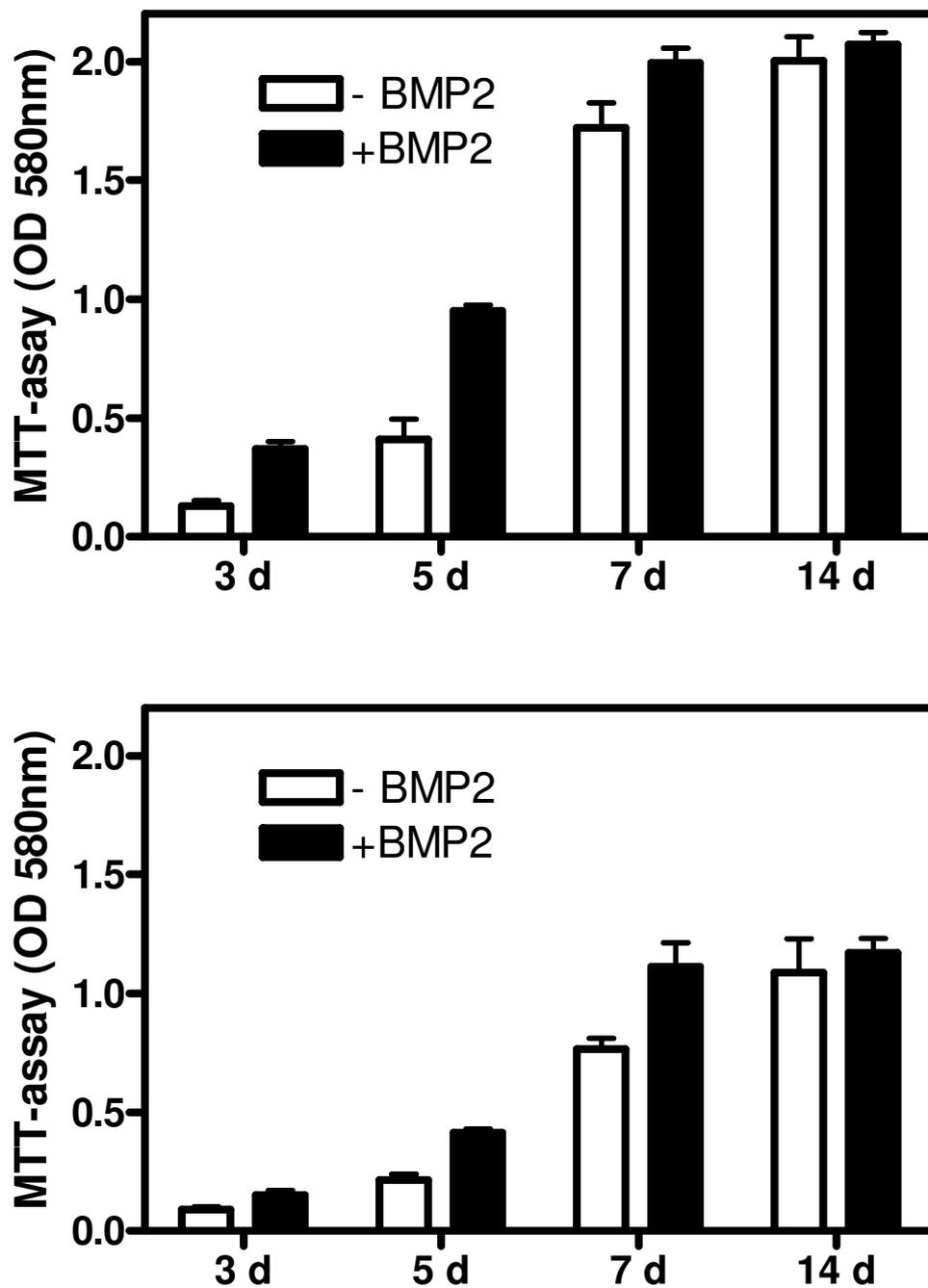


Abbildung 16: MTT-Assay zur Darstellung der Zellproliferationsrate von ATDC5-Zellen (oben) und primären Chondrozyten (unten)

ATDC5-Zellen bzw. Chondrozyten wurden nach retroviraler Infektion mit *bulletBMP2* auf 12-Feld Kulturplatten ausgesät. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde zur Messung der Zellproliferation ein MTT-Assay durchgeführt. Die Ordinate zeigt die mittlere Extinktion bei 580 nm, aufgetragen gegen die Zeit auf der Abszisse (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3).

4.3.3 Proteoglykansynthese

Ein weiterer Indikator für die Wirksamkeit des in die Zelle übertragenen Wachstumsfaktors ist gesteigerte Produktion knorpelspezifischer Matrix. Dies wurde nun an Hand der Messung der Proteoglykandichte des Zellrasens als typische Komponente der extrazellulären Knorpelmatrix studiert. ATDC5-Zellen und native Chondrozyten wurden nach retroviraler Infektion mit *bulletBMP2* bzw. *bullet-eGFP* in Dreifachbestimmung auf 12-Feld-Kulturplatten ausgesät. Zu bestimmten Zeitpunkten erfolgte die Fixation und Alzianblau-Färbung der Zellen. Nach Herauslösen des Farbstoffes mit Guanidine-Salzsäure wurde die Extinktion bei 620 nm photometrisch erfasst und normalisiert auf die DNA-Menge der Zellen. Durch diese Normalisierung sollte eine Überschätzung der Proteoglykansynthese der *BMP2*-Zellen verhindert werden. Diese haben, wie im vorherigen Experiment gezeigt, eine erhöhte Proliferation, was sonst zu einer Verfälschung der Ergebnisse hätte führen können.

Es zeigt sich lediglich an Tag 3 eine annähernd gleiche Proteoglykanmenge bei *BMP2*- und *eGFP*-transduzierten Kontrollzellen. Danach ist über den Zeitraum bis 14 Tage bei ATDC5-Zellen bzw. 24 Tage bei Chondrozyten eine deutlich gesteigerte Proteoglykanproduktion der Zellen mit Wachstumsfaktor festzustellen. Die ATDC5-Zellen verzeichnen hierbei zwischen dem dritten und zehnten Tag einen sehr steilen Anstieg, während dieser bei den Chondrozyten eher gleichmäßig und weniger stark ausfällt. Im Verlauf ergibt sich bei ATDC5-Zellen eine bis zu 7,5fache und für Chondrozyten bis zu 3fache Erhöhung der Menge dieser knorpelspezifischen Glykoproteine, die auch nach 28 Tagen noch stabil ist. Abbildung 17 zeigt den Quotienten des DNA-normalisierten Proteoglykangehalts von *bulletBMP2* versus *bullet-eGFP* Zellen im Zeitverlauf. Abbildung 18 zeigt exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen der Alzianblau-Färbung nach 14 Tagen Zellkultur. Man beobachtet eine deutlich stärkere Indikatoraufnahme in den *BMP2*-Zellen (D) im Vergleich zu den mit 5µg/ml Insulin, 5µg/ml Transferrin und 5ng/ml Natriumselenit behandelten Zellen (B). *EGFP* (C)- und Wildtypzellen (A) zeigen keine Farbanreicherung.

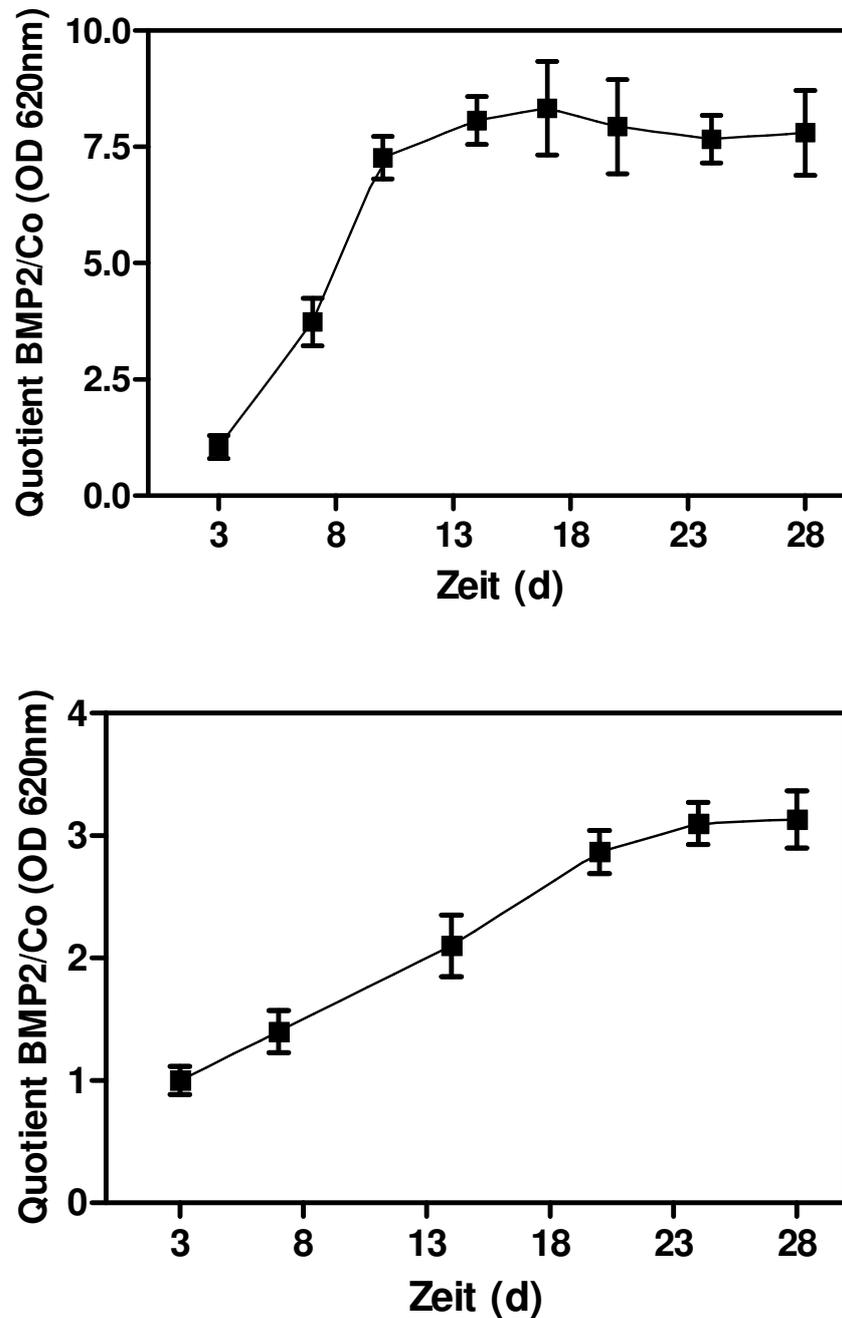


Abbildung 17: Alzianblau-Färbung in ATDC5-Zellen (oben) und Chondrozyten (unten)

Nach retroviraler Transduktion mit *bulletBMP2* bzw. *bullet-eGFP* (Kontrolle) wurden ATDC5-Zellen bzw. primäre Chondrozyten auf 12-Feld Kulturplatten inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde eine Alzianblau-Färbung durchgeführt, um den Proteoglykangehalt zu bestimmen und die DNA-Masse ermittelt. In der Abbildung sind entlang der Abszisse die Zeit in Tagen und entlang der Ordinate das Verhältnis des Proteoglykangehalts von *bulletBMP2* zu *bullet-eGFP* Zellen aufgetragen (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$).

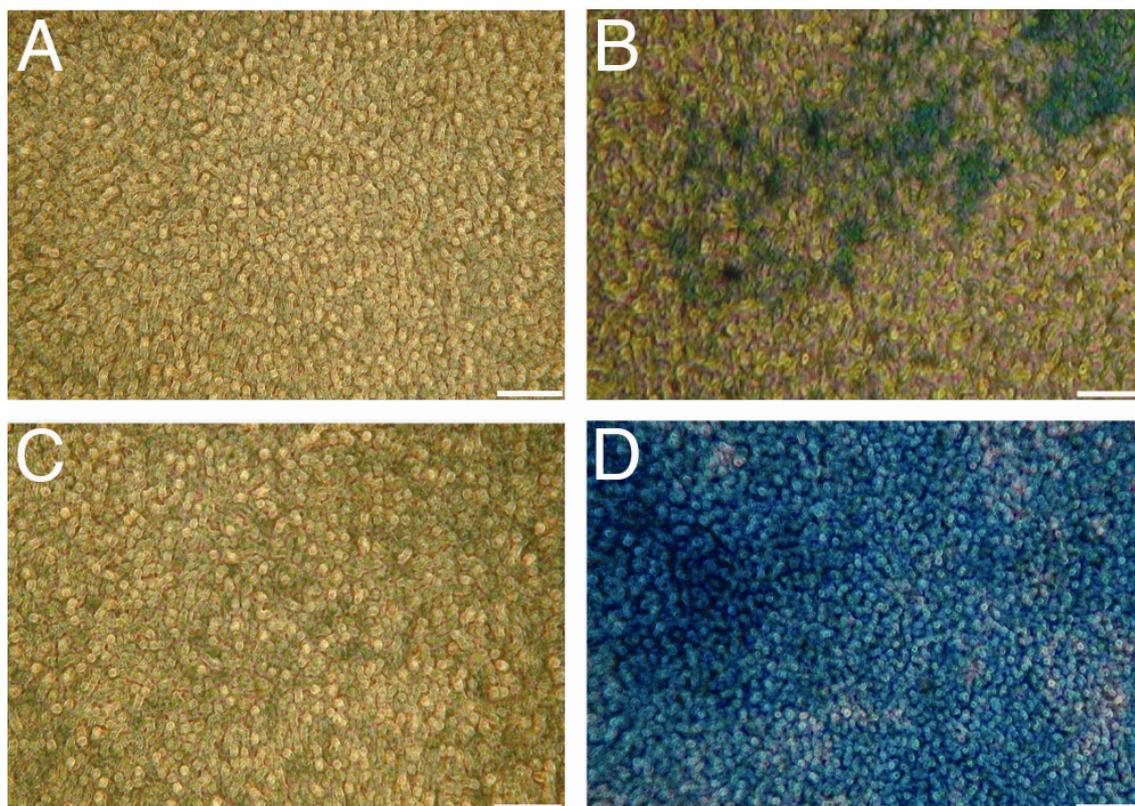


Abbildung 18: Alzianblau Färbung von Wildtyp- (A), Insulin/ Transferrin/ Natriumselenit-behandelten (B), *bullet-eGFP*- (C) und *bulletBMP2*-Zellen.

Nach retroviraler Transduktion mit *bulletBMP2* bzw. *bullet-eGFP* (Kontrolle) wurden ATDC5-Zellen auf 12-Feld Kulturplatten inkubiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Alzianblaufärbung zur Quantifizierung des Proteoglykangehalts der Zellen. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine lichtmikroskopische Aufnahme der Alzianblau-Färbung nach 14 Tagen Kulturzeit (Balken entspricht 100 µm). Es zeigt sich eine starke Anfärbung der Wachstumsfaktorzellen, während die anderen Zellen nur geringe (B) oder keine Anfärbung (A, C) aufweisen.

4.3.4 Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase ist ein anerkannter Marker für osteoblastische Aktivität und hypertrophe Chondrozyten. BMP2 spielt neben seiner Funktion in der Knorpelregeneration auch eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel von Osteoblasten und den Knochenumbau. Deshalb wurde im nächsten Versuchsansatz der Einfluss von *bulletBMP2* auf die Produktion der Alkalischen Phosphatase untersucht. Zu diesem Zwecke wurde die Aktivität des Enzyms in Zellüberständen von ATDC5-Zellen und primären Chondrozyten gemessen. Die Zellen wurden mit *bulletBMP2* transduziert, *bullet-eGFP* Zellen dienten als Kontrolle (Abbildung 19, Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3). Das Zellkulturmedium wurde bei Chondrozyten jeden dritten Tag, bei ATDC5-Zellen täglich erneuert. Die Bestimmung der AP-Aktivität erfolgte jeweils direkt vor dem Mediumwechsel.

Es zeigt sich eine stark erhöhte Aktivität der mit *bulletBMP2* transduzierten Zellen in beiden Zelllinien. Ähnlich der Proteoglykanmenge ist die AP-Aktivität in ATDC5-Zellen nur am ersten Messpunkt an Tag 3 im Bereich der Aktivität der Kontrollzellen. Zwischen Tag 7 und Tag 13 findet sich ein steiler Anstieg, der im folgenden in einem Plateau ausläuft. Dieses liegt um einen Faktor von maximal 11,3 über dem Level der Kontrollzellen.

In Chondrozyten zeigt sich ebenfalls ein steiler Aktivitätsanstieg zwischen Tag 6 und Tag 10. Danach mündet auch diese Kurve in ein Plateau mit maximal 20facher Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle.

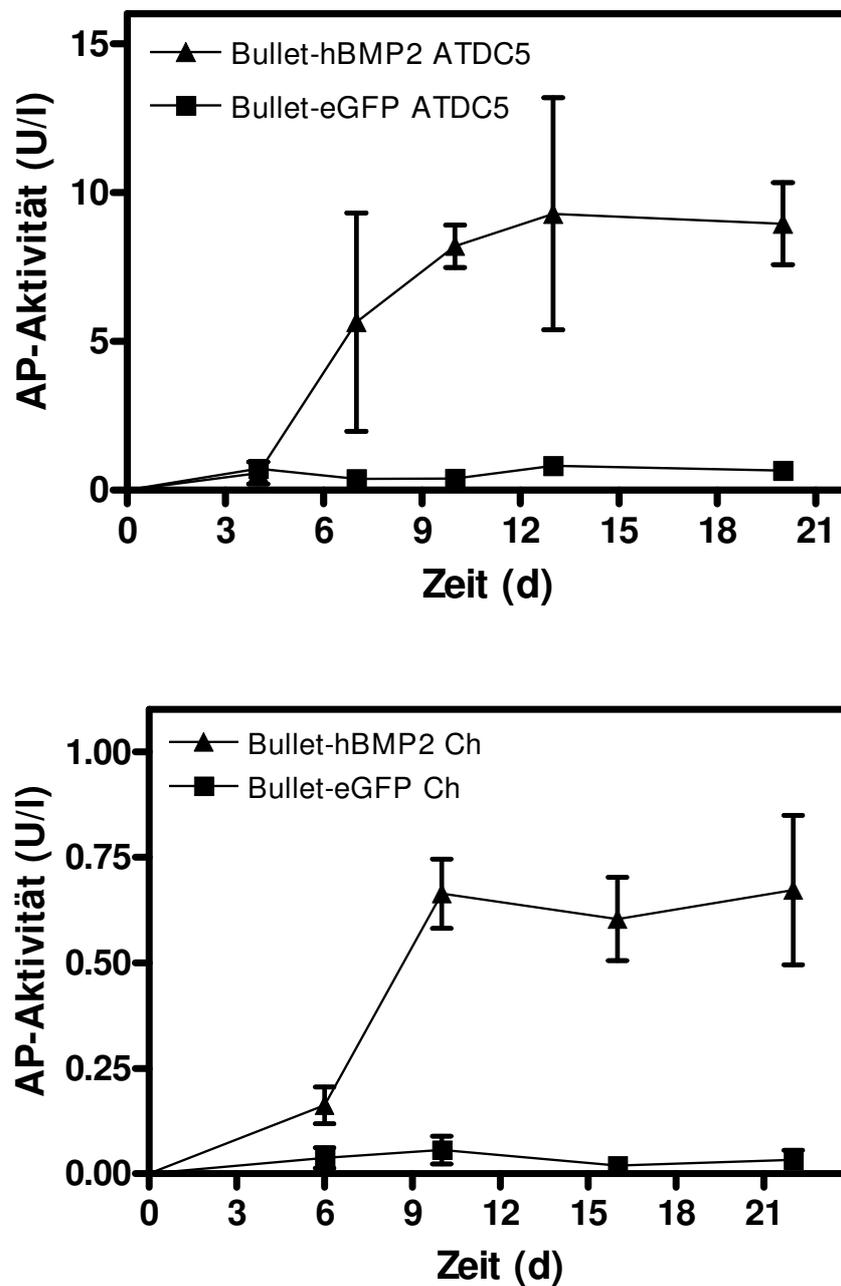


Abbildung 19: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Zellkulturüberständen von ATDC5-Zellen und Chondrozyten

Nach retroviraler Transduktion (*bulletBMP2*, *bullet-eGFP*) wurden ATDC5-Zellen und Gelenkchondrozyten in Zellkultur genommen. Die AP-Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=3$). Mediumwechsel erfolgte bei ATDC5-Zellen täglich und bei Chondrozyten jeden dritten Tag. Die Messung der AP-Aktivität erfolgte jeweils direkt vor dem Mediumwechsel.

5 Diskussion

In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass der retrovirale VSV.G pseudotypisierte Vektor *bullet* in der Lage ist, die Markergene *lacZ* bzw. *eGFP* in ATDC5-Zellen und adulte Chondrozyten einzuschleusen. Dieser Gentransfer war hocheffizient, mit über 90% Transduktionsrate ohne Notwendigkeit eines Selektionsschrittes, und über einen langen Zeitraum stabil.

Auch das therapeutische Gen *BMP2* konnte mit Hilfe dieses Vektors in die beiden Zelllinien erfolgreich eingebracht und exprimiert werden. Seine auch in Langzeitkultur chondrogene und die Matrixsynthese stimulierende Wirkung konnte an Hand der Analyse verschiedener knorpelspezifischer Parameter verifiziert werden.

5.1 Effizienter und stabiler Gentransfer mittels *bullet*

Die Verbindung von *Tissue Engineering* und Gentherapie hat sich zu einem aussichtsreichem Forschungsgebiet für die Behandlung von Knorpelschäden entwickelt [19, 89, 127, 130]. Ein ungeklärtes Problem ist hierbei das effiziente Einschleusen des therapeutischen Gens in die Zielzelle. Die Möglichkeit des Gentransfers in Chondrozyten unter Verwendung viraler und non-viraler Methoden konnte bereits in mehreren Studien demonstriert werden [8, 12, 38, 51, 61, 92, 118, 119, 136].

Mittels non-viraler Methoden konnten hierbei nur niedrige Transfektionsraten erreicht werden [71, 89, 142, 200]. Stöve untersuchte verschiedene liposomale Systeme als Vektoren. Die maximale Effizienz beschreibt er für das kommerziell erhältliche FUGENE 6[®] mit 40,3% *lacZ*-positiven Zellen nach 36 Stunden. Schon nach vier Wochen nahm diese Rate auf 8,5% ab und nach 30 Wochen exprimierten nur noch 3% der Zellen *lacZ* [186]. Madry erreichte in einer ähnlichen Studie mit FUGENE 6[®] an Gelenkchondrozyten Transduktionsraten von 41% für Rinderzellen und 20,7% für humane Knorpelzellen. Zudem stellte er fest, dass arthrotisch veränderte Chondrozyten das Transgen mit 7,8% noch deutlich weniger aufnahmen [119]. Als Folge der geringen Effizienz müssen bei dieser Methode kostenintensive Selektionsschritte nachgeschaltet werden. Der dafür benötigte Zeitaufwand behindert bei primären Zelllinien die anschließende *in-vivo* Anwendung.

Die Verwendung viraler Vektoren stellt eine hocheffiziente Methode des Gentransfers dar. Dinser gelang mit Hilfe eines adenoviralen Transfersystems nach 72 Stunden eine Transduktionsrate von 82%. Nach vier Wochen fiel diese jedoch auf nahezu 0% ab, lediglich bei den auf einer Alginatmatrix kultivierten Zellen waren nach 10 Wochen noch 30% positiv für *eGFP* [48]. Eine ähnlich hohe initiale Effizienz erreichte Ikeda mit Hilfe eines adenoviralen Vektors. Auch in seiner Studie verringerte sich die Transduktionsrate jedoch nach acht Wochen auf 55% [92]. Carlberg und Kollegen beschrieben einen retroviralen Gentransfer in mesenchymale Stammzellen. Der Anteil der *eGFP*-positiven Zellen betrug anfänglich über 90%, jedoch fehlt in dieser Publikation eine Beurteilung der Langzeit-Genexpression [38]. Hirschmann et al konnten eine über acht Monate stabile Transduktion von *eGFP* in Chondrozyten erreichen, jedoch bei insgesamt niedriger Effizienz (18-43%) [83]. In einer Lentivirus-Studie von Lu zeigten nach 6 Wochen nur noch 21,4% der Chondrozyten *eGFP*-Synthese [115]. Dies veranschaulicht das Problem, eine hohe Expression des Transgens langfristig und stabil aufrechtzuerhalten. Deshalb wurde in den Versuchen dieser Arbeit der VSV.G pseudotypisierte retrovirale Vektor *bullet* als alternative Methode für den Gentransfer in Chondrozyten getestet. Dies ist die erste Studie über den Gebrauch eines derartigen Vektors für den Gentransfer in Chondrozyten.

Mit Hilfe von *bullet* wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das *lacZ*-Gen für β -Galaktosidase von *E. coli* bzw. das *eGFP*-Gen für die Expression des *Green Fluorescence Protein* in Zellen eingeschleust. Es zeigte sich *in-vitro* eine sehr effiziente Transduktion ohne Durchführung eines Selektionsschrittes. Mehr als 92% der transduzierten Kaninchen-Chondrozyten exprimierten das Markergen *lacZ* und mehr als 98% der transduzierten ATDC5-Zellen exprimierten *eGFP*. In beiden Zelllinien war der Gentransfer sehr stabil. Chondrozyten sind jedoch primäre Zellen mit der Folge eines Sistierens der Zellteilung *in-vitro* nach Ablauf einer bestimmten Zeitperiode. Aus diesem Grunde wurden zusätzlich ATDC5-Zellen, eine stabile Zelllinie verwendet, um die Langzeitsynthese von *eGFP* zu analysieren. In diesen Zellen konnte die Expression des Transgens über ein ganzes Jahr konstant über 94% gehalten werden. Dies ist die

erste Beschreibung einer derart hohen und konstanten Transgenexpression in der Knorpelforschung.

5.2 BMP2: Wirkung auf Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese

BMP2 hat auf Knorpelgewebe eine stimulierende Wirkung. In der Zellkultur konnte dies in vorangegangenen Studien an Hand vielfältiger Effekte auf Chondrozyten und Progenitorzellen veranschaulicht werden. Es wurde gezeigt, dass *BMP2* an der Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondroblasten und Osteoblasten beteiligt ist [38, 149, 173, 192, 218]. Weiterhin ist *BMP2* in der Lage, Chondrozyten in zweidimensionaler Kultur phänotypisch konstant zu halten [82, 183]. Diese verändern sonst, wenn sie ihrer physiologischen Matrix beraubt werden, ihren Phänotyp und nehmen eine fibroblastenartige Morphologie an. Auch der Stoffwechsel verändert sich im Sinne einer gesteigerten Produktion von Kollagen I bei sinkender Kollagen II- und Aggrecanbildung. Sailor konnte zeigen, dass Chondrozyten *in-vitro* durch Addition von *BMP2* zum Zellkulturmedium über 28 Tage phänotypisch und bezüglich der Kollagen II-Synthese stabil sind [168].

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt eines konstanten und hohen *BMP2*-Spiegels *in-vitro* an ATDC5-Zellen bzw. adulten Chondrozyten studiert werden. Zu diesem Zwecke wurde das *BMP2* Gen mit Hilfe des retroviralen Vektors *bullet* in diese Zelllinien eingeschleust. Die *BMP2*-Produktion wurde mittels ELISA des Zellkulturüberstandes ermittelt. Es konnte eine gesteigerte *BMP2*-Synthese bis zum siebten Tag in ATDC5-Zellen und bis zum 14. Tag in Chondrozyten festgestellt werden. Nach Konfluenz der Zellen war die Produktion in beiden Zelllinien konstant hoch. Die nicht transduzierten Kontrollzellen zeigten keine *BMP2*-Synthese. Im Phasenkontrastmikroskop wurde zudem die Morphologie der kultivierten Chondrozyten verglichen. Die *bulletBMP2*-Zellen erschienen abgerundet und konnten ihren Phänotyp erhalten während die Kontroll- und *bulletLZ*-Zellen eine fibroblastenartige Morphologie mit länglicher Zellform und zahlreichen Zellfortsätzen zeigten.

Auch die Proliferationsrate der Zellen wird durch *BMP2* beeinflusst [160, 170]. Dabei fand die Mehrzahl der Autoren eine anabole Wirkung [47, 50, 190], jedoch finden sich in der Literatur auch Berichte von einer Abnahme der Zellteilungsrate [213, 216]. Tim et al entnahmen Chondrozyten aus dem Anulus fibrosus der Bandscheiben von Ratten. Sie konnten durch Feststellung der Zellzahl nach 2, 4, und 7 Tagen einen starken Effekt von *BMP2*, welches dem Zellkulturmedium beigemischt wurde, auf die Proliferation nachweisen. Gleiches beschrieb auch Erickson in seiner Studie an Chondrozyten aus osteochondralen Defekten von Ratten nach 24h und 48h. Keiner der Autoren untersuchte jedoch die Auswirkungen auf die Proliferation über einen längeren Zeitraum als 7 Tage. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von retroviral transduziertem *BMP2* auf die Proliferation an Hand eines MTT-Assays analysiert. Die Proliferationsrate war in ATDC5-Zellen bis Tag 5 und in Chondrozyten bis Tag 7 deutlich erhöht. Im Folgenden glich sich die Proliferation der Wachstumsfaktorzellen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums an Tag 14 an die Kontrollzellen an.

Multipotente Zellen wie auch Chondrozyten produzieren unter Einfluss von *BMP2* für Knorpelgewebe charakteristische extrazelluläre Matrix-Komponenten. Dies konnte in verschiedenen Studien an Hand der gesteigerten Synthese von Proteoglykanen, Proteoglykan-Bausteinen und Kollagen II demonstriert werden [64, 103, 110, 191]. In der Arbeit von Kim wurde an aus Bandscheiben gewonnenen humanen Chondrozyten ein dosisabhängiger Anstieg der Synthese von Proteoglykanen unter Einfluß von *BMP2* beobachtet. Eine *BMP2*-Konzentration von 300ng/ml bedingte eine 67%ige, 1000ng/ml eine 114%ige und 1500ng/ml eine 200%ige Erhöhung der Proteoglykansynthese. In dieser Studie erfolgte jedoch lediglich eine punktuelle Betrachtung an Tag 3 der Zellkultur, so dass keine Aussage über die Zu- oder Abnahme der Proteoglykanproduktion im Zeitverlauf gemacht werden kann. Gooch und Mitarbeiter brachten Gelenkchondrozyten aus Rindern mit Hilfe von PGA-Scaffolds über 4 Wochen in dreidimensionale Kultur. Sie beobachteten unter Einfluss von 100ng/ml *BMP2* im Kulturmedium eine 27% Vermehrung des Anteils der Glykosaminoglykane am Nassgewicht der Zell-Matrix-Konstrukte. Jedoch konnten sie auf diese Weise nicht feststellen, ob die Erhöhung dieser Proteoglykanbausteine auf einer erhöhten

Produktion der einzelnen Zellen beruht oder aber zumindest zum Teil auf einer *BMP2*-induzierten Steigerung der Proliferation. In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten wurde eine gesteigerte Proteoglykan-Synthese bis zum 14. Tag bei ATDC5-Zellen bzw. bis zum 24. Tag bei adulten Chondrozyten beobachtet. Nach dieser Zeit war die Proteoglykanmenge für ATDC5-Zellen konstant auf bis zu 750% und für Chondrozyten auf bis zu 300% erhöht im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese Zahlen spiegeln durch die durchgeführte Normalisierung auf die Menge an vorhandener DNA eine gesteigerte Synthese der einzelnen Zellen wider, die auch nach zwei bzw. 3 Wochen noch anhält. Eine längere Betrachtung war wegen Ablösens der Zellen von der Zellkulturplatte nicht möglich.

Die *Alkalische Phosphatase* ist ein anerkannter Marker für Osteoblastenaktivität und hypertrophe Chondrozyten [60, 66, 184]. Eine gesteigerte Aktivität der Alkalischen Phosphatase unter *BMP2*-Einfluss war bereits in früheren Arbeiten gezeigt worden [50, 63, 82]. So stellten Hiraki und Mitarbeiter in ihren *in-vitro* Experimenten an Chondrozyten eine Stimulation der AP-Aktivität fest. An der ebenfalls untersuchten osteoblastischen Zelllinie MC3T3-E1 war die AP unter *BMP*-Einfluss im Vergleich zur Kontrolle fünf- bis 20fach erhöht. Es wurde jedoch keine Verlaufsbeobachtung über die Zeit durchgeführt. In den Versuchen dieser Arbeit führte *bulletBMP2*-Transduktion nach einem starken Anstieg zwischen Tag vier und Tag zehn zu einem Plateau nach drei Wochen, mit um den Faktor 11,3 bzw. 20 erhöhter AP-Aktivität in ATDC5-Zellen bzw. Chondrozyten.

Differenzierung und Proliferation sind entgegengesetzte Ziele im Bereich der Knorpeltherapie. Eine initial erhöhte Proliferation ist auf der einen Seite sicher erwünscht, um eine ausreichende Menge an Reparatonsgewebe zu erhalten. Nach einer gewissen Zeit sollte diese jedoch sistieren, um eine Differenzierung der Zellen in Knorpelgewebe zu ermöglichen. Mit dem Vektorsystem der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt erreicht werden. Die Proliferation war nur über 7 Tage bedeutend erhöht. Die Proteoglykansynthese als ein Marker für die Differenzierung zu Knorpelzellen war jedoch über den Zeitraum von zwei bzw. drei Wochen in ATDC5-Zellen bzw.

Chondrozyten signifikant gesteigert. Die gesteigerte AP-Synthese zeigt zusammen mit der erhöhten Proteoglykan-Produktion auf der einen Seite, dass das synthetisierte BMP2 einen deutlichen anabolen Effekt sowohl auf ATDC5-Zellen als auch auf adulte Chondrozyten hat. Auf der anderen Seite könnte die erhöhte AP-Aktivität als Marker für hypertrophe Chondrozyten auf einen kontraproduktiven osteoblastischen Effekt von BMP2 hinweisen. Die Gefahr der Bildung von Osteophyten bzw. Chondrophyten durch BMP2 ist bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben worden [137, 171, 204, 225]. Eine lange andauernde BMP2-Exposition, wie mit *bulletBMP2* erreicht, könnte in diesem Zusammenhang das Risiko einer derartigen hypertrophen Ersatzgewebebildung beträchtlich erhöhen. Eine mögliche Lösung dieses Problems stellt die Verwendung von Vektorsystemen mit induzierbarer Genexpression dar, wie z.B. Tetrazyklin-sensitive (tet-) Systeme [68].

5.3 Sicherheitsaspekte des retroviralen Gentransfers und Ausblick

Obwohl der in dieser Arbeit getestete retrovirale Vektor *bullet* eine hohe Effizienz aufweist ist er in der gegenwärtigen Struktur wegen der Gefahr der malignen Transformation für klinische Versuche am Menschen nicht verwendbar. Zur Regeneration des chondralen/osteocondralen Schadens wäre eine mehrwöchige Expression des „therapeutischen Gens“ vermutlich ausreichend. Die sehr stabile Expression von Fremdgenen bei Verwendung viraler Transfersysteme führt jedoch zu einer wochen- und monatelangen Synthese des Genproduktes [207]. Gerade bei Verwendung von Wachstumsfaktoren als Transgene ist dabei das Risiko einer Tumorneogenese deutlich erhöht [108, 167]. Außerdem können durch ungünstige Integration von Promotor- oder Enhancerelementen des viralen Vektors in das Wirtsgenom Proto-Onkogene aktiviert werden, die zur Entstehung von malignen Tumoren führen [220]. Man spricht dann von insertioneller Mutagenese. Das Problem der Dauerexpression kann über steuerbare Systeme wie das tet-System gelöst werden [68]. Hierbei wird die Genexpression pharmakologisch gesteuert und ist sowohl hochspezifisch als auch nicht-toxisch. Im *tet-on*-System ist die Genexpression an die Anwesenheit von Tetrazyklin gebunden, im *tet-off*-System an die Abwesenheit dieser Substanz. Das Funktionieren dieses Systems in Chondrozyten *in-vitro* und *in-vivo* wurde von unserer Arbeitsgruppe erstmalig gezeigt [200]. Die Problematik der

insertionellen Mutagenese besteht jedoch auch bei steuerbaren Vektorsystemen. Nach dem Bekanntwerden zweier Fälle von T-Zell-Leukämie bei Kindern, die Gentherapie erhalten hatten, ist die Weiterentwicklung der Sicherheit der viralen Vektoren zu einem vieldiskutierten Forschungsthema geworden. Klinische Studien mit Retroviren wurden seither eingestellt. Die Kinder litten an *Severe Combined Immunodeficiency (SCID)* und wurden mit *ex-vivo* Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen mit Hilfe eines Retrovirus therapiert. Drei Jahre später kam es bei zwei der zehn therapierten Kinder zur unkontrollierten klonalen Expansion von adulten T-Zellen, verursacht durch Aktivierung des LMO2-Protoonkogen Promotors durch das Transgen [72].

Wegen dieser fehlenden Tauglichkeit für den Einsatz am Menschen erscheint der in dieser Arbeit beschriebene retrovirale Vektor vor allem geeignet für *in-vitro* Experimente und *in-vivo* Tierstudien zur Gentherapie. Beispielsweise könnten mit Hilfe seiner hohen und langanhaltenden Genexpression Desensibilisierungsprozesse in der Signaltransduktion von Serin/Threonin Kinasen getestet werden. Auch die *in-vivo* Erprobung des Maximaleffekts von viel versprechenden Wachstumsfaktor-Genen wie *BMP2* in der Knorpeltherapie stellt eine Einsatzmöglichkeit dar.

Andererseits existieren bereits vielfältige Ansätze, die einer Tumorentstehung durch insertionelle Mutagenese entgegenwirken sollen. Eine Variante dieser Techniken besteht darin, die Vektoren so zu modifizieren, dass die Insertion des Transgens nur noch an der gewünschten Stelle im Wirtsgenom stattfindet. Dies ist jedoch technisch heute noch nicht durchführbar und es wird noch mehrere Jahre dauern, bis retrovirale Vektoren mit gezielten Integrationsloci zur Verfügung stehen [220]. Heute bereits verfügbare Methoden sind Chromatin-Isolatoren, *suicide*-Gene und *self-inactivating (SIN)*-Vektoren [16]. Chromatin-Isolatoren verhindern die unspezifische Expression von Proto-Onkogenen, indem sie eine Barriere zwischen dem Enhancer und räumlich benachbarten Promotoren bilden [53]. Die sogenannten *suicide Gene* können zusammen mit dem gewünschten Gen transduziert werden und stehen unter Kontrolle eines pharmakologisch induzierbaren Promotors [2, 21]. Dieser kann dann bei abnormem Zellwachstum aktiviert werden und die Zerstörung der Zellen veranlassen. *SIN*-

Vektoren enthalten eine Deletion im Bereich der LTR-Promotor-Region, die Genrearrangements unwahrscheinlich macht [221]. Durch Splitten des viralen Genoms oder komplette Entfernung der Sequenzen für gag, pol und env Gene könnte in Zukunft die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer insertionellen Mutagenese weiter minimiert werden [220].

Durch diese Weiterentwicklung der retroviralen Vektorsysteme könnte die Gentherapie - gegebenenfalls in der Verbindung mit Tissue Engineering - in einigen Jahren für eine Vielzahl von Krankheitsbildern eine aussichtsreiche Therapiemöglichkeit darstellen.

6 Zusammenfassung

Die suffiziente Therapie von Knorpelschäden stellt ein bis heute ungelöstes Problem dar. Eine neue Strategie ist die Kombination von Tissue Engineering und Gentherapie, z.B. in Form einer Transduktion von Zellen mit Genen für anabole Zytokine und Implantation der Zellen in den Defekt. Ein effizienter und stabiler Gentransfer in primäre Gelenkknorpelzellen ist jedoch bis heute nicht etabliert. Deswegen wurde ein VSV.G pseudotypisierter retroviraler Vektor konstruiert und der Gentransfer von Markergenen und Wachstumsfaktoren in stabile Zelllinien und Gelenkchondrozyten *in-vitro* untersucht. Ziel der Untersuchungen war es, die Eignung des Vektors für weiterführende *in-vitro* und *in-vivo* Studien in der Heilung von osteochondralen Defekten zu evaluieren.

Durch transiente Infektion von 293T-Zellen mit Hilfe des retroviralen Plasmids *pbullet* wurden virale Überstände gewonnen, die als Transgen *nls lacZ*, *eGFP* oder *hBMP2* enthielten, sowie das gag/pol Plasmid des MML-Virus und das VSV.G Plasmid. Mittels dieser Überstände wurden ATDC5-Zellen und Gelenkchondrozyten von Kaninchen entweder mit einem der Markergene oder mit dem *BMP2*-Gen transduziert. Die Transduktionsrate wurde mit FACS-Analyse der *eGFP*- und *lacZ*-Zellen festgestellt. Für die Messung der *hBMP2*-Produktion wurde ein spezifischer ELISA verwendet. Die Zellproliferationsrate wurde durch MTT-Assay ermittelt und die Synthese von knorpelspezifischer Matrix an Hand der Messung der Proteoglykanproduktion mit Alzianblaufärbung und Extinktionsbestimmung bei 620 nm untersucht. Die Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase erfolgte durch photometrische Erfassung der Farbreaktion mit 4-Nitrophenylphosphat.

98,3% ($\pm 0,6\%$) der ATDC5-Zellen wurden initial erfolgreich mit *bullet-eGFP* transduziert. Nach 52 Wochen waren noch 94,7% ($\pm 0,6\%$) dieser Zellen positiv für *eGFP*. In Chondrozyten lag die für *bullet lacZ* ermittelte Transduktionsrate initial bei 92,3% ($\pm 6,1\%$) und nach 15 Wochen bei 75,7% ($\pm 14,2\%$). Eine stabile Expression des Wachstumsfaktors *BMP2* fand nach retroviraler Transduktion in beiden Zelllinien statt. Dies hatte initial einen deutlichen steigernden Effekt auf die Proliferationsrate zur

Folge. Diese lag jedoch nach 7 Tagen (ATDC5-Zellen) bzw. 14 Tagen (Chondrozyten) nur noch marginal über der Kontrolle. Auch die Proteoglykansynthese war in ATDC5-Zellen (bis zu 7,5fach) und Chondrozyten (bis zu 3fach) deutlich erhöht. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase lag für *bulletBMP2*-Zellen bis 11,3fach (ATDC5) bzw. bis zu 20fach (Chondrozyten) über dem Level der *bullet-eGFP* transduzierten Kontrollzellen.

Die erzielten Ergebnisse zeigen die hohe Effizienz und Beständigkeit des verwendeten retroviralen Vektors für den Gentransfer in eine stabile chondrogene Zelllinie bzw. Gelenkchondrozyten *in-vitro*. Somit ist dieser Vektor ein geeignetes Vehikel zur *in-vitro* Austestung des maximalen Effektes möglicher therapeutischer Gene in der Therapie von osteochondralen Defekten. Die Gefahr der derzeit verwendeten retroviralen Vektoren besteht jedoch in ihrem onkogenen Potential durch insertionelle Mutagenese. Deswegen muss nach Identifizierung eines geeigneten Gens mit Hilfe des vorliegenden Vektorsystems die Suche nach effizienten und sicheren Vektorsystemen, z.B. SIN-Vektoren im Vordergrund stehen, um in Zukunft einen erfolgreichen klinischen Einsatz der Gentherapie zu ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

1. *Adams, M. E. and Hukins, D. W. L.*
The extracellular matrix of the meniscus
In: "Knee meniscus: Basic and clinical foundations"
Mow, W. C., Arnoczky, S. P., and Jackson, D. W. (Hrsg.), Raven Press Ltd., New York, 1. Auflage 1992, 15 - 28
2. *Agarwal, S., Nikolai, B., Yamaguchi, T., Lech, P., Somia, N. V.* Construction and use of retroviral vectors encoding the toxic gene barnase. *Mol. Ther.* (2006) **14**: 555 - 563
3. *Ahsan, T., Sah, R. L.* Biomechanics of integrative cartilage repair. *Osteoarthritis. Cartilage.* (1999) **7**: 29 - 40
4. *Aigner, T., Stoss, H., Weseloh, G., Zeiler, G., von der, M. K.* Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* (1992) **62**: 337 - 345
5. *Akiyama, H., Fukumoto, A., Shigeno, C., Ito, H., Mukai, S., Hoshino, T., Makino, H., Nakamura, T.* TAK-778, a novel synthetic 3-benzothiepin derivative, promotes chondrogenesis in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) **261**: 131 - 138
6. *Akizuki, S., Yasukawa, Y., Takizawa, T.* Does arthroscopic abrasion arthroplasty promote cartilage regeneration in osteoarthritic knees with eburnation? A prospective study of high tibial osteotomy with abrasion arthroplasty versus high tibial osteotomy alone. *Arthroscopy.* (1997) **13**: 9 - 17
7. *Anton, M., Wagner, B., Haubner, R., Bodenstein, C., Essien, B. E., Bonisch, H., Schwaiger, M., Gansbacher, B., Weber, W. A.* Use of the norepinephrine transporter as a reporter gene for non-invasive imaging of genetically modified cells. *J Gene Med.* (2004) **6**: 119 - 126
8. *Arai, Y., Kubo, T., Kobayashi, K., Takeshita, K., Takahashi, K., Ikeda, T., Imanishi, J., Takigawa, M., Hirasawa, Y.* Adenovirus vector-mediated gene transduction to chondrocytes: in vitro evaluation of therapeutic efficacy of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 gene transduction. *J Rheumatol.* (1997) **24**: 1787 - 1795
9. *Arnone, M. I., Dmochowski, I. J., Gache, C.* Using reporter genes to study cis-regulatory elements. *Methods Cell Biol.* (2004) **74**: 621 - 652

10. *Aroen, A., Loken, S., Heir, S., Alvik, E., Ekeland, A., Granlund, O. G., Engebretsen, L.* Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am. J. Sports Med.* (2004) **32**: 211 - 215
11. *Athanasίου, K. A., Rosenwasser, M. P., Buckwalter, J. A., Malinin, T. I., Mow, V. C.* Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop. Res.* (1991) **9**: 330 - 340
12. *Baragi, V. M., Renkiewicz, R. R., Qiu, L., Brammer, D., Riley, J. M., Sigler, R. E., Frenkel, S. R., Amin, A., Abramson, S. B., Roessler, B. J.* Transplantation of adenovirally transduced allogeneic chondrocytes into articular cartilage defects in vivo. *Osteoarthritis. Cartilage.* (1997) **5**: 275 - 282
13. *Bartha, L., Vajda, A., Duska, Z., Rahmeh, H., Hangody, L.* Autologous osteochondral mosaicplasty grafting. *J Orthop. Sports Phys. Ther.* (2006) **36**: 739 - 750
14. *Bartlett, W., Skinner, J. A., Gooding, C. R., Carrington, R. W., Flanagan, A. M., Briggs, T. W., Bentley, G.* Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J. Bone Joint Surg. Br.* (2005) **87**: 640 - 645
15. *Bauer, M., Jackson, R. W.* Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification. *Arthroscopy.* (1988) **4**: 97 - 102
16. *Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z., Fehse, B.* Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* (2006) **17**: 253 - 263
17. *Behrens, P., Bitter, T., Kurz, B., Russlies, M.* Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee.* (2006) **13**: 194 - 202
18. *Betz, O. B., Betz, V. M., Nazarian, A., Pilapil, C. G., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A., Evans, C. H.* Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* (2006) **88**: 355 - 365
19. *Blunk, T., Sieminski, A. L., Gooch, K. J., Courter, D. L., Hollander, A. P., Nahir, A. M., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., Freed, L. E.* Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* (2002) **8**: 73 - 84

20. *Bolognesi, D. P., Montelaro, R. C., Frank, H., Schafer, W.* Assembly of type C oncornaviruses: a model. *Science.* (1978) **199**: 183 - 186
21. *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., Bonini, C.* Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood.* (2006) **107**: 1828 - 1836
22. *Bonnerot, C., Rocancourt, D., Briand, P., Grimber, G., Nicolas, J. F.* A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1987) **84**: 6795 - 6799
23. *Bouwmeester, P., Kuijer, R., Terwindt-Rouwenhorst, E., van der, L. T., Bulstra, S.* Histological and biochemical evaluation of perichondrial transplants in human articular cartilage defects. *J. Orthop. Res.* (1999) **17**: 843 - 849
24. *Bouwmeester, P. S., Kuijer, R., Homminga, G. N., Bulstra, S. K., Geesink, R. G. A.* retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondrial grafting versus subchondral drilling 10 years post-surgery. *J. Orthop. Res.* (2002) **20**: 267 - 273
25. *Braun, S., Vogt, S., Imhoff, A. B.* Stadiengerechte operative Knorpeltherapie - aktueller Stand. *Orthopade.* (2007) **36**: 589 - 600
26. *Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., Peterson, L.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* (1994) **331**: 889 - 895
27. *Brucker, P., Agneskirchner, J. D., Burkart, A., Imhoff, A. B.* [Mega-OATS. Technique and outcome]. *Unfallchirurg.* (2002) **105**: 443 - 449
28. *Bruckner, P., van der, R. M.* Structure and function of cartilage collagens. *Microsc. Res. Tech.* (1994) **28**: 378 - 384
29. *Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P., Harland, R. M.* Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science.* (1998) **280**: 1455 - 1457
30. *Buckwalter, J. A.* Articular cartilage injuries. *Clin. Orthop. Relat Res.* (2002) 21 - 37
31. *Buckwalter, J. A., Mankin, H. J.* Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr. Course Lect.* (1998) **47:477-86.**: 477 - 486

32. *Buckwalter, J. A., Mankin, H. J.* Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr. Course Lect. (1998) **47:487-504.**: 487 - 504
33. *Buckwalter, J. A., Mankin, H. J., Grodzinsky, A. J.* Articular cartilage and osteoarthritis. Instr. Course Lect. (2005) **54:465-80.**: 465 - 480
34. *Buckwalter, J. A., Mow, V. C., Ratcliffe, A.* Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. J Am. Acad. Orthop. Surg. (1994) **2**: 192 - 201
35. *Bujia, J., Sittinger, M., Hammer, C., Burmester, G.* [Culture of human cartilage tissue using a perfusion chamber]. Laryngorhinootologie. (1994) **73**: 577 - 580
36. *Burgeson, R. E., Nimni, M. E.* Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. Clin. Orthop. Relat Res. (1992) 250 - 272
37. *Burkart, A., Imhoff, A. B.* [Diagnostic imaging after autologous chondrocyte transplantation. Correlation of magnetic resonance tomography, histological and arthroscopic findings]. Orthopade. (2000) **29**: 135 - 144
38. *Carlberg, A. L., Pucci, B., Rallapalli, R., Tuan, R. S., Hall, D. J.* Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. Differentiation. (2001) **67**: 128 - 138
39. *Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. (1994) **263**: 802 - 805
40. *Chen, D., Zhao, M., Harris, S. E., Mi, Z.* Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. Front Biosci. (2004) **9**: 349 - 358
41. *Cherubino, P., Pazzaglia, U. E., Grassi, F. A., Borromeo, U.* Spondylosis and lumbar instability: pathologic changes. Chir Organi Mov. (1994) **79**: 11 - 18
42. *Cooper, C. R., Hanson, L. A., Diehl, W. J., Pharr, G. T., Coats, K. S.* Natural selection of the Pol gene of bovine immunodeficiency virus. Virology. (1999) **255**: 294 - 301
43. *Crystal, R. G.* Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. Science. (1995) **270**: 404 - 410
44. *Cuevas, P., Burgos, J., Baird, A.* Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1988) **156**: 611 - 618

45. *Curl, W. W., Krome, J., Gordon, E. S., Rushing, J., Smith, B. P., Poehling, G. G.* Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* (1997) **13**: 456 - 460
46. *Czitrom, A. A., Langer, F., McKee, N., Gross, A. E.* Bone and cartilage allotransplantation. A review of 14 years of research and clinical studies. *Clin. Orthop. Relat Res.* (1986) 141 - 145
47. *De Luca, F., Barnes, K. M., Uyeda, J. A., De-Levi, S., Abad, V., Palese, T., Mericq, V., Baron, J.* Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology.* (2001) **142**: 430 - 436
48. *Dinser, R., Kreppel, F., Zaucke, F., Blank, C., Paulsson, M., Kochanek, S., Maurer, P.* Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem. Cell Biol.* (2001) **116**: 69 - 77
49. *Donahue, R. E., Kessler, S. W., Bodine, D., McDonagh, K., Dunbar, C., Goodman, S., Agricola, B., Byrne, E., Raffeld, M., Moen, R., .* Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp. Med.* (1992) **176**: 1125 - 1135
50. *Erickson, D. M., Harris, S. E., Dean, D. D., Harris, M. A., Wozney, J. M., Boyan, B. D., Schwartz, Z.* Recombinant bone morphogenetic protein (BMP)-2 regulates costochondral growth plate chondrocytes and induces expression of BMP-2 and BMP-4 in a cell maturation-dependent manner. *J Orthop. Res.* (1997) **15**: 371 - 380
51. *Evans, C. H., Robbins, P. D.* Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg Am.* (1995) **77**: 1103 - 1114
52. *Evans, C. H., Robbins, P. D., Ghivizzani, S. C., Herndon, J. H., Kang, R., Bahnson, A. B., Barranger, J. A., Elders, E. M., Gay, S., Tomaino, M. M., Wasko, M. C., Watkins, S. C., Whiteside, T. L., Glorioso, J. C., Lotze, M. T., Wright, T. M.* Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum. Gene Ther.* (1996) **7**: 1261 - 1280
53. *Evans-Galea, M. V., Wielgosz, M. M., Hanawa, H., Srivastava, D. K., Nienhuis, A. W.* Suppression of clonal dominance in cultured human lymphoid cells by addition of the cHS4 insulator to a lentiviral vector. *Mol. Ther.* (2007) **15**: 801 - 809

54. *Frenkel, S. R., Saadeh, P. B., Mehrara, B. J., Chin, G. S., Steinbrech, D. S., Brent, B., Gittes, G. K., Longaker, M. T.* Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast. Reconstr. Surg.* (2000) **105**: 980 - 990
55. *Friedlaender, G. E., Perry, C. R., Cole, J. D., Cook, S. D., Cierny, G., Muschler, G. F., Zych, G. A., Calhoun, J. H., LaForte, A. J., Yin, S.* Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am.* (2001) **83-A Suppl 1**: S151 - S158
56. *Fuller, J. A., Ghadially, F. N.* Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage. *Clin. Orthop. Relat Res.* (1972) **86**: 193 - 205
57. *Furukawa, T., Eyre, D. R., Koide, S., Glimcher, M. J.* Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J. Bone Joint Surg. Am.* (1980) **62**: 79 - 89
58. *Gardlik, R., Palffy, R., Hodossy, J., Lukacs, J., Turna, J., Celec, P.* Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit.* (2005) **11**: RA110 - RA121
59. *Gelse, K., Jiang, Q. J., Aigner, T., Ritter, T., Wagner, K., Poschl, E., von der, M. K., Schneider, H.* Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum.* (2001) **44**: 1943 - 1953
60. *Gerstenfeld, L. C., Shapiro, F. D.* Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem.* (1996) **62**: 1 - 9
61. *Ghivizzani, S. C., Lechman, E. R., Tio, C., Mule, K. M., Chada, S., McCormack, J. E., Evans, C. H., Robbins, P. D.* Direct retrovirus-mediated gene transfer to the synovium of the rabbit knee: implications for arthritis gene therapy. *Gene Ther.* (1997) **4**: 977 - 982
62. *Goldring, S. R., Goldring, M. B.* The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat Res.* (2004) S27 - S36
63. *Gonnerman, K. N., Brown, L. S., Chu, T. M.* Effects of growth factors on cell migration and alkaline phosphatase release. *Biomed. Sci. Instrum.* (2006) **42**: 60 - 65

64. *Gooch, K. J., Blunk, T., Courter, D. L., Sieminski, A. L., Vunjak-Novakovic, G., Freed, L. E.* Bone morphogenetic proteins-2, -12, and -13 modulate in vitro development of engineered cartilage. *Tissue Eng.* (2002) **8**: 591 - 601
65. *Goodrich, L. R., Brower-Toland, B. D., Warnick, L., Robbins, P. D., Evans, C. H., Nixon, A. J.* Direct adenovirus-mediated IGF-I gene transduction of synovium induces persisting synovial fluid IGF-I ligand elevations. *Gene Ther.* (2006) **13**: 1253 - 1262
66. *Goodwin, H. S., Bicknese, A. R., Chien, S. N., Bogucki, B. D., Quinn, C. O., Wall, D. A.* Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol. Blood Marrow Transplant.* (2001) **7**: 581 - 588
67. *Gorecki, D. C.* "Dressed-up" naked plasmids: emerging vectors for non-viral gene therapy. *Discov. Med.* (2006) **6**: 191 - 197
68. *Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., Bujard, H.* Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* (1995) **268**: 1766 - 1769
69. *Gouze, E., Pawliuk, R., Pilapil, C., Gouze, J. N., Fleet, C., Palmer, G. D., Evans, C. H., Leboulch, P., Ghivizzani, S. C.* In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors. *Mol. Ther.* (2002) **5**: 397 - 404
70. *Govender, S., Csimma, C., Genant, H. K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Borner, M. G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van, d., V, Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R. L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P. M., Rondia, J., Rossouw, W. C., Daneel, P. J., Ruff, S., Ruter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T. A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R. B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A., Wisniewski, T.* Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* (2002) **84-A**: 2123 - 2134
71. *Grossin, L., Cournil-Henrionnet, C., Mir, L. M., Liagre, B., Dumas, D., Etienne, S., Guingamp, C., Netter, P., Gillet, P.* Direct gene transfer into rat articular cartilage by in vivo electroporation. *FASEB J.* (2003) **17**: 829 - 835
72. *Hacein-Bey-Abina, S., Von, K. 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, B. 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, D. F., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. (2003) **302**: 415 - 419
73. *Haggart, G. E.* The surgical treatment of degenerative arthritis of the knee joint. *J Bone Joint Surg.* (1940) **22**: 717 - 729
74. *Haid, R. W., Jr., Branch, C. L., Jr., Alexander, J. T., Burkus, J. K.* Posterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2 with cylindrical interbody cages. *Spine J.* (2004) **4**: 527 - 538
75. *Hangody, L., Fules, P.* Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J. Bone Joint Surg. Am.* (2003) **85-A Suppl 2:25-32**: 25 - 32
76. *Hannallah, D., Peterson, B., Lieberman, J. R., Fu, F. H., Huard, J.* Gene therapy in orthopaedic surgery. *Instr. Course Lect.* (2003) **52**: 753 - 768
77. *Hayes, D. W., Jr., Brower, R. L., John, K. J.* Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* (2001) **18**: 35 - 53
78. *Hendrickson, D. A., Nixon, A. J., Grande, D. A., Todhunter, R. J., Minor, R. M., Erb, H., Lust, G.* Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop. Res.* (1994) **12**: 485 - 497
79. *Hepp, P., Bader, A., Josten, C., Rose, T., Schulz, R.* Tissue Engineering von Knorpelzellen. *Arthroskopie.* (2005) **18**: 233 - 238
80. *Herrmann, M., Hagenhofer, M., Kalden, J. R.* Retroviruses and systemic lupus erythematosus. *Immunol. Rev.* (1996) **152**: 145 - 156
81. *Herve, P.* [Therapeutic applications and promises of cellular and tissue engineering.]. *Transfus. Clin. Biol.* (2007) **14**: 3 - 9
82. *Hiraki, Y., Inoue, H., Shigeno, C., Sanma, Y., Bentz, H., Rosen, D. M., Asada, A., Suzuki, F.* Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner. Res.* (1991) **6**: 1373 - 1385

83. *Hirschmann, F., Verhoeyen, E., Wirth, D., Bauwens, S., Hauser, H., Rudert, M.* Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein. *Osteoarthritis. Cartilage.* (2002) **10**: 109 - 118
84. *Hjelle, K., Solheim, E., Strand, T., Muri, R., Brittberg, M.* Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* (2002) **18**: 730 - 734
85. *Hoikka, V. E., Jaroma, H. J., Ritsila, V. A.* Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4-year follow-up of 13 cases. *Acta Orthop. Scand.* (1990) **61**: 36 - 39
86. *Homminga, G. N., Bulstra, S. K., Bouwmeester, P. S., Van Der Linden, A. J.* Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J. Bone Joint Surg. Br.* (1990) **72**: 1003 - 1007
87. *Horas, U., Pelinkovic, D., Herr, G., Aigner, T., Schnettler, R.* Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am.* (2003) **85-A**: 185 - 192
88. *Hsu, D. R., Economides, A. N., Wang, X., Eimon, P. M., Harland, R. M.* The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol. Cell.* (1998) **1**: 673 - 683
89. *Huard, J., Li, Y., Peng, H., Fu, F. H.* Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J Gene Med.* (2003) **5**: 93 - 108
90. *Hubbard, M. J.* Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study. *J. Bone Joint Surg. Br.* (1996) **78**: 217 - 219
91. *Hunziker, E. B.* Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis. Cartilage.* (2002) **10**: 432 - 463
92. *Ikeda, T., Kubo, T., Nakanishi, T., Arai, Y., Kobayashi, K., Mazda, O., Ohashi, S., Takahashi, K., Imanishi, J., Takigawa, M., Hirasawa, Y.* Ex vivo gene delivery using an adenovirus vector in treatment for cartilage defects. *J Rheumatol.* (2000) **27**: 990 - 996
93. *Imhoff, A. B., Burkart, A., Ottl, G. M.* [Transfer of the posterior femoral condyle. First experience with a salvage operation]. *Orthopade.* (1999) **28**: 45 - 51

94. *Imhoff, A. B., König, U.* Arthroskopie - qualifizierte Stadieneinteilung der osteochondralen Läsion (OCL) am Knie, Diagnostik und Klassifikation. *Arthroskopie.* (2003) **16**: 23 - 28
95. *Imhoff, A. B., Ottl, G. M., Burkart, A., Traub, S.* [Autologous osteochondral transplantation on various joints]. *Orthopäde.* (1999) **28**: 33 - 44
96. *Ito, Y., Ochi, M., Adachi, N., Sugawara, K., Yanada, S., Ikada, Y., Ronakorn, P.* Repair of osteochondral defect with tissue-engineered chondral plug in a rabbit model. *Arthroscopy.* (2005) **21**: 1155 - 1163
97. *Jelic, M., Pecina, M., Haspl, M., Kos, J., Taylor, K., Maticic, D., McCartney, J., Yin, S., Rueger, D., Vukicevic, S.* Regeneration of articular cartilage chondral defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep. *Growth Factors.* (2001) **19**: 101 - 113
98. *Johnson, L. L.* Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin. Orthop. Relat Res.* (2001) S306 - S317
99. *Kafri, T.* Lentivirus vectors: difficulties and hopes before clinical trials. *Curr. Opin. Mol. Ther.* (2001) **3**: 316 - 326
100. *Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W., Kitts, P.* Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques.* (1995) **19**: 650 - 655
101. *Kang, R., Marui, T., Ghivizzani, S. C., Nita, I. M., Georgescu, H. I., Suh, J. K., Robbins, P. D., Evans, C. H.* Ex vivo gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular cartilage defects: a feasibility study. *Osteoarthritis. Cartilage.* (1997) **5**: 139 - 143
102. *Kijowski, R., Blankenbaker, D. G., Stanton, P. T., Fine, J. P., De Smet, A. A.* Radiographic findings of osteoarthritis versus arthroscopic findings of articular cartilage degeneration in the tibiofemoral joint. *Radiology.* (2006) **239**: 818 - 824
103. *Kim, D. J., Moon, S. H., Kim, H., Kwon, U. H., Park, M. S., Han, K. J., Hahn, S. B., Lee, H. M.* Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. *Spine.* (2003) **28**: 2679 - 2684
104. *Kim, H. T., Zaffagnini, S., Mizuno, S., Abelow, S., Safran, M. R.* A peek into the possible future of management of articular cartilage injuries: gene therapy and scaffolds for cartilage repair. *J Orthop. Sports Phys. Ther.* (2006) **36**: 765 - 773

105. *Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigsen, T. C., Drogset, J. O., Grontvedt, T., Solheim, E., Strand, T., Roberts, S., Isaksen, V., Johansen, O.* Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* (2004) **86-A**: 455 - 464
106. *Koenig, B. B., Cook, J. S., Wolsing, D. H., Ting, J., Tiesman, J. P., Correa, P. E., Olson, C. A., Pecquet, A. L., Ventura, F., Grant, R. A., .* Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* (1994) **14**: 5961 - 5974
107. *Kuriyama, S., Mitoro, A., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Yoshiji, H., Tsujimoto, T., Yamazaki, M., Fukui, H.* Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene Ther.* (2000) **7**: 1132 - 1136
108. *Langenfeld, E. M., Langenfeld, J.* Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol. Cancer Res.* (2004) **2**: 141 - 149
109. *Langer, R., Vacanti, J. P.* Tissue engineering. *Science.* (1993) **260**: 920 - 926
110. *Li, J., Kim, K. S., Park, J. S., Elmer, W. A., Hutton, W. C., Yoon, S. T.* BMP-2 and CDMP-2: stimulation of chondrocyte production of proteoglycan. *J Orthop. Sci.* (2003) **8**: 829 - 835
111. *Li, Y., Tew, S. R., Russell, A. M., Gonzalez, K. R., Hardingham, T. E., Hawkins, R. E.* Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9. *Tissue Eng.* (2004) **10**: 575 - 584
112. *Liu, F., Ventura, F., Doody, J., Massague, J.* Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell Biol.* (1995) **15**: 3479 - 3486
113. *Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H., Ke, N. J.* Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) **260**: 712 - 717
114. *Lu, D. C., Sun, P. P.* Bone morphogenetic protein for salvage fusion in an infant with Down syndrome and craniovertebral instability. Case report. *J Neurosurg.* (2007) **106**: 480 - 483
115. *Lu, F. Z., Kitazawa, Y., Hara, Y., Jiang, J. Y., Li, X. K.* Long-term gene expression using the lentiviral vector in rat chondrocytes. *Clin. Orthop. Relat Res.* (2005) **439**: 243 - 252

116. *Lundstrom, K., Boulikas, T.* Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technol. Cancer Res. Treat.* (2003) **2**: 471 - 486
117. *Luyten, F. P., Cunningham, N. S., Ma, S., Muthukumaran, N., Hammonds, R. G., Nevins, W. B., Woods, W. I., Reddi, A. H.* Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol. Chem.* (1989) **264**: 13377 - 13380
118. *Madry, H., Cucchiaroni, M., Terwilliger, E. F., Trippel, S. B.* Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum. Gene Ther.* (2003) **14**: 393 - 402
119. *Madry, H., Trippel, S. B.* Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther.* (2000) **7**: 286 - 291
120. *Magnuson, P. B.* Joint debridement: a surgical treatment of degenerative arthritis. *Surg Gynecol Obst.* (1941) **73**: 1 - 9
121. *Maitani, Y., Igarashi, S., Sato, M., Hattori, Y.* Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression. *Int. J Pharm.* (2007)
122. *Maletius, W., Messner, K.* Eighteen- to twenty-four-year follow-up after complete rupture of the anterior cruciate ligament. *Am. J Sports Med.* (1999) **27**: 711 - 717
123. *Mankin, H. J.* The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am.* (1982) **64**: 460 - 466
124. *Mankin, H. J., Thrasher, A. Z.* Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* (1975) **57**: 76 - 80
125. *Marden, L. J., Hollinger, J. O., Chaudhari, A., Turek, T., Schaub, R. G., Ron, E.* Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed. Mater. Res.* (1994) **28**: 1127 - 1138
126. *Marlovits, S., Zeller, P., Singer, P., Resinger, C., Vecsei, V.* Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur. J Radiol.* (2006) **57**: 24 - 31
127. *Martinek, V., Ueblacker, P., Imhoff, A. B.* Current concepts of gene therapy and cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br.* (2003) **85**: 782 - 788

128. *Matsusue, Y., Yamamuro, T., Hama, H.* Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy.* (1993) **9**: 318 - 321
129. *McLaren, A. C., Blokker, C. P., Fowler, P. J., Roth, J. N., Rock, M. G.* Arthroscopic debridement of the knee for osteoarthritis. *Can. J. Surg.* (1991) **34**: 595 - 598
130. *Meenen, N. N., Ueblacker, P., Pörtner, R., Göpfert, C., Nagel-Heyer, S., Petersen, J. P., Adamietz, P.* Knorpel aus dem Labor - eine Sackgasse? *Arthroskopie.* (2005) **18**: 245 - 252
131. *Messner, K., Maletius, W.* The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop. Scand.* (1996) **67**: 165 - 168
132. *Mitchell, N., Shepard, N.* The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am.* (1976) **58**: 230 - 233
133. *Moser, C., Baltzer, A., Reinecke, J., Wehling, P.* Die Rolle der Zytokine bei Knorpeldefekten und in der Knorpeltherapie. Interleukin-1 und TNF-alpha: Schlüsselfaktoren der Knorpeldestruktion. *Arthroskopie.* (2005) **18**: 181 - 185
134. *Mosmann, T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods.* (1983) **65**: 55 - 63
135. *Mulligan, R. C.* The basic science of gene therapy. *Science.* (1993) **260**: 926 - 932
136. *Musgrave, D. S., Bosch, P., Lee, J. Y., Pelinkovic, D., Ghivizzani, S. C., Whalen, J., Niyibizi, C., Huard, J.* Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. *Clin. Orthop. Relat Res.* (2000) 290 - 305
137. *Nakase, T., Miyaji, T., Tomita, T., Kaneko, M., Kuriyama, K., Myoui, A., Sugamoto, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.* Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte. *Osteoarthritis. Cartilage.* (2003) **11**: 278 - 284
138. *Nawata, M., Wakitani, S., Nakaya, H., Tanigami, A., Seki, T., Nakamura, Y., Saito, N., Sano, K., Hidaka, E., Takaoka, K.* Use of bone morphogenetic protein 2 and diffusion chambers to engineer cartilage tissue for the repair of defects in articular cartilage. *Arthritis Rheum.* (2005) **52**: 155 - 163

-
139. *Nehrer, S., Breinan, H. A., Ramappa, A., Hsu, H. P., Minas, T., Shortkroff, S., Sledge, C. B., Yannas, I. V., Spector, M.* Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials.* (1998) **19**: 2313 - 2328
140. *Nerem, R. M.* Tissue engineering: the hope, the hype, and the future. *Tissue Eng.* (2006) **12**: 1143 - 1150
141. *Newman, A. P.* Articular cartilage repair. *Am. J Sports Med.* (1998) **26**: 309 - 324
142. *Nishikawa, M., Huang, L.* Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum. Gene Ther.* (2001) **12**: 861 - 870
143. *Nita, I., Ghivizzani, S. C., Galea-Lauri, J., Bandara, G., Georgescu, H. I., Robbins, P. D., Evans, C. H.* Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* (1996) **39**: 820 - 828
144. *Nolan, G. P., Fiering, S., Nicolas, J. F., Herzenberg, L. A.* Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of *Escherichia coli lacZ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1988) **85**: 2603 - 2607
145. *O'Connor, W. J., Botti, T., Khan, S. N., Lane, J. M.* The use of growth factors in cartilage repair. *Orthop. Clin. North Am.* (2000) **31**: 399 - 410
146. *Ogris, M.* Non-viral cancer gene therapy--what is best? *Drug Discov. Today.* (2003) **8**: 63 -
147. *Osborn, K. D., Trippel, S. B., Mankin, H. J.* Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *J Orthop. Res.* (1989) **7**: 35 - 42
148. *O'Driscoll, S. W.* The healing and regeneration of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* (1998) **80**: 1795 - 1812
149. *Park, Y., Sugimoto, M., Watrin, A., Chiquet, M., Hunziker, E. B.* BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. *Osteoarthritis. Cartilage.* (2005) **13**: 527 - 536
150. *Pearson, B., WOLF, P. L., VAZQUEZ, J.* A comparative Study of a series of new Indolyl compounds to localize beta-Galactosidase in tissues. *Lab Invest.* (1963) **12**: 1249 - 1259

151. *Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M., Lindahl, A.* Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J. Bone Joint Surg. Am.* (2003) **85-A Suppl 2:17-24.**: 17 - 24
152. *Poole, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., Laverty, S.* Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop. Relat Res.* (2001) S26 - S33
153. *Prats, A. C., Roy, C., Wang, P. A., Erard, M., Housset, V., Gabus, C., Paoletti, C., Darlix, J. L.* cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA. *J Virol.* (1990) **64**: 774 - 783
154. *Pridie, K. H.* A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg [Br].* (1959) **41**: 618 - 619
155. *Prosser, J. I.* Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment. *Microbiology.* (1994) **140 (Pt 1)**: 5 - 17
156. *Reddi, A. H.* Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homoeostasis, and regeneration. *Ann. Rheum. Dis.* (2003) **62 Suppl 2:ii73-8.**: ii73 - ii78
157. *Reddy, S., Pedowitz, D. I., Parekh, S. G., Sennett, B. J., Okereke, E.* The morbidity associated with osteochondral harvest from asymptomatic knees for the treatment of osteochondral lesions of the talus. *Am. J Sports Med.* (2007) **35**: 80 - 85
158. *Redman, S. N., Oldfield, S. F., Archer, C. W.* Current strategies for articular cartilage repair. *Eur. Cell Mater.* (2005) **9:23-32; discussion 23-32.**: 23 - 32
159. *Rettig, G. R., Rice, K. G.* Non-viral gene delivery: from the needle to the nucleus. *Expert. Opin. Biol. Ther.* (2007) **7**: 799 - 808
160. *Riley, E. H., Lane, J. M., Urist, M. R., Lyons, K. M., Lieberman, J. R.* Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin. Orthop. Relat Res.* (1996) 39 - 46
161. *Robbins, P. D., Ghivizzani, S. C.* Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol. Ther.* (1998) **80**: 35 - 47
162. *Roberts, S., McCall, I. W., Darby, A. J., Menage, J., Evans, H., Harrison, P. E., Richardson, J. B.* Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res. Ther.* (2003) **5**: R60 - R73

163. *Robinson, D., Efrat, M., Mendes, D. G., Halperin, N., Nevo, Z.* Implants composed of carbon fiber mesh and bone-marrow-derived, chondrocyte-enriched cultures for joint surface reconstruction. *Bull. Hosp. Jt. Dis.* (1993) **53**: 75 - 82
164. *Romano, G.* Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect.* (2005) **18**: 128 - 134
165. *Romano, L., Venturi, G., Catucci, M., De, M. A., Valensin, P. E., Zazzi, M.* Evaluation of cell-free and cell-associated peripheral blood human immunodeficiency virus type 1 RNA response to antiretroviral therapy. *J Infect. Dis.* (1999) **179**: 361 - 366
166. *Rosochacki, S. J., Matejczyk, M.* Green fluorescent protein as a molecular marker in microbiology. *Acta Microbiol. Pol.* (2002) **51**: 205 - 216
167. *Rothhammer, T., Poser, I., Soncin, F., Bataille, F., Moser, M., Bosserhoff, A. K.* Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res.* (2005) **65**: 448 - 456
168. *Sailor, L. Z., Hewick, R. M., Morris, E. A.* Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J. Orthop. Res.* (1996) **14**: 937 - 945
169. *Sanchez-Ramos, J., Song, S., Dailey, M., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Zigova, T., Sanberg, P. R., Snyder, E. Y.* The X-gal caution in neural transplantation studies. *Cell Transplant.* (2000) **9**: 657 - 667
170. *Sato, K., Urist, M. R.* Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture. *Clin. Orthop. Relat Res.* (1984) 180 - 187
171. *Scharstuhl, A., Vitters, E. L., van der Kraan, P. M., 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.* (2003) **48**: 3442 - 3451
172. *Scherdin, U., Rhodes, K., Breindl, M.* Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol.* (1990) **64**: 907 - 912
173. *Schliephake, H., Bertram, H., Lindenmaier, W., Dauner, M., Mayer, H.* [In vitro manipulation of primary human osteo-progenitor cells for tissue technological bone production]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* (2000) **4 Suppl 2**: S470 - S473

174. *Schmitt, J. M., Hwang, K., Winn, S. R., Hollinger, J. O.* Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop. Res.* (1999) **17**: 269 - 278
175. *Sellers, R. S., Peluso, D., 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.* (1997) **79**: 1452 - 1463
176. *Sellers, R. S., Zhang, R., Glasson, S. S., Kim, H. D., Peluso, D., D'Augusta, D. A., Beckwith, K., 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.* (2000) **82**: 151 - 160
177. *Shapiro, F., Koide, S., Glimcher, M. J.* Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* (1993) **75**: 532 - 553
178. *Shinnick, T. M., Lerner, R. A., Sutcliffe, J. G.* Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature.* (1981) **293**: 543 - 548
179. *Shukunami, C., Shigeno, C., Atsumi, T., Ishizeki, K., Suzuki, F., Hiraki, Y.* Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J Cell Biol.* (1996) **133**: 457 - 468
180. *Smith, G. D., Knutsen, G., Richardson, J. B.* A clinical review of cartilage repair techniques. *J. Bone Joint Surg. Br.* (2005) **87**: 445 - 449
181. *Steadman, J. R., Briggs, K. K., Rodrigo, J. J., Kocher, M. S., Gill, T. J., Rodkey, W. G.* Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy.* (2003) **19**: 477 - 484
182. *Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Briggs, K. K., Rodrigo, J. J.* [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade.* (1999) **28**: 26 - 32
183. *Stewart, M. C., Saunders, K. M., Burton-Wurster, N., Macleod, J. N.* Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner. Res.* (2000) **15**: 166 - 174
184. *Stoffel, K., Engler, H., Kuster, M., Riesen, W.* Changes in biochemical markers after lower limb fractures. *Clin. Chem.* (2007) **53**: 131 - 134

185. *Stoltz, J. F., Bensoussan, D., Decot, V., Ciree, A., Netter, P., Gillet, P.* Cell and tissue engineering and clinical applications: an overview. *Biomed. Mater. Eng.* (2006) **16**: S3 - S18
186. *Stove, J., Fiedler, J., Huch, K., Gunther, K. P., Puhl, W., Brenner, R.* Lipofection of rabbit chondrocytes and long lasting expression of a lacZ reporter system in alginate beads. *Osteoarthritis. Cartilage.* (2002) **10**: 212 - 217
187. *Suzuki, T., Bessho, K., Fujimura, K., Okubo, Y., Segami, N., Iizuka, T.* Regeneration of defects in the articular cartilage in rabbit temporomandibular joints by bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac. Surg.* (2002) **40**: 201 - 206
188. *Thompson, R. C., Jr.* An experimental study of surface injury to articular cartilage and enzyme responses within the joint. *Clin. Orthop. Relat Res.* (1975) 239 - 248
189. *Tibesku, C. O., Szuwart, T., Kleffner, T. O., Schlegel, P. M., Jahn, U. R., Van Aken, H., Fuchs, S.* Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. *J. Orthop. Res.* (2004) **22**: 1210 - 1214
190. *Tim, Y. S., Su, K. K., Li, J., Soo, P. J., Akamaru, T., Elmer, W. A., Hutton, W. C.* The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells in vitro. *Spine.* (2003) **28**: 1773 - 1780
191. *Toh, W. S., Liu, H., Heng, B. C., Rufaihah, A. J., Ye, C. P., Cao, T.* Combined effects of TGFbeta1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. *Growth Factors.* (2005) **23**: 313 - 321
192. *Toh, W. S., Yang, Z., Liu, H., Heng, B. C., Lee, E. H., Cao, T.* Effects of culture conditions and bone morphogenetic protein 2 on extent of chondrogenesis from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* (2007) **25**: 950 - 960
193. *Toriumi, D. M., Kotler, H. S., Luxenberg, D. P., Holtrop, M. E., Wang, E. A.* Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* (1991) **117**: 1101 - 1112
194. *Torres, L., Dunlop, D. D., Peterfy, C., Guermazi, A., Prasad, P., Hayes, K. W., Song, J., Cahue, S., Chang, A., Marshall, M., Sharma, L.* The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis. Cartilage.* (2006) **14**: 1033 - 1040

195. *Trippel, S. B.* Growth factors as therapeutic agents. *Instr. Course Lect.* (1997) **46**: 473 - 476
196. *Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B. D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T., Tabin, C. J., Rosen, V.* BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat. Genet.* (2006) **38**: 1424 - 1429
197. *Tuli, R., Li, W. J., Tuan, R. S.* Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* (2003) **5**: 235 - 238
198. *Tuli, R., Nandi, S., Li, W. J., Tuli, S., Huang, X., Manner, P. A., Laquerriere, P., Noth, U., Hall, D. J., Tuan, R. S.* Human mesenchymal progenitor cell-based tissue engineering of a single-unit osteochondral construct. *Tissue Eng.* (2004) **10**: 1169 - 1179
199. *Tuncel, M., Halici, M., Canoz, O., Yildirim, T. C., Oner, M., Ozturk, F., Kabak, S.* Role of insulin like growth factor-I in repair response in immature cartilage. *Knee.* (2005) **12**: 113 - 119
200. *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., Martinek, V.* Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects. *Osteoarthritis. Cartilage.* (2004) **12**: 711 - 719
201. *Ulrich-Vinther, M.* Gene therapy methods in bone and joint disorders. Evaluation of the adeno-associated virus vector in experimental models of articular cartilage disorders, periprosthetic osteolysis and bone healing. *Acta Orthop. Suppl.* (2007) **78**: 1 - 64
202. *Urist, M. R.* Bone: formation by autoinduction. *Science.* (1965) **150**: 893 - 899
203. *Vacanti, C. A., Bonassar, L. J., Vacanti, M. P., Shufflebarger, J.* Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N. Engl. J Med.* (2001) **344**: 1511 - 1514
204. *van Beuningen, H. M., Glansbeek, H. L., van der Kraan, P. M., 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.* (1998) **6**: 306 - 317
205. *van den Berg, W. B., van der Kraan, P. M., Scharstuhl, A., van Beuningen, H. M.* Growth factors and cartilage repair. *Clin. Orthop. Relat Res.* (2001) S244 - S250

206. *Varmus, H. E.* Form and function of retroviral proviruses. *Science*. (1982) **216**: 812 - 820
207. *Vogt, S., Martinek, V., Ueblacker, P., Wexel, G., Gänsbacher, B., Imhoff, A. B.* Retroviral BMP2 gene transfer into chondrocytes for the treatment of osteochondral lesions in a rabbit model. *ETES, Book of Abstracts*. (2005)
208. *Vogt, S., Ueblacker, P., Martinek, V., Gänsbacher, B., Imhoff, A. B.* Gentherapeutische Möglichkeiten in der Knorpeltherapie. *Arthroskopie*. (2005) **18**: 239 - 244
209. *von der, M. K., Gluckert, K.* [Biochemical and molecular biologic aspects of early detection of human arthroses]. *Orthopade*. (1990) **19**: 2 - 15
210. *Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M.* Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. (1994) **76**: 579 - 592
211. *Williams, R. J., III, Ranawat, A. S., Potter, H. G., Carter, T., Warren, R. F.* Fresh stored allografts for the treatment of osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am*. (2007) **89**: 718 - 726
212. *Wollert, K. C., Drexler, H.* Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ. Res*. (2005) **96**: 151 - 163
213. *Wong, G. A., Tang, V., El-Sabeawy, F., Weiss, R. H.* BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab*. (2003) **284**: E972 - E979
214. *Wozney, J. M., Rosen, V.* Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin. Orthop. Relat Res*. (1998) 26 - 37
215. *Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., Wang, E. A.* Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. (1988) **242**: 1528 - 1534
216. *Xu, C. P., Ji, W. M., van den Brink, G. R., Peppelenbosch, M. P.* Bone morphogenetic protein-2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation downregulated in the regenerating liver. *World J Gastroenterol*. (2006) **12**: 7621 - 7625
217. *Yan, H., Yu, C.* Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy*. (2007) **23**: 178 - 187

218. Yang, S., Wei, D., Wang, D., Phimpilai, M., Krebsbach, P. H., Franceschi, R. T. In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation. *J Bone Miner. Res.* (2003) **18**: 705 - 715
219. Yasko, A. W., Lane, J. M., Fellingner, E. J., Rosen, V., Wozney, J. M., Wang, E. A. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am.* (1992) **74**: 659 - 670
220. Yi, Y., Hahm, S. H., Lee, K. H. Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr. Gene Ther.* (2005) **5**: 25 - 35
221. Yu, S. F., von, R. T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., Gilboa, E. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1986) **83**: 3194 - 3198
222. Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996) **227**: 707 - 711
223. Zhang, H., Bradley, A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development.* (1996) **122**: 2977 - 2986
224. Zheng, M. H., Willers, C., Kirilak, L., Yates, P., Xu, J., Wood, D., Shimmin, A. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment. *Tissue Eng.* (2007) **13**: 737 - 746
225. Zoricic, S., Maric, I., Bobinac, D., Vukicevic, S. Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans. *J Anat.* (2003) **202**: 269 - 277

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifikation von Knorpel-schäden nach [15]	7
Abbildung 2: Die Technik der autologen Chondrozytenimplantation nach Brittberg 1994	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Proteoglykanstruktur	18
Abbildung 4: Histologische Struktur des Gelenknorpels	19
Abbildung 5: BMP-Signalkaskade	23
Abbildung 6: Operationssitus: Knorpelentnahme aus der Trochlea ossis femoris des Kaninchens	41
Abbildung 7: Durchführbarkeit des retroviralen Gentransfers an ATDC5-Zellen	49
Abbildung 8: Effektivität des retroviralen Vektors bullet bei ATDC5-Zellen	50
Abbildung 9: Stabile eGFP-Expression in ATDC5-Zellen nach Transduktion mit bullet- eGFP	51
Abbildung 10: Zeitverlauf der eGFP-Expression in ATDC5-Zellen	52
Abbildung 11: Durchführbarkeit des retroviralen Gentransfers an Chondrozyten	53
Abbildung 12: Initiale Transduktionsrate und Langzeitstabilität des Gentransfers mit bulletLZ in primären Chondrozyten	54
Abbildung 13: BMP2-Bestimmung im Zellkulturüberstand von ATDC5-Zellen (oben) und primären Chondrozyten (unten)	56
Abbildung 14: Zellmorphologie von Wildtyp (A), bulletLZ (B) und bulletBMP2 (C) Chondrozyten	58
Abbildung 15: Erhöhte Stoffwechselaktivität von bulletBMP2 Zellen	59
Abbildung 16: MTT-Assay zur Darstellung der Zellproliferationsrate von ATDC5- Zellen (oben) und primären Chondrozyten (unten)	60
Abbildung 17: Alzianblau-Färbung in ATDC5-Zellen (oben) und Chondrozyten (unten)	62
Abbildung 18: Alzianblau Färbung von Wildtyp- (A), Insulin/ Transferrin/ Natriumselenit-behandelten (B), bullet-eGFP- (C) und bulletBMP2- Zellen.	63
Abbildung 19: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Zellkulturüberständen von ATDC5-Zellen und Chondrozyten	65

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank im Rahmen der Fertigstellung dieser Arbeit gilt vor allem

Herrn Univ.-Prof. Dr. Andreas B. Imhoff für die Überlassung des Themas und freundliche Betreuung dieser Arbeit.

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

Meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. Stephan Vogt für seine ununterbrochene Hilfestellung und freundliche Beratung bei allen durchgeführten Experimenten.

Frau Gabriele Wexel für ihre unverzichtbare Mitarbeit bei der Knorpelbiopsie und freundliche Unterstützung bei der Kultivierung der Chondrozyten.

Frau Gerlinde Stejskal, Frau Edelburga Hammerschmidt, Herrn Anton Steger für die Unterstützung bei der FACS-Analyse sowie ihre immer zuverlässige und freundliche Hilfsbereitschaft.

Meinem Bruder Dr. med. Tobias Geis für wertvolle Tipps bei der Verfassung der Arbeit und das Korrekturlesen.

Größter Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben und mich immer in allen Belangen unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Christopher Daniel Geis

Geboren am 20.03.1979 in Aschaffenburg

SCHULBILDUNG

Sep 1989 – Jun 1998	Kaiser – Heinrich – Gymnasium Bamberg
Mai 1998	Abitur

ZIVILDIENTST

Sep 1998 - Sep 1999	Klinikum Bamberg, Anästhesie
----------------------------	------------------------------

HOCHSCHULSTUDIUM

WS 99/00–WS 00/01	Studium der Europäischen Betriebswirtschaftslehre (EBS) an der Fachhochschule Regensburg und der Oxford Brookes University in England
Juli 2000	Vordiplom EBS
SS 01-WS 02/03	Studium der Humanmedizin (Vorklinik) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
März 2003	Ärztliche Vorprüfung
SS 03-SS 07	Studium der Humanmedizin (Klinik) an der Technischen Universität München
April/Mai 2007	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung:

FAMULATUREN

September 2003	Famulatur in der Unfall- und der Viszeralchirurgie im Klinikum Bamberg
März 2004	Famulatur in der Kardiologie und Pneumologie im Städtischen Krankenhaus München-Bogenhausen
März 2005	Famulatur in der Anästhesie im Royal Prince Alfred Hospital in Sydney/Australien
August 2005	Famulatur in der Praxis für Innere Medizin Dr. Adam, Bamberg
September 2005	Famulatur in der Orthopädischen Klinik im Städtischen Krankenhaus München- Bogenhausen

PRAKTISCHES JAHR

Februar 2006 – Juni 2006	Chirurgie am Hospital Clinico De San Carlos, Madrid/Spanien
Juni 2006 – September 2006	Innere Medizin in der Geriatrischen Universitätsklinik Spital Bern-Ziegler, Schweiz
September 2006 – Januar 2007	Wahlfach Orthopädie in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar, München

11 Veröffentlichung

Die vorliegende Arbeit wurde veröffentlicht in „Biomaterials“ unter dem Titel:

„Efficient and stable gene transfer of growth factors into chondrogenic cells and primary articular chondrocytes using a VSV.G pseudotyped retroviral vector“

S. Vogt¹, P. Uebli³, Ch. Geis¹, B. Wagner², G. Wexel¹, T. Tischer¹, A. Krüger²,
C. Plank², M. Anton², A.B. Imhoff¹, B. Gänsbacher²

¹ Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie, Technische Universität München, Ismaninger Straße 22, 81675 München

² Abteilung für Experimentelle Onkologie und Therapieentwicklung, Technische Universität München, Ismaninger Straße 22, 81675 München

³ Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg

* Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen