

Aus dem Lehrstuhl  
für Experimentelle Orthopädie und Arthroserforschung  
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Henning Madry

**Gentransfer zur  
Reparatur von Knorpelschäden  
durch therapeutische rekombinante  
adeno-assoziierte virale (rAAV)-  
Vektoren**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin*

**der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2017**

Vorgelegt von: Elena Mikheeva  
Geboren am: 17. August 1972 in Saratow

Für Ekaterina, meine Eltern und meine Familie

# Inhalt

1. Zusammenfassung/Abstract .....	1
2. Einleitung, Fragestellungen.....	5
2.1. Thematik .....	5
2.2. Der hyaline Gelenkknorpel und die Chondrozyten.....	7
2.3. Ätiologie der Knorpeldefekte.....	11
2.4. Einteilung der Knorpeldefekte.....	13
2.5. Das Problem der Regeneration von Knorpeldefekten.....	13
2.6. Klinische Therapiestrategien bei fokalen Knorpelschäden.....	16
2.7. Experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenk- knorpeldefekten .....	19
2.8. Fibroblastenwachstumsfaktoren als vielversprechende Kandidaten für die experimentelle Knorpelreparatur.....	22
2.9. Gentransfer-basierte Therapie fokaler Knorpeldefekte .....	25
2.10. Fragestellungen .....	31
3. Material und Methodik.....	32
3.1. Material .....	32
3.1.1. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien.....	32
3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	33
3.1.3. Computerprogramme/Software.....	34
3.1.4. rAAV-Vektoren (Plasmide).....	34
3.1.5. Tiermodell .....	35
3.2. Methodik .....	36
3.2.1. <i>Packaging</i> von rAAV-Vektoren .....	36

3.2.2. Operationsverfahren .....	37
3.2.3. Histologie .....	39
3.2.3.1. Fixierung .....	39
3.2.3.2. Entkalkung .....	40
3.2.3.3. Einbettung .....	40
3.2.3.4. Anfertigung der histologischen Schnitte .....	41
3.2.3.5. Färbeverfahren mit Safranin O/Echtgrün und Hämatoxylin .....	41
3.2.4. Histomorphometrische Analyse .....	43
3.2.4.1. Beurteilung ( <i>Scoring</i> ) des Knorpels .....	44
3.2.4.2. Bestimmung der Zellzahl in den Defekten .....	45
3.2.5. Statistische Analyse .....	47
4. Ergebnisse .....	48
4.1. Analyse der Zellproliferation im knorpeligen Reparatur- gewebe .....	48
4.2. Evaluation der individuellen Parameter der Struktur des kartilaginären Reparaturgewebes. ....	50
4.3. Evaluation der Reparatur des subchondralen Knochens ..	53
4.4. Struktureller Gesamtindex der osteochondralen Reparatur .....	53
5. Diskussion .....	55
5.1. Das Problem des faserknorpeligen Reparaturgewebes .....	55
5.2. Wirkung des rAAV-hFGF-2-Gentransfers auf das Reparaturgewebe in osteochondralen Defekten .....	57
5.2.1. rAAV-hFGF-2-Gentransfer steigert signifikant die Zellproliferation im kartilaginären Reparaturgewebe .....	57
5.2.2. Signifikante Verbesserungen nach rAAV-hFGF-2- Gentransfer für individuelle strukturelle Parameter des kartilaginären Reparaturgewebes .....	59

5.2.3. Effekt auf die Reparatur des subchondralen Knochens.....	60
5.2.4. Signifikante Verbesserung des strukturellen Gesamtindexes der osteochondralen Reparatur nach 4 Monaten <i>in vivo</i> durch rAAV-hFGF-2-Gentransfer.....	62
5.3. Diskussion des Tiermodells .....	62
5.4. Diskussion viraler Vektoren .....	65
5.5. Ausblick: Klinische Therapieansätze mit therapeutischen rAAV-Vektoren.....	71
5.6. Schlussfolgerung und Perspektive.....	83
6. Literaturverzeichnis .....	85
7. Publikationen/Danksagung .....	104

## Abbildungen

Abb. 1: Zonen des Gelenkknorpels	10
Abb. 2: AV- und rAAV-Vektor-Genome	29
Abb. 3: rAAV-hFGF-2 und rAAV- <i>lacZ</i> Plasmide	35
Abb. 4: Produktion von rAAV-Vektoren	37
Abb. 5: Gentransfer durch rAAV-Vektoren in osteochondrale Defekten von Kaninchen	39
Abb. 6: Vergleichende Analyse der Gesamt-Zellzahl in knorpeligen Reparaturgewebe 4 Monate postoperativ <i>in vivo</i>	50
Abb. 7: Safranin-O-gefärbte histologische Schnitte der Defekte	51
Abb. 8: Gesamtergebnisse für das Bewertungssystem	54

## Tabellen

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien	32
Tab. 2: Bewertungsschema des Knorpels nach Sellers <i>et al.</i>	46
Tab. 3: Evaluation der Zellproliferation im knorpeligen Reparaturgewebe der individuellen osteochondralen Defekte nach rAAV- <i>lacZ</i> - und rAAV-FGF-2-Applikation <i>in vivo</i>	49
Tab. 4: Bewertung der individuellen Parameter des kartilaginären Reparaturgewebes nach Applikation von therapeutischen rAAV-hFGF-2 und von Kontrollgen rAAV- <i>lacZ</i>	52
Tab. 5: Bewertung der Reparatur des subchondralen Knochens nach Behandlung mit rAAV-hFGF-2 und mit Kontrollgen rAAV- <i>lacZ</i>	53
Tab. 6: Gesamtbewertung der Defektreparatur nach Anwendung von therapeutischem rAAV-hFGF-2 und des Kontrollgens rAAV- <i>lacZ</i>	54

## Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
®	Registered
AAV	Adeno-assoziiertes Virus ( <i>adeno-associated virus</i> )
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
Bcl-xL	B-Zell-Lymphom Protein ( <i>B-cell lymphoma-extra large</i> )
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein ( <i>bone morphogenetic protein</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
<i>cap</i>	Einkapselung
Cart-1	Knorpel-Homöoprotein-1 ( <i>cartilage homeoprotein 1</i> )
cDNS	Komplementäre DNS
Chm-1	Chondromodulin 1
Cm	Zentimeter
CMV-IE	<i>cytomegalovirus immediate-early</i>
CBFA-1	Kernbindungsfaktor alpha-1 ( <i>core-binding factor 1</i> )
COMP	Kartilaginäres oligomeres Matrixprotein
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii/et aliae</i>

Ets	E-26-transformatiosspezifische Familie der Transkriptionsfaktoren
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2
FGF-2R	Zellmembranrezeptor vom Fibroblastenwachstumsfaktor 2
FGF-18	Fibroblastenwachstumsfaktor 18 ( <i>Sprifermin</i> )
g	Gramm
GDF-5	Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5 ( <i>growth and differentiation factor 5</i> )
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
hFGF-2	Humaner Fibroblastenwachstumsfaktor 2
hIGF-1	Humaner Insulinartiger Wachstumsfaktor I
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
IGF-I	Insulinartiger Wachstumsfaktor I ( <i>insulin-like growth factor I</i> )
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
ITRs	Invertierte terminale Wiederholungssequenzen, <i>inverted terminal repeats</i>
kB	Kilobasenpaar
Kg	Kilogramm
konz.	Konzentriert
<i>LacZ</i>	$\beta$ -Galaktosidase-Gen
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter

mm	Millimeter
MRNS	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger</i> RNS)
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
N	Stichprobengröße
n.b.	nicht bestimmt
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
OCIF	Osteoklasten inhibierender Faktor
OP	Operation
<i>P</i>	Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pg	Picogramm
PH	<i>potentia Hydrogenii</i> (Lat.)
PTHrP	Parathormonähnliches Protein ( <i>parathyroid hormone-related protein</i> )
rAAV	Rekombinantes adeno- assoziiertes Virus
<i>Rep</i>	Replikation
RFP	Rot fluoreszierendes Protein ( <i>red fluorescent protein</i> )
rh-IGF-I	Rekombinanter humaner insulinartiger Wachstumsfaktor I
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SADOA	Langsam wirkende Arthrose-Medikamente
Sek.	Sekunde(n)
ScAAV	Selbst-komplementäres AAV ( <i>self-complementary AAV</i> )

SOX5, 6, 9	Geschlecht-bestimmende Region Y-Typ Gruppe mit hoher Mobilität 5, 6, 9 ( <i>sex-determining region Y-type high mobility group boxes 5, 6, 9</i> )
SV40	Affenvirus 40 ( <i>simian virus 40</i> )
Tab.	Tabelle
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor beta ( <i>transforming growth factor beta</i> )
u.a.	unter anderem/n
Wnt	flügellos/integriert (aktiv) ( <i>Wingless/Integrated</i> )
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNF145	Zink-Finger-Protein 145

## 1. Zusammenfassung

Fragestellung. Die Behandlung fokaler Knorpelschäden ist ein ungelöstes Problem in Orthopädie und Unfallchirurgie. In der vorliegenden Arbeit wurden an einem Modellsystem der Reparatur osteochondraler Defekte in der Trochlea femoris von adulten Kaninchen folgende Hypothesen untersucht: (1) Gentransfer von humanem Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) durch rAAV-Vektoren verbessert die Zellproliferation im Reparaturgewebe von osteochondralen Defekten *in vivo*; (2) Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren verbessert individuelle Parameter der Struktur des knorpeligen Reparaturgewebes von osteochondralen Defekten *in vivo*; (3) Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren verbessert die Reparatur des subchondralen Knochens von osteochondralen Defekten *in vivo*; (4) Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren verbessert den strukturellen Gesamtindex der osteochondralen Reparatur *in vivo*.

Methoden. In die Trochlea femoris von 4 Kaninchen wurde eine zirkuläre osteochondrale Läsion von 3,2 mm Durchmesser gesetzt. In die entstandenen Knorpeldefekte wurden 10 µl rAAV-Vektorlösungen mit Wachstumsfaktoren direkt appliziert. Bei jedem Versuchstier wurde der Defekt auf einer Seite rAAV-hFGF-2

und kontralateral rAAV-*lacZ* (Kontrollgen) eingesetzt. Die Effekte der Anwendung eines rAAV-hFGF-2-Vektors zur Reparatur von osteochondralen Defekten im Kaninchenmodell wurden nach 4 Monaten *in vivo* studiert.

Ergebnisse. Die Daten zeigen signifikante Verbesserungen nach rAAV-hFGF-2-Genstransfer für die Zellproliferation im Reparaturgewebe, und die strukturellen Parameter „Füllung des Defektes“, „Zelluläre Morphologie“ und „Integration“ des kartilaginären Reparaturgewebes. Hingegen fand sich kein signifikanter Unterschied bei der Reparatur des subchondralen Knochens. Das übergeordnete Ergebnis dieser Studie ist die signifikante Verbesserung des strukturellen Gesamtindex der osteochondralen Reparatur nach 4 Monaten *in vivo* durch rAAV-hFGF-2-Genstransfer.

Schlussfolgerung. Ein rAAV-vermittelter hFGF-2-Genstransfer verbessert die strukturelle osteochondrale Reparatur nach 4 Monaten *in vivo* im Kaninchenmodell. Derartige molekulare Therapien könnten in der Zukunft zu verbesserten rekonstruktiven Verfahren für die Behandlung fokaler Knorpelschäden in Orthopädie und Unfallchirurgie führen.

## 1. Abstract

Introduction. The treatment of focal articular cartilage lesions is an unsolved problem in orthopaedics and trauma surgery. In the present work, the following hypotheses were tested in a model system of repair of osteochondral defects in the trochlea femoris of adult rabbits: (1) gene transfer of human fibroblast growth factor-2 (FGF-2) improves cell proliferation in the repair tissue of osteochondral defects via rAAV-mediated gene transfer *in vivo*; (2) gene transfer of human FGF-2 improves individual parameters of the structure of cartilage repair tissue in osteochondral defects via rAAV vectors *in vivo*; (3) gene transfer of human FGF-2 improves the repair of the subchondral bone in osteochondral defects via rAAV vectors *in vivo*; (4) gene transfer of human FGF-2 improves the overall structural index of osteochondral repair via rAAV vectors *in vivo*.

Methods. An osteochondral lesion of 3.2-mm diameter was created in the trochlea femoris of 4 rabbits. A 10- $\mu$ l rAAV vector solution carrying growth factor sequences was directly applied to the generated defects into the knee joints. Each animal received rAAV-hFGF-2 on one knee joint and rAAV-*lacZ* (control treatment) on the contralateral knee. The effect of applying the rAAV-hFGF-2

vector on the repair of osteochondral defects was examined in the rabbit model after 4 months *in vivo*.

Results. The results show significant improvements upon rAAV-hFGF-2 gene transfer in the cell proliferation indices in the cartilage repair tissue and the structural parameters of "defect filling", "cell morphology", and "integration" of the repair tissue. However, there was no significant difference in the levels of subchondral bone repair. The critical result of the study is the significant improvement of the structural overall index of osteochondral repair after 4 months *in vivo* mediated by rAAV-hFGF-2 gene transfer.

Conclusion. RAAV-mediated hFGF-2 gene transfer improves the structural osteochondral repair after 4 months *in vivo* in a rabbit model of osteochondral defect. In the future, such a molecular therapy may help to enhance the reconstructive techniques for the treatment of focal cartilage damage in orthopaedics and trauma surgery.

## 2. Einleitung, Fragestellungen

### 2.1. Thematik

Eine Knorpelschädigung mit Verlust der Struktur und Funktion des Gelenkknorpels verursacht häufig Schmerzen und eine Einschränkung der Beweglichkeit des betroffenen Gelenkes. Am häufigsten tritt diese klinische Symptomatik bei der Arthrose auf. Es kann aber auch nach fokalen Gelenkknorpelverletzungen oder im Rahmen von Entwicklungs-, Stoffwechsel- und Entzündungskrankheiten auftreten, welche jeweils die Gelenkoberfläche zerstören und konsekutiv eine sekundäre Arthrose indizieren [Buckwalter 1997]. Die Behandlung dieser fokalen Knorpelschäden ist seit langem ein ungelöstes Problem und Gegenstand von wissenschaftlichen Untersuchungen.

Die Anwendung des Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) erscheint vielversprechend um die Knorpelreparatur zu verbessern. Allerdings reduziert die sehr kurze intraartikuläre Halbwertszeit dessen therapeutische Wirksamkeit signifikant. Daher ist der Transfer des FGF-2-Gens in Zielzellen des knorpeligen Reparaturgewebes eine attraktive Strategie, um diese therapeutischen Faktoren lokal über einen klinisch relevanten Zeitraum zur Verfügung

zu stellen. Rekombinante adeno-assoziierte virale (rAAV)-Vektoren sind eine besonders gut geeignete Klasse von Gentransfer-Vektoren, da sie hocheffizient und gleichzeitig nicht toxisch und sehr wenig immunogen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob der Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren sowohl die Chondrozytenproliferation als auch die Reparatur von osteochondralen Defekten in einem Kaninchenmodell *in vivo* verbessert.

## 2.2. Der hyaline Gelenkknorpel und die Chondrozyten

Die Oberfläche des hyalinen Gelenkknorpels ist glatt und reibungsfrei, so dass eine freie Beweglichkeit der Gelenkanteile ermöglicht wird. Der hyaline Knorpel ist elastisch und gleichzeitig sehr stabil. Er besteht aus Chondrozyten und einem Matrixgewebe. Der Anteil der Zellen im hyalinen Knorpelgewebe beträgt etwa 1-10% [Regling 1994, Rudert 1998]. Das hyaline Knorpelgewebe ist eine feste Struktur und besteht aus Knorpelzellen und einer extrazellulären Matrix von Proteoglykanen, gebunden zu 70 bis 80% mit Wasser, Typ-II-Kollagen, das 90 bis 95% des Kollagens ausmacht [Rudert 1998], und anderen Molekülen (beispielsweise Typ -VI-, -IX-, -XI- und -XIV-Kollagen, Knorpel oligomeren Matrixprotein (COMP), Decorin, Fibromodulin, Fibronectin, Tenascin) [Frisch 2014a; Frisch 2014b], die lebenslang den mechanischen Beanspruchungen Stand halten soll.

Die Chondrozyten ernähren sich primär über die Synovialflüssigkeit. Sie produzieren Kollagene und Proteoglykane, die die Grundsubstanz des Knorpelgewebes darstellen. Im Kindesalter besitzen die Chondrozyten die Fähigkeit sich zu teilen, im Erwachsenenalter geht ihre mitotische Aktivität verloren. Die Fähigkeit zur Produktion und zum Abbau von Matrixgewebe ist in

Chondrozyten dagegen lebenslang vorhanden; sie ist aber mit steigendem Alter in ihrem Ausmaß verringert. Auch die Anzahl von Knorpelzellen reduziert sich während des Lebens. Daraus ergibt sich die geringere Reparaturmöglichkeit des Knorpelgewebes im Erwachsenenalter.

Dieses komplexe extrazelluläre Netzwerk aus Kollagen, Proteoglykanen und Wasser mit den darin eingebetteten Knorpelzellen steht unter konstanter Beanspruchung seiner Tragfähigkeit und der Bewegungsmöglichkeiten. Gelenkknorpel hat auch eine protektive Wirkung auf den subchondralen Knochen bei diarthrotischer Belastung, Reibung, oder Stoßen [Pascher 2004]. Erwachsener hyaliner Gelenkknorpel, der sanftes Gleiten und Gewichtsbelastung ermöglicht, ist ein aneurales und avaskuläres Gewebe, ohne eine lymphatische Drainage [Venkatesan 2012].

Der hyaline Knorpel ist in vier verschiedene Schichten unterteilt [Rudert 1998] (siehe Abb. 1). Die oberste Schicht „Lamina splendens“ (Superficialzone), die im Folgenden Zone I genannt wird, ist die Gelenkoberfläche. Sie besteht aus zahlreichen kollagenen Fasern, die parallel zur Knorpelfläche liegen. Diese Schicht verhindert den Flüssigkeitseintritt in das Knorpelgewebe und fördert jedoch die Diffusion der Glukose aus umgebender Synovialflüssigkeit und somit auch die Versorgung des Gewebes. Somit besitzt

sie eine Barrierefunktion. Die Zone II des Gelenkknorpels ist die „Tangentialzone“ und besteht aus parallel zur Knorpelfläche wachsenden kollagenen Fasern und spindelförmig angeordneten Chondrozyten, deren Dichte höher ist, als in den tieferen Schichten. Die darunter folgende Zone III („Radiärzone“) enthält Chondrozyten in ovaler Form, die oft in Gruppen zusammen liegen. Dicht angelegte kollagene Fasern und die Knorpelzellen liegen senkrecht zur Gelenkoberfläche. Die Grenzlinie, der sogenannte *Tide-mark*, ist eine histologische Grenze zwischen Radiär- und Mineralisationszone. Diese Linie ist gut unter dem Mikroskop zu erkennen. Die über dem subchondralen Knochen liegende Zone IV, die „Mineralisationszone“ oder Zone des kalzifizierten Knorpels genannt wird, enthält zum einen hypertrophische Chondrozyten, die am Calciumstoffwechsel beteiligt sind, und zum anderen senkrecht zur Gelenkfläche laufende Kollagenfibrillen. Die Knorpelzellen haben in der Mineralisationszone keine einheitliche Anordnung. Diese Schicht bildet über die Zementlinie eine feste Verbindung zwischen Knorpel- und Knochengewebe.

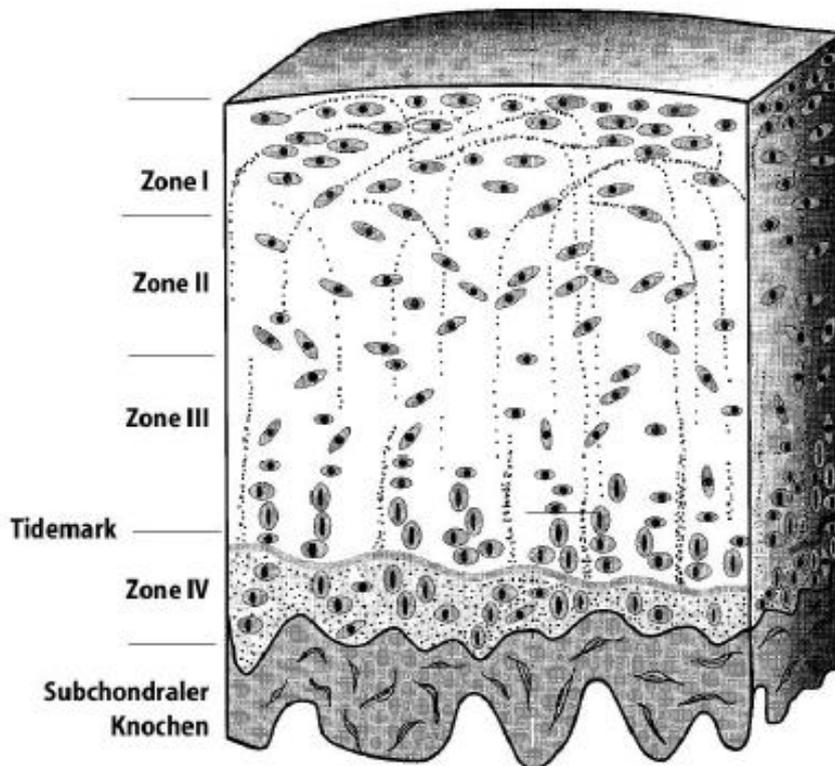


Abb. 1: Zonen des Gelenkknorpels (modifiziert aus Rudert M. *et al.* 1998). Zonen des Gelenkknorpels im Querschnitt: Zone I (Superficialzone), Zone II (Tangentialzone), Zone III (Radiärzone), Zone IV (Zone des mineralisierten Knorpels). Die gestrichelten Linien zeigen den arkadenartigen Verlauf der Kollagenfasern. Die Chondrozyten sind entlang dieser Fasern in den einzelnen Schichten ausgerichtet.

Auch die Chondrozyten besitzen unterschiedliche Formen, Größe, Aktivität und Funktion, abhängig von ihrer Lage im Knorpel. Die nahe der Oberfläche liegende Tangentialzone, die ständig mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt ist, beinhaltet elongierte, inaktive oder weniger aktive Knorpelzellen. Sie sind in parallel zu Oberfläche liegenden Kollagenfibrillen eingewebt. Spheroidale

Chondrozyten aus der Radiärzone sind stoffwechselaktiv und beteiligen sich am Ein- und Umbau von Matrixgewebe. Die Knorpelzellen in der Mineralisationszone sind hypertrophisch, sie lagern Calciumkristalle im Gewebe ein und fördern somit eine feste Verankerung zwischen chondralem Gewebe und subchondralem Knochen.

### **2.3. Ätiologie der Knorpeldefekte**

Plötzliche und unerwartete Bewegungen, Torsionsbelastungen oder akute und wiederholte Stöße führen zu hohen Belastungen für stabilisierende Gelenke und können Gelenkflächenverletzungen verursachen [Buckwalter 1998]. Eine derartige Knorpelschädigung mit Verlust der Struktur und Funktion des Gelenkknorpels verursacht häufig Schmerzen und eine Einschränkung der Beweglichkeit des betroffenen Gelenkes. Am häufigsten tritt diese klinische Symptomatik bei der Arthrose auf. Es kann aber auch nach fokalen Gelenkknorpelverletzungen oder im Rahmen von Entwicklungs-, Stoffwechsel- und Entzündungskrankheiten auftreten, welche jeweils die Gelenkoberfläche zerstören und konsekutiv eine sekundäre Arthrose indizieren [Buckwalter 1997]. Solche degenerativen Veränderungen des Gelenkknorpels sind oft die Folge von

chronischer Polyarthritits oder Psoriasisarthritis. Andere Ursachen beinhalten Gelenkknorpeldefekte als eine Folge von metabolischen Störungen wie aseptische Knochennekrosen, Osteochondrosis dissecans, aber auch posttraumatische Gelenkschädigungen, Achsfehlstellungen, sowie bakterielle und abakterielle Gelenkentzündungen. Jede fokale Verletzung des Knorpelgewebes bei Erwachsenen kann potentiell eine Arthrose im benachbarten Knorpelgewebe bewirken, was letztendlich auch zu einer Knorpeldestruktion führt [Madry und Kohn 2004; Madry 2011; Orth 2014].

Die von fokalen Knorpelschäden abzugrenzende Arthrose ist eine chronische degenerative Erkrankung des diarthrotischen Gelenkes [Orth 2014], die Millionen Menschen weltweit betrifft. Arthrose ist hauptsächlich durch eine allmähliche, irreversible Degeneration des Gelenkknorpels mit dem Verlust ihrer Hauptmatrixkomponenten (Proteoglykane, Typ-II-Kollagen) gekennzeichnet, mit Umbau und Sklerose im subchondralen Knochen und der Bildung von subchondralen Knochenzysten und Randausziehungen [Buckwalter 1997; Buckwalter 1998; Weimer 2012]. Arthrose hat eine multifaktorielle Genese und ist durch genetische, mechanische und Umweltfaktoren beeinflusst [Madry 2016].

## **2.4. Einteilung der Knorpeldefekte**

In fokalen Knorpeldefekten wird die strukturelle Integrität des Gelenkknorpels in umschriebenen Bereichen durchbrochen. Es werden ein chondraler Gelenkknorpeldefekt bei begrenzter Verletzung des Knorpels oder ein osteochondraler Defekt, wenn die Verletzung weiter den subchondralen Knochen erreicht [Orth 2013; Orth 2014]. Es wurde festgestellt, dass es altersbedingte Unterschiede bei dem Muster der Gelenkflächenverletzungen gibt. Die Gelenkknorpelfrakturen, assoziierte mit der Teilnahme am Sport, treten in der Regel bei den erwachsenen Personen auf, dagegen osteochondrale Frakturen nach Sportverletzungen finden sich typischerweise bei unreifen Personen oder jungen Erwachsenen [Buckwalter 1998].

## **2.5. Das Problem der Reparatur oder Regeneration von Knorpeldefekten**

Der Gelenkknorpel hat eine begrenzte Kapazität zur Reparatur oder Regeneration. Knorpelverletzungen führen daher zu Knorpelverlust und können nur mit Ersatzgewebe ausgefüllt werden, die-

weniger belastbar sind, und die die Funktion des hyalinen Knorpelgewebes nicht vollkommen ersetzen können [Madry 2011].

Im Wachstumsalter besitzen die Chondrozyten eine relativ hohe mitotische Aktivität, was die Heilung von Knorpelschäden fördert. Mit dem Alter verlieren Knorpelzellen ihre Fähigkeit sich zu teilen. Außerdem besitzt der Gelenkknorpel im Erwachsenenalter keine Blutgefäße. Letzte wird durch die Anwesenheit im Knorpelgewebe von zahlreichen antiangiogenen Faktoren verursacht [Madry 2017]. Die Ernährung der Chondrozyten erfolgt durch Diffusion aus der Gelenkflüssigkeit. Aufgrund seiner aneuralen und avaskulären Natur und in der Abwesenheit einer Lymphdrainage hat der Gelenkknorpel nur beschränkt Zugriff auf reparative Zellen, die in nahezu allen anderen Geweben als Antwort auf Verletzung potenziell gebracht werden [Frisch 2014a].

Sobald die Degeneration des Gelenks beginnt, schreitet sie in der Regel unaufhaltsam fort, wodurch zunehmende Schmerzen und Verlust der Beweglichkeit trotz versuchter Reparatur der Gelenkfläche entstehen [Mankin 1996]. Knorpeldefekte heilen somit nicht vollständig und können letztendlich zur Arthrose führen.

Während der ursprüngliche hyaline Gelenkknorpel reich an anti-angiogenen Proteinen ist, weist knorpeliges Reparaturgewebe solche Faktoren nicht auf, was zu einer partiellen Vaskularisierung des Reparaturgewebes führen kann [Madry 2017]. Die Knorpelreparatur resultiert in einem Gewebe, das strukturelle Ähnlichkeiten mit hyalinem Gelenkknorpel hinsichtlich makroskopischen Aspekt oder Zelltyp teilt [Buckwalter 1997; Buckwalter 1998; Orth 2014]. Im Gegensatz dazu definiert man die Knorpelregeneration als eine *Restitutio ad integrum* des Gelenkknorpels in den histologischen, biochemischen und biomechanischen Ebenen, so dass es nicht von dem benachbarten unverletzten Knorpel unterscheidet [Buckwalter 1997; Buckwalter 1998; Orth 2014]. Regeneration von Geweben tritt beschränkt nur in Embryonen auf, ist fast nicht vorhanden bei Neugeborenen (obwohl einige regenerative Ereignisse berichtet wurden), und wird nie bei Erwachsenen beobachtet [Caplan und Goldberg 1999; Orth 2014]. Die Ursache dafür ist ein relativ hoher Anteil der undifferenzierten Vorläuferzellen in Embryonen und ihre Knappheit bei Erwachsenen. Außerdem ist das embryonale Knorpelgewebe zellreicher als der adulte Knorpel [Caplan und Goldberg 1999].

Die Reproduktion der ursprünglichen Organisation und Aktivitäten im verletzten Knorpel bleibt somit weiterhin unvollständig und

problematisch. Das Reparaturgewebe ist primär ein Faserkorpel, der aus Typ-I-Kollagen besteht. Es entsteht kein Ersatzgewebe mit gleichen Eigenschaften und Funktionen des chondralen Gewebes. Häufig ist dieses Reparaturgewebe nicht gut mit dem umgebenden Knorpel integriert, und kann nur schlecht der mechanischen Belastung im Gelenk widerstehen [Buckwalter 1998; Frisch 2014b; Orth 2014]. Seitens des subchondralen Knochens entwickelt sich zudem im Verlauf der Reparatur unter anderem eine Aufwärtswanderung der subchondralen Knochenplatte, was mit einem fortlaufenden Abbau der Gelenkknorpelschicht und zu einer Verlängerung der subchondralen Knochenplattenvolumen in der Knorpelreparaturgewebe in Verbindung gebracht wird [Orth 2013]. Läsionen, die aus akuten Trauma oder degenerativen arthrotischen Veränderungen resultieren, persistieren und schreiten im Laufe der Zeit fort [Frisch 2014a].

## **2.6. Klinische Therapiestrategien bei fokalen Knorpelschäden**

Die Behandlung von fokalen Knorpelschäden ist seit langem ein ungelöstes Problem in der Orthopädie und Unfallchirurgie und Gegenstand von wissenschaftlichen Untersuchungen. Trotz der Verfügbarkeit von verschiedenen pharmakologischen Behandlungen

gen und chirurgischen Optionen regenerieren Defekte im Gelenkknorpel nicht [Cucchiaroni und Madry 2014]. Es existiert eine ganze Reihe von therapeutischen Möglichkeiten der Gelenkknorpelverletzungen, die je nach Erkrankung und Krankheitsstadium sich unterscheiden, aber viele von ihnen führen langfristig nicht zu gewünschtem Ergebnis oder sind noch nicht vollständig erforscht, um eingesetzt zu werden.

Klinische Therapiestrategien bei Knorpelschäden werden in konservative und operative Behandlungsmethoden unterteilt. Nicht-invasive Therapieformen wie Gewichtsreduktion und Lebensstiländerung, Traingstherapie, Physiotherapie, Ergotherapie, Balneotherapie, Elektrotherapie, orthetische Versorgung, Schmerzmedikation, steroidale und nichtsteroidale Antiphlogistika, bei starken Schmerzen Opioidgabe, Gelenkinjektionen mit Kortikoiden in der Akutphase können die Symptome verringern und die Beweglichkeit im geschädigten Gelenk verbessern, aber keine Veränderung im Verlauf der Krankheit nachweisen [Mankin 1996] und nicht zu langfristiger Heilung führen. Kausale pharmakologische Konzepte zur Arthrotherapie die Medikamentengruppe SADOA (*slow acting drugs in osteoarthritis* übersetzt „langsam wirkende Arthrosetherapeutika“) wie Glukosamin, Chondroitin, Hyaluronsäure und

Diacerein sollen die Knorpeldegeneration verlangsamen, jedoch ist die Evidenzlage niedrig [Madry 2011].

Rekonstruktiv-operative Behandlungsmethoden der fokalen Knorpelverletzungen (Arthroskopie, markraumeröffnete Verfahren wie Pridie-Borung, Mikrofrakturierung, Abrasionsarthroplastik) und Polynukleotid-Gel führen nicht immer zu den gewünschten und langfristigen Ergebnissen. Auch autologe Chondrozytentransplantation, Transplantation von adulten mesenchymalen Stammzellen (MSZ) und autologe osteochondrale Transplantate werden zur Reparatur von Knorpelläsionen verwendet. Eine Umstellungsosteotomie ist beispielweise bei unilateraler Gonarthrose indiziert, damit wird die Beinachse korrigiert, um die einseitigen Belastungen des Kniegelenkes zu beseitigen und damit die beschädigte Knorpelgelenkanteile entlasten. Chirurgisch-rekonstruktive Verfahren können die Gelenkfunktion verbessern und damit die Anbau von Gelenkberflächenersatz hinauszögern [Madry 2011], aber sie können nicht zu Wiederherstellung eines normalen Knorpelgewebes führen. Optimale Ergebnisse der Therapie kann man allerdings nur dann erwarten, wenn sie zur Regeneration von Knorpelgewebe führt.

Resektion der degenerativen Gelenke und Ersatz dieser Gelenke mit Implantate aus Polyethylen, Metall oder einem anderen synthetisch gefertigten Material lindert die Schmerzen und verbessert die Funktion. Jedoch haben diese Verfahren wichtige Einschränkungen vor allem für junge, aktive Patienten, weil sie keine Gelenkwiederherstellung ermöglichen, sondern ein Oberflächenersatz mit den mechanischen Eigenschaften. Die Lebensdauer des Implantates ist u.a. wegen der Abnutzung der Implantatsflächen begrenzt, so dass nach einem bestimmten Zeitraum möglicherweise ein Implantatwechsel nötig ist.

## **2.7. Experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten**

Wachstumsfaktoren stellen einen exogenen Reparaturstimulus zur Verfügung, der die Chondrogenese verbessert und die Zellpopulation erhöht. Unterschiedliche Faktoren haben verschiedene Auswirkungen auf Chondrozyten und das Knorpelgewebe insgesamt. Therapeutische Faktoren zur Heilung von Knorpeldefekten stehen in den letzten Jahren im Mittelpunkt der Forschung.

Es existieren unterschiedliche potentielle therapeutische Kandidaten, wie (insulinartiger Wachstumsfaktor I, IGF-I; Fibroblastenwachstumsfaktor 2, FGF-2; knochenmorpho-genetische Proteine 2, 4 und 7, BMP-2, BMP-4 und BMP-7; Wachstums- und Differenzierungsfaktor 5, GDF-5; transformierender Wachstumsfaktor beta, TGF- $\beta$ ; parathormonähnliches Protein, PTHrP; geschlechtbestimmende Region Y-Typ Gruppe mit hoher Mobilität 9, SOX9), die die zelluläre Funktion von Chondrozyten verbessern und die Knorpelregeneration stimulieren, allein oder in Kombination mit *Interleukin-1* Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra) und *Chondromodulin 1* (Chm-1) [Goomer 2001; Cucchiarini und Madry 2005; Madry 2006; Cucchiarini 2007; Yuan und Bi 2012; Cucchiarini 2013; Madry und Cucchiarini 2013; Cucchiarini und Madry 2014]. Einige stimulieren mehr die mitotische Aktivität, andere verbessern die synthetischen Eigenschaften von Knorpelzellen, was zu Kollagen- und Proteoglykananreicherung im Matrixgewebe führt [Cucchiarini und Madry 2005; Madry 2006; Madry und Cucchiarini 2013]. SOX9 stimuliert die biologische Aktivität der Knorpelzellen *in vitro* und im Laufe der Zeit *in vivo*, ist ein Schlüsselregulator der Chondrozytendifferenzierung und Knorpelbildung [Venkatesan 2012]. Bemerkenswert ist, dass SOX9-Anwendung eine vorzeitige terminale Differenzierung und Hypertrophie in neu gebildetem Knorpel verzögert [Venkatesan 2012; Cucchiarini 2013]. Die verschiedenen Mitglieder der

BMP-Familie induzieren die Proliferation und Differenzierung von undifferenzierten MSZ zur Knorpel- und Knochenbildung [Yuan und Bi 2012]. IGF-I stimuliert die Mitose sowie Typ-II-Kollagen- und Proteoglykansynthese [Mi 2000; Weimer 2012; Frisch 2014a]. TGF- $\beta$  stimuliert sowohl die Proteoglykansynthese von Chondrozyten [van Beuningen 1994; van Osch 1998; Venkatesan 2013], als auch das Wachstum von Knorpelzellen [Yonekura 1999; Venkatesan 2013] und Bildung der extrazellulären Matrix [Yonekura 1999]. TGF- $\beta$  inhibiert das Wachstum von epithelialen und endothelialen Zellen [Yonekura 1999] und osteoklast-ähnlichen Zellen *in vitro*, indem er den osteoklasten inhibierenden Faktor (OCIF) der Boten-Ribonukleinsäure (mRNS) in primären Osteoblasten und auch in anderen klonalen Zellen erhöht [Murakami 1998]. Gleichzeitig stimuliert er die endochondrale Ossifikation und Knochenformation *in vivo* [Rosen 1994]. Regenerierender Effekt vom TGF- $\beta$  bestand nach intraartikulärer Injektion *in vivo* kurzfristig (nur 2-4 Wochen) [Lee 2001]. Zuletzt wurde dauerhafte rAAV-vermittelte Expression TGF- $\beta$  in menschlichen normalen und arthrotischen Chondrozyten *in vitro* (für mindestens 21 Tage) und *in situ* (für mindestens 90 Tage) erreicht [Venkatesan 2013]. Hier ist die Dauer der Therapie mit TGF- $\beta$  sowie das Auftreten von unerwünschten Wirkungen am ehesten von Art der Anwendung

sowie von der Höhe der angewendeten Dosis des Wachstumsfaktors abhängig [Venkatesan 2013].

## **2.8. Fibroblastenwachstumsfaktoren als vielversprechende Kandidaten für die experimentelle Knorpelreparatur**

Die Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) sind eine Familie von Polypeptid-Wachstumsregulatoren. Ungewöhnlich unter ihren Eigenschaften sind eine hohe Affinität zu dem Glycosaminoglykan Heparin und das Fehlen einer Signalsequenz für Sekretion [D'Amore 1990]. Die Translokation von basischem FGF (FGF-2) auf die Zelloberfläche erscheint selektiv und erfolgt durch unkonventionellen Proteinexportweg [D'Amore 1990; Trudel 2000]. In Anbetracht von diesen Eigenschaften wird FGF-2 immer in der zugehörigen Zelle und in der extrazellulären Matrix gefunden, aber selten in biologischen Flüssigkeiten [Trudel 2000]. FGF-2 ist ein der stärksten Polypeptidfaktoren, der das Wachstum einer Vielzahl von mesodermal abgeleiteten Zellen stimuliert [Gospodarowicz und Mescher 1977]. FGF-2 ist ein Mitglied der FGF-Polypeptidfamilie mit vielfältigen biologischen Aktivitäten und ein sehr potenter Induktor der DNS-Synthese in einer Vielzahl von normalen diploiden Säugerzelltypen [Burgess und Maciag 1989].

FGF-2 ist ein biologisch aktives Protein, das eine hochspezifische Affinität zu seinem Zellmembranrezeptor (FGF-2R) hat. Schon in früheren Studien wurde festgestellt, dass FGF-2 ein Mitogen für mesodermal abgeleitete Zellen ist: für Hornhaut-Endothelzellen und isolierten Chondrozyten der epiphysären Wachstumsplatte [Gospodarowicz und Mescher 1977], für Myoblasten und Chondrozyten *in vitro* [Gospodarowicz 1977]. Außerdem wird die mitogene Wirkung von FGF-2 auf Chondrozyten durch Glukokortikoide potenziert [Gospodarowicz und Mescher 1977]. Zudem hat FGF-2 eine morphogene Fähigkeit [Kato und Gospodarowicz 1984]. FGF-2 stimuliert und stabilisiert die phänotypische Expression von Chondrozytenkulturen niedriger Dichte, einhergehend mit einer erhöhten Synthese vom hochmolekularen Proteoglykanen [Kato und Gospodarowicz 1985]. Außerdem wurde bestätigt, dass FGF-2 vor allem in Chondrozyten vorkommt [Luan 1996]. Er wird insbesondere von proliferativen Chondrozyten synthetisiert und in die extrazelluläre Matrix freigesetzt [Luan 1996].

FGF-2 ist kein zirkulierendes Peptid, sondern ein lokaler autokriner und parakriner Faktor in der proliferativen Zone der Chondrozyten, der die chondrogene Mitogenese kontrolliert [Luan 1996]. Zudem spielt FGF-2 eine leistungsfähige angiogene und neurotrophische Rolle [Trudel 2000]. FGF-2 ist ein potentieller Faktor, der

beim Gentransfer eingesetzt wird, die Zellproliferation verbessert und zur Reparatur von Knorpelschäden führen kann [Cucchiarini und Madry 2005; Cucchiarini 2005; Cucchiarini 2009; Madry und Cucchiarini 2013]. Frühere Experimente zeigten bereits, dass der FGF-2-Gentransfer die mitotische Aktivität von Chondrozyten erhöht [Cucchiarini 2005; Cucchiarini 2009] und von Chondrozyten vor allem zur zellulären Repopulation in geschädigtem Knorpelgewebe führt [Cucchiarini 2005]. Besonders in frühen Stadien der Arthrose (*Osteoarthritis Research Society International* [www.oarsi.org](http://www.oarsi.org) - OARSI Grad 1 und 2), wenn noch keine volle Knorpelzerstörung vorliegt, existiert ein frühes therapeutisches Fenster für die Wiederherstellung der beschädigten Zelloberfläche durch Überexpression von Genen, die anaboles Wachstum erhöhen und Zellproliferation steigern, unter anderem durch FGF-2 [Madry und Cucchiarini 2013]. Außerdem gehört FGF-2 zu den therapeutischen Kandidatsequenzen, die eine chondrogene Differenzierung von aus humanem Knochenmark abgeleiteten MSZ fördern [Cucchiarini 2011; Frisch 2014a]. Klinisch konnte der Wachstumsfaktor FGF-18 (*Sprifermin*) in prospektiv-randomisierten Studien dosisabhängig signifikant den Verlust des lateralen femoro-tibialen Knorpels bei Patienten mit symptomatischer Gonarthrose reduzieren [Lohmander 2014; Dahlberg 2016]. Limitiert wird dieser Ansatz durch die häufig kurze Halbwertszeit

von FGF-2 [Chuma 2004]. Beispielsweise ist der Nachweis von FGF-2 in der Synovialflüssigkeit bereits eine Stunde nach intraartikulärer Injektion nicht mehr möglich [Shida 1996].

## **2.9. Gentransfer-basierte Therapie fokaler Knorpeldefekte**

Gentransfer ist das Einschleusen von fremden Genen mit Hilfe von Vektoren in somatische Zellen [Madry 2002; Cucchiarini 2005; Cucchiarini und Madry 2005; Madry 2006; Cucchiarini 2007; Cucchiarini 2009a; Cucchiarini 2009b; Cucchiarini 2011; Venkatesan 2012; Weimer 2012; Cucchiarini 2013; Madry 2013; Venkatesan 2013; Cucchiarini und Madry 2014; Frisch 2014a]. Die Möglichkeit, DNS-Sequenzen der therapeutischen Faktoren in die Zellen einzubringen, welche das Reparaturgewebe bilden, erlaubt, einen lokalen therapeutischen Effekt zu erzielen [Cucchiarini und Madry 2005].

Aktuelle experimentelle Untersuchungen auf dem Gebiet der Knorpelreparatur suchen nach dem optimalen Gentransfersystem, das gute und dauerhafte therapeutische Ergebnisse erzielt, und möglichst keine Immunantwort hervorruft [Cucchiarini und Madry 2005; Madry 2006; Madry und Cucchiarini 2013]. Man unterschei-

det nichtvirale und virale Gentransfersysteme. Der Gentransfer mit nichtviralen Vektoren bezeichnet man als Transfektion, der Gentransfer mit viralen Vektoren nennt man Transduktion. Nichtvirale Vektoren basieren auf Plasmiden (zirkuläre doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Moleküle), die grundsätzlich in eine Zielzelle durch Lipidsuspension eingeschleust werden. Dieser Sachverhalt hat den Vorteil, dass nichtvirale Vektoren nicht toxisch sind, wobei aber die Effektivität des Gentransfers in den Zielzellen eher niedrig ist. Potentielle Vorteile für nicht-virale Transfektionssysteme sind die niedrigeren Kosten, aber die langfristige Transgen-Expression ist geringer als bei adenoviralen System [Dinser 2001]. Beispielsweise die Transduktion mit adenoviralen Vektoren in kultivierten primären Rinder-Chondrozyten (analysiert durch Fluoreszenzmikroskopie) war mit 82% Effizienz deutlich höher als Plasmid-Transfektion mit ca. 42% [Dinser 2001]. Neuere Studien belegen, dass lipid-basierte Systeme für Chondrozyten und MSZ mit 35-40% relativ geringere Wirksamkeit haben, verglichen mit der Anwendung von viralen Vektoren [Madry und Cucchiariini 2013]. Im Gegensatz dazu werden virale Vektoren von Viren abgeleitet (meistens werden dafür verwendet: Retroviren, Lentiviren, Adenoviren und adeno-assoziierte Viren (AAV)) [Cucchiariini und Madry 2005; Madry und Cucchiariini 2013; Frisch 2014b]. In diesen Vektoren werden die viralen Sequenzen teilweise oder vollständig

durch eine therapeutische Genauswahl ersetzt. Durch spezielle Rezeptoren erreichen die fremden Gene die Zellen. Gentransfer erhöht die Expression von therapeutischen Gene in Gelenkspalt, vermindert potentielle nebenseitiger Effekt auf systemische Applikation und Bedürfniss von oft wiederholten Dosen [Mi 2000]. Bei retroviralen Vektoren hat sich gezeigt, dass eine Zellteilung nötig ist, jedoch teilen sich adulte Chondrozyten nicht mehr [Cucchiarini und Madry 2005; Madry und Cucchiarini 2013]. Adenovirale Vektoren infizieren zwar sowohl teilende, als auch nichtteilende Zellen, sind aber sehr immunogen und erlauben keine Expression von langen, therapeutisch ausgewählten Genen [Cucchiarini und Madry 2005]. Sie zeigen nur vorübergehende Gen-Transfereffizienz [Venkatesan 2012].

Aus diesem Grund fokussiert man sich zunehmend auf eine neue Klasse von Vektoren als Träger für eine fremde Gensequenz, die rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren (rAAV-Vektoren). Der rAAV-Vektor stammt aus dem apathogenem AAV aus der Familie der Parvoviridae [Berns und Linden 1995]. AAV ist ein einzelsträngiges DNS-Parvovirus, das sich in das Wirtsgenom in einer nicht onkogenen Sequenz integrieren kann oder als Episom (nicht integriert) vorliegt. Entfernung von allen viralen protein-codierten Sequenzen (96% von Genom) verhindert Bildung von

Wild-Type AAV und immune Reaktion [Xiao 1997; Cucchiarini und Madry 2005; Madry und Cucchiarini 2013]. Außerdem besitzt AAV keine eigenständige Infektiosität. AAV besitzt 2 Kodierungssequenzen, eine zur Replikation (*rep*) und eine zur Einkapselung (*cap*), die wiederum von 2 nichtkodierenden, regulierenden invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITRs, *inverted terminal repeats*) eingeschlossen sind (siehe Abb. 2).

In rAAV-Vektoren sind alle kodierten viralen Gene durch eine gewünschte Transgencassette (Promotor-therapeutisches Gen-Polyadenylierungssignal) ersetzt (siehe Abb. 2). Aufgrund dessen sind rAAV-Vektoren nicht toxisch und auch sehr wenig immunogen [Xiao 1997; Cucchiarini 2005; Cucchiarini und Madry 2005; Madry und Cucchiarini 2013; Frisch 2014a; Frisch 2015]. Der Vorteil von rAAV-Vektoren im Vergleich zu den retroviralen Vektoren ist, dass sie sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen [Xiao 1997; Cucchiarini und Madry 2005] mit einer sehr hohen Effizienz transduzieren können.

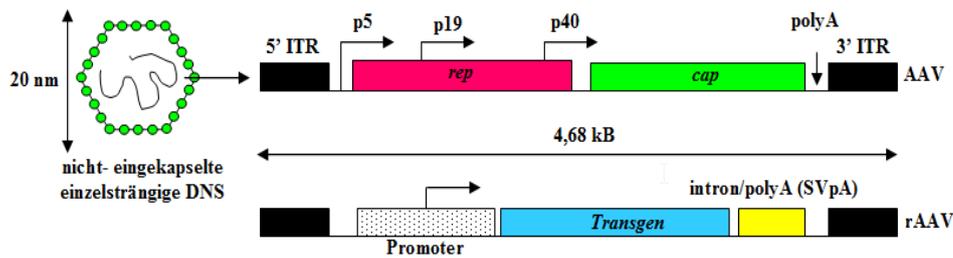


Abb. 2: AAV- und rAAV-Vektor-Genome.

Die Tatsache, dass rAAV sich nicht teilende Zellen transduzieren kann, macht diese Vektoren attraktiv für die Genübertragung *in vivo* [Evans 2001; Cucchiarini und Madry 2005; Madry und Cucchiarini 2013].

Wie in einem aktuellen Artikel beschrieben, können stabile, episomale rAAV-Transgene bei Expression eine hohe Effizienz in nicht-teilenden Chondrozyten (bis zu 95%) und in dividierten Zellen (MSZ) (65-92%) zeigen und das für längere Zeiträume (mindestens 150 Tage *in situ*) [Madry und Cucchiarini 2013].

Bei rAAV-Vektoren hat sich eine effiziente und fortwährende Expression der Markergene ( $\beta$ -Galactosidase-Gen, *lacZ*; rotes Fluoreszenzprotein, RFP) [Cucchiarini 2003a] in humanem Gelenkknorpel und Chondrozyten gezeigt [Madry 2003a]. Permissivität der Zellen für die rAAV-Vektoren wird gestattet durch Wechselwirkungen zwischen den rAAV-2-Vektor Teilchen und der Heparinsul-

fatproteoglykan, ein Zelloberflächenrezeptor, der ubiquitär in allen eukaryontischen Zellen exprimiert ist [Madry 2013].

## 2.10. Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem Modellsystem der Reparatur von osteochondralen Defekten in der Trochlea femoris von adulten Kaninchen folgende Hypothesen untersucht:

- (1) Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren verbessert die Zellproliferation im Reparaturgewebe von osteochondralen Defekten *in vivo*.
- (2) Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren verbessert individuelle Parameter der Struktur des knorpeligen Reparaturgewebes von osteochondralen Defekten *in vivo*.
- (3) Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren verbessert die Reparatur des subchondralen Knochens von osteochondralen Defekten *in vivo*.
- (4) Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren verbessert den strukturellen Gesamtindex der osteochondralen Reparatur *in vivo*.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien

<b>Lösungen, Puffer und Medien</b>	<b>Bestandteile von Lösungen</b>
Fixierlösung	10% Formaldehyd-Lösung (Otto Fischar GmbH)
Entkalker-Lösung	Natriumcitrat-Ameisensäure-Lösung: Lösung A (100 ml) mit Lösung B (100 ml)  Lösung A: - Natriumcitrat (Sigma) (20 g) - destilliertes Wasser (100 ml)  Lösung B: - 90% Ameisensäure (Sigma) (50 ml) - destilliertes Wasser (50 ml)
70% Ethanol	- 100% Ethanol (Roth) (70 ml) - destilliertes Wasser (30 ml)
80% Ethanol	- 100% Ethanol (80 ml) - destilliertes Wasser (20 ml)
95% Ethanol	- 100% Ethanol (95 ml) - destilliertes Wasser (5 ml)
Xylol / Paraffinlösung (1:1)	- Xylol (Pharm. Helv.) (50 ml) - Paraffin (Leica) (50 ml)

Hämatoxylin-Färbelösung	Lösung A (100 ml) mit Lösung B (100 ml)  Lösung A: - Hematoxylin (ICN Biomedicals) (1 g) - 95% Ethanol (100 ml)  Lösung B: - destilliertes Wasser (95 ml) - FeCl <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O (Sigma) (2,48 g) - HCl konz. (Sigma) (1 ml)
Echtgrün-Färbelösung (0,02%)	- Methyl Green (ICN Biomedicals) (0,2 g) - destilliertes Wasser (100 ml)
Safranin O-Färbelösung (1%)	- Safranin O (MP Biomedicals) (1 g) - destilliertes Wasser (100 ml)
Eisessig-Lösung (1%)	- 99,7% Eisessig (Sigma) (1 ml) - destilliertes Wasser (100 ml)

Tab. 1: Zusammensetzung der Lösungen, Puffer und Medien.

### 3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Wärmeschrank (Binder)
- Einbettgerät (EG1140H; Leica)
- Heizplatte (Bergman)
- Weichteilmikrotom (RM2135; Leica)
- Lichtmikroskope (BX45; Olympus)
- Digitalkamera (CC-12, U-TV1X-2; Olympus)
- Objektträger:
  - Gläser (25 x 75 x 1,0 mm; Menzel GmbH)
  - Deckgläser (24 x 50 mm #1; Roth)

### 3.1.3. Computerprogramme/Software

- Adobe Photoshop (Version 7.0.1; Adobe Systems, San Jose, Kalifornien, USA)
- SIS AnalySIS (Olympus, Münster, Deutschland)
- SigmaStat (SYSTAT, Erkrath, Deutschland)

### 3.1.4. rAAV-Vektoren (Plasmide)

Die gewünschte mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure) von humanem FGF-2 wurde durch Frau Prof. Magali Madry isoliert [Seno 1998], in die cDNS (komplementäre DNS) (0,48 kB) umgeschrieben und durch PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert, anschließend in rAAV-Vektoren kloniert (rAAV-hFGF-2-Plasmid) [Cucchiariini 2005].

Im Plasmid rAAV-hFGF-2 steht die hFGF-2-Sequenz unter der Kontrolle vom CMV-IE (*cytomegalovirus immediate-early*) Promoter und dem SV40 (*simian virus 40*) Polyadenylierungssignal (siehe Abb. 3).

Das rAAV-*lacZ* Plasmid [Cucchiariini 2005], welches als Kontrollbehandlung verwendet wurde, trägt das Indikator-Gen *lacZ* (ca.

3,5 kB), das für die  $\beta$ -Galaktosidase codiert und wurde durch Frau Prof. Magali Madry in entsprechender Weise kloniert (siehe Abb. 3).

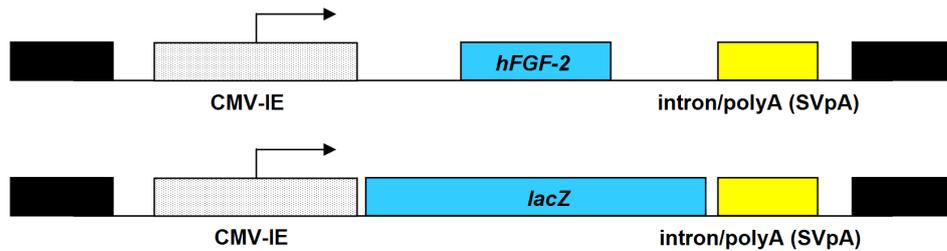


Abb. 3: rAAV-hFGF-2 und rAAV-lacZ Plasmide.

### 3.1.5. Tiermodell

Als Versuchstiere wurden 4 weibliche Kaninchen (*Chinchilla bastard rabbits*;  $2,6 \pm 0,4$  kg; Charles River, Sulzfeld) eingesetzt. Die Tiere wurden im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg (Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger) gehalten. Dort befanden sie sich unter ständiger tierärztlicher Kontrolle und wurden bei entsprechenden hygienischen Bedingungen und mit balancierter Ernährung gehalten.

Zu Versuchsbeginn waren alle Tiere 4 Monate alt. Alle Tierversuche wurden vom Universitätstierausschuss des Saarlandes ent-

sprechend deutschen Richtlinien genehmigt. Die Operationen wurden in dem OP-Saal des Instituts für Klinisch-experimentelle Chirurgie durchgeführt.

Nach dem operativen Eingriff wurden Kaninchen weitere 4 Monate im Tierlabor unter gleichen Bedingungen gezüchtet. Sie konnten sich in Käfigen frei bewegen, es fand also keine Immobilisierung statt.

## **3.2. Methodik**

### 3.2.1. *Packaging* von rAAV-Vektoren

rAAV-hFGF-2-Plasmide (oder rAAV-*lacZ*-Plasmide) wurden eingekapselt mit Hilfe des Helfer-Plasmids pAd8, das - zusammen mit dem Helfer-Adenovirus 5 (um die Expression von pAd8 zu induzieren) - verantwortlich für die Replikation und die Kapsid-Proteine von AAV ist, und in der humanen 293 *Packaging* Zelllinie exprimiert [Cucchiariini 2003b; Cucchiariini 2005].

Die rekombinanten rAAV-hFGF-2- und rAAV-*lacZ*-Vektoren wurden aus den Überständen der 293-Zellkultur ausgereinigt (siehe

Abb. 4). Diese Arbeiten wurden durch Frau Prof. Magali Madry ausgeführt.

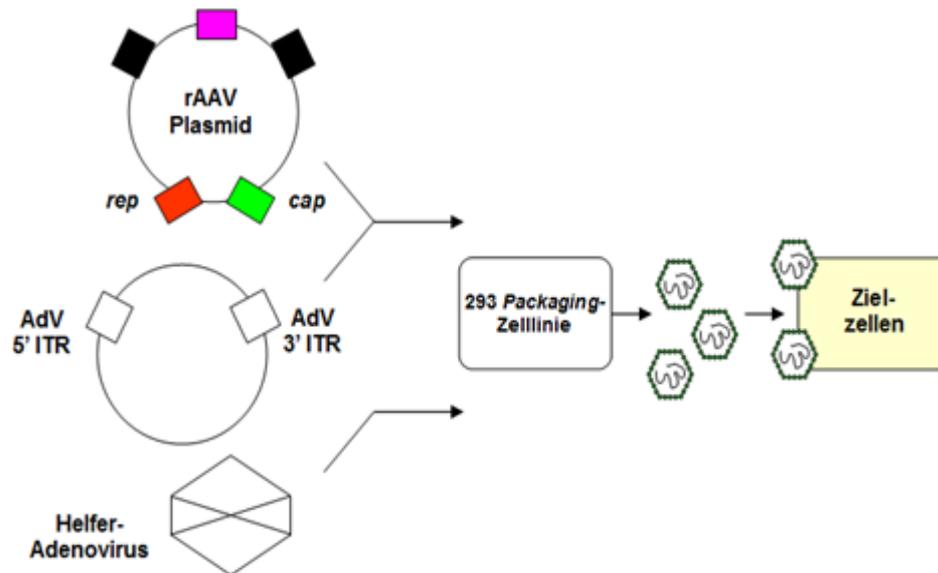


Abb. 4: Produktion von rAAV-Vektoren.

### 3.2.2. Operationsverfahren

Die Eingriffe wurden durch Herrn Prof. Henning Madry unter Vollnarkose durchgeführt. Dazu wurde intravenös Ketanest verabreicht. Zur Verhinderung der Augenaustrocknung wurde Bepanthen-Augensalbe verwendet. Nach vollständiger Narkosewirkung wurden OP-Felder rasiert und mit seinem sterilen OP-Mull abgedeckt. Die Hautdesinfektion des OP-Feldes erfolgte mittels Braunoderm (B. Braun Melsungen AG, Melsungen).

Der Zugang zum Kniegelenk erfolgte über einen minimalinvasiven medialen parapatellaren Zugang. Die Patella wurde nach lateral luxiert. Das Kniegelenk wurde zur besseren Darstellung auf 90° gebeugt. In der Mitte der Trochlea femoris wurde mit Hilfe eines Hohlzylinderbohrers eine osteochondrale Läsion von 3,2 mm äußerem Durchmesser gesetzt (3 mm tief). Für jedes Kniegelenk wurde ein Defekt gesetzt (n = 8 Defekte).

In den entstandenen osteochondralen Defekten wurden 10 µl rAAV-Vektorlösungen mit Wachstumsfaktoren direkt appliziert. Alle Kaninchen wurden beidseitig operiert. Bei jedem Versuchstier wurde der Kniegelenkdefekt auf einer Seite mit rAAV-hFGF-2 und kontralateral mit rAAV-*lacZ* (Kontrollgen) transduziert (siehe Abb. 5). Die Kontrolle und die jeweilige experimentelle Behandlung wurden gleichmäßig auf die rechten und linken Knie verteilt eingesetzt.

Die Defekte wurden durch Reposition der luxierten Patella gedeckt. Die Wunden wurde schichtweise mit Mersilene (Vicryl) der Fädenstärke 3.0 in Einzelknopftechnik verschlossen, die Hautnaht erfolgte intrakutan. Nach der Operation wurde ein Sprühverband eingelegt. Postoperativ erfolgte keine Immobilisierung.

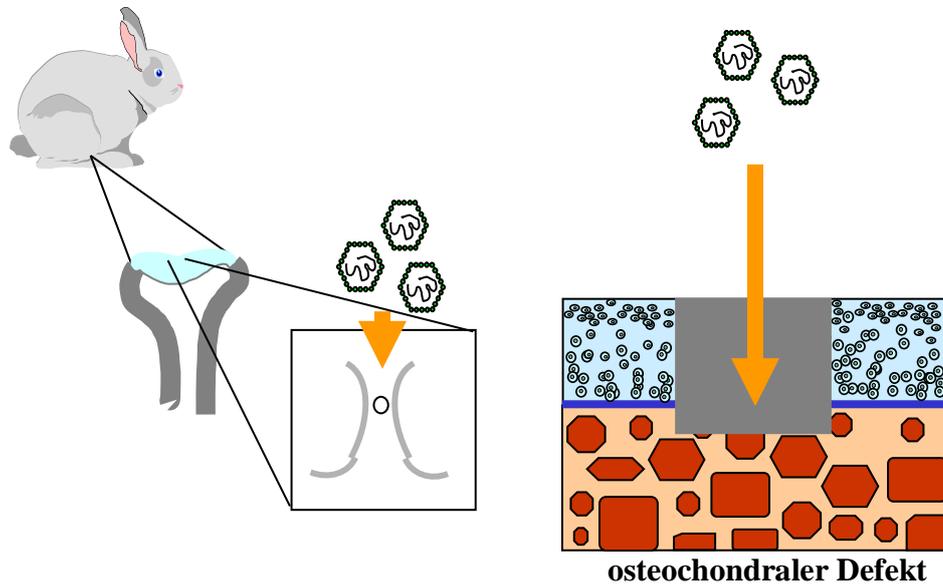


Abb. 5: Gentransfer durch rAAV-Vektoren in osteochondrale Defekten von Kaninchen.

Nach 4 Monaten wurden Proben (Distale Femora mit Reparaturgewebe) entnommen.

### 3.2.3. Histologie

#### *3.2.3.1. Fixierung*

Zur Fixierung wurden die Proben für mindestens 24 h in 10% Formaldehyd-Lösung inkubiert (siehe Tab. 1).

### 3.2.3.2. Entkalkung

Zur Entkalkung wurden die Präparate nach der Fixierung in Natriumcitrat-Ameisensäure-Lösung gegeben (siehe Tab. 1). Bei Präparaten mit einer Größe von ca. 2 cm x 2 cm dauerte die Entkalkung vier Wochen.

### 3.2.3.3. Einbettung

Nach der Entkalkung wurden die Proben entwässert und in Paraffin wie folgt eingebettet:

- |                                |             |                      |
|--------------------------------|-------------|----------------------|
| • 70% Ethanol                  | 1 h         | (RT)                 |
| • 80% Ethanol                  | 1 h         | (RT)                 |
| • 95% Ethanol                  | 1 h         | (RT)                 |
| • 100% Ethanol                 | 2 x 1 h     | (RT)                 |
| • Xylol                        | 2 x 30 Min. | (RT)                 |
| • Xylol / Paraffinlösung (1:1) | 1 h         | (RT)                 |
| • Paraffin                     | über Nacht  | (62°C, Wärmeschrank) |
| • Paraffin                     | 2 x 1 h     | (62°C)               |

#### *3.2.3.4. Anfertigung der histologischen Schnitte*

Nach der Einbettung wurden die Proben in Paraffin bei Raumtemperatur (RT) fixiert, damit das Anfertigen der Schnitte am Mikrotom erleichtert wurde (Paraffin ist geruch- und geschmacklos und hat eine Schmelztemperatur von 50-60°C). Abgekühltes, und somit wieder festes Paraffin kann leicht vom Mikrotom dünn (0,5 µm) geschnitten werden, wobei sich die Gewebeproben dabei nicht verformen. Die Schnitte wurden für kurze Zeit bei 37°C ins Wasserbad gelegt und danach mit Hilfe von feinen Pinseln auf Objektträger aufgetragen. Die histologischen Schnitte wurden im Wärmeschrank bei 70°C für 24 h getrocknet.

#### *3.2.3.5. Färbeverfahren mit Safranin O/Echtgrün und Hämatoxylin*

Nach dem Anfertigen der Gewebeschnitte wurden histologische Färbungen zur morphometrischen Analyse durchgeführt:

→ Safranin O färbt den Knorpel in verschiedenen Rot- und Orangetönen. Die Intensität der Färbung ist von Proteoglykanen im Knorpel abhängig. Bei degenerativen Veränderungen im chondralen Gewebe nimmt der Gehalt von Proteoglykanen ab und die Farbe sieht weniger intensiv aus.

→ Echtgrün färbt den Knochen grün-blau.

→ Hämatoxylin stellt die basophile Strukturen dunkel blau heraus [Böck 1989]. Dadurch sind die Zellkerne, die Nukleinsäuren enthalten, dunkel blau dargestellt.

Die histologischen Schnitte wurden bei Raumtemperatur entparaffiniert und hydriert:

- Xylol 5 Min. (x2)
- 100% Ethanol 2,5 Min. (x2)
- 95% Ethanol 2,5 Min. (x2)
- 80% Ethanol 2,5 Min.

Die Histopräparate wurden gefärbt:

- Hämatoxylin-Färbelösung 2 Min.
- spülen unter fließendem Wasser
- Echtgrün-Färbelösung 4 Min.
- Eisessig-Lösung (1%) 3x kurz eintauchen
- Safranin O-Färbelösung 30 Min.

Die Histopräparate wurden wieder dehydriert:

- 80% Ethanol 30 Sek.
- 95% Ethanol 30 Sek. (x2)

- 100% Ethanol 30 Sek. (x2)
- Xylol 5 Min. (x2)

Die Histopräparate wurden eingedeckt:

Dafür wurde das Einschlußmittel Histokitt (Roti®-Histokitt II; Roth) und dünne Deckgläser verwendet.

Nach dem Eindecken wurden die histologischen Schnitte für 24 h bei Raumtemperatur zum Trocknen gelegt.

#### 3.2.4. Histomorphometrische Analyse

Zur quantitativen Untersuchung der mikroskopischen Organisation und Struktur der neu gebildeten Reparaturgewebe in osteochondralen Defekten wurde die Histomorphometrie-Methodik verwendet.

Aus insgesamt 60 angefertigten histologischen Schnitten wurden 42 Schnitte mit Hilfe der histomorphometrischen Analyse bewertet. Von jedem Schnitt wurden jeweils 4 Bildfelder genommen und analysiert. Das Reparaturgewebe in osteochondralen Defekten wurde abgegrenzt und beurteilt.

Zur mikroskopischen Bewertung der Präparate wurde das Mikroskop BX 45 eingesetzt, das mit dem Computerprogramm ANALYSIS (*Soft Imaging System*) und Adobe Photoshop verbunden war.

Zum einen erfolgte unter der Vergrößerung x40 die histologische Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers [Sellers 1997]. Zum anderen wurden unter der Vergrößerung x100 die Chondrozyten in ganzen osteochondralen Defekten gezählt und die Flächengröße bestimmt. Die Ergebnisse sind als Chondrozytenzahl/Fläche (Zellen/mm<sup>2</sup>) angegeben.

#### *3.2.4.1. Beurteilung (Scoring) des Knorpels*

Unter der Vergrößerung x40 wurden die histologischen Schnitte mit einer publizierten Knorpel-Beurteilungstechnik [Sellers 1997] quantifiziert.

Dieses Bewertungsschema schließt folgende acht Parameter ein:

1. die Füllung des Defektes,
2. die Integration des Reparaturgewebes in Bezug auf den angrenzenden Gelenkknorpel,

3. die Färbeintensität des Matrixgewebes bei Färbung mit Safranin O/ Echtgrün,
4. die zelluläre Morphologie,
5. die Architektur innerhalb des ganzen Defektes,
6. die Architektur der Oberfläche,
7. die Ausbildung der *Tidemark*,
8. der Prozentangabe von neuem subchondralem Knochen.

Die vollständige Bewertungsmethode zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur, die zuvor von Sellers *et al.* [Sellers 1997] beschrieben wurde, ist in Tabelle 2 dargestellt.

Um eine statistische Signifikanz zu erreichen, wurde eine Anzahl von 5 bis 7 histologischen Schnitten pro Knie beurteilt - unter Verwendung der oben beschriebenen standardisierten Bewertungsmethode.

#### *3.2.4.2. Bestimmung der Zellzahl in den Defekten*

Sämtliche im knorpeligen Reparaturgewebe vorhandenen Zellen wurden unter der Vergrößerung x100 gezählt. Durch die Hämatoxylin-Färbung sind in histologischen Schnitten sehr gut die Zellkerne zu erkennen und die Zellen zählbar (siehe Punkt 3.2.3.5).

Die Flächengröße wurde histomorphometrisch mit dem Programm AnalySIS-Bilder bestimmt. Die Ergebnisse sind als Zellzahl/Fläche (Zellen/mm<sup>2</sup>) angegeben. Eine Anzahl von 5 bis 7 histologischen Schnitten wurde je pro Defekt analysiert.

Parameter	Beurteilung des Parameters	Punkte
1. Füllung des Defektes verhältnismäßig zur Oberfläche des angrenzenden Knorpels	- 111-125%	1
	- 91-110%	0
	- 76-90%	1
	- 51-75%	2
	- 26-50%	3
	- weniger als 25%	4
2. Integration des Reparaturgewebes in den angrenzenden Gelenkknorpel	- normale Kontinuität/Integration	0
	- Minderung der Zellzahl	1
	- Lücke/Mängel an einer Seite	2
	- Lücke/Mängel an beiden Seiten	3
3. Färbeintensität des Matrixgewebes (Safranin O/Echtgrün Färbung)	- normal	0
	- leicht reduziert	1
	- mäßig reduziert	2
	- stark reduziert	3
	- keine	4
4. Zelluläre Morphologie/Säulen-anordnung	(a) normal	0
	(b) hauptsächlich runde Zellen:	
	→ mehr als 75% runde Zellen	0
	→ 25-75% runde Zellen	1
	→ weniger als 25% runde Zellen	2
	(c) 50% runde Zellen:	
	→ mehr als 75% runde Zellen	2
	→ 25-75% runde Zellen	3
	→ weniger als 25% runde Zellen	4
	(d) hauptsächlich Spindelform	5
5. Architektur des Defektes	- normal	0
	- 1-3 schmale Lücken	1
	- 1-3 große Lücken	2
	- mehr als 3 große Lücken	3
	- Spalten/Fibrillationen	4
6. Architektur der Oberfläche	- normal	0
	- leichte Fibrillation/Irregulation	1
	- mäßige Fibrillation/Irregulation	2
	- starke Fibrillation/Riss	3

7. Tidemark	- komplett	0
	- 75-99%	1
	- 50-74%	2
	- 25-49%	3
	- weniger als 25%	4
8. Subchondraler Knochen	- 90-100%	0
	- 75-89%	1
	- 50-74%	2
	- 25-49%	3
	- weniger als 25%	4

Tab. 2: Bewertungsschema des Knorpels nach Sellers *et al.* [Sellers 1997].

### 3.2.5. Statistische Analyse

Es wurden beide Gruppen verglichen (rAAV-*lacZ*-behandelt *versus* rAAV-hFGF-2-behandelt). Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dokumentiert.

Um die *in vivo* Experimente zu beurteilen, wurden die Punkte für jede Kategorie und die Gesamtauswertung beider Gruppen durch eine Varianzanalyse (*mixed general linear model with repeated-measures analysis of variance*) verglichen (untersuchte Knie am gleichen Tier). Der t-Test und der Mann-Whitney Rangsummentest wurden sonst in entsprechenden Fällen angewendet. Die Daten wurden ausgedrückt als Mittelwert  $\pm$  95% Konfidenzintervall.  $P < 0,05$  galten als statistisch signifikant.

## 4. Ergebnisse

Im nachfolgenden Ergebnisteil dieser Arbeit sind (1) die Analyse der Zellproliferation im Reparaturgewebe, (2) die Evaluation der individuellen Parameter der Struktur des kartilaginären Reparaturgewebes, (3) die Evaluation der Reparatur des subchondralen Knochens sowie (4) die Kalkulation des strukturellen Gesamtindex der Reparatur von osteochondralen Defekten nach 4 Monaten *in vivo* dargestellt.

### 4.1. Analyse der Zellproliferation im knorpeligen Reparaturgewebe

Die Zellzahl im knorpeligen Reparaturgewebe der individuellen osteochondralen Defekte war 4 Monate postoperativ nach Anwendung von rAAV-FGF-2 jeweils höher als in der Kontrollgruppe (Siehe Tab. 3).

<b>Tier</b>	<b>rAAV-<i>lacZ</i></b> (Zellen/mm <sup>2</sup> ± SD)	<b>rAAV-hFGF-2</b> (Zellen/mm <sup>2</sup> ± SD)	<b><i>P</i></b>
054	877 ± 202	1.186 ± 257	n.b.
057	990 ± 203	2.209 ± 355	n.b.
058	842 ± 218	1.544 ± 330	n.b.
063	1.073 ± 110	1.225 ± 209	n.b.
<b>Mittelwert</b>	<b>946 ± 106</b>	<b>1.541 ± 473</b>	<b>0,049</b>

Tab. 3: Evaluation der Zellproliferation im knorpeligen Reparaturgewebe der individuellen osteochondralen Defekte nach rAAV-*lacZ*- und rAAV-FGF-2-Applikation *in vivo*.

Per Defekt wurden 5-7 histologische Schnitte ausgewertet. Daten sind als Mittelwert und Standardabweichungen aufgeführt.

Die Gesamt-Zellzahl im knorpeligen Reparaturgewebe der osteochondralen Defekte war 4 Monate postoperativ nach Anwendung von rAAV-FGF-2 signifikant 1,6-fach höher als in der Kontrollgruppe ( $P = 0,049$ ) (Siehe Abb. 6).

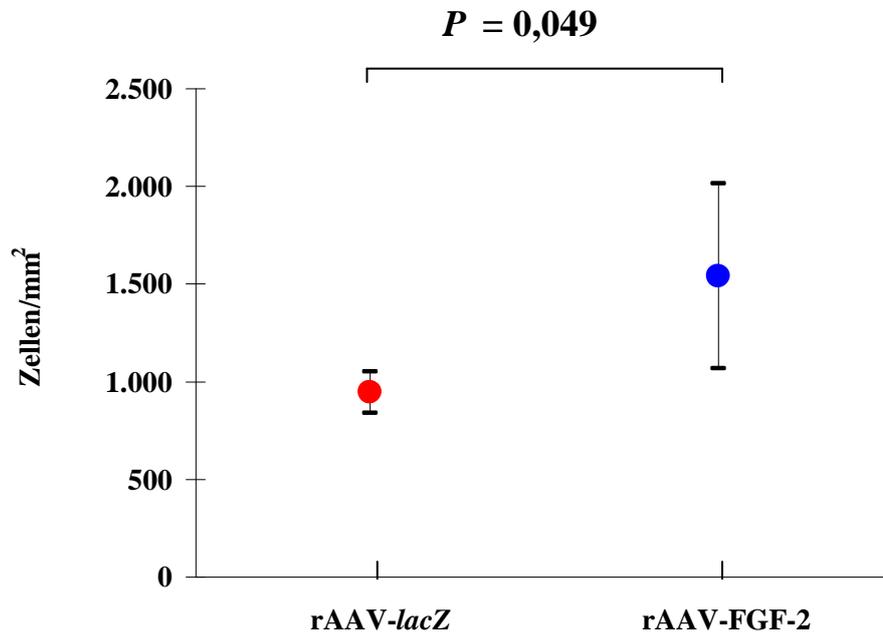


Abb. 6: Vergleichende Analyse der Gesamt-Zellzahl im knorpeligen Reparaturgewebe 4 Monate postoperativ *in vivo*.

#### 4.2. Evaluation der individuellen Parameter der Struktur des kartilaginären Reparaturgewebes

Um das Heilungsvermögen in osteochondralen Defekten *in vivo* nach Applikation von therapeutischem rAAV-hFGF-2-Vektor semi-quantitativ zu messen, wurden histologische Schnitte mittels des von Sellers *et al.* veröffentlichten Knorpel-Beurteilungssystemes [Sellers 1997] analysiert. Die semiquantitative Bewertung der De-

fektreparatur erfolgte hierbei an Safranin-O-Echtgrün-gefärbten Paraffinschnitten, die in der Abbildung 7 dargestellt sind.

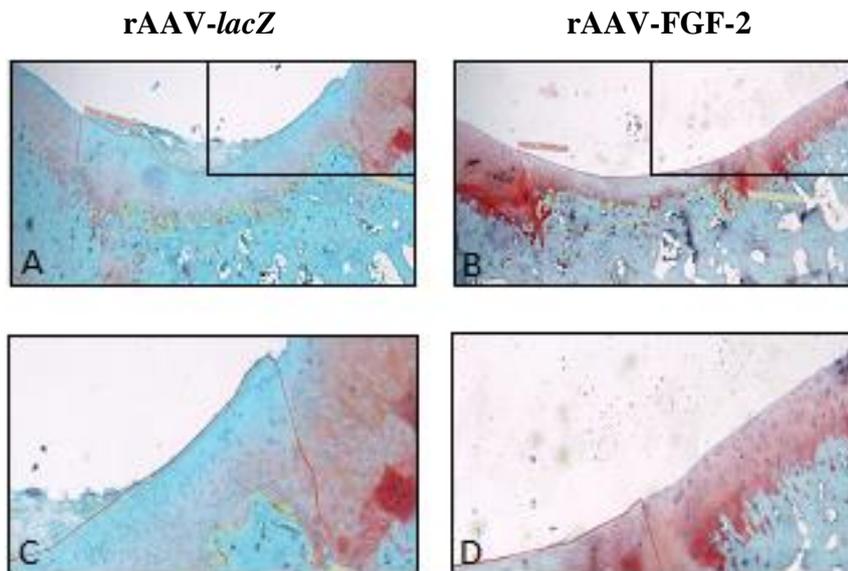


Abb. 7: Safranin-O-Echtgrün-gefärbte histologische Schnitte der Defekte. A,C: rAAV-*lacZ*-Gruppe (Vergrößerung: 20x und 40x); B,D: rAAV-hFGF-2-Gruppe (Vergrößerung: 20x und 40x).

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Evaluation der individuellen Parameter des Reparaturgewebes per Kategorie des in Tabelle 4 abgebildeten Bewertungssystems zusammengefasst. Nach 4 Monaten wurde für die histologischen Beurteilungsparameter „Füllung des Defektes“ ( $P < 0,030$ ), „Integration des Reparaturgewebes“ ( $P < 0,030$ ) und „Zelluläre Morphologie“ ( $P < 0,030$ ) je eine signifikante Verbesserung in Defekten beobachtet, die rAAV-hFGF-2 er-

hielten. Diese Behandlung resultierte in dem Erscheinen vieler runder Zellen mit typischem Phänotyp und säulenartiger Organisation von Chondrozyten innerhalb des neuen Knorpelgewebes. Im Gegensatz dazu waren in Kontrolldefekten (rAAV-*lacZ*-behandelt) zu diesem Zeitpunkt nur sehr wenige Zellen mit diesem Erscheinungsbild zu sehen. Andere Einzelparameter der Beurteilung, wie zum Beispiel „Färbeintensität des Matrixgewebes“ (Parameter #3), „Architektur des Defektes“ (Parameter #5), „Architektur der Oberfläche“ (Parameter #6) und „*Tidemark*“ (Parameter #7) waren zwar verbessert, aber erreichten keine statistische Signifikanz.

Parameter	#	rAAV- <i>lacZ</i>		rAAV-hFGF-2		P
		MW	SD	MW	SD	
Füllung des Defektes	1	1,13	0,64	0,00	0,00	0,029
Integration	2	2,00	0,76	0,75	0,46	0,029
Färbeintensität des Matrixgewebes	3	2,50	0,76	1,50	1,20	0,223
Zelluläre Morphologie	4	3,13	1,13	1,50	0,53	0,029
Architektur des Defektes	5	2,38	1,06	1,00	1,20	0,147
Architektur der Oberfläche	6	2,50	0,53	2,13	0,99	0,686
<i>Tidemark</i>	7	2,50	1,20	2,00	1,07	0,537

Tab. 4: Bewertung der individuellen Parameter des kartilaginären Reparaturgewebes nach Applikation von therapeutischem rAAV-hFGF-2 und von Kontrollgen rAAV-*lacZ*.

### 4.3. Evaluation der Reparatur des subchondralen Knochens

Nach 4 Monaten ergab die semiquantitative Analyse der histologischen Reparatur des subchondralen Knochens (Parameter #8) keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (siehe Tab. 5).

Parameter	#	rAAV- <i>lacZ</i>		rAAV-hFGF-2		<i>P</i>
		MW	SD	MW	SD	
Subchondraler Knochen	8	2,13	0,99	1,25	0,46	0,153

Tab. 5: Bewertung der Reparatur des subchondralen Knochens nach Behandlung mit rAAV-hFGF-2 und mit Kontrollgen rAAV-*lacZ*.

### 4.4. Struktureller Gesamtindex der osteochondralen Reparatur

Die Gesamtbewertung aller 8 histologischen Parameter der Defektreparatur war 4 Monate postoperativ bei den mit rAAV-hFGF-2 behandelten Defekten signifikant ( $P = 0,031$ ) verbessert im Vergleich zu den mit rAAV-*lacZ* behandelten Defekten (siehe Tab. 6).

Parameter	rAAV- <i>lacZ</i>		rAAV-hFGF-2		<i>P</i>
	MW	SD	MW	SD	
Gesamtpunktzahl	18,25	4,30	10,13	3,60	0,031

Tab. 6: Gesamtbewertung der Defektreparatur nach Anwendung von therapeutischem rAAV-hFGF-2 und des Kontrollgens rAAV-*lacZ*.

Die Gesamtbeurteilung der Reparaturgewebe ergab einen strukturellen Gesamtindex der osteochondralen Reparatur von  $10,13 \pm 3,60$  für mit rAAV-hFGF-2 behandelte Defekte; während er bei  $18,25 \pm 4,30$  für mit rAAV-*lacZ* behandelte Defekte lag (siehe Abb. 8).

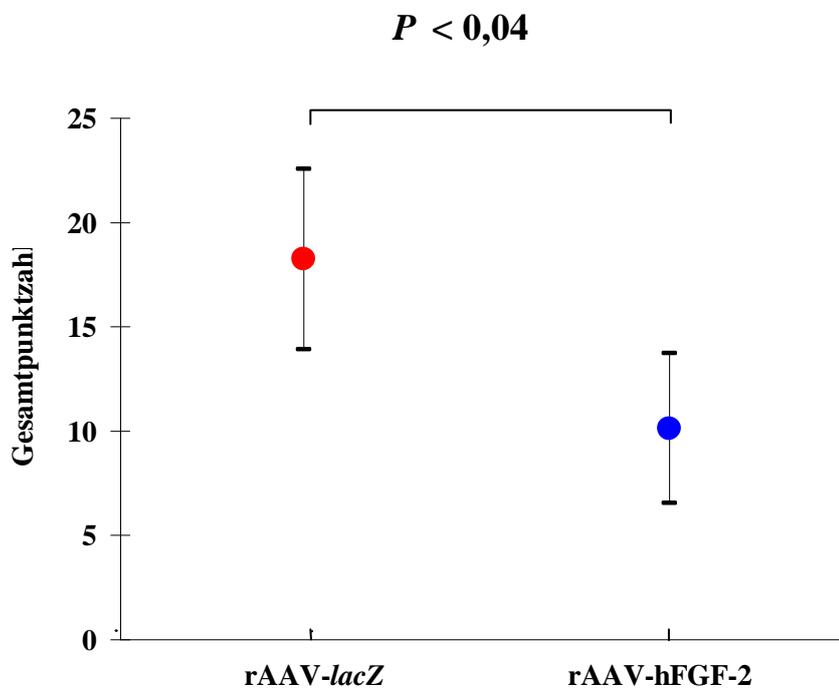


Abb. 8: Gesamtergebnisse für das Bewertungssystem.

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die übergeordnete Hypothese, ob Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren die osteochondrale Reparatur *in vivo* verbessert. Die Daten zeigen eine signifikant höhere Zellproliferation nach rAAV-hFGF-2-Gentransfer im knorpeligen Reparaturgewebe. Sie zeigen weiterhin signifikant verbesserte individuelle strukturelle Parameter des kartilaginären Reparaturgewebes „Füllung des Defektes“, „Zelluläre Morphologie“ und „Integration des Reparaturgewebes“. Es fand sich kein signifikanter Unterschied bei der Reparatur des subchondralen Knochens. Das wesentliche Ergebnis dieser Studie ist die signifikante Verbesserung des strukturellen Gesamtindex der osteochondralen Reparatur nach 4 Monaten *in vivo* durch rAAV-hFGF-2-Gentransfer.

### 5.1. Das Problem des faserknorpeligen Reparaturgewebes

Der menschliche Knorpel ist ein vielschichtiges Gewebe (siehe Punkt 2.2.) und Chondrogenese ist ein komplexer Prozess, gesteuert von mehreren Regulierungsmitteln, wie Proteinen und Po-

lypeptiden, Signalmolekülen und anderen Transkriptionsfaktoren [Cucchiarini 2009b].

Die meisten bisher verfügbaren Therapien erzeugen nur ein Faserknorpelreparaturgewebe mit Typ-I-Kollagen statt Typ-II-Kollagen, das nicht vollständig funktionieren kann und dem hohen mechanischen Stress nicht widerstehen kann [Buckwalter 1998]. Auch bei der Gentransfertherapie wird das regenerierte Gewebe oft dem fibrotischem Knorpel, statt dem hyalinen Knorpel, ähnlich, was schließlich zu degenerativen Veränderungen führt [Tanaka 2004]. In den bisher durchgeführten Studien konnte in Gegenwart von therapeutischen Gentransferfaktoren wie FGF-2, IGF-1, TGF- $\beta$ , BMP-2 und -4 und dem Transkriptionsfaktor SOX9 nur eine teilweise Knorpelerneuerung festgestellt werden [Venkatesan 2013].

Dabei ist besonders die Wiederherstellung des funktionsfähigen Knorpelgewebes eine Herausforderung für genetische Manipulationen. Ansätze, die auf genbasierter Therapie oder Stammzellentherapie beruhen, gewinnen immer mehr Aufmerksamkeit, weil sie die leistungsfähigen Werkzeuge zur Behandlungsverbesserung von Gelenknorpelläsionen sind [Frisch 2014b; Orth 2014].

## 5.2. Wirkung des rAAV-hFGF-2-Gentransfers auf das Reparaturgewebe in osteochondralen Defekten

### 5.2.1. rAAV-hFGF-2-Gentransfer steigert signifikant die Zellproliferation im kartilaginären Reparaturgewebe

Zunächst wurde die Hypothese überprüft, dass eine FGF-2-Gentransfertherapie signifikant die Zellproliferation im knorpeligen Reparaturgewebe steigert. Die Analyse der Zellproliferation in den Defekten 4 Monate postoperativ führte zu einer signifikanten Zunahme der Zellproliferation unter Transduktion mit rAAV-hFGF-2 innerhalb der Defekte *in vivo* im Vergleich zum Kontrollgen rAAV-*lacZ* ( $P = 0,049$ ).

Somit wurde ein mitogener Effekt vom humanen Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) in osteochondralen Defekten *in vivo* bewiesen. Allerdings ist trotz der positiven Auswirkungen der rAAV-hFGF-2-Behandlung das wiederhergestellte Knorpelgewebe kein normaler Knorpel, sondern eine Gewebe mit einer hohen Chondrozytenzahl und chondrogener Architektur. Die Wiederherstellung der Matrixstruktur wird durch das Einbringen von FGF-2 wenig beeinflusst. Hier sind zusätzliche Therapieoptionen notwen-

dig, um die Regenerationsprozesse der verletzten Knorpelgewebe zu verbessern.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass der rAAV-vermittelte FGF-2-Gentransfer die Fähigkeit hat, die Proliferation und das Überleben von MSZ zu stimulieren [Cucchiariini 2011]. MSZ sind pluripotente Zellen, die sich unter gewissen Umständen und stimulierenden Faktoren in unterschiedliche Zellarten verwandeln können, unter anderem in Knorpelzellen. MSZ sind daher eine gute Quelle für die gerichtete Gewebezüchtung, weil sie eine große Anzahl von undifferenzierten Vorläuferzellen mit verschiedenem Potential zur Verfügung stellen und zusätzliches parakrines Signalpotential haben [Johnstone 2013]. Allerdings ist die Verwendung dieser Zellen eingeschränkt, weil eine große Anzahl der Zellen für Anwendungen *in vivo* benötigt wird und ein niedriger Prozentsatz von Zellen entsteht, die chondrogene Differenzierungswege gehen [Cucchiariini 2011]. Die Verwendung von FGF-2-Gentransfer hat zwar die Zellteilung der humanen MSZ stimuliert, hat aber spezifische und chondrogene Aktivitäten von MSZ (Proteoglykane, Typ-II-Kollagen, und SOX9) nicht geändert. Allerdings verringerte die Verwendung von FGF-2 die Profile des Typ-I- und Typ-X-Kollagens (knochenbildende und hypertrophe Marker) und alkalische Phosphatase [Cucchiariini 2011]. Hier könnten neben FGF-2 zusätzlich andere rAAV-vermittelte Gentransfer gleich-

zeitig exprimiert werden, die Proteoglykan- und Typ-II-Kollagen-Synthese stimulieren, wie zum Beispiel IGF-I oder SOX9-Transkriptionsfaktor [Cucchiarini 2007; Cucchiarini 2009b; Weimer 2012; Cucchiarini 2013].

#### 5.2.2. Signifikante Verbesserungen nach rAAV-hFGF-2-Gentransfer für individuelle strukturelle Parameter des kartilaginären Reparaturgewebes

Als nächstes wurden die histologischen Schnitte mit kartilaginärem Reparaturgewebe histomorphometrisch mittels der Knorpel-Beurteilungstechnik nach Sellers *et al.* [Sellers 1997] beurteilt.

Dabei wurde eine signifikante Verbesserung einzelner histologischer Beurteilungsparameter in Knorpeldefekten beobachtet, die mit rAAV-hFGF-2 behandelt wurden. Vier Monate nach der Vektor-Behandlung beider Arten von Defekten war die Farbe der Defekte ähnlich zu dem umgebenden Knorpel und die Ränder der Defekte waren schwer zu erkennen. Es konnte eine bessere Füllung der Defekte ( $P < 0,030$ ) im Vergleich zu den mit rAAV-*lacZ* behandelten Defekten verzeichnet werden. Durch die rAAV-hFGF-2-Transduktion wurde die Integration des Reparaturgewebes sig-

nifikant verbessert ( $P < 0,030$ ). Zudem zeigte die Transduktion durch rAAV-hFGF-2 eine signifikante Verbesserung der zellulären Morphologie ( $P < 0,030$ ) im Vergleich zur Anwendung von rAAV-*lacZ*. Durch die Therapie mit rAAV-hFGF-2 entstanden viele runde Zellen mit chondrogenem Phänotyp und einer säulenartigen Anordnung der Chondrozyten innerhalb des neuen Gewebes. Das bestätigt, dass FGF-2 mitogene Fähigkeiten auf Chondrozyten ausübt [Luan 1996] und zur Reparatur von Knorpelschäden führt [Cucchiarini und Madry 2005; Cucchiarini 2005; Cucchiarini 2009; Madry und Cucchiarini 2013]. Im Vergleich dazu waren in den Kontrolldefekten (rAAV-*lacZ*-behandelt) nach 4 Monaten sehr wenige Zellen mit chondrogenem Phänotyp ohne korrekte Integration zu verzeichnen. Andere histologische Parameter, wie die Färbintensität des Matrixgewebes, Architektur des Defektes, Architektur der Oberfläche und Tidemark wurden unter Anwendung der rAAV-hFGF-2 verbessert, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

### 5.2.3. Effekt auf die Reparatur des subchondralen Knochens

Unter Verwendung von rAAV-hFGF-2-Vektoren in osteochondralen Defekten von Kaninchen *in vivo* wurde der strukturelle Para-

meter subchondraler Knochen im Vergleich zu Kontrolldefekten (mit rAAV-*lacZ*-behandelt) zwar numerisch verbessert, erreichte allerdings keine statistische Signifikanz.

Experimentelle und klinische Studien legen nahe, dass die Knorpelverletzungen oft nicht alleine auf den Knorpel beschränkt sind, sondern oftmals unter Beteiligung des subchondralen Knochens ablaufen. Eine Verschlechterung der subchondralen Knochenplatte und subarticulärer Spongiosa kann ein zusätzlicher, bisher unterschätzter Faktor sein, der das langfristige Ergebnis der Knorpelreparaturstrategien beeinflusst [Orth 2013]. Diese Erkenntnisse sind hoch relevant für die Entwicklung von zell- oder biomaterialbasierten Ansätzen zur Erhaltung und Wiederherstellung der gesamten osteochondralen Einheit, da die osteochondrale Reparatur nicht nur Auswirkungen auf den Gelenkknorpel, sondern auch auf den subchondralen Knochen erfordert [Orth 2013].

#### 5.2.4. Signifikante Verbesserung des strukturellen Gesamtindex der osteochondralen Reparatur nach 4 Monaten *in vivo* durch rAAV-hFGF-2-Gentransfer

Beachtlicherweise war die Gesamtbeurteilung der histologischen Einstufung signifikant besser für Defekte nach der rAAV-hFGF-2-Behandlung ( $P < 0,040$ ), im Vergleich zur Therapie mit rAAV-*lacZ*.

Auch wenn nicht alle der einzelnen Beurteilungsparameter des histologischen Knorpel-Bewertungssystems nach Sellers *et al.* [Sellers 1997] eine signifikante Verbesserung für die Defekte nach der Transduktion von rAAV-hFGF-2 zeigten, war das übergeordnete Ergebnis dieser Studie die signifikante Verbesserung des strukturellen Gesamtindex der osteochondralen Reparatur nach 4 Monaten *in vivo* durch rAAV-hFGF-2-Gentransfer (siehe Punkt 4.4).

### **5.3. Diskussion des Tiermodells**

Das in dieser Arbeit verwendete experimentelle Tiermodell ist klinisch auch für eine Anwendung an Menschen relevant. Das Kniegelenk von Mensch und Kaninchen ist sehr ähnlich, was den Auf-

bau betrifft. Das Gelenk eines Kaninchens besteht aus dem Femur und der Tibia, einer Patella, einem vorderen und einem hinteren Kreuzband, einem medialen und einem lateralen Meniskus, sowie Außen- und Innenbändern. Die femorale Komponente besteht aus einem medialen und einem lateralen Kondylus, die mit dem Tibia-plateau artikuliert. Die Patella liegt dem konkav geformten patell-ofemoralem Gleitlager auf und ist in der Ansatzsehne des Musculus quadriceps femoris eingelagert. Diese Sehne setzt sich unterhalb der Patella in das Ligamentum patellae fort, welches direkt unterhalb des Kniegelenks an der Tuberositas tibiae (geringe Knochenerhöhung an der Vorderseite des Schienbeins) ansetzt. Im Kaninchenknie gibt es allerdings eine Besonderheit: der Musculus extensor digitorum communis und seine Sehne verläuft ventral vom lateralen Kondylus und entspringt am proximalen Femur [Barone 1973]. Der vergleichbare Muskel beim Menschen - Musculus extensor digitorum longus - hat seinen Ursprung nicht am Femur, sondern an der proximalen Tibiaende (unterhalb des Condylus lateralis), Margo anterior der Fibula, der Membrana interossea cruris, dem Septum intermusculare cruris anterius und der Fascia cruris und gehört somit nicht zum Kniegelenk [Sobotta 2004].

Es gibt neben den anatomischen auch funktionelle Unterschiede zwischen dem menschlichen und tierischen Kniegelenk. Das Kaninchenknie befindet sich immer in der Beugstellung und besitzt somit eine andere Tragefähigkeit und eine statische Funktion. Beim Menschen muß das Gelenk großen Belastungen standhalten und gleichzeitig eine ausreichende Beweglichkeit ermöglichen. Im Gegensatz zum Kaninchen sind beim menschlichen Kniegelenk Beugung/Streckung und - ausschließlich im gebeugten Zustand - eine rotierende Bewegung möglich. Die geringen anatomischen und großen funktionellen Unterschiede zwischen den Kniegelenken von Mensch und Kaninchen spielen später in klinischen Phasen von Experimenten eine wichtige Rolle.

Es ist bekannt, dass osteochondrale Defekte in Kaninchen nicht innerhalb von 4 Monaten selbstständig regenerieren [Madry 2003b]. Dieses Tiermodell hat eine geringe, geeignete Größe und bringt eine einfache Tierhaltung mit sich. In unserer Dauerstudie wurden die Tiere 4 Monate nach durchgeführter Transduktion untersucht und eine histologische Analyse, sowie morphometrische Messungen des Reparaturgewebes postoperativ vorgenommen.

#### 5.4. Diskussion viraler Vektoren

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) gehört zu den Parvoviridae. Dieses Virus richtet durch folgende Merkmale die Aufmerksamkeit in der Gentherapieforschung auf sich: Zum einen hat es eine hohe Bevölkerungsinfektionsrate (80-90%), aber keine Pathogenität mit nur geringerer Immunantwort. Zudem kann man eine ortsspezifische Integration von AAV durchführen. Dabei befindet sich das AAV in einer relativ stabilen Form. Außerdem hat es eine breite Palette an Wirten, darunter eine Vielzahl von sich teilenden und nichtteilenden Zellen. Es kann exogene Gene übertragen und erzielt eine langfristige, nachhaltige und stabile Expression. Zusätzlich hat das AAV eine relativ gute thermische Stabilität. Wegen der Beständigkeit gegen organische Lösungsmittel ist es leicht zu lagern. Jedoch ist das herkömmliche Verfahren zur Konstruktion von rekombinantem AAV, also die humanen embryonalen Nieren-293-Zellen zu transduzieren, die ein rekombinantes Plasmid und Helferplasmid verwenden, ein umständliches Verfahren. Es erzeugt dabei geringe Mengen von rAAV und könnte durch den Wildtyp-Adenovirus kontaminiert werden [Yuan und Bi 2012].

Es besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass virale Vektoren sich zufällig in ein Wirtsgenom integrieren können, was das Risiko

einer neoplastischen Transformation erhöht [Goomer 2001]. Nach Angaben von Evans *et al.* [Evans 2001] kann nur 1 bis 10% der rekombinanten Virionen in Abhängigkeit von der Herstellung infektiös sein. Die anderen 90-99% nicht infektiösen Viruspartikel sind antigen und können zur Produktion von anti-AAV-Immunglobulinsynthese beitragen [Evans 2001]. Zum Beispiel wird bei zweiter Verabreichung von AAV-Vektoren die Transduktion aufgrund der neutralisierenden Antikörper, die sich als Antwort auf die primäre Vektorverabreichung bilden, blockiert [Halbert 2000], vereinbar mit einem wirtsimmunologischen Gedächtnis [Selot 2013]. Trotzdem gibt es viele Arbeitsgruppen, die neue rAAV-Vektoren produzieren, um diese Immunantwort zu reduzieren (z.B. mit verschiedenen, niedrig immunogenen AAV Serotypen oder immunologisch inerten AAV) [Halbert 2000; Mingozi 2013; Selot 2013]. Das können unter anderem gemischte Vektoren (chimere Vektoren), gezielte Mutagenese, gleichzeitige Einführung von immunosuppressiven Mitteln oder von Antikörpern gegen Selekt-Liganden oder Plasmapherese sein [Selot 2013]. Die Zugabe von leeren Capsid-„Lockvögeln“ zu den AAV-Vektoren beseitigt die hemmende Wirkung durch neutralisierende Antikörper (anti-AAV-Antikörper) im Blut bei wiederholter systemischer Verabreichung von AAV-Vektoren und senkt somit die Immunantwort. Das führt zur Steigerung der Transduktionseffizienz von systemisch ange-

wendeten AAV-Vektoren bei bereits bestehender humoraler Immunität gegen AAV [Mingozzi 2013].

Wie in einem aktuellen Artikel beschrieben wurde, können stabile, episomale rAAV-Transgene bei der Expression für längere Zeiträume (mindestens 150 Tage *in situ*) eine hohe Effizienz in nichtteilenden Chondrozyten (bis zu 95%) und in dividierten Zellen (MSZ) (65-92%) zeigen [Madry und Cucchiaroni 2013]. Im Vergleich dazu verringert sich die Konzentration von Plasmid-Vektoren schnell und ist wahrscheinlich ab dem 20. Tag nicht nachweisbar [Weimer 2012], wie es schon in der Vergangenheit mit nichtviralen Vektoren beobachtet wurde [Madry und Trippel 2000].

Therapeutische rAAV-Vektoren werden experimentell benutzt zur Reparatur von verschiedenen Geweben (Muskeln, Knochen oder andere) [Xiao 1996; Chamberlain 2004], die unterschiedlichen Krankheiten ausgesetzt sind, bei denen Zellteilung deutlich eingeschränkt oder aufgehoben ist, oder wenn genetische Mutationen vorliegen. Autologes Gen-Targeting der MSZ durch rAAV-Vektoren kann zur Behandlung zahlreicher Krankheiten verwendet werden, wie z.B. Osteogenesis imperfecta [Chamberlain 2004]. Dabei können MSZ verschiedene Gewebetypen bilden. Knorpel-

schädigungen gehören zu einem großen Behandlungsproblem in der Medizin. Die Gentransfertherapie ist eine wichtige experimentelle Methode bei der Behandlung der isolierten chondralen oder osteochondralen Defekte und frühen degenerativen Veränderungen des Knorpels [Buckwalter 1997], bei denen noch restliche Knorpelgewebe und Chondrozyten vorhanden sind [Weimer 2012].

rAAV-Vektoren sind ein bevorzugtes Werkzeug für die Behandlung von experimenteller Arthrose *in vivo* und für klinische Anwendungen [Madry und Cucchiariini 2013; Madry 2013; Frisch 2014b]. rAAV-Vektoren sind weniger immunogen, als adenovirale Vektoren, da sie keine viral-kodierten Sequenzen tragen. rAAV-Vektoren transduzieren sowohl nicht-teilende Zellen (Chondrozyten), als auch dividierende Zellen (MSZ) zu einem sehr hohem Wirkungsgrad (bis 85%) und über längere Zeiträume sowohl *in vivo*, als auch *in situ* und in Knorpeldefekten *in vivo*, wahrscheinlich aufgrund der geringen Größe der Viruspartikel und der guten Erhaltung episomaler Transgene [Madry und Cucchiariini 2013; Madry 2013]. Aufgrund der Leichtigkeit der Erzeugung hoher Titer von rekombinanten adenoviralen Vektoren und ihrer Fähigkeit sich nicht teilende Zellen zu transduzieren, ist dieses Gentransfersystem besonders attraktiv für *in vivo* Anwendungen, die sonst nur

schwer zu erreichen sind [Evans 2001; Cucchiarini und Madry 2005; Madry und Cucchiarini 2013]. rAAV-Vektoren vermitteln typischerweise stark wirksame und dauerhafte Transgenexpression in den meisten Zellen (bei der Teilung oder in Ruhe) des muskuloskeletalen Apparats inklusiv Sehnen- und Bänder. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu den anderen Klassen, die entweder immunogene Vektoren sind (adenovirale Vektoren), oder das Risiko einer Insertionsmutagenese haben (retrovirale Vektoren) [Venkatesan 2012; Madry 2013]. Die Expression von rAAV-Vektoren, angetrieben von Episomen, hält mehrere Monate bis zu einem Jahr an und senkt das Risiko einer Insertionsmutagenese [Cucchiarini 2011].

Bemerkenswerterweise sind rAAV-Vektoren die derzeit favorisierten Gentransfersysteme für klinische Anwendungen [Cucchiarini 2013; Madry 2013]. Systeme auf Basis von humanem nichtpathogenem replikations-defektem AAV wie rAAV-Vektoren scheinen vorteilhafter zu sein, als die auf Basis von Adenovirus. Zudem trägt der rAAV-Vektor keine viral-kodierte Sequenzen, sodass er weniger immunogen, als ein Adenovirus ist [Cucchiarini 2013]. Er bleibt meistens episomal im Gegensatz zu Retro- und Lentiviren, die zur Insertionsmutagenese führen können [Madry 2013; Frisch 2014b]. Gleichzeitig haben sie eine hohe und anhaltende Trans-

genexpression im humanen MCZ gezeigt [Frisch 2014b]. Im Vergleich zu nichtviralen und adenoviralen Vektoren zeigen rAAV eine höhere und längerfristige Wirksamkeit [Frisch 2014b].

Obwohl eine Verbesserung mit selbst-komplementären AAV (scAAV) aufgrund der Umgehung der schritteinschränkende Umwandlung von einzelsträngiger in doppelsträngige DNS und mit der Verwendung von trans-Spleißen Systemen stattfindet, ist eine Einschränkung dieser Vektoren die Größenbeschränkung des Transgens [McCarty 2008]. Dies ist ein Problem für die Lieferung von großen Sequenzen, wie die Komponenten der extracellulären Matrix. Bemerkenswert ist es auch, dass alle AAV-Serotypen vielleicht nicht gleich im Bezug auf ihre Ziel-Wandler sind [Madry und Cucchiaroni 2013].

In jüngsten experimentellen Arbeiten [Madry 2013] wurde gezeigt, dass die effiziente, stabile FGF-2-Expression über rAAV-Vektoren die Heilung von experimentellen Verletzungen des menschlichen vorderen Kreuzbandes verbessert. FGF-2 ist ein leistungsfähiger Stimulator, der Zellproliferation und der Produktion von Kollagen, die Gewebeheilung in experimentellen Modellen fördert, wenn es in einer rekombinanten (Polypeptid) Form bereitgestellt ist. Expression von rAAV-hFGF-2-Gentransfer in experimentelle humane

adulte Läsionen des vorderen Kreuzbandes gestattete eine deutliche und stabile Aktivierung der Zellproliferation und entscheidender metabolischer Prozesse wie Typ-I-Kollagenproduktion [Madry 2013].

### **5.5. Ausblick: Klinische Therapieansätze mit therapeutischen rAAV-Vektoren**

Vor einer möglichen Übertragung auf den Menschen ist es notwendig, die therapeutischen rAAV-Vektoren anhand größerer Tiermodelle (Schaf, Ziege) prüfen. Interessanterweise wurde eine Phase-1-Studie vor kurzem bei 12 Patienten mit fortgeschrittener Arthrose durchgeführt, um die Sicherheit der Methode zu überprüfen. Dabei wurden in den Kniegelenkraum genetisch modifizierte Chondrozyten injiziert, die den TGF- $\beta$ 1 durch retroviralen Gentransfer direkt ins beschädigte Kniegelenk exprimierten [Ha 2012]. Die Ergebnisse dieser Studie haben eine Wirksamkeit der Behandlung gezeigt, obwohl die Anzahl der Patienten nicht ausreichend war, um eine statistische Signifikanz zu erreichen [Madry und Cucchiari 2013].

Auch andere Wachstumsfaktoren erscheinen gut geeignet, die Struktur der Reparaturgewebe zu verbessern. Die direkte, rAAV-vermittelte Überexpression des insulinähnlichen Wachstumsfaktors I (IGF-I) im normalen Knorpel und bei Knorpelschädigung *in vitro* und *in situ* erhöht signifikant die Chondrozytenproliferation, verbessert den Inhalt von Proteoglykane und Typ-II-Kollagen, verringert apoptotische Ereignisse und schützt gegen den Abbau der extrazellulären Matrix im Vergleich zu rAAV-*lacZ*. Dabei bleibt die Anzahl der lebensfähigen Zellen, Zelldichte und DNS-Gehalt nach 20-26 Tagen aufrechterhalten, wahrscheinlich aufgrund der stetigen Expression von IGF-I-Transgens in den Zellen [Weimer 2012]. Dennoch hat die Anwendung von IGF-I nicht vollständig zur Wiederherstellung der originellen Architektur geführt. Somit könnten zusätzliche Behandlungen erforderlich sein, um die Prozesse der Regeneration zu verfeinern [Weimer 2012].

Auch rAAV-vermittelte Überexpression von TGF- $\beta$  in menschlichen arthrotischem Knorpel *in vitro* und *in situ* verbessert effizient proliferative und anabole Aktivitäten der Zellen und verlängert die Überlebenszeit der Chodrozyten über einen längeren Zeitraum (mindestens 21 Tage *in vitro* und bis zu 90 Tage *in situ*) im Vergleich zu Kontroll-Vektor rAAV-*lacZ* mit der Transduktionseffizienz von 70-80% in diesen Systemen [Venkatesan 2013].

Da Gentransfer-Vektoren zumeist nicht physisch mit einer Matrix verbunden sind, können sie in den Gelenkraum diffundieren und frei verfügbare synovialen Zellen transduzieren. Es wurde ein Teil von Vektoren in der Synovialmembrananalyse bewiesen, was auf eine Leckage des Vektors und/oder der transduzierten Zellen hinweist. [Pascher 2004]. Da viele der therapeutischen Faktoren, wie z.B. TGF- $\beta$ , pleiotrop sind, könnte die Bewegung des Vektors oder der genetisch veränderten Zellen in dem Gelenkraum zu Nebenwirkungen, wie Entzündung, Fibrose, Muskelödem oder Osteophytenbildung führen [Mi 2003; Pascher 2004]. Doch die nachteiligen Auswirkungen von TGF- $\beta$  sind nur nachzuweisen, wenn eine sehr hohe Dosis des rekombinanten Faktors in einer dosisabhängigen oder rezidivierenden Weise oder nach adenoviralem Gentransfer bei hoher Dosis von Viruspartikeln angewendet wurde [Mi 2003; Venkatesan 2013]. Außerdem spielt die Art der Verabreichung vom Gentransferfaktor eine Rolle bei der Entstehung von unerwünschten Wirkungen. Bei intraartikulärer Injektion verteilen sich die Genvektoren und der rekombinante Faktor im ganzen Gelenk und entzündliche und können proliferative Effekte erzeugen [Mi 2003; Venkatesan 2013; Zhen 2013].

Die FGF-2 Expression durch rAAV-Vektoren erhöht die Zellzahl von Chondrozyten in osteochondralen Defekten bei Kaninchen *in*

*vivo*, aber verbessert nicht das Matrixgewebe, deswegen sollte man auch Gene testen, die diese Knorpelmatrix aufbauen können. Das könnte durch Gentransfer vom knorpelspezifischem Transkriptionsfaktor SOX9 getestet werden, da SOX9 den Promoter von Aggrecan (einem Chondroitinsulfat-Proteoglykan und einem der Hauptkomponenten der Knorpelmatrix) und Typ-II-Kollagen aktivieren kann [Bell 1997; Sekiya 2000], und die Matrix in osteochondralen Defekten bei Kaninchen *in vivo* aufbauen kann [Cucchiari 2013].

Desweiteren sind auch geronnene Knochenmarkaspirate ein überragend gutes Substrat für einen Gentransfer in osteochondrale Defekte [Pascher 2004; Frisch 2015; Rey-Rico 2015]. Ein erfolgreich rAAV-vermittelter Gentransfer und die Expression von *lacZ* und RFP (rot fluoreszierendes Protein) Markergenen wurden in transduzierten Knochenmarkaspiraten bei sehr hoher Transduktionseffizienz (90-94%) und über längere Zeiträume (bis 125 Tage) nach der Behandlung mit Hirudin, einem alternativen Antikoagulans, erreicht [Rey-Rico 2015]. Es ist bekannt, dass die Adsorption von rAAV-2-Partikeln an der Oberfläche der menschlichen Zelllinien durch Heparinsulfat Proteoglycan verhindert wird [Hacker 2001]. Im Vergleich zu Heparin inhibiert Hirudin nicht die Adsorption der rAAV-2-Vektoren an der Zelloberfläche [Hacker 2001;

Rey-Rico 2015], und kann wirksam zum rAAV-modifizierten Gentransfer von Knochenmarkaspiraten verwendet werden. Vor kurzem wurde eine erfolgreiche signifikante rAAV-vermittelte IGF-I-Gen-Expression in transduzierten Knochenmarkaspiraten (bis zu  $105,9 \pm 35,1$  pg rh-IGF-I/mg Gesamtprotein) über die Zeit von 21 Tagen auf sehr hohem Niveau (ca. 80 % der Zellexpression von IGF-I-Transgen) erreicht, was zu einer erhöhten Proliferation, Matrixsynthese und chondrogener Differenzierung über die Zeit gegenüber der Kontrollbedingung (*lacZ*) führte. Ferner war das Niveau der Proliferation über rAAV-hIGF-Gentransfer in den Knochenmarkaspiraten höher, als mit dem gleichem Konstrukt in den isolierten menschlichen MSZ [Frisch 2014a; Frisch 2015]. Die Verwendung von rAAV-vermitteltem Transfer der Knochenmarkaspiraten hat somit einen starken Wert für therapeutische Genbasierte Ansätze zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten [Rey-Rico 2015; Frisch 2015].

Das übergeordnete Ziel aller Therapien zur Behandlung von Knorpeldefekten ist, ein Reparaturgewebe mit Eigenschaften des normalen intakten Knorpels zu erzielen, damit die Gelenkfunktion im normalen Umfang ausgeführt werden kann. Dabei soll diese Therapie nicht immunogen sein und keine Nebenreaktion hervorrufen.

Gentransfer durch therapeutische rAAV-Vektoren ist ein vielversprechendes Instrument zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. Vektoren, die aus dem menschlichen, nicht pathogenen replikationsdefekten AAV wie rAAV-Vektoren abgeleitet werden, tragen keine viral kodierte Sequenzen, so dass sie weniger immunogen sind. Im Vergleich dazu ist die Anwendung von nicht-viralen und adenoviralen Vektoren durch ihre geringe Wirksamkeit und/oder Immunogenität eingeschränkt [Cucchiarini und Madry 2014]. Der rAAV-vermittelte Gentransfer wurde immer gut vertragen. Die Identifizierung einer wirksamen therapeutischen Kandidat-Sequenz hat eine große Bedeutung für die Knorpelreparatur. Es wurden mehrere verschiedene Faktoren untersucht, die Heilungsprozesse im verletzten Knorpel beeinflussen. Neben dem in dieser Arbeit vorgestellten Gentransfer mit FGF-2, wurden in Versuchsmodellen *in vivo* andere Faktoren wie Bindegewebe-Wachstumsfaktor, BMP, *Chondromodulin 1*, Mitglieder der Familie SOX, spezifische Transkriptionsfaktoren oder Zink-Finger-Protein 145 (ZNF145) untersucht [Cucchiarini und Madry 2014]. Jedoch wurde die komplette Knorpelreparatur in diesen Modellen nicht beschrieben. Das zeigt die Notwendigkeit der Anwendung anderer Agenten, um das Ausmaß der Heilungsprozesse auszubauen.

Die Lieferung von zusätzlichen Genkandidaten, deren Wirkung potenziert werden kann, könnte eine Therapieoption bei der Reparatur von Gelenkknorpeldefekten sein. Dabei können verschiedene Faktoren, die unterschiedliche Auswirkungen auf das Knorpelgewebe haben, aber insgesamt die proliferative Eigenschaften für Knorpelgewebe erzeugen, wie Wachstumsfaktoren (FGF-2, IGF-I, TGF- $\beta$ ), Transkriptionsfaktor SOX9 (siehe unten), *human Telomerase Reverse Transcriptase* (hTERT) oder B-Zell-Lymphom Protein (Bcl-xL), zusammen transduziert werden, um bessere Ergebnisse zu erzielen [Venkatesan 2012].

Die zuletzt untersuchte Überexpression von humanem IGF-I über den direkten rAAV-vermittelten Gentransfer [Cucchiarini und Madry 2014] zeigte signifikante Verbesserungen der Rekonstruktion des gesamten osteochondralen Defektes in Kniegelenken von Kaninchen im Vergleich zum Kontrolltransfer (*lacZ*).

Der Gelenkknorpel hat aufgrund seiner aneuralen und avaskulären Natur keinen Zugriff auf reparative Zellen, die ansonsten in nahezu allen anderen Geweben als Reaktion auf Verletzung zum Einsatz kommen. Die Behandlung von Knorpelschäden durch stammzellbasierte Therapie könnte eine interessante Strategie sein, um die natürliche Heilung von Gelenkknorpeldefekten zu

verbessern [Venkatesan 2012; Frisch 2014a]. Die vom menschlichen Knochenmark abgeleiteten MSZ kann man mittels Gentransfer-Ansätzen erfolgreich zur Knorpelreparatur verwenden [Frisch 2014a]. Verschiedene therapeutische Kandidatsequenzen wirken auf die chondrogene Differenzierung von MSZ, unter anderem FGF-2 [Cucchiaroni 2011], SOX9 [Venkatesan 2012], IGF-I [Frisch 2014a], TGF- $\beta$  [Frisch 2014b] und BMP's [Yuan und Bi 2012]. Mehrere Untersuchungen zeigten das Potential der Verwendung von rAAV-vermitteltem Gentransfer als Werkzeug für zukünftige Stammzell-basierte Ansätze zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten [Weimer 2012; Frisch 2014a].

TGF- $\beta$  ist einer der potentesten Vermittler von menschlichen stammzellbasierten Chondrogenesen. Eine effiziente und verlängerte Expression von TGF- $\beta$  über die rAAV-Genübertragung kann sowohl in undifferenzierten, als auch in chondrogen induzierten humanen MSZ für mindestens 21 Tage mit einer Transduktionseffizienz bis zu 87% erreicht werden [Frisch 2014b]. Es wurde festgestellt, dass TGF- $\beta$ -Expression über rAAV stimuliert sowohl proliferative, als auch anabole Aktivitäten von humanen MSZ in undifferenzierten Schichtkulturen. In chondrogen induzierten menschlichen MSZ, erhöht die Behandlung mit rAAV-TGF- $\beta$ -Vektoren das Niveau der Proliferation und verbessert das Diffe-

renzierungspotential der Zellen [Frisch 2014b]. Es wurde eine höhere Expression von Proteoglykanen, Aggrecan und Typ-II-Kollagen in Anwesenheit von TGF- $\beta$  bestätigt [Frisch 2014b]. Allerdings ist bei der TGF- $\beta$ -Therapie eine präzise Regulation des Produktionsniveaus notwendig, um frühterminale Differenzierungen und Verknöcherungen zu vermeiden [Cucchiari 2005, Frisch 2014b]. Hier könnte neben der Verwendung einer niedrigeren Vektor-Dosis von TGF- $\beta$  eine Verabreichung von zusätzlichen Faktoren helfen, wie z.B. FGF-2 und SOX9-Transkriptionsfaktoren. [Cucchiari 2011, Frisch 2014b]. Die FGF-2-Überexpression verringert die Mineralisierung und die Expression von osteogenen Markern wie die alkalische Phosphatase [Cucchiari 2011]. Beispielsweise reduzierte ein dualer rAAV-vermittelter Gentransfer von TGF- $\beta$  und SOX9 insbesondere in den höchsten Vektordosen das Niveau der Hypertrophie und der vorzeitigen terminalen Differenzierung in humanen Knochenmarkspiraten nach 21 Tagen bei gleichzeitiger effektiver Stimulierung von Zellproliferation, Matrixsynthese und chondrogener Differenzierung [Tao 2017].

Die kombinierte Überexpression von humanem FGF-2 und SOX9 durch rAAV hat einen Potentialwert bei der Stimulierung der reparativen Eigenschaften im menschlichen normalen und arthroti-

schen Gelenkknorpel [Weimer 2007]. FGF-2 stimulierte die Zellproliferation von Chondrozyten und SOX9 förderte Typ-II-Kollagen- und die Matrixsynthese [Weimer 2007]. In einer späteren Studie [Cucchiariini 2009b] wurde gezeigt, dass die direkte kombinierte Expression von zwei Kandidatenvektoren FGF-2 und SOX9 *in situ* in menschlichen arthrotischen Knorpel gleichzeitig die Chondrozytenproliferation moduliert und den Verlust der Matrixkomponenten kompensiert. Somit hat eine zusätzliche Expression von SOX9 die Produktion von Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen stimuliert und zur Regeneration von arthrotischem Knorpel beigetragen. Das Reparaturgewebe näherte sich an normales Knorpelgewebe an, allerdings war dadurch noch kein normaler Gelenkknorpel entstanden. Dabei waren rAAV starke Gentransferfaktoren, die die getrennte Expression von mehreren Genen gleichzeitig in ihre Ziele erlaubten [Cucchiariini 2009b]. Die kombinierte Anwendung verschiedener Faktoren kann also notwendig sein zur weiteren Verbesserung der Chondrogenese und Gewebeheilung in Knorpelläsionen [Rey-Rico 2015]. In dieser Hinsicht sind weitere Experimente mit Einsatz weiterer Kandidatenvektoren erforderlich, um kombinierte Wirkungen von mehreren Genkandidaten auf die geschädigten Knorpelgewebe zu erforschen, um ein normales Gelenkknorpel wiederherzustellen, der seine ursprünglichen Funktionen vollständig ausführen kann.

Zu derartigen Kandidatenvektoren gehören neben den hier verwendeten Faktoren auch das Parathormon-verwandte Peptid, die knorpelmorphogenetische Proteine, GDF-5, das Knorpel-Retinsäure empfindlichen Protein, Mitglieder der Wnt (*Wingless/Integrated*, flügellos/integriert) und *Hedgehog* (Igel) Familien, SOX5 und SOX6, Kernbindungsfaktor alpha-1 (CBFA-1), Knorpelhomöoprotein-1 (Cart-1) und die E-26-transformationsspezifische-Familie (Ets) der Transkriptionsfaktoren [Cucchiarini und Madry 2005; Cucchiarini 2009b].

Bei nichtviralen lipid-vermittelten Gentransferverfahren bei der Transfektion von Chondrozyten zeigte sich eine Abnahme der Expression am Tag 14, sodass es 21 Tage nach der Transfektion keine nachweisbare Aktivität vom (*lacZ*)-Vektor basierend auf der X-Gal-Färbung gab [Madry 2000]. Die Expression von sowohl IGF-I, als auch FGF-2 bei der Verwendung von Plasmid-Vektoren verringert sich schnell am 6. Tag, was für nichtvirale Vektoren in der Regel mit der Zeit charakteristisch ist [Shi 2010]. Ein rascher Rückgang der IGF-I-Expression wurde auch bei der Verwendung von adenoviralen Vektoren berichtet [Mi 2000; Smith 2000; Brower-Toland 2001]. Adenovirale IGF-I-Expression war prominent am 4. und 8. Tag und zeigte sich im weiteren Verlauf rückgängig zum 28. Tag [Brower-Toland 2001].

Gentransfer durch therapeutische rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren ist ein Teil von vielfältigen Ansätzen in der Reparatur von Gelenkknorpelschäden [Hemphill 2016]. Die Wiederherstellung von funktionstüchtigem Knorpelgewebe ist eins der ungelösten Probleme der sogenannten funktionsgerichtete Gewebzüchtung [Johnstone 2013]. Neben der Gentransferbehandlung mit verschiedenen Genkandidaten, allein oder kombiniert, ist das Einsetzen von MSZ und verschiedenen Biomaterialien vielversprechend in der Behandlung von Knorpeldefekten und osteochondralen Verletzungen [Rey-Rico 2016]. Obwohl in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte gemacht wurden, macht es die Komplexität der Wiederherstellung von funktionsfähigem Knorpelgewebe unverzichtbar, dass ein multidisziplinärer Ansatz (die Kombination von Gentransfertherapie, Stammzelltherapie und Biomaterialien) entwickelt wird, um die Herausforderung der Entwicklung des funktionellen Knorpelersatzes zu überwinden [Johnstone 2013; Orth 2014]. Es wurde kürzlich in einem translationalen Tiermodell nachgewiesen, dass die Knochenmarkaspiratkonzentrat-verstärkte Mikrofrakturierung zu einer signifikant erhöhten Defektfüllung, besseren strukturellen Parametern des Reparaturgewebes und einer verbesserten Integration im Vergleich zur alleinigen Mikrofrakturierung führt [Gao 2017; Madry 2017]. Andererseits gehören Gelenkknorpelverletzungen nicht zu lebensbedrohlichen

Krankheiten. Deswegen werden weitere kontrollierte Studien zur Erstellung sicherer und wirksamer Therapie dieser Erkrankungen erforderlich sein [Orth 2014].

## 5.6. Schlussfolgerung und Perspektive

Ein rAAV-vermittelter hFGF-2-Gentransfer verbessert die strukturelle osteochondrale Reparatur nach 4 Monaten *in vivo* im adulten Kaninchenmodell. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren die mitogene Fähigkeit der Chondrozyten im Reparaturgewebe bei osteochondralen Defekten *in vivo* ( $P = 0,049$ ) signifikant verbessert.

Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren verbessert viele Parameter des neugebildeten Knorpelgewebes der osteochondralen Defekte *in vivo*. Vier Monate nach der Behandlung mit rAAV-hFGF-2 wurde für die histologischen Beurteilungsparameter „Füllung des Defektes“ ( $P < 0,030$ ), „Integration des Reparaturgewebes“ ( $P < 0,030$ ) und „Zelluläre Morphologie“ ( $P < 0,030$ ) eine signifikante Verbesserung der Defekte beobachtet. Andere Einzelparameter, wie Färbeintensität des Matrixgewebes, Architektur des Defektes, Architektur der Oberfläche und Tidemark wa-

ren zwar verbessert, aber erreichten keine statistische Signifikanz. Die Einführung vom rAAV-hFGF-2-Gentransfer in den osteochondralen Defekt beschleunigt die Knorpelreparatur. Es fand sich kein signifikanter Unterschied bei der Reparatur des subchondralen Knochens durch rAAV-vermittelten Gentransfer von humanem FGF-2. Der Gentransfer von humanem FGF-2 durch rAAV-Vektoren verbessert den strukturellen Gesamtindex der osteochondralen Reparatur *in vivo*. Die Gesamtbeurteilung der histologischen Einstufung war signifikant besser für Defekte, die eine rAAV-hFGF-2-Behandlung erhalten haben, im Vergleich zu den Kontrolldefekten ( $P < 0,040$ ).

Somit stellt die rAAV-vermittelte *in situ*-Überexpression von humanem FGF-2 einen innovativen experimentellen Ansatz zur Heilung von osteochondralen Defekten dar. Derartige molekulare Therapien könnten in der Zukunft zu verbesserten rekonstruktiven Verfahren für die Behandlung fokaler Knorpelschäden in Orthopädie und Unfallchirurgie führen.

## 6. Literaturverzeichnis

Barone R., Pavaux C., Blin P. C., Cuq P. Atlas of rabbit anatomy. Masson & Cie, Paris. **1973**, 121-2.

Bell D. M., Leung K. K., Wheatley S. C., Ng L. J., Zhou S., Ling K. W., Sham M. H., Koopman P., Tam P. P., Cheah K. S. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.* **1997**, 16:174-8.

Berns K. I., Linden R. M. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays.* **1995**, 17:237-45.

Böck P. Mikroskopische Technik. In: Romeis, Urban und Schwarzenberg, 17. neugearbeitete Auflage, München-Wien-Baltimore. **1989**, 2013-29.

Brower-Toland B. D., Saxer R. A., Goodrich L. R., Mi Z., Robbins P. D., Evans C. H., Nixon A. J. Direct adenovirus-mediated insulin-like growth factor I gene transfer enhances transplant chondrocyte function. *Hum Gene Ther.* **2001**, 12:117-29.

Buckwalter J. A., Mankin H. J. Articular cartilage. Part II: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation.

*J Bone Joint Surg Am.* **1997**, 79(4):612-32.

Buckwalter J. A. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther.* **1998**, 28:192-202.

Burgess W. H., Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* **1989**, 58:575-602.

Caplan A. I., Goldberg VM. Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res.* **1999**, 367 (Suppl):S12-6.

Chamberlain J. R., Schwarze U., Wang P. R., Hirata R. K., Hankenson K. D., Pace J. M., Underwood R. A., Song K. M., Sussman M., Byers P. H., Russell D. W. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science.* **2004**, 303:1198-201.

Chuma H., Mizuta H., Kudo S., Takagi K., Hiraki Y. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-

thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis and Cartilage*. **2004**, 12:834-42.

Cucchiaroni M., Madry H., Kohn D., Menger M. D., Trippel S. B., Terwilliger E. F. Prolonged transgene expression in chondral and osteochondral articular cartilage defects in rabbits *in vivo* using rAAV vectors. *Trans ORS*. **2003a**, 0225.

Cucchiaroni M., Ren X. L., Perides G., Terwilliger E. F. Selective gene expression in brain microglia via adeno-associated virus type 2 and type 5 vectors. *Gene Ther*. **2003b**, 10:657-67.

Cucchiaroni M., Madry H., Ma C., Thurn T., Zurakowski D., Menger M. D., Kohn D., Trippel S. B., Terwilliger E. F. Improved tissue repair in articular cartilage defects *in vivo* by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther*. **2005**, 12:229-38.

Cucchiaroni M., Madry H. Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med*. **2005**, 7:1495-509.

Cucchiaroni M., Thurn T., Weimer A., Kohn D., Terwilliger E. F., Madry H. Restoration of the extracellular matrix in human osteoar-

thritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis Rheum.* **2007**, 56:158-67.

Cucchiarini M., Schetting S., Terwilliger E. F., Kohn D., Madry H. rAAV-mediated overexpression of FGF-2 promotes cell proliferation, survival, and  $\alpha$ -SMA expression in human meniscal lesions. *Gene Ther.* **2009a**, 16:1363-72.

Cucchiarini M., Terwilliger E. F., Kohn D., Madry H. Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with SOX9 via rAAV gene transfer. *J Cell Mol Med.* **2009b**, 13:2476-88.

Cucchiarini M., Ekici M., Schetting S., Kohn D., Madry H. Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A.* **2011**, 17:1921-33.

Cucchiarini M., Orth P., Madry H. Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy *in vivo*. *J Mol Med.* **2013**, 91:625-36.

Cucchiaroni M., Madry H. Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects *in vivo*. *Gene Ther.* **2014**, 21:811-9.

D'Amore P. M. Modes of FGF release *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Metast Rev.* **1990**, 9:227-38.

Dahlberg L. E., Aydemir A., Muurahainen N., Gühring H., Fredberg Edebo H., Krarup-Jensen N., Ladel C. H., Jurvelin J. S. A first-in-human, double-blind, randomised, placebo-controlled, dose ascending study of intra-articular rhFGF18 (sprifermin) in patients with advanced knee osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol.* **2016**, 34(3):445-50.

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

Evans C. H., Ghivizzani S. C., Oligino T. A., Robbins P. D. Future of adenoviruses in the gene therapy of arthritis. *Arthritis Res.* **2001**, 3:142-6.

Frisch J., Venkatesan J. K., Rey-Rico A., Schmitt G., Madry H., Cucchiarini M. Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* **2014a**, 5:1-12.

Frisch J., Venkatesan J. K., Rey-Rico A., Schmitt G., Madry H., Cucchiarini M. Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor- $\beta$  via recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther.* **2014b**, 25:1050-60.

Frisch J., Rey-Rico A., Venkatesan J. K., Schmitt G., Madry H., Cucchiarini M. Chondrogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates upon rAAV-mediated gene transfer and overexpression of the insulin-like growth factor I. *Tissue Eng Part A.* **2015**, 21:2460-71.

Gao L., Orth P., Müller-Brandt K., Goebel L. K., Cucchiarini M., Madry H. Early loss of subchondral bone following microfracture is

counteracted by bone marrow aspirate in a translational model of osteochondral repair. *Sci Rep.* **2017**, 7:45189.

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

Gospodarowicz D., Mescher A. L. A comparison of the responses of cultured myoblasts and chondrocytes to fibroblast and epidermal growth factors. *J Cell Physiol.* **1977**, 87:117-28.

Gospodarowicz D., Mescher A. L., Birdwell C. R. Stimulation of corneal endothelial cell proliferation *in vitro* by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp Eye Res.* **1977**, 25:75-89.

Ha C. W., Noh M. J., Choi K. B., Lee K. H. Initial phase I safety of retrovirally transduced human chondrocytes expressing transforming growth factor-beta-1 in degenerative arthritis patients. *Cytherapy.* **2012**, 14:247-56.

Hacker U. T., Gerner F. M., Buning H., Hutter M., Reichenspurner H., Stangl M., Hallek M. Standard heparin, low molecular weight heparin, low molecular weight heparinoid, and recombinant hirudin differ in their ability to inhibit transduction by recombinant adeno-associated virus type 2 vectors. *Gene Ther.* **2001**, 8:966-8.

Halbert C. L., Rutledge E. A., Allen J. M., Russell D. W., Miller A. D. Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol.* **2000**, 73:1524-32.

Hemphill D. D., McIlwraith C. W., Slayden R. A., Samulski R.-J., Goodrich L. R. Adeno-associated virus gene therapy vector scAA-VIGF-I for transduction of equine articular chondrocytes and RNA-seq analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* **2016**, 24(5):902-11.

Johnstone B., Alini M., Cucchiaroni M., Dodge G. R., Eglin D., Guilak F., Madry H., Mata A., Mauck R. L., Semino C. E., Stoddart M. J. Tissue engineering for articular cartilage repair - the state of the art. *Eur Cell Mater.* **2013**, 25:248-67.

Kato Y., Gospodarowicz D. Growth requirements of low-density rabbit costal chondrocyte cultures maintained in serum-free medium. *J Cell Physiol.* **1984**, 120:354-63.

Kato Y., Gospodarowicz D. Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor. *J Cell Biol.* **1985**, 100:477-85.

Lee K. H., Song S. U., Hwang T. S., Yi Y., Oh I. S., Lee J. Y., Choi K. B., Choi M. S., Kim S. J. Regeneration of hyaline cartilage by cell-mediated gene therapy using transforming growth factor beta 1-producing fibroblasts. *Hum Gene Ther.* **2001**, 12:1805-13.

Lohmander L. S., Hellot S., Dreher D., Krantz E. F.; Kruger D. S., Guermazi A., Eckstein F. Intraarticular sprifermin (recombinant human fibroblast growth factor 18) in knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheumatol.* **2014**, 66(7):1820-31.

Luan Y., Praul C. A., Gay C. V., Leach, R. M. Basic fibroblast growth factor: an autocrine growth factor for epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem.* **1996**, 62:372-82.

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

Madry H., Padera R., Seidel J., Langer R., Freed L. E., Trippel S. B., Vunjak-Novakovic G. Gene transfer of a human insulin-like growth factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage. *Hum Gene Ther.* **2002**, 13:1621-30.

Madry H., Cucchiarini 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.* **2003a**, 14:393-402.

Madry H., Cucchiarini M., Stein U., Remberger K., Menger M. D., Kohn D., Trippel S. B. Sustained transgene expression in cartilage defects *in vivo* after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system. *J Gene Med.* **2003b**, 5:502-9.

Madry H., Kohn D. Conservative treatment of knee osteoarthritis. *Unfallchirurg.* **2004**, 107:689-99.

Madry H., Kohn D., Cucchiarini M. Gene therapy in orthopaedic surgery. *Orthopade*. **2006**, 35:1193-202.

Madry H., Grün U. W., Knutsen G. Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int*. **2011**, 108:669-77.

Madry H., Cucchiarini M. Advances and challenges in gene-based approaches for osteoarthritis. *J Gene Med*. **2013**, 15:343-55.

Madry H., Kohn D., Cucchiarini M. Direct FGF-2 gene transfer via recombinant adeno-associated virus vectors stimulates cell proliferation, collagen production, and the repair of experimental lesions in the human ACL. *Am J Sports Med*. **2013**, 41:194-202.

Madry H., Kon E., Condello V., Peretti G. M., Steinwachs M., Seil R., Berruto M., Engebretsen L., Filardo G., Angele P. Early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. **2016**, 24(6):1753-62.

Madry H., Gao L., Eichler H., Orth P., Cucchiarini M. Bone Marrow Aspirate Concentrate-Enhanced Marrow Stimulation of Chondral Defects. *Stem Cells Int*. **2017**, 2017:1609685.

Mankin H. J., Buckwalter, J. A. Restoration of the osteoarthrotic joint. *J Bone Joint Surg Am.* **1996**, 78:1-2.

McCarty D. M. Self-complementary AAV vectors: advances and applications. *Mol Ther.* **2008**, 16:1648-56.

Mi Z., Ghivizzani S. C., Lechman E. R., Jaffurs D., Glorioso J. C., Evans C. H., Robbins P. D. Adenovirus-mediated gene transfer of insulin-like growth factor 1 stimulates proteoglycan synthesis in rabbit joints. *Arthritis Rheumatol.* **2000**, 43:2563-70.

Mi Z., Ghivizzani S. C., Lechman E., Glorioso1 J. C., Evans C. H., Robbins P. D. Adverse effects of adenovirus-mediated gene transfer of human transforming growth factor beta 1 into rabbit knees. *Arthritis Res Ther.* **2003**, 5:132-9.

Mingozzi F., Anguela X. M., Pavani G., Chen Y., Davidson R., J., Hui D. J., Yazicioglu M., Elkoubly L., Hinderer C. J., Faella A., Hovard C., Tai A., Podsakoff G. M., Zhou S., Basner-Tschakarjan E., Wright J. F., High K. A. Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Sci Transl Med.* **2013**, 5:1-20.

Murakami T., Yamamoto M., Ono K., Nishikawa M., Nagata N., Motoyoshi K., Akatsu T. Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Comm.* **1998**, 252:747-52.

Orth P., Cucchiari M., Kohn D., Madry H. Alterations of the subchondral bone in osteochondral repair - translational data and clinical evidence. *Eur Cell Mater.* **2013**, 25:299-316.

Orth P., Rey-Rico A., Venkatesan J. K., Madry H., Cucchiari M. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning.* **2014**, 7:1-17.

Pascher A., Palmer G. D., Steinert A., Oligino T., Gouze E., Gouze J. N., Betz O., Spector M., Robbins P. D., Evans C. H., Ghivizzani S. C. Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther.* **2004**, 11:133-41.

Regling G. Regulationsebenen und Krankheitsdynamik des Arthrose-Gelenkes. Teil 1: Arthrose-Begriff und biomechanische Funktionsbeanspruchung. Teil 2: Bioelektrische Mechanismen und Synovia-Ruhe-pO<sub>2</sub>. *Z Arztl Fortbild (Jena).* **1994**, 88: 903-16.

Rey-Rico A., Frisch J., Venkatesan J. K., Schmitt G., Madry H., Cucchiaroni M. Determination of effective rAAV-mediated gene transfer conditions to support chondrogenic differentiation processes in human primary bone marrow aspirates. *Gene Ther.* **2015**, 22:50-7.

Rey-Rico A., Frisch J., Venkatesan J. K., Schmitt G., Rial-Hermida I., Taboada P., Concheiro A., Madry H., Alvarez-Lorenzo C., Cucchiaroni M. PEO-PPO-PEO carriers for rAAV-mediated transduction of human articular chondrocytes *in vitro* and in a human osteochondral defect model. *ACS Appl Mater Interfaces.* **2016**, 8(32):20600-13.

Rosen D., Miller S. C., DeLeon E., Thompson A. Y., Bentz H., Mathews M., Adams S. Systemic administration of recombinant transforming growth factor beta 2 (rTGF-beta2) stimulates parameters of cancellous bone formation in juvenile and adult rats. *Bone.* **1994**, 15:355-9.

Rudert M., Wirth C. J. Cartilage regeneration and substitution. *Orthopade.* **1998**, 27:309-21.

Sekiya I., Tsuji K., Koopman P., Watanabe H., Yamada Y., Shinomiyai K., Nifuji A., Noda M. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell Line, TC6. *J Biol Chem.* **2000**, 275:10738-44.

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 J Surg Am.* **1997**, 79:1452-63.

Selot R. S., Hareendran S., Jayandharan G. R. Developing immunologically inert adeno-associated virus (AAV) vectors for gene therapy: possibilities and limitations. *Curr Pharm Biotechnol.* **2013**, 14:1-11.

Seno M., Masago A., Nishimura A., Tada H., Kosaka M., Sasada R., Igarashi K., Seno S., Yamada H. BALB/c3T3 cells co-expressing FGF-2 and soluble FGF receptor acquire tumorigenicity. *Cytokine.* **1998**, 10:290-4.

Shi S., Mercer S., Trippel S. B. Effect of transfection strategy on growth factor overexpression by articular chondrocytes. *J Orthop Res.* **2010**, 28:103-9.

Shida J., Jingushi S., Izumi T., Iwaki A., Sugioka Y. Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats *in vivo*. *J Orthop Res.* **1996**, 14:265-72.

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

Sobotta N. Atlas der Anatomie des Menschen, 21 Auflage, Elsevier, Urban & Fischer. **2004**, 725-7.

Tanaka H., Mizokami H., Shiigi E., Murata H., Ogasa H., Mine T., Kaway S. Effects of basic fibroblast growth factor on the repair of large osteochondral defects of articular cartilage in rabbits: dose-response effects and long-term outcomes. *Tissue Eng.* **2004**, 10:633-41.

Tao K., Rey-Rico A., Frisch J., Venkatesan J. K., Schmitt G., Madry H., Lin J., Cucchiaroni M. Effects of combined rAAV-mediated TGF- $\beta$  and sox9 gene transfer and overexpression on

the metabolic and chondrogenic activities in human bone marrow aspirates. *J Exp Orthop.* **2017**, 4:4

Trudel C., Faure-Desire V., Florkiewicz R. Z., Baird A. Translocation of FGF2 to the cell surface without release into conditioned media. *J Cell Physiol.* **2000**, 185:260-68.

van Beuningen H. M., van der Kraan P. M., Arntz O. J., van den Berg W. B. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest.* **1994**, 71:279-90.

van Osch G. J., van der Veen S. W., Buma P., Verwoerd-Verhoef H. L. Effect of transforming growth factor-beta on proteoglycan synthesis by chondrocytes in relation to differentiation stage and the presence of pericellular matrix. *Matrix Biol.* **1998**, 17:413-24.

Venkatesan J. K., Ekici M., Madry H., Schmitt G., Kohn D., Cucchiaroni M. SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* **2012**, 3:22-36.

Venkatesan J. K., Rey-Rico A., Schmitt G., Wezel A., Madry H., Cucchiarini M. rAAV-mediated overexpression of TGF- $\beta$  stably re-structures human osteoarthritic articular cartilage *in situ*. *J Transl Med*. **2013**, 11:211-24.

Weimer A., Madry H., Mikheeva E., Thurn T., Ma C., Terwilliger E. F., Kohn D., Cucchiarini M. Combined overexpression of human FGF-2 and SOX9 via rAAV stimulates cell proliferation and extra-cellular matrix synthesis in human normal and osteoarthritic articular cartilage *in situ*. *Transactions of the Orthopaedic Research Society*. **2007**, 1467.

Weimer A., Madry H., Venkatesan J. K., Schmitt G., Frisch J., Wezel A., Jung J., Kohn D., Terwilliger E. F., Trippel S. B., Cucchiarini M. Benefits of recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated insulin-like growth factor I (IGF-I) overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF-I axis. *Mol Med*. **2012**, 18:346-58.

Xiao X., Li J., Samulski R. J. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol*. **1996**, 70:8098-108.

Xiao X., Li J., McCown T. J., Samulski R. J. Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system.

*Exp Neurol.* **1997**, 144:113-24.

Yonekura A., Osaki M., Hirota Y., Tsukazaki T., Miyazaki Y., Matsumoto T., Ohtsuru A., Namba H., Shindo H., Yamashita S.

Transforming growth factor- $\beta$  stimulates articular chondrocyte cell growth through p44/42 MAP Kinase (ERK) activation. *Endocr J.*

**1999**, 46:545-53.

Yuan S.-H., Bi Z. Effect of recombinant adeno-associated BMP-4/7 fusion gene of the biology of BMSCs. *Mol Med Rep.* **2012**,

6:1401-7.

Zhen G., Wen C., Jia X., Li Y., Crane J. L., Mears S. C., Askin F. B., Frassica F. J., Chang W., Yao J., Carrino J. A., Cosgarea A.,

Artemov D., Chen Q., Zhao Z., Zhou X., Riley L., Sponseller P.,

Wan M., Lu W. W., Cao X. Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nat Med.* **2013**, 19:704-12.

## 7. Publikationen/Danksagung

Weimer A., Madry H., Mikheeva E., Thurn T., Ma C., Terwilliger E. F., Kohn D., Cucchiari M. Combined overexpression of human FGF-2 and SOX9 via rAAV stimulates cell proliferation and extracellular matrix synthesis in human normal and osteoarthritic articular cartilage *in situ*. *Transactions of the Orthopaedic Research Society*. **2007**, 1467.

## Danksagung

Die präsentierte Arbeit wurde am Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung, Zentrum für Experimentelle Orthopädie, Universität des Saarlandes erstellt.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Henning Madry für die Vergabe des Themas, die kritische Sichtweise und persönliche Betreuung sowie fachliche Begleitung. Desweiteren möchte ich mich für die praktischen Ratschläge, die Vorschläge zur Gestaltung der Doktorarbeit und das Interesse an meinen Fortschritten bedanken.

Ein besonderes herzlicher Dank geht an Prof. Dr. rer. nat. Magali Cucchiarini Madry für das fachliche Interesse an den praktischen und theoretischen Teilen der Arbeit, für die wertvolle Ratschläge, die freundschaftliche Unterstützung und die Teilnahme an meiner wissenschaftlichen Entwicklung.

Außerdem spreche ich meinen Dank an alle Mitarbeiter des Labors, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Günther Kaul und Frau Anja Weimer-Leißing für ihre Hilfsbereitschaft und ihre freundschaftli-

che Ratschläge und Frau Tanja Thurn für die technische Unterweisung und Hilfe aus.

Anschließend bedanke ich mich bei den Menschen, die mich motiviert haben, immer nach vorne zu schauen, vor allem bei Ekaterina und Vadim Lantsberg, meinen Eltern, Dr. med. Christoph Broy und Frau Dr. med. Tanja Arhip.