

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

Effekt der Überexpression des chondrogenen  
Transkriptionsfaktors SOX9 durch rekombinante adeno-  
assoziierte virale (rAAV) Vektoren in Kombination mit  
Trägermaterialien auf die frühe Knorpelreparatur im  
translationalen Großtiermodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

November 2017

vorgelegt von

Kathrin Müller-Brandt, geboren am 8. November 1990 in Kassel

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Henning Madry
- II. Berichterstatter:
- III. Berichterstatter:

Tag der Promotion:

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Zusammenfassung / Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Problematik</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Die osteochondrale Einheit</b> .....	<b>4</b>
2.2.1 Der Gelenkknorpel .....	4
2.2.1.1 Funktion des Gelenkknorpels .....	4
2.2.1.2 Aufbau des Gelenkknorpels .....	5
2.2.2 Der subchondrale Knochen .....	6
<b>2.3 Knorpeldefekte</b> .....	<b>6</b>
<b>2.4 Etablierte operative Therapiemöglichkeiten</b> .....	<b>8</b>
2.4.1 Markraumeröffnende Verfahren .....	8
2.4.2 Autologe Chondrozytentransplantation .....	9
<b>2.5 Experimentelle Therapieansätze</b> .....	<b>10</b>
2.5.1 Gentransfer .....	10
2.5.1.1 Nichtvirale Gentransfermethoden .....	10
2.5.1.2 Virale Genvektoren .....	10
2.5.2 Therapeutische Faktoren .....	11
2.5.3 Knochenmarkaspirat .....	12
2.5.4 Gentherapie .....	13
2.5.5 Trägermaterialien .....	13
2.5.5.1 Solide Trägermaterialien .....	14
2.5.5.2 Hydrogele .....	14
2.5.6 <i>Tissue Engineering</i> .....	15
<b>2.6 Konzept der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>15</b>
<b>3 Fragestellung</b> .....	<b>17</b>

<b>4</b>	<b>Material</b> .....	<b>18</b>
4.1	Chemikalien.....	18
4.2	Lösungen, Puffer und Medien.....	19
4.3	Geräte.....	21
4.4	Software.....	22
4.5	Antikörper.....	22
4.6	Genvektor und Zellen.....	22
4.7	Trägermaterialien.....	23
4.8	Tierstämme.....	23
4.9	Operationsmaterial.....	23
<b>5</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>25</b>
5.1	Versuchsaufbau.....	25
5.1.1	Gruppeneinteilung.....	25
5.1.2	Versuchstiere.....	26
5.2	Operation.....	26
5.3	Sektion.....	28
5.4	Makroskopische Analyse.....	28
5.5	Mikrofokus Computertomographie ( $\mu$ -CT).....	30
5.6	Histologische Aufarbeitung.....	32
5.6.1	Entkalkung.....	32
5.6.2	Fixierung.....	32
5.6.3	Einbettung.....	32
5.7	Färbung.....	33
5.7.1	Safranin-O-Echtgrün.....	33
5.7.2	Hämatoxylin-Eosin.....	35
5.7.3	Typ-II- Kollagen.....	35
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
6.1	Effekt von rAAV-SOX9 auf die osteochondrale Reparatur nach vier Wochen <i>in vivo</i> .....	36
6.1.1	Semiquantitativ-makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur.....	36
6.1.2	Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Knorpelreparatur.....	37
6.1.2.1	Safranin-O-Echtgrün-Färbung.....	37
6.1.2.2	Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie.....	39
6.1.3	Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Reparatur des subchondralen Knochens.....	40

6.1.3.1	Auswirkung auf den subchondralen Knochen im Bereich des Defekts .....	40
6.1.3.2	Auswirkung auf den angrenzenden subchondralen Knochen .....	41
<b>6.2</b>	<b>Effekt von rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat auf die osteochondrale Reparatur nach vier Wochen <i>in vivo</i> .....</b>	<b>43</b>
6.2.1	Semiquantitativ-makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur .....	43
6.2.2	Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Knorpelreparatur .....	44
6.2.2.1	Safranin-O-Echtgrün-Färbung .....	44
6.2.2.2	Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie .....	45
6.2.3	Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Reparatur des subchondralen Knochens .....	46
6.2.3.1	Auswirkungen auf den subchondralen Knochen im Bereich des Defekts .....	46
6.2.3.2	Auswirkung auf den angrenzenden subchondralen Knochen .....	48
<b>6.3</b>	<b>Effekt von rAAV-SOX9 und PCL-Medium auf die Knorpelreparatur nach vier Wochen <i>in vivo</i> .....</b>	<b>49</b>
6.3.1	Semiquantitativ-makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur .....	49
6.3.2	Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Knorpelreparatur .....	50
6.3.2.1	Safranin-O-Echtgrün-Färbung .....	50
6.3.2.2	Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie .....	52
6.3.3	Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Reparatur des subchondralen Knochens .....	53
6.3.3.1	Effekt auf den subchondralen Knochen im Bereich des Defekts .....	53
6.3.3.2	Effekt auf den angrenzenden Knochen .....	54
<b>6.4</b>	<b>Effekt von rAAV-SOX9 und PF127-Hydrogel auf die Knorpelreparatur nach vier Wochen <i>in vivo</i> .....</b>	<b>56</b>
6.4.1	Semiquantitativ-makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur .....	56
6.4.2	Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Knorpelreparatur .....	57
6.4.2.1	Safranin-O-Echtgrün-Färbung .....	57
6.4.2.2	Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie .....	58
6.4.3	Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Reparatur des subchondralen Knochens .....	59
6.4.3.1	Effekt auf den subchondralen Knochen im Bereich des Defekts .....	59
6.4.3.2	Effekt auf den angrenzenden subchondralen Knochen .....	61
<b>6.5</b>	<b>Vergleich der Effekte der therapeutischen Ansätze auf die osteochondrale Reparatur .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
7.1	Übersicht .....	65
7.2	Diskussion der experimentellen Vorgehensweise .....	65

7.2.1	Studiendesign und Begründung der Stichprobenwahl .....	65
7.2.2	Versuchstiere.....	66
7.2.3	Analyseverfahren der osteochondralen Reparatur .....	67
<b>7.3</b>	<b>Diskussion der untersuchten Therapieansätze .....</b>	<b>67</b>
7.3.1	SOX9-beladene rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren .....	67
7.3.2	Autologes Knochenmarkspirat.....	70
7.3.3	Solides Poly-ε-Caprolacton-(PCL-)Medium.....	73
7.3.4	Thermosensitives Hydrogel PF127.....	74
7.3.5	Vergleich der untersuchten Therapieansätze .....	76
<b>7.4</b>	<b>Klinische Relevanz und Ausblick.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>92</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>93</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der osteochondralen Einheit.....	8
Abbildung 2: Operationsinstrumente.....	24
Abbildung 3: Gruppeneinteilung.....	26
Abbildung 4: Operation.....	27
Abbildung 5: Auswertung der $\mu$ -CT-Bilder anhand der <i>regions of interests</i> .....	31
Abbildung 6: Histologische Darstellung des Effekts von rAAV-SOX9 auf die..... Knorpelreparatur.....	38
Abbildung 7: Darstellung des Gehalts an Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe.....	39
Abbildung 8: Histologische Darstellung des Effekts von rAAV-SOX9 in..... Knochenmarkspirat auf die Knorpelreparatur.....	45
Abbildung 9: Darstellung des Gehalts an Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe.....	46
Abbildung 10: Histologische Darstellung des Effekts von rAAV-SOX9 in..... Knochenmarkspirat und einem PCL-Medium auf die Knorpelreparatur.....	51
Abbildung 11: Darstellung des Gehalts an Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe.....	52
Abbildung 12: Histologische Darstellung des Effekts von rAAV-SOX9 in PF127..... auf die Knorpelreparatur.....	58
Abbildung 13: Darstellung des Gehalts an Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe.....	59
Abbildung 14: Gesamtpunktzahl der rAAV- <i>lacZ</i> -Kontrollgruppen im..... Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i> ....	63

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien .....	18
Tabelle 2: Verwendete Lösungen, Puffer und Medien .....	19
Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien .....	21
Tabelle 4: Verwendete Computerprogramme .....	22
Tabelle 5: Herkunft verwendeter Antikörper .....	22
Tabelle 6: Oswestry-Bewertungssystem ( <i>Oswestry Arthroscopy Score</i> ).....	29
Tabelle 7: Makroskopisches Bewertungssystem nach Goebel <i>et al.</i> .....	30
Tabelle 8: Modifiziertes histologisches Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i> .....	33
Tabelle 9: Immunreaktivität des Typ-II-Kollagens im Defektgewebe .....	35
Tabelle 10: Effekt von rAAV-SOX9 auf die chondrale Reparatur im.....	
Bewertungssystem nach Goebel <i>et al.</i> .....	37
Tabelle 11: Effekt von rAAV-SOX9 auf die Knorpelreparatur im Oswestry-.....	
Bewertungssystem .....	37
Tabelle 12: Effekt von rAAV-SOX9 auf die Knorpelreparatur im.....	
Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i> .....	39
Tabelle 13: Effekt von rAAV-SOX9 auf den Typ-II-Kollagengehalt im Defekt .....	40
Tabelle 14: Effekt von rAAV-SOX9 auf die subchondrale Knochenplatte im.....	
Defektbereich.....	40
Tabelle 15: Effekt von rAAV-SOX9 auf die subartikuläre Spongiosa im.....	
Defektbereich.....	41
Tabelle 16: Effekt von rAAV-SOX9 auf die angrenzende subartikuläre Spongiosa.....	42
Tabelle 17: Effekt von rAAV-SOX9 auf die angrenzende subchondrale.....	
Knochenplatte.....	42
Tabelle 18: Effekt von rAAV in Knochenmarkspirat auf die Knorpelreparatur.....	
im Bewertungssystem nach Goebel <i>et al.</i> .....	43
Tabelle 19: Effekt von rAAV in Knochenmarkspirat auf die Knorpelreparatur.....	
im Oswestry-Bewertungssystem .....	44
Tabelle 20: Effekt von rAAV in Knochenmarkspirat auf die Knorpelreparatur.....	
im Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i> .....	45
Tabelle 21: Effekt von rAAV in Knochenmarkspirat auf den Typ-II-.....	
Kollagengehalt im Defekt.....	46
Tabelle 22: Effekt von rAAV in BMA auf die subartikuläre Spongiosa im.....	
Defektbereich.....	47



Tabelle 23: Effekt von rAAV in BMA auf die subchondrale Knochenplatte im..... Defektbereich.....	47
Tabelle 24: Effekt von rAAV in BMA auf die angrenzende subartikuläre..... Spongiosa.....	48
Tabelle 25: Effekt von rAAV in BMA auf die angrenzende subchondrale..... Knochenplatte.....	49
Tabelle 26: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat..... auf die chondrale Reparatur im Bewertungssystem nach Goebel <i>et al.</i> .....	50
Tabelle 27: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat..... auf die Knorpelreparatur im Oswestry-Bewertungssystem .....	50
Tabelle 28: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat..... auf die chondrale Reparatur im Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i> .....	51
Tabelle 29: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat..... auf den Typ-II-Kollagengehalt im Defekt.....	52
Tabelle 30: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat..... auf die subchondrale Knochenplatte im Defektbereich .....	53
Tabelle 31: Effekt des PCL-Mediums rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat auf..... die subartikuläre Spongiosa im Defektbereich .....	54
Tabelle 32: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat..... auf die angrenzende subchondrale Knochenplatte.....	55
Tabelle 33: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat..... auf die angrenzende subartikuläre Spongiosa .....	55
Tabelle 34: Effekt von SOX9 in PF127 auf die Knorpelreparatur im..... Bewertungssystem nach Goebel <i>et al.</i> .....	56
Tabelle 35: Effekt von PF127 mit rAAV-SOX9 auf die chondrale Reparatur im..... Oswestry-Bewertungssystem.....	57
Tabelle 36: Effekt von PF127 mit rAAV-SOX9 auf die Knorpelreparatur im..... Bewertungssystem nach Sellers <i>et al.</i> .....	58
Tabelle 37: Effekt von PF127 mit rAAV-SOX9 auf den Typ-II-Kollagengehalt..... im Defekt.....	59
Tabelle 38: Effekt von PF127 und rAAV-SOX9 auf die subartikuläre Spongiosa..... im Defektbereich .....	60
Tabelle 39: Effekt von PF127 und rAAV-SOX9 auf die subchondrale..... Knochenplatte im Defektbereich.....	60
Tabelle 40: Effekt von PF127 und AAV-SOX9 auf die angrenzende subartikuläre..... Spongiosa.....	61

Tabelle 41: Effekt von PF127 und rAAV-SOX9 auf die angrenzende subchondrale..... Knochenplatte.....	62
Tabelle 42: Vergleich der Effekte der einzelnen therapeutischen Ansätze auf die..... chondrale Reparatur im Bewertungssystem nach Seller <i>et al.</i> .....	63

## Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
Ad5/8	Adenovirus 5/8
aqua bidest.	aqua bidestillata
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
BMA	Knochenmarkaspirat, <i>bone marrow aspirate</i>
BMP-2	Knochenmorphogenetisches Protein 2, <i>bone morphogenic protein 2</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomographie
engl.	Englisch
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor, <i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
G	Gramm
H	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HMG	<i>High mobility group</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IGF-I	Insulinartiger Wachstumsfaktor, <i>Insulin-like growth factor I</i>
IgG	Immunglobulin G
IL1	Interleukin 1
IL8	Interleukin 8
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
l	Liter
lacZ	β-Galactosidase-Gen
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute

---

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCL	Poly- $\epsilon$ -Caprolacton
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor, <i>platelet-derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
PF127	Poloxamer 407
PGA	Polyglykolsäure, <i>polyglycolic acid</i>
PPO	Polypropylenoxid
pSSV9	AAV-2 genomischer Klon nach Samulski
rAAV Vektoren	rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren
RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
s	Sekunde
SOX9	<i>SRY-related HMG Box 9</i>
SRY	<i>Sex determining region Y</i>
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ , <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
U	units
VEGF	Endothelwachstumsfaktor, <i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
Wnt	<i>vertebrate homologue of the Drosophila segment polarity gene wingless</i>
$\mu$ -CT	Mikrofokus-Computertomographie
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter

## 1 Zusammenfassung

Die Regenerationsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels ist begrenzt. Die Suche nach innovativen Methoden zur Knorpelheilung ist Gegenstand intensiver Forschung. Gentherapie und Gewebszüchtung (*Tissue Engineering*) sind vielversprechende Ansätze. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob die frühe Reparatur fokaler vollschichtiger Knorpeldefekte im Großtiermodell *in vivo* durch *in situ* Applikation von Biomaterialien und eines replikationsdefekten, rekombinanten adeno-assoziierten viralen Genvektors (rAAV), der eine cDNS des humanen Transkriptionsfaktors SOX9 trägt, verbessert wird. Folgende Hypothesen wurden speziell überprüft: (1) Alleinige Überexpression von SOX9 beladenen rAAV-Vektoren verbessert die Knorpelreparatur im Vergleich zur Kontrollgruppe mit *lacZ*-beladenen rAAV-Vektoren. (2) Überexpression von rAAV-SOX9 in autologem Knochenmarkspirat verbessert die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe. (3) Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem soliden Biomaterial verbessert die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe. (4) Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem thermosensitiven Hydrogel verbessert die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe. (5) Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem thermosensitiven Hydrogel ist allen anderen hier untersuchten Ansätzen hinsichtlich der Verbesserung der Knorpelreparatur überlegen.

Für die Studie wurden zwölf adulte weibliche Göttinger Minipigs ausgewählt und vollschichtige chondrale Defekte in der Trochlea femoris mit entweder rAAV-SOX9, rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat, einem PCL-Trägermaterial und rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat, rAAV-SOX9 im thermosensitiven PF127-Hydrogel oder als Negativkontrolle rAAV-*lacZ* behandelt. Vier Wochen postoperativ erfolgte die Entnahme der Kniegelenke und die Analyse der Defektreparatur makroskopisch, histologisch, immunhistochemisch und in der Mikrofokuscomputertomographie ( $\mu$ -CT).

Die Daten zeigen, dass (1) die alleinige Überexpression von rAAV-SOX9 die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe signifikant verbessert. Sie zeigen weiterhin, dass (2) Überexpression von rAAV-SOX9 in autologem Knochenmarkspirat die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe verbessert. Die Hypothese, dass (3) eine Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem soliden Biomaterial die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe verbessert, wurde widerlegt. Schließlich demonstrieren die Daten, dass (4) die Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem thermosensitiven Hydrogel den singulären Parameter „Defektarchitektur“ im Vergleich zur rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe verbessert. Zuletzt wurde die Hypothese (5) verworfen, dass Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem thermosensitiven Hydrogel allen anderen untersuchten Ansätzen hinsichtlich der Verbesserung der Knorpelreparatur überlegen ist.

Somit zeigen die Daten zusammenfassend, dass die rAAV-vermittelte Überexpression von SOX9 im Tiermodell zu einer verbesserten osteochondralen Reparatur führt. Die Daten demonstrieren weiterhin, dass die Defektreparatur durch Zusatz von Knochenmarkspirat sowie durch Kombination von Prinzipien der Gentherapie (rAAV-SOX9) mit *Tissue Engineering* (PF127/PCL) zusätzlich verbessert werden kann.

## Abstract

### **Overexpression of the chondrogenic transcription factor SOX9 via recombinant adeno associated viral (rAAV) vectors in combination with biomaterials and its effect on early cartilage repair in a large animal model**

The ability of hyaline articular cartilage to regenerate is limited. The quest for innovative methods to treat focal cartilage defects is the subject of intensive research. Gene therapy and tissue engineering are promising approaches in this regard. The present thesis investigates whether the early repair of focal, full-thickness articular cartilage defects in a large animal model *in vivo* is improved by *in situ* application of biomaterials and a replication-defective, recombinant adeno associated viral (rAAV) gene vector carrying a cDNA of the human transcription factor SOX9. The following hypotheses were examined: (1) Sole overexpression of rAAV-SOX9 improves cartilage repair as compared to the control group (*lacZ*-rAAV vectors). (2) Overexpression of rAAV-SOX9 in autologous bone marrow aspirate improves the cartilage repair in comparison with the rAAV-*lacZ* control group. (3) Overexpression of rAAV-SOX9 in combination with a solid biomaterial improves cartilage repair compared with the rAAV-*lacZ* control group. (4) Overexpression of rAAV-SOX9 in combination with a thermosensitive hydrogel improves cartilage repair in comparison with the rAAV-*lacZ* control group. (5) Overexpression of rAAV-SOX9 combined with a thermosensitive hydrogel is superior to any other investigated approaches.

Twelve adult female Minipigs received focal full-thickness chondral defects in the trochlea groove and were treated with either rAAV-SOX9, rAAV-SOX9 in bone marrow aspirate, rAAV-SOX9 in a poly- $\epsilon$ -caprolacton(PCL) scaffold and rAAV-SOX9 in the thermosensitive PF127 hydrogel, or similarly with rAAV-*lacZ* as a negative control. Four weeks postoperatively, osteochondral repair was analyzed macroscopically, histologically, immunohistochemically and using microfocus computer tomography ( $\mu$ -CT).

The data show that (1) sole overexpression of rAAV-SOX9 simultaneously improves cartilage repair in comparison with the rAAV-*lacZ* control group. They further reveal that (2) overexpression of rAAV-SOX9 in autologous bone marrow aspirate improves chondral repair by comparison with the rAAV-*lacZ* control group. The hypothesis that (3) overexpression of rAAV-SOX9 combined with a solid scaffold leads to better cartilage repair than the *lacZ* control group was rejected. After all the data show that (4) the overexpression of rAAV-SOX9 in combination with a thermosensitive hydrogel optimizes the singular parameter "defect architecture" compared to the rAAV-*lacZ* control group. Finally, the hypothesis was rejected that (5) overexpression of rAAV-SOX9 in combination with a thermosensitive hydrogel is superior to all other approaches studied regarding articular cartilage repair.

In conclusion the data show that rAAV-mediated overexpression of SOX9 in a translational large animal model improves osteochondral repair. The data also demonstrate that defect repair can be further improved by the addition of bone marrow aspirate and by combining gene therapy (rAAV-SOX9) with tissue engineering principles (PF127/scaffold).

## 2 Einleitung

### 2.1 Problematik

Defekte des hyalinen Gelenkknorpels sind häufig. Im Rahmen einer Studie wurden Knorpeldefekte in 60% aller durchgeführten Arthroskopien festgestellt (Widuchowski *et al.*, 2007). Die Ursachen sind vielfältig und umfassen die lokale traumatische Knorpelschädigung, Osteochondrosis dissecans, Osteonekrose und Arthrose (Pape *et al.*, 2010). Sie alle führen früher oder später zu einer gestörten Gelenkfunktion, die sich klinisch in der Form von Schmerzen, Schwellung, Erguss und motorischer Einschränkung bemerkbar macht. Unbehandelt kommt es zur Ausbreitung der lokalen Läsion und zur fortschreitenden Arthrose des Gelenks, denn Gelenkknorpel birgt nur ein sehr geringes Heilungspotential (Hunziker, 2002; O'Driscoll, 1998). Nach rekonstruktiv-chirurgischer Therapie entwickelt sich häufig ein Reparaturgewebe, das in seiner Form und Funktion nicht den ursprünglichen hyalinen Knorpel ersetzt und den degenerativen Prozess, der mit der Verletzung von Knorpel beginnt, nicht aufhalten kann (Hiraki *et al.*, 2001).

Da fokale Knorpelläsionen beim Erwachsenen spontan nicht regenerieren, ist die Therapie solcher Läsionen seit langem Gegenstand aktueller Forschungen. Verschiedene Verfahren zur Defektreparatur wurden entwickelt, bisher konnten keine der im klinischen Gebrauch üblichen Operationsverfahren die Wiederherstellung des ursprünglichen Knorpels erreichen (Cucchiari *et al.*, 2014). Es bleibt daher weiterhin das Ziel, ein innovatives Therapieverfahren zu entwickeln, das zur Knorpelregeneration mit Ausbildung eines gleichwertigen Gewebes führt. Gentherapie und Gewebezüchtung (engl. *tissue engineering*) sind innovative Strategien, die potentielle Lösungswege für die Problematik der nicht regenerierenden Knorpeldefekte anbieten. Durch Gentransfer können Transkriptions- oder Wachstumsfaktoren in Zellen im Knorpeldefekt transferiert werden, um dort die Chondrogenese mit Ausbildung einer neuen Knorpelmatrix zu induzieren. Mesenchymale pluripotente Stammzellen aus Knochenmarkaspirat können sich in Knorpelmilieu zu Chondrozyten differenzieren, was sie zu optimalen Zelllieferanten in chondralen Defekten macht (Johnstone *et al.*, 1998). Im Rahmen des *Tissue*

*Engineering* werden Trägermaterialien entwickelt, die in den Defekt implantiert werden, um dort Zellen des Defekts als Leitstruktur zu dienen und den Defekt mechanisch zu stabilisieren, bis sich ein funktionales Neogewebe ausgebildet hat (Kock *et al.*, 2012).

Eine Kombination von Stammzellen, Gentransfer und *Tissue Engineering* ist eine interessante und vielversprechende Strategie, die potentiell bessere Ergebnisse erzielt als der Gebrauch von Gentransfer oder Trägermedien alleine (Madry & Cucchiari, 2016). Für die vorliegende Arbeit untersuchten wir den Effekt von Gentransfer durch rekombinante und replikationsdefekte adeno-assoziierte virale Vektoren (rAAV) allein sowie in Kombination mit Knochenmarkaspirat und Trägermaterialien auf die Regeneration chondraler Defekte.

## **2.2 Die osteochondrale Einheit**

Die osteochondrale Einheit ist die Funktionseinheit diarthrotischer Gelenke. Sie setzt sich zusammen aus Gelenkknorpel und dem darunter liegenden subchondralen Knochen (Madry *et al.*, 2010). Beide Bestandteile fungieren als Partner, deren Interaktion und gegenseitige Wirkung aufeinander essentiell für eine gute Gelenkfunktion sind (Orth *et al.*, 2014a). Kommt es zu Läsionen innerhalb des subchondralen Knochens, führt dies auch zu Veränderungen im darüber liegenden Knorpel und umgekehrt (Madry *et al.*, 2016).

### **2.2.1 Der Gelenkknorpel**

#### 2.2.1.1 Funktion des Gelenkknorpels

Hyaliner Knorpel überzieht als Gleitschicht die knöchernen Enden diarthrotischer Gelenke. Dadurch wird die Kongruenz der artikulierenden Partner erhöht und somit eine optimale Funktion des Gelenks gewährleistet (Hunziker *et al.*, 2007). Weiterhin dient der Gelenkknorpel als Stoßdämpfer und verteilt die einwirkenden Kräfte und Lasten optimal auf den darunter liegenden subchondralen Knochen (Martel-Pelletier



*et al.*, 2008). Daher ist eine intakte Gelenkfläche unabdingbar für eine optimale Gelenkfunktion.

#### 2.2.1.2 Aufbau des Gelenkknorpels

Hyaliner Knorpel ist ein avaskuläres, alymphatisches und anervales Gewebe (O'Driscoll, 1998). Er setzt sich zusammen aus Chondrozyten und der extrazellulären Matrix bestehend aus Kollagenen und Proteoglykanen, insbesondere Aggrecan (Hunziker *et al.*, 1997). Zu 90-95% findet sich Typ-II-Kollagen (Martel-Pelletier *et al.*, 2008), weiterhin vertreten sind Kollagene vom Typ V, VI, IX, X, XI und XIV. Die Kollagene geben dem Knorpel die Grundstruktur und Form und ermöglichen die Widerstandskraft gegenüber Spannung und Scherkräften. Die zwischen den Kollagenketten verankerten Proteoglykane gehen Wechselwirkungen mit Wassermolekülen ein, die sich in das Gerüst aus Kollagenen und Proteoglykanen einlagern. Dadurch erhöht sich die Spannung der Kollagenfibrillen und der Knorpel erlangt seine Druckelastizität und Resistenz gegenüber Kompression (Hall *et al.*, 1996). Insgesamt macht der Wasseranteil 80% des Gesamtgewichts aus (Bora & Miller, 1987).

Innerhalb der extrazellulären Matrix liegen die Chondrozyten zu Gruppen angeordnet. Anhand der Zellverteilung lässt sich der Gelenkknorpel in verschiedene Zonen einteilen. Zu oberst liegt die tangentielle Zone, innerhalb derer längliche Zellen parallel zur Oberfläche angeordnet sind. Diese Zone steht in Kontakt mit der Synovia, wodurch die Ernährung des Knorpels über Diffusion sichergestellt wird (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Es schließt sich eine Zone an, in der runde Chondrozyten frei verteilt in der Matrix liegen, gefolgt von einer tiefen Zone mit ebenfalls runden, in Kolonnen "gestapelten" Zellen (Madry & Cucchiari, 2016). Diese Schicht des nicht kalzifizierten Knorpels wird durch die sogenannte *Tidemark* vom kalzifizierten Knorpel getrennt (Broom & Poole, 1982). Insgesamt machen die Chondrozyten alleine den geringsten Teil der Gesamtmasse aus, produzieren aber die extrazelluläre Matrix, die für die Charakteristika des Gelenkknorpels verantwortlich ist. Es besteht dabei ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Matrix. Mit zunehmendem Alter verändern die Chondrozyten ihre Morphologie und die Synthese der Matrix-Bestandteile. Es resultiert eine Matrix mit veränderter Zusammensetzung und vermindertem Umsatz (Buckwalter *et al.*, 1993). Die Interaktion der Chondrozyten mit der Matrix ist wesentlich für den Funktionserhalt des hyalinen Knorpels (Buckwalter

& Mankin, 1998). Folglich führt eine verminderte Zellfunktion zu einer Veränderung der Homöostase der extrazellulären Matrix und umgekehrt. Beide Zustände münden in eine verminderte Belastbarkeit des Knorpels (Buckwalter, 1983).

### **2.2.2 Der subchondrale Knochen**

An die kalzifizierte Zone des Gelenkknorpels schließt sich der subchondrale Knochen an, wobei diese Zone als Trennung zwischen Knorpel und Knochen fungiert, gleichzeitig aber auch die Funktion als osteochondrale Einheit bewahrt. Kollagenfibrillen ziehen vom nicht kalzifizierten durch die *Tidemark* in den kalzifizierten Knorpel (Madry *et al.*, 2010). Auf diese Weise wird der Knorpel am subchondralen Knochen verankert und die Kraftübertragung vom Knorpel auf den subchondralen Knochen gewährleistet (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Dabei setzt sich dieser aus der subchondralen Knochenplatte und der subartikulären Spongiosa zusammen (Madry *et al.*, 2010). Die Trennlinie zwischen Gelenkknorpel und korrespondierendem subchondralen Knochen ist die Zementlinie (*cement line*) (Duncan *et al.*, 1987).

## **2.3 Knorpeldefekte**

Defekte im Gelenkknorpel können anhand ihrer Ausdehnung in die Tiefe klassifiziert werden. Chondrale Defekte betreffen nur den Gelenkknorpel und sind die am häufigsten gesehenen Knorpeldefekte (Hjelle *et al.*, 2002). Sie werden weiter unterteilt in teilschichtige, *partial-thickness*, und vollschichtige, *full-thickness*, Defekte (Abbildung 1). Teilschichtige Defekte beschränken sich auf den nicht kalzifizierten Knorpel und sind ähnlich Fissuren und Rissen früharthrotischer Veränderungen (Redman *et al.*, 2005). Vollschichtige Defekte betreffen den gesamten Knorpel, einschließlich des kalzifizierten Knorpels. Zur Auffüllung chondraler Defekte kommt es nur unter bestimmten Bedingungen, die Stammzellen der Synovia ermöglichen, in das Defektareal zu migrieren und dort ein Reparaturgewebe ausbilden (Hunziker & Rosenberg, 1996). Osteochondrale Defekte reichen bis in den subchondralen Knochen. Das Defektareal tritt in Kontakt mit dem eröffneten Knochenmark, aus dem

pluripotente mesenchymale Stammzellen innerhalb eines sich formierenden Blutgerinnsels in den Defektbereich gelangen. Dort differenzieren die Stammzellen zu Chondrozyten und Osteoblasten und bilden chondrales Reparaturgewebe und neuen subchondralen Knochen aus (Furukawa *et al.*, 1980; Shapiro *et al.*, 1993).

Chondrales Reparaturgewebe besteht im Gegensatz zu normalem hyalinen Knorpel vermehrt aus Kollagen vom Typ I und gleicht in seiner Struktur und Zusammensetzung eher Faserknorpel als hyalinem Knorpel (Buckwalter & Mankin, 1998). Es zeichnet sich durch eine verminderte Belastbarkeit aus, was in geringerer Widerstandsfähigkeit des Ersatzgewebes und folglich in dessen Verschleiß resultiert (Buckwalter *et al.*, 2005; Franke *et al.*, 2007). Vielmehr beeinflusst die Defektauffüllung auch den umliegenden normalen Knorpel mit Abflachung und Ausdünnung (Jackson *et al.*, 2001). Bei der Ausbildung solcher Ersatzgewebe handelt es sich stets um Reparation und nicht Regeneration, da letzterer Terminus immer eine *restitutio ad integrum* beschreibt (Caplan & Goldberg, 1999; Orth & Madry, 2016).

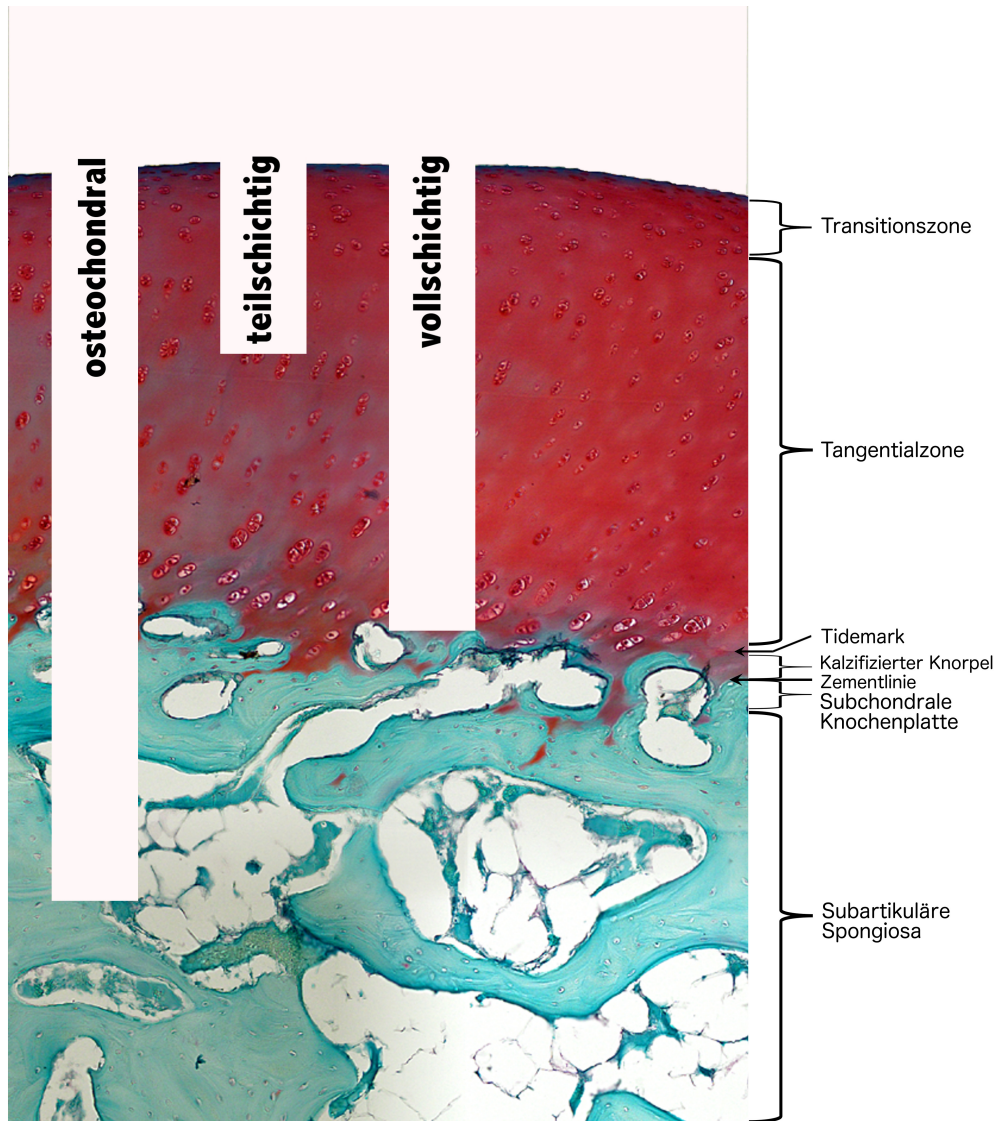


Abbildung 1: Aufbau der osteochondralen Einheit des ovinen Gelenkknorpels mit Darstellung teil- und vollschichtiger chondraler und osteochondraler Defekte (100fach vergrößert).

## 2.4 Etablierte operative Therapiemöglichkeiten

### 2.4.1 Markraumeröffnende Verfahren

Aufgrund des mangelnden Regenerationspotentials hyalinen Knorpels sind Therapieverfahren notwendig, die die Ausbildung eines Reparaturgewebes induzieren, das im besten Fall normalen Gelenkknorpel darstellt. Insbesondere die markraumeröffnenden Verfahren wie die Pridie-Bohrung (Pridie, 1959),

Mikrofrakturierung (Steadman *et al.*, 2001) und Abrasionsarthroplastik (Johnson, 1986) sind für die klinisch häufig kleinflächigen symptomatischen Defekte indiziert. Diese führen zur Ausbildung eines Blutgerinnsels und damit zur Migration von Stammzellen aus dem Knochenmark in den Knorpeldefekt. In der Umgebung reifen hyalinen Knorpels differenzieren die mesenchymalen Stammzellen aus dem Gerinnsel zu Chondrozyten (Ashton *et al.*, 1980; Shapiro *et al.*, 1993). Sie stellen somit ein einzeitiges und sehr kosteneffektives Verfahren dar (Cucchiarini *et al.*, 2014). Als nachteilig ist dabei die Bildung eines Ersatzgewebes zu betrachten, das als fibröser Knorpel minderwertig im Vergleich zu normalem Gelenkknorpel ist (Steadman *et al.*, 2001).

#### **2.4.2 Autologe Chondrozytentransplantation**

Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) ist eine weitere Möglichkeit zur Deckung fokaler Knorpeldefekte, eingeführt in den klinischen Gebrauch von Peterson und Brittberg (Brittberg *et al.*, 1994). Sie ist primär für die klinisch seltener auftretenden großflächigen symptomatischen Knorpeldefekte indiziert. Autologe Chondrozyten, entnommen aus Gelenkknorpel in weniger belasteten Bereichen des Kniegelenks, werden dazu *in vitro* isoliert, kultiviert und als Zellsuspension während einer zweiten Operation in den Knorpeldefekt implantiert. Die ACT muss somit zweizeitig durchgeführt werden. Erweitert wurde die ACT zu einem Matrix-basierten Verfahren, in dem die vorher entnommenen und *in vitro* bearbeiteten Chondrozyten in eine Matrix gebettet implantiert werden (MACT) (Batty *et al.*, 2011; Brittberg, 2010). Das Verfahren wendet durch die Verwendung eines soliden Chondrozyten-besiedelten Biomaterials wesentliche Prinzipien des *Tissue Engineering* an (Cucchiarini *et al.*, 2014). Durch die Implantation reifer Chondrozyten erlaubt sie auch für großflächige Defekte die Entstehung eines knorpeligen Reparaturgewebes (Knutsen *et al.*, 2016).

## 2.5 Experimentelle Therapieansätze

### 2.5.1 Gentransfer

Gentransfer bezeichnet das Einschleusen fremder DNS in verschiedene Arten von Zellen. Gene oder einzelne Gensequenzen, die in die Zielzelle eingeschleust werden sollen, werden als cDNS in Form von Plasmiden übertragen. Innerhalb der Zielzelle wird die cDNS entweder in das eigene Genom integriert oder sie verbleibt als Episom extrachromosomal. Für den Gentransfer sind Helfersysteme erforderlich, da es beim Transfer reiner Plasmid-DNS nur in 1-3% der Zielzellen zur Internierung des Gens kommt und folglich nur geringe Transgenexpressionsraten erreicht werden (Ravi Kumar *et al.*, 2004). Im Folgenden werden virale und nicht-virale Systeme unterschieden.

#### 2.5.1.1 Nichtvirale Gentransfermethoden

Bei der Transfektion finden nicht-virale chemische Transfersysteme wie kationische Lipide (Elsler *et al.*, 2012), Liposome (Orth *et al.*, 2008), Polymere (Hudde *et al.*, 1999), Polyethylenimine (Godbey *et al.*, 1999) sowie Nanopartikel (Ravi Kumar *et al.*, 2004) Verwendung. Der Vorteil nicht-viraler Transfersysteme beruht auf der Tatsache, dass sie keine reproduzierbare Immunantwort auslösen, nicht pathogen sind und große therapeutische Faktoren transfizieren (Madry *et al.*, 2011). Nachteilig ist die häufig geringere Effektivität gegenüber viralen Gentransfermechanismen (Johnstone *et al.*, 2013).

#### 2.5.1.2 Virale Genvektoren

Werden virale Vektoren als Überträger verwendet, spricht man von Transduktion. Dabei wird die Eigenschaft von Viren genutzt, die eigene DNS effektiv in fremde Zellen zu integrieren und natürlich vorhandene Eintrittsmechanismen in Zielzellen zu nutzen (Conlon & Flotte, 2004). Dadurch werden höhere Transgenexpressionsraten erzielt und eine direkte *in vivo* Applikation ist möglich. Besonders effizient sind Vektoren aus Retroviren. Das transduzierte Gen verbleibt im

Genom und kann so lange exprimiert werden. Nachteilig ist ein starkes onkogenes Potential. Weiterhin findet eine Integration nur in Zellen mit hoher Mitoserate statt (Madry *et al.*, 2011). Lentiviren, verwandt mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV), integrieren auch in Zellen mit niedrigen Mitoseraten, bergen aber ebenfalls die Gefahr möglicher Tumorentstehung sowie eventuelle Expression von HIV-Genomsequenzen (Frisch *et al.*, 2015a). Adenoviren und Herpesviren sind ebenfalls sehr effektiv und transduzieren lange Gensequenzen, jedoch weisen sie eine hohe Zytotoxizität und Immunogenität auf (Frisch *et al.*, 2015a). Im Gegensatz zu den o.g. Viren sind adeno-assoziierte-virale Vektoren nicht immunogen und nicht toxisch (Madry *et al.*, 2011). Rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV) sind replikationsdefekte Abkömmlinge humaner Parvoviren (Berns & Linden, 1995), die durch Bindung an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG), FGFR und  $\alpha V\beta 5$ -Integrin über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zielzellen aufgenommen werden (Conlon & Flotte, 2004) und dort als stabiles und geschütztes Episom extrachromosomal verbleiben (Cucchiaroni *et al.*, 2016). Das ermöglicht eine hoch effektive Transduktionsrate (bis zu 100%) über einen langen Zeitraum (Cucchiaroni, 2016; Rey-Rico & Cucchiaroni, 2016a), wobei rAAV sowohl in Zellen mit hoher mitotischer Aktivität als auch in solchen mit geringer Teilungsrate transduzieren (Flotte *et al.*, 1994). Das macht rAAV zu potenten, relativ sicheren und den bevorzugtesten Vektoren (Rey-Rico & Cucchiaroni, 2016b).

### 2.5.2 Therapeutische Faktoren

Verschiedene Therapeutische Faktoren zur Verbesserung der Knorpelreparatur bzw. -regeneration fokaler Defekte sind identifiziert worden, besonders Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren finden Anwendung als therapeutische Agenzien in der Therapie chondraler Defekte (Trippel, 1997). Die Notwendigkeit der Applikation via Gentransfer ist gegeben, da die Halbwertszeit der Faktoren eine direkte Verwendung ineffektiv macht.

SOX9 ist der wichtigste Transkriptionsfaktor der Chondrogenese und Knorpelbildung (Bi *et al.*, 1999). Es gehört zu den Proteinen der SOX-Gruppe, die ähnlich dem geschlechtsbestimmendem, y-chromosomalem SRY (*sex related Y chromosom*)-Gen bestimmte DNS-Bindestellen aufweisen, sogenannte SRY *related high-mobility-group*

*box* (HMG-*box*), und daher ihren Namen haben (Lefebvre *et al.*, 2001). In vielen Zelllinien spielen SOX-Proteine eine zentrale Rolle im Spezialisierungsprozess von Zellen. Für die Spezialisierung von Stammzellen zu Chondrozyten konnte SOX9, zusammen mit TGF- $\beta$ , als essentieller Faktor nachgewiesen werden (Frisch & Cucchiarini, 2016). Er stimuliert die Chondrogenese und die Expression von Aggrekan, dem wesentlichen Proteoglykan der extrazellulären Matrix (Tew *et al.*, 2008). TGF- $\beta$  induziert als Wachstumsfaktor die Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu Chondrozyten (Frisch *et al.*, 2016a). Ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor ist IGF-I, der als anaboler Faktor sowohl die Synthese von Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen als auch die Zellproliferation steigert (Cucchiarini & Madry, 2014; Menendez *et al.*, 2011). FGF-2 fungiert als Induktor der Chondrogenese (Cucchiarini *et al.*, 2005; Frenz *et al.*, 1994), was zu gesteigerter Synthese von Matrixproteinen führt (Frisch *et al.*, 2016b), und die Freisetzung von SOX9 fördert (Murakami *et al.*, 2000).

### 2.5.3 Knochenmarkspirat

Knochenmark enthält pluripotente, mesenchymale Stammzellen (Caplan, 1991). Die Bezeichnung „mesenchymale Stammzelle“ (MSZ) entstand aufgrund der Tatsache, dass sie sich zu allen Zellarten differenzieren können, die dem embryonalen Mesenchym entspringen. Mesenchymale Stammzellen differenzieren abhängig vom umliegenden Gewebe (Barry & Murphy, 2004). In Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Zell-Matrix-Interaktion, Zell-Zell-Interaktion und mechanischer Einwirkung werden die pluripotenten Stammzellen aktiviert und differenzieren zu Chondrozyten (Goldring *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2010; Prockop, 2009; Steinert *et al.*, 2007). Auch humanes Knochenmarkspirat (*bone marrow aspirate*, BMA) enthält MSZ, denen in Studien chondrogenes Potential nachgewiesen wurde (Frisch *et al.*, 2015b). In der Therapie von chondralen Defekten kann zusätzlich Knochenmarkspirat appliziert werden (Fortier *et al.*, 2010). Da Knochenmarkspirat leicht aus Femur oder Tibia zu isolieren ist und oben beschriebenes chondrogenes Potential aufweist, eignet es sich gut als Zellspender (Madry *et al.*, 2017; Orth *et al.*, 2014b).



#### 2.5.4 Gentherapie

Ist das Ziel des Gentransfers die Heilung bestimmter Krankheiten, handelt es sich um Gentherapie. Im Rahmen der Knorpeltherapie ist es das Ziel der Gentherapie, die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten zu verbessern und so die Neubildung von hyalinem Knorpel zu erreichen. Die ersten Erfolge in der Gentherapie für arthritisch verändertes Knorpelgewebe erzielten Evans *et al.* durch die Transduktion von IGF-I in Synoviozyten (Evans *et al.*, 1996). Über eine Arthrotomie können die Vektoren direkt in den Defekt gegeben werden, wo sie im besten Falle ihre Wirkung erzielen sollen. Dabei gibt es die Möglichkeit, die Vektoren am Zielort *in vivo* mit Progenitorzellen zusammenzubringen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Applikation *ex vivo* modifizierter Zellen in den Defekt. Als Vektoren haben sich solche auf rAAV-Basis als Mittel der Wahl herauskristallisiert (Madry *et al.*, 2003a). In präklinischen Studien zeigte sich eine verbesserte Defektreparatur sowohl mithilfe *ex vivo* modifizierter Zellen (Ivkovic *et al.*, 2010) als auch *in vitro* unter Verwendung der *in vivo*-Methode (Venkatesan *et al.*, 2012).

#### 2.5.5 Trägermaterialien

Biomaterialien können als Trägersubstanzen verschiedenen Zellen oder Genvektoren als Transfermedium dienen. Hinsichtlich der Therapie chondraler Defekte sollte ein ideales Trägermedium den normalen Gelenkknorpel hinsichtlich Struktur, Funktion und Biologie imitieren, wodurch die Anlagerung, Proliferation und Differenzierung neuer Zellen gefördert wird und somit neues Gewebe gebildet werden kann (Kon *et al.*, 2014). Weiterhin sollten Trägermedien sich in den umliegenden normalen Knorpel integrieren, den Defekt adäquat auffüllen, biokompatibel und auch biodegradibel sein, sodass sie sich mit der Ausbildung neuen Gewebes langsam und kontrolliert abbauen (Balakrishnan & Banerjee, 2011). Eine poröse Struktur ermöglicht einerseits die Anlagerung und Proliferation von Zellen (Shi *et al.*, 2012), andererseits garantiert sie einen Sauerstoff- und Nährstofftransport (Rey-Rico *et al.*, 2016a), der neben den o.g. Eigenschaften für die Ausbildung und Erhaltung neuen Gewebes wichtig ist (van Osch *et al.*, 2009). Im Folgenden werden solide Materialien von Hydrogelen unterschieden.

### 2.5.5.1 Solide Trägermaterialien

Moutos und Guilak entwickelten ein gewebtes Trägermedium aus Polyglycolsäurefäden (PGA). Die Fasern wurden in alle drei Raumebenen mit jeweils unterschiedlichen Mengenverhältnissen verarbeitet (Moutos *et al.*, 2007). Das entstandene Maschenwerk zeigte Eigenschaften ähnlich hyalinem Knorpel: Anisotropie und Nicht-Linearität hinsichtlich Dehnbarkeit, Komprimierbarkeit und Viskoelastizität (Soltz & Ateshian, 2000).

Poly- $\epsilon$ -Caprolacton (PCL) ist ein aliphatischer Polyester mit nachgewiesenem, Chondrogenese-induzierendem Potential (Li *et al.*, 2003). Dreidimensionale Trägermedien gewebt aus PCL-Fäden wiesen in Studien ebenfalls Eigenschaften ähnlich hyalinem Knorpel auf und stimulierten die Chondrogenese und Matrixsynthese (Moutos *et al.*, 2010). Die Ähnlichkeit zu hyalinem Knorpel zeigte sich größer in PCL- als in PGA-Materialien (Moutos & Guilak, 2008). Verschiedene weitere Trägersysteme wurden bisher in klinischen Studien getestet, konnten jedoch nicht die mechanischen Eigenschaften normalen Gelenkknorpels erreichen (Safran *et al.*, 2008).

### 2.5.5.2 Hydrogele

Hydrogele setzen sich zusammen aus einem 3D-Netzwerk hydrophiler Polymere, die entweder physikalisch über hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder Kristallbildung bzw. chemisch durch kovalente Bindungen aneinander gebunden sind (Zhu & Marchant, 2011). Aufgrund ihrer Struktur können Hydrogele Wasser aufnehmen und anschwellen, ohne sich selbst in Wasser aufzulösen (Ahmed, 2015). Sie sind somit hyalinem Knorpel sehr ähnlich. Da sie Genvektoren leicht einkapseln können und diese vor Abbau schützen, eignen sie sich gut als Trägermaterial (Rey-Rico *et al.*, 2016a). Anhand der zugrunde liegenden Polymere werden Hydrogele eingeteilt in natürliche, synthetische und kombiniert natürlich-synthetische (Zhu & Marchant, 2011). In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien konnten effektiv erhöhte Transgenexpressionsraten durch die Verwendung von Fibrinkleber (fibrin glue), RAD16-I (Rey-Rico *et al.*, 2015a), Polyethylenglycol (PEG) (Zeng *et al.*, 2012), Alginaten (Madry *et al.*, 2003b) nachgewiesen werden.

Thermosensitive Hydrogele gehen temperaturabhängig in die Gelform über: bei 37°C liegen sie als Gel vor, bei 4°C dagegen sind sie flüssig, weshalb sie als Injektion gut zu

applizieren sind (Rey-Rico *et al.*, 2011; Wang & Pham, 2008). Dazu zählen Kopolymere basierend auf Polyethylenoxid (PEO) und Polypropylenoxid (PPO), sogenannte Poloxamere bzw. Pluronic®. Bei Pluronic®F-127 (PF127) handelt sich um einen amphiphilen Kopolymer aus Ethylenoxid und Polypropylenoxid, der nicht toxisch ist, eine hohe Biokompatibilität aufweist und daher vielfach als Trägermedium anwendbar ist (Escobar-Chávez *et al.*, 2006).

### **2.5.6 Tissue Engineering**

*Tissue Engineering* bedeutet Gewebekonstruktion. Es handelt sich dabei um die künstliche Anzüchtung neuen Gewebes, mit dem krankhaft veränderte Gewebe bzw. Gewebedefekte aufgefüllt werden können. Folgende Kriterien sind in der Gewebezüchtung zu beachten und gelten als Paradigma für das *Tissue Engineering*: Zellen, die sich an der Gewebekonstruktion anlagern und dort neues Gewebe synthetisieren; biomimetische Trägermaterialien, die die Einwanderung von Zellen erlauben und die Ausbildung der Neomatrix unterstützen und therapeutische Faktoren, die die Differenzierung der Progenitorzellen in die gewünschte Richtung leiten (Brunger *et al.*, 2014). Mithilfe von Trägermedien konnten in der Therapie fokaler chondraler Defekte durch *Tissue Engineering* gute Ergebnisse erzielt werden. Moutos *et al.* verwendeten ein PCL-Medium beladen mit Progenitorzellen und erreichten damit eine adäquate Defektauffüllung *in vitro* (Moutos & Guilak, 2010).

## **2.6 Konzept der vorliegenden Arbeit**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Therapie fokaler vollschichtiger Knorpeldefekte *in vivo* wurde der Ansatz des *Tissue Engineering* mit dem der Gentherapie gekoppelt. In vielen Studien konnte bereits eine verbesserte Defektreparatur mithilfe genetisch modifizierter Zellen (Cucchiaroni *et al.*, 2011; Pagnotto *et al.*, 2007; Venkatesan *et al.*, 2012) oder durch Implantation von Trägermaterialien (De Franceschi *et al.*, 2005; Madry *et al.*, 2003b; Moutos *et al.*, 2007; Rey-Rico *et al.*, 2011; Wang & Pham, 2008) nachgewiesen werden. Da die Genvektoren

nach Applikation am Ort des Geschehens verbleiben sollen, sind Methoden erforderlich, die eine Emigration der Vektoren aus der Defektzone verhindern. Trägermedien eignen sich zur kontrollierten und lange andauernden Freisetzung der Genvektoren. Weiterhin werden Vektoren innerhalb eines Trägermediums vor Abbau und einer Immunabwehr durch den Empfängerorganismus geschützt. Dadurch lässt sich auch die benötigte Menge für eine effektive Transgenexpression reduzieren (Cucchiaroni, 2016). Zudem füllen sie fokale Knorpeldefekte auf und fungieren als Platzhalter und mechanische Stütze bis zur vollständigen Ausbildung des neuen Gewebes. Eine Kombination aus *Tissue Engineering* und Gentherapie ist vielversprechend im Vergleich zu Gentransfer oder Zelltransplantation alleine (Cucchiaroni, 2016; Frisch *et al.*, 2015a; Glass *et al.*, 2014; Madry *et al.*, 2012).

Da Chondrozyten nicht in die Defektzone migrieren, ist sowohl die Gentherapie als auch das *Tissue Engineering* auf zusätzliche Progenitorzellen angewiesen. Als Quelle für Stammzellen verwendeten wir autologes Knochenmarkaspirat. Der Transkriptionsfaktor SOX9 wurde als essentielles Signalmolekül der Chondrogenese und Produktion der extrazellulären Matrix identifiziert. Wir wählten ihn daher als therapeutischen Faktor aus, um die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmarkaspirat *in vivo* zu stimulieren. Weil Genvektoren basierend auf rAAV bereits erfolgreich *in vitro* und *in vivo* angewandt wurden, verwendeten wir rAAV-Vektoren, um SOX9 zu transfizieren. Vollschichtige Knorpeldefekte wurden in der Facies patellaris der Femurtrochlea von Göttinger Minipigs erzeugt, mikrofrakturiert und mit rAAV-SOX9 beimpft. Um den Effekt von zusätzlichen Progenitorzellen zu ermitteln, fügten wir in einem weiteren Versuch BMA der Versuchstiere hinzu. In einem nächsten Ansatz wurden die Vektoren mithilfe eines Trägermaterials aus dreidimensionalem PCL-Maschenwerk in vollschichtige Knorpeldefekte überführt und ebenfalls mit Knochenmarkaspirat in Kontakt gebracht. In einem vierten Ansatz verwendeten wir das Hydrogel PF127 als Trägermedium für die Genvektoren. Die Gewebereparatur wurde anschließend sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht. Die Defektauffüllung durch rAAV-SOX9 wurde immer mit den jeweiligen Kontrolltherapien basierend auf dem Transfer eines irrelevanten Marker-Gens (rAAV-*lacZ*) verglichen. Als Grundlage der Untersuchungen diente die Hypothese, dass SOX9 eine effektive Knorpelreparatur vermittelt. Wir vermuteten, dass sie sich durch die zusätzliche Addition von Knochenmarkaspirat sowie durch die Verwendung von neu entwickelten Trägermaterialien noch steigern lässt.

### 3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit überprüfen wir die Hypothesen:

- (1) Die alleinige Überexpression von rAAV-SOX9 führt zu einer besseren frühen Knorpelreparatur im Vergleich zur rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe.
- (2) Die Überexpression von rAAV-SOX9 in autologem Knochenmarkaspirat verbessert die frühe Knorpelreparatur im Vergleich zur rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe.
- (3) Die Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem soliden Biomaterial führt zu verbesserter früher Knorpelreparatur im Vergleich zur rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe.
- (4) Die Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem thermosensitiven Hydrogel verbessert die frühe Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe.
- (5) Die Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem thermosensitiven Hydrogel ist allen anderen hier untersuchten Ansätzen hinsichtlich der Verbesserung der frühen Knorpelreparatur überlegen.

## 4 Material

### 4.1 Chemikalien

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien verwendet.

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien**

<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>
1,9-Dimethylmethylenblau	Serva (Darmstadt, Deutschland)
Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz	Vector Laboratories (Burlingame, Kanada)
Ameisensäure	Apotheke, Universitätsklinikum des Saarlandes
Atropin	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Braunol	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Chloroquin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)-Reagenz	Vector Laboratories (Burlingame, Kanada)
DMEM Kitt	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Echtgrün ( <i>fast green FCF</i> )	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (99,7%)	Apotheke, Universitätsklinikum des Saarlandes
Ethanol (100%)	Apotheke, Universitätsklinikum des Saarlandes
Fetales Kälberserum	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Formalin-Stammlösung (37%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Hämatoxylin nach Harris	Roth (Darmstadt, Deutschland)
Hämatoxylin nach Weigert	Roth (Darmstadt, Deutschland)
Isofloran	Baxter (Unterschleißheim, Deutschland)
Isopropanolol	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ketavet (Ketamin-Hydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn (Erlangen, Deutschland)
OptiMEM Kitt	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Paraffin-Granulat	Leica (Nussloch, Deutschland)
Penicillin (100 U/ml)-Streptomycin (100 µg/ml)-	Fisher (Schwerte, Deutschland)

<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>
Lösung	
Propofol	AstraZeneca (Wedel, Deutschland)
Rinderalbumin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Rompun (Xylazin-Hydrochlorid)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Standard-DNS-Lösung (10 µg/ml; Kalbsthymus)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin	GE Healthcare (Pasching, Österreich)
Wasserstoffperoxid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Xylazin	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Xylen	Apotheke, Universitätsklinikum des Saarlandes

## 4.2 Lösungen, Puffer und Medien

Die hier aufgeführten Lösungen bzw. Puffer und Medien wurden mit Aqua bidest., hergestellt von der Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlands, angesetzt.

**Tabelle 2: Verwendete Lösungen, Puffer und Medien**

<i>Lösung, Puffer, Medium</i>	<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Konzentration, Menge, Volumen</i>
0,1x TE-Lösung	Tris/HCl (pH 8,0)	1 mM
	EDTA	1,86 mg (0,1 mM)
0,2 M Chloroquin	Chloroquin	1,03g
	H <sub>2</sub> O	10 ml
102 mM CaCl <sub>2</sub> -Lösung	CaCl <sub>2</sub> • H <sub>2</sub> O	14,99 g (2 M)
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
1x TNE-Puffer	NaCl	5,8 g (100 mM)
	Na <sub>2</sub> EDTA • 2H <sub>2</sub> O	372 mg (1 mM)
	Tris/HCl (pH 7,4)	1322 mg (10 mM)
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
2,5 M CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub> • H <sub>2</sub> O	3,675 g (2 M)
	H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
2x HBS (pH 7,05)	NaCl	1,62 g (280 mM)
	KCl	75 mg (10 mM)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub> • 7H <sub>2</sub> O	40 mg (1,5 mM)

<i>Lösung, Puffer, Medium</i>	<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Konzentration, Menge, Volumen</i>
	Dextrose	216 mg (12 mM)
	HEPES	1,2 g (50 mM)
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
<i>Blocking buffer</i>	Rinderalbumin	6 ml
	PBS	200 ml
Calciumphosphat (Co-Präzipitations-Methode)	0,1x TE-Lösung	1 ml
Echtgrün-( <i>fast green</i> -) Lösung (0,02%)	fast green	200 mg
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Entkalkungslösung	Natrium-Citrat	100 g
	Ameisensäure (90%)	250 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 750 ml
Eosin-Lösung	Eosin G	10 g
	H <sub>2</sub> O	ad 2000 ml
Essigsäure 1%	Essigsäure	1 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
Formalin-Lösung (pH 7,4)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,07 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,86 g
	Formalin-Stammlösung	140 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
HCl-Lösung (1%)	HCl (37%)	5,4 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 200 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,3%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	600 µl
	H <sub>2</sub> O	200 ml
NaCl-Lösung (150 mM)	NaCl	435 mg
	H <sub>2</sub> O	ad 50 ml
Natrium-Citrat-Lösung	Tri-Natrium-Citrat	1618 mg
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
PBS	Kaliumchlorid (pH 7,2)	2,7 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	1,7 mM
	Natriumchlorid	136 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	10 mM
Pufferlösung	Ethanol 70%	1000 ml
	Essigsäure 100%	2,5 ml
Safranin-Orange-Lösung	Safranin-Orange	1 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Trypsin-Lösung (0,1%)	Trypsin-Stammlösung (25%)	200 µl
	H <sub>2</sub> O	ad 200 ml



<i>Lösung, Puffer, Medium</i>	<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Konzentration, Menge, Volumen</i>
Wachstumsmedium für Zellkultur	D-MEM	89% (V/V)
	Fetales Kälberserum	10% (V/V)
	Penicillin (100 U/ml)- Streptomycin (100 µg/ml)- Lösung	1% (V/V)

### 4.3 Geräte

Neben den üblichen Verbrauchsmaterialien wurden die unten aufgelisteten Geräte verwendet. Die Verbrauchsmaterialien bezogen wir von den Firmen Falcon (Pont de Claix, Frankreich), Fisher (Schwerte), neoLab (Heidelberg) und VWR (Darmstadt, je aus Deutschland).

**Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien**

<i>Geräte und Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Deckgläser	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Digitaler Fotoapparat Canon Powershot A480	Canon (Neuhausen, Deutschland)
Einbettmaschine EG1140H	Leica (Nussloch, Deutschland)
Gefrierschrank -20°C	Bosch (Deutschland)
Inkubator 37°C	Bosch (Deutschland)
Kühlplatte EG1140C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Liquidblocker Fettstift	Sigma (Taufkirch, Germany)
Magnetrührer RH basic 2	IKA (Staufen, Deutschland)
Mikroskop BX45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop CX31	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikrotom RM2135 (inkl. Klingen)	Leica (Nussloch, Deutschland)
Mischplatte	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
SuperFrost Objektträger	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Tischzentrifuge	Krackeler Scientific (Albany, NY, USA)
Wärmeplatte HI1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 62°C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wasserbad HI1210	Leica (Nussloch, Deutschland)

#### 4.4 Software

Zur Erhebung, Analyse, Interpretation und Darstellung der vorliegenden Daten wurden die im Folgenden aufgelisteten Programme verwendet.

**Tabelle 4: Verwendete Computerprogramme**

<i>Programm</i>	<i>Hersteller</i>
Cellsense	Olympus (Hamburg, Deutschland)
CTAn (CT-Analyzer)	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
NRecon	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
Data viewer	Bruker Skyscan (Kontich, Belgien)
Excel	Microsoft Corp. Redmount
GIMP 2.8.18	GNU Image Manipulation Program
IBM SPSS Statistics	IBM (Armonk, NY, USA)

#### 4.5 Antikörper

Folgende monoklonale Antikörper wurden verwendet.

**Tabelle 5: Herkunft verwendeter Antikörper**

<i>Bezeichnung</i>	<i>Art</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)
Anti-Maus-IgG	Ziege	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

#### 4.6 Genvektor und Zellen

Zur Herstellung der Genvektoren gebrauchten wir 293-Nierenzellen (The Gene Therapy Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA), die zunächst mit dem Helfervirus (Adenovirus 5) transfiziert wurden. Anschließend erfolgte die Transfektion mit dem Virus-Template (AAV-2) aus dem pSSV9-Stamm, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. J. Samulski (The Gene Therapy Center,

University of North Carolina, Chapel Hill, USA), 1 ml cDNS des humanen Transkriptionsfaktors SOX9 (Institut für Humangenetik, Albert-Ludwig Universität, Freiburg, Deutschland) bzw. des Markergens *lacZ*, und dem Hilfsplasmid Ad8. Durch die Ko-Infektion mit dem Helfervirus wird die Replikation des Hilfsplasmids und des AAV-2-Templates eingeleitet. Das Hilfsplasmid liefert kodierende Sequenzen, die später die Integration des rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektors (rAAV-SOX9) in das Genom der Wirtszellen ermöglichen. Die Viruspartikel wurden anschließend isoliert und steril verpackt. Knochenmarkaspirat (5 ml) wurde intraoperativ aus der proximalen Tibia aspiriert, zentrifugiert und in Verbindung mit den sterilen Vektoren als Lösung appliziert.

#### **4.7 Trägermaterialien**

Als Trägermaterialien für rAAV-Vektoren verwendeten wir das Hydrogel PF127, Pluronic®F-127 (Merck Life Science, Darmstadt, Deutschland), in 20% v/v und fügten 15 µl Vektorlösung hinzu sowie das von Moutos *et al.* (2010) aus PCL(Poly-ε-Caprolacton)-Faden entwickelte dreidimensional gewebte solide Trägermaterial.

#### **4.8 Tierstämme**

Weibliche, adulte Göttinger Minipigs dienten als Versuchstiere (Ellegaard, Dalmose, Dänemark).

#### **4.9 Operationsmaterial**

Zur Herstellung der chondralen Defekte wurde eine runde Biopsiestanze (Durchmesser 4 mm) verwendet. Die Mikrofrakturierungen erzeugten wir mit einer eigens angefertigten Ahle mit einem Durchmesser von 1,2 mm und einer Tiefe von 5 mm. Spritzen, Nadeln und Nahtmaterial bezogen wir von der Firma Braun

(Melsungen, Deutschland). Weiteres Operationsinstrumentarium stammt von den Firmen Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen, Deutschland), Megro (Wesel, Deutschland) und A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz).

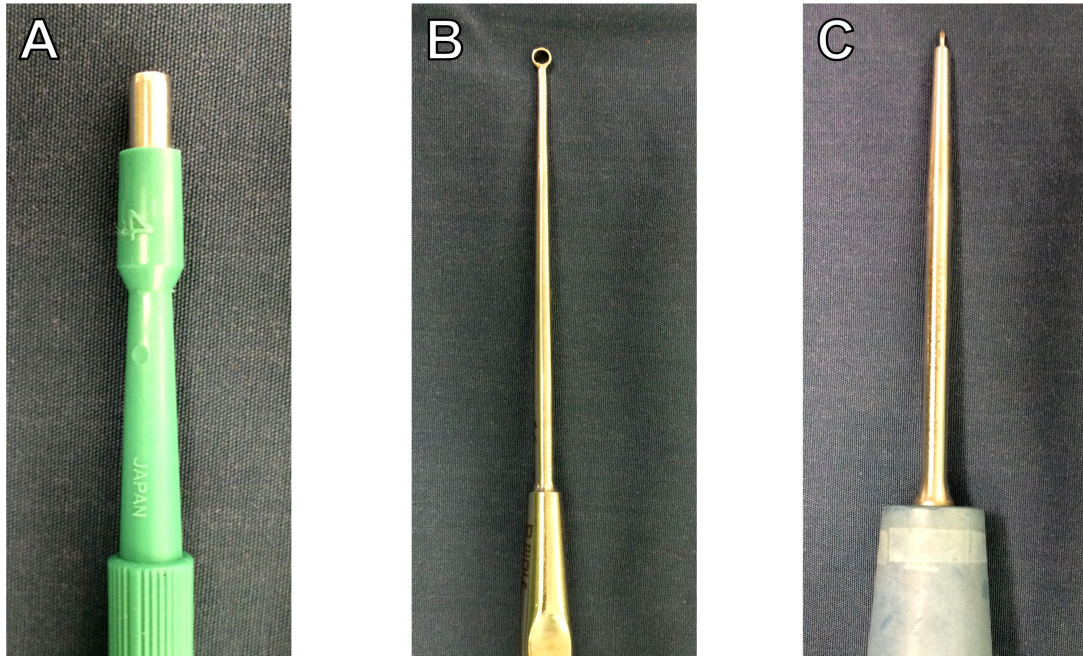


Abbildung 2: Operationsinstrumente. A = Biopsiestanze; B = Kürette; C = Mikrofrakturierungssahle.

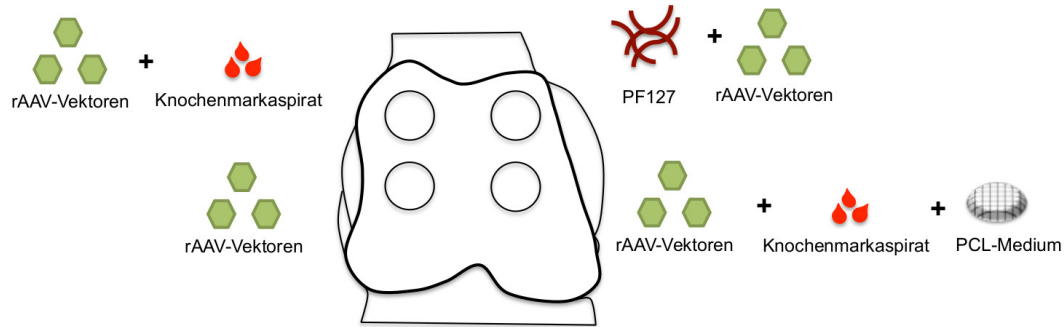
## 5 Methoden

### 5.1 Versuchsaufbau

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwölf Göttinger Minipigs bzw. deren Kniegelenke untersucht. Ein Kniegelenk diente als Therapiegruppe, das der Gegenseite als Kontrolle, jeweils rechts und links alternierend. In die Trochlea femoris wurden standardisiert vollschichtige chondrale Defekte gesetzt. Anschließend wurden die Defekte mit dem beladenen rAAV-Vektor beimpft und entsprechend der Gruppeneinteilung entweder Knochenmarkaspirat, ein Poly- $\epsilon$ -Caprolacton(PCL)-Trägermedium oder PF127 hinzugefügt.

#### 5.1.1 Gruppeneinteilung

Für die vorliegende Arbeit wurden die Defekte oben genannten Gruppen zugeteilt. Dabei erhielt jeder Defekt 15  $\mu$ l des Genvektors rAAV (Gruppe 1). Die Vektoren wurden entweder mit *lacZ* beladen oder mit dem Transkriptionsfaktor SOX9. *LacZ*-beladene Vektoren teilten wir den Kontrollgruppen zu, solche mit SOX9 den Therapiegruppen. Dabei wurde jeweils rechtes und linkes Knie eines Tieres alterniert. Für die zweite Gruppe addierten wir Knochenmarkaspirat hinzu (Gruppe 2). Die nächste Gruppe behandelten wir zusätzlich zu dem Vektor und dem Aspirat mit einem PCL-Trägermedium (Gruppe 3). Eine letzte Defektgruppe wurde mit 60  $\mu$ l der PF127-Vektor-Lösung beimpft (Gruppe 4). Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie vier verschiedene Gruppen untersucht.



**Abbildung 3: Gruppeneinteilung.** Gruppe 1 rAAV-Vektoren; Gruppe 2 rAAV-Vektoren + Knochenmarkaspirat; Gruppe 3 rAAV-Vektoren + Knochenmarkaspirat + PCL-Medium; Gruppe 4 rAAV-Vektoren + PF127.

### 5.1.2 Versuchstiere

Für die Studie wurden zwölf adulte weibliche Göttinger Minipigs mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von  $38,9 \pm 5,3$  kg verwendet. Die Versuchstiere wurden gemäß des Tierschutzgesetzes im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes regelrecht gehalten. Ihnen stand Wasser *ad libitum* sowie eine standardisierte Fütterung zur Verfügung. Regelmäßige Kontrollen durch den Operateur und einen Tierarzt wurden durchgeführt.

## 5.2 Operation

Die Tiere wurden an beiden Knien unter sterilen Bedingungen unter Allgemeinanästhesie im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes von Prof. Dr. Henning Madry unter Assistenz von Kathrin Müller-Brandt operiert. Nach zwölfstündigem Fasten wurden die Tiere durch eine intramuskuläre Injektion von 30 mg Ketavet, 2 mg Xylazin und 1 mg Atropin sediert und mit intravenöser Applikation von 20 ml 2%igem Propofol narkotisiert. Über eine endotracheale Intubation wurde die Atemwegssicherung gewährleistet. Die Allgemeinanästhesie wurde durch das Inhalationsnarkotikum Isofluran (1,5%) und intravenöser Propofolgabe (6-20 mg/kg KG/h) aufrechterhalten. Nach Rasur, sterilem Abwaschen und Abdecken erfolgte in Rückenlagerung ein medialer Zugang zum Kniegelenk mit Lateralisierung der Patella um die Trochlea femoris darzustellen.

Mithilfe einer Biopsie-Stanze wurden manuell kreisrunde chondrale Defekte in die Trochlea femoris eingebracht. Pro Trochlea wurden vier Defekte mit jeweils einem Durchmesser von 4 mm gesetzt. Innerhalb der Defektzonen wurden zusätzlich drei Mikrofrakturierungen mit einer speziell gefertigten Ahle (1,2 mm Durchmesser und 5,0 mm Tiefe) durchgeführt. Anschließend wurden diese Defekte entsprechend der Gruppenzuordnung behandelt. Ein Knie erhielt in jedem Defekt rAAV-SOX9, das gegenseitige rAAV-lacZ, jeweils rechts und links alternierend. Darauf folgte der schichtweise Wundverschluss mit Hautverschluss in Einzelknopftechnik. Postoperativ wurden die Tiere regelmäßig auf Verhalten, Wundstatus, Gewicht und Bewegungsverhalten für insgesamt 30 Tage überprüft. Dabei war den Tieren die direkte Vollbelastung gestattet. Wir führten keine postoperative Immobilisierung durch. Es zeigten sich keine Auffälligkeiten.

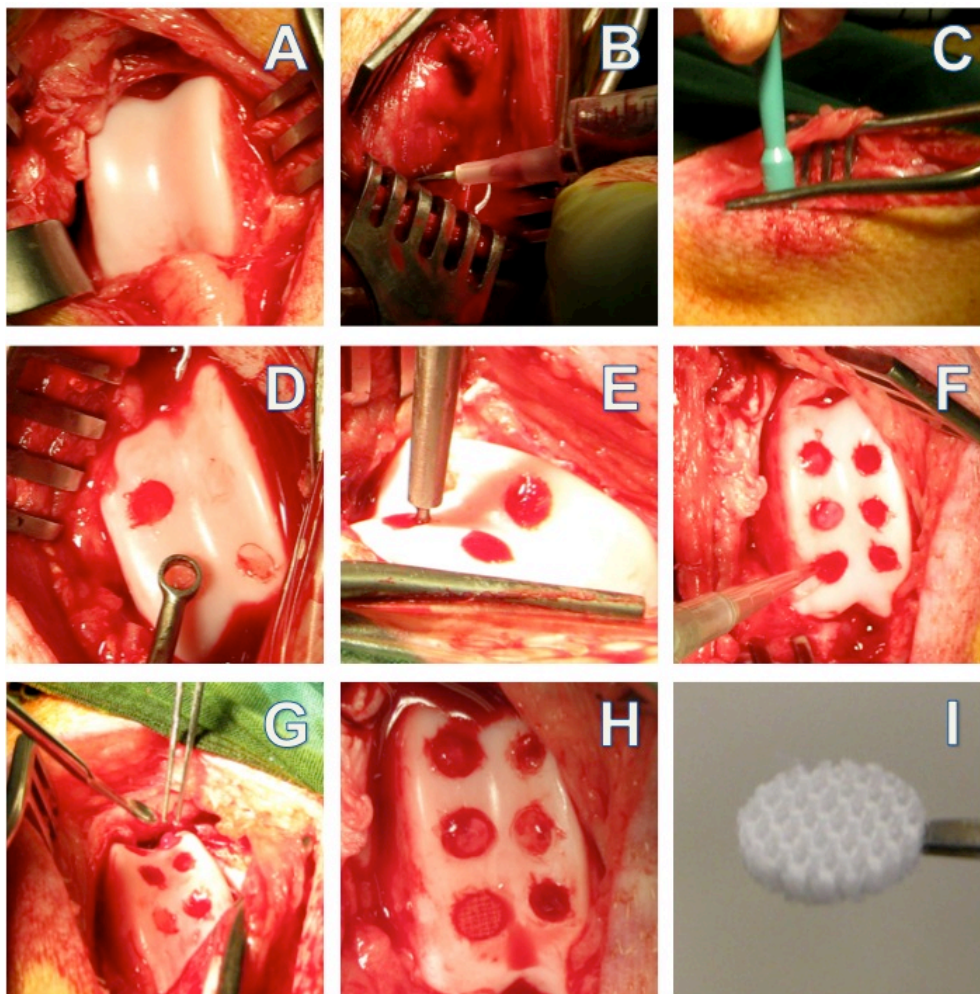


Abbildung 4: Operation. A Eröffnung des Kniegelenks mit Darstellung der Trochlea femoris; B Knochenmarkaspiration; C Markierung der Defekte mittels Stanze; D Fertigung der chondralen Defekte; E Mikrofrakturierung innerhalb der Defekte mithilfe einer Ahle; F Vektorapplikation; G Applikation von PF127; H fertige Defekte; I PCL-Trägermedium.

### 5.3 Sektion

Am 30. postoperativen Tag wurden die Schweine mit Xylazin und Ketamin wie oben beschrieben sediert und anschließend durch intravenöse Injektion von Phenobarbital (Narcofen; 150 mg/kg KG) und nachfolgend Luft (10 ml) getötet. Die Kniegelenke wurden exartikuliert um die Trochleae entnehmen zu können. Dabei zeigten sich keine Hinweise auf Defizite im Heilungsprozess. Die Proben wurden direkt nach Entnahme unter standardisierten Lichtbedingungen fotografiert und in PBS zur weiteren Analyse gelagert.

### 5.4 Makroskopische Analyse

Die Defektreparatur wurde mithilfe des neu entwickelten semiquantitativen Homburger Bewertungssystems (Goebel *et al.*, 2012) und des Oswestry-Bewertungssystems (van den Borne *et al.*, 2007) hinsichtlich Defektauffüllung, Integration in den umliegenden Knorpel, Vaskularisierung und Oberflächenstruktur beurteilt.



**Tabelle 6: Oswestry-Bewertungssystem (Oswestry Arthroscopy Score)**

<i>Kategorie</i>	<i>Punkte</i>
<b>1. Höhe des Defektgewebes im Vergleich zu umliegenden Knorpel</b>	
Gleiche Höhe	2
Erhöht	1
Tiefer	0
<b>2. Integration in den umliegenden Knorpel</b>	
Komplett	2
Kleine Unterbrechungen (<25% des Gewebes)	1
Große Unterbrechungen (>25% des Gewebes)	0
<b>3. Oberflächenbeschaffenheit</b>	
Glatt	2
Feine Risse	1
Große Risse/Fibrillationen	0
<b>4. Farbe des Defektgewebes</b>	
Hyalin-ähnlich	2
weiß	1
gelblich/knöchern	0
<b>Gesamt</b>	<b>0-10</b>

**Semiquantitatives Bewertungssystem zur makroskopischen Beurteilung des Reparaturgewebes. Die maximal erreichbare Punktzahl von 10 Punkten repräsentiert ein optimales, wünschenswertes Ergebnis.**

Tabelle 7: Makroskopisches Bewertungssystem nach Goebel *et al.*

<i>Kategorie</i>	<i>Punkte</i>
<b>1. Farbe des Reparaturgewebes</b>	
Hyalin ähnlich oder weiß	0
Überwiegend weiß (>50%)	1
Überwiegend durchscheinend (>50%)	2
Durchscheinend	3
Kein Reparaturgewebe	4
<b>2. Vorhandensein von Blutgefäßen im Reparaturgewebe</b>	
Keine	0
< 25% des Reparaturgewebes	1
25-50% des Reparaturgewebes	2
50-75% des Reparaturgewebes	3
> 75% des Reparaturgewebes	4
<b>3. Oberflächenstruktur des Reparaturgewebes</b>	
Glatt, homogen	0
Glatt, heterogen	1
Aufrauhungen, Fibrillationen	2
Inkomplettes Reparaturgewebe	3
Kein Reparaturgewebe	4
<b>4. Füllung des ursprünglichen Defekts</b>	
Gleiche Höhe wie der angrenzende Knorpel	0
>50% des ursprünglichen Defekts gefüllt oder Hypertrophie	1
<50% des ursprünglichen Defekts gefüllt	2
0% des ursprünglichen Defekts gefüllt	3
Freiliegender subchondraler Knochen	4
<b>5. Integrität des umliegenden Knorpels</b>	
Normal	0
Spalten oder Auffaserungen in der Integrationszone	1
Diffuse arthrotische Veränderungen	2
Ausbreitung des Defekts in den umliegenden Knorpel	3
Schaden des subchondralen Knochens	4
<b>Gesamt</b>	<b>0-20</b>

Semiquantitatives Bewertungssystem zur makroskopischen Beschreibung des Reparaturgewebes. Maximal sind 20 Punkte erreichbar. Eine niedrige Punktzahl beschreibt ein gutes Ergebnis.

## 5.5 Mikrofokus Computertomographie ( $\mu$ -CT)

Wir führten eine Dünnschichtcomputertomographie (Skyscan 1172, Skyscan, Bruker, Belgien) der Proben in PBS durch. Zur Fertigung der Bilder mit einer maximalen Auflösung von 13  $\mu$ m verwendeten wir folgende Geräteeinstellungen: eine Spannung

von 70 kV und eine Stromstärke von 140 mA sowie einen Filter aus Kupfer und Aluminium. Die Bilder wurden anschließend mithilfe eines modifizierten Feldkamp Strahlenkegel Algorithmus (Feldkamp *et al.*, 1989) rekonstruiert (NRecon, Skyscan) und in die Frontalebene rotiert (CTVol, Skyscan). Die Auswertung der generierten CT-Bilder erfolgte innerhalb bestimmter *Regions of interests* (ROI) mithilfe der Software CT-Analyzer (CTAn, Skyscan). Wir definierten die ROIs wie folgt: „Subchondrale Knochenplatte – Defekt (SBP-*defect*)“ und „Subchondrale Knochenplatte – angrenzend (SBP-*adjacent*)“ für die subchondrale Knochenplatte im Bereich des chondralen Defekts bzw. angrenzend zum Defekt sowie entsprechend für die Spongiosa unterhalb der Defektzone „Subartikuläre Spongiosa – Defekt (SAS-*defect*)“ und die daran angrenzende Spongiosa „Subartikuläre Spongiosa – angrenzend (SAS-*adjacent*)“ (Orth *et al.*, 2012). Die maximale Ausdehnung der ROIs legten wir auf 3 mm in die Tiefe und 4 mm in die Breite fest. Eine Überlappung der ROIs wurde dabei stets vermieden (siehe Abbildung 5).

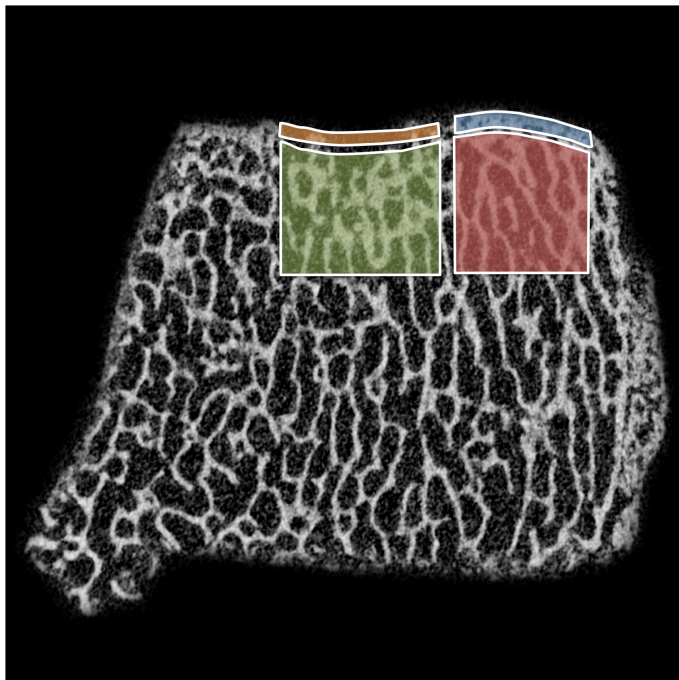


Abbildung 5: Auswertung der  $\mu$ -CT-Bilder anhand der *regions of interests*. Die Bereiche wurden so gewählt, dass ein repräsentativer Bereich erfasst und eine Überlappung der einzelnen Bereiche vermieden wurde. Orange = subchondrale Knochenplatte - Defekt (SBP - *defect*); blau = Subchondrale Knochenplatte - angrenzend (SBP - *adjacent*); grün = Subartikuläre Spongiosa - Defekt (SAS - *defect*); rot = Subartikuläre Spongiosa - angrenzend (SAS - *adjacent*).

In jedem ROI wurden mithilfe des CT-Analyzer (CTAn, Skyscan) die Werte für die Knochenmineraldichte (engl. bone mineral density, BMD), Knochenvolumenanteil (engl. *bone volume fraction*, BV/TV), Verhältnis Knochenoberfläche/Volumen (engl.

*bone surface/bone volume*, BS/BV), Knochenoberflächendichte (engl. *bone surface density*, BS/TV) und Porosität (engl. *total porosity*, Po.tot) bestimmt. Innerhalb Spongiosa-haltiger ROIS wurden zusätzlich der trabekuläre Musterfaktor (engl. *trabecular pattern factor*, Tb.Pf), der Struktur Model Index (engl. *structure model index*, SMI), die Trabekeldicke (engl. *trabecular thickness*, Tb.Th), die Trabekelanzahl (engl. *trabecular number*, Tb.N), die trabekuläre Separation (engl. *trabecular separation*, Tb.Sp), die fraktale Dimension (engl. *fractal dimension*, FD) und der Grad der Anisotropie (engl. *degree of anisotropy*, DA) berechnet. Der Parameter kortikale Dicke (engl. *cortical thickness*, Ct.Th) wurde in den ROI, die die subchondrale Knochenplatte betreffen, ermittelt.

## **5.6 Histologische Aufarbeitung**

### **5.6.1 Entkalkung**

Nach Entnahme wurden die Proben in einer Lösung aus Natriumcitrat und Essigsäure für sechs Wochen entkalkt. Anschließend wurden die Proben in Formalin aufbewahrt.

### **5.6.2 Fixierung**

Die entkalkten Proben wurden zunächst in einer Alkoholreihe mit aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (70, 80, 95, 95, 100%) entwässert und anschließend in 100%iger Ethanollösung über Nacht belassen. Am Folgetag schloss sich die Inkubation mit Xylol (1h), einem Xylol-Paraffingemisch (1h) und zuletzt reinem Paraffin an.

### **5.6.3 Einbettung**

Die Präparate legten wir in eine Metallkassette und füllten diese mit flüssigem Paraffin auf, sodass die Proben vollständig in Paraffin eingebettet waren. Nach Aushärtung der Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom histologische Schnitte angefertigt. Die

Schnitte entstanden in der Frontalebene auf Höhe der Defektmittle in einem Abstand von 300 µm. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträgern fixiert.

## 5.7 Färbung

### 5.7.1 Safranin-O-Echtgrün

Zur histologischen Auswertung färbten wir nach Safranin-O-Echtgrün. Dazu wurden die Präparate zunächst schrittweise in Ethanol von absteigender Konzentration (100%, 95%, 80%) entparaffiniert und bewässert. Daran schloss ich eine Exposition gegenüber Hämatoxylin nach Weigert (12 min), Echtgrün für (5 min) und 1%iger Essigsäure (5 s) an. Überschüssige Färbelösungen wurden durch Waschen in klarem Wasser entfernt. Zuletzt führten wir eine Gegenfärbung mit Safranin-O (10 min) durch. Nachdem überschüssige Lösung wieder ausgewaschen wurde, erfolgte die Fixierung und Entwässerung in einer Alkoholreihe von zunehmender Konzentration. Zum Schluss wurden die Präparate auf den Objektträgern mit Deckgläschen und Eindecklösung eingedeckt. In den mit Safranin-O gefärbten Präparaten beurteilten wir das Reparaturgewebe sowie den unterhalb des Defekts liegenden subchondralen Knochen. Hierfür verwendeten wir das unten dargestellte Punktesystem (Tabelle 8) (Sellers *et al.*, 1997). Von jedem Defekt wurden mindestens acht Schnitte bei 20-, 40- und 100facher Vergrößerung ausgewertet. Da wir für die vorliegende Arbeit chondrale Defekte untersuchten, modifizierten wir das unter Punkt 7 genannte Kriterium so, dass der subchondrale Knochen beurteilt wird und nicht, wie ursprünglich von Sellers *et al.* bei osteochondralen Defekten vorgeschlagen, der neu gebildete Knochen.

**Tabelle 8: Modifiziertes histologisches Bewertungssystem nach Sellers *et al.***

<i>Kategorie</i>	<i>Punkte</i>
1. Defektfüllung im Vergleich zum umliegenden normalen Knorpel	
111-125%	1
91-110%	0
76-90%	1
51-75%	2
26-50%	3
<25%	4

<b>2. Integration des Defektgewebes in den umliegenden Knorpel</b>	
Normale Kontinuität und Integration	0
Verminderte Zellularität	1
Spalte auf einer Seite	2
Spalte auf beiden Seiten	3
<b>3. Matrixfärbbarkeit mit Safranin-O-Echtgrün</b>	
Normal	0
Leicht vermindert	1
Moderat vermindert	2
Stark vermindert	3
Keine	4
<b>4. Zellmorphologie</b>	
Normal	0
Hauptsächlich runde Zellen, Chondrozytenmorphologie	
>75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	0
25-75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	1
<25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
50% runde Zellen, Chondrozytenmorphologie	
>75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
25-75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	3
<25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
Hauptsächlich spindelförmige (fibroblastenähnliche) Zellen	5
<b>5. Defektarchitektur (Grenzzone nicht mit einbezogen)</b>	
Normal	0
1-3 kleine Unterbrechungen/Defekte	1
1-3 mittelgroße Unterbrechungen/Defekte	2
>3 große Unterbrechungen/Defekte	3
Risse/Spalten	4
<b>6. Oberflächenarchitektur</b>	
Normal	0
Leichte Auffaserungen (=Fibrillation) oder Unregelmäßigkeiten	1
Moderate Fibrillation oder Unregelmäßigkeiten	2
Starke Fibrillation oder Unregelmäßigkeiten	3
<b>7. Prozent des ursprünglichen subchondralen Knochens unterhalb des Defekts</b>	
90-100%	0
75-89%	1
50-74%	2
25-49%	3
<25%	4
<b>8. Ausbildung der Tidemark</b>	
Komplett	0
75-99%	1
50-74%	2
25-49%	3
<25%	4
<b>Gesamt</b>	<b>0-31</b>

**Semiquantitatives Bewertungssystem histologischen Beschreibung des Reparaturgewebes im Gelenkknorpel. Maximal sind 31 Punkte erreichbar, wobei eine niedrige Punktzahl eine gute Defektheilung beschreibt, eine hohe Punktzahl dagegen eine schlechtere.**

### 5.7.2 Hämatoxylin-Eosin

Zunächst wurden die Präparate wie unter 5.7.1 beschrieben entparaffiniert. Dann wurden sie für 10 min in Hämatoxylin-Lösung gefärbt, anschließend wurde überschüssige Lösung mit Leitungswasser abgespült. Nach kurzer Differenzierung in HCl-Lösung (2 s) und warmen Wasser (5 min) folgte die Färbung in Eosin (10 s). Danach wurden die Präparate erneut in Leitungswasser gewaschen. Daran schloss sich die Entwässerung und Eindeckung wie in Abschnitt 5.7.1 beschrieben an.

### 5.7.3 Typ-II- Kollagen

Zur Darstellung der Kollagenfasern Typ II wurden die Präparate zunächst schrittweise entparaffiniert (vgl. 5.7.1) und in 0,3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) vorbehandelt. Nach zweifachem Spülen in PBS folgte die Exposition gegenüber Trypsin (0,1%) für 10 min und nach erneutem Spülen mit PBS diejenige gegenüber *blocking buffer* (30 min). Danach wurden die Präparate mit dem Antikörper gegen Kollagenfasern vom Typ II (Verdünnung 1:90) inkubiert (1h). Nach der Inkubation wurden die Proben zweimal mit PBS gespült und anschließend dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:45) über Nacht bei 4°C ausgesetzt. Überschüssige Lösung wurde durch Spülen mit PBS entfernt. Schließlich wurden die sekundären Antikörper durch Inkubation mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz (30 min, vorbereitet nach Herstellerangaben) und DAB-Reagenz (7 min, vorbereitet nach Herstellervorgaben) sichtbar gemacht. Zum Schluss wurden die Präparate entwässert und die Färbung fixiert (vgl. 5.7.1). Anhand der Farbintensität beurteilten wir das Vorhandensein von Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe im Vergleich zum umliegenden Knorpelgewebe. Von jedem Defekt wurden mindestens acht Schnitte untersucht.

**Tabelle 9: Immunreaktivität des Typ-II-Kollagens im Defektgewebe**

<i>Farbintensität im Vergleich zu umliegenden Knorpelgewebe</i>	<i>Punkte</i>
Keine Immunreaktivität	0
Signifikant geringere Immunreaktivität	1
Moderat geringere Immunreaktivität	2
Ähnliche Immunreaktivität	3
Stärkere Immunreaktivität	4

**Die Beurteilung der Immunreaktivität erfolgte anhand der Farbintensität im Vergleich zum umliegenden normalen Gelenkknorpel. Letzterer fungierte dabei als interne Positivkontrolle.**

## 6 Ergebnisse

Im Sinne des Konzepts der osteochondralen Einheit sind nachfolgend sowohl die therapeutischen Effekte auf die Knorpelreparatur als auch auf die Rekonstruktion des subchondralen Knochens dargestellt. Obwohl es sich um chondrale Defekte handelt, induziert die Mikrofrakturierung auch Veränderungen des subchondralen Knochens.

### 6.1 Effekt von rAAV-SOX9 auf die osteochondrale Reparatur nach vier Wochen *in vivo*

#### 6.1.1 Semiquantitativ-makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur

Die Knorpelreparatur wurde makroskopisch semiquantitativ mithilfe der Bewertungssysteme nach Oswestry und Goebel *et al.* wie weiter oben beschrieben (siehe Tabelle 6 bzw. Tabelle 7) beurteilt und anschließend mit dem Effekt von rAAV-*lacZ* verglichen. Nach Applikation von rAAV-*lacZ* entwickelte sich ein Defektgewebe mit durchschnittlich durchscheinender Farbe (mittlere Punktzahl: 2,83). Es waren in 75% der Defekte Blutgefäße zu sehen. Die meist unregelmäßige Oberfläche wies Fibrillationen und Risse auf. Der Defekt war nie komplett aufgefüllt; die mittlere Füllhöhe betrug meist weniger als 50%. Der angrenzende Knorpel wurde kaum beeinträchtigt (mittlere Punktzahl: 0,5). Das Reparaturgewebe war in nur weniger als 25% der Defektzirkumferenz in den angrenzenden Knorpel integriert (mittlere Punktzahl: 0,67).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine deutlich bessere Knorpelreparatur in der Gruppe rAAV-SOX9-behandelter Defekte (mittlere Punktzahl: 7,83). Die Farbe des Defektgewebes war überwiegend weiß und im Bewertungssystem nach Oswestry *et al.* signifikant besser als in der Kontrollgruppe. Blutgefäße fanden sich vereinzelt mit einer maximalen Ausdehnung von 50% des Defektgewebes (mittlere Punktzahl: 1,83). Die Oberflächenstruktur war im Mittel glatt, vereinzelt wurde sie von Rissen unterbrochen (mittlere Punktzahl: 1,5 bzw. 2,0). Im Durchschnitt kam es zu einer



Defektauffüllung von 50%. Die Integration in den angrenzenden Knorpel war mit 1,5 Punkten signifikant besser als in der Kontrollgruppe ( $P = 0,025$ ), wobei sich wiederum kaum Auswirkungen auf den angrenzenden Knorpel zeigten. Insgesamt führte rAAV-SOX9 zu einer makroskopisch signifikant verbesserten Knorpelreparatur ( $P = 0,027$ ).

**Tabelle 10: Effekt von rAAV-SOX9 auf die chondrale Reparatur im Bewertungssystem nach Goebel et al.**

Kategorie	rAAV (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	lacZ	SOX9		
Farbe	2,83 $\pm$ 0,75	2,33 $\pm$ 0,82	-0,50	0,257
Blutgefäße	3,00 $\pm$ 0,63	1,83 $\pm$ 1,47	-1,17	0,216
Oberflächenstruktur	2,00 $\pm$ 1,26	1,50 $\pm$ 1,22	-0,50	0,524
Füllung	2,33 $\pm$ 0,82	1,83 $\pm$ 0,98	-0,50	0,180
Angrenzender Knorpel	0,50 $\pm$ 0,84	0,33 $\pm$ 0,82	-0,17	0,785
Gesamt	10,67 $\pm$ 1,86	7,83 $\pm$ 2,56	-2,83	0,071

Die semiquantitative makroskopische Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung.

**Tabelle 11: Effekt von rAAV-SOX9 auf die Knorpelreparatur im Oswestry-Bewertungssystem**

Kategorie	rAAV (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	lacZ	SOX9		
Höhe	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,52	0,33	0,157
Integration	0,67 $\pm$ 0,52	1,50 $\pm$ 0,55	0,83	0,025*
Oberflächenstruktur	1,50 $\pm$ 0,84	2,00 $\pm$ 0,00	0,50	0,180
Farbe	1,00 $\pm$ 0,63	0,67 $\pm$ 0,82	-0,33	0,027*
Gesamt	3,17 $\pm$ 1,17	4,50 $\pm$ 1,76	1,33	0,034*

Die semiquantitative makroskopische Auswertung wurde nach vier Wochen *in vivo* durchgeführt. SA = Standardabweichung; \* = statistisch signifikant.

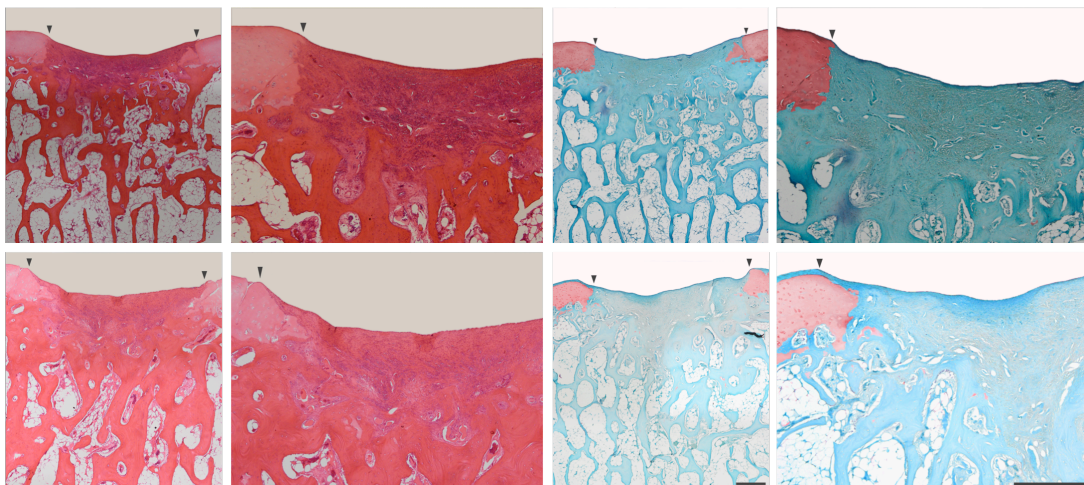
## 6.1.2 Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Knorpelreparatur

### 6.1.2.1 Safranin-O-Echtgrün-Färbung

Für die Beurteilung des Reparaturgewebes wurden die histologischen Schnitte wie oben beschrieben nach Safranin-O-Echtgrün gefärbt und mithilfe des in Tabelle 8 dargestellten Bewertungssystems analysiert. Im Durchschnitt ist eine Defektauffüllung von 50-90% im Vergleich zur Dicke des umliegenden Knorpels

erreicht worden (mittlere Punktzahl: 1,9). Die Integration des Defektgewebes in das angrenzende Knorpelgewebe war stets gekennzeichnet durch eine verminderte Zellularität, eine Spaltbildung fand sich regelmäßig (mittlere Punktzahl: 1,4). Die Färbbarkeit der Matrix war stark vermindert. Morphologisch präsentierten sich die Zellen des Defektgewebes hauptsächlich als spindelförmig (mittlere Punktzahl: 4,54). Die Strukturierung des Defektgewebes war teilweise durchsetzt von kleinen bis mittelgroßen Unterbrechungen. Dagegen stellte sich die Oberflächenstruktur als annähernd normal dar (mittlere Punktzahl: 0,54). Eine Regeneration der *Tidemark* erfolgte nicht.

Vergleichend zur Kontrollgruppe kam es zu einer besseren Defektauffüllung durch rAAV-SOX9 (mittlere Punktzahl: 1,65). Die Integration in den umliegenden Knorpel spiegelte sich in einer verminderten Zellularität wieder. Ähnlich zur Kontrollgruppe ließ sich die extrazelluläre Matrix schlechter als normaler Gelenkknorpel anfärben (mittlere Punktzahl: 3,38). In der Struktur des Defektgewebes waren vereinzelt kleine bis große Unterbrechungen zu sehen, die Struktur der Oberfläche dagegen zeigte sich ohne Fibrillationen ähnlich normaler Knorpeloberfläche (mittlere Punktzahl: 0,4). Die *Tidemark* wurde auch hier nicht rekonstruiert, sodass insgesamt eine signifikant bessere Knorpelreparatur im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar ist ( $P = 0,027$ ).



**Abbildung 6:** Histologische Darstellung des Effekts von rAAV-SOX9 auf die Knorpelreparatur nach vier Wochen *in vivo*. Obere Reihe der Abbildung zeigt die rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe, die linke Hälfte zeigt den Defekt in der HE-Färbung, die rechte in der Safranin-O-Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Tabelle 12: Effekt von rAAV-SOX9 auf die Knorpelreparatur im Bewertungssystem nach Sellers *et al.*

Kategorie	rAAV(Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Defektfüllung	1,90 $\pm$ 0,15	1,65 $\pm$ 0,15	-0,25	0,25
Integration	1,40 $\pm$ 0,09	1,46 $\pm$ 0,09	0,06	0,62
Matrixfärbbarkeit	3,54 $\pm$ 0,09	3,38 $\pm$ 0,09	-0,16	0,19
Zellmorphologie	4,54 $\pm$ 0,11	4,40 $\pm$ 0,11	-0,14	0,35
Defektarchitektur	2,35 $\pm$ 0,11	2,13 $\pm$ 0,11	-0,22	0,14
Oberflächenarchitektur	0,54 $\pm$ 0,10	0,40 $\pm$ 0,10	-0,14	0,31
Subchondraler Knochen	2,58 $\pm$ 0,13	1,96 $\pm$ 0,13	-0,62	<0,001*
<i>Tidemark</i>	3,98 $\pm$ 0,02	4,00 $\pm$ 0,02	0,02	0,32
Gesamtpunktwert	20,83 $\pm$ 0,47	19,35 $\pm$ 0,47	-1,48	0,027*

Die semiquantitativ mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; \* = statistisch signifikant.

### 6.1.2.2 Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie

Zur Beurteilung des Kollagengehalts im Defektgewebe wendeten wir das in Tabelle 9 aufgeführte Bewertungsschema an. Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich eine mittlere Anfärbbarkeit von 0,5 Punkten. Die Färbung des Defektgewebes in der rAAV-SOX9-Gruppe war mit einem *P*-Wert von 0,046 signifikant besser.

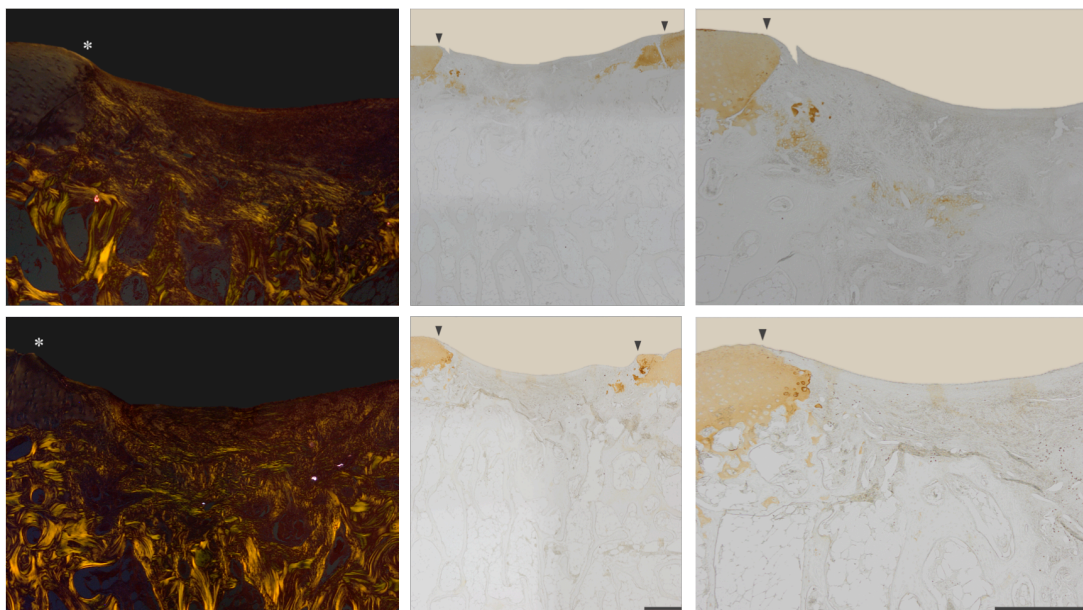


Abbildung 7: Darstellung des Gehalts an Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe nach vier Wochen *in vivo*. Obere Reihe: rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe; links: Polarisationsmikroskopie; rechts: Immunhistochemie; Pfeile zeigen den Defektbereich an; der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

Tabelle 13: Effekt von rAAV-SOX9 auf den Typ-II-Kollagengehalt im Defekt

	rAAV (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Farbintensität im Vergleich zu umliegenden Knorpelgewebe	0,5 $\pm$ 0,55	0,8 $\pm$ 0,75	0,3	0,046*

Die semiquantitative Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; \* = statistisch signifikant.

### 6.1.3 Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Reparatur des subchondralen Knochens

#### 6.1.3.1 Auswirkung auf den subchondralen Knochen im Bereich des Defekts

Die Auswertung erfolgte wie unter 5.5 beschrieben. Nach vier Wochen *in vivo* nahm die Knochenmineraldichte (BMD) in der subartikulären Spongiosa durch die Exposition gegenüber rAAV-SOX9 im Vergleich zur Exposition gegenüber rAAV-*lacZ* (Kontrollgruppe) zu. Ähnlich verhält es sich mit dem Knochenvolumenanteil (BV/TV), der Trabekelanzahl (Tb.N), der Trabekeldichte (Tb.Th), dem Trabekelmusterfaktor (Tb.f) und der fraktalen Dimension (FD). Passend dazu zeigten sich die Porosität (Po(tot)), der Strukturmodellindex (SMI) und die Verhältnisse Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV) sowie Knochenoberfläche zu Gesamtvolumen (BS/TV) geringer. Auf die subchondrale Knochenplatte übte SOX9 einen vergleichbaren Effekt aus. Das Signifikanzniveau wurde jeweils nicht erreicht.

Tabelle 14: Effekt von rAAV-SOX9 auf die subchondrale Knochenplatte im Defektbereich

Parameter	rAAV (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	410,05 $\pm$ 222,01	578,94 $\pm$ 153,98	168,89	0,116
BV/TV (%)	1,24 $\pm$ 1,22	1,05 $\pm$ 1,54	-0,20	0,753
BS/BV (1/mm)	172,86 $\pm$ 76,16	185,01 $\pm$ 46,94	12,15	0,917
BS/TV (1/mm)	1,65 $\pm$ 1,44	1,41 $\pm$ 1,52	-0,23	0,917
Ct.Th (mm)	0,06 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,00	-0,02	0,173
Po(tot) (%)	98,76 $\pm$ 1,22	98,95 $\pm$ 1,54	0,20	0,735

Die mikroskopische Analyse wurde nach vier Wochen *in vivo* durchgeführt. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Ct.Th = Kortikalisdicke; Po(tot) = Gesamtporosität.

Tabelle 15: Effekt von rAAV-SOX9 auf die subartikuläre Spongiosa im Defektbereich

Parameter	rAAV (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	520,89 $\pm$ 287,88	607,00 $\pm$ 316,33	86,11	0,600
BV/TV (%)	36,91 $\pm$ 3,90	40,09 $\pm$ 7,80	3,18	0,249
BS/BV (1/mm)	28,25 $\pm$ 2,99	25,83 $\pm$ 2,18	-2,41	0,753
BS/TV (1/mm)	10,44 $\pm$ 1,65	10,38 $\pm$ 2,42	-0,06	0,753
Tb.Pf (1/mm)	-2,17 $\pm$ 5,16	-2,87 $\pm$ 5,14	-0,70	0,600
SMI	0,90 $\pm$ 0,65	0,76 $\pm$ 0,66	-0,14	0,345
Tb.Th (mm)	0,12 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,01	0,753
Tb.N (1/mm)	3,01 $\pm$ 0,50	3,04 $\pm$ 0,85	0,03	0,917
Tb.Sp (mm)	0,23 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,07	0,00	0,917
DA	0,44 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,04	0,00	0,600
FD	2,43 $\pm$ 0,04	2,44 $\pm$ 0,03	0,01	0,345
Po(tot) (%)	63,09 $\pm$ 3,90	59,91 $\pm$ 7,80	-3,18	0,345

Die mikroskopische Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Tb.Pf = Trabekulärer Musterfaktor; SMI = Strukturmodellindex; Tb.Th = Trabekeldicke; Tb.N = Trabekelanzahl; Tb.Sp = Trabekelabstand; DA = Grad der Anisotropie; FD = Fraktale Dimension; Po(tot) = Gesamtporosität.

### 6.1.3.2 Auswirkung auf den angrenzenden subchondralen Knochen

Im Bereich angrenzend zum Defekt kam es in der subartikulären Spongiosa nach vier Wochen *in vivo* unter Exposition gegenüber rAAV-SOX9 zu verschiedenen geringen Veränderungen: die Knochenmineraldichte (BMD), die Porosität (Po(tot)), der Strukturmodellindex (SMI), der trabekuläre Musterfaktor (Tb.Pf) und der Trabekelabstand (Tb.Sp) nahmen zu, der Knochenvolumenanteil (BV/TV), die Trabekelanzahl (Tb.N) und die fraktale Dimension (FD) nahmen ab im Vergleich zur Kontrollgruppe (rAAV-*lacZ*). Ähnliche Veränderungen zeigten sich innerhalb der subchondralen Knochenplatte. Das Signifikanzniveau wurde in keiner der genannten Kategorien erreicht.

Tabelle 16: Effekt von rAAV-SOX9 auf die angrenzende subartikuläre Spongiosa

Parameter	rAAV (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	585,94 $\pm$ 268,01	648,42 $\pm$ 210,48	62,48	0,917
BV/TV (%)	41,80 $\pm$ 5,65	39,81 $\pm$ 9,76	-1,99	0,463
BS/BV (1/mm)	30,55 $\pm$ 4,65	31,20 $\pm$ 4,35	0,65	0,753
BS/TV (1/mm)	12,62 $\pm$ 1,62	12,11 $\pm$ 1,97	-0,51	0,345
Tb.Pf (1/mm)	-2,10 $\pm$ 4,10	-1,36 $\pm$ 4,12	0,74	0,345
SMI	0,69 $\pm$ 0,58	0,71 $\pm$ 0,41	0,02	0,917
Tb.Th (mm)	0,11 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01	0,00	0,753
Tb.N (1/mm)	3,81 $\pm$ 0,59	3,63 $\pm$ 0,64	-0,17	0,463
Tb.Sp (mm)	0,17 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,05	0,01	0,345
DA	0,47 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,06	-0,01	0,6
FD	2,41 $\pm$ 0,09	2,39 $\pm$ 0,05	-0,01	0,917
Po(tot) (%)	58,20 $\pm$ 5,65	60,19 $\pm$ 9,76	1,99	0,463

Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*; SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Tb.Pf = Trabekulärer Musterfaktor; SMI = Strukturmodellindex; Tb.Th = Trabekeldicke; Tb.N = Trabekelanzahl; Tb.Sp = Trabekelabstand; DA = Grad der Anisotropie; FD = Fraktale Dimension; Po(tot) = Gesamtporosität.

Tabelle 17: Effekt von rAAV-SOX9 auf die angrenzende subchondrale Knochenplatte

Parameter	rAAV (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	565,61 $\pm$ 253,53	700,48 $\pm$ 185,68	134,86	0,173
BV/TV (%)	80,35 $\pm$ 7,44	81,64 $\pm$ 9,82	1,28	0,753
BS/BV (1/mm)	50,39 $\pm$ 3,01	49,70 $\pm$ 8,78	-0,69	0,917
BS/TV (1/mm)	40,43 $\pm$ 3,81	40,35 $\pm$ 7,91	-0,08	0,345
Ct.Th (mm)	0,08 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,04	0,00	0,6
Po(tot) (%)	19,65 $\pm$ 7,44	18,36 $\pm$ 9,82	-1,28	0,753

Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Ct.Th = Kortikalisdicke; Po(tot) = Gesamtporosität.

## 6.2 Effekt von rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat auf die osteochondrale Reparatur nach vier Wochen *in vivo*

### 6.2.1 Semiquantitativ-makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur

Die makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur erfolgte wie unter 5.4 beschrieben. Der Effekt von rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat auf die Knorpelreparatur wurde mit dem Effekt von rAAV-*lacZ* in Knochenmarkaspirat verglichen, wobei zuletzt genannte Defekte als Kontrollgruppe zusammengefasst wurden. Innerhalb dieser ließ sich eine ähnliche Knorpelreparatur wie in Abschnitt 6.1.1 beschrieben beobachten. Defekte, die mit rAAV-SOX9 behandelt wurden, zeigten dagegen eine bessere Reparatur. Die Farbe des Defektgewebes war durchscheinend bis weiß (mittlere Punktzahl: 2,33 bzw. 1,17), wodurch in 25-50% des Gewebes Blutgefäße zu erkennen waren. Heterogen und von feinen Rissen unterbrochen stellte sich die Oberfläche des Defektgewebes dar. Die Oberfläche des angrenzenden Knorpels blieb unbeeinflusst (mittlere Punktzahl: 0,17), wobei die Integration in letzteren zu mehr als 75% vollständig war (mittlere Punktzahl: 1,33). Insgesamt wurde innerhalb dieser Gruppe der Defekt zu mehr als 50% aufgefüllt.

**Tabelle 18: Effekt von rAAV in Knochenmarkaspirat auf die Knorpelreparatur im Bewertungssystem nach Goebel *et al.***

Kategorie	rAAV in BMA (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Farbe	2,33 $\pm$ 1,21	2,33 $\pm$ 1,21	0,00	1,000
Blutgefäße	3,00 $\pm$ 1,10	2,11 $\pm$ 1,03	-0,76	0,194
Oberflächenstruktur	2,00 $\pm$ 1,26	1,67 $\pm$ 1,51	-0,33	0,577
Füllung	1,50 $\pm$ 1,05	1,67 $\pm$ 1,51	0,17	0,783
Angrenzender Knorpel	0,67 $\pm$ 0,82	0,17 $\pm$ 0,41	-0,50	0,275
Gesamt	9,50 $\pm$ 4,46	8,17 $\pm$ 4,49	-1,33	0,498

Die semiquantitative makroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. BMA = Knochenmarkaspirat; SA = Standardabweichung.

**Tabelle 19: Effekt von rAAV in Knochenmarkspirat auf die Knorpelreparatur im Oswestry-Bewertungssystem**

Kategorie	rAAV in BMA (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Höhe	0,50 $\pm$ 0,84	0,83 $\pm$ 0,98	0,33	0,317
Integration	0,50 $\pm$ 0,55	1,33 $\pm$ 0,52	0,83	0,059
Oberflächenstruktur	1,00 $\pm$ 0,63	1,33 $\pm$ 0,82	0,33	0,317
Farbe	1,00 $\pm$ 0,89	1,17 $\pm$ 0,98	0,17	0,656
Gesamt	3,00 $\pm$ 2,53	4,67 $\pm$ 2,73	1,76	0,096

Die semiquantitative makroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. BMA = Knochenmarkspirat; SA = Standardabweichung.

## 6.2.2 Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Knorpelreparatur

### 6.2.2.1 Safranin-O-Echtgrün-Färbung

Die histologische Auswertung erfolgte wie unter 5.7.1 erläutert. Durch Applikation von rAAV-*lacZ* in Knochenmarkspirat in die chondralen Defekte ergab sich eine ähnliche Knorpelreparatur wie in Abschnitt 6.1.2.1 beschrieben. Im Vergleich dazu führte die Applikation von rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat insgesamt zu einer signifikant besseren Knorpelreparatur ( $P = 0,046$ ). Dabei ließ sich eine signifikant bessere Färbung der Matrix feststellen ( $P = 0,018$ ). Die Zellen im Defektgewebe waren hauptsächlich rund und somit hyalinem Knorpel signifikant ähnlicher als in der Kontrollgruppe ( $P = 0,019$ ). Im Defektgewebe waren weniger Unterbrechungen zu finden als in der Kontrollgruppe ( $P = 0,017$ ). Auch die Beschaffenheit der Oberfläche war mit einem  $P < 0,001$  signifikant besser als in der Kontrollgruppe.



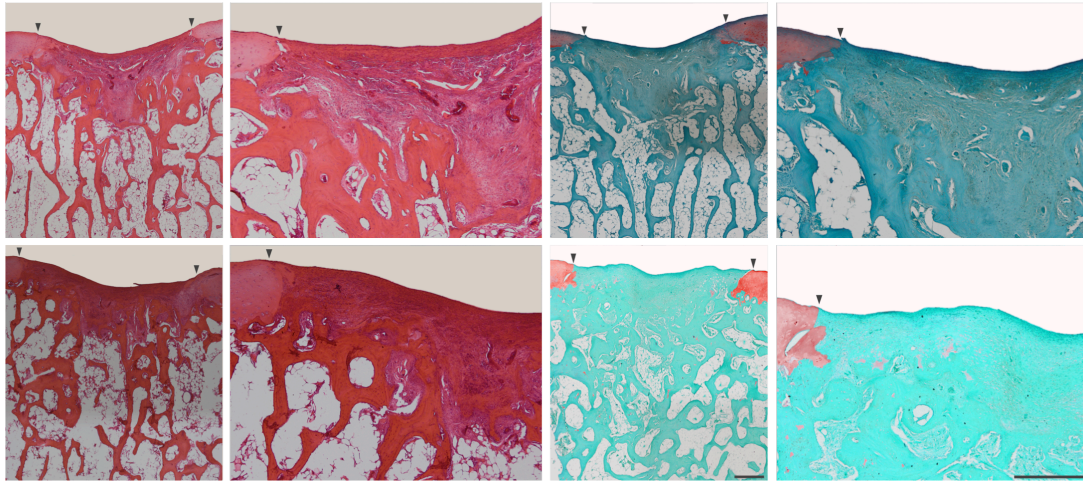


Abbildung 8: Histologische Darstellung des Effekts von rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat auf die Knorpelreparatur vier Wochen postoperativ. Obere Reihe: rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe; links: HE-Färbung; rechts: Safranin-O-Färbung; Pfeile zeigen die Defektgrenzen; der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Tabelle 20: Effekt von rAAV in Knochenmarkspirat auf die Knorpelreparatur im Bewertungssystem nach Sellers *et al.*

Kategorie	rAAV in BMA (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Defektfüllung	1,27 $\pm$ 0,13	1,40 $\pm$ 0,13	0,13	0,50
Integration	1,44 $\pm$ 0,08	1,25 $\pm$ 0,08	-0,19	0,09
Matrixfärbbarkeit	3,46 $\pm$ 0,10	3,13 $\pm$ 0,10	-0,33	0,018*
Zellmorphologie	4,25 $\pm$ 0,14	3,77 $\pm$ 0,14	-0,48	0,019*
Defektarchitektur	2,40 $\pm$ 0,10	2,06 $\pm$ 0,10	-0,34	0,017*
Oberflächenarchitektur	1,08 $\pm$ 0,12	0,44 $\pm$ 0,12	-0,64	<0,001*
Subchondraler Knochen	1,81 $\pm$ 0,15	2,25 $\pm$ 0,15	0,44	0,035*
<i>Tidemark</i>	3,98 $\pm$ 0,02	4,00 $\pm$ 0,02	0,02	0,32
Gesamtpunktwert	19,69 $\pm$ 0,33	18,29 $\pm$ 0,33	-1,40	0,003*

Die semiquantitative mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. BMA = Knochenmarkspirat; SA = Standardabweichung; \* = statistisch signifikant.

#### 6.2.2.2 Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung wurde wie oben erläutert durchgeführt und anschließend anhand des in Tabelle 9 gezeigten Schemas bewertet. Es zeigte sich eine signifikant geringere Immunreaktivität in der Kontrollgruppe (rAAV-*lacZ* in Knochenmarkspirat) im Vergleich zur Therapiegruppe, die rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat erhielt ( $P = 0,046$ ).

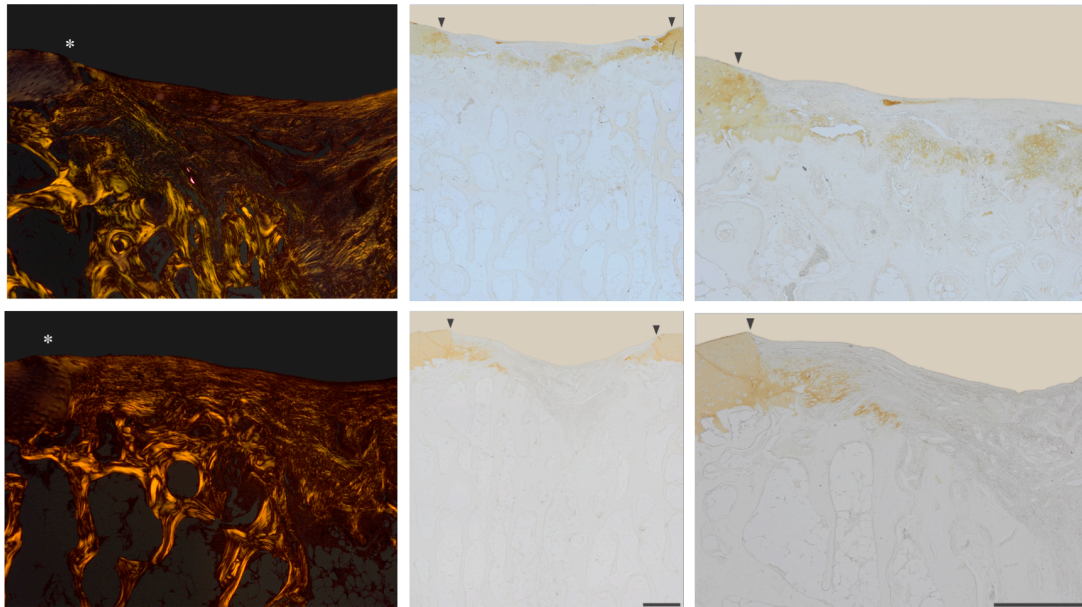


Abbildung 9: Darstellung des Gehalts an Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe nach vier Wochen *in vivo*. Obere Reihe: rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe; links: Polarisationsmikroskopie; rechts: Immunhistochemie; Pfeile zeigen Defektgrenzen; der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Tabelle 21: Effekt von rAAV in Knochenmarkspirat auf den Typ-II-Kollagengehalt im Defekt

	rAAV in BMA (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Farbintensität im Vergleich zu umliegenden Knorpelgewebe	0,8 $\pm$ 0,41	0,7 $\pm$ 0,82	0,17	0,046*

Die semiquantitative mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. BMA = Knochenmarkspirat; SA = Standardabweichung; \* = statistisch signifikant.

### 6.2.3 Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Reparatur des subchondralen Knochens

#### 6.2.3.1 Auswirkungen auf den subchondralen Knochen im Bereich des Defekts

Im Vergleich der Effekte von rAAV-*lacZ* in Knochenmarkspirat (Kontrollgruppe) und rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat auf die subartikuläre Spongiosa im Bereich des Defektes zeigten sich nach vier Wochen *in vivo* eine Zunahme der Knochenmineraldichte (BMD), der Porosität (Po(tot)), des Strukturmodellindex (SMI) und des Trabekelabstands (Tb.Sp). Gleichzeitig nahmen der Knochenvolumenanteil (BV/TV), das Verhältnis aus Knochenoberfläche und Knochenvolumen (BS/BV) sowie aus Knochenoberfläche und Gesamtvolumen (BS/TV), die Anzahl an Trabekeln (Tb.N),

der Grad der Anisotropie (DA) und die fraktale Dimension (FD) ab. Im Bereich der subchondralen Knochenplatte zeigten sich ebenfalls eine Zunahme der BMD und der Gesamtporosität. Das Signifikanzniveau wurde dabei nicht erreicht.

**Tabelle 22: Effekt von rAAV in BMA auf die subartikuläre Spongiosa im Defektbereich**

Parameter	rAAV in BMA (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	599,87 $\pm$ 234,19	756,14 $\pm$ 189,89	156,27	0,028*
BV/TV (%)	46,07 $\pm$ 6,38	42,94 $\pm$ 7,79	-3,125	0,688
BS/BV (1/mm)	26,49 $\pm$ 3,47	25,76 $\pm$ 2,40	-0,727	1,000
BS/TV (1/mm)	12,08 $\pm$ 1,24	10,98 $\pm$ 1,82	-1,093	0,219
Tb.Pf (1/mm)	-5,40 $\pm$ 5,26	-2,38 $\pm$ 4,13	3,020	0,219
SMI	0,48 $\pm$ 0,78	0,81 $\pm$ 0,70	0,329	0,219
Tb.Th (mm)	0,13 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	0,008	1,000
Tb.N (1/mm)	3,61 $\pm$ 0,53	3,15 $\pm$ 0,59	-0,460	0,031
Tb.Sp (mm)	0,17 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,05	0,031	0,688
DA	0,39 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,03	-0,012	0,688
FD	2,48 $\pm$ 0,02	2,44 $\pm$ 0,02	-0,038	0,031
Po(tot) (%)	53,93 $\pm$ 6,38	57,06 $\pm$ 7,79	3,125	0,688

Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. BMA = Knochenmarkspirat; SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Tb.Pf = Trabekulärer Musterfaktor; SMI = Strukturmodellindex; Tb.Th = Trabekeldicke; Tb.N = Trabekelanzahl; Tb.Sp = Trabekelabstand; DA = Grad der Anisotropie; FD = Fraktale Dimension; Po(tot) = Gesamtporosität.

**Tabelle 23: Effekt von rAAV in BMA auf die subchondrale Knochenplatte im Defektbereich**

Parameter	rAAV in BMA (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	460,05 $\pm$ 196,34	547,20 $\pm$ 188,24	87,16	0,173
BV/TV (%)	1,19 $\pm$ 0,95	0,89 $\pm$ 0,85	-0,30	0,917
BS/BV (1/mm)	162,76 $\pm$ 21,37	196,36 $\pm$ 38,99	6,60	0,917
BS/TV (1/mm)	1,83 $\pm$ 1,33	1,34 $\pm$ 1,02	-0,50	0,753
Ct.Th (mm)	0,05 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	-0,02	0,028*
Po(tot) (%)	98,81 $\pm$ 0,95	99,11 $\pm$ 0,85	0,30	0,917

Die mikroskopische Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; \* = statistisch signifikant; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Ct.Th = Kortikalisdicke; Po(tot) = Gesamtporosität.

## 6.2.3.2 Auswirkung auf den angrenzenden subchondralen Knochen

Nach vier Wochen *in vivo* zeigten sich in der angrenzenden subartikulären Spongiosa durch rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat diverse Veränderungen, wie eine numerisch größere Knochenmineraldichte (BMD). Genauso verhielt es sich mit dem Knochenvolumenanteil (BV/TV). Auch in der subchondralen Knochenplatte nahmen beispielsweise die Knochenmineraldichte und der Knochenvolumenanteil im Vergleich zur Kontrollgruppe zu. Die übrigen Parameter Porosität, Kortikalisdicke und die Verhältnisse Knochenoberfläche zu Knochenvolumen und Knochenoberfläche zu Gesamtvolumen verkleinerten sich. Ein Signifikanzniveau wurde jeweils nicht erreicht.

Tabelle 24: Effekt von rAAV in BMA auf die angrenzende subartikuläre Spongiosa

Parameter	rAAV in BMA (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	667,43 $\pm$ 246,31	753,59 $\pm$ 203,42	86,16	0,173
BV/TV (%)	41,66 $\pm$ 9,96	44,19 $\pm$ 10,91	2,53	0,249
BS/BV (1/mm)	30,49 $\pm$ 5,46	27,87 $\pm$ 6,15	-2,62	0,116
BS/TV (1/mm)	12,35 $\pm$ 1,94	11,90 $\pm$ 1,46	-0,45	0,753
Tb.Pf (1/mm)	-1,80 $\pm$ 6,16	-2,05 $\pm$ 4,41	-0,25	0,463
SMI	0,80 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,68	-0,20	0,463
Tb.Th (mm)	0,37 $\pm$ 0,64	0,24 $\pm$ 0,29	-0,14	0,600
Tb.N (1/mm)	3,64 $\pm$ 0,57	3,63 $\pm$ 0,54	-0,01	0,917
Tb.Sp (mm)	0,17 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,05	0,00	0,753
DA	0,46 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,07	-0,03	0,173
FD	2,38 $\pm$ 0,08	2,40 $\pm$ 0,08	0,02	0,753
Po(tot) (%)	58,34 $\pm$ 9,96	55,81 $\pm$ 10,91	-2,53	0,249

Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Tb.Pf = Trabekulärer Musterfaktor; SMI = Strukturmodellindex; Tb.Th = Trabekeldicke; Tb.N = Trabekelanzahl; Tb.Sp = Trabekelabstand; DA = Grad der Anisotropie; FD = Fraktale Dimension; Po(tot) = Gesamtporosität.

Tabelle 25: Effekt von rAAV in BMA auf die angrenzende subchondrale Knochenplatte

Parameter	rAAV in BMA (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	673,87 $\pm$ 244,95	697,21 $\pm$ 183,63	23,34	0,463
BV/TV (%)	75,97 $\pm$ 8,98	82,17 $\pm$ 4,51	6,19	0,116
BS/BV (1/mm)	55,39 $\pm$ 10,45	50,16 $\pm$ 6,13	-5,24	0,753
BS/TV (1/mm)	41,53 $\pm$ 5,90	41,27 $\pm$ 6,13	-0,25	0,028
Ct.Th (mm)	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	-0,01	0,173
Po(tot) (%)	24,03 $\pm$ 8,98	17,83 $\pm$ 4,51	-6,19	0,116

Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Ct.Th = Kortikalisdicke; Po(tot) = Gesamtporosität.

### 6.3 Effekt von rAAV-SOX9 und PCL-Medium auf die Knorpelreparatur nach vier Wochen *in vivo*

#### 6.3.1 Semiquantitativ-makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur

Die makroskopische Auswertung des Effekts von rAAV-SOX9 kombiniert mit einem PCL-Trägermedium und Knochenmarkspirat erfolgte wie in Abschnitt 5.4 beschrieben im Vergleich zum Effekt von rAAV-*lacZ*, (Kontrollgruppe). Innerhalb dieser bildete sich ein Defektgewebe aus, das im Mittel eine durchscheinende Farbe aufwies bzw. gelblich knöchern erschien. In durchschnittlich 50-75% des Gewebes waren Blutgefäße zu erkennen. Das Niveau des benachbarten Knorpels wurde nicht erreicht (mittlere Punktzahl: 0,0), wobei sich die Oberfläche des Defektgewebes inkomplett (mittlere Punktzahl: 3,17) und von Rissen unterbrochen darstellte (mittlere Punktzahl: 0,33). Die Integration des Gewebes in den umliegenden Knorpel war inkomplett, wobei dieser wenig beeinträchtigt wurde (mittlere Punktzahl: 0,83). In der Gruppe mit rAAV-SOX9-Defekten stellte sich das Reparaturgewebe durchschnittlich durchscheinend dar (mittlere Punktzahl: 2,8). Darin waren in 50-75% des Gewebes Blutgefäße zu erkennen (mittlere Punktzahl: 3,0). Das Niveau des angrenzenden Knorpels wurde nicht erreicht. Zuletzt genannter wurde kaum beeinträchtigt. Die Integration in das umliegende Knorpelgewebe war signifikant besser als in der Kontrollgruppe ( $P = 0,046$ ), ebenso die Oberflächenbeschaffenheit ( $P$

= 0,038). Insgesamt zeigten die makroskopischen Analysen eine signifikant bessere Knorpelreparatur als in der Kontrollgruppe ( $P = 0,038$ ).

**Tabelle 26: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat auf die chondrale Reparatur im Bewertungssystem nach Goebel *et al.***

Kategorie	PCL (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Farbe	3,67 $\pm$ 0,52	2,80 $\pm$ 0,45	-0,87	0,102
Blutgefäße	2,83 $\pm$ 0,89	3,00 $\pm$ 0,71	0,17	1,000
Oberflächenstruktur	3,17 $\pm$ 0,75	1,60 $\pm$ 0,55	-0,57	0,038*
Füllung	2,83 $\pm$ 1,17	2,40 $\pm$ 0,55	-0,43	0,705
Angrenzender Knorpel	0,83 $\pm$ 0,98	0,40 $\pm$ 0,89	-0,43	0,317
Gesamt	13,33 $\pm$ 3,14	10,20 $\pm$ 1,30	-3,13	0,109

Die semiquantitativ makroskopische Auswertung wurde nach vier Wochen *in vivo* durchgeführt. SA = Standardabweichung; \* = statistisch signifikant.

**Tabelle 27: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat auf die Knorpelreparatur im Oswestry-Bewertungssystem**

Kategorie	PCL (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Höhe	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00	1,00
Integration	0,33 $\pm$ 0,52	1,20 $\pm$ 0,45	0,87	0,046*
Oberflächenstruktur	0,33 $\pm$ 0,52	0,80 $\pm$ 0,84	0,47	0,180
Farbe	0,50 $\pm$ 0,55	0,60 $\pm$ 0,55	0,10	0,564
Gesamt	1,17 $\pm$ 0,98	2,60 $\pm$ 1,14	1,43	0,038*

Die semiquantitativ makroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; \* = statistisch signifikant.

### 6.3.2 Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Knorpelreparatur

#### 6.3.2.1 Safranin-O-Echtgrün-Färbung

Die Färbung nach Safranin-O-Echtgrün führten wir wie in Abschnitt 5.7.1 erläutert durch, anschließend erfolgte die semiquantitative Auswertung. Die Defekte, die rAAV-*lacZ* in einem PCL-Trägermedium erhielten, fassten wir als Kontrolle zusammen. Mit einem mittleren Punktwert von 20,5 erzielte diese Gruppe einen ähnlichen Effekt auf die Knorpelreparatur wie die weiter oben erwähnten rAAV-*lacZ*-Gruppen (Abschnitte

6.1.2.1, 6.2.2.1 und 6.4.2.1). In der Gruppe mit rAAV-SOX9-PCL-Defekten wurde durchschnittlich eine 75-90%ige Defektfüllung erreicht. Die Integration in das intakte Knorpelgewebe war durch verminderte Zellularität und Spalten auf einer Seite gekennzeichnet und somit signifikant besser als in der Kontrollgruppe ( $P = 0,042$ ). Das Defektgewebe selbst wies größere Unterbrechungen auf, wobei die Matrix sich stark vermindert anfärben ließ und die Zellen teils spindelförmig, teils rund aussahen (mittlere Punktzahl: 4,2). Die Oberflächenarchitektur wies leichte Fibrillationen auf.

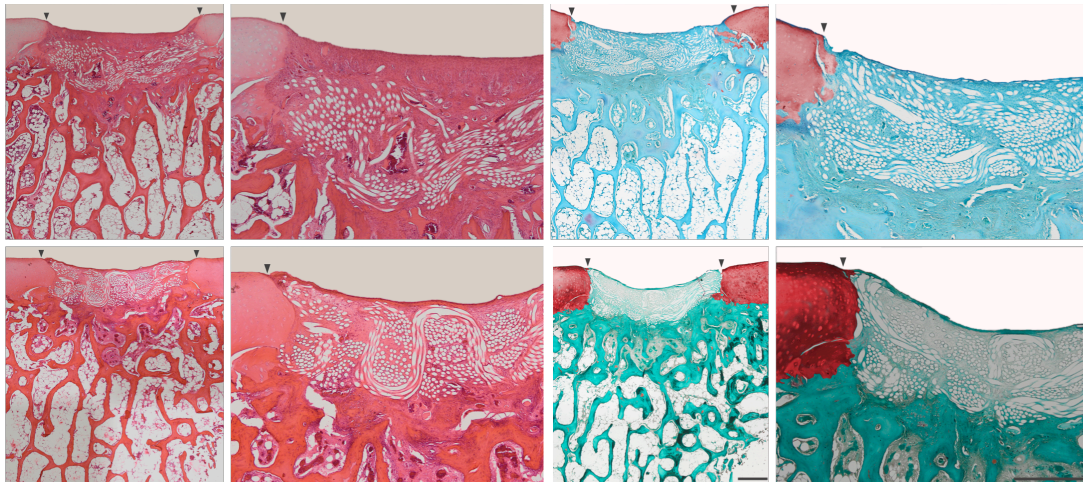


Abbildung 10: Histologische Darstellung des Effekts von rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat und einem PCL-Medium auf die Knorpelreparatur vier Wochen postoperativ. Obere Reihe: rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe; links: HE-Färbung; rechts: Safranin-O-Färbung; Pfeile zeigen die Defektgrenzen; der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Tabelle 28: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat auf die chondrale Reparatur im Bewertungssystem nach Sellers *et al.*

Kategorie	PCL (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Defektfüllung	1,00 $\pm$ 0,90	0,95 $\pm$ 0,78	-0,05	0,500
Integration	1,29 $\pm$ 0,58	1,95 $\pm$ 0,78	0,66	0,042*
Matrixfärbbarkeit	3,58 $\pm$ 0,54	3,33 $\pm$ 0,83	-0,26	0,345
Zellmorphologie	4,52 $\pm$ 0,87	4,2 $\pm$ 1,32	-0,32	0,893
Defektarchitektur	2,63 $\pm$ 0,91	2,30 $\pm$ 0,69	-3,33	0,144
Oberflächenarchitektur	2,54 $\pm$ 0,97	1,00 $\pm$ 0,75	-0,04	0,893
Subchondraler Knochen	2,54 $\pm$ 0,97	2,08 $\pm$ 0,92	-0,47	0,225
<i>Tidemark</i>	4,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	0,00	1,000
Gesamtpunktwert	20,52 $\pm$ 2,32	19,80 $\pm$ 2,92	-0,68	0,17

Die semiquantitativ-mikroskopische Auswertung wurde nach vier Wochen *in vivo* durchgeführt. SA = Standardabweichung; \* = Statistisch signifikant.

### 6.3.2.2 Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie

Typ-II-Kollagen wurde wie oben beschrieben immunhistochemisch dargestellt und die Immunreaktivität mithilfe des in Tabelle 9 abgebildeten Schemas semiquantitativ ausgewertet. Alle Defekte, die rAAV-*lacZ* in einem PCL-Trägermedium erhielten, zeigten eine signifikant verminderte Immunreaktivität im Vergleich zum umliegenden Knorpel (mittlere Punktzahl: 1,0). Moderat vermindert zeigte sich der Gehalt an Kollagen vom Typ II in den rAAV-SOX9-PCL-Defekten (mittlere Punktzahl: 1,6).

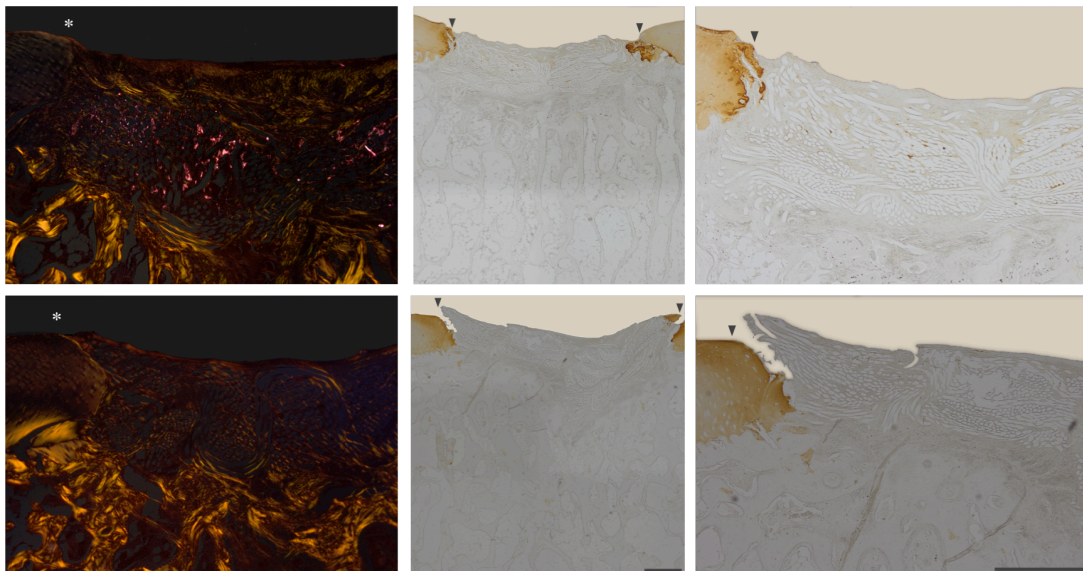


Abbildung 11: Darstellung des Gehalts an Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe nach vier Wochen *in vivo*. Obere Reihe: rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe; links: Polarisationsmikroskopie; rechts: Immunhistochemie; Pfeile zeigen den Defektbereich an; der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Tabelle 29: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat auf den Typ-II-Kollagengehalt im Defekt

	PCL (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Farbintensität im Vergleich zu umliegendem Knorpelgewebe	1,0 $\pm$ 0,89	1,6 $\pm$ 0,55	0,6	0,417

Die semiquantitative Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung.



### 6.3.3 Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Reparatur des subchondralen Knochens

Die Auswertung des Effekts von rAAV-SOX9 in einem PCL-Trägermedium und Knochenmarkaspirat erfolgte wie unter 5.5 beschrieben im Vergleich zum Effekt von rAAV-*lacZ* im PCL-Trägermedium und Knochenmarkaspirat (Kontrollgruppe).

#### 6.3.3.1 Effekt auf den subchondralen Knochen im Bereich des Defekts

Die Auswertung der Daten zeigt eine Zunahme der Knochenmineraldichte (BMD) nach vier Wochen *in vivo* in der subartikulären Spongiosa im Bereich des Defekts. Ebenso zeigen sie eine höhere Porosität (Po(tot)) und einen größeren Strukturmodellindex (SMI). Der Grad der Anisotropie (DA), die fraktale Dimension (FD) und das Verhältnis der Knochenoberfläche zum Knochenvolumen (BS/BV) bzw. zum Gesamtvolumen (BS/TV) waren geringer. Ähnlich wie in der subartikulären Spongiosa war die Knochenmineraldichte in der subchondralen Knochenplatte größer als in der Kontrollgruppe. Gleichermassen veränderten sich der Knochenvolumenanteil und das Verhältnis der Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen. Die Daten zeigen passend dazu eine geringere Porosität und ein kleineres Verhältnis aus Knochenoberfläche und Knochenvolumen. Das Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  wurde in keiner der Kategorien erreicht.

**Tabelle 30: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat auf die subchondrale Knochenplatte im Defektbereich**

Parameter	PCL (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	455,27 $\pm$ 152,29	1531,30 $\pm$ 63,51	1076,03	0,225
BV/TV (%)	0,29 $\pm$ 0,19	0,64 $\pm$ 0,39	0,35	0,08
BS/BV (1/mm)	226,36 $\pm$ 27,72	170,00 $\pm$ 32,44	-56,37	0,08
BS/TV (1/mm)	0,63 $\pm$ 0,36	1,02 $\pm$ 0,54	0,39	0,138
Ct.Th (mm)	0,06 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	-0,02	0,08
Po(tot) (%)	99,71 $\pm$ 0,19	99,36 $\pm$ 0,39	-0,35	0,08

Die mikroskopische Analyse wurde nach vier Wochen *in vivo* durchgeführt. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Ct.Th = Kortikalisdicke; Po(tot) = Gesamtporosität.

**Tabelle 31: Effekt des PCL-Mediums rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat auf die subartikuläre Spongiosa im Defektbereich**

Parameter	PCL (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	700,21 $\pm$ 281,23	2355,04 $\pm$ 35,82	1654,83	0,893
BV/TV (%)	32,91 $\pm$ 6,02	32,42 $\pm$ 9,48	-0,49	0,893
BS/BV (1/mm)	29,42 $\pm$ 3,12	28,36 $\pm$ 3,57	-1,06	0,345
BS/TV (1/mm)	9,58 $\pm$ 1,38	8,94 $\pm$ 1,73	-0,64	0,225
Tb.Pf (1/mm)	1,91 $\pm$ 4,05	4,76 $\pm$ 5,79	2,85	0,225
SMI	1,32 $\pm$ 0,83	1,86 $\pm$ 0,78	0,54	0,138
Tb.Th (mm)	0,12 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,01	0,138
Tb.N (1/mm)	2,71 $\pm$ 0,51	2,42 $\pm$ 0,54	-0,29	0,225
Tb.Sp (mm)	0,25 $\pm$ 0,07	0,24 $\pm$ 0,05	-0,01	0,5
DA	0,45 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,04	0,00	0,893
FD	2,43 $\pm$ 0,06	2,49 $\pm$ 0,06	0,06	0,345
Po(tot) (%)	67,09 $\pm$ 6,02	67,58 $\pm$ 9,48	0,49	0,893

Die mikroskopische Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Tb.Pf = Trabekulärer Musterfaktor; SMI = Strukturmodellindex; Tb.Th = Trabekeldicke; Tb.N = Trabekelanzahl; Tb.Sp = Trabekelabstand; DA = Grad der Anisotropie; FD = Fraktale Dimension; Po(tot) = Gesamtporosität.

### 6.3.3.2 Effekt auf den angrenzenden Knochen

Nach vier Wochen *in vivo* zeigte sich in der angrenzenden Spongiosa eine größere Knochenmineraldichte (BMD) als in der Kontrollgruppe. Ebenso nahmen zu der Knochenvolumenanteil (BV/TV), das Verhältnis der Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen (BS/TV), der trabekuläre Musterfaktor (Tb.Pf), die Trabekeldicke (Tb.Th) und die Trabekelanzahl (Tb.N). Erwartungsgemäß waren der Trabekelabstand (Tb.Sp) und die Porosität (Po(tot)) geringer. Die Daten zeigen vergleichbare Effekte auf die angrenzende subchondrale Knochenplatte. Die Kortikalis war dicker als in der Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht.

**Tabelle 32: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat auf die angrenzende subchondrale Knochenplatte**

Parameter	PCL (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	570,43 $\pm$ 282,19	2186,78 $\pm$ 37,33	1616,35	0,50
BV/TV (%)	80,61 $\pm$ 5,50	83,33 $\pm$ 5,90	2,72	0,23
BS/BV (1/mm)	48,79 $\pm$ 5,91	48,46 $\pm$ 5,06	-0,33	0,69
BS/TV (1/mm)	39,11 $\pm$ 2,95	40,17 $\pm$ 2,43	1,06	0,89
Ct.Th (mm)	0,09 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01	0,01	0,35
Po(tot) (%)	19,39 $\pm$ 5,50	16,67 $\pm$ 5,90	-2,72	0,23

Die mikroskopische Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Ct.Th = Kortikalisdicke; Po(tot) = Gesamtporosität.

**Tabelle 33: Effekt des PCL-Mediums mit rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat auf die angrenzende subartikuläre Spongiosa**

Parameter	PCL (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	707,07 $\pm$ 202,55	2315,03 $\pm$ 41,47	1607,96	0,69
BV/TV (%)	32,30 $\pm$ 4,43	37,23 $\pm$ 1,74	4,93	0,08
BS/BV (1/mm)	34,47 $\pm$ 5,69	30,47 $\pm$ 1,88	-4,00	0,23
BS/TV (1/mm)	10,96 $\pm$ 0,89	11,33 $\pm$ 0,44	0,37	0,23
Tb.Pf (1/mm)	2,52 $\pm$ 4,23	3,25 $\pm$ 0,90	0,74	0,50
SMI	1,06 $\pm$ 0,64	1,38 $\pm$ 0,06	0,33	0,14
Tb.Th (mm)	0,10 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,01	0,08
Tb.N (1/mm)	3,25 $\pm$ 0,25	3,30 $\pm$ 0,11	0,05	0,50
Tb.Sp (mm)	0,22 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,01	-0,03	0,14
DA	0,49 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,08	-0,03	0,35
FD	2,38 $\pm$ 0,05	2,41 $\pm$ 0,05	0,03	0,69
Po(tot) (%)	67,70 $\pm$ 4,43	62,77 $\pm$ 1,74	-4,93	0,08

Die mikroskopische Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Tb.Pf = Trabekulärer Musterfaktor; SMI = Strukturmodellindex; Tb.Th = Trabekeldicke; Tb.N = Trabekelanzahl; Tb.Sp = Trabekelabstand; DA = Grad der Anisotropie; FD = Fraktale Dimension; Po(tot) = Gesamtporosität.

## 6.4 Effekt von rAAV-SOX9 und PF127-Hydrogel auf die Knorpelreparatur nach vier Wochen *in vivo*

### 6.4.1 Semiquantitativ-makroskopische Auswertung der Knorpelreparatur

Die makroskopische Analyse erfolgte wie unter Punkt 5.4 mithilfe der semiquantitativen Bewertungsschemata nach Goebel *et al.* und Oswestry *et al.* (siehe Tabelle 6 bzw. Tabelle 7). Als Kontrollgruppe wurden solche Defekte zusammengefasst, die rAAV-*lacZ* und PF127-Hydrogel erhielten. Das Defektgewebe war hauptsächlich von durchscheinender (mittlere Punktzahl: 2,0) bis weißer Farbe (mittlere Punktzahl: 0,67). In 25-50% des Defektgewebes waren Blutgefäße zu erkennen. Die Oberflächenstruktur des Reparaturgewebes zeigte sich heterogen mit feinen Rissen bzw. Fibrillationen (mittlere Punktzahl: 1,83 bzw. 1,67). Die Defekte wurden im Durchschnitt mehr als 50% aufgefüllt (mittlere Punktzahl: 1,0), wobei das Niveau mit durchschnittlich 0,67 Punkten unterhalb des benachbarten Knorpels blieb. Das umliegende Knorpelgewebe zeigte vereinzelte arthrotische Veränderungen, wobei sich die Integration zu mehr als 25% inkomplett darstellte. Im anschließenden Vergleich mit dem Effekt von rAAV-SOX9 und PF127-Hydrogel auf die Knorpelreparatur zeigte sich ein insgesamt besseres Ergebnis. Im Defektgewebe waren durch die weißlich-durchscheinende Farbe weniger Blutgefäße (mittlere Punktzahl: 1,83) zu erkennen. Die Integration in den benachbarten Knorpel war in weniger als 25% (mittlere Punktzahl: 1,17) unterbrochen, wobei nur geringfügige Beeinträchtigungen darin nachzuweisen waren (mittlere Punktzahl: 0,5). Das Niveau des angrenzenden Knorpels wurde nicht ganz erreicht.

**Tabelle 34: Effekt von SOX9 in PF127 auf die Knorpelreparatur im Bewertungssystem nach Goebel *et al.***

Kategorie	PF127 (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Farbe	2,00 $\pm$ 0,63	2,17 $\pm$ 0,75	0,17	0,564
Blutgefäße	2,17 $\pm$ 0,75	1,83 $\pm$ 0,75	-0,33	0,480
Oberflächenstruktur	1,83 $\pm$ 0,98	1,67 $\pm$ 1,21	-0,17	1,00
Füllung	1,00 $\pm$ 0,89	1,50 $\pm$ 0,55	0,50	0,257
Angrenzender Knorpel	0,33 $\pm$ 0,52	0,50 $\pm$ 0,84	0,17	0,705
Gesamt	7,33 $\pm$ 1,97	7,67 $\pm$ 2,58	0,33	0,916

Die semiquantitative makroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung.

Tabelle 35: Effekt von PF127 mit rAAV-SOX9 auf die chondrale Reparatur im Oswestry-Bewertungssystem

Kategorie	PF127 (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Höhe	0,67 $\pm$ 1,03	0,67 $\pm$ 1,03	0,00	1,00
Integration	0,67 $\pm$ 0,52	1,17 $\pm$ 0,41	0,50	0,083
Oberflächenstruktur	1,17 $\pm$ 0,98	1,50 $\pm$ 0,55	0,33	0,317
Farbe	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,63	0,00	1,00
Gesamt	3,50 $\pm$ 2,07	4,33 $\pm$ 1,51	0,83	0,336

Die semiquantitative makroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung.

## 6.4.2 Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Knorpelreparatur

### 6.4.2.1 Safranin-O-Echtgrün-Färbung

Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 5.7.1 aufgeführt. Defekte, die PF127 und rAAV-*lacZ* erhielten, dienten als Kontrollgruppe. Die erzielten Ergebnisse waren vergleichbar mit denen beschrieben unter 6.1.2.1 und 6.2.2.1. Im Vergleich dazu war die Integration des Defektgewebes in den umliegenden Knorpel nach Applikation von PF127 und rAAV-SOX9 signifikant besser ( $P = 0,012$ ). Sie war geprägt durch verminderte Zellularität, Spalten waren vereinzelt auf einer Seite zu finden. Die Färbbarkeit der Matrix war stark vermindert. Das Defektgewebe zeichnete sich durch eine vornehmlich glatte Oberflächenarchitektur aus (mittlere Punktzahl: 0,77). Innerhalb des Defektgewebes fanden sich Zellen, die in ihrer Morphologie hauptsächlich Fibroblasten entsprechen, sowie vereinzelt kleine Unterbrechungen. Die Struktur des Defektgewebes war somit gleichmäßiger als in der Kontrollgruppe ( $P < 0,001$ ).

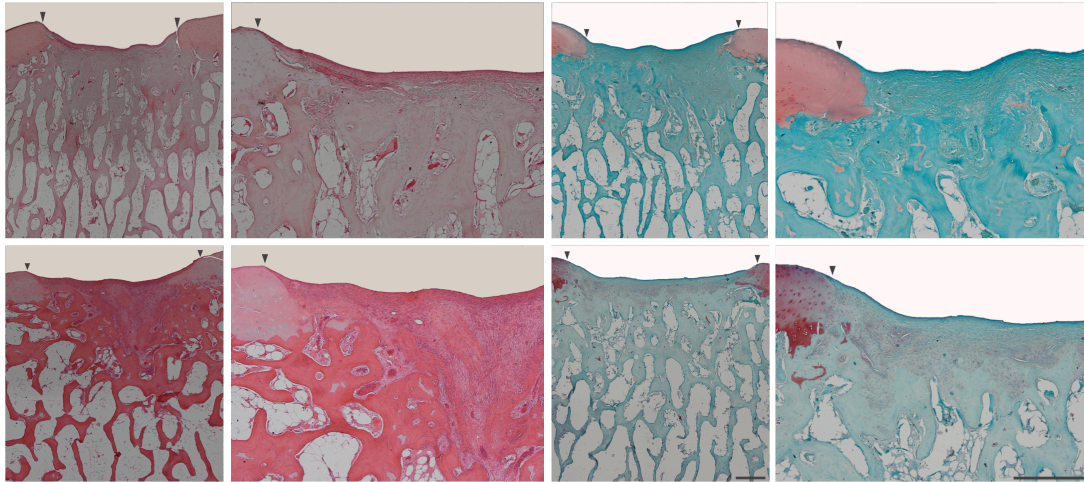


Abbildung 12: Histologische Darstellung des Effekts von rAAV-SOX9 in PF127 auf die Knorpelreparatur vier Wochen postoperativ. Obere Reihe: rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe; links: HE-Färbung; rechts: Safranin-O-Färbung; Pfeile zeigen die Defektgrenzen; der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Tabelle 36: Effekt von PF127 mit rAAV-SOX9 auf die Knorpelreparatur im Bewertungssystem nach Sellers *et al.*

Kategorie	PF127 (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Defektfüllung	1,58 $\pm$ 0,15	1,48 $\pm$ 0,15	-0,10	0,63
Integration	1,71 $\pm$ 0,09	1,40 $\pm$ 0,09	-0,31	0,012*
Matrixfärbbarkeit	3,35 $\pm$ 0,09	3,52 $\pm$ 0,09	0,17	0,17
Zellmorphologie	4,88 $\pm$ 0,05	4,90 $\pm$ 0,05	0,02	0,75
Defektarchitektur	2,00 $\pm$ 0,13	1,27 $\pm$ 0,13	-0,73	<0,001*
Oberflächenarchitektur	0,65 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,11	0,12	0,43
Subchondraler Knochen	1,44 $\pm$ 0,15	1,58 $\pm$ 0,15	0,14	0,49
<i>Tidemark</i>	4,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	0,00	1,00
Gesamtpunktwert	19,60 $\pm$ 0,35	18,92 $\pm$ 0,35	-0,68	0,17

Die semiquantitative mikroskopische Auswertung erfolgte nach 4 Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; \* = Statistisch signifikant.

#### 6.4.2.2 Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie

Die semiquantitative Auswertung der Knorpelreparatur erfolgte wie weiter oben beschrieben. Anschließend folgte der Vergleich zwischen Kontrolle, rAAV-*lacZ* + Hydrogel PF127, und dem Therapeutikum rAAV-SOX9 zusammen mit Hydrogel PF127. Für die Kontrollgruppe zeigte die Analyse einen ähnlichen Gehalt an Typ-II-Kollagen wie in den Abschnitten 6.1.2.2 bzw. 6.2.2.2 dargestellt. Mit einem Mittelwert von 0,8 Punkten zeigte sich in Therapiegruppe eine stärkere Immunreaktivität als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 37: Effekt von PF127 mit rAAV-SOX9 auf den Typ-II-Kollagengehalt im Defekt

	PF127 (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
Farbintensität im Vergleich zu umliegenden Knorpelgewebe	0,5 $\pm$ 0,84	0,8 $\pm$ 0,41	0,3	0,317

Die semiquantitative Analyse wurde nach vier Wochen *in vivo* durchgeführt. SA = Standardabweichung.

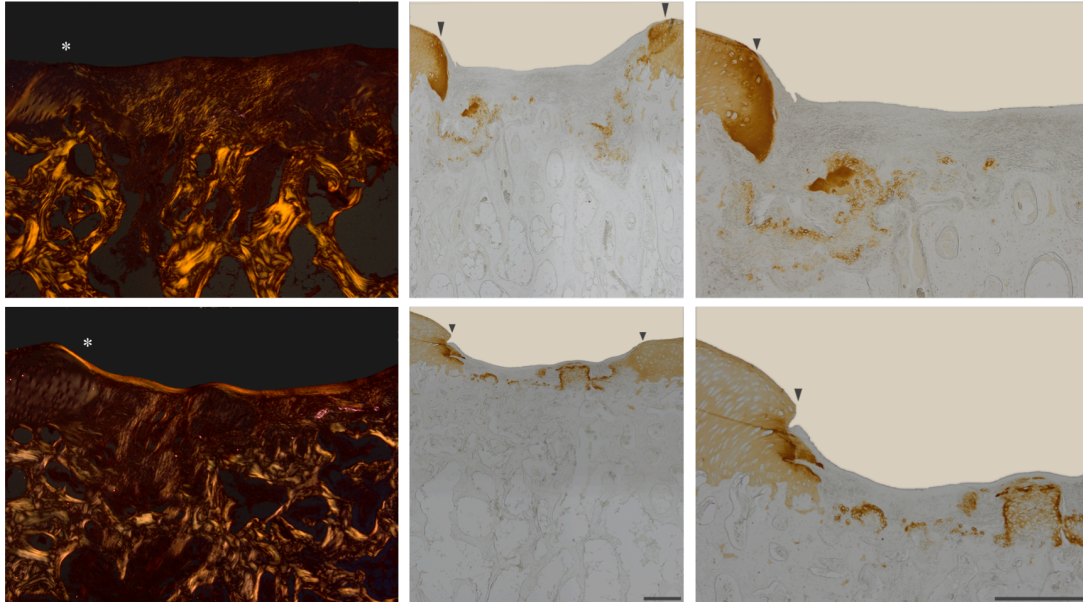


Abbildung 13: Darstellung des Gehalts an Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe nach vier Wochen *in vivo*. Obere Reihe: rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe; links: Polarisationsmikroskopie; rechts: Immunhistochemie; Pfeile zeigen den Defektbereich an; der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

#### 6.4.3 Semiquantitativ-mikroskopische Auswertung der Reparatur des subchondralen Knochens

Die Auswertung des Effekts von rAAV-SOX9 in PF127-Hydrogel erfolgte wie unter 5.5 beschrieben im Vergleich zum Effekt von rAAV-*lacZ* in PF127 (Kontrollgruppe).

##### 6.4.3.1 Effekt auf den subchondralen Knochen im Bereich des Defekts

In der subartikulären Spongiosa nahmen im Bereich des Defekts die Knochenmineraldichte (BMD), der Strukturmodellindex (SMI) und die Porosität (Po(tot)) im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Der Knochenvolumenanteil (BV/TV), die Trabekelanzahl (Tb.N), der trabekuläre Musterfaktor (Tb.Pf) und die fraktale Dimension (FD) waren größer als in der Kontrollgruppe. Ähnlich verhielt es sich mit

dem Trabekelabstand (Tb.Sp) und dem Grad der Anisotropie (DA). In der subchondralen Knochenplatte zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Knochenmineraldichte. Das Verhältnis aus Knochenoberfläche und Knochenvolumen (BS/BV) sowie das aus Knochenoberfläche und Gesamtvolumen (BS/TV) nahmen zu. Das Signifikanzniveau wurde jeweils nicht erreicht.

**Tabelle 38: Effekt von PF127 und rAAV-SOX9 auf die subartikuläre Spongiosa im Defektbereich**

Parameter	PF127 (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	886,97 $\pm$ 9,98	864,55 $\pm$ 33,55	-22,42	0,345
BV/TV (%)	41,61 $\pm$ 9,98	43,16 $\pm$ 8,37	1,546	0,753
BS/BV (1/mm)	27,98 $\pm$ 112,43	26,08 $\pm$ 3,31	-1,902	0,753
BS/TV (1/mm)	11,16 $\pm$ 1,15	11,07 $\pm$ 1,25	-0,098	0,917
Tb.Pf (1/mm)	-2,32 $\pm$ 2,16	-3,69 $\pm$ 3,89	-1,372	0,600
SMI	0,97 $\pm$ 0,16	0,55 $\pm$ 0,72	-0,418	0,463
Tb.Th (mm)	0,13 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,01	-0,001	0,917
Tb.N (1/mm)	3,17 $\pm$ 0,41	3,32 $\pm$ 0,56	0,152	0,463
Tb.Sp (mm)	0,22 $\pm$ 0,09	0,20 $\pm$ 0,04	-0,025	0,917
DA	0,44 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,03	-0,027	0,116
FD	2,46 $\pm$ 0,05	2,49 $\pm$ 0,04	0,024	0,463
Po(tot) (%)	58,39 $\pm$ 9,98	56,84 $\pm$ 8,37	-1,546	0,753

Die mikroskopische Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Tb.Pf = Trabekulärer Musterfaktor; SMI = Strukturmodellindex; Tb.Th = Trabekeldicke; Tb.N = Trabekelanzahl; Tb.Sp = Trabekelabstand; DA = Grad der Anisotropie; FD = Fraktale Dimension; Po(tot) = Gesamtporosität.

**Tabelle 39: Effekt von PF127 und rAAV-SOX9 auf die subchondrale Knochenplatte im Defektbereich**

Parameter	PF127 (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	674,62 $\pm$ 38,32	635,97 $\pm$ 17,82	-38,65	0,028*
BV/TV (%)	2,16 $\pm$ 1,67	1,00 $\pm$ 0,50	-42,26	0,463
BS/BV (1/mm)	0,61 $\pm$ 13,85	142,23 $\pm$ 15,56	100,62	0,249
BS/TV (1/mm)	0,03 $\pm$ 2,07	1,38 $\pm$ 0,66	0,78	0,600
Ct.Th (mm)	0,10 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,02	0,01	0,600
Po(tot) (%)	98,39 $\pm$ 1,67	99,00 $\pm$ 0,50	0,61	0,463

Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Ct.Th = Kortikalisdicke; Po(tot) = Gesamtporosität.



## 6.4.3.2 Effekt auf den angrenzenden subchondralen Knochen

Durch die Applikation von rAAV-SOX9 im Hydrogel PF127 zeigte sich in der angrenzenden Spongiosa nach vier Wochen *in vivo* eine numerische Zunahme der Knochenmineraldichte (BMD) und des Knochenvolumenanteils (BV/TV) gegenüber der Kontrollgruppe. Die Porosität (Po(tot)), der Strukturmodellindex (SMI) und das Verhältnis aus Knochenoberfläche und Knochenvolumen (BS/BV) bzw. Gesamtvolumen (BS/TV) nahmen ab. Genauso verhielt es sich mit dem trabekulären Musterfaktor (Tb.Pf), dem Grad der Anisotropie (DA) und der Trabekelanzahl (Tb.N). Die fraktale Dimension (FD) vergrößerte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auf die angrenzende subchondrale Knochenplatte übte rAAV-SOX9 in PF127 einen vergleichbaren Effekt aus: Die Knochenmineraldichte und der Knochenvolumenanteil waren größer, die Porosität, das Verhältnis aus Knochenoberfläche und Knochenvolumen sowie das Verhältnis der Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen waren kleiner als in der Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  wurde nicht erreicht.

Tabelle 40: Effekt von PF127 und AAV-SOX9 auf die angrenzende subartikuläre Spongiosa

Parameter	PF127 (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	871,28 $\pm$ 99,62	866,44 $\pm$ 26,77	-4,85	0,92
BV/TV (%)	43,26 $\pm$ 7,73	44,90 $\pm$ 5,90	1,65	0,75
BS/BV (1/mm)	30,56 $\pm$ 5,83	27,73 $\pm$ 2,36	-2,83	0,35
BS/TV (1/mm)	12,91 $\pm$ 1,45	12,36 $\pm$ 1,14	-0,55	0,25
Tb.Pf (1/mm)	-1,13 $\pm$ 2,30	-1,56 $\pm$ 2,09	-0,43	0,46
SMI	0,93 $\pm$ 0,45	0,68 $\pm$ 0,37	-0,25	0,08
Tb.Th (mm)	0,12 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01	0,00	0,60
Tb.N (1/mm)	3,74 $\pm$ 0,32	3,72 $\pm$ 0,38	-0,02	0,92
Tb.Sp (mm)	0,17 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,03	0,00	0,92
DA	0,47 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,04	0,00	0,92
FD	2,37 $\pm$ 0,06	2,40 $\pm$ 0,03	0,03	0,46
Po(tot) (%)	56,74 $\pm$ 7,73	55,10 $\pm$ 5,90	-1,65	0,75

Die mikroskopische Analyse wurde nach vier Wochen *in vivo* durchgeführt. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Tb.Pf = Trabekulärer Musterfaktor; SMI = Strukturmodellindex; Tb.Th = Trabekeldicke; Tb.N = Trabekelanzahl; Tb.Sp = Trabekelabstand; DA = Grad der Anisotropie; FD = Fraktale Dimension; Po(tot) = Gesamtporosität.

Tabelle 41: Effekt von PF127 und rAAV-SOX9 auf die angrenzende subchondrale Knochenplatte

Parameter	PF127 (Mittelwert $\pm$ SA)		Durchschnittsdifferenz	P-Wert
	<i>lacZ</i>	SOX9		
BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	802,52 $\pm$ 92,91	809,93 $\pm$ 28,71	7,40	0,92
BV/TV (%)	76,36 $\pm$ 12,02	76,83 $\pm$ 7,92	0,47	0,92
BS/BV (1/mm)	47,71 $\pm$ 10,53	43,10 $\pm$ 8,25	-4,63	0,35
BS/TV (1/mm)	35,68 $\pm$ 5,96	32,76 $\pm$ 5,40	-2,91	0,17
Ct.Th (mm)	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02	0,00	0,60
Po(tot) (%)	23,64 $\pm$ 12,02	23,17 $\pm$ 7,92	-0,47	0,92

Die mikroskopische Analyse erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SA = Standardabweichung; BMD = Knochenmineraldichte; BV/TV = Knochenvolumenanteil; BS/BV = Knochenoberfläche/Knochenvolumen; BS/TV = Knochenoberfläche/Gesamtvolumen; Ct.Th = Kortikalisdicke; Po(tot) = Gesamtporosität.

## 6.5 Vergleich der Effekte der therapeutischen Ansätze auf die osteochondrale Reparatur

Beim Vergleich der verschiedenen Therapieansätze rAAV-SOX9 alleine (1) rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat (2), PCL-Trägermedium und rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat (3), rAAV-SOX9 in PF127-Hydrogel (4) untereinander ließ sich makroskopisch kein Unterschied erkennen. Unter Anwendung des Oswestry-Arthoskopie-Bewertungssystems und des Punktesystems nach Goebel *et al.* (siehe Tabelle 6 bzw. Tabelle 7) zeigen die Daten keine signifikanten Abweichungen. Insgesamt war jedoch in allen Fällen ein besseres Reparaturgewebe in Defekten zu sehen, die rAAV-SOX9 und nicht rAAV-*lacZ* erhielten.

Während der histologischen Analysen mithilfe des modifizierten Bewertungssystems nach Sellers *et al.* bestätigte sich dieser Trend, wobei zwischen den einzelnen therapeutischen Ansätzen Unterschiede zu erkennen waren. Ein Vergleich der rAAV-*lacZ*-Negativkontrollgruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Integration des Defektgewebes in den angrenzenden, normalen Knorpel war stets gekennzeichnet durch verminderte Zellularität, tiefe Einschnitte oder Diskontinuitäten waren jedoch selten zu verzeichnen, wobei die Gruppen (1), (2) und (4) jeweils ein signifikant besser integriertes Reparaturgewebe als Gruppe (3) aufwiesen. Die Färbbarkeit der Matrix war in allen Fällen deutlich reduziert, zeigte sich in Gruppe (2) dabei signifikant stärker als in Gruppe (4). Auch in der Zellmorphologie war ein

signifikanter Unterschied erkennbar: In der Gruppe (2) waren die Zellen zu 50% rund und unterschieden sich somit signifikant von Gruppe (1) und (4) ( $P = 0,004$  bzw.  $<0,001$ ), wobei sich Gruppe (1) signifikant von Gruppe (3) unterschied ( $P <0,001$ ). Der Vergleich der Gruppen demonstrierte eine bessere Defektarchitektur in der mit PF127-rAAV-SOX9 behandelten Gruppe als in den anderen Gruppen. Ähnlich zeigten die Werte für den Erhalt des ursprünglichen subchondralen Knochens ein signifikant besseres Ergebnis durch Applikation von PF127 (4) im Vergleich zu Gruppe (2) ( $P <0,001$ ) und (3) ( $P = 0,008$ ). Die Architektur der Oberfläche stellte sich in Gruppe (3) am unregelmäßigsten dar, Gruppe (1) und Gruppe (2) waren jeweils signifikant besser ( $P <0,001$ ). Eine Regeneration der *Tidemark* war in keinem der Defekte nachzuweisen.

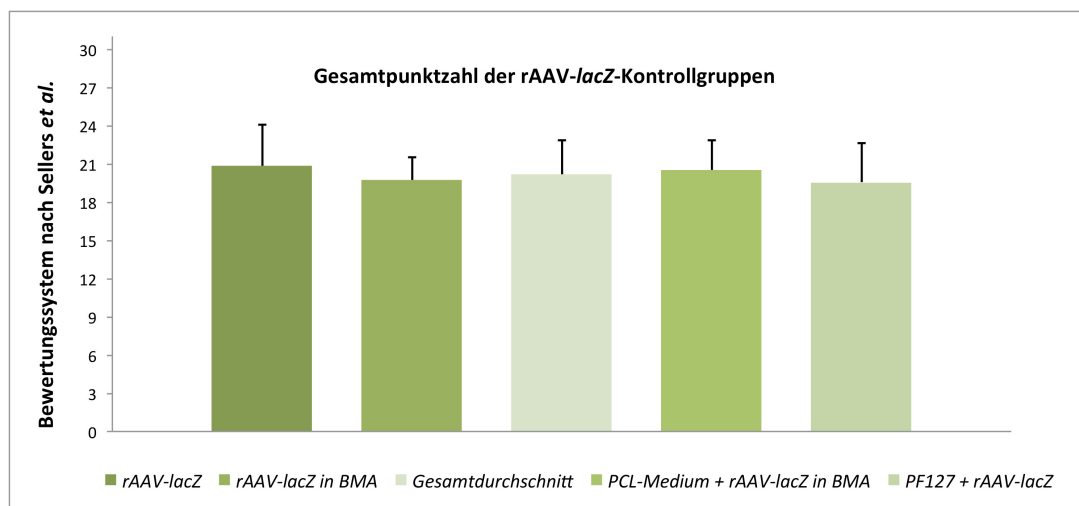


Abbildung 14: Gesamtpunktzahl im Bewertungssystem nach Sellers *et al.* der rAAV-lacZ-Kontrollgruppen im Vergleich.

Tabelle 42: Vergleich der Effekte der einzelnen therapeutischen Ansätze auf die chondrale Reparatur im Bewertungssystem nach Seller *et al.*

Kategorie	Mittelwert $\pm$ SA				<i>P</i>
	SOX9	SOX9 in BMA	PCL-Medium	PF127	
Defektfüllung	1,65 $\pm$ 0,73	1,34 $\pm$ 1,0	0,95 $\pm$ 0,78	1,65 $\pm$ 1,12	0,008
Integration	1,46 $\pm$ 0,62	1,25 $\pm$ 0,53	2,0 $\pm$ 0,79	1,35 $\pm$ 0,53	<0,001
Matrixfärbbarkeit	3,38 $\pm$ 0,07	3,13 $\pm$ 0,73	3,33 $\pm$ 0,83	3,48 $\pm$ 0,5	0,006
Zellmorphologie	4,40 $\pm$ 0,61	3,77 $\pm$ 1,06	4,2 $\pm$ 1,32	4,94 $\pm$ 0,24	<0,001
Defektarchitektur	2,13 $\pm$ 0,82	2,06 $\pm$ 0,73	2,3 $\pm$ 0,69	1,33 $\pm$ 0,52	<0,001
Oberflächenarchitektur	0,40 $\pm$ 0,64	0,44 $\pm$ 0,85	1,00 $\pm$ 0,75	0,71 $\pm$ 0,92	<0,001
Subchondraler Knochen	1,96 $\pm$ 0,85	2,25 $\pm$ 0,81	2,08 $\pm$ 0,92	1,52 $\pm$ 0,58	0,008
<i>Tidemark</i>	4,00 $\pm$ 0,0	4,00 $\pm$ 0,0	4,00 $\pm$ 0,0	4,00 $\pm$ 0,0	0,752
Gesamtpunktwert	19,35 $\pm$ 3,17	18,29 $\pm$ 2,67	19,8 $\pm$ 2,9	18,97 $\pm$ 1,55	<0,001

Kategorie	$P_1$	$P_2$	$P_3$	$P_4$	$P_5$	$P_6$
Defektfüllung	0,506	1	<0,001	0,65	0,098	0,005
Integration	0,29	0,81	0,01	0,766	<0,001	0,001
Matrixfärbbarkeit	0,327	0,383	0,99	0,035	0,636	0,734
Zellmorphologie	0,004	<0,002	0,824	<0,001	0,354	0,006
Defektarchitektur	0,979	<0,001	0,695	<0,001	0,399	<0,001
Oberflächenarchitektur	0,987	0,225	<0,001	0,319	<0,001	0,364
Subchondraler Knochen	0,319	0,22	0,927	<0,001	0,784	0,008
<i>Tidemark</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Gesamtpunktwert	0,291	0,882	0,901	0,418	0,065	0,382

Die semiquantitative mikroskopische Auswertung erfolgte nach vier Wochen *in vivo*. SD=Standardabweichung; Ein P-Wert  $\leq 0,05$  gilt als statistisch signifikant;  $P$  = Gesamt P-Wert;  $P_1$  = (1) vs. (2);  $P_2$  = (1) vs. (3);  $P_3$  = (1) vs. (4);  $P_4$  = (2) vs. (3);  $P_5$  = (2) vs. (4);  $P_6$  = (3) vs. (4).

Auch die immunhistochemische Abfärbung der Typ-II-Kollagenfasern innerhalb des Reparaturgewebes war in den einzelnen Gruppen jeweils stärker als in der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe. Zwischen den Gruppen jedoch ließ sich keine signifikante Abweichung nachweisen ( $P = 0,212$ ).

Im Vergleich der Effekte der therapeutischen Ansätze auf den subchondralen Knochen im Bereich des Defekts zeigte sich sowohl ein signifikant größerer Struktur Model Index ( $P = 0,035$ ) als auch ein höherer Trabekelmusterfaktor ( $P = 0,034$ ) in Gruppe (3) als in Gruppe (4). Im Bereich der subchondralen Knochenplatte war eine signifikant dickere Kortikalis in Gruppe (4) als in den übrigen Gruppe nachweisbar. In den übrigen Kategorien ließen sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

## 7 Diskussion

### 7.1 Übersicht

Die vorliegende Arbeit untersuchte, ob die frühe Reparatur fokaler vollschichtiger Knorpeldefekte in den Femurtrochleae von Göttinger Minipigs *in vivo* durch *in situ*-Applikation eines rAAV-basierenden Genvektors, der eine cDNS des humanen Transkriptionsfaktors SOX9 trägt, verbessert ist. Die erhobenen Daten zeigen, dass vier Wochen postoperativ (1) die alleinige Überexpression von rAAV-SOX9 die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe verbessert. Sie zeigen weiterhin, dass (2) Überexpression von rAAV-SOX9 in autologen Knochenmarkspirat die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe verbessert. Die Hypothese, dass (3) eine Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem soliden Biomaterial die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe verbessert, wurde verworfen. Schließlich demonstrieren die Daten, dass (4) die Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem thermosensitiven Hydrogel den singulären Parameter Defektarchitektur der Knorpelreparatur im Vergleich zur rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe verbessert. Zuletzt wurde die Hypothese widerlegt, dass (5) die Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem thermosensitiven Hydrogel allen anderen hier untersuchten Ansätzen hinsichtlich der Verbesserung der Knorpelreparatur überlegen ist.

### 7.2 Diskussion der experimentellen Vorgehensweise

#### 7.2.1 Studiendesign und Begründung der Stichprobenwahl

Für die vorliegende Arbeit evaluierten wir das osteochondrale Reparaturgewebe an 48 vollschichtigen chondralen Defekten (insgesamt 376 Schnitte) unter dem Effekt verschiedener o.g. Therapiestrategien. Der gewählte bilaterale Ansatz trägt im

Vergleich zu einem unilateralen Ansatz signifikant zur Reduktion der Anzahl benötigter Versuchstiere bei, ohne die Teststärke der Studienergebnisse negativ zu beeinflussen. Orth *et al.* demonstrierten, dass bei einem bilateralen Ansatz die Stichprobengröße ohne Veränderung der Standardabweichung und der Durchschnittsdifferenz reduziert werden kann (Orth *et al.*, 2013). Diese Tatsache ist insbesondere aus Sicht des Tierschutzes relevant.

### 7.2.2 Versuchstiere

Tierversuche sind ein etabliertes Verfahren im Rahmen präklinischer Studien. Generell werden in der Knorpelforschung Mäuse, Ratten (An & Friedman, 1999), Kaninchen (Boopalan *et al.*, 2011; Marquis *et al.*, 1994), Schafe (Bernstein *et al.*, 2013; Marquass *et al.*, 2010; Zscharnack *et al.*, 2010), Mini-Schweine (Jiang *et al.*, 2007) und Pferde (Goodrich *et al.*, 2007; Strauss, 2005) verwendet. Diese Studie wurde an zwölf ausgewachsenen, weiblichen Göttinger Minipigs, einer Kreuzung aus dem Minnesota Minipig, vietnamesischen Hängebauchschwein und der deutschen Landrasse, durchgeführt. Ihr hyaliner Knorpel weist Ähnlichkeiten zu dem des Menschen auf: Zum einen verlaufen die Kollagenfasern in beiden Spezies in vergleichbarer Anordnung (Käab *et al.*, 1998), zum anderen birgt er, genau wie der menschliche, nur ein geringes endogenes Reparaturpotential, wodurch unsere experimentellen Therapieansätze gültig beurteilt werden konnten. Zusätzlich haben laborchemische Parameter von Menschen und Miniaturschweinen weitgehend ähnliche Normwerte (Marshall *et al.*, 1972). Minipigs eignen sich daher gut als Versuchstiere in Studien zur Reparatur (osteo)chondraler Defekte (Christensen *et al.*, 2015; Gotterbarm *et al.*, 2003, 2006, 2008; Müller *et al.*, 2013). Zudem sind sie relativ einfach zu halten und im Vergleich zum Pferd als relativ kostengünstige Großtiermodelle anzusehen. Wir wählten adulte Versuchstiere, um die klinische Vergleichbarkeit der Defektreparatur zu gewährleisten.

### 7.2.3 Analyseverfahren der osteochondralen Reparatur

Sämtliche Analysemethoden zur Auswertung der osteochondralen Reparatur basieren auf standardisierten und validierten (semi-)quantitativen Bewertungsverfahren. Für die makroskopische Evaluation zogen wir die validierten Bewertungssysteme nach Goebel (Goebel *et al.*, 2012, 2017) und Oswestry heran (Smith *et al.*, 2005).

Die histologische Auswertung erfolgte anhand des validierten (Orth *et al.*, 2015; Orth & Madry, 2015) von Sellers und Kollegen 1997 beschriebenen Bewertungssystems (Sellers *et al.*, 1997). Im Vergleich zu den Bewertungssystemen nach Wakitani (Wakitani *et al.*, 1994) und Pineda (Pineda *et al.*, 1992) wird das Reparaturgewebe in mehreren Kategorien detailliert bewertet, sodass insgesamt eine Maximalpunktzahl von 31 erreicht werden kann. Mithilfe immunhistochemischer Färbemethoden wurde Typ-II-Kollagen dargestellt und die Farbintensität des Reparaturgewebes mit der des angrenzenden Knorpels verglichen; anschließend wurde semiquantitativ nach bewährter Methode ausgewertet (Orth *et al.*, 2011). Die Polarisationsmikroskopie visualisiert mittels eines zusätzlichen optischen Filters die Kollagenfibrillen. Auf diese Weise lässt sich deren Anordnung innerhalb der osteochondralen Einheit, insbesondere im Reparaturgewebe (Lee & Xia, 2013), darstellen.

Das  $\mu$ -CT stellt die optimale non-invasive Methode zur Analyse des subchondralen Knochens dar, die stark mit üblichen histomorphologischen Untersuchungen korreliert (Müller *et al.*, 1996). Sie erlaubt eine genaue Darstellung der Mikroarchitektur und der strukturellen Umbauvorgänge innerhalb der subchondralen Knochenplatte und der subartikulären Spongiosa (Bouxsein *et al.*, 2010).

## 7.3 Diskussion der untersuchten Therapieansätze

### 7.3.1 SOX9-beladene rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die alleinige Überexpression von rAAV-SOX9 die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe

verbessert. Bereits nach vier Wochen *in vivo* verzeichneten wir einen positiven Effekt auf die osteochondrale Reparatur.

Vektoren aus rekombinanten adeno-assoziierten Viren sind eine sehr sichere und effektive Transduktionsmethode (Cucchiarini, 2016). Da sie in Form von replikationsdefektiven Genkassetten zur Anwendung kommen, die in den Zielzellen außerhalb des Zellkerns als stabile Episomen vorliegen, bergen sie nur eine sehr geringe Mutagenität und können gleichzeitig lange exprimiert werden (Daya & Berns, 2008; Evans & Huard, 2015). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführte Studien belegen den erfolgreichen Einsatz von rAAV in der Knorpelforschung. Mittels rAAV überführten Pagnotto *et al.* grünes fluoreszierendes Protein [engl. *green fluorescent protein* (GFP)] in humane mesenchymale Stammzellen (Pagnotto *et al.*, 2007). Letztere exprimierten das fluoreszierende Protein und entwickelten sich zu chondrozytenähnlichen Zellen. Cucchiarini *et al.* transduzierten rAAV-Vektoren beladen mit einem FGF-2 in Chondrozyten und registrierten eine Expressionsrate des Transgens von 80% (Cucchiarini *et al.*, 2005; Madry *et al.*, 2003a). Die Transduktion von rekombinantem *lacZ*-Gen in humane Chondrozyten mittels rAAV-Vektoren führte dabei zu einer Transgenexpressionsdauer von 150 Tagen.

Bei der Chondrogenese spielen Wachstums- und Transkriptionsfaktoren eine wegweisende Rolle. Der Transkriptionsfaktor SOX9 gilt dabei als wichtigster Faktor. Er ist sowohl während der Embryogenese als auch postnatal im Rahmen der Knorpelhomöostase in Chondrozyten nachweisbar (Henry *et al.*, 2012) und stimuliert sowohl die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Chondrozyten als auch die Synthese matrixspezifischer Moleküle (Cao *et al.*, 2011; Lefebvre *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 1997; Tsuchiya *et al.*, 2003; Venkatesan *et al.*, 2012).

Cucchiarini *et al.* registrierten eine gesteigerte Synthese von Typ-II-Kollagen und Proteoglykanen nach Transduktion von SOX9 in Chondrozyten mittels rAAV *in vitro* im Vergleich zu Chondrozyten, die mit rAAV-*lacZ* transduziert wurden. Ein Unterschied in Zellzahl und Zelldichte wurde nicht registriert. (Cucchiarini *et al.*, 2007). Cucchiarini *et al.* applizierten den rAAV-Vektor anschließend direkt in osteochondrale Defekte von Kaninchen. Es zeigte sich eine hohe Transgenexpressionsrate sowie eine signifikant verbesserte Reparatur der osteochondralen Einheit. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spiegeln diese Erkenntnisse wider: Die Färbbarkeit von Typ-II-Kollagen nach vier Wochen *in vivo*



war signifikant besser in der Gruppe mit rAAV-SOX9 behandelten Defekten als in der Kontrollgruppe (Behandlung mit rAAV-*lacZ*). Insgesamt zeigte sich eine schwache Farbintensität sowohl in der SOX9-Gruppe als auch in der *lacZ*-Gruppe. Grund dafür ist der kurze Beobachtungszeitraum von vier Wochen *in vivo*. Die Gruppe um Cucchiarini zeigte 2013, dass nach 16 Wochen *in vivo* die immunhistochemische Anfärbung von Typ-II-Kollagen intensiver ist als nach 3 Wochen und somit, dass der Gehalt an Typ-II-Kollagen in der extrazellulären Matrix mit der Zeit *in vivo* zunimmt (Cucchiarini *et al.*, 2013). Weiter beschrieben Cucchiarini *et al.* (2013), die rAAV-SOX9 direkt in osteochondrale Defekte von Kaninchenknien injizierten und den Effekt auf die osteochondrale Reparatur nach 3 bzw. 16 Wochen *in vivo* analysierten, dass sich bereits makroskopisch ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte: Das Reparaturgewebe glich dem angrenzenden, normalen hyalinen Knorpel. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit unseren Daten, denn im Bewertungssystem nach Oswestry zur makroskopischen Analyse bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Kein Unterschied war hingegen in der Füllhöhe des Defekts zu erkennen. Das kann darauf zurückgeführt werden, dass SOX9 zwar die Synthese der Bestandteile der extrazellulären Matrix verbessert, aber nicht die Zellproliferation (Cucchiarini *et al.*, 2007).

Auch in der histologischen Auswertung zeigen die Ergebnisse den positiven Effekt von rAAV-SOX9 auf die osteochondrale Reparatur. Im Bewertungssystem nach Sellers unterscheiden sich speziell der Gesamtpunktwert und die Erhaltung des ursprünglichen subchondralen Knochens signifikant. Unsere Daten verhalten sich in Analogie zu denen von Cucchiarini *et al.* (2013), die sowohl insgesamt als auch speziell in der Kategorie „subchondraler Knochen“ (Sellers-Bewertungssystem) eine signifikant bessere Defektreparatur als in der Kontrollgruppe, die rAAV-*lacZ* erhielt, beschrieben. Ähnlich verhalten sich die Ergebnisse von Cao *et al.*, die Stammzellen aus dem Knochenmark von Kaninchen mit SOX9-beladenen rAAV-Vektoren transduzierten. Anschließend wurden jene zusammen mit einem Gerüst aus Polyglycolsäure (PGA) in vollschichtige Knorpeldefekte der Kaninchen eingefügt. Nach 12 Wochen *in vivo* registrierten Cao *et al.* eine verbesserte Knorpelreparatur in solchen Defekten, die zusätzlich zu einem PGA-Gerüst auch SOX9 erhielten (Cao *et al.*, 2011). Weil wir im Vergleich zur Arbeitsgruppe um Cao (2011) den Effekt von SOX9 auf die Knorpelreparatur ohne zusätzliches Gerüst untersuchten, kann auf eine positive Auswirkung allein von SOX9 geschlossen werden.

Da SOX9 als Transkriptionsfaktor seine Funktion innerhalb der Zellen ausübt, kommt es weniger zur unerwünschten Stimulation anderer Gewebe wie zum Beispiel des subchondralen Knochens. Hinzu kommt, dass SOX9 nicht nur in die Chondrogenese sondern auch in osteogenetische Prozesse regulierend eingreift. Durch Interaktion mit der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade wird die Differenzierung von Progenitorzellen zu Osteoblasten gehemmt (Akiyama *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2005; Venkatesan *et al.*, 2012). Cucchiari *et al.* (2013) registrierten eine verminderte Expression von  $\beta$ -Catenin in osteochondralen Defekten nach Überexpression von SOX9. Zudem hat SOX9 einen inhibierenden Effekt auf RUNX2, einen Transkriptionsfaktor der Osteogenese (Cao *et al.*, 2011; Cheng & Genever, 2010; Cucchiari *et al.*, 2013). Unsere Daten stehen in Einklang mit den o.g. Ergebnissen. Nach vier Wochen *in vivo* zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Rekonstruktion des subchondralen Knochens im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 7.3.2 Autologes Knochenmarkspirat

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine verbesserte Knorpelreparatur durch die zusätzliche Applikation von autologem Knochenmarkspirat in vollschichtige chondrale Defekte.

Knochenmarkspirat enthält pluripotente mesenchymale Stammzellen (MSZ), die sich unter Anwesenheit bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren zu Chondrozyten differenzieren (Holton *et al.*, 2016; Madry *et al.*, 2017; Pittenger *et al.*, 1999). Aufgrund des chondrogenen Potentials und der relativ einfachen Gewinnung eignen sie sich hervorragend als Zellspender für die (osteo-)chondrale Reparatur. Bereits 1993 beschrieben Shapiro und Kollegen das Einwandern von Zellen aus dem Knochenmark in chondrale Defekte und registrierten eine verbesserte Defektreparatur vollschichtiger Knorpeldefekte in Kaninchen (Shapiro *et al.*, 1993). In mehreren Tiermodellen zeigte sich seitdem eine signifikant bessere Knorpelreparatur nach Applikation von Knochenmarkspirat im Vergleich zu entsprechenden Kontrollgruppen ohne zusätzliches Knochenmarkspirat (Fortier *et al.*, 2010; Ivkovic *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2009; Wakitani *et al.*, 1994).

Des Weiteren konnten mesenchymale Stammzellen aus Knochenmarkaspirat erfolgreich mit Wachstumsfaktor bzw. Transkriptionsfaktor tragenden rAAV-Vektoren transduziert werden. Stender *et al.* (1997) zeigten, dass rAAV erfolgreich mesenchymale Stammzellen transduzieren können ohne deren chondrogenes Potential zu mindern (Stender *et al.*, 2007). Venkatesan *et al.* überführten rAAV-SOX9 in mesenchymale Stammzellen gewonnen aus humanem Knochenmarkaspirat und registrierten eine signifikant bessere Entwicklung zu Chondrozyten und ein signifikant größeres Vorhandensein von Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen, den wesentlichen Bestandteilen der extrazellulären Matrix des Gelenkknorpels (Venkatesan *et al.*, 2012).

Wir überprüften den Ansatz von Venkatesan *et al.* (2012) *in vivo* an vollschichtigen chondralen Defekten im Kniegelenk von Minipigs. Bereits nach vier Wochen *in vivo* besaß das Reparaturgewebe makroskopisch eine glattere Oberfläche als in der Kontrollgruppe, jedoch ohne Signifikanz. Nach der Applikation von Knochenmarkaspirat in vollschichtige Knorpeldefekte equiner Kniegelenke zusätzlich zur Mikrofrakturierung erzielten Fortier *et al.* (2010) ein vergleichbares Ergebnis. Das Reparaturgewebe war hyalinem Knorpel signifikant ähnlicher als das der Kontrollgruppe, die kein Knochenmarkaspirat erhielt. Allerdings evaluierten Fortier *et al.* den Prozess der osteochondralen Reparatur später, nach 12 und 24 Wochen *in vivo*.

Die histologische Untersuchung unserer Daten ergab eine signifikant bessere Oberflächenbeschaffenheit des Reparaturgewebes im Vergleich zu den Defekten der Kontrollgruppe (rAAV-*lacZ* und Knochenmarkaspirat). Die Daten zeigen Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wakitani *et al.* (1994), die Progenitorzellen aus Periost und Knochenmark isolierten und diese in einem Gel aus Typ-I-Kollagen verankerten. Mit diesem Transplantat füllten sie vollschichtige Defekte in Kaninchenkniegelenken. Ähnlich wie wir registrierte die Gruppe um Wakitani eine glatte Oberfläche des Defektareals, das nicht ganz das Niveau des umliegenden Knorpels erreichte. Die signifikant bessere Färbbarkeit der Matrix, die wir nach zusätzlicher Applikation des Aspirats feststellten, lässt sich zunächst darauf zurückführen, dass Progenitorzellen gut zu Chondrozyten in einer dem hyalinen Knorpel ähnlichen Umgebung differenzieren, die mit einer Matrix aus Typ-I-Kollagen nicht optimal bereitgestellt wird. Weiter ist sie Ergebnis der additiven Transduktion des Aspirats mit SOX9, dem Schlüsselfaktor der Chondrogenese. Im Gegensatz zu unserem Ergebnis konnten Ivkovic *et al.* (2010) einen signifikanten Unterschied

weder in der Oberflächenarchitektur noch in der Färbbarkeit der Matrix erkennen. Sie transduzierten Knochenmarkaspirat mit rAAV-TGF- $\beta$ , implantierten dieses in teilschichtige chondrale Defekte von Schafen und beurteilten die Knorpelreparatur nach sechs Wochen *in vivo*. Außerdem sahen wir einen signifikanten Unterschied in der Defektarchitektur und in der Zellmorphologie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jung *et al.* (2009) beschrieben ebenfalls runde Zellen mit der Morphologie von Chondrozyten nach einer Kombinationstherapie aus autologer Knorpelzelltransplantation (ACT) und Knochenmarkaspirat. Im Gegensatz zur alleinigen Therapie mit ACT zeigte sich eine signifikant bessere Defektreparatur durch zusätzliche Applikation des Aspirats. Der Gehalt an Typ-II-Kollagen war signifikant stärker als in der Kontrollgruppe. Die insgesamt reduzierte Färbung des Reparaturgewebes sowohl in der rAAV-SOX9-Aspirat-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe ist auf den kurzen Beobachtungszeitraum von vier Wochen *in vivo* zurückzuführen. Auch der Gesamtpunktwert im Bewertungssystem nach Sellers unterschied sich signifikant von dem der Kontrollgruppe, sodass von einer zusätzlichen positiven Wirkung des Aspirats auf die osteochondrale Reparatur ausgegangen werden kann. Diese Wirkung lässt sich darauf zurückführen, dass Knochenmarkaspirat immunmodulatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die Chondrogenese stimulieren, enthält, darunter TGF- $\beta$ , BMP, IL1, IL8, VEGF, PDGF, FGF und IGF-I (Holton *et al.*, 2016; Uccelli *et al.*, 2007).

Bezüglich der Regeneration des subchondralen Knochens bestand ähnlich wie in der Gruppe rAAV-SOX9 behandelte Defekte auch nach Applikation von rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Daten zeigen jedoch eine höhere Knochenmineraldichte sowohl in der subartikulären Spongiosa als auch in der subchondralen Knochenplatte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gao *et al.* demonstrierten, dass das zusätzliche Applizieren von Knochenmarkaspirat im Rahmen einer Mikrofrakturierungstherapie an Minipigs zu einer besseren Knochenmineraldichte und einem größeren Knochenvolumenanteil führt (Gao *et al.*, 2017).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass rAAV-SOX9 in Kombination mit autologem Knochenmarkaspirat in einer verbesserten osteochondralen Reparatur resultiert.

### 7.3.3 Solides Poly- $\epsilon$ -Caprolacton-(PCL-)Medium

Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass die Implantation eines soliden PCL-Trägermediums und die simultane Überexpression von rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat die Knorpelreparatur im Vergleich mit der rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe nicht verbessert. Poly- $\epsilon$ -Caprolacton (PCL) ist ein synthetisches, biokompatibles und biodegradibles Polyester, das aufgrund seiner chemischen Struktur leicht formbar ist (Moutos & Guilak, 2008). Moutos *et al.* entwickelten ein dreidimensionales Medium gewebt aus PCL-Fäden, der in seinen biomechanischen Eigenschaften denen des Gelenkknorpels ähnlich ist (Moutos & Guilak, 2010). Die Poren innerhalb des Trägermediums ermöglichen das Anlagern von Zellen. Anschließende histologische und immunhistochemische Untersuchungen des mit Progenitorzellen beladenen Trägermediums *in vitro* zeigten innerhalb der Poren sowie am Rande des Mediums Zellen, die phänotypisch fibrösem Knorpel entsprachen.

Bei der Analyse des Effekts von einem PCL- Trägermedium zusätzlich zu rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat zeigten die vorliegenden Daten vergleichbare Resultate: In den Poren fanden sich Zellen wieder, die ein spindelförmiges Aussehen hatten. Ähnlich wie bei Moutos (2010) war die Matrix mit Safranin-O nur schwach anzufärben, was auf eine geringe Proteoglykansynthese innerhalb des Trägermediums zurückzuführen ist. Brunger *et al.* dagegen berichteten von der Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten ähnlichen Zellen mit der Produktion einer adäquaten extrazellulären Matrix (Brunger *et al.*, 2014). Dabei verwendeten sie mit TGF- $\beta$  beladene Lentiviren und gebrauchten zusätzlich Poly-L-Lysin, um die Lentiviren im Trägermedium zu immobilisieren, was eine mögliche Erklärung für die bessere Chondrogenese liefert.

Christensen *et al.* implantierten ein PCL- Trägermedium in osteochondrale Defekte von Kaninchen und beobachteten eine annähernd komplette Defektfüllung mit Ausbildung eines hyalin-ähnlichen Gewebes (Christensen *et al.*, 2012). Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch imponierte die glatte Oberfläche und die Integrität des neu gebildeten Gewebes. Die vorliegenden Daten decken sich mit denen von Christensen *et al.* Im Bewertungssystem nach Goebel *et al.* war eine signifikant glattere Oberflächenstruktur gegenüber der mit rAAV-*lacZ* behandelten Kontrollgruppe zu erkennen. Auch im Oswestry-Bewertungssystem zeigte sich eine signifikant bessere chondrale Reparatur, besonders fiel eine bessere Integration des

Reparaturgewebes in den angrenzenden Knorpel auf. Die histologische Auswertung mithilfe des modifizierten Punktesystem nach Sellers *et al.* bestätigt die gute Integration des neuen Gewebes in den umliegenden Knorpel und zeigt, dass die Progenitorzellen des Knochenmarkaspirats mit dem soliden PCL-Medium eine Leitstruktur während der Differenzierung und Produktion der extrazellulären Matrix hatten. Die von Christensen *et al.* (2012) beschriebene gute Defektauffüllung konnten wir nicht bestätigen. Im Gegenteil sahen wir vereinzelt ein Absinken des Trägermediums in den subchondralen Knochen oder ein Herauslösen aus dem Defekt (betroffene Proben wurden in der Evaluation nicht berücksichtigt). Ein möglicher Weg diese Herausforderungen zu umgehen kann die kombinierte Anwendung aus einem soliden Trägermedium und einem Hydrogel darstellen.

Die immunhistochemische Darstellung von Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe bewies, dass Typ-II-Kollagen synthetisiert wurde, es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zur rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe. In Zusammenhang mit dem eher spindelförmigen Phänotyp und der geringen Safranin-O-Farbintensität lässt das auf ein fibrocartilaginöses Reparaturgewebe schließen. Die Daten der  $\mu$ -CT-Analyse bestätigen die wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors SOX9 in der Chondrogenese respektive die hemmende Wirkung auf die Osteogenese. Vier Wochen postoperativ zeigten sich durch die Implantation des PCL-Trägermediums und rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat bzw. rAAV-*lacZ* in Knochenmarkaspirat keine signifikanten Unterschiede im Effekt auf den subchondralen Knochen.

Insgesamt zeigte sich nach Abschluss des Beobachtungszeitraums keine signifikant verbesserte osteochondrale Reparatur durch die Implantation eines soliden PCL-Gerüsts und additiver Applikation von rAAV-SOX9 in Knochenmarkaspirat.

#### **7.3.4 Thermosensitives Hydrogel PF127**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen positiven Effekt auf die osteochondrale Reparatur durch die Verwendung von Pluronic® F-127 als Trägermedium für rAAV-SOX9. PF127, Pluronic® F-127 ist ein Kopolymer bestehend aus Ethylenoxid und Propylenoxid. Es gehört zur Gruppe der thermosensitiven Hydrogele: Bei 4°C liegt es als Flüssigkeit vor, bei Temperatursteigerung geht es in die

Gelform über. Aufgrund dieser Eigenschaft wird es in einem breiten Spektrum als Trägermaterial für Medikamente, Therapeutika oder Vektoren eingesetzt (Escobar-Chávez *et al.*, 2006). Diese Eigenschaft macht es auch zu einem vielversprechenden Trägermaterial in der Gewebezüchtung für Knorpel (Cao *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). *In vitro* Ergebnisse zeigen, dass PF127 als Trägermedium von Genvektoren Schutz vor eventuell vorhandenen Antikörpern gegen das Viruskapsid bietet und zu einer kontrollierten Freisetzung des Vektors und somit zu hohen Transgenexpressionsraten führt (Rey-Rico *et al.*, 2016a, b).

Díaz-Rodríguez *et al.* transduzierten humane mesenchymale Stammzellen unter Verwendung von PF127/Alginat als Trägermedium für rAAV-Vektoren ohne das chondrogene Potential der Zellen zu beeinträchtigen (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2015). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen decken sich mit den Ergebnissen von Díaz-Rodríguez (2015). Nach vier Wochen *in vivo* bildete sich ein Reparaturgewebe, das bereits makroskopisch auf die erfolgreiche Transduktion von rAAV-SOX9 schließen lässt. Die histologischen Untersuchungen an Safranin-O gefärbten Schnitten bestätigen das: Im Bewertungssystem nach Sellers *et al.* war eine signifikant bessere Defektarchitektur als in der *lacZ*-Gruppe zu erkennen. Auch Cao *et al.* beschrieben ähnliche Ergebnisse, nachdem autologe Chondrozyten aus ovinem elastischem Knorpel verkapselt in PF127 subkutan in Schweine implantiert wurden. Nach sechs Wochen *in vivo* war sowohl makroskopisch als auch histologisch Knorpel entstanden mit ovalen Chondrozyten, die eine adäquate Knorpelmatrix produzierten (Cao *et al.*, 1998). Des Weiteren zeigen unsere Daten eine signifikant bessere Integration des Ersatzgewebes in den angrenzenden Knorpel durch die Exposition gegenüber rAAV-SOX9 in PF127 als gegenüber rAAV-*lacZ* in PF127. Das lässt sich zum einen auf den Transkriptionsfaktor SOX9 als metabolischen Stimulus zurückführen. Zum anderen bietet PF127 Progenitorzellen ein gutes Gerüst zur Ausbildung einer neuen extrazellulären Matrix. Das legten auch Saim *et al.* dar, die Chondrozyten in PF127 verkapselten und diese anschließend subkutan in Schweine implantierten. Nach zehn Wochen *in vivo* hatte sich neuer Knorpel ektop gebildet (Saim *et al.*, 2000). Der Gesamtpunktwert im Bewertungssystem nach Sellers unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen den zwei Gruppen, ebenso wenig die Farbintensität des Reparaturgewebes nach immunhistochemischer Darstellung des Typ-II-Kollagens. Beides lässt sich in Zusammenhang mit dem Beobachtungszeitraum von vier Wochen *in vivo* setzen.

Innerhalb des subchondralen Knochens war sowohl in der subchondralen Knochenplatte als auch in der subartikulären Spongiosa kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe nachweisbar. Der Effekt von PF127 als Trägermedium für rAAV-SOX9 auf die Reparatur des subchondralen Knochens ist somit vergleichbar mit dem alleinigen Effekt von rAAV-SOX9, was mit dem bekannt geringen Effekt von SOX9 auf die Osteogenese begründet werden kann (Cao *et al.*, 2011; Cheng & Genever, 2010; Cucchiari *et al.*, 2013).

Die Daten bestätigen die Hypothese, dass PF127 zusammen mit der Applikation von rAAV-SOX9 zu einer verbesserten osteochondralen Reparatur führt und insbesondere die Architektur des Reparaturgewebes verbessert.

### 7.3.5 Vergleich der untersuchten Therapieansätze

Die Auswertung der einzelnen therapeutischen Ansätze, rAAV-SOX9 alleine (1) rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat (2), PCL-Trägermedium und rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat (3), rAAV-SOX9 in PF127-Hydrogel (4), auf die osteochondrale Reparatur zeigten jeweils einen besseren Effekt nach vier Wochen postoperativ als die jeweilige rAAV-*lacZ*-Kontrollgruppe. Die Daten zeigen interessanterweise keinen Unterschied der frühen Reparatur fokaler vollschichtiger Knorpeldefekte innerhalb aller Negativkontrollgruppen. Stammzellen gelangen durch die perforierte subchondrale Knochenplatte, entstanden durch die Mikrofrakturierung, in den Defekt und differenzieren dort im Knorpelmilieu zu Chondrozyten. Durch deren Chondrogenese entsteht ein fibrocartilaginöses Reparaturgewebe, das den Defekt auffüllt, unabhängig von den zusätzlich verwendeten Trägermaterialien. Unsere Daten zeigen, dass auch die zusätzliche Applikation von Knochenmarkspirat ohne therapeutischen Faktor keine Verbesserung der Defektreparatur erzielt. Dadurch war es möglich, den Effekt von rAAV-*lacZ* mit den Effekten von rAAV-SOX9, rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat, rAAV-SOX9 in einem PCL-Trägermedium und SOX9 in PF127-Hydrogel zu vergleichen.

Während der histologischen Analysen mithilfe des modifizierten Bewertungssystems nach Sellers *et al.* beobachteten wir die beste Defektfüllung in Gruppe (3). Grund dafür ist, dass ein solides Trägermedium an sich den Defekt füllt und die neugebildete



extrazelluläre Matrix sich am Gewebe des Mediums anlagern kann. Das trägt zum Erhalt der knorpelähnlichen Eigenschaften des Trägermediums bei (Moutos & Guilak, 2010). Dagegen zeigen die Daten eine jeweils signifikant bessere Integration des Defektgewebes in den angrenzenden, normalen Knorpel als in Gruppe (3), die aber immer durch verminderte Zellularität gekennzeichnet war. Moutos *et al.* (2010) beschrieben, dass sich die Fasern des dreidimensional gewebten PCL-Trägermediums unter Kompression gegeneinander verschieben können. Die Bewegung resultiert in einer Veränderung der internen Zugkräfte und folglich einer verminderten Integration in den angrenzenden Knorpel. Eine Kombination aus einem Hydrogel und einem soliden Trägermaterial könnte diese Entwicklung begrenzen. Die Anfärbbarkeit der Matrix war in allen Fällen deutlich reduziert, zeigte sich in Gruppe (2) dabei signifikant stärker als in Gruppe (4). Insgesamt spiegelt die reduzierte Farbtintensität den kurzen Beobachtungszeitraum von vier Wochen postoperativ wider, in dem die Proteoglykansynthese noch nicht weit fortgeschritten ist (Cucchiaroni *et al.*, 2013).

Weiterhin bestätigen die Daten den Effekt von SOX9 auf die Chondrogenese. Zellen, die in ihrer Morphologie hyalinen Knorpelzellen am ähnlichsten sind, fanden wir in der Gruppe (2) mit jeweils signifikantem Unterschied zu den übrigen Gruppen. Daran lässt sich der positive Effekt von zusätzlichem Knochenmarkspirat auf die chondrale Reparatur und dessen chondrogenes Potential erkennen (Madry *et al.*, 2017). Nach Applikation von PF127-Hydrogel (4) zeigte sich eine signifikant bessere Architektur des Defektgewebes als in den anderen Gruppen, worin sich die Ähnlichkeit des Hydrogels PF127 in Struktur und Eigenschaft zu hyalinem Knorpel zeigt (Ahmed, 2015). Die Daten zeigen weiterhin eine gute Defektarchitektur nach Applikation von Knochenmarkspirat (2). Bei gemeinsamer Betrachtung des positiven Effekts von PF127 und von Knochenmarkspirat auf die Defektarchitektur, Zellmorphologie und Matrixanfärbbarkeit kann eine Kombination beider Therapieansätze in der Zukunft eine interessante Methode sein. Die Architektur der Oberfläche zeigte in den Gruppen (1) und (2) jeweils einen signifikanten Unterschied zu Gruppe (3). Dies lässt sich mit der Verschieblichkeit der PCL-Fasern gegeneinander unter Kompression zum einen und der metabolischen Wirkung von SOX9 zum anderen begründen.

Der subchondrale Knochen im Bereich des Defekts wurde am besten durch Applikation von PF127 (4) erhalten. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied gegenüber rAAV-SOX9 alleine (1), jedoch gegenüber rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat (2) und dem soliden PCL-Medium, wodurch die effektive

Immobilisation des Genvektors im Hydrogel ersichtlich und der unerwünschte Effekt auf Nicht-Zielgewebe minimiert wird (Rey-Rico *et al.*, 2016a). Die in allen Gruppen geringe Intensität der Kollagen-II-Färbung mit jeweils intensiverer Färbung als in den *lacZ*-Kontrollgruppen zeigt, dass vier Wochen postoperativ die osteochondrale Reparatur mit der Matrixsynthese erst am Anfang steht.

Obwohl PF127 einen positiven Effekt auf die Defektarchitektur zeigt, ist in der Gesamtpunktzahl kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrollgruppe und zu den anderen Gruppen nachweisbar. Zunächst ist das auf den kurzen Beobachtungszeitraum von nur vier Wochen postoperativ zurückzuführen, in dem es noch nicht zu einer kompletten Defektreparatur kommen kann (Shapiro *et al.*, 1993). Des Weiteren ist die Funktion von PF127-Hydrogel als Trägermaterial zur kontrollierten Vektorfreisetzung von der Konzentration und der Art der Bindung zwischen Vektor und Trägermedium abhängig. Je besser die Bindung an das Trägermaterial, desto langfristiger die Freisetzung und desto geringer die Ausschöpfung des eigentlich vorhandenen chondrogenen Potentials des Systems. Rey-Rico *et al.* zeigten, dass PF127 während 21 Tagen *in vitro* bei einer Konzentration von 2% (v/v) zu einer Abnahme der Zellviabilität führte (Rey-Rico *et al.*, 2015b). Schließlich verwarfen wir die Hypothese (5), dass Überexpression von rAAV-SOX9 in Kombination mit einem thermosensitiven Hydrogel allen anderen untersuchten Ansätzen hinsichtlich der Verbesserung der Knorpelreparatur überlegen ist.

#### **7.4 Klinische Relevanz und Ausblick**

Die Behandlung fokaler chondraler Läsionen ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschungen. In der Knorpelforschung sind rAAV als effektive Gentransfervektoren etabliert. Sie werden zur Transduktion von Faktoren der Chondrogenese verwendet, sowohl direkt *in vivo* als auch *ex vivo* mit primärer Überführung in Stammzellen und anschließender Implantation in Knorpeldefekte.

Die Daten der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Regeneration hyalinen Knorpels hat. Dieser therapeutische Ansatz ist klinisch relevant, da

Gewinnung von Knochenmarkspirat, Transduktion des therapeutischen Faktors und Injektion in Knorpelläsionen einzeitig, beispielsweise während einer Arthroskopie durchführbar ist. Für die Zukunft erscheint es daher zielführend, weitere Studien im Großtiermodell mit einem längeren Beobachtungszeitraum durchzuführen, um das optimale Verhältnis aus Zellen und Vektoren für die Knorpelreparatur zu ermitteln. In einer klinischen Situation kommen zur Therapie fokaler Knorpeldefekte gegenwärtig die Mikrofrakturierung für kleinflächige und die autologe Knorpelzelltransplantation (ACT) für großflächige Defekte zum Einsatz. Bei beiden Techniken wird der Knorpel innerhalb der Läsion komplett bis zur subchondralen Knochenplatte abgetragen. Letztere wird bei der Mikrofrakturierung anschließend mithilfe von Ahlen perforiert, wodurch mesenchymale Stammzellen in den Defekt migrieren und dort ein Ersatzgewebe aus Faserknorpel erzeugen. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen eine signifikant bessere Zellmorphologie durch zusätzliche Applikation von Knochenmarkspirat im Vergleich zu alleiniger Therapie mit SOX9 respektive Kontrolle mit *lacZ*. Da Gao *et al.* darlegten, dass Mikrofrakturierung zunächst zu einer Knochenresorption führt und diese durch die zusätzliche Applikation von Knochenmarkspirat minimiert werden kann, könnte die Technik der Mikrofrakturierung durch zusätzlich appliziertes Knochenmarkspirat ergänzt werden (Gao *et al.*, 2017). Ebenso könnte Knochenmarkspirat in der Zukunft als mögliche Zellquelle fungieren. Obwohl diese Überlegung für die klinische Anwendung eine auch unter ökonomischen Aspekten optimierte Therapiemöglichkeit darstellt, müssen derartige Ansätze zunächst durch Studien mit hoher Evidenz belegt werden.

Eine Herausforderung bei der Konstruktion von rAAV-Vektoren ist ihre geringe Kapazität, die nur die Einschleusung von relativ kleinen Genen in Zielzellen ermöglicht. Des Weiteren verfügt ein Großteil der Bevölkerung über präformierte Antikörper gegen adeno-assoziierte Viren, welches zur Neutralisation der Genvektoren nach Applikation führen kann (Calcedo & Wilson, 2013). Diese Möglichkeit kann umgangen werden, indem die Vektoren in kompatible Trägermaterialien eingebracht werden. Hydrogele, darunter PF127, sind besonders gut als derartige Trägermedien geeignet, da sie sowohl die Emigration aus dem Defekt als auch die Neutralisation durch Antikörper verhindern (Rey-Rico *et al.*, 2015a). Mit nahezu identischen Gesamtpunktzahlen im semiquantitativen histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* in den Gruppen rAAV-SOX9 in PF127 und rAAV-SOX9 in Knochenmarkspirat zeigen die vorliegenden Daten, dass sowohl Knochenmarkspirat als auch PF127 die Knorpelreparatur positiv beeinflussen. Zuvor

durchgeführte *in vitro* Studien belegen die Verwendbarkeit von Hydrogelen als System zur Transduktion mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmarkaspirat (Rey-Rico *et al.*, 2015a, b). Jung *et al.* verwendeten PF127 als Träger für TGF- $\beta$ , um mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe zur Chondrogenese zu stimulieren. Die anschließende Implantation in chondrale Defekte zeigte eine verbesserte Knorpelreparatur (Jung *et al.*, 2010). Interessant wäre zukünftig eine Kombination der beiden Therapieansätze PF127 und Knochenmarkaspirat, um deren additiven Effekt auf die osteochondrale Reparatur zu evaluieren. Diese Kombination ist insbesondere klinisch von Interesse, da PF127 einerseits aufgrund seines temperaturabhängigen Übergangs von flüssig zu gelförmig zunächst gut als Lösung zu injizieren bzw. applizieren ist, um dann innerhalb des Gelenks in die Gelform überzugehen. Andererseits lässt sich autologes Knochenmarkaspirat relativ leicht gewinnen und ebenfalls injizieren. Auch im Hinblick auf arthroskopische Verfahren sind diese beiden therapeutischen Ansätze interessant, da sie jeweils keine Arthrotomie zu ihrer Applikation benötigen.

Zusammenfassend zeigen die Daten das vielversprechende Potential der rAAV-vermittelten Transduktion von SOX9 zur frühen Reparatur von Knorpeldefekten, unter anderem in der Kombination mit innovativen Trägermaterialien. Weiterführende Arbeiten werden überprüfen, ob die Kombination mehrerer therapeutischer Faktoren sinnvoll ist. In mehreren Studien konnte ein positiver Effekt durch die Kombination mehrerer Faktoren beobachtet werden. Ikeda *et al.* überführten SOX-Gene kodierend für SOX9, SOX5 und SOX6 in mesenchymale Stammzellen mittels adenoviraler Vektoren (Ikeda *et al.*, 2004). Nach drei Wochen *in vitro* zeigte sich eine hohe Rate an Aggrecanexpression und Typ-II-Kollagen-Synthese. Die Rate war am höchsten, wenn alle drei SOX-Gene transduziert wurden; ein SOX-Faktor alleine führte zu verminderter Matrixproduktion, *lacZ* führte zu stark verminderter Produktion. Tao *et al.* transduzierten mesenchymale Stammzellen mit rAAV-SOX9 und rAAV-TGF- $\beta$  (Tao *et al.*, 2016). Sie registrierten einen positiven Effekt auf die Chondrogenese vermittelt durch SOX9 und zusätzlich eine gesteigerte Zellzahl vermittelt durch TGF- $\beta$  ohne Hypertrophie des neuen Gewebes. Der Effekt eines kombinierten Gentransfers von mehreren Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, insbesondere eine Kombination aus SOX9 und TGF- $\beta$ , auf die (osteo-)chondrale Reparatur sollte weiter verfolgt und anhand translationaler Studien *in vivo* evaluiert werden. Zusätzlich sind weitere *in vivo* Studien mit anderen Konzentrationsverhältnissen des Hydrogels PF127 notwendig, um die Ähnlichkeit von PF127 mit normalem hyalinem Knorpel und gutem Potential als Trägermaterial

optimal ausnutzen zu können. Schließlich zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die Behandlung fokaler Knorpeldefekte nicht durch Gentherapie oder *Tissue Engineering* alleine, sondern wahrscheinlich durch die Kombination verschiedener Therapieansätze zu realisieren ist.

Für die Zukunft erscheint ein optimales klinisches Ergebnis nur unter Berücksichtigung der individuellen klinischen Situation und der Kombination etablierter klinischer Therapiestrategien mit derartigen experimentellen Ansätzen erreichbar.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ahmed, E. M. (2015).** Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* **6**, 105–21. Cairo University.
- Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J. M., Taketo, M. M., Nakamura, T. & other authors. (2004).** Interactions between Sox9 and  $\beta$ -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* **18**, 1072–1087. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- An, Y. H. & Friedman, R. J. (1999).** *Animal models in orthopaedic research.*
- Ashton, B. A., Allen, T. D., Howlett, C. R., Eaglesom, C. C., Hattori, A. & Owen, M. (1980).** Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* **151**, 294–307.
- Balakrishnan, B. & Banerjee, R. (2011, August 10).** Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chem Rev*.
- Barry, F. P. & Murphy, J. M. (2004).** Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 568–84.
- Batty, L., Dance, S., Bajaj, S. & Cole, B. J. (2011).** Autologous chondrocyte implantation: an overview of technique and outcomes. *ANZ J Surg* **81**, 18–25.
- Berns, K. I. & Linden, R. M. (1995).** The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* **17**, 237–45. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Bernstein, A., Niemeyer, P., Salzmann, G., Südkamp, N. P., Hube, R., Klehm, J., Menzel, M., Von Eisenhart-Rothe, R., Bohner, M. & other authors. (2013).** Microporous calcium phosphate ceramics as tissue engineering scaffolds for the repair of osteochondral defects: Histological results. *Acta Biomater* **9**, 7490–7505.
- Boopalan, P. R. J. V. C., Arumugam, S., Livingston, A., Mohanty, M. & Chittaranjan, S. (2011).** Pulsed electromagnetic field therapy results in healing of full thickness articular cartilage defect. *Int Orthop* **35**, 143–148. Springer.
- Bora, F. W. & Miller, G. (1987).** Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis. *Hand Clin* **3**, 325–36.
- van den Borne, M. P. J., Raijmakers, N. J. H., Vanlauwe, J., Victor, J., de Jong, S. N., Bellemans, J. & Saris, D. B. F. (2007).** International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthr Cartil* **15**, 1397–1402.
- Bouxein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J. & Müller, R. (2010).** Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* **25**, 1468–1486.
- Brittberg, M. (2010).** Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med* **38**, 1259–71. American Orthopaedic Society for Sports Medicine.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O. & Peterson, L. (1994).** Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N Engl J Med* **331**, 889–895.
- Broom, N. . D. & Poole, C. A. (1982).** A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition. *J Anat* **135**, 65–82. Wiley-Blackwell.
- Brunger, J. M., Huynh, N. P. T., Guenther, C. M., Perez-Pinera, P., Moutos, F. T., Sanchez-Adams, J., Gersbach, C. A. & Guilak, F. (2014).** Scaffold-mediated lentiviral transduction for functional tissue engineering of cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E798-806.

- Buckwalter, J. A. (1983).** Articular cartilage. *Instr Course Lect* **32**, 349–70.
- Buckwalter, J. A. & Mankin, H. J. (1998).** Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* **47**, 477–86.
- Buckwalter, J. A., Woo, S. L., Goldberg, V. M., Hadley, E. C., Booth, F., Oegema, T. R. & Eyre, D. R. (1993).** Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am* **75**, 1533–48.
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. & Grodzinsky, A. J. (2005).** Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect*.
- Calcedo, R. & Wilson, J. M. (2013).** Humoral Immune Response to AAV. *Front Immunol* **4**, 341.
- Cao, L., Yang, F., Liu, G., Yu, D., Li, H., Fan, Q., Gan, Y., Tang, T. & Dai, K. (2011).** The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **32**, 3910–20.
- Cao, Y., Rodriguez, A., Vacanti, M. A., Ibarra, C., Arevalo, C. & Vacanti, C. A. (1998).** Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed* **9**, 475–487.
- Caplan, A. I. (1991).** Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**, 641–50.
- Caplan, A. I. & Goldberg, V. M. (1999).** Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res* **S12-6**.
- Cheng, A. & Genever, P. G. (2010).** SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *J Bone Miner Res* **25**, 2680–9. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Christensen, B. B., Foldager, C. B., Møller Hansen, O., Albæk Kristiansen, A., Svend Le, D. Q., Nielsen, A. D., Nygaard, J. V., Bünger, C. E. & Lind, M. (2012).** A novel nano-structured porous polycaprolactone scaffold improves hyaline cartilage repair in a rabbit model compared to a collagen type I/III scaffold: In vitro and in vivo studies. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* **20**, 1192–1204.
- Christensen, B. B., Foldager, C. B., Olesen, M. L., Vingtoft, L., Rölfing, J. H. D., Ringgaard, S. & Lind, M. (2015).** Experimental articular cartilage repair in the Göttingen minipig: the influence of multiple defects per knee. *J Exp Orthop* **2**, 13. Journal of Experimental Orthopaedics.
- Conlon, T. J. & Flotte, T. R. (2004).** Recombinant adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* **4**, 1093–1101.
- Cucchiari, M. (2016).** Human gene therapy: novel approaches to improve the current gene delivery systems. *Discov Med* **21**, 495–506.
- Cucchiari, M. & Madry, H. (2014).** Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo. *Gene Ther* **21**, 811–9.
- Cucchiari, M., Madry, H., Ma, C., Thurn, T., Zurakowski, D., Menger, M. D., Kohn, D., Trippel, S. B. & Terwilliger, E. F. (2005).** Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther* **12**, 229–238.
- Cucchiari, M., Thurn, T., Weimer, A., Kohn, D., Terwilliger, E. F. & Madry, H. (2007).** Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis Rheum* **56**, 158–67.
- Cucchiari, M., Ekici, M., Schetting, S., Kohn, D. & Madry, H. (2011).** 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* **17**, 1921–33. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801

- USA.
- Cucchiarini, M., Orth, P. & Madry, H. (2013).** Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo. *J Mol Med* **91**, 625–636.
- Cucchiarini, M., Madry, H., Guilak, F., Saris, D. B., Stoddart, M. J., Koon Wong, M. & Roughley, P. (2014).** A vision on the future of articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* **27**, 12–6.
- Cucchiarini, M., McNulty, A. L., Mauck, R. L., Setton, L. A., Guilak, F. & Madry, H. (2016).** Advances in combining gene therapy with cell and tissue engineering-based approaches to enhance healing of the meniscus. *Osteoarthr Cartil* **24**, 1330–1339.
- Daya, S. & Berns, K. I. (2008).** Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* **21**, 583–93.
- Díaz-Rodríguez, P., Rey-Rico, A., Madry, H., Landin, M. & Cucchiarini, M. (2015).** Effective genetic modification and differentiation of hMSCs upon controlled release of rAAV vectors using alginate/poloxamer composite systems. *Int J Pharm* **496**, 614–26.
- Duncan, H., Jundt, J., Riddle, J. M., Pitchford, W. & Christopherson, T. (1987).** The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am* **69**, 1212–20.
- Elsler, S., Schetting, S., Schmitt, G., Kohn, D., Madry, H. & Cucchiarini, M. (2012).** Effective, safe nonviral gene transfer to preserve the chondrogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *J Gene Med* **14**, 501–11.
- Escobar-Chávez, J. J., López-Cervantes, M., Naik, A., Kalia, Y. N., Quintanar-Guerrero, D. & Ganem-Quintanar, A. (2006).** Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci* **9**, 339–358.
- Evans, C. H. & Huard, J. (2015).** Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol* **11**, 234–242.
- Evans, C. H., Robbins, P. D., Ghivizzani, S. C., Herndon, J. H., Kang, R., Bahnson, A. B., Barranger, J. A., Elders, E. M., Gay, S. & other authors. (1996).** Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritis cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* **7**, 1261–80. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA.
- Feldkamp, L. A., Goldstein, S. A., Parfitt, M. A., Jesion, G. & Kleerekoper, M. (1989).** The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* **4**, 3–11.
- Flotte, T. R., Afione, S. A. & Zeitlin, P. L. (1994).** Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**, 517–21. American Public Health Association.
- Fortier, L. A., Potter, H. G., Rickey, E. J., Schnabel, L. V., Foo, L. F., Chong, L. R., Stokol, T., Cheetham, J. & Nixon, A. J. (2010).** Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J Bone Joint Surg Am* **92**, 1927–37.
- De Franceschi, L., Grigolo, B., Roseti, L., Facchini, A., Fini, M., Giavaresi, G., Tschon, M. & Giardino, R. (2005).** Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A* **75**, 612–22.
- Franke, O., Durst, K., Maier, V., Göken, M., Birkholz, T., Schneider, H., Hennig, F. & Gelse, K. (2007).** Mechanical properties of hyaline and repair cartilage studied by nanoindentation. *Acta Biomater* **3**, 873–881.
- Frenz, D. A., Liu, W., Williams, J. D., Hatcher, V., Galinovic-Schwartz, V., Flanders,**



- K. C. & Van de Water, T. R. (1994).** Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Development* **120**, 415–24.
- Frisch, J., Venkatesan, J. K., Rey-Rico, A. & Madry, H. (2015a).** Current Progress in Stem Cell-Based Gene Therapy for Articular Cartilage Repair. *Curr Stem Cell Res Ther* **10**, 121–31.
- Frisch, J., Rey-rico, A., Venkatesan, J. K. & Schmitt, G. (2015b).** Chondrogenic Differentiation Processes in Human Bone Marrow Aspirates upon rAAV-Mediated Gene Transfer. *Tissue Eng Part A* **21**, 2460–2472.
- Frisch, J., Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Madry, H. & Cucchiari, M. (2016a).** TGF- $\beta$  gene transfer and overexpression via rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates. *J Cell Mol Med* **20**, 430–440.
- Frisch, J., Venkatesan, J. K., Rey-Rico, A., Zawada, A. M., Schmitt, G., Madry, H. & Cucchiari, M. (2016b).** Effects of rAAV-mediated FGF-2 gene transfer and overexpression upon the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates. *J Exp Orthop* **3**, 16. Journal of Experimental Orthopaedics.
- Furukawa, T., Eyre, D. R., Koide, S. & Glimcher, M. J. (1980).** Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* **62**, 79–89.
- Gao, L., Orth, P., Müller-Brandt, K., Goebel, L., Cucchiari, M. & Madry, H. (2017).** Early loss of subchondral bone following microfracture is counteracted by bone marrow aspirate in a translational model of osteochondral repair. *Sci Rep* **7**, 45189. Nature Publishing Group.
- Glass, K. A., Link, J. M., Brunger, J. M., Moutos, F. T., Gersbach, C. A. & Guilak, F. (2014).** Tissue-engineered cartilage with inducible and tunable immunomodulatory properties. *Biomaterials* **35**, 5921–5931. Elsevier Ltd.
- Godbey, W. T., Wu, K. K., Hirasaki, G. J. & Mikos, A. G. (1999).** Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene Ther* **6**, 1380–8.
- Goebel, L., Orth, P., Müller, A., Zurakowski, D., Bücken, A., Cucchiari, M., Pape, D. & Madry, H. (2012).** Experimental scoring systems for macroscopic articular cartilage repair correlate with the MOCART score assessed by a high-field MRI at 9.4 T - comparative evaluation of five macroscopic scoring systems in a large animal cartilage defect model. *Osteoarthr Cartil* **20**, 1046–1055.
- Goebel, L., Orth, P., Cucchiari, M., Pape, D. & Madry, H. (2017).** Macroscopic cartilage repair scoring of defect fill, integration and total points correlate with corresponding items in histological scoring systems - a study in adult sheep. *Osteoarthr Cartil* **25**, 581–588. Elsevier Ltd.
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. (2006).** The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **97**, 33–44.
- Goodrich, L. R., Hidaka, C., Robbins, P. D., Evans, C. H. & Nixon, A. J. (2007).** Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br* **89**, 672–685.
- Gotterbarm, T., Reitzel, T., Schneider, U., Voß, H. J., Stofft, E. & Breusch, S. J. (2003).** Einwachsverhalten von periostgedeckten knochendübeln mit und ohne autologe knorpelzellen: Eine tierexperimentelle untersuchung am Göttinger minipig. *Orthopade* **32**, 65–73. Springer-Verlag.
- Gotterbarm, T., Richter, W., Jung, M., Berardi Vilei, S., Mainil-Varlet, P., Yamashita, T. & Breusch, S. J. (2006).** An in vivo study of a growth-factor enhanced, cell free, two-layered collagen-tricalcium phosphate in deep osteochondral defects. *Biomaterials* **27**, 3387–3395.
- Gotterbarm, T., Breusch, S. J., Schneider, U. & Jung, M. (2008).** The minipig model

- for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Anim* **42**, 71–82.
- Hall, A. C., Horwitz, E. R. & Wilkins, R. J. (1996).** The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol* **81**, 535–545.
- Henry, S. P., Liang, S., Akdemir, K. C. & De Crombrughe, B. (2012).** The postnatal role of Sox9 in cartilage. *J Bone Miner Res* **27**, 2511–25. NIH Public Access.
- Hill, T. P., Später, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W. & Hartmann, C. (2005).** Canonical Wnt/??-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* **8**, 727–738.
- Hiraki, Y., Shukunami, C., Iyama, K. & Mizuta, H. (2001).** Differentiation of chondrogenic precursor cells during the regeneration of articular cartilage. *Osteoarthr Cartil* **9 Suppl A**, S102-8.
- Hjelle, K., Solheim, E., Strand, T., Muri, R. & Brittberg, M. (2002).** Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* **18**, 730–734.
- Holton, J., Imam, M., Ward, J. & Snow, M. (2016).** The Basic Science of Bone Marrow Aspirate Concentrate in Chondral Injuries. *Orthop Rev (Pavia)* **8**, 6659. PAGEPress.
- Huang, A. H., Farrell, M. J., Kim, M. & Mauck, R. L. (2010).** Long-term dynamic loading improves the mechanical properties of chondrogenic mesenchymal stem cell-laden hydrogel. *Eur Cell Mater* **19**, 72–85.
- Hudde, T., Rayner, S. A., Comer, R. M., Weber, M., Isaacs, J. D., Waldmann, H., Larkin, D. F. P. & George, A. J. T. (1999).** Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium. *Gene Ther* **6**, 939–43.
- Hunziker, E. B. (2002).** Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr Cartil* **10**, 432–463.
- Hunziker, E. B. & Rosenberg, L. C. (1996).** Repair of Partial-Thickness Defects in Articular Cartilage : Cell Recruitment from the Synovial Membrane \*. *J Bone Joint Surg Am* **78**, 721–733.
- Hunziker, E. B., Michel, M. & Studer, D. (1997).** Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. *Microsc Res Tech* **37**, 271–284.
- Hunziker, E. B., Kapfinger, E. & Geiss, J. (2007).** The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development. *Osteoarthr Cartil* **15**, 403–413.
- Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S. & Chung, U. (2004).** The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* **50**, 3561–73.
- Ivkovic, A., Pascher, A., Hudetz, D., Maticic, D., Jelic, M., Dickinson, S., Loparic, M., Haspl, M., Windhager, R. & Pecina, M. (2010).** Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. *Gene Ther* **17**, 779–89. Nature Publishing Group.
- Jackson, D. W., Lalor, P. A., Aberman, H. M. & Simon, T. M. (2001).** Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* **83-A**, 53–64.
- Jiang, C. C., Chiang, H., Liao, C. J., Lin, Y. J., Kuo, T. F., Shieh, C. S., Huang, Y. Y. & Tuan, R. S. (2007).** Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite. *J Orthop Res* **25**, 1277–1290. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Johnson, L. L. (1986).** Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* **2**, 54–69.

- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. & Yoo, J. U. (1998).** In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *ExpCell Res* **238**, 265–272.
- Johnstone, B., Alini, M., Cucchiari, M., Dodge, G. R., Eglin, D., Guilak, F., Madry, H., Mata, A., Mauck, R. L. & other authors. (2013).** Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater* **25**, 248–67.
- Jung, H. H., Park, K. & Han, D. K. (2010).** Preparation of TGF- $\beta$ 1-conjugated biodegradable pluronic F127 hydrogel and its application with adipose-derived stem cells. *J Control Release* **147**, 84–91. Elsevier B.V.
- Jung, M., Kaszap, B., Redöhl, A., Steck, E., Breusch, S. J., Richter, W. & Gotterbarm, T. (2009).** Enhanced early tissue regeneration after matrix-assisted autologous mesenchymal stem cell transplantation in full thickness chondral defects in a minipig model. *Cell Transplant* **18**, 923–32.
- Kääb, M. J., Gwynn, I. A. & Nötzli, H. P. (1998).** Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat* **193** ( Pt 1, 23–34. Wiley-Blackwell.
- Knutsen, G., Drogset, J. O., Engebretsen, L., Grontvedt, T., Ludvigsen, T. C., Loken, S., Solheim, E., Strand, T. & Johansen, O. (2016).** A Randomized Multicenter Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture: Long-Term Follow-up at 14 to 15 Years. *J Bone Jt Surg* **98**, 1332–1339.
- Kock, L., Van Donkelaar, C. C. & Ito, K. (2012).** Tissue engineering of functional articular cartilage: The current status. *Cell Tissue Res* **347**, 613–627.
- Kon, E., Filardo, G., Perdisa, F., Venieri, G. & Marcacci, M. (2014).** Clinical results of multilayered biomaterials for osteochondral regeneration. *J Exp Orthop* **1**, 10.
- Lee, J. H. & Xia, Y. (2013).** Quantitative zonal differentiation of articular cartilage by microscopic magnetic resonance imaging, polarized light microscopy, and Fourier-transform infrared imaging. *Microsc Res Tech* **76**, 625–632.
- Lefebvre, V., Behringer, R. R. & De Crombrughe, B. (2001).** L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthr Cartil* **9 Suppl A**, S69-75.
- Li, W.-J., Danielson, K. G., Alexander, P. G. & Tuan, R. S. (2003).** Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *J Biomed Mater Res A* **67**, 1105–14.
- Madry, H. & Cucchiari, M. (2016).** Gene therapy for human osteoarthritis: principles and clinical translation. *Expert Opin Biol Ther* **16**, 331–46.
- Madry, H., Cucchiari, M., Terwilliger, E. F. & Trippel, S. B. (2003a).** Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum Gene Ther* **14**, 393–402. Mary Ann Liebert, Inc.
- Madry, H., Cucchiari, M., Stein, U., Remberger, K., Menger, M. D., Kohn, D. & Trippel, S. B. (2003b).** 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* **5**, 502–9.
- Madry, H., van Dijk, C. N. & Mueller-Gerbl, M. (2010).** The basic science of the subchondral bone. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* **18**, 419–433.
- Madry, H., Orth, P. & Cucchiari, M. (2011).** Gene Therapy for Cartilage Repair. *Cartilage* **2**, 201–25. SAGE Publications.
- Madry, H., Kaul, G., Zurakowski, D., Vunjak-Novakovic, G. & Cucchiari, M. (2012).** Cartilage constructs engineered from chondrocytes overexpressing IGF-I improve the repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Eur Cells Mater* **25**, 229–247.
- Madry, H., Orth, P. & Cucchiari, M. (2016).** Role of the Subchondral Bone in Articular Cartilage Degeneration and Repair. *J Am Acad Orthop Surg* **24**, e45–e46.

- Madry, H., Gao, L., Eichler, H., Orth, P. & Cucchiari, M. (2017).** Bone Marrow Aspirate Concentrate-Enhanced Marrow Stimulation of Chondral Defects. *Stem Cells Int* **2017**, 1609685.
- Marquass, B., Somerson, J. S., Hepp, P., Aigner, T., Schwan, S., Bader, A., Josten, C., Zscharnack, M. & Schulz, R. M. (2010).** A novel MSC-seeded triphasic construct for the repair of osteochondral defects. *J Orthop Res* **28**, 1586–99. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Marquis, J. C., Langer, R., Gore, W. L. & Az, F. (1994).** Joint resurfacing using all0. *J Biomed Mater Res* **28**, 891–899.
- Marshall, M., Lydtin, H., Krawietz, W., Hagen, R., Schuckert, G., Hess, H. & Zöllner, N. (1972).** Das Miniaturschwein als Versuchstier in der experimentellen Medizin - Haltung, operative Präparationen, Versuchsdurchführung und Normalwerte. *Res Exp Med* **157**, 300–316.
- Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J. P. & Roughley, P. J. (2008).** Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 351–384.
- Menendez, M. I., Clark, D. J., Carlton, M., Flanigan, D. C., Jia, G., Sammet, S., Weisbrode, S. E., Knopp, M. V. & Bertone, A. L. (2011).** Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model. *Osteoarthr Cartil* **19**, 1066–1075.
- Moutos, F. T. & Guilak, F. (2008).** Composite scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biorheology* **45**, 501–12.
- Moutos, F. T. & Guilak, F. (2010).** Functional properties of cell-seeded three-dimensionally woven poly (ε-caprolactone) scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* **16**, 1291–1301.
- Moutos, F. T., Freed, L. E. & Guilak, F. (2007).** A biomimetic three-dimensional woven composite scaffold for functional tissue engineering of cartilage. *Nat Mater* **6**, 162–167.
- Moutos, F. T., Estes, B. T. & Guilak, F. (2010).** Multifunctional hybrid three-dimensionally woven scaffolds for cartilage tissue engineering. *Macromol Biosci* **10**, 1355–64.
- Müller, C., Marzahn, U., Kohl, B., El Sayed, K., Lohan, A., Meier, C., Ertel, W. & Schulze-Tanzil, G. (2013).** Hybrid pig versus Gottingen minipig-derived cartilage and chondrocytes show pig line-dependent differences. *Exp Biol Med (Maywood)* **238**, 1210–22.
- Müller, R., Hahn, M., Vogel, M., Delling, G. & Rügsegger, P. (1996).** Morphometric analysis of noninvasively assessed bone biopsies: Comparison of high-resolution computed tomography and histologic sections. *Bone* **18**, 215–220.
- Murakami, S., Kan, M., McKeenan, W. L. & De Crombrughe, B. (2000).** Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1113–8.
- Ng, L. J., Wheatley, S., Muscat, G. E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D. M., Tam, P. P., Cheah, K. S. & Koopman, P. (1997).** SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* **183**, 108–21.
- O'Driscoll, S. W. (1998).** The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **80**, 1795–812.
- Orth, P. & Madry, H. (2015, August).** Complex and elementary histological scoring systems for articular cartilage repair. *Histol Histopathol*.
- Orth, P. & Madry, H. (2016).** Knorpeldefekte. *Arthroscopie* **29**, 68–74.
- Orth, P., Weimer, A., Kaul, G., Kohn, D., Cucchiari, M. & Madry, H. (2008).** Analysis of novel nonviral gene transfer systems for gene delivery to cells of the musculoskeletal system. *Mol Biotechnol* **38**, 137–44.

- Orth, P., Kaul, G., Cucchiarini, M., Zurakowski, D., Menger, M. D., Kohn, D. & Madry, H. (2011).** Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* **19**, 2119–2130.
- Orth, P., Goebel, L., Wolfram, U., Ong, M. F., Gräber, S., Kohn, D., Cucchiarini, M., Ignatius, A., Pape, D. & Madry, H. (2012).** Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone: analysis in a large animal model at 6 months. *Am J Sports Med* **40**, 828–36.
- Orth, P., Zurakowski, D., Alini, M., Cucchiarini, M. & Madry, H. (2013).** Reduction of sample size requirements by bilateral versus unilateral research designs in animal models for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* **19**, 885–91.
- Orth, P., Cucchiarini, M., Wagenpfeil, S., Menger, M. D. & Madry, H. (2014a).** PTH [1-34]-induced alterations of the subchondral bone provoke early osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* **22**, 813–21.
- Orth, P., Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Madry, H. & Cucchiarini, M. (2014b, January).** Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning Adv Appl*.
- Orth, P., Peifer, C., Goebel, L., Cucchiarini, M. & Madry, H. (2015).** Comprehensive analysis of translational osteochondral repair: Focus on the histological assessment. *Prog Histochem Cytochem* **50**, 19–36. Elsevier GmbH.
- van Osch, G. J. V. M., Brittberg, M., Dennis, J. E., Bastiaansen-Jenniskens, Y. M., Erben, R. G., Konttinen, Y. T. & Luyten, F. P. (2009).** Cartilage repair: past and future--lessons for regenerative medicine. *J Cell Mol Med* **13**, 792–810.
- Pagnotto, M. R., Wang, Z., Karpie, J. C., Ferretti, M., Xiao, X. & Chu, C. R. (2007).** Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* **14**, 804–13.
- Pape, D., Filardo, G., Kon, E., van Dijk, C. N. & Madry, H. (2010).** Disease-specific clinical problems associated with the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **18**, 448–62. Springer-Verlag.
- Park, K. M., Lee, S. Y., Joung, Y. K., Na, J. S., Lee, M. C. & Park, K. D. (2009).** Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomater* **5**, 1956–65. Acta Materialia Inc.
- Pineda, S., Pollack, A., Stevenson, S., Goldberg, V. & Caplan, A. (1992).** A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Cells Tissues Organs* **143**, 335–340.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. & Marshak, D. R. (1999).** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–7.
- Pridie, K. H. (1959).** A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Jt Surg Br* **41-B**, 618–619.
- Prockop, D. J. (2009).** Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* **17**, 939–46. Nature Publishing Group.
- Ravi Kumar, M., Hellermann, G., Lockey, R. F. & Mohapatra, S. S. (2004).** Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art. *Expert Opin Biol Ther* **4**, 1213–24.
- Redman, S. N., Oldfield, S. F. & Archer, C. W. (2005).** Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* **9**, 23-32-32.
- Rey-Rico, A. & Cucchiarini, M. (2016a).** Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery. *Acta Biomater*. Acta Materialia Inc.
- Rey-Rico, A. & Cucchiarini, M. (2016b).** Recent tissue engineering-based advances

- for effective rAAV-mediated gene transfer in the musculoskeletal system. *Bioengineered* **5979**, 175–88.
- Rey-Rico, A., Silva, M., Couceiro, J., Concheiro, A. & Alvarez-Lorenzo, C. (2011).** Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2. *Eur Cells Mater* **21**, 317–340.
- Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Frisch, J., Schmitt, G., Monge-Marcet, A., Lopez-Chicon, P., Mata, A., Semino, C., Madry, H. & Cucchiari, M. (2015a).** Effective and durable genetic modification of human mesenchymal stem cells via controlled release of rAAV vectors from self-assembling peptide hydrogels with a maintained differentiation potency. *Acta Biomater* **18**, 118–127. Acta Materialia Inc.
- Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Frisch, J., Rial-Hermida, I., Schmitt, G., Concheiro, A., Madry, H., Alvarez-Lorenzo, C. & Cucchiari, M. (2015b).** PEO-PPO-PEO micelles as effective rAAV-mediated gene delivery systems to target human mesenchymal stem cells without altering their differentiation potency. *Acta Biomater* **27**, 42–52. Acta Materialia Inc.
- Rey-Rico, A., Madry, H. & Cucchiari, M. (2016a).** Hydrogel-Based Controlled Delivery Systems for Articular Cartilage Repair. *Biomed Res Int* **2016**, 1–12. Hindawi Publishing Corporation.
- Rey-Rico, A., Frisch, J., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Rial-Hermida, I., Taboada, P., Concheiro, A., Madry, H., Alvarez-Lorenzo, C. & Cucchiari, M. (2016b).** 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* **8**, 20600–13.
- Safran, M. R., Kim, H. & Zaffagnini, S. (2008).** The use of scaffolds in the management of articular cartilage injury. *J Am Acad Orthop Surg* **16**, 306–11.
- Saim, A. B., Cao, Y., Weng, Y., Chang, C.-N., Vacanti, M. A., Vacanti, C. A. & Eavey, R. D. (2000).** Engineering Autogenous Cartilage in the Shape of a Helix Using an Injectable Hydrogel Scaffold. *Laryngoscope* **110**, 1694–1697.
- Sellers, R. S., Peluso, D. & Morris, A. A. (1997).** The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **79**, 1452–63.
- Shapiro, F., Koide, S. & Glimcher, M. J. (1993).** Cell origin and differentiation in the repair of full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg* **75A**, 532–553.
- Shi, J., Zhang, X., Zeng, X., Zhu, J., Pi, Y., Zhou, C. & Ao, Y. (2012).** One-step articular cartilage repair: combination of in situ bone marrow stem cells with cell-free poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffold in a rabbit model. *Orthopedics* **35**, e665-71.
- Smith, G. D., Taylor, J., Almqvist, K. F., Erggelet, C., Knutsen, G., Garcia Portabella, M., Smith, T. & Richardson, J. B. (2005).** Arthroscopic assessment of cartilage repair: a validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy* **21**, 1462–7.
- Soltz, M. A. & Ateshian, G. A. (2000).** A Conewise Linear Elasticity mixture model for the analysis of tension-compression nonlinearity in articular cartilage. *J Biomech Eng* **122**, 576–586.
- Stedman, J. R., Rodkey, W. G. & Rodrigo, J. J. (2001).** Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res* **S362-9**.
- Steinert, A. F., Ghivizzani, S. C., Rethwilm, A., Tuan, R. S., Evans, C. H. & Nöth, U. (2007).** Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* **9**, 213.
- Stender, S., Murphy, M., O'Brien, T., Stengaard, C., Ulrich-Vinther, M., Søballe, K. & Barry, F. (2007).** Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* **13**, 93–99; discussion 99.
- Strauss, E. J. (2005).** Biochemical and Biomechanical Properties of Lesion and

- Adjacent Articular Cartilage After Chondral Defect Repair in an Equine Model. *Am J Sports Med* **33**, 1647–1653.
- Tao, K., Frisch, J., Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K., Schmitt, G., Madry, H., Lin, J. & Cucchiarini, M. (2016).** Co-overexpression of TGF- $\beta$  and SOX9 via rAAV gene transfer modulates the metabolic and chondrogenic activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* **7**, 20. Stem Cell Research & Therapy.
- Trippel, S. B. (1997).** Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect* **46**, 473–6.
- Tsuchiya, H., Kitoh, H., Sugiura, F. & Ishiguro, N. (2003).** Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 338–43.
- Uccelli, A., Pistoia, V. & Moretta, L. (2007).** Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* **28**, 219–26.
- Venkatesan, J. K., Ekici, M., Madry, H., Schmitt, G., Kohn, D. & Cucchiarini, M. (2012).** 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* **3**, 22. BioMed Central Ltd.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I. & Goldberg, V. M. (1994).** Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **76**, 579–92.
- Wang, C. & Pham, P.-T. (2008).** Polymers for viral gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **5**, 385–401.
- Wang, Q. G., Hughes, N., Cartmell, S. H. & Kuiper, N. J. (2010).** The composition of hydrogels for cartilage tissue engineering can influence glycosaminoglycan profile. *Eur Cell Mater* **19**, 86–95.
- Widuchowski, W., Widuchowski, J. & Trzaska, T. (2007).** Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee* **14**, 177–82.
- Zeng, Y.-F., Tseng, S.-J., Kempson, I. M., Peng, S.-F., Wu, W.-T. & Liu, J.-R. (2012).** Controlled delivery of recombinant adeno-associated virus serotype 2 using pH-sensitive poly(ethylene glycol)-poly-L-histidine hydrogels. *Biomaterials* **33**, 9239–45. Elsevier Ltd.
- Zhu, J. & Marchant, R. E. (2011).** Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* **8**, 607–26.
- Zscharnack, M., Hepp, P., Richter, R., Aigner, T., Schulz, R., Somerson, J., Josten, C., Bader, A. & Marquass, B. (2010).** Repair of Chronic Osteochondral Defects Using Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells in an Ovine Model. *Am J Sports Med* **38**, 1857–1869. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA.

## 9 Publikationen

**Liang Gao, Patrick Orth, Kathrin Müller-Brandt, Lars Goebel, Magali Cucchiarini, Henning Madry (2017).** Early loss of subchondral bone following microfracture is counteracted by bone marrow aspirate in a translational model of osteochondral repair. *Scientific Reports*, 7, 45189.



## 10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Madry gilt mein aufrichtiger Dank für die freundliche Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie für die geduldige Betreuung, die von wertvollen Anregungen und ständiger Ansprechbarkeit geprägt waren und mir bei der Bearbeitung des Stoffes eine große Hilfe waren.

Allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Gertrud Schmitt, danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die dauernde Hilfsbereitschaft und die anregenden Gespräche.

Besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. rer. nat. M. Cucchiarini, PD Dr. med. Patrick Orth und Dr. med. Lars Goebel bedanken, die für alle Fragen immer ein offenes Ohr hatten.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Eltern, die mich in jeder Phase der Arbeit unterstützt, sich stets nach dem Fortschritt der Arbeit erkundigt und mir die Promotion erst ermöglicht haben.