

Aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung

Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. H. Madry

**Gentransfer von humanem
Transkriptionsfaktor Sox9 mittels
rekombinanter adeno-assoziiertes viraler
Vektoren verbessert die Reparatur von
osteocondralen Defekten im Großtiermodell**

**Dissertation zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Medizin**
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Cliff Lange

geboren am: 30. Mai 1988 in Borna

Tag der Promotion: 23.09.2020
Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. med. Henning Madry
Prof. Dr. med. Matthias Werner Laschke

Inhaltsverzeichnis

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	3
2.	EINLEITUNG	4
2.1	Problematik und Überblick	4
2.2	Biologie des hyalinen Gelenkknorpels	5
2.3	Aufbau der osteochondralen Einheit	5
2.4	Einteilung und Reparatur von fokalen Gelenkknorpeldefekten	7
2.5	Operative Therapie bei fokalen Gelenkknorpeldefekten	8
2.6	Experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten	9
2.6.1	Therapeutische Faktoren	10
2.6.2	Gentransfervektoren	11
2.6.3	Gentransferstrategie	13
2.6.4	Konzept der vorliegenden Arbeit	14
3.	FRAGESTELLUNGEN	15
4.	MATERIAL	16
4.1	Lösungen, Puffer und Medien	16
4.2	Chemikalien	18
4.3	Biologische Materialien	19
4.3.1	Versuchstiere	19
4.3.2	Antikörper und Enzyme	19
4.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
4.4.1	Laborgeräte	20
4.4.2	Verbrauchsmaterialien	21
4.4.3	Computerprogramme	21

4.4.4	Operationsinstrumentarium und-materialien	21
5.	METHODEN	22
5.1	Überblick	22
5.2	Herstellung der rAAV-Vektoren	22
5.3	Großtiermodell	23
5.4	Makroskopische Auswertung des Reparaturgewebes	24
5.4.1	Makroskopisches Bewertungssystem	24
5.4.2	Oswestry-Bewertungssystem	25
5.5	Micro-CT Analyse	26
5.5.1	Micro-CT Darstellung	26
5.5.2	Definition der „ <i>volumes of interest</i> “ (VOI)	27
5.5.3	Micro-CT Parameter	28
5.5.4	Strukturelle Veränderungen des subchondralen Knochens	29
5.6	Makroskopische Auswertung des angrenzenden Knorpels	30
5.7	Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes	31
5.7.1	Papain-Verdau	31
5.7.2	DNS-Bestimmung (Hoechst-33258-Test)	32
5.7.3	Proteoglykan-Bestimmung (DMMB-Test)	32
5.7.4	Protein-Bestimmung (<i>bicinchoninic acid Test</i> ; BCA-Test)	33
5.8	Histologische Auswertung des Reparaturgewebes	34
5.8.1	Herstellung der histologischen Präparate	34
5.8.2	Angewandte Färbemethoden	34
5.8.3	Bewertungssystem nach Sellers	36
5.8.4	Bewertungssystem nach Wakitani	38
5.8.5	Bewertungssystem nach Little	38
5.9	Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I- und Typ-II-Kollagen	40
5.9.1	Färbemethodik	40
5.9.2	Bewertungssystem	41
5.10	Statistische Auswertung	42

6.	ERGEBNISSE	43
6.1	Reparatur des Gelenkknorpels	43
6.1.1	Makroskopische Auswertung des Reparaturgewebes	43
6.1.2	Histologische Auswertung des Reparaturgewebes	46
6.1.3	Immunhistochemische Auswertung des Reparaturgewebes	50
6.1.4	Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes	51
6.2	Reparatur des subchondralen Knochens	54
6.2.1	Mikro-CT Parameter im Defektareal	54
6.2.2	Veränderungen des angrenzenden subchondralen Knochens	55
6.2.3	Vergleich der Mikro-CT Parameter im Defektareal mit Angrenzend	56
6.2.4	Strukturelle Veränderungen des subchondralen Knochens	58
6.3	Degenerative Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels	59
6.3.1	Makroskopische Evaluation degenerativer Veränderungen	59
6.3.2	Histologische Beurteilung des angrenzenden Gelenkknorpels	60
7.	DISKUSSION	63
7.1	Reparatur des Gelenkknorpels	63
7.1.1	Makroskopische Auswertung des Reparaturgewebes	63
7.1.2	Histologische Auswertung des Reparaturgewebes	64
7.1.3	Immunhistochemische Auswertung des Reparaturgewebes	66
7.1.4	Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes	69
7.2	Reparatur des subchondralen Knochens	70
7.2.1	Rekonstruktion des subchondralen Knochens	70
7.2.2	Strukturelle Veränderungen des subchondralen Knochens	71
7.3	Degenerative Veränderungen des angrenzenden Knorpels	73
7.4	Methodische Diskussion der vorliegenden Studie	74
7.4.1	rAAV-basierte Gentransferstrategie	74
7.4.2	Großtiermodell	75
7.4.3	Bewertungsmethodik der osteochondralen Knorpelreparatur	75
7.5	Translational-klinischer Ausblick	76
8.	LITERATURVERZEICHNIS	78

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
®	Registered
°C	Grad Celsius
AAV	Adeno-assoziiertes-Virus
Aqua bidest.	destilliertes Wasser
BMD	Knochenmineraldichte (<i>bone mineral density</i>)
BMI	Körpermasseindex
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein (<i>Bone morphogenetic protein</i>)
BS/BV	Knochenoberfläche/Volumen (<i>bone surface/volume</i>)
BS/TV	Knochenoberflächendichte (<i>bone surface density</i>)
BV/TV	Knochenvolumenanteil (<i>bone volume fraction</i>)
bzw.	beziehungsweise
CMV	Cytomegalievirus
Ct.Th.	kortikale Dicke (<i>cortical thickness</i>)
DA	Grad der Anisotropie (<i>degree of anisotropy</i>)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	Komplementäre DNS
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	et aliae/et alii
FD	Fraktale Dimension (<i>fractal dimension</i>)
FLAG	Aminosäuresequenz des Anti-FLAG-Antikörpers
g	Gramm
IgG	Immunglobulin G
ITR	Inverted Terminal Repeats
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen
μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter
M	Mol
max.	maximal
mg	Milligramm

Mikro-CT	Mikrofokus-Computertomographie
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
n.e.	nicht erhoben
ng	Nanogramm
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
rAAV	Rekombinanter adeno-assoziiertes viraler Vektor
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	Region von Interesse (<i>region of interest</i>)
s	Sekunde
SA	Standardabweichung
Score	Bewertungssystem
SE	Standardfehler (<i>Standard error of mean</i>)
SKA	Subchondrale Knochenplatte angrenzend
SKD	Subchondrale Knochenplatte Defekt
SKL	Subchondrale Knochenplatte lateral
SKM	Subchondrale Knochenplatte medial
SMI	Struktur-Model-Index (<i>structure model index</i>)
Sox	<i>Sry</i> -related High Mobility Group Box-containing gene
SSA	Subartikuläre Spongiosa angrenzend
SSD	Subartikuläre Spongiosa Defekt
SSL	Subartikuläre Spongiosa lateral
SSM	Subartikuläre Spongiosa medial
Std.	Stunde
Tb.N.	Trabekelanzahl (<i>trabecular number</i>)
Tb.Pf.	trabekulärer Knochen-Anordnungsfaktor (<i>trabecular pattern factor</i>)
Tb.Sp.	Trabekelabstand (<i>trabecular separation</i>)
Tb.Th.	Trabekeldicke (<i>trabecular thickness</i>)
ü.N.	über Nacht
VOI	Volumen von Interesse (<i>volume of interest</i>)
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Aufbau der osteochondralen Einheit.....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 2: Versuchsübersicht und Auswertungsmethoden.....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 3: Therapeutische rAAV-Vektoren.....</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 4: Schematik der „Volumes of Interest“ (VOI).....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 5: Strukturelle Veränderungen des subchondralen Knochens.....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 6: Beispiel eines mit Tusche gefärbten Präparats.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 7: Übersichtsbilder der makroskopischen Knorpelreparatur.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 8: Gesamtpunktwerte in den makroskopischen Bewertungssystemen.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 9: Übersichtsbilder der histologischen Knorpelreparatur.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 10: Histologische Übersichtsbilder in der Safranin-O-Färbung.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 11: Gesamtpunktwerte in den histologischen Bewertungssystemen.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 12: Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 13: Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 14: Punktwerte der Immunreaktivitäten im Reparaturgewebe.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 15: Ergebnisse Biochemie: Proteoglykane pro Gesamtprotein.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 16: Ergebnisse Biochemie: DNS pro Gesamtprotein.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 17: Ergebnisse Biochemie: Proteoglykane pro DNS.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 18: Knochenreparatur im Mikro-CT.....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 19: Makroskopische Auswertung der Tuschefärbung.....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 20: Makroskopische Auswertung des angrenzenden Gelenkknorpels.....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 21: Histologische Beurteilung des angrenzenden Gelenkknorpels.....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 22: Histologische Auswertung des angrenzenden Gelenkknorpels.....</i>	<i>62</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Lösungen, Puffer und Medien.</i>	16
<i>Tabelle 2: Chemikalien.</i>	18
<i>Tabelle 3: Antikörper.</i>	19
<i>Tabelle 4: Geräte.</i>	20
<i>Tabelle 5: Makroskopisches Bewertungssystem der Knorpelreparatur.</i>	25
<i>Tabelle 6: Modifiziertes Oswestry-Bewertungssystem der Knorpelreparatur.</i>	26
<i>Tabelle 7: Strukturelle Knochenveränderungen im Mikro-CT.</i>	30
<i>Tabelle 8: Schema zur Herstellung der Standardreihe im Hoechst-Test.</i>	32
<i>Tabelle 9: Schema zur Herstellung der Standardreihe im DMMB-Test.</i>	32
<i>Tabelle 10: Schema zur Herstellung der Standardreihe im BCA-Test.</i>	34
<i>Tabelle 11: Komplexes histologisches Bewertungssystem der Knorpelreparatur.</i>	36
<i>Tabelle 12: Einfaches histologisches Bewertungssystem der Knorpelreparatur.</i>	38
<i>Tabelle 13: Histologisches Bewertungssystem des angrenzenden Gelenkknorpels.</i>	39
<i>Tabelle 14: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktivität.</i>	41
<i>Tabelle 15: Ergebnisse des makroskopischen Bewertungssystems.</i>	44
<i>Tabelle 16: Ergebnisse des modifizierten Oswestry-Bewertungssystems.</i>	45
<i>Tabelle 17: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur.</i>	48
<i>Tabelle 18: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur.</i>	49
<i>Tabelle 19: Ergebnisse der biochemischen Auswertung der Knorpelreparatur.</i>	52
<i>Tabelle 20: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse im Defektareal.</i>	54
<i>Tabelle 21: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse im Defektareal.</i>	54
<i>Tabelle 22: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse vom angrenzenden Knochen.</i>	55
<i>Tabelle 23: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse vom angrenzenden Knochen.</i>	56
<i>Tabelle 24: Gruppeninterner Vergleich der Mikro-CT Ergebnisse.</i>	57
<i>Tabelle 25: Gruppeninterner Vergleich der Mikro-CT Ergebnisse.</i>	57
<i>Tabelle 26: Ergebnisse der deskriptiven Mikro-CT Analyse.</i>	58
<i>Tabelle 27: Ergebnisse der histologischen Beurteilung angrenzender Gelenkknorpel.</i>	61

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Zusammenfassung

Fragestellung. Fokale osteochondrale Defekte sind ein ungelöstes klinisch-orthopädisches Problem. Gentransfer-basierte Therapiestrategien sind ein experimenteller Ansatz zu seiner Lösung. In der vorliegenden Arbeit testeten wir die Hypothesen, dass direkter Gentransfer des humanen Transkriptionsfaktors Sox9 via rekombinanter adeno-assoziiierter viraler (rAAV) Vektoren sowohl (1) die Knorpelreparatur als auch (2) die mikroarchitektonische Wiederherstellung des subchondralen Knochens von osteochondralen Defekten im Großtiermodell verbessert und (3) der Entwicklung von arthrotischen Veränderungen im angrenzenden Gelenkknorpel protektiv entgegenwirkt.

Methoden. In osteochondrale Defekte der *Trochleae femores* von adulten Merinoschafen wurden entweder rAAV-Sox9-Behandlungsvektoren oder rAAV-lacZ-(β -Galaktosidase)-Kontrollvektoren appliziert. Nach 6 Monaten *in vivo* wurde die Knorpelreparatur und der angrenzende Gelenkknorpel untersucht und durch etablierte makroskopische, histologische und immunhistochemische Bewertungssysteme und biochemische Analysen evaluiert. Die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens wurde durch Mikrofokus-Computertomographie (Mikro-CT) beurteilt.

Ergebnisse. (1) Gentransfer von Sox9 via rAAV-Vektoren verbesserte signifikant individuelle Parameter der Knorpelreparatur wie Defektfüllung, Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie, Defektarchitektur, Oberflächenarchitektur, subchondraler Knochen, *Tidemark* und den Gesamtpunktwert im komplexen histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* sowie führte zu signifikant besseren Einzelpunktwerten Zellmorphologie, Knorpeldicke und dem Gesamtpunktwert im histologischen Bewertungssystem nach Wakitani *et al.*; je im Vergleich mit lacZ-Kontrolldefekten. Die Immunreaktivität des knorpeligen Reparaturgewebes nach Sox9-Gentransfer war für Typ-I-Kollagen signifikant erniedrigt. Biochemisch lag in den mit Sox9-behandelten Defekten eine signifikant höhere zelluläre Proteoglykanproduktion bei signifikant reduzierter Zellzahl vor. (2) Die Mikrostruktur des unvollständig wiederhergestellten subchondralen Knochens war nicht signifikant unterschiedlich bei häufig auftretenden subchondralen Knochenveränderungen. (3) Der an die Defekte angrenzende Gelenkknorpel zeigte in Sox9-behandelten Defekten signifikant weniger Zellklone und eine signifikant stärkere Anfärbbarkeit mit Safranin-O; beides Zeichen reduzierter degenerativer Veränderungen.

Schlussfolgerungen. Der rAAV-vermittelte Gentransfer von humanem Transkriptionsfaktor Sox9 verbessert signifikant die Knorpelreparatur von osteochondralen Defekten in Schafen *in vivo* ohne Einfluss auf die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens. Weiterhin reduziert rAAV-vermittelte Überexpression von Sox9 signifikant das Ausmaß perifokaler arthrotischer Veränderungen im Sinne einer Arthroseprotektion. Diese Ergebnisse unterstreichen das hohe Potential der rAAV-Sox9-Vektoren als therapeutische Werkzeuge zur Behandlung von Knorpeldefekten..

1.2 Abstract

Introduction. Focal osteochondral defects are an unsolved problem in clinical orthopaedics. Gene transfer-based strategies are an innovative experimental approach to solve this problem. In the present work, we tested the hypotheses that direct gene transfer of the human transcription factor *Sox9* via recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors improves both (1) articular cartilage repair and (2) subchondral bone restoration of osteochondral defects in a large animal model and (3) protectively counteracts the development of osteoarthritic changes in the articular cartilage adjacent to the defects.

Methods. In osteochondral defects of the *Trochleae femores* of adult sheep either rAAV-*Sox9*-treatment vectors or rAAV-*lacZ*-(β -Galactosidase)-control vectors were applied. After 6 months *in vivo*, cartilage repair and the adjacent articular cartilage were evaluated applying established macroscopic, histological, immunohistochemical scoring systems and biochemical analyses. The microarchitecture of the subchondral bone was assessed by microfocus computed tomography (micro-CT).

Results. (1) Gene transfer of *Sox9* via rAAV vectors significantly improved individual parameters of cartilage repair such as defect filling, matrix staining, cell morphology, defect architecture, surface architecture, subchondral bone, *tidemark* and the overall point value of the complex histological evaluation system according to Sellers *et al.* as well as the individual point values for cell morphology, cartilage thickness and the total point value in the histological evaluation system according to Wakitani *et al.* in comparison with *lacZ* control defects. Immunoreactivity against type-I-collagen of the cartilaginous repair tissue after *Sox9* gene transfer was significantly reduced. There was a significantly higher proteoglycan production per cell in the cartilaginous repair tissue of defects treated with *Sox9* with a significantly reduced cell number. (2) The microstructure of the incompletely restored subchondral bone was not significantly different between groups and often showed alterations of the subchondral bone. (3) The adjacent articular cartilage of *Sox9*-treated defects showed significantly fewer cell clones and significantly more safranin-O staining, both signs of reduced osteoarthritic changes.

Conclusions. The rAAV-mediated gene transfer of the human transcription factor *Sox9* significantly improves the cartilage repair of osteochondral defects in sheep *in vivo* without influencing the microarchitecture of the subchondral bone. Furthermore, rAAV-mediated overexpression of *Sox9* significantly reduces the extent of perifocal osteoarthritic changes, thus providing a protective role. These results underline the high potential of the rAAV-*Sox9* vectors as therapeutic tools for the treatment of cartilage defects.

2. EINLEITUNG

2.1 Problematik und Überblick

Der hyaline Gelenkknorpel ermöglicht die physiologische Gelenkfunktion. Treten Defekte am adultem Gelenkknorpel auf, heilen diese nicht vollständig aus. Dies ist vor allem aufgrund der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels ein ungelöstes klinisches Problem (Cucchiari, Madry, 2018). Dabei ist es egal, ob Knorpeldefekte im Rahmen von Traumata, arthrotischer Veränderungen oder durch Erkrankungen des subchondralen Knochens wie der Osteochondrosis dissecans oder der Osteonekrose entstanden sind (Hunziker *et al.*, 2015). Bislang ist kein Therapieansatz vorhersagbar in der Lage, den hyalinen Gelenkknorpel vollständig und dauerhaft wiederherzustellen (Buckwalter, Mankin, 1998b; Madry *et al.*, 2011a).

Osteochondrale Defekte reichen in den subchondralen Knochen hinein (Madry *et al.*, 2010). Sie werden mit einem faserknorpeligen Reparaturgewebe repariert (Frisbie *et al.*, 2003), welches weniger belastbar als hyaliner Gelenkknorpel ist und im Zeitverlauf degeneriert (Jackson *et al.*, 2001). Als Folge kann vom Defekt ausgehend im Verlauf eine sekundäre Arthrose entstehen (Madry *et al.*, 2016a). Da vor allem junge, sportlich aktive Patienten von osteochondralen Defekten betroffen sind (Hjelle *et al.*, 2002), für welche die letzte Therapieoption des endoprothetischen Gelenkersatzes mit erhöhten Komplikationsraten und daraus resultierenden Revisionseingriffen keine Dauerlösung darstellt (Meehan *et al.*, 2014), kommt der Verbesserung der Knorpelreparatur in einer zunehmend älter werdenden Gesellschaft eine klinisch wie auch volkswirtschaftlich signifikante Relevanz zu (Brown *et al.*, 2006).

Die Gentherapie ist ein experimentell-klinischer Ansatz zur Lösung dieses Problems. Hierbei werden chondroreparative Faktoren gentransfer-basiert bereitgestellt, um die Chondrogenese im Knorpeldefekt zu verbessern (Cucchiari, Madry, 2005). Rekombinante, adenoassoziierte virale (rAAV) Vektoren können Fremdgene sicher, effizient und nachhaltig in Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates transferieren. Der humane Transkriptionsfaktor Sox9 reguliert Schlüsselfunktionen in der embryonalen Chondrogenese. Sein rAAV-vermittelter Gentransfer in die reparaturrelevanten mesenchymalen Vorläuferzellen und Chondrozyten verbesserte die Chondrogenese *in vitro*, *in situ* als auch im Tiermodell *in vivo* (Cucchiari *et al.*, 2007; Venkatesan *et al.*, 2012; Cucchiari *et al.*, 2013; Madry *et al.*, 2020).

Ziel in der vorliegenden Arbeit war es, den mittelfristigen Einfluss der Überexpression von humanem Transkriptionsfaktor Sox9 mittels direktem rAAV-vermitteltem

Gentransfer auf die Reparatur von osteochondralen Defekten im translationalen Großtiermodell des Schafes zu untersuchen.

2.2 Biologie des hyalinen Gelenkknorpels

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein druck- und stoßelastisches Stützgewebe mit glatter, reibungsarmer Oberfläche. Er besteht aus Chondrozyten und der von ihnen produzierten Extrazellulärmatrix (Poole *et al.*, 2001). Blutgefäße, Nerven und Lymphbahnen sind nicht vorhanden. Die Nährstoffversorgung des adulten Gelenkknorpels erfolgt hauptsächlich per Diffusion aus der Synovialflüssigkeit (O'driscoll, 1998). Postmitotisch vereinnahmen die Chondrozyten lediglich 1-5% des gesamten Knorpelvolumens. Infolgedessen ist ihre Gesamtaktivität niedrig (Buckwalter *et al.*, 2005). Altersabhängig reduzieren die Chondrozyten ihren Stoffwechsel, ihre Anzahl verringert sich und sie verlieren die Fähigkeit zur Zellteilung (Martin, Buckwalter, 2002). Diese biologischen Eigenschaften bedingen im Wesentlichen die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels im Erwachsenenalter (Hunziker, 2002).

Die Zusammensetzung aus extrazellulärer Matrix bestimmt die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels (Buckwalter, Mankin, 1998a). Seine Hauptbestandteile sind Wasser (70-80%), das vorwiegend an Proteoglykane (5-7%) gebunden vorliegt und Kollagene (10-20%). Zu geringerem Anteil finden sich weitere nicht-kollagene Proteine und diverse Glykoproteine (Hunziker *et al.*, 1997). Proteoglykane sind für die Druckelastizität im Gelenkknorpel verantwortlich. Aggrecan ist das größte und häufigste Proteoglykan im Gelenkknorpel. Funktionell entscheidend sind seine dem Kernprotein repetitiv angelagerten hydrophilen, negativ geladenen Glykosaminoglykan-Seitenketten (Hardingham, Fosang, 1992). Über Linkproteine binden die Proteoglykane an Hyaluronsäure und bilden große, wassertragende Komplexe aus (Roughley, 2006). Ihrem Expansionsdrang setzt sich das dreidimensionale Fasernetzwerk der Kollagentypen II, VI, IX, XI und XIV restriktiv entgegen (Poole *et al.*, 2001). Typ-II-Kollagen ist mit einem Anteil von 90-95% des Gesamtkollagens für die mechanische Festigkeit und Form des Gelenkknorpels wesentlich verantwortlich (Bora, Miller, 1987). Typ-I-Kollagen hingegen ist ein Hauptbestandteil des subchondralen Knochens und kommt im faserknorpeligen Reparaturgewebe unbehandelter Knorpeldefekte vor (Orth, 2008).

2.3 Aufbau der osteochondralen Einheit

Der hyaline Gelenkknorpel schützt den darunterliegenden subchondralen Knochen vor mechanischer Überbelastung. Dabei werden vier horizontale Knorpelzonen unterschieden (Abbildung 1). Als Leitstruktur dienen die trajektorieell ausgerichteten Typ-

II-Kollagenfibrillen. Sie durchziehen den Gelenkknorpel bogenförmig (Poole *et al.*, 2001). Gelenknah verlaufen die Typ-II-Kollagenfibrillen parallel zur Oberfläche. Gemeinsam mit spindelförmig, abgeflachten Chondrozyten bilden sie die Tangentialzone. Diese Zone leitet Scher- und Reibkräfte ab und dient als selektive Barriere des Knorpels zur Synovialflüssigkeit. Die basal folgende Übergangzone beinhaltet schräg kreuzende Kollagenfibrillen und sphäriode Chondrozyten. Der Proteoglykangehalt steigt und damit auch die Druckresistenz des Gelenkknorpels. In der Radiärzone, der dicksten Knorpelzone, verlaufen die Kollagenfibrillen in senkrechter Position zur Gelenkoberfläche. Ihnen liegen oval rundlich geformte Chondrozyten in typischer Säulenkonfiguration an. Deren rege Proteoglykanproduktion garantiert den maximalen Widerstand des Gelenkknorpels gegenüber Druckbelastungen (Buckwalter, Mankin, 1998a). Die *Tidemark* ist eine zellfreie, histologisch erkennbare Trennlinie zur kalzifizierten Knorpelzone (Lyons *et al.*, 2005). Sie wird von den senkrecht weiterverlaufenden Kollagenfibrillen durchkreuzt, um den oberflächen, elastischen Gelenkknorpel mit der kalzifizierten Knorpelzone zu verankern (Hardingham, Fosang, 1992). Diese Zone besteht aus einer kalziumhaltige Matrix mit Typ-X-Kollagen und wenigen hypertrophen Chondrozyten. Diese Komposition ermöglicht die Übertragung der Zugkräfte vom Gelenkknorpel auf den steiferen subchondralen Knochen (Broom, Poole, 1982). Er liegt unter der Zementlinie (osteocondrale Grenzzone). Seine subchondrale Knochenplatte formen spongiöse Knochenlamellen, deren diaphysenwärts größer werdendes Hohlraumsystem sukzessive in das radiär verlaufende Trabekelgeflecht aus subartikulärer Spongiosa übergeht. Im Gegensatz zum hyalinen Gelenkknorpel ist der subchondrale Knochen gut vaskularisiert und innerviert. Seine Hauptaufgaben liegen in biomechanisch unterstützenden Funktionen für den darüberliegenden Gelenkknorpel durch flexible, belastungsabhängige Umbauprozesse. Gemeinsam bilden hyaliner Gelenkknorpel und subchondraler Knochen die osteocondrale Einheit. Ihre zyklische Be- und Entlastung sichert die Nährstoffversorgung und individuelle Gewebshomöostase (Imhof *et al.*, 2000; Madry *et al.*, 2010).

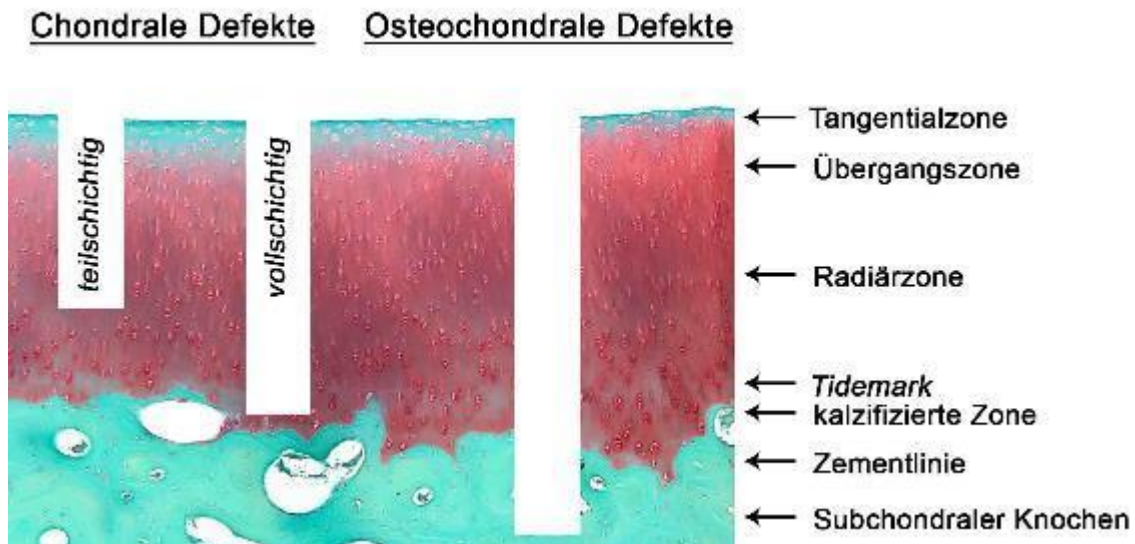


Abbildung 1: Aufbau der osteochondralen Einheit. Exemplarische Darstellung der Tiefe chondraler - und osteochondraler Defekte anhand eines Safranin-O gefärbten Präparats der lateralen Trochlea ossis femoris des Merinoschafes.

2.4 Einteilung und Reparatur von fokalen Gelenkknorpeldefekten

Fokale Knorpeldefekte sind lokal umschriebene Schäden der Gelenkoberfläche. Nach ihrer Eindringtiefe werden chondrale und osteochondrale Defekte unterschieden (Noyes, Stabler, 1989) (siehe Abbildung 1).

Chondrale Defekte können in teilschichtige (*partial-thickness*) oder vollschichtige (*full-thickness*) unterteilt werden. Letztere reichen bis zum kalzifizierten Knorpel (Noyes, Stabler, 1989). Bei chondralen Defekten findet daher per definitionem keine Eröffnung des subchondralen Knochenmarkraums statt. Die Auffüllung dieser Läsionen erfolgt nur partiell durch mesenchymalen Vorläuferzellen synovialen Ursprungs (Hunziker, Rosenberg, 1996; Hunziker, 2002). Die an den Defekt angrenzenden Chondrozyten nehmen nicht effektiv an der Defektreparatur teil. Sie zeigen eine reaktiv gesteigerte Zellproliferation in sog. Clustern („Zellhaufen“). Diese münden regelhaft in gesteigerten Apoptoseraten (Buckwalter *et al.*, 2005). Unbehandelt können Knorpeldefekte daher auch im Verlauf an Größe zunehmen (Cicuttini *et al.*, 2005).

Bei osteochondralen Defekten ist der subchondrale Knochen mitbetroffen (Orth *et al.*, 2013a). Durch Kontakt zum subchondralen Knochenmark bildet sich ein Blutgerinnsel. Es enthält undifferenzierte, mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks. Unter dem Einfluss von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Sox9, bilden sie das osteochondrale Reparaturgewebe (Shapiro *et al.*, 1993). Während der subchondrale Knochen meist zufriedenstellend repariert wird, weist das oberflächliche Reparaturgewebe meist nur faserknorpelige Anteile auf. Dieser Faserknorpel ist

charakterisiert durch spindelförmige, fibroblastenartige Zellen, einem reduziertem Proteoglykangehalt und einem erhöhtem Verhältnis von Typ-I-Kollagen zu Typ-II-Kollagen (Furukawa *et al.*, 1980). Auch die Struktur des Reparaturgewebes entspricht nie der des originären hyalinen Knorpels (Bhosale, Richardson, 2008). Daraus resultiert eine frühzeitige Degeneration des faserknorpeligen Reparaturgewebes bereits nach wenigen Monaten (Hunziker, 2002). Auch die Ausbreitung des Defektes in daran angrenzende Knorpelregionen kann häufig nicht verhindert werden (Jackson *et al.*, 2001). Weiterhin kann der subchondrale Knochen über sein ursprüngliches Niveau in das Reparaturgewebe hineinwachsen und dieses zusätzlich ausdünnen (Orth *et al.*, 2013a).

Knorpelreparatur bedeutet die Bildung eines Ersatzgewebes, das lediglich Ähnlichkeiten mit dem hyalinen Gelenkknorpel hat. Knorpelregeneration hingegen terminiert die vollständige und dauerhafte Wiederherstellung des hyalinen Gelenkknorpels (Orth, Madry, 2016). Letzteres wird ausschließlich während der embryonalen Chondrogenese beobachtet und tritt im Erwachsenenalter niemals spontan für Knorpeldefekte auf (Caplan *et al.*, 1997).

2.5 Operative Therapie bei fokalen Gelenkknorpeldefekten

Fokale, symptomatische Knorpeldefekte werden operativ behandelt, wenn konservative Therapiemaßnahmen wie medikamentöse Schmerztherapie und Physiotherapie zu keiner Beschwerdelinderung führen (Niemeyer *et al.*, 2016). Ziel ist die Bildung eines biomechanisch kompetenten und gelenkkongruenten Ersatzknorpels. Dieser soll Schmerzen lindern, die Gelenkfunktion wiederherstellen und der Anschlussdegeneration von angrenzendem Gelenkknorpel vorbeugen (Madry *et al.*, 2011a; Jungmann *et al.*, 2018). Die Wahl des individuell geeigneten Verfahrens ist abhängig von der Defektgröße, Ätiologie, und -lage sowie dem Alter und dem Aktivitätsniveau des Patienten. Weiteren Einfluss auf das Behandlungsergebnis haben die Begleitkorrektur von Gelenkpathologien (Band-, Meniskusverletzungen, fehlerhafte Beinachse) und das postoperative Rehabilitationsprogramm (Gomoll *et al.*, 2010; Ebert *et al.*, 2020).

Knochenmarkstimulierende Verfahren sind arthroskopisch durchführbare Techniken wie zumeist die Pridie-Bohrung (Pridie, 1959) und Mikrofrakturierung (Steadman *et al.*, 1999). Sie werden zur Behandlung von kleinen chondralen Defekten eingesetzt (Fläche < 3 cm²) (Niemeyer *et al.*, 2016). Hierbei werden millimetergroße Löcher in die subchondrale Knochenplatte des vorher ausgeräumten Defektgrundes gebohrt oder gepickt, damit mesenchymale Knochenmarkszellen ein Reparaturgewebe ausbilden können (Steadman *et al.*, 2001). Aufgrund der oftmals minderwertigen Faserknorpelbildung und Tendenz zu subchondralen Knochenveränderungen wird bei

bei größeren chondralen Knorpeldefekten zur autologen Chondrozytentransplantation (ACT) geraten (Fläche > 2,5-3 bis ca 14 cm²) (Niemeyer *et al.*, 2016). Hierbei werden in zwei Operationsschritten Chondrozyten bioptisch entnommen, *ex vivo* kultiviert und anschließend in einer zweiten Operation zusammen mit biodegradierbaren Trägersubstanzen reimplantiert (Brittberg *et al.*, 1994; Brittberg, 2010) (Knutsen *et al.*, 2016). Ein Problem für den Langzeiterfolg des hyalinähnlichen Reparaturgewebes (Saris *et al.*, 2009) stellt die kritische Eigenschaft von Chondrozyten zur phänotypischen Dedifferenzierung dar (Graceffa *et al.*, 2018). Dieser Phänotypverlust zu fibroblastenähnlichen Zellen ist mit dem Verlust der knorpelspezifischen Matrixsynthese assoziiert (Benya, Shaffer, 1982). Unabhängig davon bestehen immer die hohen Kosten und Notwendigkeit eines zweizeitigen Eingriffs.

Ist der subchondrale Knochen mitbetroffen, können autologe, aus minderbelasteten Gelenkarealen, oder allogene Knorpel-Knochen-Zylinder eingesetzt werden (Imhoff *et al.*, 1999; Hangody *et al.*, 2001). Die behandelbare Defektgröße ist durch die Entnahmemorbidität und Probleme eine kongruente Gelenkfläche herzustellen, limitiert (Fläche < 3 cm²) (Niemeyer 2016). Bei großen osteochondralen Defekten ergibt die Kombination von ACT und autologer Spongioplastik gute Ergebnisse (Ochs *et al.*, 2011). Sind Knorpeldefekte arthrotisch diffus fortgeschritten ist keines der genannten Operationsverfahren mehr sinnvoll einsetzbar (Niemeyer *et al.*, 2016). Bei Vorliegen einer Bein-Achsfehlstellung können kniegelenksnahe Osteotomien zur Korrektur der mechanischen Achse durchgeführt werden. Die dadurch herbeigeführte lokale Druckentlastung des geschädigten Knorpelareals soll die Ausbreitung einer noch lokalisierten Arthrose hemmen (Madry *et al.*, 2011a; Heijink *et al.*, 2012). Damit kann auch der endoprothetische Gelenkersatz verzögert werden (Lutzner *et al.*, 2009).

2.6 Experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten

Da die klinisch etablierten Therapiekonzepte weder zu einer Knorpelregeneration noch zu einer langfristig zufriedenstellenden Knorpelreparatur führen, werden alternative Wege in der Behandlung fokaler Knorpeldefekte erprobt. Chondrogene Wachstums- und Transkriptionsfaktoren haben die Eigenschaft, anabol stimulierend auf die Chondrogenese von mesenchymalen Zellen und Chondrozyten zu wirken (Goldring *et al.*, 2006). Ihre Applikation in Knorpeldefekte ist daher zentral. Im Gegensatz zur intraartikulären Applikation von rekombinanten Faktoren, mit entsprechend nur kurzer pharmakologischer Halbwertszeit im Gelenk von wenigen Minuten, können Gentransfer-basierte Therapiekonzepte eine langfristige Bioverfügbarkeit der therapeutischen

Faktoren im Knorpeldefekt ermöglichen (Cucchiari, Madry, 2005). Dazu wird das entsprechende Gen isoliert, in eine cDNA umgeschrieben und in einen Expressionsvektor (Gentransfektor) integriert.

2.6.1 Therapeutische Faktoren

Die Knorpelreparatur im Defekt weist Ähnlichkeiten zum Vorgang der endochondralen Ossifikation auf. Idealerweise sollten die therapeutischen Faktoren daher imstande sein, die Chondrogenese der mesenchymalen Vorläuferzellen zu induzieren und mit Zellproliferation und knorpelspezifischer Matrixsynthese aufrechtzuerhalten, ohne dass es zu einer Verknöcherung im Reparaturgewebe kommt (Cucchiari, Madry, 2005; Graceffa *et al.*, 2018).

Wachstumsfaktoren

Polypeptidwachstumsfaktoren binden an Oberflächenrezeptoren von Knorpelzellen und wirken über komplexe, intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse (Lo, Cruz, 1995; Fortier *et al.*, 2004) auf die Expression von Effektorgenen der Chondrogenese ein (Shi *et al.*, 2015). Vielverwendete Kandidaten sind der transformierende Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor, TGF- β*), die knochenmorphogenetischen Proteine (*bone morphogenetic proteins, BMPs*) wie *BMP-2*, *BMP-6* und *BMP-7*, der insulinartige Wachstumsfaktor 1 (*insulin-like growth factor 1, IGF-1*) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (*FGF-2*) (Bellavia *et al.*, 2017). Aufgrund ihres pleiotropen Charakters sind Wachstumsfaktoren aber nicht in der Lage, eine adäquate chondrogene Differenzierung (*IGF-1*) der mesenchymalen Zellen einzuleiten oder deren knorpelspezifische Matrixbiosynthese (*FGF-2*) zu steigern. Neben katabolen Signalwegen (Shi *et al.*, 2019) sind desweiteren auch solche für eine Knorpelregeneration unerwünschten Prozesse der chondrozytären Hypertrophie und Osteogenese bei Überexpression nur schwer abschätzbar (*TGF- β , BMPs*) (Venkatesan *et al.*, 2012).

Transkriptionsfaktoren

Alternativ zu den pleiotropen Wachstumsfaktoren können Effektorgene der embryonalen Chondrogenese zur Stimulation der Knorpelreparatur eingesetzt werden (Goldring *et al.*, 2006). Das sind vor allem die Vertreter *Sox5*, *Sox6* und *Sox9* aus der Sox-Transkriptionsfaktorenfamilie (*SRY-related High-Mobility Group box family of DNA binding proteins*) (Akiyama, Lefebvre, 2011). Der humane Transkriptionsfaktor *Sox9* besitzt Schlüsselfunktion in der embryonalen Chondrogenese (Lefebvre, Dvir-Ginzberg, 2016). Mutationen in und um dem humanen *Sox9*-Gen führen zu Fehlbildungen von knorpeligen Vorstufen, die im Rahmen der Skelettentwicklung durch die endochondrale

Ossifikation entstehen (Foster *et al.*, 1994; Hargus *et al.*, 2008). Hierbei induziert Sox9 die Zelldifferenzierung der mesenchymaler Zellen zu Chondrozyten (Wright *et al.*, 1995; Bi *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2002; Lefebvre, Smits, 2005). Als DNS-Bindungsprotein aktiviert Sox9 die Expression der knorpelspezifischen Matrixgene von Typ-II-Kollagen und Aggrecan (Bell *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998; Tew *et al.*, 2008). Gleichzeitig wird Sox9 in hypertrophen Chondrozyten nicht mehr exprimiert, da Sox9 die Expression von mit chondrozytärer Hypertrophie und Osteogenese assoziierten Gene und Signalwegen unterdrückt (Akiyama *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006; Cheng, Genever, 2010; Hattori *et al.*, 2010; Ikegami *et al.*, 2011; Dy *et al.*, 2012).

Gentransfer von Sox9 in mesenchymale Stammzellen (Tsuchiya *et al.*, 2003; Kupcsik *et al.*, 2010; Venkatesan *et al.*, 2012) und Chondrozyten (Li *et al.*, 2004; Cucchiari *et al.*, 2007) und kombinierten Gentransferverfahren (Cucchiari *et al.*, 2009; Frisch *et al.*, 2016) führt zu verbesserter Chondrogenese (Produktion von Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen) und reduzierten Expressionsprofilen der chondrozytären Hypertrophie und Osteogenese (Produktion von Typ-X und Typ-I-Kollagen). In osteochondralen Knorpeldefektmodellen des Kleintieres (Cao *et al.*, 2011; Cucchiari *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017) als auch von Mini-Schweinen (Madry *et al.*, 2020) resultierte immer ein strukturell signifikant besseres Reparaturgewebe als in den Kontrollbehandlungen. Dennoch wurde bisher keine Studie durchgeführt, die den Einfluss von Sox9 auf die Knorpelreparatur von osteochondralen Defekten in einem klinisch relevanten Großtiermodell auch über einen hinreichend langen Beobachtungszeitraum untersuchte.

2.6.2 Gentransfervektoren

Gentransfervektoren vermitteln die Aufnahme des als Transgen bezeichneten genetischen Materials in somatische Zellen. Dafür stehen prinzipiell nicht-virale und virale Genvektoren zur Verfügung. Ihre Gentransfereffizienz definiert den Prozentsatz der Zellen, die das übertragene Transgen anschließend auch exprimieren (Madry *et al.*, 2006).

Nicht-virale Genvektoren

Nicht-virale Genvektoren bieten Vorteile der einfachen und sicheren Durchführbarkeit. Ihr Gentransfer (Transfektion) basiert auf extrakorporalen Komplexbildungen der zu transferierenden, negativ geladenen cDNS mit chemischen Makromolekülen (u.a. kationische Lipide, Proteine oder Polymerverbindungen) (Wu *et al.*, 2018). Diese Komplexe werden unspezifisch per Endozytose zellulär aufgenommen. Nur ein geringer Prozentsatz der Transgene entgeht den endolysosomalen Degradationsprozessen und hält sich für einige Tage extrachromosomal auf (Luo, Saltzman, 2000). Aufgrund der

niedrigen und zellspezifischen Effizienzen (max 40-50% *in vitro*) (Madry, Trippel, 2000) liegen die Anwendungsbereiche für nicht-virale Genvektoren hauptsächlich in *ex vivo* Gentransferansätzen (Madry, Cucchiari, 2014).

Virale Genvektoren

Der Gentransfer mit viralen Vektoren (Transduktion) ist hocheffizient (bis zu 100%ige Transduktionseffizienz *in vitro*) (Loser *et al.*, 2002). Hierbei wird die Fähigkeit von Viren ausgenutzt, ihr um das therapeutische Gen modifiziertes Genom effektiv in Fremdzelle einbringen zu können (Thomas *et al.*, 2003). Diese replikationsdefekten Vektoren basieren hauptsächlich auf Retroviren, Lentiviren, Adenoviren und Adeno-assoziierten Viren (AAV) (Lundstrom, 2018). Der Großteil der genannten Virusvektoren birgt dennoch unzumutbare immunogene, toxische oder onkogene Restrisiken für den sicheren *in vivo* Gentransfer. Aus diesem Grund sind Vektoren auf AAV-Basis das derzeit am meisten favorisierte Gentransfersystem in klinischen Gentransferstudien (Wang, Tai, 2019; Li, Samulski, 2020). AAV sind kleine, apathogene, replikationsdefekte, einzelsträngige humane DNS-Parvoviren mit 4,8 kB großem Genom (Berns, Linden, 1995; Goncalves, 2005). Sie transduzieren sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen mit einer hohen Transduktionseffizienz über langfristige Zeiträume *in situ* und *in vivo* (Monahan, Samulski, 2000; High, Aubourg, 2011; Grimm, Buning, 2017) Rekombinante AAV (rAAV)-Vektoren besitzen den entscheidenden Vorteil, dass die viralen Gensequenzen der Replikation und Kapsidproduktion im rAAV Herstellungsprozess komplett entfernt und durch therapeutische Transgenkassetten ersetzt werden können. Die zusätzliche heterologe Promotorsequenz im Vektorgenom ermöglicht eine Genexpression unabhängig von Helferviren (Daya, Berns, 2008). Dadurch sind rAAV-Vektoren weniger immunogen als Vektoren des Adenovirus (Raper *et al.*, 2003) und nicht toxisch wie Vektoren des Herpes-Simplex-Virus (Marconi *et al.*, 2008). Nach erfolgreicher Zelltransduktion persistieren die übertragenen Transgene fast ausschließlich als episomale DNS-Konkatemere im Zellkern (Smith, 2008). Dennoch ist die Transgenexpression von über einem Jahr beschrieben (Flotte *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1996; Ofri *et al.*, 2018). Diese Eigenschaft steht im deutlichen Gegensatz zu Vektoren auf Basis der Retro- und Lentiviren (Goater *et al.*, 2000), die das Risiko der Insertionsmutagenese tragen (Anderson, 1992; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008). Jüngst erhielten mit Luxturna® und Glybera® zwei auf rAAV-Vektoren basierende Gentherapiemedikamente die klinische Marktzulassung in Europa (Wang, Tai, 2019; Li, Samulski, 2020). Aus diesen Gründen wurden rAAV-Vektoren auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

2.6.3 Gentransferstrategie

Um Gene im intraartikulär gelegenen Knorpeldefekt bereitzustellen, erfolgt idealerweise eine Arthrotomie. Danach unterscheidet man zwischen den Methoden der *ex vivo* Gentransferstrategie (Implantation *ex vivo* genetisch modifizierten Zellen) und der *in vivo* Gentransferstrategie (Applikation von Genvektoren) gewählt werden (Madry *et al.*, 2011b).

Ex vivo Gentransferstrategie

Ex vivo Gentransferstrategien sind die tierexperimentell bevorzugte Methode, um Gene im Knorpeldefekt bereitzustellen (Bellavia *et al.*, 2017). Sie bieten den Sicherheitsvorteil, da der Gentransfer kontrollierbar im Zelllabor erfolgt. Typischerweise werden Chondrozyten, mesenchymalen Stammzellen oder Synoviozyten verwendet. Ihre Defektimplantation erfolgt oftmals matrixgekoppelt mit Hilfe von biodegradierbare Gerüstwerke natürlicher oder synthetischer Herkunft (Johnstone *et al.*, 2013). Im Knorpeldefekt ist die Transgenexpression der implantierten Zellen rückläufig für etwa einen Monat aktiv (Madry, Cucchiarini, 2011). Die wesentlichen Nachteile der *ex vivo* Strategien liegen in den dafür notwendigen zeit- und kostenintensiven Prozeduren der Zellgewinnung, Isolation und -expansion und dem Aspekt der technischen Durchführung (Evans, Huard, 2015).

In vivo Gentransferstrategie

Der direkte Transfer von Genen in die Zellen des Knorpeldefektes ist die wesentlich praktikablere und kostengünstigere Methode. Ihre wesentliche Limitierung bestand lange Zeit darin, dass der Großteil des verfügbaren Genvektorspektrums (siehe 2.6.1) keine sichere und effiziente Transgenübertragung im Gelenkknorpel ermöglichte. Erst mit der Identifizierung von versatilen rAAV-Vektoren war auch die Grundlagenforschung des Gentransfers in den Gelenkknorpel deutlich vorwärtsgeschritten. Gene konnten effizient (mind. 70%) und langandauernd (bis zu 150 Tagen) in klinisch relevanten Tiefen von humanen Gelenkknorpelproben überexprimiert nachgewiesen werden (Arai *et al.*, 2000; Madry *et al.*, 2003; Cucchiarini, Madry, 2005). In osteochondrale Defekte der Kniegelenke von Klein- und Großtieren appliziert, zeigten sich hauptsächlich die aus dem Knochenmark einwandernden Zellen nebenwirkungsfrei über die Beobachtungszeiträume (bis zu vier Monate) transduziert (Cucchiarini *et al.*, 2005; Cucchiarini *et al.*, 2013; Cucchiarini, Madry, 2014; Cucchiarini *et al.*, 2018; Madry *et al.*, 2020).

2.6.4 Konzept der vorliegenden Arbeit

An osteochondralen Defekten in den Kniegelenken von Kaninchen resultierte nach rAAV-vermitteltem direktem Gentransfer die nebenwirkungsfreie Sox9-Transgenexpression von den aus dem Knochenmark einwandernden Vorläuferzellen, die in diesem Modell den Defekt füllten. Dadurch war die Knorpelreparatur von Sox9-behandelten Defekten signifikant besser gewesen als die von lacZ-Kontrolldefekten (Cucchiarini *et al.*, 2013). Für die klinische Anwendbarkeit dieses experimentellen Therapiekonzeptes bedarf es jedoch der Überprüfung in einem Großtiermodell, um einerseits eine klinisch relevantere Situation zu erzeugen und andererseits diese Studien über einen hinreichend langen Beobachtungszeitraum durchzuführen (Cucchiarini, Madry, 2005). Besonders Schafe sind neben Mini-Schweinen, Pferden, Ziegen und Hunden in Bezug auf die Gelenkanatomie, die Gelenkbelastung und die Knorpeldicke ihrer Kniegelenke mit dem Menschen besser vergleichbar als Kleintiere (Schneider-Wald *et al.*, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von direktem rAAV-vermitteltem Gentransfer des humanen Transkriptionsfaktors Sox9 auf die Reparatur von osteochondralen Defekten im Großtiermodell des Schafes untersucht. Hierfür erhielten adulte Merinoschafe nach Arthrotomie ihrer beiden hinteren Kniegelenke zylindrische osteochondrale Defekte in den lateralen Gelenkflächen der *Trochleae femores*. Alternierend pro Kniegelenk wurden die rAAV-Vektorlösungen, welche die cDNS des humanen Transkriptionsfaktors Sox9 „rAAV-Sox9“ (Sox9-Behandlungsgruppe) oder das β -Galactosidase Kontrollgen lacZ von *Escherichia coli* „rAAV-lacZ“ (lacZ-Kontrollgruppe) trugen, in die Defekte appliziert. Postoperativ wurde den Tieren die Vollbelastung ihrer operierten Knie bei uneingeschränktem Bewegungsumfang gestattet. Nach sechs Monaten *in vivo* erfolgte die Sectio der Tiere. Die Knorpelreparatur wurde anhand etablierter Bewertungssysteme makroskopisch, histologisch, immunhistochemisch verglichen und biochemisch untersucht (Orth *et al.*, 2015). Die Reparatur des subchondralen Knochens wurde per Mikro-CT-Analyse beurteilt (Orth *et al.*, 2012b).

3. FRAGESTELLUNGEN

In einem bilateralem Modellsystem fokaler, osteochondraler Defekte in den *Trochleae femores* adulter Merinoschafe wurden folgende Hypothesen untersucht:

- (1) Therapeutisch mit „rAAV-Sox9“ behandelte Defekte zeigen eine bessere Knorpelreparatur als die mit „rAAV-lacZ“ behandelten Kontrolldefekte.

- (2) Therapeutisch mit „rAAV-Sox9“ behandelte Defekte weisen keine veränderte mikroarchitektonische Wiederherstellung des subchondralen Knochens im Vergleich mit durch „rAAV-lacZ“ behandelter Kontrolldefekte auf.

- (3) Therapeutisch mit „rAAV-Sox9“ behandelte Defekte weisen eine geringere Entwicklung von perifokalen, arthrotischen Veränderungen in dem an den Defekt angrenzenden Gelenkknorpel auf als die mit „rAAV-lacZ“ behandelten Kontrolldefekte.

4. MATERIAL

4.1 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden mit *aqua bidest.* angesetzt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Lösungen, Puffer und Medien.

Lösung, Puffer	Inhaltsstoffe	Konzentration/Menge/ Volumen
1x TNE-Puffer	NaCl	5,8 g (100 mM)
	Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	372 mg (1 mM)
	Tris/(HCl) (pH = 7,4)	1322 mg (10 mM)
	H ₂ O	
Blockierungspuffer	BSA	6 ml
	PBS	200 ml
DAB-Lösung (3'3 Diaminobenzidine)	H ₂ O	5 ml
	Puffer (pH = 7,5)	2 Tropfen
	DAB Substratreagenz	4 Tropfen
D-MEM	H ₂ O ₂	2 Tropfen
	D-Glukose	4500 mg/l
	L-Glutamin	580 mg/l
	Phenolrot	15 mg/l
	nicht-essentielle Aminosäuren, Vitamine und anorganische Salze	nach Herstellerangaben
DMMB-Lösung A	D-Cysteinhydrochlorid-monohydrat	0,05 g
	PBE	30 ml
DMMB-Lösung B	Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	0,053 g
	Lösung A	1 ml
DMMB-Lösung C	Lösung A	24,95 ml
	Lösung C	0,05 ml
DMMB-Färbelösung (pH = 3,5)	1,9-Dimethylmethylenblau	16 mg
	Natriumhydroxid (1 M)	25,6 ml
	Ethanol (95%)	5 ml
	Ameisensäure (90%)	3 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
Echtgrün- (<i>fast green</i> -) Lösung	Echtgrün	200 mg
	H ₂ O	ad 1000 ml
Entkalkungs-Lösung	Natrium-Citrat	100 g
	Ameisensäure (90%)	250 ml
	H ₂ O	ad 750 ml

Eosin-Lösung	Eosin G	10 g
	H ₂ O	ad 2000 ml
Formalin-Lösung (pH = 7,4)	KH ₂ PO ₄	9,07 g
	Na ₂ HPO ₄	11,86 g
	Formalin-Stammlösung	140 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
Hämatoxylin-Lösung (nach Harris)	Hämatoxylin	10 g
	Ethanol (100%)	120 ml
	Natrium-Jodat	10 g
	Aluminiumkaliumsulfat	200 g
	H ₂ O	ad 2000 ml
HCl-Lösung	HCl (40%)	5,4 ml
	H ₂ O	ad 200 ml
Papain-Lösung	Papain	5 mg
	PBS	ad 40 ml
PBE	Na ₂ HPO ₄	7,1 g
	EDTA	1,86 g
	H ₂ O	500 ml
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Kaliumchlorid (pH = 7,2)	2,7 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	1,7 mM
	Natriumchlorid	136 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O)	10 mM
Safranin-Orange- Lösung	Safranin-Orange	1 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
Trypsin-Lösung (0,1%)	Trypsin-Stammlösung (25%)	800 ml
	PBS	ad 200 ml
Trypsin-Stammlösung	Trypsin	25% (V/V)
	PBS	75% (V/V)
Wasserstoff-Peroxid- Lösung (0,3%)	H ₂ O ₂	0,6 ml
	H ₂ O	

4.2 Chemikalien

Die Laborchemikalien zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Bezugsquellen weiterer Chemikalien (Tabelle 2):

Tabelle 2: Chemikalien.

Produkt	Hersteller
ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz)	Vector (Burlingame, CA, USA)
Albumin-Standard	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
Bisbenzimid Hoechst 33258	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
BSA (bovines Serum Albumin)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
D-Cysteinhydrochloridmonohydrat	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector (Burlingame, CA, USA)
Echtgrün (FCF)	ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (1%)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formalin-Stammlösung (37%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Goldner Lösung I (Ponceau-Säurefuchsin)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Goldner Lösung II (Phosphorwolframsäure-O)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Goldner Lösung III (Lichtgrün SF)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Papain	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Paraffin-Granulat „Roti Plast“	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pierce-BCA-Protein-Assay-Reagent-A	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (1%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Toluidinblau (1%)	Morphisto (Frankfurt am Main, Deutschland)
Tusche, schwarz	Pelikan (Hannover, Deutschland)
Wasserstoff-Peroxid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

Xylol	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz)	Vector (Burlingame, CA, USA)
Albumin-Standard	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
Bisbenzimid Hoechst 33258	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific (Rockford, Illinois, USA)
BSA (bovines Serum Albumin)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	Fluka (Buchs, Schweiz)
D-Cysteinhydrochloridmonohydrat	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

4.3 Biologische Materialien

4.3.1 Versuchstiere

Die sechs ausgewachsenen, weiblichen Merinoschafe (Alter 2-4 Jahre, durchschnittliches Körpergewicht: $61,7 \pm 5,1$ kg) wurden vom Landesschafzuchtverband Sachsen-Anhalt e.V. in Halle an der Saale (Deutschland) bezogen.

4.3.2 Antikörper und Enzyme

Folgende monoklonalen Antikörper und Enzyme wurden zur immunohistochemischen Auswertung verwendet (Tabelle 3):

Tabelle 3: Antikörper.

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Anti-Typ-I-Kollagen	Maus	Abcam plc. (Cambridge, Großbritannien)
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)
Anti-Maus-IgG (biotinyliert)	Ziege	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Trypsin	-	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

4.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.4.1 Laborgeräte

Neben allgemeinen Laborgeräten wurden folgende Spezialgeräte verwendet (Tabelle 4):

Tabelle 4: Geräte.

Gerät	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, Großbritannien)
Canon Powershot A480	Canon (Neu-Isenburg, Deutschland)
Digitalkamera CC-12 (auf Mikroskop BX-45)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Einbettmaschine EG 1140-C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Gefrierschrank -20°C	Bosch (Gerlingern-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank -74°C Platinum 550	Angelantoni Industrie (Massa Martana PG, Italien)
GENios microplate reader	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Inkubator CB 150 (37°C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Magnetrührer RH basic 2	IKA (Staufen, Deutschland)
Mikrofokus-Computertomographie-Scanner	Skyscan (Kontich, Belgien)
Mikrofokus-Computertomographie-Röntgenröhre	Hamamatsu (Hamamatsu City, Japan)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop CK-2	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen; F-Profil	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mischplatte (Mixing Plate)	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
OptiPlate-96 Black	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Plattenabdeckung (Plate Sealer)	MD Bioproducts (Saint Paul, MN, USA)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
Plattenschüttler LabNet Orbit LS	Labnet (Woodbridge, NJ, USA)
Tischzentrifuge Qualitron Mikrozentrifuge	Krackeler Scientific (Albany, NY, USA)
Vortex Reagenzglasnischer 7-2020	neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
Waage EW-600-2M	Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 62°C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wärmeschrank 37°C	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad HI 1210	Leica (Nussloch, Deutschland)

4.4.2 Verbrauchsmaterialien

Die Firma Leica lieferte Klingen für das Rotationsmikrotom. Objektträger, Deckgläser, Metallkassetten sowie Plastikabdeckungen stammten von Roth (Karlsruhe, Deutschland). Plastikartikel und Glasbehälter wurden von Falcon (Beckton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich), Fisher (Schwerte, Deutschland), neoLab (Heidelberg, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

4.4.3 Computerprogramme

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Stata Software (Release 15, StataCorp., College Station, Texas, USA) und der SPSS Software (Version 24.0, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die Bilder des Mikro-CTs wurden mit der Software „NRecon“ (Skyscan, Kontich, Belgien) rekonstruiert, mit dem Programm „DataViewer“ (Skyscan) betrachtet und mit dem Programm „CT-Analyzer“ (Skyscan) ausgewertet. Die Bilder der histologischen Präparate wurden mit dem Programm „cellSens“ Version 1.12 (Olympus, Tokio, Japan) erstellt und mit „Adobe Photoshop CS6“ Version 6.1 (Adobe Systems, San José, CA, USA) zusammengefügt.

4.4.4 Operationsinstrumentarium und-materialien

Die osteochondralen Defektbohrungen wurden mit einem manuell betriebenen kanülierten Hohlbohrer der Firma Synthes (West Chester, PA, USA) durchgeführt. Nahtmaterial, Nadeln und Spritzen wurden von der Firma Braun (Melsungen, Deutschland) bezogen. Weiteres chirurgisches Instrumentarium bezogen wir über die Firmen A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz), Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen, Deutschland) sowie Megro (Wesel, Deutschland).

5. METHODEN

5.1 Überblick

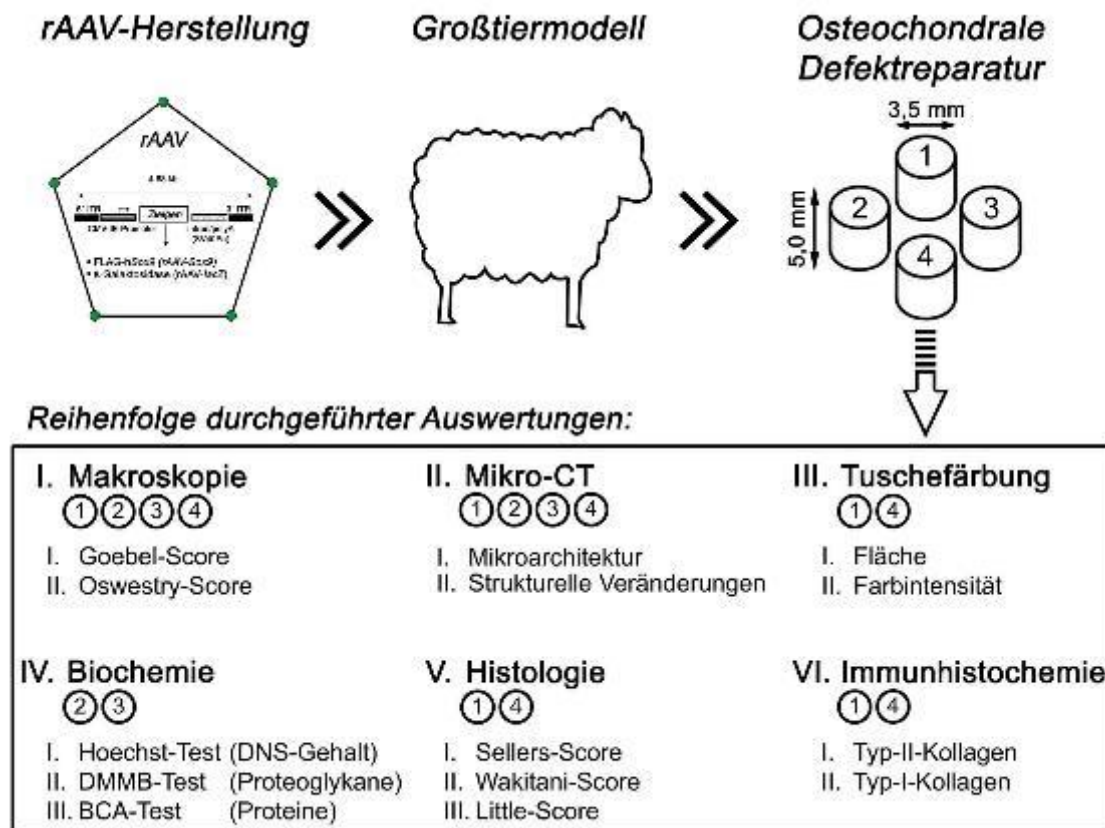


Abbildung 2: Versuchsübersicht und Auswertungsmethoden.

5.2 Herstellung der rAAV-Vektoren

Die Vektoren „rAAV-*lacZ*“ und „rAAV-*Sox9*“ wurden von Frau Prof. Dr. rer. nat. Cucchiarini im Vorfeld der Studie nach einem standardisiertem Protokoll in humanen embryonalen 293er-Nierenzelllinien hergestellt. Die Vektorpräparate wurden gereinigt und durch eine Echtzeit-PCR titriert, wodurch etwa 10^{10} transgene Kopien/ml, mit einem Verhältnis von viralem Partikel-zu-Funktionvektor von 500/1 entstehen (Madry *et al.*, 2003; Cucchiarini *et al.*, 2007; Venkatesan *et al.*, 2012; Cucchiarini *et al.*, 2013).

Mit rAAV-*lacZ*, welches als Kontrollbehandlung verwendet wurde, ist ein *lacZ*-Gen tragendes AAV-2-basiertes Plasmid bezeichnet, das für β -Galactosidase kodiert (Samulski *et al.*, 1987, 1989). Von rAAV-hSox9 wird statt der *lacZ*-Sequenz ein 1,7 kb großes FLAG-markiertes (cDNS)-Fragment „FLAG-hSox9“ des menschlichen humanen Transkriptionsfaktors Sox9 (hSox9) getragen (Institut für Humangenetik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg). Beide Transgene stehen unter der Kontrolle des Cytomegalovirus immediate-early (CMV-IE)-Promotors (Abbildung 3).

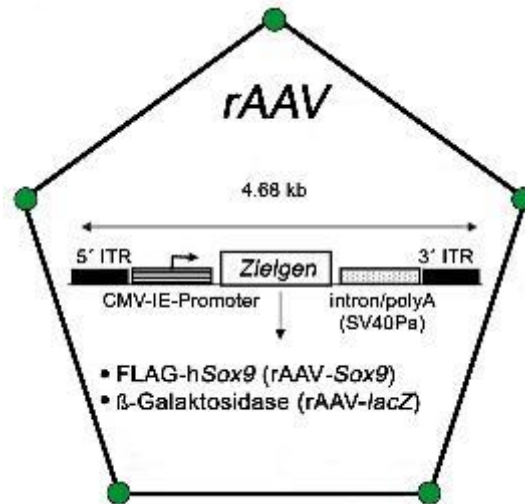


Abbildung 3: Therapeutische rAAV-Vektoren. ITR: Inverted Terminal Repeat Enden. CMV-IE: Cytomegalievirus Immediate Early Promoter. SV40Pa: Polyadenylierungssequenz des Simian Virus 40. lacZ: E.coli β-Galaktosidase-Gen. FLAG-hSox9: FLAG-markierte humane Sox9 cDNS.

5.3 Großtiermodell

Der Großtierversuch erfolgte nach Genehmigung der saarländischen Tierschutz-Kommission und in Übereinstimmung mit dem nationalen Recht für Tierschutz sowie der gültigen NIH Richtlinien für die Achtung und den Schutz von Versuchstieren („*guidelines for the care and use of laboratory animals*“, NIH Veröffentlichung 85-23, Revised 1985).

An der Studie nahmen sechs ausgewachsene, weibliche Merino-Schafe teil (Alter 2-4 Jahre, durchschnittliches Körpergewicht: 61,7 ± 5,1 kg). Präoperativ erfolgte der radiologische Ausschluss von arthrotischen Veränderungen in den Kniegelenken der Tiere. Die Schafe erhielten Wasser *ad libitum*, wurden nach einem standardisierten Ernährungsplan gefüttert und von einem Veterinärmediziner klinisch überwacht.

Die Operation der Tiere wurde von Prof. Dr. med. H. Madry und Priv. Doz. Dr. med. P. Orth in den Operationssälen des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie an der Universität des Saarlandes durchgeführt. Nach 12 Std. Fastenzeit wurden die Schafe mit 2% Rompun (Bayer, Leverkusen, Deutschland) pro 0,05 mg/kg Körpergewicht sediert und nach intravenöser Verabreichung von 4 mg/kg Körpergewicht Propofol (AstraZeneca, Wedel) und Caprofol 1,4 mg/kg Körpergewicht (Pfizer, Berlin) endotracheal intubiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose war durch Inhalation von 1,5% Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) und intravenöser Gabe von Propofol (6-12 mg/kg Körpergewicht/h) gegeben. Nach Rasur, sterilem Abwaschen und Abdecken der Hinterbeine stellten wir über eine mediale parapatellare Miniarthrotomie und lateraler Luxation der Patella in 60° Flexionsstellung die *Facies patellaris femoris* der beiden hinteren Kniegelenke dar (Orth, Madry, 2013). In deren

lateralen Gelenkflächen wurden mit einem manuell betriebenen kanülierten Bohrer je vier zylindrische osteochondrale Defekte in rautenförmiger Anordnung erzeugt (Durchmesser 3,5 mm; Tiefe 5,0 mm; n = 48). Nach Spülung der Defekte wurden alternierend pro Kniegelenk je 10 µl der Vektorlösung rAAV-*lacZ* (n = 24) oder rAAV-*Sox9* (n = 24) in die Defekte appliziert. Nach Reposition der Patella wurden die Kniegelenke schichtweise verschlossen. Postoperativ erfolgte eine Antibiotikaphylaxe durch Gabe von Amoxicillin/Clavulansäure (Pfizer; 30 mg/kg Körpergewicht). Zur Schmerzausschaltung erhielt jedes Tier 3 ml Fenpipramide/Levomethadon 0,25% (MSD, Unterschleißheim, Deutschland) intravenös und 1,8 mg/kg Körpergewicht Caprofen subkutan über einen Zeitraum von 2 Wochen appliziert. Postoperativ erfolgte weder eine Entlastung noch Ruhigstellung der operierten Gelenke.

Nach sechs Monaten *in vivo* wurden die Schafe narkotisiert, eingeschlafert und einer Sectio unterzogen. Die Kniegelenke wurden eröffnet, makroskopisch begutachtet und die Defektareale fotodokumentiert (Canon Powershot A480 mit Makrolinse; Neulsenburg, Deutschland). Der osteochondrale Block aus lateraler Schaf-Trochlea, der die vier Defekte enthielt, wurde in standardisierter Methode extrahiert. Bei zwei Defekten wurde mittels scharfem Löffel das Reparaturgewebe für die biochemischen Auswertungen entnommen. Anschließend wurden die Schaf-Trochleae für 24 Std. in 4%igem Formalin fixiert und in 70%igem Ethanol für die Mikro-CT Analysen aufbewahrt (Abbildung 2).

5.4 Makroskopische Auswertung des Reparaturgewebes

Die makroskopische Auswertung der Reparaturgewebe erfolgte verblindet anhand zweier etablierter Bewertungssysteme.

5.4.1 Makroskopisches Bewertungssystem

Die erste Evaluation erfolgte nach einem für experimentelle Ansätze entwickelten komplexen, inversen Bewertungssystems (Goebel *et al.*, 2012). Hierbei können in fünf verschiedenen Kategorien insgesamt 20 Punkte vergeben werden (Tabelle 5). Defekte ohne jegliches Reparaturgewebe erzielten 20 Gesamtpunkte, wohingegen Defekte mit einer kompletten Regeneration und normalem Knorpel 0 Punkte erzielten.

Tabelle 5: Makroskopisches Bewertungssystem zur Begutachtung der Knorpelreparatur (Goebel *et al.*, 2012).

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Farbe des Reparaturgewebes	Hyalin oder weiß	0
	Vorwiegend weiß (> 50%)	1
	Vorwiegend transparent (> 50%)	2
	Transparent	3
	Kein Reparaturgewebe vorhanden	4
2. Sichtbare Blutgefäße im Reparaturgewebe	Keine sichtbaren Blutgefäße	0
	< 25% des Reparaturgewebes	1
	25-50% des Reparaturgewebes	2
	50-75% des Reparaturgewebes	3
	> 75% des Reparaturgewebes	4
3. Oberflächenstruktur des Reparaturgewebes	Glatt, homogen	0
	Glatt, inhomogen	1
	Fibrillationen	2
	Inkompletter neuer Reparaturknorpel	3
	Kein knorpeliges Reparaturgewebe	4
4. Defektfüllung im Vergleich zum umgebenden Knorpel	Im Niveau	
	> 50% der Defekttiefe ausgefüllt oder hervorstehend	1
	< 50% der Defekttiefe ausgefüllt	2
	0% der Defekttiefe ausgefüllt	3
5. Oberflächenstruktur des angrenzenden Knorpels	Beschädigung des subchondralen Knochens	4
	Normal	0
	Risse und/oder Fibrillationen in der Integrationszone	1
	Diffuse arthrotische Veränderungen	2
	Ausbreitung des Defekts in den angrenzenden Knorpel	3

5.4.2 Oswestry-Bewertungssystem

Die zweite Evaluation erfolgte nach dem modifizierten Oswestry-Bewertungssystem (Smith *et al.*, 2005). Dieses wird im klinischen Alltag bei Arthroskopien angewandt. Auf die Evaluation der Steifigkeit des Reparaturgewebes wurde verzichtet (max. 8 Punkte; schlechtester Reparaturknorpel: 0 Punkte, bestmöglicher Reparaturknorpel: 8 Punkte) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Modifiziertes Oswestry-Bewertungssystem zur makroskopischen Begutachtung der Knorpelreparatur (Smith et al., 2005).

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung im Vergleich zum umgebenden Knorpel	Unterhalb	0
	Oberhalb	1
	Im Niveau	2
2. Integration mit dem benachbarten Knorpel	Größere Unterbrechungen (> 25% der Fläche)	0
	Kleinere Unterbrechungen (< 25% der Fläche)	1
	Vollständig	2
3. Oberflächenstruktur des Reparaturgewebes	Aufgefasert	0
	Inhomogen	1
	Glatt, homogen	2
4. Farbe des Reparaturgewebes	Gelber Knochen	0
	Weiß	1
	Hyalinartig	2

5.5 Micro-CT Analyse

Die Mikro-CT Analyse ist eine standardisierte Methode, um die Mikrostruktur des subchondralen Knochens morphometrisch zu analysieren und verschiedene Knochenstrukturparameter im Schafmodell bestimmen zu können (Orth et al., 2012b).

5.5.1 Micro-CT Darstellung

Die Schaf-Trochleae (n = 12) wurden in einem Mikro-CT-Scanner (Skyscan 1172) analysiert. Ausgestattet ist das Gerät mit einer drehbaren Abtastbühne, einer beweglichen 10 Mp Kamera sowie mit einer Mikrofokus-Röntgenröhre (Spotgröße < 5 µm; Hamamatsu, Japan). Diese ermöglicht eine größtmögliche Auflösung von 0,8 µm. Mit einer Röhrenspannung 70 kV, Stromstärke 139 µA und räumliche Auflösung von 15 µm wurden für jede Probe (in 70%igem Ethanol konserviert) zwischen 900-1200 16 bit Röntgenbilder erstellt. Ein 0,5 mm Aluminium/Kupfer-Filter wurde zwischen Röntgenstrahlenquelle und Detektor platziert. Die Kamera rotierte pro Röntgenbild 0,4° um die Probe (Belichtungszeit 2400 ms). Die Parameter *frame averaging*, *random movement* und *ring artifact correction* wurden entsprechend empirischer Vorversuche am Schafmodell mit den Werten 3, 15, 7 (jeweils ohne Einheit) gewählt. Durch einen modifizierten *Feldkamp Cone-Beam Algorithmus* (NRecon, Skyscan) wurden die Bilder

rekonstruiert (Feldkamp *et al.*, 1989). Für die Einstellung binärer Bilder wurden Graustufen-Schwellenwerte von 8 bzw. 255 gewählt. Aus Vorversuchen war bekannt, dass diese Schwellenwerte den Knochen im Vergleich zu den unbearbeiteten Rohbildern bestmöglich nachahmen. Die Knochenmineraldichte (*bone mineral density*; BMD) wurde anhand der ermittelten Grauwerte (Abschwächungskoeffizienten) errechnet. Als Eichparameter dienten zwei Calciumhydroxyapatit (CaHA)-Phantome (in 70%igem Ethanol konserviert) mit bekannten BMD-Werten von 250 und 750 mg CaHA/cm³ (Orth *et al.*, 2012b).

5.5.2 Definition der „*volumes of interest*“ (VOI)

Um die Mikroarchitektur des subchondralen Knochens zu ermitteln, wurden sechs verschiedene zweidimensionale *regions of interest* (ROIs) definiert, die nach dreidimensionaler Extrapolation in sechs *volumes of interest* (VOIs) resultieren. Die Grenzen der VOIs orientieren sich an den anatomischen Strukturen subchondrale Knochenplatte, Zementlinie und subartikuläre Spongiosa. Das Programm CT-Analyzer (CTAn, Skyscan) wurde zur Bearbeitung der Mikro-CT Bilder verwendet (Skyscan, 2008). Zur standardisierten Bewertung der Mikro-CT Bilder wurden je Probe jeweils drei VOIs in der subchondralen Knochenplatte und drei weitere in der subartikulären Spongiosa definiert (Abbildung 4). In der subchondralen Knochenplatte wurden folgende VOIs bestimmt: Die „subchondrale Knochenplatte Defekt“ (SKD) repräsentiert die Defektzone und schließt den apikalen Anteil des Bohrkanals ein (3,5 mm breit, analog der Breite des Knorpeldefekts). Die medial an die Defektzone angrenzende subchondrale Knochenplatte wurde als „subchondrale Knochenplatte medial“ (SKM) und die lateral anliegende Region als „subchondrale Knochenplatte lateral“ (SKL) definiert. Diese beiden Regionen der SKM und SKL wurde zur VOI „subchondrale Knochenplatte angrenzend“ (SKA) zusammengefasst. Die Unterteilung der subartikulären Spongiosa erfolgte analog zu der subchondralen Knochenplatte, wobei „subartikuläre Spongiosa Defekt“ (SSD) die Bohrkanäle umfasst und sich medial bzw. lateral davon die VOIs „subartikuläre Spongiosa medial“ (SSM) bzw. „subartikuläre Spongiosa lateral“ (SSL) anschließen. Letztere bilden dann gemeinsam wieder die „subartikuläre Spongiosa angrenzend“ (SSA). Zwei übereinanderliegende VOIs überschreiten die Eindringtiefe der Bohrlöcher von 5 mm nicht. Zudem verliefen die Grenzen der nebeneinanderliegenden VOIs parallel zueinander, wodurch eine Überschneidung verhindert wurde. Insgesamt wurden 72 VOIs (12 operierte Trochleae mit je sechs VOIs) definiert (Abbildung 4).

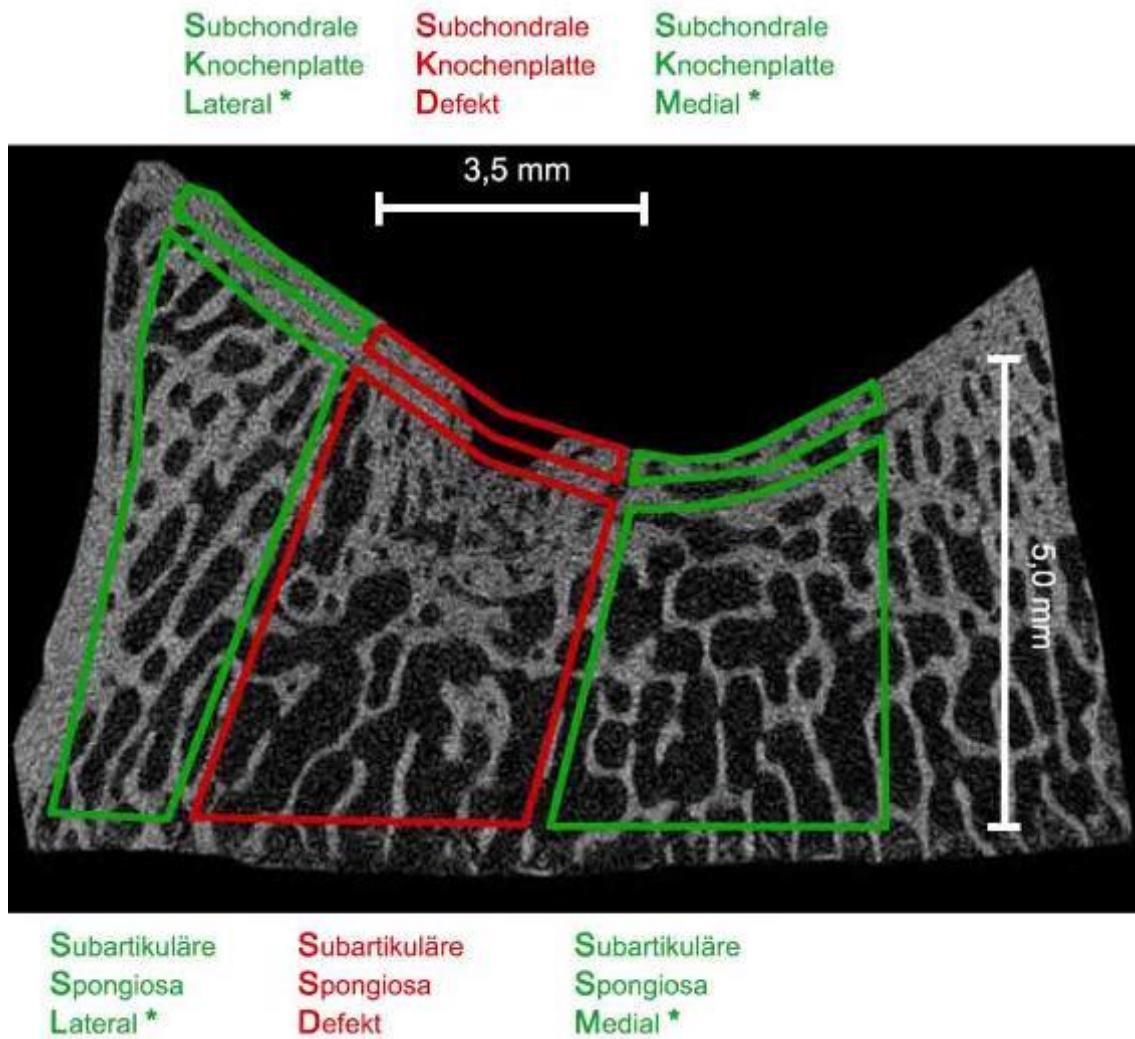


Abbildung 4: Schematik der „Volumes of Interest“ (VOI) und deren Maße. (*): SKL und SKM wurden zu SKA („subchondrale Knochenplatte angrenzend“), respektive SSL und SSM zu SSA („subartikuläre Spongiosa angrenzend“) zusammengefasst.

5.5.3 Micro-CT Parameter

Mit der CT-Analyzer-Software des Herstellers (CTAn, Skyscan) wurden für jede VOI folgende dreidimensionale Parameter (Nomenklatur der *American Society for Bone and Mineral Research*) berechnet:

- Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD)
- Knochenvolumenanteil (*bone volume fraction*, BV/TV)
- Knochenoberfläche/Volumen Verhältnis (*bone surface/volume ratio*, BS/BV)
- Knochenoberflächendichte (*bone surface density*, BS/TV).

In der subchondralen Knochenplatte wurde zusätzlich die kortikale Dicke (*cortical thickness*, Ct.Th) bestimmt, wohingegen in der subartikulären Spongiosa folgende Parameter bestimmt wurden:

- Trabekeldicke (*trabecular thickness*, Tb.Th)
- Trabekelabstand (*trabecular separation*, Tb.Sp)
- Trabekulärer Knochen-Anordnungsfaktor (*trabecular pattern factor*, Tb.Pf)
- Trabekelanzahl (*trabecular number*, Tb.N)
- Struktur-Model-Index (*structure model index*, SMI)
- Grad der Anisotropie (*degree of anisotropy*, DA)
- Fraktale Dimension (*fractal dimension*, FD).

5.5.4 Strukturelle Veränderungen des subchondralen Knochens

Mit Hilfe der CT-Analyzer-Software des Herstellers (CTAn, Skyscan) wurden die Defekte auf das Vorhandensein von strukturellen, defektassoziierten Veränderungen des subchondralen Knochens untersucht (Tabelle 7; Abbildung 5).

Intraläsionale Osteophyten

Intraläsionale Osteophyten sind als fokale Knochenneubildungen definiert, die über das Niveau der Zementlinie in das Reparaturgewebe bzw. den Gelenkknorpel hineinwachsen (Orth *et al.*, 2013a).

Generalisiertes Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte

Das generalisierte Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte definiert die flächige Hochverlagerung der subchondrale Knochenplatte über das Niveau der Zementlinie (Orth *et al.*, 2012a).

Subchondrale Knochenzysten

Subchondrale Knochenzysten wurden in Anlehnung an das Bewertungssystem nach Hoemann *et al.* definiert (Hoemann *et al.*, 2005): Der horizontale Durchmesser einer pathologischen Knochenzyste beträgt mindestens den dreifachen horizontalen Durchmesser eines Bohrkanals (3,5 mm: $\geq 10,5$ mm horizontaler Durchmesser) (Eldracher *et al.*, 2014).

Tabelle 7: Deskriptive Erfassung der strukturellen Knochenveränderungen im Mikro-CT.

Strukturelle Veränderungen	Parameter
Intraläsionale Osteophyten	Gesamtanzahl
Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte	Inzidenz/Defekt [%] Höhe [mm]
Subchondrale Knochenzysten	Breite [mm]

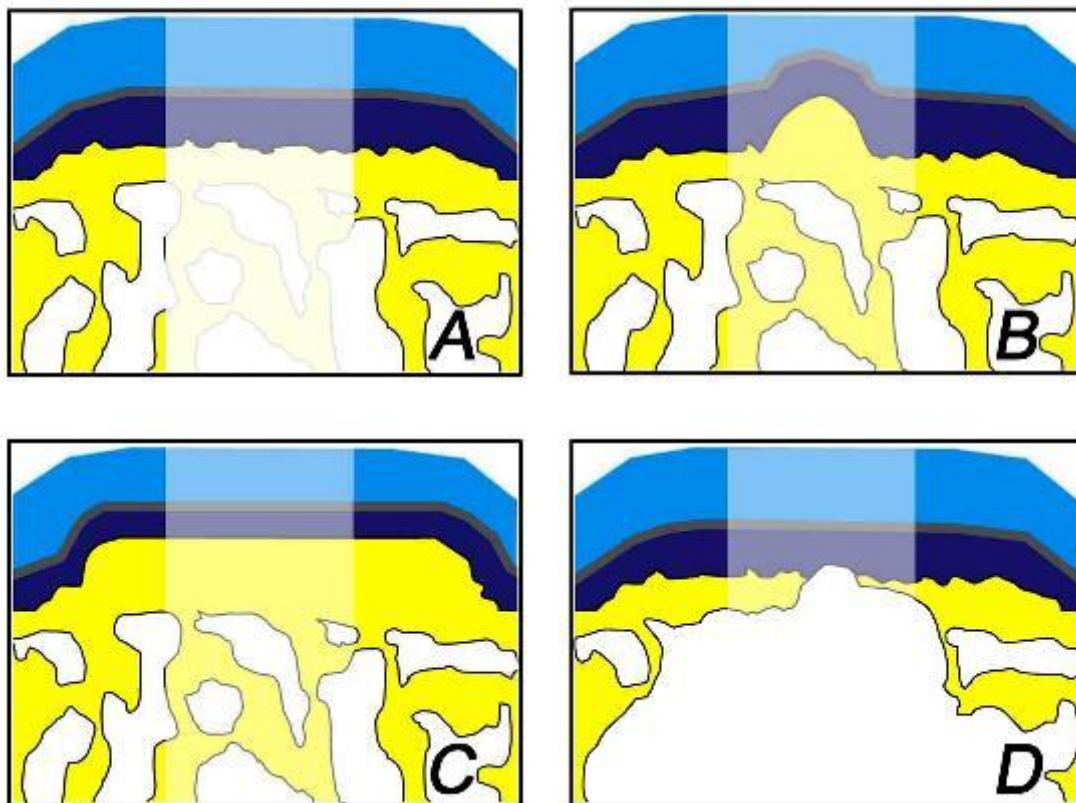


Abbildung 5: Strukturelle Veränderungen des subchondralen Knochens. A: Intakte osteochondrale Einheit. B: Intraläsionaler Osteophyt. C: Generalisiertes Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte. D: Subchondrale Knochenzyste (transparente Fläche = Defektzone, grau = Tidemark, blau = Gelenkknorpel, dunkelblau = kalzifizierter Knorpel, schwarze Linie = Zementlinie, gelb = subchondrale Knochenplatte mit darunterliegender subartikulärer Spongiosa).

5.6 Makroskopische Auswertung des angrenzenden Knorpels

Tusche färbt unregelmäßige, aufgeraute Knorpeloberflächen (arthrotische Degenerationen) schwarz (Meachim, 1972). Der an die Defekte angrenzende Gelenkknorpel wurde mit einem in Tusche getränkten Pinsel (Pelikan, Hannover,

Deutschland) bestrichen. Überschüssige Farbreste wurden mit einem weichen Papiertuch entfernt. Anschließend wurden die Defektareale fotodokumentiert und mit der AnalySIS-Software am Computer analysiert: Hierbei wurde das Defektareal virtuell geschwärzt und ein 1,5 mm kreisrunder Rahmen um die Defekte gesetzt. Arthrotische veränderte Areale wurden nun manuell umfahren und deren Fläche (mm²) sowie die Farbintensität (ohne Einheit) kalkuliert (Abbildung 6).

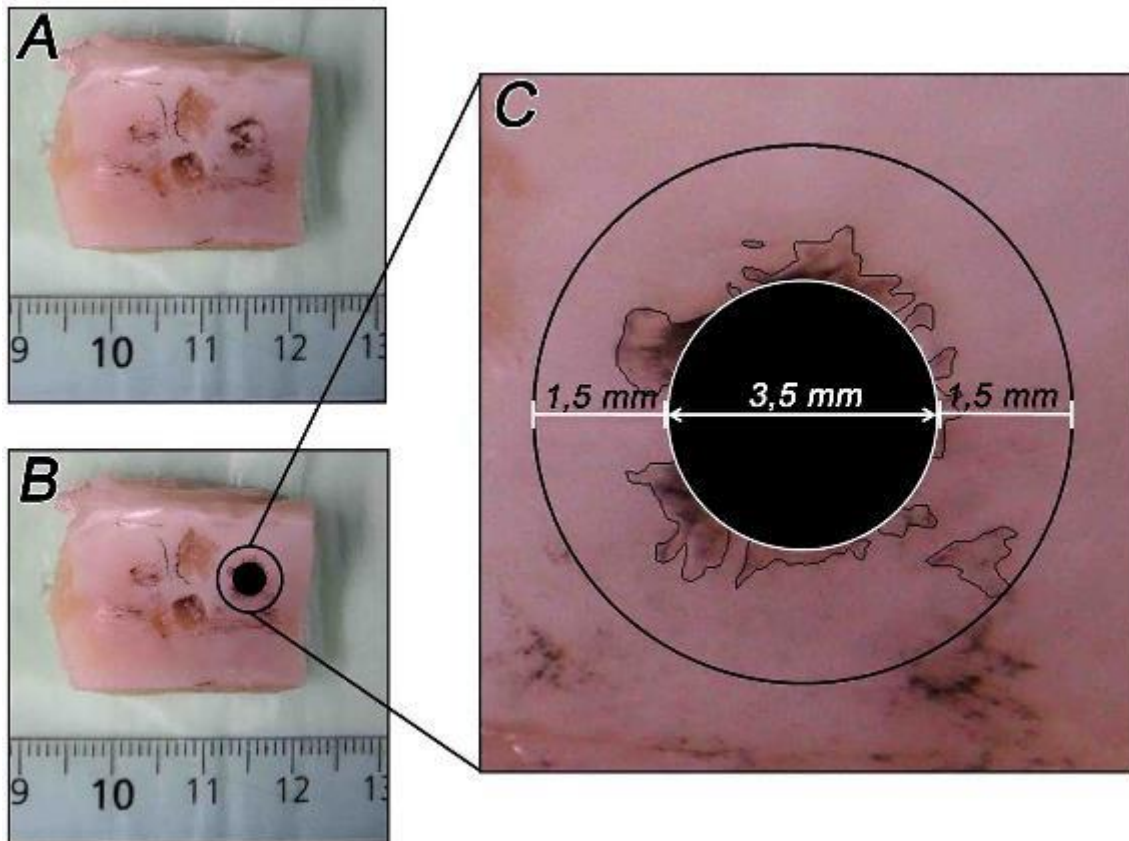


Abbildung 6: Beispiel eines mit Tusche gefärbten Präparats (A). Der Defekt wurde geschwärzt (B) und mit einem 1,5 mm breiten, kreisrunden Rahmen versehen, innerhalb dessen Fläche und Farbintensität der degenerativ veränderter Areale kalkuliert wurden (C).

5.7 Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes

Zur Bestimmung von Zellzahl (DNS-Test; Hoechst-33258-Test), Proteoglykan-Gehalt (Dimethylmethylenblau [DMMB]-Test) und Protein-Anteil (*Bicinchoninic acid* [BCA]-Test) wurden insgesamt 24 Proben (6 Tiere, je 2 Proben pro Kniegelenk) analysiert.

5.7.1 Papain-Verdau

Um die Knorpelproben biochemisch untersuchen zu können, mussten sie mit Papain verdaut werden. Hierzu wurde eine Papain-Lösung (25 mg/ml) mit PBS auf 0,5 mg/ml verdünnt. Jede Probe erhielt 400 µl von dieser hergestellten Lösung und wurde ü.N inkubiert (60°C).

5.7.2 DNS-Bestimmung (Hoechst-33258-Test)

Zur DNS-Bestimmung der Proben legten wir eine Standardreihe (A-F) in einer schwarzen Mikrotiterplatte an (Tabelle 8). Dazu pipettierten wir 10 µl der verdauten Probe und 90 µl des TNE-Puffers in die Vertiefungen. Die Hoechst 33258-Lösung wurde im Verhältnis von 1:500 mit TNE verdünnt. Lichtgeschützt wurden 100 µl der verdünnten Farbstofflösung verabreicht. Bei dieser zeit- und lichtabhängigen Reaktion interkaliert das Bisbenzimid Hoechst 33258 mit der DNS durch Bindung an das Basenpaar Adenin/Thymin (Brunk *et al.*, 1979). Mithilfe des *GENios plate readers* wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 365 nm die Emissionen der Wellenlänge von 458 nm detektiert. Bei bekanntem DNS-Gehalt des Standards erstellten wir eine Kalibrierungsgerade und berechneten dann den DNS-Gehalt der Proben (Tabelle 8).

Tabelle 8: Schema zur Herstellung der Standardreihe im Hoechst-Test.

Standard	A	B	C	D	E	F
DNS Standard	0 µl	5 µl	10 µl	20 µl	50 µl	90 µl
TNE	100 µl	95 µl	90 µl	80 µl	50 µl	10 µl
DNS-Gehalt	0 ng	50 ng	100 ng	200 ng	500 ng	900 ng

5.7.3 Proteoglykan-Bestimmung (DMMB-Test)

DMMB (Dimethylmethylenblau) bindet Chondroitinsulfate und Proteoglykane, womit deren photometrische Detektion möglich wird (Farndale *et al.*, 1986). Zur Herstellung der gepufferten DMMB-Lösung applizierten wir 16 mg DMMB in 5 ml 95%igem Ethanol und fügten 3 ml Ameisensäure sowie 25,6 ml 1 M Natriumhydroxid-Lösung hinzu. Die entstandene Flüssigkeit wurde bis auf 1 l Gesamtvolumen mit *aqua bidest* aufgefüllt (pH-Wert = 3,5; lichtgeschützt) (Muller, Hanschke, 1996). Anschließend setzten wir drei Lösungen an: Lösung A aus 0,05 g D-Cysteinhydrochloridmonohydrat mit 30 ml PBE, Lösung B aus 0,053 g Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz mit 1 ml Lösung A sowie Lösung C aus 24,95 ml Lösung A mit 0,05 ml Lösung B. Wir erstellten die Standardreihe (A-F mit je 40 µl Standard/Vertiefung) bei bekannten Chondroitinsulfat-Konzentrationen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Schema zur Herstellung der Standardreihe im DMMB-Test.

Standard	Herstellung des Standards	Konzentration
A	40 µl Lösung C	100 µg/ml
B	32 µl Lösung C + 8 µl Lösung A	80 µg/ml

C	24 µl Lösung C + 16 µl Lösung A	60 µg/ml
D	16 µl Lösung C + 24 µl Lösung A	40 µg/ml
E	8 µl Lösung C + 32 µl Lösung A	20 µg/ml
F	40 µl Lösung A	0 µg/ml

Anschließend führten wir Doppelbestimmungen in einer transparenten Mikrotiterplatte durch: Hierzu wurden dem Papain-angedautem Reparaturgewebe 10 µl entnommen und 30 µl von Lösung A zugegeben. Sowohl zur Probe als auch dem Standard fügten wir 250 µl DMMB Lösung zu. Mit Hilfe des *GENios plate readers* ermittelten wir die Absorption der Blaufärbung bei einer Wellenlänge von 530 nm. Bei bekannten Standardwerten wurde erneut eine Kalibrierungsgerade erstellt. Anhand dieser konnte der Proteoglykan-Gehalt in den Proben bestimmt werden.

5.7.4 Protein-Bestimmung (*bicinchoninic acid Test*; **BCA-Test**)

Das BCA Reagenz führt in Anwesenheit von Proteinen zu einem violetten Farbumschlag (Reaktion der zweiwertigen Kupferionen zur einwertigen Form) (Smith *et al.*, 1985). In einer transparenten Mikrotiterplatte legten wir wieder eine Standardreihe in Doppelbestimmung an (A-I mit je 25 µl Standardlösung) (Tabelle 10). Wir applizierten 3 µl des Papain-angedauten Reparaturgewebes sowie 200 µl des *working reagenz* (nach Herstellerangaben angesetzt Arbeitsreagenz) und vermischten die Lösungen mit einem Plattenschüttler. Die Proben wurden inkubiert (37°C; 30 Min) und unter Abdeckung auf Raumtemperatur abgekühlt. Es folgte die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 530 nm. Aus den Absorptionswerten der Standardreihe erstellten wir die Kalibrierungsgerade und bestimmten den Proteingehalt der Proben.

Tabelle 10: Schema zur Herstellung der Standardreihe im BCA-Test. Stammlösung: 2 mg BSA/ml.

Standard	H ₂ O	BSA	BSA-Konzentration
A	0 µl	75,0 µl Stammlösung	2000 µg/ml
B	31,3 µl	93,8 µl Stammlösung	1500 µg/ml
C	81,3 µl	81,3 µl Stammlösung	1000 µg/ml
D	43,8 µl	43,8 µl von B	750 µg/ml
E	81,3 µl	81,3 µl von C	500 µg/ml
F	81,3 µl	81,3 µl von E	250 µg/ml
G	81,3 µl	81,3 µl von F	125 µg/ml
H	100,0 µl	25,0 µl von G	25 µg/ml
I	100,0 µl	0 µl	0 µg/ml = Blank

5.8 Histologische Auswertung des Reparaturgewebes

5.8.1 Herstellung der histologischen Präparate

Die Schaf-Trochleae (n = 12) wurden unter regelmäßiger Erneuerung des Entkalkermediums für zwei Monate entkalkt. Anschließend erfolgte ein standardisierter Zuschnitt der Proben. Das zur biochemischen Auswertung verwendete Teilstück mit den zwei ausgekratzen Defekte wurde entfernt. Die zwei verbliebenen Defekte wurden separiert und mit *aqua bidest* gewaschen (2x 1 Std. und 1x ü.N.). Die Proben wurden dehydriert (aufsteigende Ethanolreihe: 70%, 2x 95%, 1x 100%, jeweils 1 Std. und 100% ü.N. und 1 Std. 100%), in Xylol gelagert (2x 1 Std.) und in flüssiges Paraffin überführt (62°C; 1 Std. und ü.N.). Die Proben wurden in mit flüssigem Paraffin gefüllte Metallkassetten eingebettet und ü.N. ausgehärtet. Ab dem Folgetag konnten 3 µm dicke histologische Schnitte mit einem Rotationsmikrotom (Leica) angefertigt werden. Diese wurden in ein warmes Wasserbad (24°C; 30 Min) überführt. Hiernach legten wir die Schnitte auf Albumin-beschichtete Objektträger und legten sie auf eine Wärmeplatte (42°C, 20 Min). Die Schnitte wurden ü.N. zur Aushärtung bei 62°C inkubiert.

5.8.2 Angewandte Färbemethoden

Die histologischen Färbungen wurden in 200 ml Glasbehältern durchgeführt.

Safranin-O-Färbung

Die Safranin-Orange Färbung (im Folgenden als Safranin-O-Färbung bezeichnet) wurde gemäß eines hierfür etablierten Protokolls durchgeführt (Kiernan, 1999): Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert (2x 5 Min) und hydriert (absteigende Ethanolreihe: 2x 100%, 2x 95%, 1x 80%, jeweils 2,5 Min). Anschließend wurden die Schnitte in Hämatoxylin-Lösung gebracht (10 Min), mit Leitungswasser gewaschen, in Echtgrün-Lösung gebadet (0,02%; 4 Min), 3x kurz in 1%ige Essigsäure getaucht und in 1%ige Safranin-O-Lösung (5 min) überführt. Nun folgte die Entwässerung der Präparate in umgekehrter Reihenfolge der oben beschriebenen Schritte zur Entparaffinierung und Hydrierung. Mithilfe des Roti Histokitt II (Roth) deckten wir die Schnitte luftdicht ein. Die Präparate wurden getrocknet und ü.N. unter einer Abzugshaube bei Raumtemperatur verwahrt. Safranin-O färbt Glykosaminoglykane im hyalinen Gelenkknorpel rot-orange. Die Farbintensität ist direkt proportional zum Glykosaminoglykangehalt der Proben und dient der semiquantitativen Detektion von Proteoglykanen. Zellkerne erscheinen violett-schwarz. Zytoplasma und Kollagen färben sich grün.

Toluidinblau-Färbung

Für die Toluidinblau-Färbung wurden die Schnitte wie zuvor in der Safranin-O-Färbung beschrieben entparaffiniert und hydriert. Danach platzierten wir die Schnitte in einer Nasskammer, applizierten die Toluidin-Blau-Lösung (1-2 Tropfen, 15 min) und spülten überschüssige Farbreste mit Leitungswasser ab. Die anschließende Entwässerung und Eindeckung der Schnitte erfolgte analog zur Safranin-O-Färbung. Toluidinblau färbt Glykosaminoglykane im hyalinen Gelenkknorpel blau. Die Farbintensität korreliert mit dem Gehalt an Proteoglykanen im Reparaturgewebe.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte wie zuvor in der Safranin-O-Färbung beschrieben entparaffiniert und hydriert. Danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser gewaschen, in Hämatoxylin-Lösung nach Harris gefärbt (10 min), unter Leitungswasser abgespült, in 1%iger Salzsäure differenziert und in Wasser gebläut (4 min, 60°C). Nach wiederholter Färbung in Hämatoxylin (2-3 min) und Spülung unter Leitungswasser brachten wir die Schnitte in eine Eosinlösung (1-2 min). Die abschließende Entwässerung und Eindeckung erfolgte analog zur Safranin-O-Färbung. Hämatoxylin färbt saure (basophile) Strukturen (DNS, Zellkerne) blau. Eosin färbt basisches (azidophiles) Strukturen (Proteine des Zellplasmas) rot.

Masson-Goldner-Färbung

Für die Masson-Goldner-Färbung wurden die Schnitte wie zuvor in der Safranin-O-Färbung beschrieben entparaffiniert und hydriert. Danach wurden die Schnitte in Eisenhämatoxylin-Lösung gefärbt (2-3 min) und in Leitungswasser gebläut (10 min). Anschließend erfolgte das Eintauchen der Schnitte in Goldner-Lösung-I (5 min), die Differenzierung in 1%iger Essigsäure, die Aufbewahrung in Goldner-Lösung-II (4 min) und die erneute Differenzierung in 1%iger Essigsäure. Mittels Goldner-Lösung-III führten wir die Gegenfärbung durch (5 min). Nach letztmaligem Auswaschen mit 1%iger Essigsäure (3 min) führten wir die Entwässerung und Eindeckung analog zur Safranin-O-Färbung durch. In der Masson-Goldner-Färbung erscheinen Zellkerne braunschwarz, das Zytoplasma rot und das umliegende Bindegewebe grün.

5.8.3 Bewertungssystem nach Sellers

Die histologische Auswertung des Reparaturgewebes erfolgte mittels zweier etablierter Bewertungssysteme. Bei 24 Defekten wurden insgesamt 216 Schnitte (mind. 9 Schnitte/Defekt) in jedem Bewertungssystem doppelt verblindet evaluiert (20-, 40- und 100-fache Vergrößerung).

Das komplexe, inverse Sellers-Bewertungssystem (Sellers *et al.*, 1997) analysiert acht Komponenten der Knorpelreparatur (max. 31 Punkte: leerer Defekt ohne jegliches Reparaturgewebe; 0 Punkte: hyaliner Gelenkknorpel mit vollständiger Reparatur) (Tabelle 11).

Tabelle 11: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur (Sellers et al., 1997).

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Defektfüllung in Relation zum angrenzenden gesunden Knorpel	91-110%	0
	76-90% oder 111-125%	1
	51-75%	2
	26-50%	3
	< 25%	4
2. Integration des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden gesunden Knorpel	Normale Kontinuität	0
	Verminderte Zellularität	1
	Spalte auf einer Seite	2
	Spalte auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbbarkeit mit Safranin-O	Normal	0
	Leicht vermindert	1

	Mittelstark vermindert	2
	Stark vermindert	3
	Keine Anfärbarkeit	4
4. Zellmorphologie	(a) normal	0
	(b) vorwiegend runde Zellen	
	Chondrozytenmorphologie:	
	75% der Zellen in Säulen in der Radiärzone	0
	25-75% der Zellen in Säulen in der Radiärzone	1
	< 25% der Zellen in Säulen in der Radiärzone	2
	(c) 50% runde Zellen	
	Chondrozytenmorphologie:	
	75% der Zellen in Säulen in der Radiärzone	2
	25-75% der Zellen in Säulen in der Radiärzone	3
	< 25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
	(d) vorwiegend Fibroblastenähnliche Zellen	5
5. Defektarchitektur ohne Berücksichtigung der Defektränder	Normal	0
	1-3 kleine Defekte	1
	1-3 große Defekte	2
	> 3 große Defekte	3
	Risse/Spalten	4
6. Oberflächenarchitektur	Normal	0
Fibrillation = Auffaserung der Oberfläche	Leichte Auffaserung	1
	Mittelstarke Auffaserung	2
	Starke Auffaserung	3
7. Neubildung von subchondralen Knochen unterhalb des Knorpelreparaturgewebes	90-100%	0
	75-89%	1
	50-74%	2
	25-49%	3
	< 25%	4
8. Tidemark	Vollständig	0
	75-99%	1
	50-74%	2
	25-49%	3
	< 25%	4

5.8.4 Bewertungssystem nach Wakitani

Das einfache, inverse Wakitani-Bewertungssystem (Wakitani *et al.*, 1994) betrachtet fünf Komponenten der Knorpelreparatur (max. 14 Punkte: leerer Defekt mit fehlender Reparatur; 0 Punkte: normales Knorpelgewebe mit kompletter Reparatur) (Tabelle 12).

Tabelle 12: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur (Wakitani *et al.*, 1994).

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Zellmorphologie	Hyaliner Knorpel	0
	Vorwiegend hyaliner Knorpel	1
	Vorwiegend Faserknorpel	2
	Vorwiegend Nicht-Knorpel-Gewebe	3
	Keinerlei Knorpelgewebe	4
2. Matrixanfärbbarkeit mit Safranin-O	Normal	0
	Leicht vermindert	1
	Deutlich vermindert	2
	Keine Färbung	3
3. Oberflächenbeschaffenheit	Glatt (> 3/4)	0
	Moderat (> 1/2-3/4)	1
	Irregulär (1/4-1/2)	2
	Massiv irregulär (< 1/4)	3
4. Knorpeldicke im Vergleich zum angrenzenden Knorpel	> 2/3	0
	1/3-2/3	1
	< 1/3	2
5. Integration des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden gesunden Knorpel	Beide Seiten integriert	0
	Eine Seite integriert	1
	Keine Seite integriert	2

5.8.5 Bewertungssystem nach Little

Die histologische Evaluation des an den Defekt angrenzenden Gelenkknorpels erfolgte unter Anwendung des etablierten Little-Bewertungssystems (Little *et al.*, 2010) (max. 25 Punkte: vollständig aufgebrauchter Knorpel; 0 Punkte: gesundes Knorpelgewebe) (Tabelle 13). Bei 24 Defekten wurden insgesamt 316 Schnitte (9 Schnitte/Defekt) doppelt verblindet evaluiert (20-, 40- und 100-fache Vergrößerung).

Tabelle 13: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung des an den Defekt angrenzenden Gelenkknorpels (Little et al., 2010).

Kategorie	Parameter	Punkte
1. Struktur (Beurteilung des schlechtesten Areal)	Normal	0
	Leichte Oberflächen-Irregularitäten (Oberfläche kaum zerrissen)	1
	Moderate Oberflächen-Irregularitäten (raue Oberfläche)	2
	Massive Oberflächen-Irregularitäten (Auffaserung <10% Tiefe)	3
	Fissuren bis zur Transitionalzone	4
	Fissuren bis zur radialen Zone	5
	Fissuren bis zur kalzifizierten Zone	6
	Erosionen/massive Fibrillationen bis zur mittleren Zone (1/3 Tiefe)	7
	Erosionen/massive Fibrillationen bis zur tiefen Zone (2/3 Tiefe)	8
	Erosionen massive Fibrillationen bis zur kalzifizierten Zone (vollständige Tiefe)	9
Erosionen/massive Fibrillationen bis zum Subchondralen Knochen	10	
2. Chondrozyten Dichte (Beurteilung des gesamten Areal)	Normal	0
	Erhöht oder leicht erniedrigt	1
	Moderat erniedrigt	2
	Massiv erniedrigt	3
	Keine Zellen	4
3. Zellklone (Beurteilung des gesamten Areal)	Normal	0
	Einzelne Duplets	1
	Viele Duplets	2
	Duplets und Triplets	3
	Multiple Zellnester oder keine Zellen	4
4. Safranin-O-Färbung (Beurteilung des schlechtesten Areal)	Normal	0
	Erniedrigte Färbung bis zu mittleren Zone (1/3 Tiefe)	1
	Erniedrigte Färbung bis zu tiefen Zone (2/3 Tiefe)	2
	Erniedrigte Färbung bis zu kalzifizierten Zone (ganze Tiefe)	3
	Keine Färbung	4
5. Tidemark/	Intakte Subchondraler Knochenplatte + eine <i>Tidemark</i>	0

Kalzifizierter	Intakte Subchondraler Knochenplatte + doppelte <i>Tidemark</i>	1
Knorpel/	Blutgefäße penetrieren die Subchondrale Knochenplatte	2
Subchondraler	Blutgefäße penetrieren die <i>Tidemark</i>	3
Knochen		
(Beurteilung des		
schlechtesten		
Areals)		

5.9 Immunhistochemischer Nachweis von Typ-I- und Typ-II-Kollagen

5.9.1 Färbemethodik

Die Schnitte wurden wie zuvor in der Safranin-O-Färbung beschrieben entparaffiniert und hydriert. Danach wurden diese mit Leitungswasser gewaschen (2x 1 min), in 0,3%ige Wasserstoff-Peroxid Lösung getaucht (H_2O_2 , 30 min bei Raumtemperatur), mit PBS-Lösung gespült (2x) und mit einer Trypsin-Lösung (0,1%) inkubiert (10 min bei 37°C). Darauf folgte die Spülung mit PBS-Lösung (5 min.) und Überführung in einen Blockierungspuffer (30 min, Raumtemperatur). In separaten Nasskammern wurden die Schnitte mit der entsprechenden Kollagen-Antikörper-Lösung beimpft: Hierbei wurden monoklonale primäre Kollagen-I-Antikörper (Verdünnung 1:400 in Blockierungspuffer) bzw. Kollagen-Typ-II-Antikörper (Verdünnung 1:200 in Blockierungspuffer) appliziert. Die Schnitte wurden nun bei Raumtemperatur inkubiert (1 Std.), mit PBS (2x) gespült und mit einem sekundären Antikörpern (biotinyliert; Verdünnung 1:200 in PBS) beimpft. Anschließend lagerten wir die Präparate in der Nasskammer (1 Std. bei Raumtemperatur) und entfernten Überstände mit PBS-Lösung (3x 5 min). Das nach Herstellerangaben vorbereitete ABC-Reagenz wurde hinzugefügt, die Objektträger bei Raumtemperatur inkubiert (30 min) und anschließend wieder mit PBS (3x 5 min) gespült. Es folgte die Applikation der DAB-Lösung (nach Herstellerangaben vorbereitet, für 7 min bei Raumtemperatur) und die Spülung mittels PBS-Lösung (3x 5 min). Die Schnitte wurden mit *aqua bidest* (1 min) gewaschen und analog zur Safranin-O-Färbung entwässert und eingedeckt.

Das Anheften der Peroxidase des ABC-Reagenz an sekundären Antikörpern bewirkt einen braunen Farbumschlag. Die Intensität der Färbung ist proportional zum Gehalt des des entsprechenden Kollagens (Orth *et al.*, 2015).

5.9.2 Bewertungssystem

Die Immunreaktivität des Reparaturgewebes auf Typ-I- und Typ-II-Kollagen beurteilten wir mit Hilfe eines semiquantitativen Bewertungssystems. Die Intensität der Braunverfärbung diente hierbei jeweils als der Indikator für den Kollagengehalt in den Proben (Orth, 2008). Bei der Typ-I-Kollagen-Anfärbung fungierte der subchondrale Knochen als Positivkontrolle und der normale Gelenkknorpel als Negativkontrolle. Bei der Typ-II-Kollagen-Anfärbung wurde umgekehrt verfahren. Entsprechend der Farbintensität zur Positivkontrolle wurden Punktzahlen von 0 bis 4 vergeben (Tabelle 14). Unter Verblindung beurteilten wir jeweils einen histologischen Schnitt pro Defekt bei 20- und 40-facher Vergrößerung.

Tabelle 14: Bewertungssystem zur Beurteilung der Immunreaktivität.

Punktzahl	Farbintensität entsprechend der Immunreaktivität (stets im Vergleich zur Positivkontrolle)
0	keine Immunreaktion
1	signifikant reduzierte Immunreaktion
2	moderat reduzierte Immunreaktion
3	gleiche Immunreaktion
4	höhere Immunreaktion

5.10 Statistische Auswertung

Die erhobenen Zahlenwerte wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Werte, die der Normalverteilung unterlagen, wurden mit einer Varianzanalyse (*mixed general linear model with repeated measures analysis of variance*) verglichen. Diesen Teil der statistischen Auswertung führte D. Zurakowski, Ph.D, Department of Biostatistics, Harvard University (Boston, MA, USA) mit Hilfe der Stata Software (Release 15, StataCorp., College Station, Texas, USA) durch.

Werte, die nicht der Normalverteilung unterlagen, wurden in den entsprechenden Fällen mit dem „Mann-Whitney-U-Test“ (unabhängige Werte) und dem „Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (abhängige Werte für Vergleiche in der Micro-CT Analyse) verglichen. Diesen Teil der statistischen Auswertung führten wir mit der SPSS-Software durch (Version 24.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

Einen P -Wert $< 0,05$ werteten wir in allen Fällen als statistisch signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse für normalverteilte Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SE) angegeben. Für nicht-normalverteilte Werte wurden die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

6. ERGEBNISSE

Im Ergebnisteil dieser Arbeit sind entsprechend der aufgestellten Hypothesen nachfolgend (1) die makroskopischen, histologischen, immunhistochemischen und biochemischen Auswertungen der Knorpelreparatur, (2) die Reparatur des subchondralen Knochens im Mikro-CT und (3) die Auswertungen von degenerativen Veränderungen in dem an den Defekt angrenzenden Gelenkknorpel nach sechs Monaten *in vivo* dargestellt.

6.1 Reparatur des Gelenkknorpels

6.1.1 Makroskopische Auswertung des Reparaturgewebes

Bei reizlosen Gelenkverhältnissen zeigten sich die vier gesetzten Knorpeldefekte stets identifizierbar und waren immer vom angrenzenden Gelenkknorpel abgrenzbar (Abbildung 7).

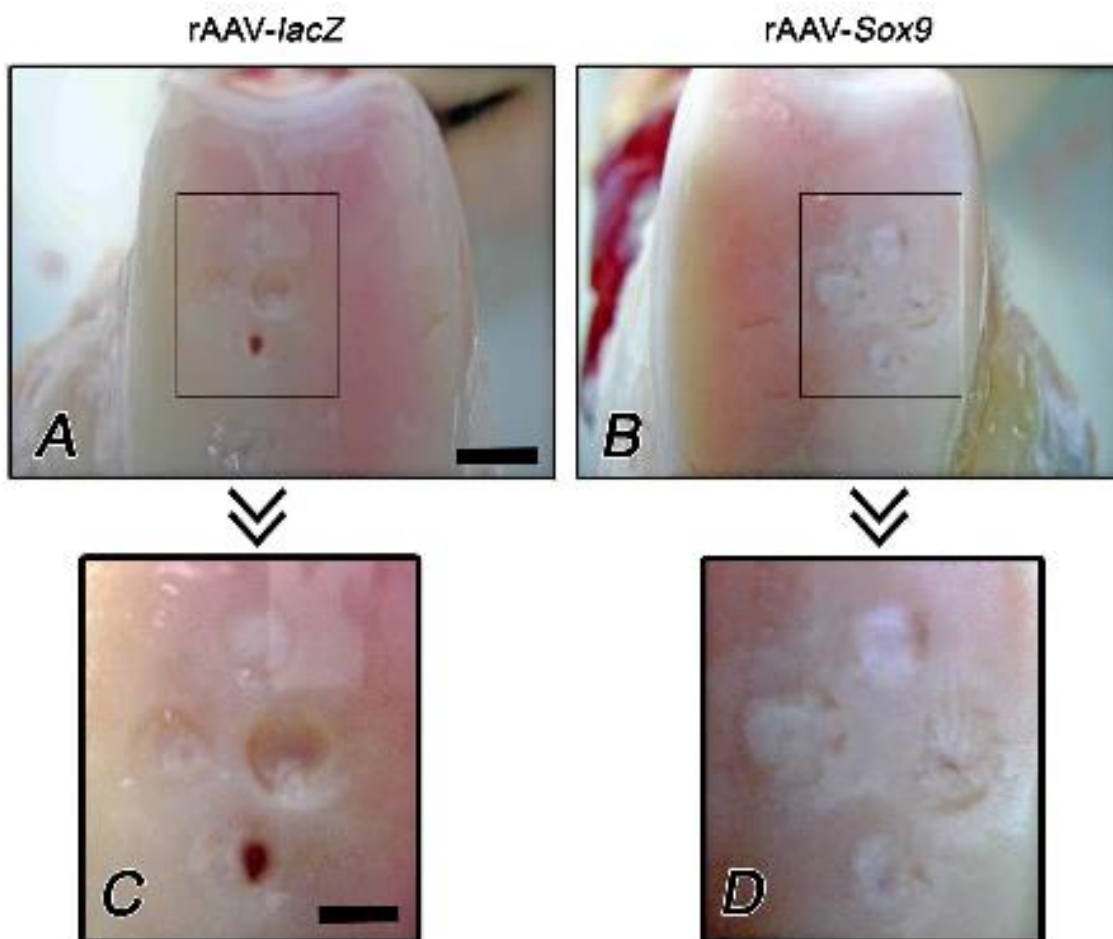


Abbildung 7: Repräsentative Übersichtsbilder der makroskopischen Knorpelreparatur. Die Auswahl der Bilder erfolgte anhand der Gruppenmittelwerte im komplexen Goebel-Bewertungssystem. Balken (A, B) = 10 mm, Balken (C, D) = 3,5 mm.

Makroskopisches Bewertungssystem nach Goebel

In beiden Defektgruppen zeigte das Reparaturgewebe eine weiße bis hyalinartige Farbe. Es integrierte sich unter Ausbildung von leichten Fibrillationen in den daran angrenzenden Gelenkknorpel. Die Reparaturoberfläche erschien glatt, aber inhomogen. Die *lacZ*-Kontrolldefekte waren zu über 50% wiederbefüllt und zeigten vereinzelt Blutgefäße auf (Abbildung 7: A, C). Die *Sox9*-behandelten Defekte waren größtenteils im Niveau des angrenzenden Knorpels wiederbefüllt, ohne Blutgefäße aufzuzeigen (Abbildung 7: B, D). Die *Sox9*-behandelten Defekte zeigten zwar bessere Einzelpunktwerte im Goebel-Bewertungssystem, erreichten aber nicht das Signifikanzniveau im makroskopischen Gesamtpunktwert gegenüber der *lacZ*-Kontrolldefekte aber nicht ($P = 0,096$) (Tabelle 15; Abbildung 8).

Tabelle 15: Ergebnisse des Bewertungssystems nach Goebel; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 20 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SE.

Kategorie	rAAV-<i>lacZ</i>	rAAV-<i>Sox9</i>	Mittlere Differenz (95% KI)	P-Wert
Farbe	0,87 \pm 0,15	0,65 \pm 0,10	0,22 (-0,16-0,59)	0,254
Blutgefäße	0,22 \pm 0,11	0,04 \pm 0,04	0,18 (-0,09-0,43)	0,193
Oberfläche	0,87 \pm 0,11	0,69 \pm 0,12	0,18 (-0,16-0,50)	0,304
Defektfüllung	0,65 \pm 0,15	0,26 \pm 0,09	0,39 (-0,04-0,81)	0,079
Benachbarter Knorpel	0,39 \pm 0,12	0,26 \pm 0,09	0,13 (-0,21-0,47)	0,444
Summe	3,00 \pm 0,40	1,91 \pm 0,20	1,09 (-0,19-2,34)	0,096

Makroskopisches Oswestry-Bewertungssystem

Bei der makroskopischen Evaluation im einfachen Oswestry-Bewertungssystem zeigten *Sox9*-behandelte Defekte eine signifikant bessere Integration zum daran angrenzenden Gelenkknorpel als *lacZ*-Kontrolldefekte ($P = 0,048$). Der bessere makroskopische Gesamtpunktwert in *Sox9*-behandelten Defekte erreichte aber auch hier nicht das Signifikanzniveau gegenüber der *lacZ*-Kontrolldefekte ($P = 0,286$) (Tabelle 16; Abbildung 8).

Tabelle 16: Ergebnisse des modifizierten Oswestry-Bewertungssystems; 8 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 0 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SE.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-Sox9	Mittlere Differenz (95% KI)	P-Wert
Defektfüllung	1,13 \pm 0,21	1,39 \pm 0,20	-0,24 (-0,96-0,48)	0,514
Integration	1,22 \pm 0,11	1,52 \pm 0,11	-0,30 (0,01-0,61)	0,048
Oberfläche	1,26 \pm 0,13	1,22 \pm 0,15	0,04 (-0,39-0,49)	0,822
Farbe	1,57 \pm 0,11	1,83 \pm 0,08	-0,26 (-0,57-0,06)	0,115
Summe	5,17 \pm 0,33	5,96 \pm 0,38	-0,79 (-2,11-0,62)	0,286

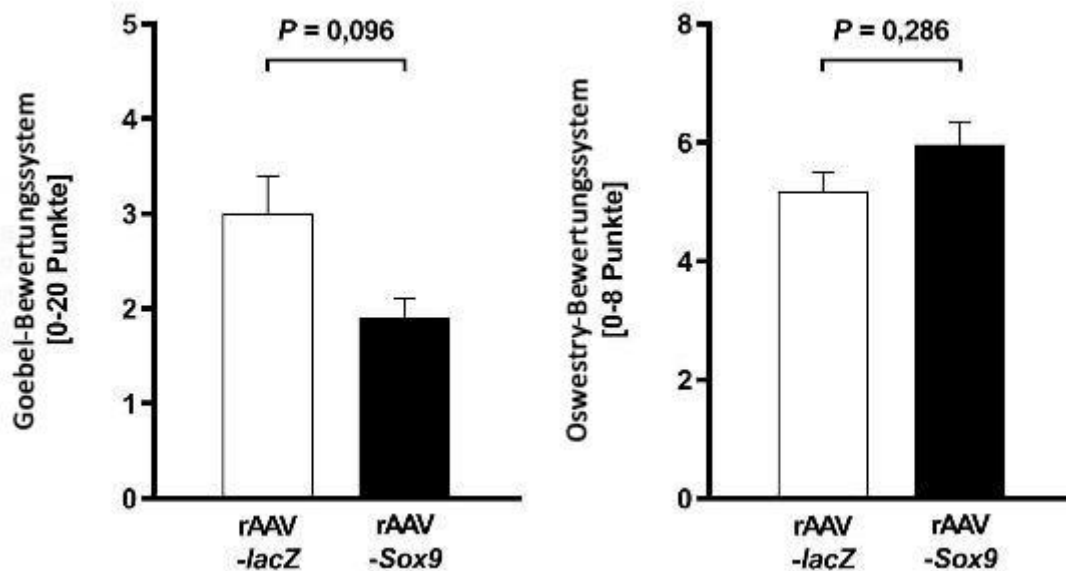


Abbildung 8: Gesamtpunktwerte in den makroskopischen Bewertungssystemen.

6.1.2 Histologische Auswertung des Reparaturgewebes

Die histologische Bewertung der Knorpelreparatur erfolgte unter Zuhilfenahme verschiedener Färbungen (Abbildung 9).

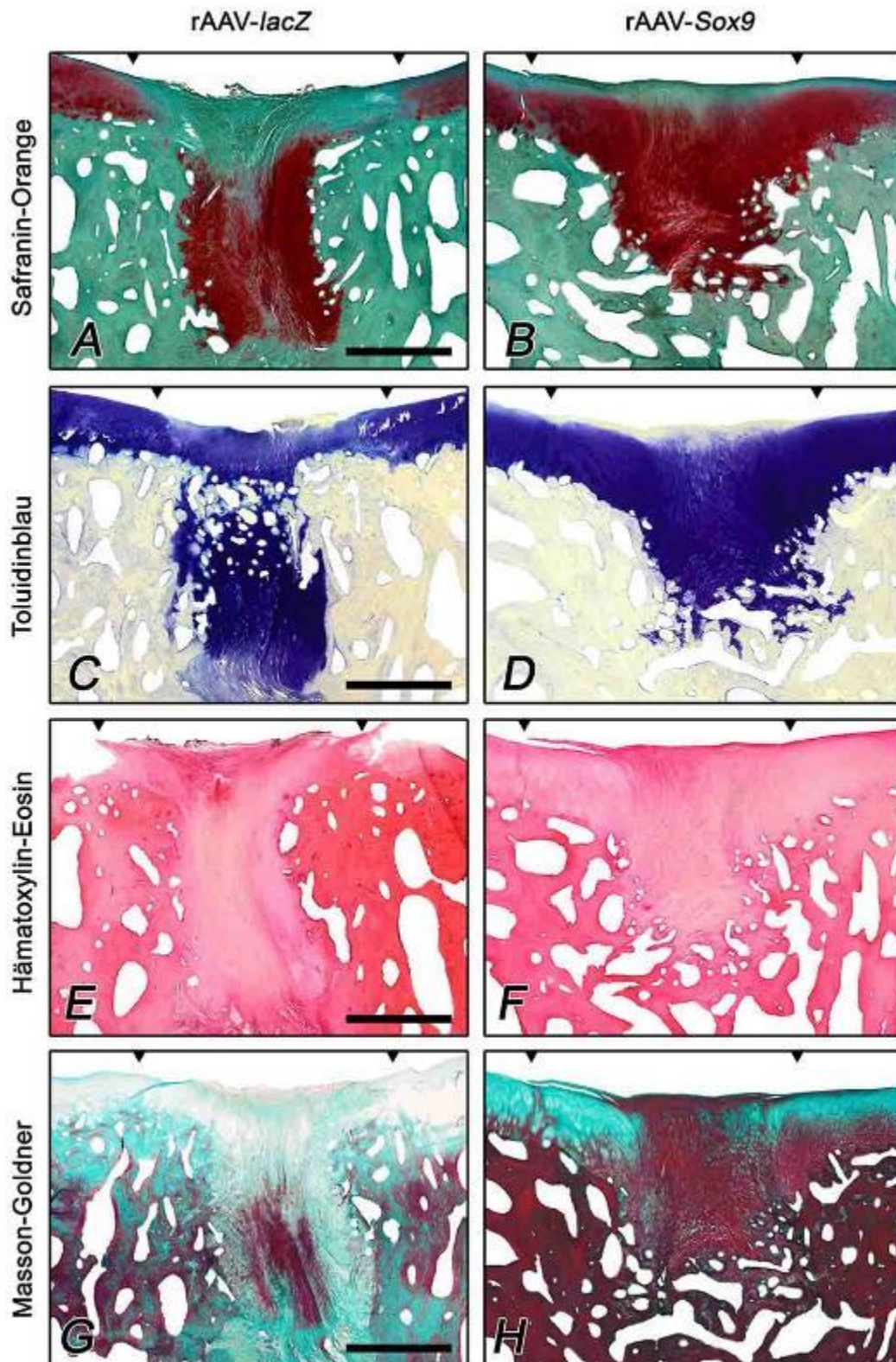


Abbildung 9: Repräsentative Übersichtsbilder der histologischen Knorpelreparatur. Die Auswahl der Bilder erfolgte anhand der Gruppenmittelwerte im komplexen Sellers-Bewertungssystem. Maßstabsbalken (A-H) = 1 mm.

Histologisches Bewertungssystem nach Sellers

Für die histologische Auswertung nach Sellers *et al.* sind exemplarisch die Defektbilder der beiden Gruppen in Safranin-O-Färbung dargestellt (Abbildung 10).

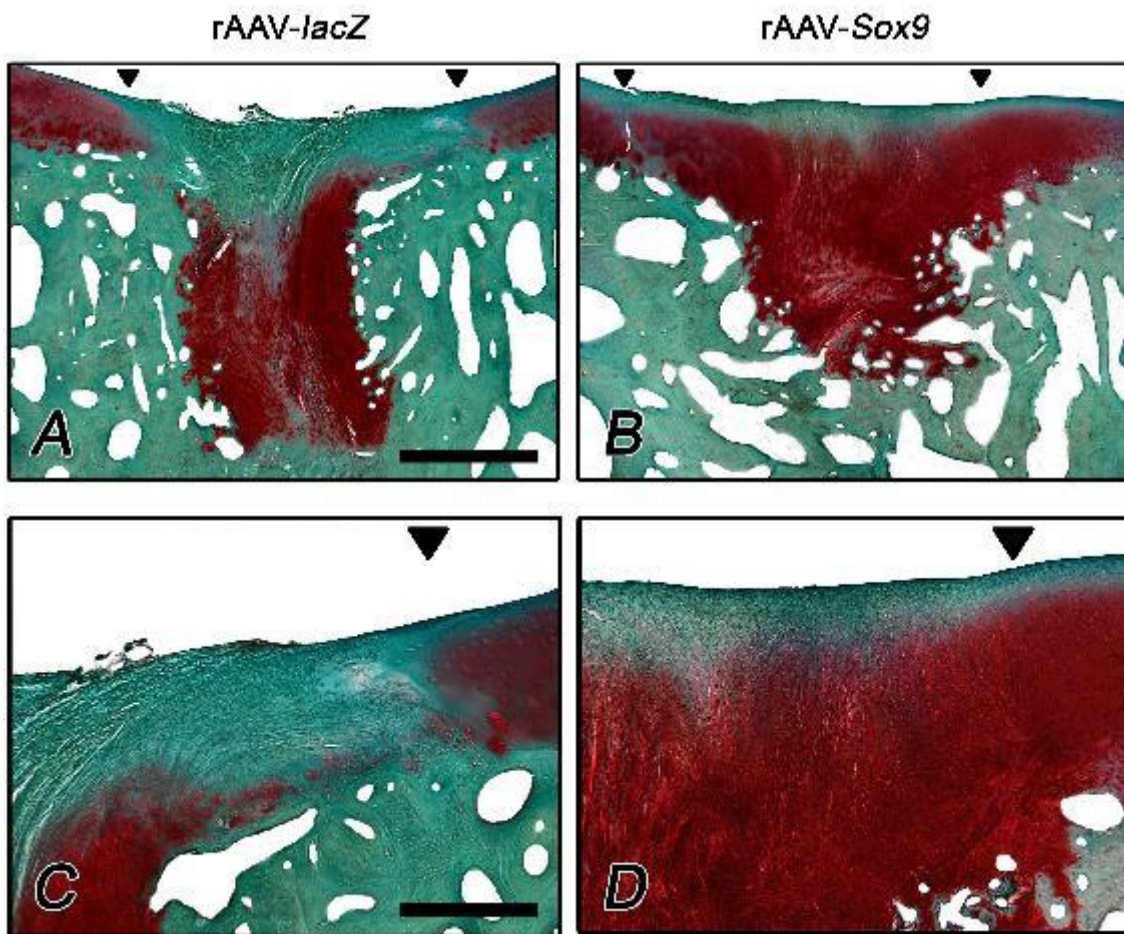


Abbildung 10: Repräsentative Übersichtsbilder der histologischen Knorpelreparatur in der Safranin-O-Färbung. Die Auswahl der Bilder erfolgte anhand der Gruppenmittelwerte nach dem Sellers-Bewertungssystem. Pfeilspitzen: Defektgrenzen; Balken (A, B) = 1 mm, Balken (C, D) = 200 μ m.

Das Reparaturgewebe integrierte sich in beiden Defektgruppen beidseitig unter verminderter Zellularität mit dem umliegenden Knorpel (Abbildung 10: C, D). Die *lacZ*-Kontrolldefekte waren zu über 76% wiederbefüllt. Ihre Oberfläche zeigte eine irreguläre Oberflächenbeschaffenheit mit moderaten bis starken Auffasserungen. Bei stark reduzierter Safranin-O-Matrixanfärbbarkeit im Reparaturgewebe und vorwiegend fibroblastenähnlichem Zellbild ähnelten weniger als 50% der Reparaturzellen runden Chondrozyten, von denen sich wiederum weniger als 25% in Säulen formierten. Das Reparaturgewebe beinhaltete mindestens drei kleine bis hin zu größeren strukturellen Defekten. Der subchondrale Knochen war zu weniger als 50% wiederhergestellt und die *Tidemark* zeigte sich nur spärlich regeneriert (Abbildung 10: A, C).

Die Sox9-behandelten Defekte waren zu über 90% wiederbefüllt, ohne die Defektgrenzen zu überschreiten. Ihre Oberfläche war von leichten bis moderaten Auffasserungen durchsetzt. Bei moderat verminderter Safranin-O-Matrixanfärbbarkeit im Reparaturgewebe zeigten sich vorwiegend runde, chondrozytenähnliche Zellen, von denen sich weniger als 25% in Säulen formierten. Das Reparaturgewebe beinhaltete weniger als drei kleine Defekte. Der subchondrale Knochen war zu über 50% und die *Tidemark* zu weniger als 25% wiederhergestellt (Abbildung 10: B, D).

Zusammenfassend zeigten Sox9-behandelte Defekte eine signifikant bessere Defektfüllung, Safranin-O-Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie, Defekt- und Oberflächenarchitektur, Rekonstitution des subchondralen Knochens, der *Tidemark* und des Gesamtpunktwertes im Sellers-Bewertungssystem als *lacZ*-Kontrolldefekte ($P \leq 0,002$) (Tabelle 17; Abbildung 11).

Tabelle 17: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Sellers; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 31 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SE.

Kategorie	rAAV-<i>lacZ</i>	rAAV-<i>Sox9</i>	Mittlere Differenz (95% KI)	P-Wert
Defektfüllung	1,26 \pm 0,10	0,51 \pm 0,10	0,75 (0,47-1,03)	<0,001
Integration	1,00 \pm 0,03	1,08 \pm 0,03	-0,08 (-0,16-0,00)	0,530
Matrixanfärbbarkeit	2,99 \pm 0,11	2,00 \pm 0,11	0,99 (0,67-1,31)	<0,001
Zellmorphologie	4,20 \pm 0,15	2,14 \pm 0,15	2,06 (1,64-2,49)	<0,001
Defektarchitektur	1,68 \pm 0,12	0,93 \pm 0,12	0,75 (0,41-1,09)	<0,001
Oberflächenarchitektur	2,54 \pm 0,09	1,74 \pm 0,09	0,79 (0,54-1,05)	<0,001
Subchondraler Knochen	2,63 \pm 0,14	1,99 \pm 0,14	0,64 (0,25-1,03)	<0,001
<i>Tidemark</i>	3,99 \pm 0,08	3,65 \pm 0,07	0,34 (0,13-0,54)	<0,002
Summe	20,29 \pm 0,55	14,05 \pm 0,54	6,24 (4,73-7,75)	<0,001

Histologisches Bewertungssystem nach Wakitani

Nach der histologischen Evaluation unter Verwendung des einfachen Wakitani-Bewertungssystems waren für Sox9-behandelte Defekte die Punktwerte für die histologische Zellmorphologie, Knorpeldicke und der Gesamtpunkt看wert signifikant besser als für lacZ-Kontrolldefekte ($P \leq 0,046$) (Tabelle 18; Abbildung 11).

Tabelle 18: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Wakitani; 0 Punkte vollständige Knorpelreparatur, 14 Punkte fehlende Knorpelreparatur; MW \pm SE.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-Sox9	Mittlere Differenz (95% KI)	P-Wert
Zellmorphologie	2,52 \pm 0,07	2,06 \pm 0,07	0,46 (0,01-0,92)	0,046
Matrixanfärbbarkeit	2,22 \pm 0,07	1,76 \pm 0,07	0,46 (-0,04-0,97)	0,072
Oberfläche	1,76 \pm 0,10	1,11 \pm 0,10	0,65 (-0,04-1,35)	0,064
Knorpeldicke	0,44 \pm 0,08	0,02 \pm 0,02	0,42 (0,04-0,79)	0,029
Integration	0,12 \pm 0,04	0,04 \pm 0,02	0,08 (-0,07-0,24)	0,296
Summe	7,07 \pm 0,25	4,99 \pm 0,19	2,08 (0,56-3,60)	0,007

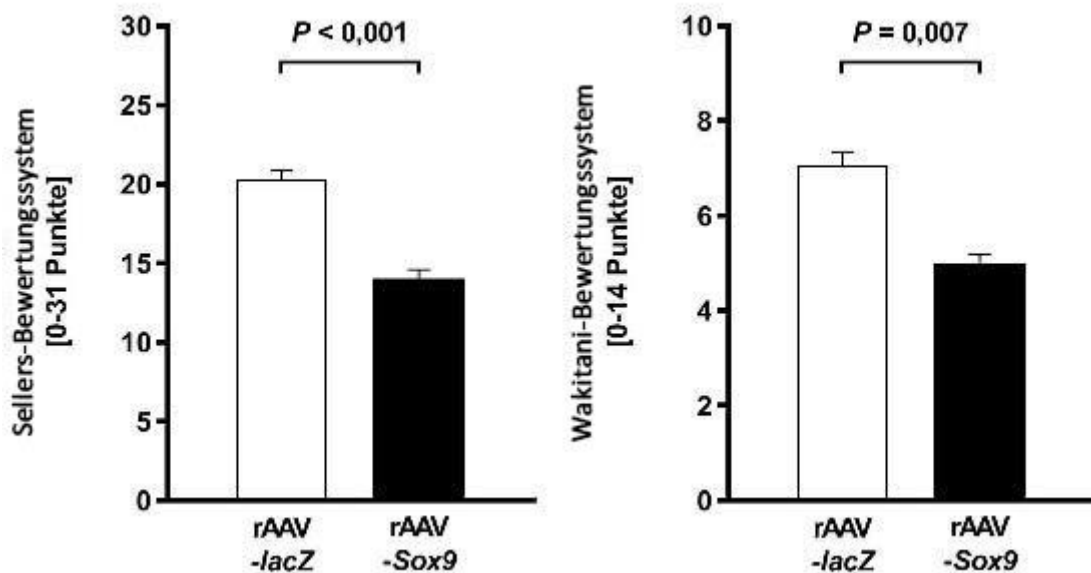


Abbildung 11: Gesamtpunkt看werte in den histologischen Bewertungssystemen.

6.1.3 Immunhistochemische Auswertung des Reparaturgewebes

Typ-II-Kollagen

Das Reparaturgewebe in *lacZ*-Kontrolldefekten war im Vergleich zur Positivkontrolle des angrenzenden Gelenkknorpels für Typ-II-Kollagen moderat schwächer anfärbbar (Punktwert: $2,00 \pm 0,32$) (Abbildung 12: E, G). Das Reparaturgewebe in Sox9-behandelten Defekte hingegen zeigte teilweise die gleiche Anfärbbarkeit für Typ-II-Kollagen im Vergleich zur Positivkontrolle des angrenzenden Gelenkknorpels (Punktwert: $2,58 \pm 0,32$) (Abbildung 12: E, G). Diese Verbesserung für Sox9-behandelte Defekte erreichte das statistische Signifikanzniveau nicht (1,3-facher Unterschied; $P = 0,210$; Abbildung 14).

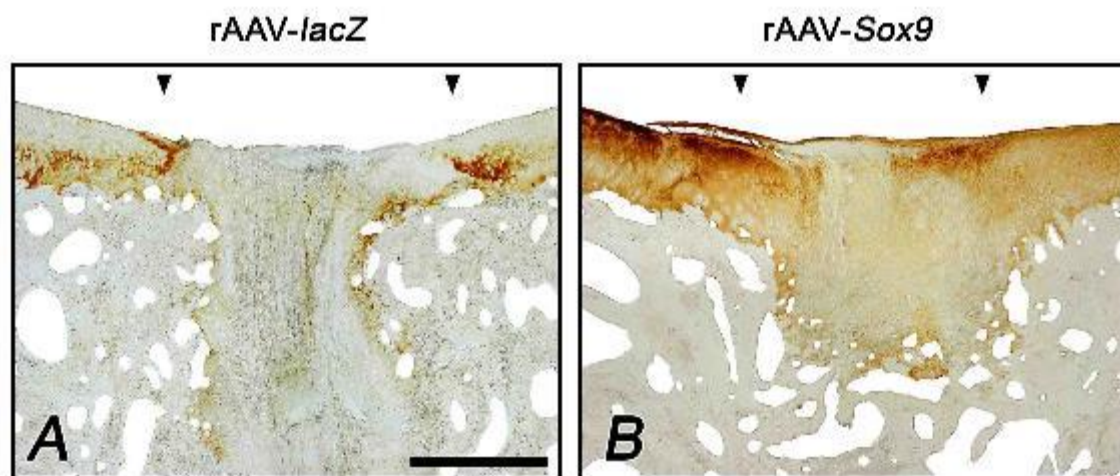


Abbildung 12: Darstellung der Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe. Die Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen war im Reparaturgewebe von *lacZ*-Kontrolldefekten (A) niedriger als in Sox9-behandelten Defekten (B). Die Auswahl der Bilder erfolgte anhand der Gruppenmittelwerte. Pfeilspitzen: Defektgrenzen; Balken (A, B) = 1 mm.

Typ-I-Kollagen

Das Reparaturgewebe in *lacZ*-Kontrolldefekten war im Vergleich zur Positivkontrolle des subchondralen Knochens für Typ-I-Kollagen moderat schwächer anfärbbar (Punktwert: $2,25 \pm 0,87$) (Abbildung 13: A, C). Das Reparaturgewebe in Sox9-behandelten Defekten hingegen zeigte eine signifikant schwächere Anfärbbarkeit für Typ-I-Kollagen im Vergleich zur Positivkontrolle des subchondralen Knochens (Punktwert: $0,83 \pm 0,94$) (Abbildung 13: B, D). Diese Verbesserung für Sox9-behandelte Defekte erreichte das statistische Signifikanzniveau (2,9-facher Unterschied; $P = 0,001$; Abbildung 14).

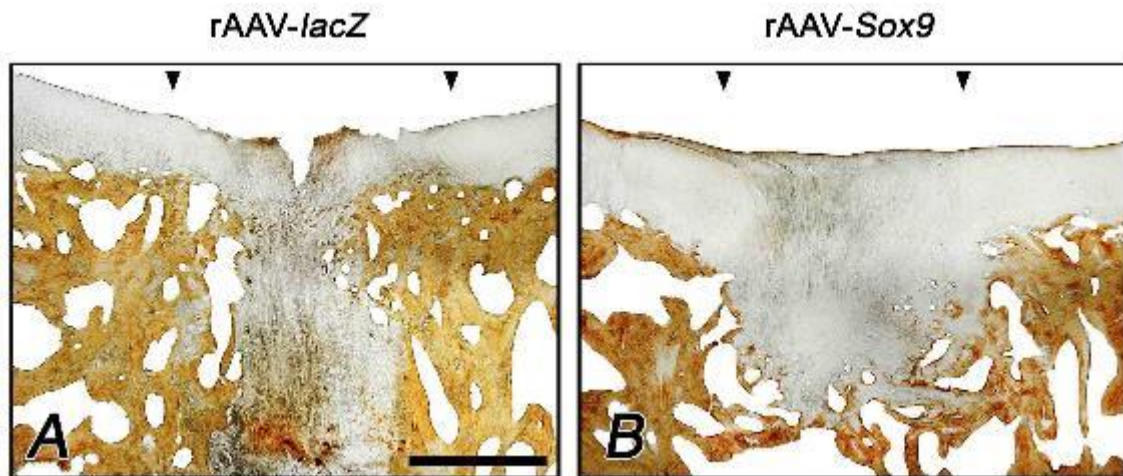


Abbildung 13: Darstellung der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe. Die Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen war im Reparaturgewebe von lacZ-Kontrolldefekten (A) signifikant höher als in Sox9-behandelten Defekten (B). Die Auswahl der Bilder erfolgte anhand der Gruppenmittelwerte. Pfeilspitzen: Defektgrenzen; Balken (A, B) = 1 mm.

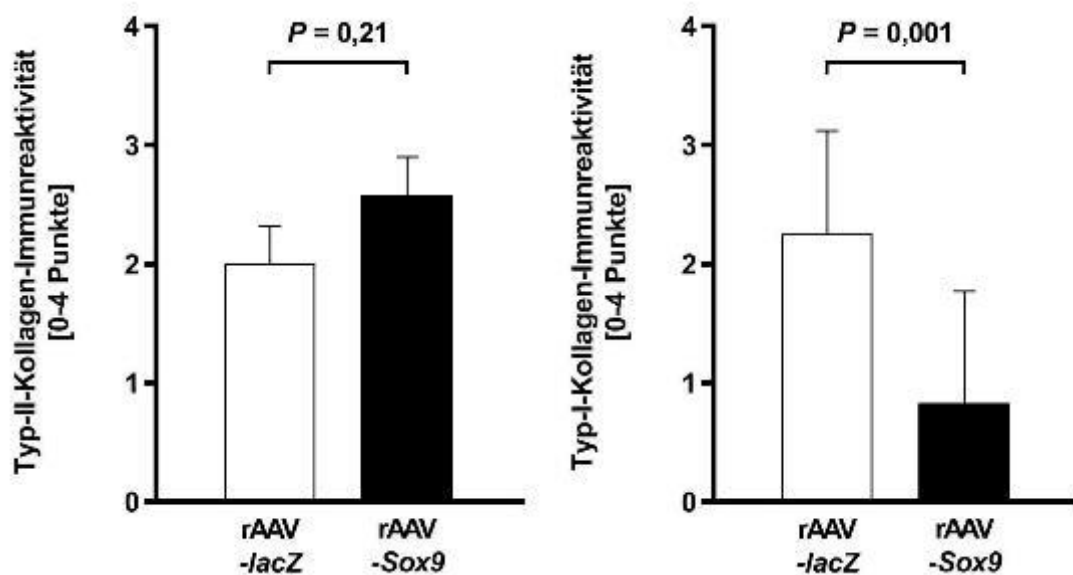


Abbildung 14: Punktwerte der Immunreaktivitäten für Typ-II/I-Kollagen im Reparaturgewebe.

6.1.4 Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes

Zur Quantifizierung der Reparaturgewebe bestimmten wir den Gesamtgehalt an Proteinen, DNS und Proteoglykanen. Die drei Messwerte setzten wir in Relation zueinander und bestimmten die Quotienten aus Proteoglykan/Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{mg}$), DNS/Gesamtprotein (ng/mg) und Proteoglykane/DNS ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) (Tabelle 19).

Tabelle 19: Ergebnisse der biochemischen Auswertung; MW \pm SD.

Kategorie	rAAV-lacZ	rAAV-Sox9	P-Wert
Proteoglykane pro Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	70,44 \pm 28,22	69,28 \pm 25,39	0,883
DNS pro Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,85 \pm 0,31	0,57 \pm 0,17	0,037
Proteoglykane pro DNS ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)	63,26 \pm 24,83	89,08 \pm 8,54	0,008

Proteoglykane pro Gesamtprotein

Der Gehalt an Proteoglykanen pro Gesamtprotein ($\mu\text{g}/\text{mg}$) war zwischen den Reparaturgeweben von *lacZ*-Kontrolldefekten und *Sox9*-behandelten Defekten nicht signifikant unterschiedlich ($P = 0,883$) (Abbildung 15; Tabelle 19).

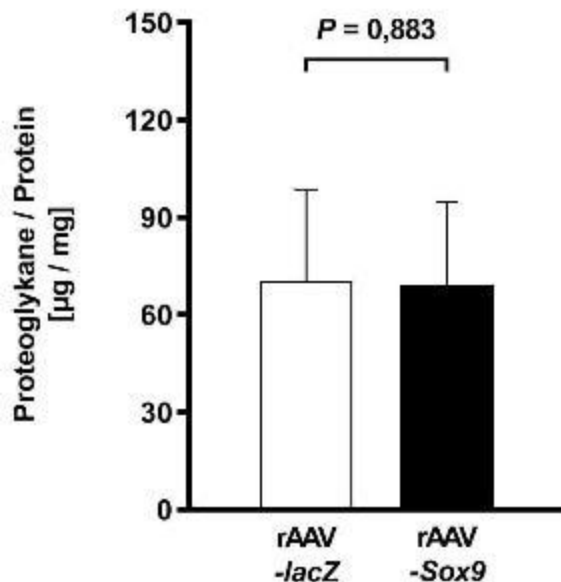


Abbildung 15: Ergebnisse Biochemie: Proteoglykane pro Gesamtprotein.

DNS pro Gesamtprotein

Der biochemisch bestimmte DNS-Gehalt pro Gesamtprotein diente als Indikator für die Zellzahl im Reparaturgewebe. Dieser zeigte sich im Reparaturgewebe von *lacZ*-Kontrolldefekten signifikant höher als in *Sox9*-behandelten Defekten (1,5-facher Unterschied; $P = 0,037$) (Abbildung 16; Tabelle 19).

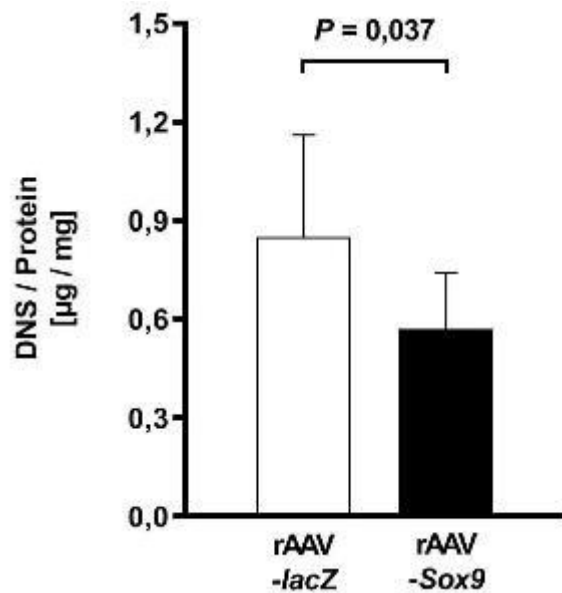


Abbildung 16: Ergebnisse Biochemie: DNS pro Gesamtprotein.

Proteoglykane pro DNS

Der Quotient aus den biochemisch bestimmten Proteoglykanen und DNS Gehalt dient als Indikator für die Matrixsyntheseleistung der Zellen im Reparaturgewebe. Dieser Indikator war im Reparaturgewebe von Sox9-behandelten Defekten signifikant höher als in lacZ-Kontrolldefekten (1,4-facher Unterschied; $P = 0,008$) (Abbildung 17; Tabelle 19).

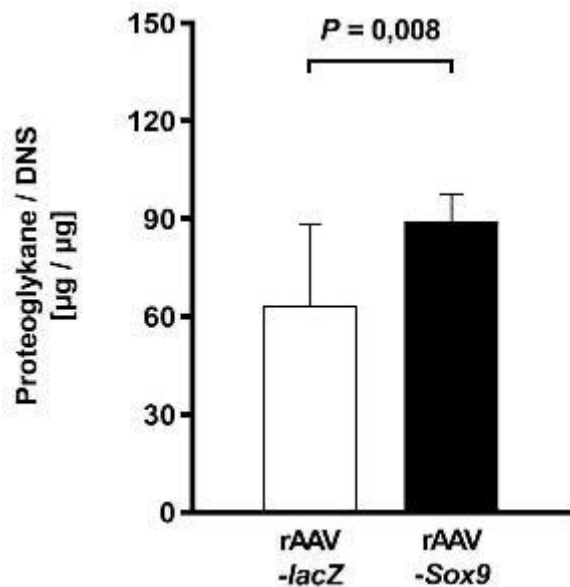


Abbildung 17: Ergebnisse Biochemie: Proteoglykane pro DNS.

6.2 Reparatur des subchondralen Knochens

Der neugebildete subchondrale Knochen im Defekt und der daran angrenzende subchondrale Knochen, wurde wie unter 5.5.2 beschrieben, in jeweils zwei VOIs der subchondrale Knochenplatte und subartikuläre Spongiosa unterteilt.

6.2.1 Mikro-CT Parameter im Defektareal

Analyse der subchondralen Knochenplatte im Defektareal

Im Vergleich der subchondralen Knochenplatte im Defektareal wiesen die Knochenstrukturparameter von *lacZ*-Kontrolldefekten und *Sox9*-behandelten Defekten keine signifikanten Unterschiede auf ($P \geq 0,150$) (Tabelle 20).

Tabelle 20: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse von subchondraler Knochenplatte im Defektareal; MW \pm SD.

Subchondrale Knochenplatte Defektareal			
Parameter	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV- <i>Sox9</i>	<i>P</i>
BMD [mg/cm ³]	299,74 \pm 65,51	267,84 \pm 43,39	0,522
BV/TV [%]	25,06 \pm 8,28	18,90 \pm 5,19	0,200
BS/BV [mm ⁻¹]	58,18 \pm 10,00	62,06 \pm 10,56	0,522
BS/TV [mm ⁻¹]	13,95 \pm 2,37	11,45 \pm 2,63	0,150
Ct.Th [mm]	0,18 \pm 0,04	0,18 \pm 0,04	0,936

Analyse der subartikulären Spongiosa im Defektareal

Auch bei der Auswertung der subartikulären Spongiosa im Defektareal zeigten sich keine signifikante Unterschiede zwischen den Knochenstrukturparametern von *lacZ*-Kontrolldefekten und *Sox9*-behandelten Defekten ($P \geq 0,200$) (Tabelle 21).

Tabelle 21: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse von subartikulärer Spongiosa im Defektareal; MW \pm SD.

Subartikuläre Spongiosa Defektareal			
Parameter	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV- <i>Sox9</i>	<i>P</i>
BMD [mg/cm ³]	345,07 \pm 50,53	379,28 \pm 48,31	0,337
BV/TV [%]	30,70 \pm 6,83	31,90 \pm 4,87	1,000
BS/BV [mm ⁻¹]	38,96 \pm 4,42	41,14 \pm 4,51	0,423

			Ergebnisse
BS/TV [mm ⁻¹]	11,79 ± 2,04	13,02 ± 1,73	0,337
Tb.Th [mm]	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,262
Tb.Sp [mm]	0,34 ± 0,14	0,31 ± 0,08	0,749
Tb.Pf [mm ⁻¹]	-11,96 ± 4,49	-13,61 ± 3,35	0,631
Tb.N [mm ⁻¹]	3,29 ± 0,63	3,62 ± 0,54	0,262
SMI	0,14 ± 0,57	0,12 ± 0,46	0,873
DA	0,23 ± 0,06	0,25 ± 0,02	0,200
FD	345,07 ± 50,53	379,28 ± 48,31	0,337

6.2.2 Veränderungen des angrenzenden subchondralen Knochens

Analyse der subchondralen Knochenplatte im angrenzendem subchondralem Knochen

Im Vergleich der Micro-CT Parameter der subchondralen Knochenplatte im an die Defekte angrenzendem subchondralen Knochen von *lacZ*-Kontrolldefekten und *Sox9*-behandelten Defekten waren die Knochenstrukturparameter nicht signifikant unterschiedlich ($P \geq 0,423$) (Tabelle 22).

Tabelle 22: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse von subchondraler Knochenplatte Angrenzend; MW ± SD.

Subchondrale Knochenplatte Angrenzend			
Parameter	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV- <i>Sox9</i>	<i>P</i>
BMD [mg/cm ³]	611,4 ± 91,49	635,44 ± 92,28	0,423
BV/TV [%]	68,56 ± 17,40	69,34 ± 16,38	0,522
BS/BV [mm ⁻¹]	37,99 ± 15,39	39,07 ± 14,37	0,749
BS/TV [mm ⁻¹]	23,62 ± 4,86	24,97 ± 4,18	0,423
Ct.Th [mm]	0,28 ± 0,09	0,28 ± 0,07	0,873

Analyse der subartikulären Spongiosa im angrenzendem subchondralem Knochen

Auch die Vergleiche der Micro-CT Parameter der subartikulären Spongiosa im an die Defekte angrenzenden subchondralem Knochen von *lacZ*-Kontrolldefekten und

Sox9-behandelten Defekten ergaben für die Knochenstrukturparameter keine signifikanten Unterschiede ($P \geq 0,109$) (Tabelle 23).

Tabelle 23: Ergebnisse der Mikro-CT Analyse in der angrenzenden subartikulären Spongiosa; MW \pm SD.

Subartikuläre Spongiosa Angrenzend			
Parameter	rAAV-lacZ	rAAV-Sox9	P
BMD [mg/cm ³]	407,40 \pm 55,46	425,67 \pm 90,20	0,522
BV/TV [%]	40,41 \pm 7,45	40,15 \pm 10,38	0,873
BS/BV [mm ⁻¹]	25,24 \pm 4,13	26,89 \pm 5,11	0,200
BS/TV [mm ⁻¹]	9,97 \pm 1,07	10,37 \pm 1,42	0,423
Tb.Th [mm]	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,149
Tb.Sp [mm]	0,31 \pm 0,05	0,32 \pm 0,08	0,873
Tb.Pf [mm ⁻¹]	-18,33 \pm 5,56	-21,63 \pm 6,72	0,150
Tb.N [mm ⁻¹]	3,30 \pm 0,56	3,50 \pm 0,78	0,423
SMI	-1,80 \pm 1,02	-2,16 \pm 1,53	0,109
DA	0,29 \pm 0,10	0,34 \pm 0,07	0,150
FD	2,40 \pm 0,06	2,42 \pm 0,05	0,631

6.2.3 Vergleich der Mikro-CT Parameter im Defektareal mit dem angrenzendem Areal

Vergleich der Mikro-CT Parameter der subchondralen Knochenplatte

Bei der gruppeninternen Gegenüberstellung von subchondraler Knochenplatte Defektareal mit der jeweils benachbarten intakten, subchondralen Knochenplatte zeigten sich signifikante Unterschiede für die Knochenstrukturparameter. Im Defektareal der beiden Gruppen waren signifikant reduzierte Werte der Knochenmineraldichte (BMD), kortikalen Dicke (Ct.Th), Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen (BV/TV) und Verhältnis von Knochenoberfläche zu Totalvolumen (BS/TV) nachweisbar ($P \leq 0,280$) (Tabelle 24). Demgegenüber zeigte das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV) statistisch signifikante höhere Werte in der subchondralen Knochenplatte des Defektareals der beiden Gruppen ($P = 0,280$) (Tabelle 24).

Tabelle 24: Gruppeninterner Vergleich der Mikro-CT Ergebnisse von subchondraler Knochenplatte im Defektareal mit der angrenzenden, subchondralen Knochenplatte.

Parameter	P-Wert	
	rAAV-lacZ	rAAV-Sox9
BMD [mg/cm ³]	0,028	0,028
BV/TV [%]	0,028	0,028
BS/BV [mm ⁻¹]	0,028	0,028
BS/TV [mm ⁻¹]	0,028	0,028
Ct.Th [mm]	0,027	0,028

Vergleich der Mikro-CT Parameter der subartikulären Spongiosa

Auch bei der gruppeninternen Gegenüberstellung von subartikulärer Spongiosa im Defektareal mit der benachbarten, intakten subartikulären Spongiosa waren signifikante Unterschiede nachweisbar. Im Defektareal der beiden Gruppen zeigten sich signifikant reduzierte Werte der Trabekeldicke (Tb.Th), Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen (BV/TV), *Structure-Model-Index* (SMI) und Grad der Anisotropie (DA). Der Messwert für Knochenmineraldichte (BMD) war nur innerhalb der lacZ-Kontrolldefekte signifikant niedriger gegenüber der angrenzenden subartikulären Spongiosa. Dies wurde in Sox9-behandelten Defekten für das Verhältnis Knochenoberfläche/Totalvolumen (BS/TV) und dem trabekulären Anordnungsfaktor (Tb.Pf) evaluiert. Demgegenüber zeigte das Verhältnis von Knochenoberfläche/Knochenvolumen (BS/BV) statistisch signifikant höhere Werte in der subartikulären Spongiosa der beiden Defektareale ($P \leq 0,028$) (Tabelle 25).

Tabelle 25: Gruppeninterner Vergleich der Mikro-CT Ergebnisse von subartikulärer Spongiosa im Defektareal mit der angrenzenden, subartikulären Spongiosa.

Parameter	P-Wert	
	rAAV-lacZ	rAAV-Sox9
BMD [mg/cm ³]	0,028	0,116
BV/TV [%]	0,028	0,028
BS/BV [mm ⁻¹]	0,028	0,028
BS/TV [mm ⁻¹]	0,116	0,028
Tb.Th [mm]	0,027	0,026
Tb.Sp [mm]	0,596	0,917
Tb.Pf [mm ⁻¹]	0,075	0,028

Tb.N [mm ⁻¹]	0,917	0,600
SMI	0,028	0,028
DA	0,027	0,026
FD	0,674	0,207

6.2.4 Strukturelle Veränderungen des subchondralen Knochens

In den insgesamt 24 Defekten pro Gruppe traten 25 intraläsionale Osteophyten in *lacZ*-Kontrolldefekten auf, wohingegen nur 17 intraläsionale Osteophyten in *Sox9*-behandelten Defekten nachweisbar waren (1,5-facher Unterschied; $P = 0,153$). Ein generalisiertes Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte trat jeweils in 4 Defekten der beiden Gruppen auf ($P = 0,500$). Subchondrale Knochenzysten waren in beiden Gruppen nicht nachweisbar (Tabelle 26; Abbildung 18).

Tabelle 26: Ergebnisse der deskriptiven Mikro-CT Analyse von strukturellen Veränderungen des subchondralen Knochens; MW \pm SD.

Strukturelle Veränderung	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV- <i>Sox9</i>	P-Wert
Subchondrale Knochenzysten			
Gesamtanzahl	0	0	n.e.
Intraläsionale Osteophyten			
Gesamtanzahl	25	17	n.e.
Inzidenz/Defekt [%]	100	71	0,153
Höhe [mm]	0,24 \pm 0,11	0,20 \pm 0,07	0,131
Breite [mm]	1,31 \pm 0,89	0,95 \pm 0,56	0,075
Voranschreiten der Knochenplatte			
Gesamtanzahl	4	4	n.e.
Inzidenz [%]	17	17	0,500
Höhe [mm]	0,43 \pm 0,17	0,54 \pm 0,24	0,276
Breite [mm]	2,66 \pm 0,71	4,34 \pm 0,31	0,005

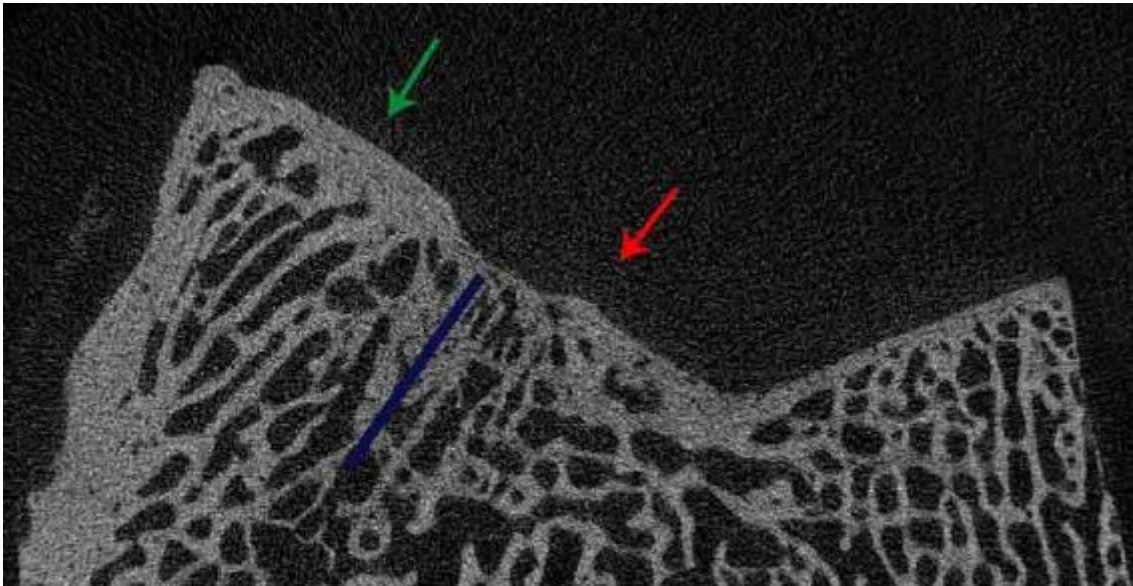


Abbildung 18: Knochenreparatur im Mikro-CT. Die Abbildung zeigt einen intraläsionalen Osteophyten (roter Pfeil) und das generalisierte Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte (grüner Pfeil) an den Defekträndern. Das subchondrale Defektareal war in beiden Defektgruppen (unvollständig) mit neugebildetem Knochen durchbaut (blaue Linie).

6.3 Degenerative Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels

Um zu prüfen, wie sich die osteochondralen Defektbohrungen auf die daran angrenzende osteochondrale Einheit auswirkten, wurden der angrenzende Gelenkknorpel makroskopisch (quantitativ) und histologisch (qualitativ) auf arthrotisch degenerative Veränderungen und sein subchondraler Knochen mikrocomputertomographisch (quantitativ) untersucht.

6.3.1 Makroskopische Evaluation degenerativer Veränderungen

Der an die Defekte angrenzende Gelenkknorpel zeigte hinsichtlich seiner Flächenausdehnung von mit Tusche anfärbbaren Arealen keine signifikanten Unterschied zwischen *lacZ*-Kontrolldefekten und *Sox9*-behandelten Defekten (*lacZ*-Kontrolldefekte: $13,85 \pm 10,88 \text{ mm}^2$ pro Defekt; *Sox9*-behandelte Defekte: $15,19 \pm 13,20 \text{ mm}^2$ pro Defekt; 1,1-facher Unterschied; $P = 0,862$) (Abbildung 19; Abbildung 20). Die Farbintensität dieser arthrotisch degenerativ veränderten Areale hingegen wies für *lacZ*-Kontrolldefekte signifikant höhere Werte auf (*lacZ*-Kontrolldefekte: $246,63 \pm 84,00$; *Sox9*-behandelte Defekte: $166,18 \pm 81,99$; jeweils ohne Einheit; 1,5-facher Unterschied; $P = 0,033$) (Abbildung 19; Abbildung 20).

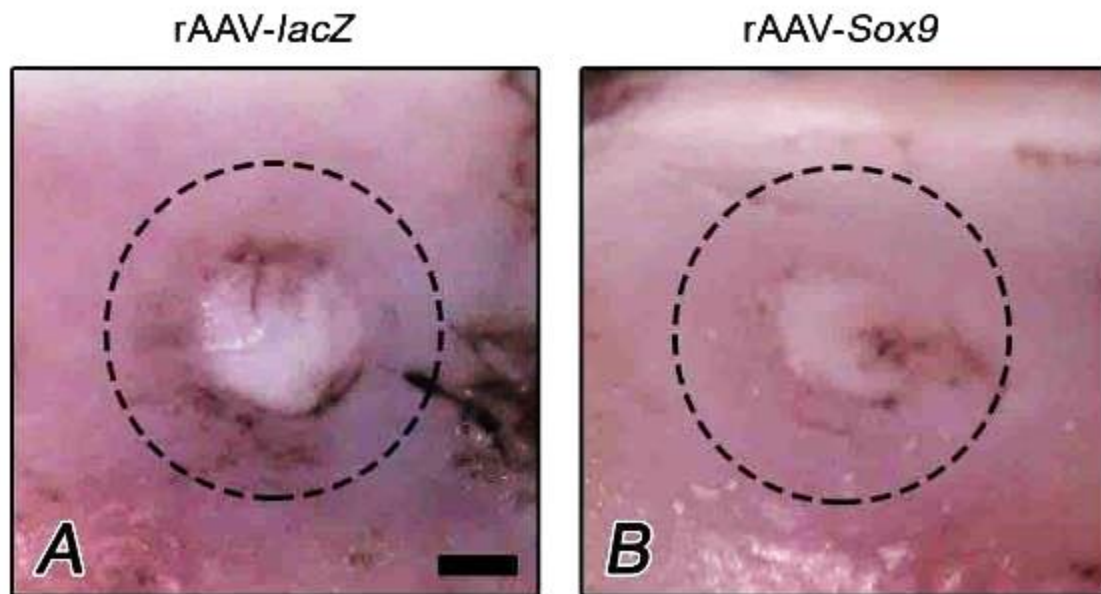


Abbildung 19: Makroskopische Auswertung der Tuschefärbung. In lacZ-Kontrolldefekten (A) war die Intensität der Tuschefärbung signifikant stärker im Vergleich zu Sox9-behandelten Defekten (B). Die Auswahl der Bilder erfolgte anhand des Gruppenmittelwertes in der Flächenausdehnung. Evaluationsbereich der Degenerationen um den Defekt markiert, Balken = 1,5 mm.

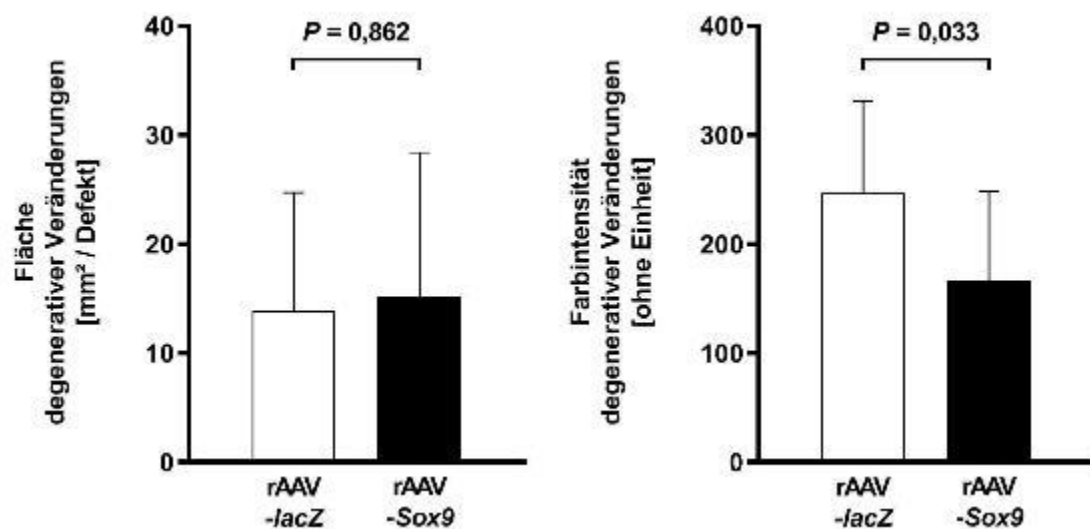


Abbildung 20: Ergebnisse der makroskopischen Auswertung des angrenzenden Gelenkknorpels.

6.3.2 Quantitative histologische Analyse degenerativer Veränderungen des angrenzenden Gelenkknorpels

Mit Hilfe von Safranin-O-gefärbten Präparaten (n=9 Schnitte pro Defekt) beurteilten wir den an den Defekt angrenzenden Gelenkknorpel im Little-Bewertungssystem auf arthrotisch degenerative Veränderungen (Abbildung 21).

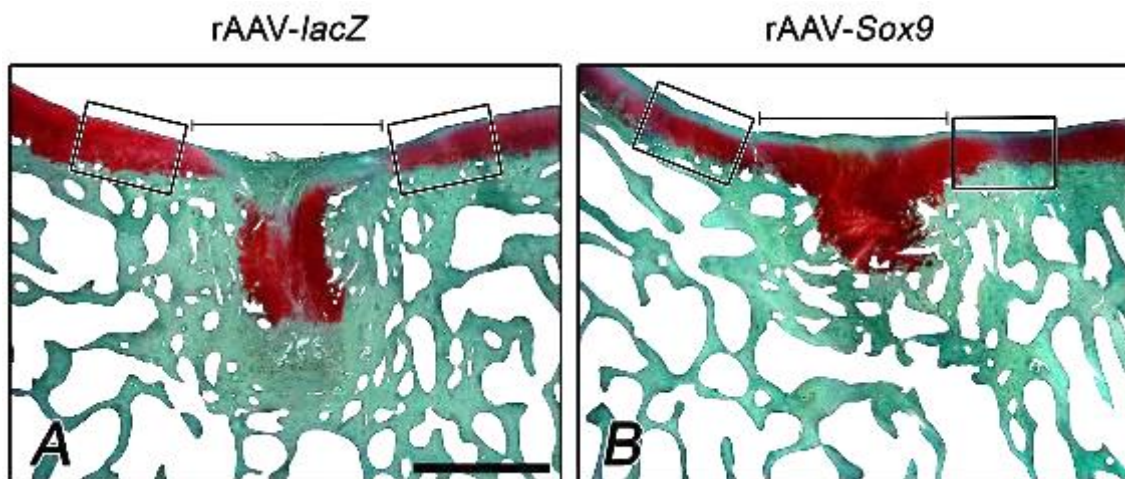


Abbildung 21: Schematik der histologischen Beurteilung des an die Defekten angrenzenden Gelenkknorpels. Der medial und lateral angrenzende Knorpel des Defektareals (1,5 mm) wurde mit Hilfe des Little-Bewertungssystems evaluiert. Markierungen: Linie: Defektareal; Rahmen: angrenzender Gelenkknorpel; Balken = 2 mm.

In *lacZ*-Kontrolldefekten wie auch *Sox9*-behandelten Defekten war die Oberfläche im angrenzenden Gelenkknorpel von von leichten bis moderaten Unebenheiten durchsetzt. Im Knorpelgewebe selbst war die Chondrozytendichte leicht erniedrigt, die *Tidemark* verdoppelt und der subchondrale Knochen intakt.

Die Chondrozyten in *lacZ*-Kontrolldefekten organisierten sich in Form vieler Duplets, in *Sox9*-behandelten Defekten dagegen signifikant weniger, nur in Form einzelner Duplets ($P = 0,010$). In *lacZ*-Kontrolldefekten zeigte der angrenzende Knorpel eine reduzierte Safranin-O-Matrixanfärbbarkeit bis hin zu tiefen Knorpelschichten. Dieser Verlust von Proteoglykanen reichte in *Sox9*-behandelten Defekten dagegen signifikant nur bis zur mittleren Zone ($P = 0,039$) (Tabelle 27; Abbildung 22).

Tabelle 27: Ergebnisse der histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur nach Little; 0 Punkte normaler Knorpel, 25 Punkte restlos aufgebrauchter Knorpel; MW \pm SE.

Kategorie	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV- <i>Sox9</i>	Mittlere Differenz (95% KI)	P-Wert
Chondrozyten	1,03 \pm 0,12	0,75 \pm 0,12	0,28 (-0,06-0.61)	0,100
Zellklone	1,86 \pm 0,16	1,25 \pm 0,16	0,61 (0,15-1.07)	0,010
Safranin-O-Färbung	1,33 \pm 0,12	0,97 \pm 0,12	0,36 (0,02-0.70)	0,039
<i>Tidemark</i>	1,00 \pm 0,09	0,97 \pm 0,09	0,03 (-0.22-0.27)	0,820
Summe	6,03 \pm 0,40	5,33 \pm 0,40	0,70 (-0,45-1.83)	0,230

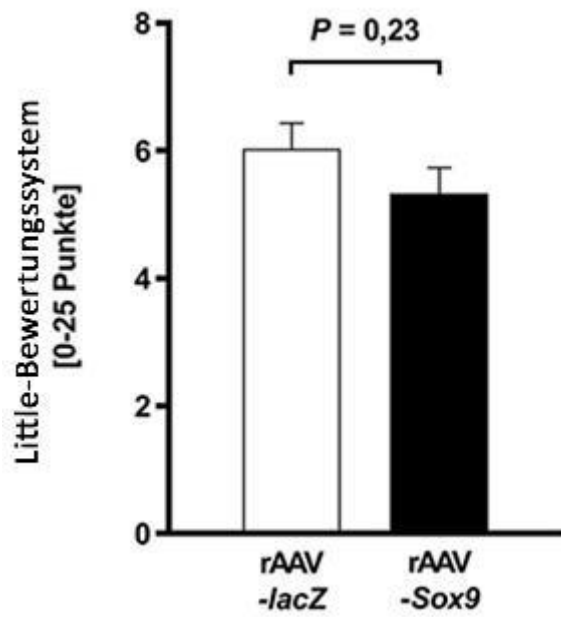


Abbildung 22: Ergebnis der histologischen Auswertung des angrenzenden Gelenkknorpels.

7. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss der Überexpression des humanen Transkriptionsfaktors *Sox9* via direktem rAAV-vermitteltem Gentransfer auf die Reparatur von osteochondralen Defekten im translationalem Großtiermodell. Nach 6 Monaten *in vivo* zeigten *Sox9*-behandelte Defekte (1) signifikant verbesserte individuelle Parameter der Knorpelreparatur wie Defektfüllung, Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie, Defektarchitektur, Oberflächenarchitektur, subchondraler Knochen, *Tidemark* und den Gesamtpunktwert im komplexen histologischen Bewertungssystem nach Sellers *et al.* sowie führte zu signifikant besseren Einzelpunktwerten Zellmorphologie, Knorpeldicke und dem Gesamtpunktwert im histologischen Bewertungssystem nach Wakitani *et al.*; je im Vergleich mit *lacZ*-Kontrolldefekten. Die Immunreaktivität des knorpeligen Reparaturgewebes nach *Sox9*-Gentransfer war für Typ-I-Kollagen signifikant erniedrigt. (2) Die Mikrostruktur des unvollständig wiederhergestellten subchondralen Knochens war nicht signifikant unterschiedlich bei häufig auftretenden subchondralen Knochenveränderungen. (3) Der an die Defekte angrenzende Gelenkknorpel zeigte in *Sox9*-behandelten Defekte signifikant weniger Zellklone und eine signifikant stärkere Anfärbbarkeit mit Safranin-O; beides Zeichen reduzierter degenerativer Veränderungen.

7.1 Reparatur des Gelenkknorpels

7.1.1 Makroskopische Auswertung des Reparaturgewebes

In den makroskopischen Bewertungssystemen zeigten *Sox9*-behandelte Defekte keine signifikant besseren Gesamt- und Einzelpunktwerte gegenüber der *lacZ*-Kontrolldefekte auf. Hierbei waren es jedoch mehrheitlich *Sox9*-behandelte Defekte, die im Niveau zum daran angrenzenden Gelenkknorpel von einem weißen, hyalinartigen Reparaturgewebe wiederbefüllt waren.

Im Vergleich zu diesen Daten evaluierten noch drei weitere Arbeitsgruppen die Effekte von *Sox9* auf die makroskopische Knorpelreparatur an osteochondralen Defekten im Tiermodell mit signifikant besseren Gesamtpunktwerte anhand von komplexen Bewertungssystemen. Dafür transduzierten Cao *et al.* mesenchymale Zellen *ex vivo* mit einem adenoviralen *Sox9*-Genvektor und implantierten diese Zellen matrixgekoppelt mit Hilfe einer biodegradierbaren Polyglykol-Trägermatrix in osteochondrale Defekte (Cao *et al.*, 2011). Zhang *et al.* erzeugten einen zellpenetrierungsfähigen, rekombinanten *Sox9*-Proteinkomplex. Diesen brachten sie in einer damit imprägnierten Kollagenmembran über mikrofrakturierte Knorpeldefekte im Kaninchenmodell ein

(Zhang *et al.*, 2017). Madry *et al.* applizierten rAAV-Sox9-Vektoren frei oder in einem selbstorganisierenden, temperatursensitiven Hydrogel aus Polyethylenoxid- (PEO) und Polypropylenoxid- (PPO) Dreiblockcopolymeren über zuvor mikrofrakturierte Knorpeldefekte im Mini-Schweinmodell (Madry *et al.*, 2020). In Analogie zur vorliegenden Arbeit konnten die genannten Arbeitsgruppen ihre makroskopischen Evaluationen eines defektausfüllenden, hyalinähnlichen Reparaturgewebes für Sox9-behandelte Defekten in den histologischen Auswertungen bestätigen. Diese Ergebnisse unterstreichen den prognostischen Wert von makroskopischen Bewertungssystemen für die genauere Evaluation der Knorpelreparatur im Tiermodell (Goebel *et al.*, 2017).

7.1.2 Histologische Auswertung des Reparaturgewebes

In den histologischen Bewertungssystemen zeigten Sox9-behandelte Defekte die signifikant bessere Knorpelreparatur als *lacZ*-Kontrolldefekte. Im komplexen Sellers-Bewertungssystem stellten sich der Gesamtpunktwert für Sox9-behandelte Defekte und die Einzelpunktwerte der histologischen Defektfüllung, Safranin-O-Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie, Defekt- und Oberflächenarchitektur, Ausmaß der Wiederherstellung der *Tidemark* und des subchondralen Knochens signifikant verbessert dar. Im einfachen Wakitani-Bewertungssystem waren der Gesamtpunktwert für Sox9-behandelte Defekte und Einzelpunktwerte der histologischen Zellmorphologie und Knorpeldicke signifikant verbessert.

Cucchiari *et al.* konnten dies vergleichbar signifikant für Sox9-behandelte Defekte nach der Applikation von rAAV-Sox9-Vektoren in osteochondrale Defekte im Kaninchenmodell für die frühe Knorpelreparatur nach drei Wochen als auch zum Studienendpunkt nach sechzehn Wochen im komplexen Sellers-Bewertungssystem zeigen (Cucchiari *et al.*, 2013). Interessanterweise war das überexprimierte Sox9 in der Frühphase der Knorpelreparatur wirksamer als zum Studienendpunkt, was mit der essentiellen Induktionsfunktion des Transkriptionsfaktors in der frühen Chondrogenese mesenchymaler Zellen übereinstimmt (Wright *et al.*, 1995; Bi *et al.*, 1999; Anraku *et al.*, 2009). Dennoch erweisen sich der erzielte Gesamtpunktwert in der Kleintierstudie nach vier Monaten für Sox9-behandelte Defekte und signifikant bessere Einzelpunktwerte der histologischen Safranin-O-Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie, Defekt- und Oberflächenarchitektur vergleichbar zur vorliegenden Arbeit nach sechs Monaten, was auch auf Langzeiteffekte von Sox9 auf die Chondrogenese mesenchymaler Zellen hinweist.

In diesem Zusammenhang berichteten auch Madry *et al.* von signifikanten Verbesserungen des histologischen Gesamtpunktwertes und Einzelpunkte der histologischen Defektfüllung, Defektintegration, Safranin-O-Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie und Oberflächenarchitektur unter Verwendung eines komplexen, semiquantitativen Bewertungssystems für die nachweislich gentransfereffizientere Hydrogel-basierte Applikation der rAAV-Sox9-Vektoren über mikrofrakturierte Defekte im Mini-Schweinmodell gegenüber der Kontrollbehandlungen nach dem vierwöchigen Beobachtungszeitraum. Interessanterweise waren zu diesen frühen Zeitpunkt auch histomorphometrisch bereits signifikante Fortschritte in der zonalen Organisation des knorpeligen Reparaturgewebes nachweisbar (Madry *et al.*, 2020).

Im Vergleich zur direkten rAAV-basierten Gentransferstrategie evaluierten auch Cao *et al.* für eine *ex vivo* Sox9-Gentransferstrategie nach drei Monaten und Zhang *et al.* für einen zellpenetrierungsfähigen, rekombinanten Sox9-Proteinkomplex nach acht Wochen signifikante Verbesserungen auf die Knorpelreparatur im Kaninchenmodell mit einer chondrozytenähnlichen Zellmorphologie, oberflächennahen Defektfüllung, regulären Oberflächenbeschaffenheit, besseren Safranin-O-Färbung sowie Defektintegration anhand von histologischen Bewertungssystemen (Cao *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017). Nachteilig in diesen Arbeiten zeigte sich jedoch, dass es bereits zur Ausdünnung des Reparaturgewebe durch den subchondralen Knochen in Sox9-behandelten Defekten kam (Cao *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017). Cao *et al.* postulierten eine Transgenaktivität der implantierten mesenchymalen Zellen von 2-4 Wochen, detektierten aber keine *in vivo* Transgenexpression der Zellen (Cao *et al.*, 2011). Studien im Tiermodell belegten, dass *ex vivo* genetisch modifizierte Zellen nach einiger Zeit in Knorpeldefekten nicht mehr nachweisbar sind (Grande *et al.*, 1989; Hidaka *et al.*, 2003; Mierisch *et al.*, 2003; Madry *et al.*, 2005). Einige von ihnen unterlaufen Apoptose und Nekrose, während andere überleben (Madry, Cucchiari, 2011). Gleichzeitig sind die aus dem Knochenmark aufsteigende Zellen an der Defektreparatur beteiligt. Allerdings unterliegen diese keinem Sox9-Reparaturstimulus und können der inhärenten Tendenz zur endochondralen Ossifikation nur schwer entgehen (Somoza *et al.*, 2014) (Graceffa *et al.*, 2018). Um diesem Problem beizukommen, brachten Zhang *et al.* einen zellpenetrierungsfähigen, rekombinanten Sox9-Proteinkomplex mit Hilfe einer Kollagenmembran über mikrofrakturierte Defekte ein (Zhang *et al.*, 2017). Ihre *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass das Sox9-Protein in den mesenchymalen Vorläuferzellen bis zu sieben Tage intrazellulär nachweisbar war. Ob und inwieweit dies aber auch die Sox9-Aktivität von *in vivo* widerspiegelt bleibt unklar. Zudem erlaubt der kurze Beobachtungszeitraum von acht Wochen keine Aussage über die Dauerhaftigkeit des hyalinähnlichen Ersatzknorpels.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Detektion der Transgenexpression verzichtet. Dennoch waren die Effekte eines erfolgreich stattgehabten rAAV-vermittelten Sox9-Gentransfers auf die mesenchymalen Zellen des Knorpeldefektes nach sechs Monaten *in vivo* nachzuweisen. Die Sox9-behandelten Defekte beinhalteten vorwiegend chondrozytenmorphologisch rundliche, proteoglykanproduzierende Zellen, die teilweise sogar in der für hyalinen Gelenkknorpel typischen Säulenkonfiguration angeordnet vorlagen. Auch deren vollständigere Defektfüllung und Generierung einer intakteren Reparaturoberfläche sind als Erfolg einzustufen, um eine kongruente, funktionsfähige Gelenkfläche wiederherzustellen (Mithoefer *et al.*, 2009; Raudner *et al.*, 2017). Im Gegensatz dazu zeigten *lacZ*-Kontrolldefekte eine inkomplettere Füllung mit einem schlechter anfärbbarem Reparaturgewebe, das neben den größeren strukturellen Defekten vorwiegend von spindelförmigen, fibroblastenähnlichen Zellen repariert war. Auch die deutlich ausgeprägteren oberflächlichen Fibrillationen waren als Zeichen eines vorzeitigen Degenerationsprozesses zu werten (Pritzker *et al.*, 2006; Madry *et al.*, 2012). Als persistierende Herausforderung in der Knorpelreparatur von Sox9-behandelten Defekten beobachteten wir die zellarme Integrationszone des Reparaturgewebes zum daran angrenzenden Gelenkknorpel (Shapiro *et al.*, 1993). Treten Risse oder Spaltbildungen auf, kann dies die vorzeitige Degeneration von Reparaturgewebe und dem daran angrenzendem Gelenkknorpel bedeuten (Khan *et al.*, 2008). Da sich weder die *Tidemark* noch der subchondrale Knochen in Sox9-behandelten Defekten nach sechs Monaten komplett wiederhergestellt zeigten, erscheinen längerfristige Beobachtungszeiträume in Großtiermodellen notwendig, um das Potential einer Sox9-Überexpression in der Knorpelreparatur beurteilen zu können. Unter zusätzlicher Einbeziehung von postoperativen Entlastungsphasen wäre auch ein besseres histologisches Ergebnis bezüglich der chondralen Defektintegration denkbar.

7.1.3 Immunhistochemische Auswertung des Reparaturgewebes

Mit einem Anteil von 90-95% des Gesamtkollagens ist Typ-II-Kollagen für die biomechanische Kompetenz im hyalinen Gelenkknorpel wesentlich mitverantwortlich (Buckwalter *et al.*, 2005). Typ-I-Kollagen hingegen findet sich im subchondralen Knochen und dem faserknorpeligen, minderbelastbaren Reparaturgewebe von unbehandelten Knorpeldefekten (Orth, 2008).

Typ-II-Kollagen

In den immunhistochemischen Auswertungen wiesen Sox9-behandelte Defekte eine höhere Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen auf als *lacZ*-Kontrolldefekte. Dabei zeigte das Reparaturgewebe in Sox9-behandelten Defekten teilweise die gleichmäßige

Anfärbarkeit für Typ-II-Kollagen auf wie der angrenzende, normale Gelenkknorpel, während *lacZ*-Kontrolldefekte diesem gegenüber immer moderat schwächer anfärbbar waren.

Diese höhere Anfärbarkeit für Typ-II-Kollagen per semiquantitativer immunhistochemischer Analyse im Reparaturgewebe von *Sox9*-behandelten Defekten wurde zuvor von Cucchiarini *et al.* unter vergleichbaren Versuchsbedingungen im Kaninchenmodell nach vier Monaten Beobachtungszeitraum durch eine statistische Signifikanz gegenüber der *lacZ*-Kontrolldefekte untermauert (Cucchiarini *et al.*, 2013). Auch Madry *et al.* evaluierten neben einer besseren Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen auch einen histomorphometrisch signifikant höheren Prozentsatz an Typ-II-Kollagen positiven Zellen im Reparaturgewebe von *Sox9*-behandelten Defekte nach vier Wochen im Mini-Schweinmodell. Interessanterweise war auch die räumliche Ausrichtung des neugebildeten Typ-II-Kollagennetzwerkes im Reparaturgewebe von *Sox9*-behandelten Defekte dem gesunden Gelenkknorpel signifikant ähnlicher als im Reparaturgewebe der Kontrollgruppen (Madry *et al.*, 2020). Ebenso wiesen Zhang *et al.* in ihren biochemisch quantitativen Analysen nach acht Wochen Beobachtungszeitraum eine signifikante Steigerung der Typ-II-Kollagensynthese nach (Zhang *et al.*, 2017). Cao *et al.* dagegen beschrieben nach drei Monaten Beobachtungszeitraum lediglich eine bessere qualitative Anfärbarkeit von Typ-II-Kollagen in *Sox9*-behandelten Defekten per immunhistochemischer Analyse (Cao *et al.*, 2011). Auf zellulärer Ebene ist diese *Sox9*-induzierte Steigerung der Typ-II-Kollagensynthese in mesenchymalen Zellen durch Bindung des Transkriptionsfaktors an ein spezifisches Enhancer-Element im Typ-II-Kollagen-Gen charakterisiert (Bell *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998) und wurde mehrfach eindrucksvoll durch rAAV-transduzierten *Sox9*-Gentransfer an mesenchymalen Zellen *in vitro*, an Knochenmarkaspiraten *in situ* und kombinierten Gentransferstudien nachgewiesen (Venkatesan *et al.*, 2012; Rey-Rico *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2017).

Vergleichbar dazu zeigten Cucchiarini *et al.* auch an Chondrozyten in humanem normalen und arthrotischen Knorpelimplantaten eine dosisabhängige Steigerung ihrer Typ-II-Kollagen-Produktion nach rAAV-vermittelten *Sox9*-Gentransfer (Cucchiarini *et al.*, 2007). Im Gegensatz hierzu wies die Arbeitsgruppe um Kyriotou *et al.* eine inhibitorische Wirkung von zu hohen *Sox9*-Expressionsniveaus auf die Typ-II-Kollagensynthese in Kaninchenchondrozyten nach. Diese war durch Bindung des Transkriptionsfaktors an ein proximal des Enhancer-Elementes gelegenen Promoters im Typ-II-Kollagen-Gen bedingt (Kyriotou *et al.*, 2003). Aigner *et al.* wiederum konnten keine Korrelation zwischen dem *Sox9*-Expressionsniveau und der Typ-II-Kollagenexpression in normalen und arthrotisch veränderten humanen Chondrozyten feststellen (Aigner *et al.*, 2003). Shi *et al.* schlussfolgerten aus der Inkonsistenz der Ergebnisse, dass *Sox9* durch Bindung an verschiedene regulatorische

Elemente im Typ-II-Kollagenen auch unterschiedlichen Effekte auf seine Expression in Chondrozyten hervorrufen könnte (Shi *et al.*, 2015). Einflussfaktoren wie die biologische Umgebung eines osteochondralen Defektes, die zusätzliche parakrine Faktoren zur Verfestigung stellt, die solche Prozesse beeinflussen können und ein unterschiedliches biologisches Ansprechen von bovinen, humanen und Kaninchenknorpel auf unterschiedliche Vektordosen über kürzere Beobachtungszeiträume *in vitro* könnten zusätzlich die Unterschiedlichkeit in den Resultaten erklären. Weitere quantitative Analysen der zugrunde liegenden Signalwege der Sox9-induzierten Typ-II-Kollagensynthese in chondrogenen Zellen ist für zukünftige gentherapeutische Anwendungen daher von großer Bedeutung (Yasuda *et al.*, 2017).

Typ-I-Kollagen

In den immunhistochemischen Auswertungen zeigten *lacZ*-Kontrolldefekte die signifikant höhere Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen als Sox9-behandelte Defekte. Dabei wies das Reparaturgewebe in *lacZ*-Kontrolldefekten teilweise die gleichmäßige Anfärbbarkeit für Typ-I-Kollagen auf wie der angrenzende, normale subchondrale Knochen, während Sox9-behandelte Defekte diesem gegenüber immer signifikant schwächer anfärbbar waren (2,7-facher Unterschied).

Diese signifikant reduzierte Anfärbbarkeit für Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe von Sox9-behandelten Defekten zeigten auch die anderen *in vivo* Studien im Kaninchenmodell. Speziell Cucchiari *et al.* konnten dies zusätzlich mit einer signifikant reduzierten Expression von Markern der chondrozytären Hypertrophie und Osteogenese im Reparaturgewebe von Sox9-behandelten Defekten evaluieren (Cucchiari *et al.*, 2013). Diese *in vivo* Ergebnisse stimmen gut mit den zuvor erhaltenen Untersuchungen nach Sox9-Überexpression in mesenchymalen Zellen und Chondrozyten *in vitro* und *in situ* überein (Cucchiari *et al.*, 2009; Venkatesan *et al.*, 2012; Rey-Rico *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2017). Ähnlich zum Vorgang der enchondralen Ossifikation, bei dem Knorpel durch Knochen ersetzt wird (Scotti *et al.*, 2010), behalten auch die mesenchymalen Vorläuferzellen eines osteochondralen Defekt ihren chondrogenen Phänotyp nicht bei (Somoza *et al.*, 2014; Lydon *et al.*, 2017). Die Expression von knorpelspezifischen Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen wird ab- und die von knochenspezifischen Typ-X- und I-Kollagen angeschaltet (Armiento *et al.*, 2018). Diese Mineralisation des knorpeligen Reparaturgewebes kann ein wesentlicher Grund dafür sein, warum es zum vorzeitigen Funktionsverlust nach knorpelchirurgischen Verfahren im Patienten kommt (Mithoefer *et al.*, 2009).

Zusammenfassend erlauben die immunhistochemischen Daten daher den Rückschluss, dass das überexprimierte Sox9 im vorliegenden Modell nicht nur effektiv die Chondrogenese im Knorpeldefekt induzierte, sondern auch den chondrogenen

Phänotyp im Reparaturgewebe mit kontrastierenden Effekten des Transkriptionsfaktors auf Prozesse der Hypertrophie und Osteogenese aufrechterhalten konnte.

7.1.4 Biochemische Auswertung des Reparaturgewebes

Proteoglykane sind für die Druckelastizität im hyalinen Gelenkknorpel verantwortlich und werden von metabolisch aktiven Chondrozyten gebildet (Buckwalter, Mankin, 1998a).

In den biochemischen Auswertungen zeigten *Sox9*-behandelte Defekte die signifikant höhere zelluläre Proteoglykanproduktion als *lacZ*-Kontrolldefekte (1,4-facher Unterschied). Allerdings war der Gesamtgehalt an Proteoglykanen in den Gewebeproben der beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich, da sich die Zellzahl in *lacZ*-Kontrolldefekten signifikant höher darstellte als die im Reparaturgewebe von *Sox9*-behandelten Defekten (1,5-facher Unterschied). Damit steht unser Ergebnis im Widerspruch zur Studie im Kleintiermodell, die nach Applikation einer äquivalenten rAAV-*Sox9*-Vektordosis in lapine, osteochondrale Defekte eine histomorphometrisch signifikant bessere Safranin-O-Matrixanfärbbarkeit im Reparaturgewebe der *Sox9*-behandelten Defekte zeigten, ohne die Zellzahl negativ zu beeinflussen (Cucchiari *et al.*, 2013). Auch in den Ergebnissen der zuvor durchgeführten Arbeiten *in vitro* und *in situ*, bei denen noch höhere rAAV-*Sox9*-Vektordosen als in den *in vivo* Tiermodellen appliziert wurden, zeigten signifikant gesteigerte metabolische und chondrogene Aktivitäten (Proteoglykan- und Typ-II-Kollagen-Synthese) ohne nachteilige Effekte auf die Zellproliferation (Cucchiari *et al.*, 2007; Venkatesan *et al.*, 2012; Rey-Rico *et al.*, 2015; Venkatesan *et al.*, 2018a). Unterschiedliche Ergebnisse in den Resultaten könnten im längeren postoperativen Zeitraum und einem unterschiedlichen biologischem Ansprechen der Tiere begründet liegen.

Andererseits zeigt sich unser biochemisches Ergebnis in guter Übereinstimmung mit den histologischen und immunhistochemischen Auswertungen. Die Parameter der histologischen Zellmorphologie, Matrixanfärbbarkeit und Defektfüllung des Sellers-Bewertungssystems deuteten ebenfalls auf das mehrheitliche Vorliegen von metabolisch aktiven Chondrozyten-ähnlichen Vorläuferzellen in *Sox9*-behandelten Defekten hin. Im Hinblick auf das bessere Verhältnis von Typ-II- zu Typ-I-Kollagen in den immunhistochemischen Auswertungen gegenüber von *lacZ*-Kontrolldefekten war ihre bessere Synthese von Hauptkomponenten einer hyalinen extrazellulären Matrix als wesentliche Grundlage für die Verbesserung der histologischen Knorpelreparatur zu sehen. Weitere Studien werden zeigen, ob und inwieweit eine *Sox9*-Aktivität die zelluläre Proliferations- und Überlebensfähigkeit einschränkt (Panda *et al.*, 2001; Drivdahl *et al.*, 2004).

7.2 Reparatur des subchondralen Knochens

Die strukturelle Integrität der osteochondralen Einheit ist die wesentliche Voraussetzung zur Herstellung optimaler biomechanischer Gelenkverhältnisse (siehe 2.3). Für den dauerhaften Erfolg der Knorpelreparatur erscheint die biomechanische Unterstützung durch den intakten subchondralen Knochen daher unentbehrlich (Madry *et al.*, 2016b).

7.2.1 Rekonstruktion des subchondralen Knochens

In der Mikro-CT-Analyse zeigte die Knochenstruktur von *Sox9*-behandelten Defekten und *lacZ*-Kontrolldefekten keine signifikanten Unterschiede. Als Zeichen der unvollständigen Wiederherstellung der subchondralen Knochenstruktur waren signifikante Abnahmen des Knochenvolumens, der Knochenvolumendichte, der Dicke der subchondralen Knochenplatte, der subartikulären Trabekel und der Knochendichte in beiden Defektgruppen nachweisbar (im Vergleich zur benachbarten, intakten subchondralen Knochenstruktur) (Orth *et al.*, 2012b; Orth *et al.*, 2013b; Eldracher *et al.*, 2014; Orth *et al.*, 2016). Auch Madry *et al.* evaluierten vier Wochen nach Applikation der rAAV-*Sox9*-Vektoren im Mini-Schweinmodell nebst der unvollständigen Wiederherstellung der subchondralen Knochenstruktur keine relevanten Unterschiede in den Werten der Knochenstrukturparameter zwischen *Sox9*-behandelten Defekten und den Kontrollgruppen. Ferner war histomorphometrisch eine signifikant erhöhte Dichte an Osteoblasten und Osteoklasten im knöchernen Reparaturgewebe von *Sox9*-behandelten Defekten nachweisbar (Madry *et al.*, 2020). Im Gegensatz dazu stellten wir bei der histologischen Auswertung im Sellers-Bewertungssystem die signifikant höhere prozentuale Neubildung des subchondralen Defektareals mit Knochen in *Sox9*-behandelten Defekten fest (*Sox9*: > 50% des subchondralen Defektareals mit Knochen repariert *versus lacZ*: < 50% des subchondralen Defektareals mit Knochen repariert). Cucchiari *et al.* konnten dies ebenfalls histologisch und histomorphometrisch signifikant für *Sox9*-behandelte Defekte im Kaninchenmodell zeigen. Interessanterweise erschien dies durch eine signifikante Hochregulation des knochenspezifischen Transkriptionsfaktors *Runx2* in den subchondralen Defektarealen erklärbar (Cucchiari *et al.*, 2013). Konträr dazu zeigten frühere Grundlagenstudien, dass *Sox9*-Überexpression nicht nur die Expression von mit chondrozytärer Hypertrophie und Osteogenese assoziierten Genen wie *Runx2* in mesenchymalen Zellen und Chondrozyten inhibiert (Venkatesan *et al.*, 2012; Cucchiari *et al.*, 2013; Frisch *et al.*, 2016), sondern auch deren hypertrophe/osteogene Dedifferenzierungsprozesse unterdrückt (Akiyama *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2011) und sogar den Abbau des *Runx2*-Proteins fördern konnte (Cheng, Genever, 2010). Dieser Widerspruch zu den Auswirkungen im Tiermodell könnte damit zusammenhängen, dass die *Sox9*-Aktivität

initial zur Erzeugung und Aufrechterhaltung von proliferierenden Chondrozyten aus Osteochondroprogenitorzellen erforderlich ist (Bi *et al.*, 2001; Ikegami *et al.*, 2011; Dy *et al.*, 2012), ein Abschalten langfristig wiederum auch Voraussetzung dafür ist, damit die erzeugten Knorpelvorstufen im Rahmen der endochondralen Ossifikation vollständig durch Knochen ersetzt werden können (Zhou *et al.*, 2006) (Hattori *et al.*, 2010; Hutchings *et al.*, 2020). Im vorliegenden Defektmodell können negative Effekte einer Sox9-Überexpression auf die Osteogenese der Osteochondroprogenitorzellen nicht sicher ausgeschlossen werden, weshalb sich der histologische Fortschritt in der Knochenreparatur von Sox9-behandelten Defekten wohlmöglich nicht in den Parametern der Mikro-CT-Analyse wiedergespiegelt haben dürfte.

Da Zeiträume von einem Jahr oder mehr erforderlich sein können, damit der neue Knochen vollständig mineralisiert ist (Glimcher, 1998; Burr, 2004), wird die Aussagekraft unseres Ergebnisses durch längerfristige Studien zu überprüfen sein.

7.2.2 Strukturelle Veränderungen des subchondralen Knochens

In Sox9-behandelten Defekten wie auch *lacZ*-Kontrolldefekten kam es hochfrequent zur Bildung von intraläsionalen Osteophyten und vereinzelt auch zu einem generalisierten Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte. Das Auftreten solcher subchondralen Knochenneubildungen fand man auch in anderen translationalen Studien im Schafmodell nach der Anwendung knochenmarkstimulierender Verfahren und postoperativ gewährter Vollbelastung (Orth *et al.*, 2012b; Eldracher *et al.*, 2014; Orth *et al.*, 2016; Seow *et al.*, 2017). Wenn beispielsweise chondrale Knorpeldefekte im Schafmodell an der lateralen Trochlea mit Pridie-Bohrungen unterschiedlicher Bohrlochdurchmesser behandelt wurden, waren auch hier keine subchondralen Knochenzysten nachweisbar, während es in nahezu allen Defekten der Behandlungs- und Kontrollgruppe dieses Modells zu einem generalisiertes Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte kam und sich in 23% der Defekte intraläsionale Osteophyten entwickelten (Eldracher *et al.*, 2014). Das häufigere Auftreten von intraläsionalen Osteophyten in der vorliegenden Arbeit dürfte sicherlich in dem größeren lokalen Knochenschaden begründet liegen, den vier osteochondrale Defektbohrungen (3,5 mm Defektdurchmesser; 100% Eröffnung der subchondralen Knochenplatte bei 9,62 mm² Defektfläche) im Vergleich zu punktuell versetzten Bohrungen eines größeren, chondralen Defektes (Ø-Defektdurchmesser: 1,1 mm; < 50% Eröffnung der subchondralen Knochenplatte bei 32 mm² Defektfläche) verursachten (Gao *et al.*, 2018). Interessanterweise befanden sich die subchondralen Knochenneubildungen in der vorliegenden Arbeit stets an den Randbereichen der Defekte. Demnach bildeten sie sich wahrscheinlich nicht auf der Basis eingewanderter Knochenmarkszellen (Shapiro *et al.*, 1993). Vielmehr könnten sie ihren Ursprung von mechanosensitiven Osteoblasten der

angrenzenden, subchondralen Knochenplatte genommen haben (Jackson *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2012). Diese könnten durch die veränderten mechanischen Gegebenheiten eines postoperativ vollbelasteten osteochondralen Defektareals unangemessen aktiviert worden sein (Kock *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010), um die vermehrte Druckbelastung auf die subartikuläre Spongiosa durch reaktive Knochenbildung kompensieren zu können. Ebenso sind Mechanismen der endochondralen Ossifikation mit Hypertrophie und folgender Knorpelmineralisation ortsständiger Chondrozyten in den tiefen angrenzenden Knorpelschichten denkbar (Studer *et al.*, 2012).

Wenn auch intraläsionale Osteophyten eine Rolle bei der Wiederherstellung von Gelenkkongruenz spielen können (Van Der Kraan, Van Den Berg, 2007), führen sie unweigerlich zu einer Höhenminderung der stoßdämpfenden Knorpelschicht bei unverändertem Gesamtvolumen der osteochondrale Einheit. Diese ist dann weniger elastisch und somit anfälliger für auf den Gelenkknorpel einwirkende Scherkräfte (Qiu *et al.*, 2003; Madry *et al.*, 2010). So belegten qualitativ hochwertige klinische Studien im Patienten, dass ein erhöhtes Auftreten von subchondralen Knochenneubildungen nach der Durchführung diverser knorpelchirurgischer Verfahren mit signifikant erhöhten Ausfallraten korrelierte (Mithoefer *et al.*, 2016; Orth *et al.*, 2019). Außerdem war der klinische Langzeiterfolg von sekundären Knorpelreparaturstrategien, wie der autologen Chondrozytenimplantation, nach dem Versagen von knochenmarkstimulierenden Verfahren, beeinträchtigt (Minas *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2020). Gleichsam korrelierte im Kleintiermodell das generalisierte Voranschreiten der subchondralen Knochenplatte nicht mit der vorzeitigen Degeneration des darüberliegenden Reparaturgewebes (Orth *et al.*, 2012a).

Zusammenfassend lässt sich das Zulassen der postoperativen Vollbelastung im vorliegenden Modell als ein entscheidender Faktor für das Auftreten von subchondralen Knochenneubildungen ausmachen. Zu dieser Erkenntnis kamen auch Madry *et al.* in ihrem Mini-Schweinmodell, welche die Bildung von intraläsionalen Osteophyten in Sox9-behandelten Defekten wie auch lacZ-Kontrolldefekten bereits nach vier Wochen postoperativ gewährter Vollbelastung evaluierten (Madry *et al.*, 2020). Diese Resultate heben die klinische Bedeutung der postoperativen Entlastungsphase nach der Durchführung knorpelchirurgischer Verfahren im Patienten hervor, um ein noch unreifes osteochondrale Reparaturgewebe vor möglicherweise schädigenden Einflüssen dieser Knochenneubildungen zu schützen (Gomoll *et al.*, 2010).

7.3 Degenerative Veränderungen des angrenzenden Knorpels

Osteochondrale Defekte lösen degenerative Veränderungen in dem (zuvor normalen) angrenzenden Gelenkknorpel aus (Jackson *et al.*, 2001; Schinhan *et al.*, 2012). Infolge mechanischer Überbeanspruchung, biochemischer Stressparameter und Überwiegen kataboler Stoffwechselfvorgänge wird die Gelenkoberfläche des umliegenden Gelenkknorpels diskontinuierlicher und seine strukturelle Integrität geht verloren (Anderson *et al.*, 2011). Eine ebenso wichtige Rolle spielt die subchondrale Knochenplatte, die sich im Prozess der beginnenden Arthrose progressiv verbreitert (Madry *et al.*, 2012). Therapeutische Konzepte haben daher auch das Ziel, die genannten Vorgänge zu verlangsamen (Angele *et al.*, 2016), da sich rein perifokale Veränderungen mittel-bis langfristig in eine unikompartimentell fortschreitende Arthrose ausweiten können (Madry *et al.*, 2016a).

In dem hier zur Beurteilung der Arthrose verwendeten, etablierten histologischen Bewertungssystem (Little *et al.*, 2010) zeigten Sox9-behandelte Defekten den niedrig besseren Gesamtpunktwert als lacZ-Kontrolldefekte. Unter diesem geringeren histologischen Progress von frühdegenerativen Veränderungen in Sox9-behandelten Defekten war die Clusterbildung der randständigen Chondrozyten und der Verlust von Proteoglykanen in der Safranin-O-Matrixanfärbbarkeit in lacZ-Kontrolldefekten signifikant stärker nachweisbar. Letzterer reichte in lacZ-Kontrolldefekten bis teilweise in die Radiärzone, während er im angrenzenden Gelenkknorpel von Sox9-behandelten Defekten nur bis maximal in die Übergangszone reichte. Die reaktive Clusterbildung der randständigen Chondrozyten wird in der Frühphase der Arthrose zwar als ein Versuch des Organismus angesehen, den Knorpeldefekt zu regenerieren. In lacZ-Kontrolldefekten war diese gesteigerte Aktivität in Kombination mit dem stärkeren Proteoglykanverlust aber als Fortschritt des Degenerationsprozesses im Vergleich mit Sox9-behandelten Defekten zu werten (Buckwalter *et al.*, 2005; Madry *et al.*, 2012). Eine mögliche Erklärung hierfür dürfte sicherlich in der Knorpelreparatur Sox9-behandelter Defekte gelegen haben. In der Literatur ist beschrieben, dass ein oberflächenkongruentes Reparaturgewebe die Auftretenswahrscheinlichkeit von pathologischen Scherkräften an den Defekträndern verringert und der mechanische Knorpelabrieb abgemildert werden kann (Heijink *et al.*, 2012; Madry *et al.*, 2016a). Weiterhin könnte es nach Applikation des rAAV-Sox9-Vektorlösung auch zu einer Sox9-Transgenaktivität im angrenzenden Gelenkknorpel gekommen sein (Cucchiari *et al.*, 2005; Cucchiari *et al.*, 2013). Diesbezüglich zeigten Untersuchungen an humanen arthrotischen Knorpelimplantaten, dass die rAAV-vermittelte Überexpression von Sox9 die Proteoglykan und Typ-II-Kollagensynthese der arthrotischen Chondrozyten derart

steigerte, so dass ähnliche Mengen wie in gesunden Knorpelproben vorlagen (Cucchiari *et al.*, 2009). Insbesondere in Frühstadien der Arthrose, wenn noch keine vollständiger Knorpelverlust vorliegt, existiert ein frühes therapeutisches Fenster, um die anabole Aktivität der arthrotisch veränderten Chondrozyten durch Überexpression von therapeutischen Genen zu steigern (Madry, Cucchiari *et al.*, 2013).

7.4 Methodische Diskussion der vorliegenden Studie

7.4.1 rAAV-basierte Gentransferstrategie

Die lokale Applikation von rAAV-Vektoren in osteochondrale Defekte während einer Arthrotomie (*versus* der Implantation *ex vivo* genetisch modifizierter Zellen) konnte in den bisherigen Tierversuchen ein einzeitiges, erfolgreiches Gentransferverfahren darstellen, um die einwandernden mesenchymalen Vorläuferzellen sicher und effizient zur langandauernden Expression des therapeutischen Gens zu transduzieren (Madry *et al.*, 2003; Cucchiari *et al.*, 2005; Cucchiari *et al.*, 2013; Cucchiari, Madry, 2014; Cucchiari *et al.*, 2018). Die rAAV-basierte Gentransferstrategie ist somit auf ethischer Ebene bezüglich der Risiken einer Gentherapie im Tiermodell als unbedenklich einzustufen. Bei diesen Versuchen stand die Expression des therapeutischen Gens unter Kontrolle des *Cytomegalovirus immediate-early* (CMV-IE)-Promotors. Dieser erzielt eine hohe und langanhaltende Transgenexpression in verschiedensten Zelltypen (Papadakis *et al.*, 2004). Allerdings ist unklar, wieviel therapeutisches Genprodukt notwendig ist, um die Knorpel- und Knochenbildung eines osteochondralen Knorpeldefektes optimal anzuregen. Unregulierte Dauerexpression birgt auch potentiell die Gefahren der malignen Entartung und Toxizität (Cucchiari, Madry, 2005). Dieses Problem könnte durch Bildung von Vektorkonstrukten, die regulierbare Tetrazyklinsensitive (Gafni *et al.*, 2004) oder knorpelgewebespezifische Gewebepromotoren (Goldring *et al.*, 1994) tragen, gelöst werden. Weiterhin kann es nach der Applikation der rAAV-Vektorlösung im Tiermodell zu Vektorleckagen und somit zu einer (unkontrollierten) intraartikulären Verbreitung des Genproduktes kommen. Speziell im Menschen sind auch Immunreaktionen gegen das Viruskapsid beschrieben und könnten aus therapeutischer Sicht zum vorzeitigen Verlust des genetischen Materials führen (Rey-Rico, Cucchiari, 2016; Li, Samulski, 2020). Ein translationaler Ansatz zur Behebung dieser Probleme stellt die Implantation der rAAV-Vektoren mit biokompatiblen Trägermaterialien (Venkatesan *et al.*, 2018b) oder Hydrogelen (Rey-Rico *et al.*, 2016) dar. Hierbei erfolgt die kontrollierte Abgabe der rAAV-Vektoren über Degradierung der Polymermatrix des Biomaterials, die nur in unmittelbarer Nahe zu den immobilisierten Vektorpartikeln stattfinden kann (Venkatesan *et al.*, 2019; Madry *et al.*, 2020).

7.4.2 Großtiermodell

Für den vorliegenden Versuchsansatz wählten wir Merinoschafe aus, für welche unsere Arbeitsgruppe langjährige Erfahrung hat (Orth *et al.*, 2012b; Madry *et al.*, 2013; Orth, Madry, 2013; Goebel *et al.*, 2015; Goebel *et al.*, 2017). Es wurden ausschließlich ausgewachsene Schafe herangezogen, da das Regenerationspotential von nicht ausgewachsenen Tieren als höher angesehen wird (Wei *et al.*, 1997). Durch den bilateralen Versuchsaufbau in den Hinterläufen der Tiere konnte die notwendige Anzahl an Versuchstieren reduziert werden (Orth *et al.*, 2013d; Cucchiarini *et al.*, 2018; Madry *et al.*, 2020). Gleichzeitig wurden die Defekte mit hoher Wahrscheinlichkeit zu gleichen Teilen vollbelastet. Die osteochondralen Defektbohrungen in einer für den Knorpeldefekt typischen klinischen Defektlokalisation der Femurtrochlea (Curl *et al.*, 1997; Widuchowski *et al.*, 2007) sollte den Fall eines traumatischen Knorpeldefektes bzw. den klinischen Umstand nach Durchführung knochenmarksstimulierender Verfahren simulieren. Durch Eröffnung des subchondralen Knochens erhalten mesenchymale Knochenmarkszellen Zutritt zum Knorpeldefekt (Steadman *et al.*, 2001) Gleichzeitig kann der rAAV-vermittelte Sox9-Gentransfer die Zellen stimulieren, um zu Chondrozyten und Osteoblasten auszdifferenzieren (Venkatesan *et al.*, 2012; Cucchiarini *et al.*, 2013). Mit einem Durchmesser von 3,5 mm hätten die osteochondralen Defekte eine ähnliche Größe wie die vorangegangenen Studien im Kaninchenmodell (3,2-4,0 mm) (Cao *et al.*, 2011; Cucchiarini *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017). Größere Defekte dieser Art neigen bei postoperativer gewährter Vollbelastung zu einem Kollaps des Defektareals mit progressiver Defektausbreitung (Jackson *et al.*, 2001). Da *lacZ*-Kontrolldefekte spontan nicht regenerierten, war das Tiermodell valide, um die beobachteten Verbesserungen in der Knorpelreparatur auf den Einfluss des humanen Transkriptionsfaktors Sox9 zurückführen zu können (Hunziker, 2002). Der gewählte Beobachtungszeitraum von sechs Monaten ist im Schafmodell gemeinhin akzeptiert, um sowohl den Erfolg in der osteochondralen Knorpelreparatur (Hoemann *et al.*, 2011) als auch die Entwicklung von frühdegenerativen Veränderungen in dem daran angrenzenden Gelenkknorpel beurteilen zu können (Orth *et al.*, 2013c). In Anlehnung an die klinische Situation im Patienten, bei dem die Umbau- und Ausdifferenzierungsprozesse zu einem belastbarem Gewebe einen Zeitraum von mehreren Jahren erfordern kann (Knutsen *et al.*, 2004; Knutsen *et al.*, 2007; Knutsen *et al.*, 2016), sind aber auch Beobachtungszeiträume von einem Jahr im Großtiermodell beschrieben (Nixon *et al.*, 2017).

7.4.3 Bewertungsmethodik der osteochondralen Knorpelreparatur

Um Ergebnisse in der Knorpelreparatur quantitativ miteinander vergleichen zu können, setzten wir etablierte Bewertungssysteme der experimentellen Knorpelforschung ein (Orth *et al.*, 2015). Hierbei stellt die histologische Auswertung den Goldstandard in

experimentellen Fragestellungen zur Knorpelreparatur dar. Ihre Relevanz übertrifft die der makroskopischen, immunhistochemischen und biochemischen Auswertungen (Orth *et al.*, 2015). Dafür deckt das komplexe Sellers-Bewertungssystem (Sellers *et al.*, 1997) mit acht Einzelparametern alle wesentlichen Aspekte in der Reparatur von osteochondralen Defekten ab (Orth, Madry, 2015). Verdeutlicht wird dies durch die hohe Gesamtpunktzahl von 31. Im Vergleich liegt dieser Wert im einfachen Wakitani-Bewertungssystem (Wakitani *et al.*, 1994) nur bei 14 Punkten. Eine weitere Stärke der Studie ist die Auswertung der Knochenreparatur mit einem Mikro-CT. Im Ergebnis ist die mechanische Knochenstärke nicht nur ein Resultat der Knochenmasse, sondern auch von dem Mineralisierungsgrad und der dreidimensionalen Mikroarchitektur abhängig (Turner, 2002; Orth *et al.*, 2012b). Als methodische Einschränkung der vorliegenden Arbeit bleibt zu konstatieren, dass gute histologische Ergebnisse nicht immer mit klinischen Verbesserungen korrelieren (Knutsen *et al.*, 2004). Diese Tatsache macht die biomechanische Testung des Reparaturgewebes als weitere Auswertungsmethode der Knorpelreparatur im Großtiermodell unerlässlich (Hoemann *et al.*, 2011). Da Sox9-behandelte Defekte trotz der insuffizienten, knöchernen Mikroarchitektur und den hochfrequenten Knochenneubildungen zu einer histologisch höherwertigeren Knorpelreparatur als *lacZ*-Kontrolldefekte führten, erscheint es dennoch schlüssig, dass Sox9-behandelte Defekte auch ein biomechanisch belastbareres Reparaturgewebe vorweisen könnten als *lacZ*-Kontrolldefekte.

7.5 Translational-klinischer Ausblick

Osteochondrale Defekte heilen nicht und können unbehandelt zur sekundären Arthrose führen. Der Gentransfer chondrogener Faktoren ist ein experimenteller Ansatz zur Lösung dieses Problems. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass direkter rAAV-vermittelter Gentransfer von humanem Transkriptionsfaktor Sox9 die Knorpelreparatur von osteochondralen Defekten im klinisch relevanten Großtiermodell des Schafes signifikant *in vivo* verbesserte. Dieses Ergebnis favorisiert rAAV-Vektoren als wirksames Instrument direkter Gentransferstrategien zur Behandlung von fokalen Knorpeldefekten. Längerfristige Untersuchungen in Großtierstudien werden diesen Versuchsaufbau übertragen und Auskunft über die biomechanischen Eigenschaften des Reparaturgewebes geben müssen.

Letztendlich werden dazu auch klinische Studien am menschlichen Knorpeldefekt mit therapeutischen rAAV-Vektoren notwendig sein, wie es bereits zur Behandlung der Arthrose und der rheumatoiden Arthritis in Form von intraartikulären Injektionstherapien angewandt (Evans *et al.*, 2018). Der klinische Erfolg in der Orthopädie wird in Jahren oder sogar Jahrzehnten gemessen, insbesondere vor der möglichen Entwicklung einer sekundären Arthrose (Knutsen *et al.*, 2016). Ausgehend von Ergebnissen in

Tiermodellen und der Grundlagenforschung zu molekularen Mechanismen der Knorpel- und Knochenreparatur (Goodrich, McIlwraith, 2016; Patel *et al.*, 2019; Hutchings *et al.*, 2020) können auch kontrollierbare rAAV-Genabgabesysteme in Biomaterialien mit verschiedenen therapeutischen Faktoren den größten Nutzen für die Bildung eines suffizienten Reparaturgewebes bringen (Cucchiari *et al.*, 2014; Madry *et al.*, 2020). Hierfür könnte die kombinierte Überexpression von *Sox9* mit proliferativ wirksamen Wachstumsfaktoren wie *FGF-2*, *IGF-I* oder *TGF- β* (Frisch *et al.*, 2016), den anderen Sox-Transkriptionsfaktoren *Sox5* und *Sox6* (Ikeda *et al.*, 2004) oder knochenspezifischen Faktoren wie *Runx2* (Needham *et al.*, 2014) sowie neuartigen Biomaterialien (Eftekhari *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020) in Betracht kommen.

Zukünftig könnten gentherapeutische Verfahren als Augmentation von etablierten knorpelchirurgischen Verfahren eingesetzt werden, um die Chondrogenese im Knorpeldefekt reproduzierbar zu verbessern oder auch im Rahmen osteochondraler Transplantationsverfahren die Reparatur der Entnahmestellen von Knorpel-Knochen-Zylindern zu verbessern (Cucchiari *et al.*, Madry, 2018). Für *ex vivo* Gentransferansätze könnte die Transduktion von Chondrozyten, mesenchymalen Stammzellen oder auch Knochenmarksaspiraten mit therapeutischen rAAV-Vektoren bereits *in vitro* erfolgen, sodass diese dann *in vivo* einer beschleunigten Chondrogenese unterliegen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende translationale Arbeit einen vielversprechenden gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung von fokalen osteochondralen Defekten auf.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aigner T, Gebhard PM, Schmid E, Bau B, Harley V, Poschl E (2003) SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes. *Matrix Biol* 22:363-372
2. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16:2813-2828
3. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B (2004) Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18:1072-1087
4. Akiyama H, Lefebvre V (2011) Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *J Bone Miner Metab* 29:390-395
5. Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, Buckwalter JA (2011) Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res* 29:802-809
6. Anderson WF (1992) Human gene therapy. *Science* 256:808-813
7. Angele P, Niemeyer P, Steinwachs M, Filardo G, Gomoll AH, Kon E, Zellner J, Madry H (2016) Chondral and osteochondral operative treatment in early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 24:1743-1752
8. Anraku Y, Mizuta H, Sei A, Kudo S, Nakamura E, Senba K, Hiraki Y (2009) Analyses of early events during chondrogenic repair in rat full-thickness articular cartilage defects. *J Bone Miner Metab* 27:272-286
9. Arai Y, Kubo T, Fushiki S, Mazda O, Nakai H, Iwaki Y, Imanishi J, Hirasawa Y (2000) Gene delivery to human chondrocytes by an adeno associated virus vector. *J Rheumatol* 27:979-982
10. Armiento AR, Alini M, Stoddart MJ (2018) Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Adv Drug Deliv Rev*
11. Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16:174-178
12. Bellavia D, Veronesi F, Carina V, Costa V, Raimondi L, De Luca A, Alessandro R, Fini M, Giavaresi G (2017) Gene therapy for chondral and osteochondral regeneration: is the future now? *Cellular and Molecular Life Sciences*
13. Benya PD, Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30:215-224
14. Berns KI, Linden RM (1995) The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 17:237-245
15. Bhosale AM, Richardson JB (2008) Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 87:77-95
16. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85-89
17. Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (2001) Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6698-6703
18. Bora FW, Jr., Miller G (1987) Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis. *Hand Clin* 3:325-336

19. 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
20. 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* 38:1259-1271
21. Broom ND, Poole CA (1982) A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition. *J Anat* 135:65-82
22. Brown TD, Johnston RC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA (2006) Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. *J Orthop Trauma* 20:739-744
23. Brunk CF, Jones KC, James TW (1979) Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal Biochem* 92:497-500
24. Buckwalter JA, Mankin HJ (1998a) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 47:477-486
25. Buckwalter JA, Mankin HJ (1998b) Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 41:1331-1342
26. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ (2005) Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 54:465-480
27. Burr DB (2004) Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A:S20-30
28. 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* 32:3910-3920
29. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM (1997) Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res*:254-269
30. Chen JH, Liu C, You L, Simmons CA (2010) Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *J Biomech* 43:108-118
31. Cheng A, Genever PG (2010) SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *J Bone Miner Res* 25:2680-2689
32. Cicuttini F, Ding C, Wluka A, Davis S, Ebeling PR, Jones G (2005) Association of cartilage defects with loss of knee cartilage in healthy, middle-age adults: a prospective study. *Arthritis Rheum* 52:2033-2039
33. Cucchiarini M, Madry H (2005) Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* 7:1495-1509
34. Cucchiarini M, Madry H, Ma C, Thurn T, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Terwilliger EF (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
35. Cucchiarini M, Thurn T, Weimer A, Kohn D, Terwilliger EF, Madry H (2007) Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis Rheum* 56:158-167
36. Cucchiarini M, Terwilliger EF, Kohn D, Madry H (2009) Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J Cell Mol Med* 13:2476-2488
37. 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 (Berl)* 91:625-636

38. Cucchiarini 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* 21:811-819
39. Cucchiarini M, Madry H, Guilak F, Saris DB, Stoddart MJ, Koon Wong M, Roughley P (2014) A vision on the future of articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 27:12-16
40. Cucchiarini M, Asen AK, Goebel L, Venkatesan JK, Schmitt G, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Madry H (2018) Effects of TGF-beta Overexpression via rAAV Gene Transfer on the Early Repair Processes in an Osteochondral Defect Model in Minipigs. *Am J Sports Med*:363546518773709
41. Cucchiarini M, Madry H (2018) Biomaterial-guided delivery of gene vectors for targeted articular cartilage repair. *Nature Reviews Rheumatology*
42. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG (1997) Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 13:456-460
43. Daya S, Berns KI (2008) Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21:583-593
44. Drivdahl R, Haugk KH, Sprenger CC, Nelson PS, Tennant MK, Plymate SR (2004) Suppression of growth and tumorigenicity in the prostate tumor cell line M12 by overexpression of the transcription factor SOX9. *Oncogene* 23:4584-4593
45. Dy P, Wang W, Bhattaram P, Wang Q, Wang L, Ballock RT, Lefebvre V (2012) Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev Cell* 22:597-609
46. Ebert JR, Fallon M, Ackland TR, Janes GC, Wood DJ (2020) Minimum 10-Year Clinical and Radiological Outcomes of a Randomized Controlled Trial Evaluating 2 Different Approaches to Full Weightbearing After Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation. *Am J Sports Med* 48:133-142
47. Eftekhari A, Maleki Dizaj S, Sharifi S, Salatin S, Rahbar Saadat Y, Zununi Vahed S, Samiei M, Ardalan M, Rameshrad M, Ahmadian E, Cucchiarini M (2020) The Use of Nanomaterials in Tissue Engineering for Cartilage Regeneration; Current Approaches and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 21
48. Eldracher M, Orth P, Cucchiarini M, Pape D, Madry H (2014) Small subchondral drill holes improve marrow stimulation of articular cartilage defects. *Am J Sports Med* 42:2741-2750
49. Evans CH, Huard J (2015) Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol* 11:234-242
50. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD (2018) Arthritis gene therapy is becoming a reality. *Nat Rev Rheumatol* 14:381-382
51. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 883:173-177
52. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, 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
53. Flotte TR, Afione SA, Zeitlin PL (1994) Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:517-521
54. Fortier LA, Deak MM, Semevolos SA, Cerione RA (2004) Insulin-like growth factor-I diminishes the activation status and expression of the small GTPase Cdc42 in articular chondrocytes. *J Orthop Res* 22:436-445

55. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525-530
56. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, Trotter GW, Rodkey WG, Steadman JR, Goodnight JL, McIlwraith CW (2003) Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop Relat Res*:215-227
57. Frisch J, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M (2016) rAAV-mediated overexpression of sox9, TGF-beta and IGF-I in minipig bone marrow aspirates to enhance the chondrogenic processes for cartilage repair. *Gene Ther* 23:247-255
58. Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ (1980) Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 62:79-89
59. Gafni Y, Pelled G, Zilberman Y, Turgeman G, Apparailly F, Yotvat H, Galun E, Gazit Z, Jorgensen C, Gazit D (2004) Gene therapy platform for bone regeneration using an exogenously regulated, AAV-2-based gene expression system. *Mol Ther* 9:587-595
60. Gao L, Goebel L, Orth P, Cucchiari M, Madry H (2018) Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research).
61. Glimcher MJ (1998). Chapter 2 - The Nature of the Mineral Phase in Bone: Biological and Clinical Implications. In *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders (Third Edition)*, Avioli LV, SM Krane, eds. (San Diego, Academic Press), pp. 23-52e.
62. Goater J, Muller R, Kollias G, Firestein GS, Sanz I, O'Keefe RJ, Schwarz EM (2000) Empirical advantages of adeno associated viral vectors in vivo gene therapy for arthritis. *J Rheumatol* 27:983-989
63. Goebel L, Orth P, Muller A, Zurakowski D, Bucker 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. *Osteoarthritis Cartilage* 20:1046-1055
64. Goebel L, Muller A, Bucker A, Madry H (2015) High resolution MRI imaging at 9.4 Tesla of the osteochondral unit in a translational model of articular cartilage repair. *BMC Musculoskelet Disord* 16:91
65. 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. *Osteoarthritis Cartilage* 25:581-588
66. Goldring MB, Fukuo K, Birkhead JR, Dudek E, Sandell LJ (1994) Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem* 54:85-99
67. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97:33-44
68. Gomoll AH, Farr J, Gillogly SD, Kercher J, Minas T (2010) Surgical management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 92:2470-2490
69. Goncalves MA (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol J* 2:43
70. Goodrich LR, McIlwraith CW (2016) Small Molecules Alone or in Combination to Treat Joint Disease and Progress Toward Gene Therapy. *Operative Techniques in Orthopaedics* 26:73-81

71. Graceffa V, Vinatier C, Guicheux J, Evans CH, Stoddart M, Alini M, Zeugolis DI (2018) State of art and limitations in genetic engineering to induce stable chondrogenic phenotype. *Biotechnol Adv*
72. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M (1989) The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 7:208-218
73. Grimm D, Buning H (2017) Small But Increasingly Mighty: Latest Advances in AAV Vector Research, Design, and Evolution. *Hum Gene Ther* 28:1075-1086
74. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118:3132-3142
75. Hangody L, Feczko P, Bartha L, Bodo G, Kish G (2001) Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop Relat Res*:S328-336
76. Hardingham TE, Fosang AJ (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 6:861-870
77. Hargus G, Kist R, Kramer J, Gerstel D, Neitz A, Scherer G, Rohwedel J (2008) Loss of Sox9 function results in defective chondrocyte differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Int J Dev Biol* 52:323-332
78. Hattori T, Muller C, Gebhard S, Bauer E, Pausch F, Schlund B, Bosl MR, Hess A, Surmann-Schmitt C, von der Mark H, de Crombrughe B, von der Mark K (2010) SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development* 137:901-911
79. Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobnic M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, Van Dijk CN (2012) Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20:423-435
80. Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ (2003) Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 21:573-583
81. High KA, Aubourg P (2011) rAAV human trial experience. *Methods Mol Biol* 807:429-457
82. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M (2002) Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 18:730-734
83. Hoemann C, Kandel R, Roberts S, Saris DB, Creemers L, Mainil-Varlet P, Methot S, Hollander AP, Buschmann MD (2011) International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials. *Cartilage* 2:153-172
84. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD (2005) Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am* 87:2671-2686
85. Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 78:721-733
86. Hunziker EB, Michel M, Studer D (1997) Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. *Microsc Res Tech* 37:271-284

87. Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10:432-463
88. Hunziker EB, Lippuner K, Keel MJ, Shintani N (2015) An educational review of cartilage repair: precepts & practice--myths & misconceptions--progress & prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 23:334-350
89. Hutchings G, Moncrieff L, Dompe C, Janowicz K, Sibiak R, Bryja A (2020) Bone Regeneration, Reconstruction and Use of Osteogenic Cells; from Basic Knowledge, Animal Models to Clinical Trials. 9
90. Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, Chung UI (2004) The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 50:3561-3573
91. Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, Tsumaki N (2011) Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development* 138:1507-1519
92. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F (2000) Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol* 35:581-588
93. Imhoff AB, Öttl GM, Burkart A, Traub S (1999) Osteochondral autologous transplantation in various joints. *Der Orthopäde* 28:33-44
94. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM (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
95. Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck RL, Semino CE, Stoddart MJ (2013) Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater* 25:248-267
96. Jungmann PM, Gersing AS, Baumann F, Holwein C, Braun S, Neumann J, Zarnowski J, Hofmann FC, Imhoff AB, Rummeny EJ, Link TM (2018) Cartilage repair surgery prevents progression of knee degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*
97. Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW (2008) Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Eur Cell Mater* 16:26-39
98. Kiernan JA (1999) *Histological and Histochemical Methods – Theory and Practice* (Oxford, Butterworth-Heinemann).
99. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O (2004) Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 86-A:455-464
100. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O (2007) A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* 89:2105-2112
101. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Ludvigsen TC, 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 Joint Surg Am* 98:1332-1339
102. Kock NB, Smolders JM, van Susante JL, Buma P, van Kampen A, Verdonschot N (2008) A cadaveric analysis of contact stress restoration after osteochondral transplantation of a cylindrical cartilage defect. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 16:461-468

103. Kupcsik L, Stoddart MJ, Li Z, Benneker LM, Alini M (2010) Improving chondrogenesis: potential and limitations of SOX9 gene transfer and mechanical stimulation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 16:1845-1855
104. Kyriiotou M, Fossard-Demoor M, Chadjichristos C, Ghayor C, de Crombrughe B, Pujol JP, Galera P (2003) SOX9 exerts a bifunctional effect on type II collagen gene (COL2A1) expression in chondrocytes depending on the differentiation state. *DNA Cell Biol* 22:119-129
105. Lefebvre V, Smits P (2005) Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:200-212
106. Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M (2016) SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connect Tissue Res*:1-13
107. Leung VY, Gao B, Leung KK, Melhado IG, Wynn SL, Au TY, Dung NW, Lau JY, Mak AC, Chan D, Cheah KS (2011) SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS Genet* 7:e1002356
108. Li C, Samulski RJ (2020) Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*
109. Li Y, Tew SR, Russell AM, Gonzalez KR, Hardingham TE, Hawkins RE (2004) Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9. *Tissue Eng* 10:575-584
110. Little CB, Smith MM, Cake MA, Read RA, Murphy MJ, Barry FP (2010) The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3:S80-92
111. Liu X, Chen Y, Mao AS, Xuan C, Wang Z, Gao H, An G, Zhu Y, Shi X, Mao C (2020) Molecular recognition-directed site-specific release of stem cell differentiation inducers for enhanced joint repair. *Biomaterials* 232:119644
112. Lo YY, Cruz TF (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 270:11727-11730
113. Loser P, Huser A Fau - Hillgenberg M, Hillgenberg M Fau - Kumin D, Kumin D Fau - Both GW, Both Gw Fau - Hofmann C, Hofmann C (2002) Advances in the development of non-human viral DNA-vectors for gene delivery.
114. Lundstrom K (2018) Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases (Basel, Switzerland)* 6:42
115. Luo D, Saltzman WM (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 18:33-37
116. Lutzner J, Kasten P, Gunther KP, Kirschner S (2009) Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee. *Nat Rev Rheumatol* 5:309-316
117. Lydon H, Getgood A, Henson FMD (2017) Healing of Osteochondral Defects via Endochondral Ossification in an Ovine Model. *Cartilage*:1947603517713818
118. Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J (2005) The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol* 36:207-215
119. Madry H, Trippel SB (2000) Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther* 7:286-291
120. Madry H, Cucchiari M, Terwilliger EF, Trippel SB (2003) Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum Gene Ther* 14:393-402

121. Madry H, Kaul G, Cucchiarini M, Stein U, Zurakowski D, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB (2005) Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther* 12:1171-1179
122. Madry H, Kohn D, Cucchiarini M (2006) Gentherapie in der Orthopädie. *Der Orthopäde* 35:1193-1204
123. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M (2010) The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:419-433
124. Madry H, Cucchiarini M (2011) Clinical potential and challenges of using genetically modified cells for articular cartilage repair. *Croat Med J* 52:245-261
125. Madry H, Grun UW, Knutsen G (2011a) Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int* 108:669-677
126. Madry H, Orth P, Cucchiarini M (2011b) Gene Therapy for Cartilage Repair. *Cartilage* 2:201-225
127. Madry H, Luyten FP, Facchini A (2012) Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20:407-422
128. Madry H, Cucchiarini M (2013) Advances and challenges in gene-based approaches for osteoarthritis. *J Gene Med* 15:343-355
129. Madry H, Ziegler R, Orth P, Goebel L, Ong MF, Kohn D, Cucchiarini M, Pape D (2013) Effect of open wedge high tibial osteotomy on the lateral compartment in sheep. Part I: Analysis of the lateral meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 21:39-48
130. Madry H, Cucchiarini M (2014) Tissue-engineering strategies to repair joint tissue in osteoarthritis: nonviral gene-transfer approaches. *Curr Rheumatol Rep* 16:450
131. Madry H, Kon E, Condello V, Peretti GM, Steinwachs M, Seil R, Berruto M, Engebretsen L, Filardo G, Angele P (2016a) Early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 24:1753-1762
132. Madry H, Orth P, Cucchiarini M (2016b) Role of the Subchondral Bone in Articular Cartilage Degeneration and Repair. *J Am Acad Orthop Surg* 24:e45-46
133. Madry H, Gao L, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Muller-Brandt K, Cai X, Goebel L, Schmitt G, Speicher-Mentges S, Zurakowski D, Menger MD, Laschke MW, Cucchiarini M (2020) Thermosensitive Hydrogel Based on PEO-PPO-PEO Poloxamers for a Controlled In Situ Release of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Effective Gene Therapy of Cartilage Defects. *32:e1906508*
134. Marconi P, Argnani R, Berto E, Epstein AL, Manservigi R (2008) HSV as a vector in vaccine development and gene therapy. *Hum Vaccin* 4:91-105
135. Martin JA, Buckwalter JA (2002) Human chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biorheology* 39:145-152
136. Meachim G (1972) Light microscopy of Indian ink preparations of fibrillated cartilage. *Ann Rheum Dis* 31:457-464
137. Meehan JP, Danielsen B, Kim SH, Jamali AA, White RH (2014) Younger age is associated with a higher risk of early periprosthetic joint infection and aseptic mechanical failure after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 96:529-535
138. Mierisch CM, Wilson HA, Turner MA, Milbrandt TA, Berthoux L, Hammarskjold ML, Rekosh D, Balian G, Diduch DR (2003) Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg Am* 85-A:1757-1767

139. Minas T, Gomoll AH, Rosenberger R, Royce RO, Bryant T (2009) Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *Am J Sports Med* 37:902-908
140. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR (2009) Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med* 37:2053-2063
141. Mithoefer K, Venugopal V, Manaqibwala M (2016) Incidence, Degree, and Clinical Effect of Subchondral Bone Overgrowth After Microfracture in the Knee. *Am J Sports Med* 44:2057-2063
142. Monahan PE, Samulski RJ (2000) AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* 7:24-30
143. Muller G, Hanschke M (1996) Quantitative and qualitative analyses of proteoglycans in cartilage extracts by precipitation with 1,9-dimethylmethylene blue. *Connect Tissue Res* 33:243-248
144. Müller PE, Gallik D, Hammerschmid F, Baur-Melnyk A, Pietschmann MF, Zhang A, Niethammer TR (2020) Third-generation autologous chondrocyte implantation after failed bone marrow stimulation leads to inferior clinical results. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 28:470-477
145. Needham CJ, Shah SR, Dahlin RL, Kinard LA, Lam J, Watson BM, Lu S, Kasper FK, Mikos AG (2014) Osteochondral tissue regeneration through polymeric delivery of DNA encoding for the SOX trio and RUNX2. *Acta Biomater* 10:4103-4112
146. Niemeyer P, Albrecht D, Andereya S, Angele P, Ateschrang A, Aurich M, Baumann M, Bosch U, Erggelet C, Fickert S, Gebhard H, Gelse K, Gunther D, Hoburg A, Kasten P, Kolombe T, Madry H, Marlovits S, Meenen NM, Muller PE, Noth U, Petersen JP, Pietschmann M, Richter W, Rolauffs B, Rhunau K, Schewe B, Steinert A, Steinwachs MR, Welsch GH, Zinser W, Fritz J (2016) Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: A guideline by the working group "Clinical Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU). *Knee* 23:426-435
147. Nixon AJ, Sparks HD, Begum L, McDonough S, Scimeca MS, Moran N, Matthews GL (2017) Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation (MACI) Using a Cell-Seeded Collagen Membrane Improves Cartilage Healing in the Equine Model. *J Bone Joint Surg Am* 99:1987-1998
148. Noyes FR, Stabler CL (1989) A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med* 17:505-513
149. O'Driscoll SW (1998) The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 80:1795-1812
150. Ochs BG, Muller-Horvat C, Albrecht D, Schewe B, Weise K, Aicher WK, Rolauffs B (2011) Remodeling of articular cartilage and subchondral bone after bone grafting and matrix-associated autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans of the knee. *Am J Sports Med* 39:764-773
151. Ofri R, Averbukh E, Ezra-Elia R, Ross M, Honig H, Obolensky A, Rosov A, Hauswirth WW, Gootwine E, Banin E (2018) Six Years and Counting: Restoration of Photopic Retinal Function and Visual Behavior Following Gene Augmentation Therapy in a Sheep Model of CNGA3 Achromatopsia. *Hum Gene Ther*
152. Orth P (2008) *Gentransfer zur Verbesserung der Knorpelreparatur*, Universität des Saarlandes, Campus Homburg/Saar; 2008.
153. Orth P, Cucchiari M, Kaul G, Ong MF, Graber S, Kohn DM, Madry H (2012a) Temporal and spatial migration pattern of the subchondral bone plate in a rabbit osteochondral defect model. *Osteoarthritis Cartilage* 20:1161-1169

154. Orth P, Goebel L, Wolfram U, Ong MF, Graber S, Kohn D, Cucchiarini M, Ignatius A, Pape D, Madry H (2012b) Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone: analysis in a large animal model at 6 months. *Am J Sports Med* 40:828-836
155. Orth P, Cucchiarini M, Kohn D, Madry H (2013a) Alterations of the subchondral bone in osteochondral repair--translational data and clinical evidence. *Eur Cell Mater* 25:299-316; discussion 314-296
156. Orth P, Cucchiarini M, Zurakowski D, Menger MD, Kohn DM, Madry H (2013b) Parathyroid hormone [1-34] improves articular cartilage surface architecture and integration and subchondral bone reconstitution in osteochondral defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 21:614-624
157. Orth P, Madry H (2013) A low morbidity surgical approach to the sheep femoral trochlea. *BMC Musculoskelet Disord* 14:5
158. Orth P, Meyer HL, Goebel L, Eldracher M, Ong MF, Cucchiarini M, Madry H (2013c) Improved repair of chondral and osteochondral defects in the ovine trochlea compared with the medial condyle. *J Orthop Res* 31:1772-1779
159. Orth P, Zurakowski D, Alini M, Cucchiarini M, Madry H (2013d) Reduction of sample size requirements by bilateral versus unilateral research designs in animal models for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 19:885-891
160. Orth P, Madry H (2015) Complex and elementary histological scoring systems for articular cartilage repair. *Histol Histopathol* 30:911-919
161. 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
162. Orth P, Duffner J, Zurakowski D, Cucchiarini M, Madry H (2016) Small-Diameter Awns Improve Articular Cartilage Repair After Microfracture Treatment in a Translational Animal Model. *Am J Sports Med* 44:209-219
163. Orth P, Madry H (2016) Knorpeldefekte. *Arthroskopie* 29:68-74
164. Orth P, Gao L, Madry H (2019) Microfracture for cartilage repair in the knee: a systematic review of the contemporary literature. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*
165. Panda DK, Miao D, Lefebvre V, Hendy GN, Goltzman D (2001) The transcription factor SOX9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells. *J Biol Chem* 276:41229-41236
166. Papadakis ED, Nicklin SA, Baker AH, White SJ (2004) Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy. *Curr Gene Ther* 4:89-113
167. Patel JM, Saleh KS, Burdick JA, Mauck RL (2019) Bioactive factors for cartilage repair and regeneration: Improving delivery, retention, and activity. *Acta Biomater*
168. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*:S26-33
169. Pridie KH (1959) A method of resurfacing knee joints. *Proceedings of the British orthopaedic association. J Bone Joint Surg Br* 41:618
170. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB (2006) Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 14:13-29
171. Qiu YS, Shahgaldi BF, Revell WJ, Heatley FW (2003) Observations of subchondral plate advancement during osteochondral repair: a

- histomorphometric and mechanical study in the rabbit femoral condyle. *Osteoarthritis Cartilage* 11:810-820
172. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML (2003) Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80:148-158
 173. Raudner M, Schreiner MM, Röhrich S, Zalaudek M, Trattnig S (2017) Wann ist eine Knorpelreparatur erfolgreich? *Der Radiologe* 57:907-914
 174. Rey-Rico A, Frisch J, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M (2015) Determination of effective rAAV-mediated gene transfer conditions to support chondrogenic differentiation processes in human primary bone marrow aspirates. *Gene Ther* 22:50-57
 175. Rey-Rico A, Cucchiari M (2016) Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery. *Acta Biomater* 29:1-10
 176. Rey-Rico A, Frisch J, Venkatesan JK, Schmitt G, Rial-Hermida I, Taboada P, Concheiro A, Madry H, Alvarez-Lorenzo C, Cucchiari M (2016) 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* 8:20600-20613
 177. Roughley PJ (2006) The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater* 12:92-101
 178. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T (1987) A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 61:3096-3101
 179. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T (1989) Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63:3822-3828
 180. Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, Delcour JP, Msika P, Baudouin C, Henrotin YE (2012) Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis Rheum* 64:1193-1203
 181. Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Almqvist KF, Verdonk R, Bellemans J, Luyten FP (2009) Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture. *Am J Sports Med* 37 Suppl 1:10S-19S
 182. Schinhan M, Gruber M, Vavken P, Dorotka R, Samouh L, Chiari C, Gruebl-Barabas R, Nehrer S (2012) Critical-size defect induces unicompartmental osteoarthritis in a stable ovine knee. *J Orthop Res* 30:214-220
 183. Schneider-Wald B, von Thaden AK, Schwarz MLR (2013) Defektmodelle für die Gelenkknorpelregeneration im Großtier. *Der Orthopäde* 42:242-253
 184. Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A, Lopez-Rios J, Zeller R, Barbero A, Martin I (2010) Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7251-7256
 185. Sellers RS, Peluso D, Morris EA (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* 79:1452-1463
 186. Seow D, Yasui Y, Hutchinson ID, Hurley ET, Shimosono Y, Kennedy JG (2017) The Subchondral Bone Is Affected by Bone Marrow Stimulation: A Systematic Review of Preclinical Animal Studies. *Cartilage*:1947603517711220

187. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75:532-553
188. Shi S, Wang C, Acton AJ, Eckert GJ, Trippel SB (2015) Role of sox9 in growth factor regulation of articular chondrocytes. *J Cell Biochem* 116:1391-1400
189. Shi S, Mercer S, Eckert GJ, Trippel SB (2019) Regulation of articular chondrocyte catabolic genes by growth factor interaction.
190. Skyscan (2008) Structural parameters measured by Skyscan™ CT-analyzer software. Skyscan:S. 1-36
191. Smith GD, Taylor J, Almqvist KF, Erggelet C, Knutsen G, Garcia Portabella M, Smith T, Richardson JB (2005) Arthroscopic assessment of cartilage repair: a validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy* 21:1462-1467
192. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
193. Smith RH (2008) Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 15:817-822
194. Somoza RA, Welter JF, Correa D, Caplan AI (2014) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Eng Part B Rev* 20:596-608
195. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999) The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade* 28:26-32
196. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ (2001) Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*:S362-369
197. Studer D, Millan C, Ozturk E, Maniura-Weber K, Zenobi-Wong M (2012) Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 24:118-135; discussion 135
198. Tao K, Rey-Rico A, Frisch J, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Lin J, Cucchiari M (2017) Effects of combined rAAV-mediated TGF-beta and sox9 gene transfer and overexpression on the metabolic and chondrogenic activities in human bone marrow aspirates. *J Exp Orthop* 4:4
199. Tew SR, Pothacharoen P, Katopodi T, Hardingham TE (2008) SOX9 transduction increases chondroitin sulfate synthesis in cultured human articular chondrocytes without altering glycosyltransferase and sulfotransferase transcription. *Biochem J* 414:231-236
200. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* 4:346-358
201. 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* 301:338-343
202. Turner CH (2002) Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int* 13:97-104
203. van der Kraan PM, van den Berg WB (2007) Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage* 15:237-244
204. Venkatesan JK, Ekici M, Madry H, Schmitt G, Kohn D, Cucchiari 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

205. Venkatesan JK, Gardner O, Rey-Rico A (2018a) Improved Chondrogenic Differentiation of rAAV SOX9-Modified Human MSCs Seeded in Fibrin-Polyurethane Scaffolds in a Hydrodynamic Environment. 19
206. Venkatesan JK, Moutos FT, Rey-Rico A, Estes BT, Frisch J, Schmitt G, Madry H, Guilak F, Cucchiari M (2018b) Chondrogenic Differentiation Processes in Human Bone Marrow Aspirates Seeded in Three-Dimensional Woven Poly(epsilon-Caprolactone) Scaffolds Enhanced by rAAV-Mediated SOX9 Gene Transfer. *Hum Gene Ther*
207. Venkatesan JK, Rey-Rico A, Cucchiari M (2019) Current Trends in Viral Gene Therapy for Human Orthopaedic Regenerative Medicine. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*
208. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76:579-592
209. Wang D, Tai PWL (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery.
210. Wei X, Gao J, Messner K (1997) Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint. *J Biomed Mater Res* 34:63-72
211. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T (2007) Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee* 14:177-182
212. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P (1995) The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9:15-20
213. Wu P, Chen H, Jin R, Weng T, Ho JK, You C, Zhang L, Wang X, Han C (2018) Non-viral gene delivery systems for tissue repair and regeneration. *J Transl Med* 16:29
214. Xiao X, Li J, Samulski RJ (1996) Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 70:8098-8108
215. Yasuda H, Oh CD, Chen D, de Crombrughe B, Kim JH (2017) A Novel Regulatory Mechanism of Type II Collagen Expression via a SOX9-dependent Enhancer in Intron 6. *J Biol Chem* 292:528-538
216. Zhang X, Wu S, Naccarato T, Prakash-Damani M, Chou Y, Chu CQ (2017) Regeneration of hyaline-like cartilage in situ with SOX9 stimulation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. 12:e0180138
217. Zhou G, Lefebvre V, Zhang Z, Eberspaecher H, de Crombrughe B (1998) Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *J Biol Chem* 273:14989-14997
218. Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B (2006) Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19004-19009

9. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Labor des Zentrums für Experimentelle Orthopädie der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes erstellt.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Madry und Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Madry (geb. Cucchiarini) für die außerordentlich gute Betreuung, ihre ständige Ansprechbarkeit und ermunternden Worte in einer schweren Lebenslage meines Lebens. Dies alles war von unschätzbarem Wert für die Fertigstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Besonders möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Gertrud Schmitt, Dr. rer. nat. Jagadeesh K. Venkatesan, Dr. rer. nat. Ana Rey-Rico, Dr. rer. nat. Janina Frisch, Prof. Dr. med. Patrick Orth und Dr. med. Lars Goebel bedanken, die für alle Fragen und Belange immer ein offenes Ohr hatten.

Und zuletzt danke ich meiner Mutter und meinen Geschwistern, die mich in jeder Phase meines Lebens unterstützt haben.