

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

**Effekt eines kombinierten rekombinanten adeno-
assoziierten viralen Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I
auf die Chondrogenese von humanen mesenchymalen
Stromazellen *in vitro* und in einem humanen
osteocondralen Defektmodell *ex vivo***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2022

vorgelegt von: Stephanie Morscheid
geboren am: 19.10.1990 in Wittlich

Tag der Promotion: 18. November 2022

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

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Magali Madry
Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese
Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann

Meinem verstorbenen Vater
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungen.....	XII
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Problematik.....	3
2.2 Die osteochondrale Einheit	4
2.2.1 Der hyaline Gelenkknorpel	5
2.2.2 Der subchondrale Knochen.....	7
2.3 Knorpelhomöostase	7
2.4 Gelenkknorpeldefekte	9
2.5 Die osteochondrale Reparatur	10
2.6 Mesenchymale Stromazellen in der Knorpelreparatur	11
2.7 Klinische Relevanz fokaler Gelenkknorpeldefekte.....	12
2.8 Klinisch etablierte Therapieoptionen	13
2.9 Experimentelle Therapieansätze.....	14
2.9.1 Überblick über die Gentherapie.....	14
2.9.2 Gentherapie osteochondraler Defekte.....	15
2.9.3 Gentransfermethoden	15
2.9.4 Therapeutische Faktoren	16
2.9.4.1 TGF- β als therapeutischer Faktor	18
2.9.4.2 IGF-I als therapeutischer Faktor	20
2.9.5 Vektorsysteme	21
2.9.6 rAAV-Vektoren	22
2.9.6.1 Adeno-assoziierte Viren	22
2.9.6.2 Wirtszellinfektion	23
2.9.6.3 Virale DNS-Replikation und virales DNS- <i>Packaging</i>	26
2.9.6.4 rAAV-Vektoren	28
3 Hypothesen.....	30
4 Konzept der Studie.....	31
5 Materialien	34
5.1 Chemikalien	34
5.2 Lösungen, Puffer und Medien	35
5.3 Analyse-Sets.....	38
5.4 Biologische Materialien	38
5.4.1 Zellen und Gelenkknorpel	38

5.4.1.1	Humane mesenchymale Stromazellen und Knorpelimplantate	38
5.4.1.2	<i>Human Embryonic Kidney (HEK)-293-Zellen</i>	38
5.4.2	Plasmide	39
5.4.3	Antikörper und Enzyme	39
5.4.4	Primer	39
5.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien	40
5.5.1	Geräte	40
5.5.2	Verbrauchsmaterialien	41
5.5.3	Software	41
6	Methoden	42
6.1	Versuchsaufbau	42
6.1.1	Gruppeneinteilung	42
6.1.2	Direktes virales Gentransfermodell	43
6.1.3	Indirektes virales Gentransfermodell	44
6.2	Zellkultur	45
6.2.1	Isolierung und Kultivierung humaner MSZ aus Knochenmarkspiraten	45
6.2.2	Passagieren von Zellen	46
6.2.3	Bestimmung der Zellzahl	46
6.2.4	Herstellung von humanen 3D-MSZ-Aggregaten	47
6.3	Vorbereitung von rAAV-Plasmiden	47
6.3.1	Plasmid-Aufbau	48
6.3.2	Transformation	49
6.3.3	Bakterienanreicherung	50
6.3.4	Plasmidisolation	50
6.3.5	Bestimmung der Plasmidkonzentration und -reinheit	51
6.3.6	Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese	52
6.4	Herstellung von rAAV-Vektoren	53
6.4.1	Transfektion	54
6.4.2	X-Gal-Färbung	55
6.5	Transduktion	57
6.5.1	Kultivierung des direkten viralen Gentransfermodells	57
6.5.2	Kultivierung des indirekten viralen Gentransfermodells	58
6.6	Herstellung humaner osteochondraler Defektmodelle	58
6.7	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	59
6.7.1	Durchführung des hTGF- β - <i>ELISA</i>	60
6.7.2	Durchführung des hIGF-I- <i>ELISA</i>	62
6.8	Biochemische Analysen	63
6.8.1	Papain-Verdau	63
6.8.1.1	Humane 3D-MSZ-Aggregate	63

6.8.1.2	Humane osteochondrale Defektmodelle	63
6.8.2	Proteoglykan-Bestimmung mittels DMMB-Test	64
6.8.3	Gesamtprotein-Bestimmung mittels BCA-Test	65
6.8.4	DNS-Bestimmung mittels Hoechst 33258-Test	65
6.9	Histologische und immunhistochemische Analysen	66
6.9.1	Aufarbeitung der humanen 3D-MSZ-Aggregate	66
6.9.2	Aufarbeitung der humanen osteochondralen Defektmodelle	67
6.9.3	Histologische Färbungen.....	68
6.9.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	68
6.9.3.2	Toluidinblau-Färbung.....	69
6.9.3.3	Safranin-O-Färbung.....	69
6.9.3.4	Alizarin-Rot-Färbung	70
6.9.4	Immunhistochemische Färbungen	70
6.9.5	Modifiziertes Bewertungssystem aus Bern.....	72
6.9.6	<i>Real-time</i> RT-PCR-Analysen	73
6.9.7	RNS-Isolation.....	73
6.9.8	Reverse Transkription	74
6.9.9	Ablauf der <i>Real-time</i> RT-PCR	75
6.10	Statistische Analysen.....	77
7	Ergebnisse.....	79
7.1	Humane 3D-MSZ-Aggregate.....	79
7.1.1	Analysen der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I	79
7.1.1.1	Analyse der Transgenexpression mittels <i>ELISA</i>	79
7.1.1.2	Analyse der Transgenexpression mittels	
	immunhistochemischen Färbungen	80
7.1.2	Evaluation biosynthetischer, proliferativer und chondrogener.....	
	Differenzierungsaktivitäten	83
7.1.2.1	Analyse der Zellzahl mittels DNS-Bestimmung.....	83
7.1.2.2	Analyse der Zellzahl mittels	
	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	83
7.1.2.3	Analyse des Proteoglykangehalts mittels.....	
	biochemischen Analysen.....	84
7.1.2.4	Analyse des Proteoglykangehalts mittels.....	
	Toluidinblau-Färbung.....	85
7.1.2.5	Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression mittels.....	
	immunhistochemischer Färbung.....	86
7.1.3	Evaluation osteogener und hypertropher.....	
	Differenzierungsaktivitäten	87
7.1.3.1	Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression mittels.....	
	immunhistochemischer Färbung.....	87
7.1.3.2	Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression mittels	
	immunhistochemischer Färbung.....	89

7.1.3.3	Analyse des Calciumphosphatgehalts mittels Alizarin-Rot-Färbung	90
7.1.4	<i>Real-time RT-PCR</i> -Analysen	91
7.1.4.1	Analyse der SOX9-Expression	91
7.1.4.2	Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression.....	91
7.1.4.3	Analyse der Aggrekan-Expression.....	92
7.1.4.4	Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression.....	93
7.1.4.5	Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression	93
7.2	Humane osteochondrale Defektmodelle	94
7.2.1	Analysen der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I.....	94
7.2.1.1	Analyse der Transgenexpression mittels <i>ELISA</i>	95
7.2.1.2	Analyse der Transgenexpression mittels immunhistochemischen Färbungen.....	95
7.2.2	Evaluation biosynthetischer, proliferativer und chondrogener Differenzierungsaktivitäten	98
7.2.2.1	Analyse der Zellzahl mittels DNS-Bestimmung.....	98
7.2.2.2	Analyse der Zellzahl mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung	98
7.2.2.3	Analyse des Proteoglykangehalts mittels biochemischen Analysen.....	99
7.2.2.4	Analyse des Proteoglykangehalts mittels Safranin-O-Färbung.....	100
7.2.2.5	Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression mittels immunhistochemischer Färbung.....	102
7.2.3	Evaluation osteogener und hypertropher Differenzierungsaktivitäten	103
7.2.3.1	Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression mittels immunhistochemischer Färbung.....	103
7.2.3.2	Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression mittels immunhistochemischer Färbung.....	104
7.2.4	<i>Real-time RT-PCR</i> -Analysen	106
7.2.4.1	Analyse der SOX9-Expression	106
7.2.4.2	Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression.....	106
7.2.4.3	Analyse der Aggrekan-Expression.....	107
7.2.4.4	Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression.....	107
7.2.4.5	Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression	108
7.2.4.6	Analyse der Matrix-Metalloproteinase 13-Expression	109
8	Diskussion.....	110
8.1	Wirkung eines direkten und indirekten kombinierten rAAV-basierten Gentransfers auf chondroreparative Differenzierungsaktivitäten von humanen mesenchymalen Stromazellen	112
8.1.1	Analysen der Transgenexpression	112

8.1.2	Proliferative, biosynthetische und chondrogene Differenzierungsaktivitäten	115
8.1.3	Osteogene, hypertrophe und terminale Differenzierungsaktivitäten	118
8.2	Vorgehensweise	120
8.2.1	Konzept der Studie.....	120
8.2.2	Analyseverfahren	122
8.2.3	rAAV-Vektoren	122
8.2.4	TGF- β und IGF-I als therapeutische Faktoren.....	126
8.2.5	Zielzellen.....	127
8.3	Limitationen	127
8.4	Klinische Relevanz.....	129
8.5	Zusammenfassung und Ausblick	130
9	Referenzen.....	132
10	Publikationen und Abstracts.....	156
11	Danksagungen	158
12	Lebenslauf.....	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematischer Aufbau der osteochondralen Einheit	5
Abbildung 2. Schematische Darstellung der anabolen und katabolen	
Signalwege im Gelenkknorpel.....	8
Abbildung 3. Einteilung von Gelenkknorpeldefekten	9
Abbildung 4. Gentransfermethoden für osteochondrale Defekte	16
Abbildung 5. Signaltransduktionswege von TGF- β und deren Einflüsse auf den.....	
Gelenkknorpel.....	19
Abbildung 6. Signaltransduktionswege von IGF-I und deren Einflüsse auf den.....	
Gelenkknorpel.....	20
Abbildung 7. Schematische Darstellung des AAV-2-Genoms (Wildtyp)	23
Abbildung 8. Schematische Darstellung der Wirtszellinfektion am Beispiel des	
AAV-2 (Wildtyp)	25
Abbildung 9. Schematische Darstellung des viralen <i>Packagings</i>	27
Abbildung 10. Schematische Darstellung des Wildtyp-AAV-2 und des rAAV-2	28
Abbildung 11. Konzept der Studie.....	33
Abbildung 12. Schematische Übersicht über das direkte rekombinante	
adeno-assoziierte virale Gentransfermodell	43
Abbildung 13. Schematische Übersicht über das indirekte rekombinante	
adeno-assoziierte virale Gentransfermodell	44
Abbildung 14. Kultivierung von humanen 3D-MSZ-Aggregaten	47
Abbildung 15. Schematischer Plasmid-Aufbau	48
Abbildung 16. Schematische Darstellung des rekombinanten.....	
adeno-assoziierten viralen <i>Packagings</i>	53
Abbildung 17. Transduktionsnachweis mittels X-Gal-Färbung	56
Abbildung 18. Herstellung humaner osteochondraler Defektmodelle	59
Abbildung 19. Serielle Verdünnungsreihe zur Durchführung des hTGF- β 1- <i>ELISA</i>	61
Abbildung 20. Serielle Verdünnungsreihe zur Durchführung des hIGF-I- <i>ELISA</i>	62
Abbildung 21. Aufarbeitung humaner osteochondraler Defektmodelle für.....	
histologische und immunhistochemische Analysen	67
Abbildung 22. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β rAAV-basiert	
transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels	
TGF- β -Immunhistochemie.....	81
Abbildung 23. Analyse der Transgenexpression von hIGF-I rAAV-basiert	
transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels IGF-I-Immunhistochemie.....	82

Abbildung 24. Analyse der Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung	84
Abbildung 25. Analyse des Proteoglykangehalts von rAAV-basiert..... transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Toluidinblau-Färbung.....	86
Abbildung 26. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert..... transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels	87
Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie	
Abbildung 27. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert..... transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels	88
Typ-I-Kollagen-Immunhistochemie	
Abbildung 28. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert	89
transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels	
Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie	
Abbildung 29. Analyse des Calciumphosphatgehalts von rAAV-basiert	90
transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Alizarin-Rot-Färbung	
Abbildung 30. Übersicht über die Ergebnisse der <i>Real-time</i> RT-PCR-Analysen	94
von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten	
Abbildung 31. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I	97
rAAV-basiert transduzierter humaner osteochondraler Defektmodelle	
mittels TGF- β - und IGF-I-Immunhistochemie	
Abbildung 32. Analyse der Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen	99
osteochondralen Defektmodellen mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung	
Abbildung 33. Analyse des Proteoglykangehalts von rAAV-basiert..... transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels.....	101
Safranin-O-Färbung	
Abbildung 34. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert..... transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels.....	103
Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie	
Abbildung 35. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert..... transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels.....	104
Typ-I-Kollagen-Immunhistochemie	
Abbildung 36. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert	105
transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels.....	
Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie	
Abbildung 37. Übersicht über die Ergebnisse der <i>Real-time</i> RT-PCR-Analysen	109
von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen	
Abbildung 38. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	111

Abbildung 39. Übersicht über den translationalen Forschungsansatz 128

Sämtliche Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden entweder eigenständig entworfen oder nach den jeweils angegebenen Referenzen adaptiert und anschließend eigenständig mit einem entsprechenden Computerprogramm erstellt.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Chemikalien.....	34
Tabelle 2. Verwendete Lösungen, Puffer und Medien.....	35
Tabelle 3. Verwendete Analyse-Sets	38
Tabelle 4. Verwendete Antikörper und Enzyme	39
Tabelle 5. Verwendete Primer.....	39
Tabelle 6. Verwendete Geräte	40
Tabelle 7. Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	41
Tabelle 8. Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese.....	52
Tabelle 9. Schema zur Herstellung der Standardkurve für den DMMB-Test	64
Tabelle 10. Schema zur Herstellung der Standardkurve für den BCA-Test.....	65
Tabelle 11. Schema zur Herstellung der Standardkurve für den	
Hoechst 33258-Test.....	66
Tabelle 12. Verwendete Antikörperlösungen und entsprechende Verdünnungen	
für immunhistochemische Analysen	72
Tabelle 13. Modifiziertes Bewertungssystem aus Bern	73
Tabelle 14. Verwendete Primer (Sequenzen) für <i>Real-time RT-PCR</i> -Analysen	76
Tabelle 15. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I.....	
rAAV-basiert transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels <i>ELISA</i>	80
Tabelle 16. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β rAAV-basiert	
transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels	
TGF- β -Immunhistochemie.....	81
Tabelle 17. Analyse der Transgenexpression von hIGF-I rAAV-basiert.....	
transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels	
IGF-I-Immunhistochemie.....	82
Tabelle 18. Analyse der Zellzahl von rAAV-basiert transduzierten humanen	
3D-MSZ-Aggregaten mittels Bestimmung des DNS-Gehalts.....	83
Tabelle 19. Analyse der Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen	
3D-MSZ-Aggregaten mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung	84
Tabelle 20. Analyse biosynthetischer Aktivitäten von rAAV-basiert transduzierten.....	
humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels biochemischen Untersuchungen.....	85
Tabelle 21. Analyse des Proteoglykangehalts von rAAV-basiert transduzierten.....	
humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Toluidinblau-Färbung.....	86

Tabelle 22. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie	87
Tabelle 23. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Typ-I-Kollagen-Immunhistochemie	88
Tabelle 24. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie	89
Tabelle 25. Analyse des Calciumphosphatgehalts von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Alizarin-Rot-Färbung	90
Tabelle 26. Analyse der SOX9-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	91
Tabelle 27. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	92
Tabelle 28. Analyse der Aggrekan-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	92
Tabelle 29. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	93
Tabelle 30. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	94
Tabelle 31. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner osteochondraler Defektmodelle mittels <i>ELISA</i>	95
Tabelle 32. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner osteochondraler Defektmodelle mittels TGF- β - und IGF-I-Immunhistochemie	97
Tabelle 33. Analyse der Zellzahl von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Bestimmung des DNS-Gehalts	98
Tabelle 34. Analyse der Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung	99
Tabelle 35. Analyse biosynthetischer Aktivitäten von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels biochemischen Untersuchungen	100
Tabelle 36. Analyse des Proteoglykangehalts von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Safranin-O-Färbung	101

Tabelle 37. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie	102
Tabelle 38. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Typ-I-Kollagen-Immunhistochemie	104
Tabelle 39. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie	105
Tabelle 40. Analyse der SOX9-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	106
Tabelle 41. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	107
Tabelle 42. Analyse der Aggrekan-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	107
Tabelle 43. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	108
Tabelle 44. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	108
Tabelle 45. Analyse der Matrix-Metalloproteinase 13-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels <i>Real-time RT-PCR</i>	109

Abkürzungen

3D	dreidimensional
(M)ACT	(matrixgestützte) autologe Chondrozytentransplantation
(r)AAV-Vektor	(rekombinanter) adeno-assoziiertes viraler Vektor
°C	Grad Celsius
AAVS1	AAV <i>Integration Site 1</i>
ABC-Reagenz	Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz
Ad5/8	Adenovirus 5/8
ADAMTS	<i>a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs</i>
Akt	Proteinkinase B
ALK	<i>Activin Receptor-like Kinase</i>
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzgen
ATPase	Adenosintriphosphatasen
BCA	Bicinchoninsäure (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
BMP	knochenmorphogenetisches Protein (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>)
bp	Basenpaar
c-Jun	Bestandteil des Transkriptionsfaktors <i>Activator protein 1</i> (AP-1), Protoonkogen
cap	Kapsid-Gen des adeno-assoziierten viralen Virus
CD	Immunphänotypischer Oberflächenmarker (<i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNS	komplementäre (<i>complementary</i>) Desoxyribonukleinsäure
CMV-IE	Cytomegalovirus- <i>Immediate Early</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated Protein 9</i>
Ct-Wert	Schwellenwertzyklus (<i>Cycle threshold</i>)
Cu	Kupfer
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMMB	Dimethylmethylenblau (<i>Dimethylmethylene Blue</i>)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsDNS	doppelsträngige (<i>double-stranded</i>) Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1/2	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2</i>

EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	fetales Kälberserum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP/GTP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
Grb2	<i>Growth Factor Receptor-bound Protein 2</i>
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase-3 beta
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HBS	<i>HEPES Buffered Saline</i> (Pufferlösung)
HCl	Salzsäure
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney</i> (humane embryonale Nieren)-293-Zellen
HeLa-Zellen	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks
HEPES	Puffersubstanz 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLA-DR	Humanes Leukozyten-Antigen DR (Klasse-II-Antigen)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
HSPG	Herparansulfat-Proteoglykan
(h)IGF-I	(humaner) insulinartiger Wachstumsfaktor I (<i>Insulin-like Growth Factor I</i>)
IgG	Immunglobulin G
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
IL-1, -17, -18	Interleukin-1, -17, -18
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
IRS1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1
ITR	<i>Inverted Terminal Repeat</i>
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase-Gen (Reportergen)
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>Multiple Cloning Site</i>)
mg	Milligramm
MEK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase Kinase</i>

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>Multiplicity of Infection</i>)
mRNS	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
MSZ	mesenchymale Stromazellen
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
N	Normalität (Konzentrationsmaß)
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPC	Kernporenkomplex (<i>Nuclear Pore Complex</i>)
OAT	osteochondrale autologe Transplantation
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
ORI	Replikationsursprung (<i>Origin of Replication</i>)
PBE	Phosphat-gepufferte EDTA-Lösung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEO-PPO-PEO	Polythylenoxid-Polypropylenoxid-Polyethylenoxid
pH	Potential des Wasserstoffs
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase-B
pSSV9	AAV-2 genomischer Klon (nach Samulski)
PTHrP	Parathormon-verwandtes Peptid (<i>Parathormon-related Protein</i>)
Rab-Protein	<i>Brai in brain</i> (G-Poteine)
Ras/Raf	<i>Rat sarcoma/Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RBE	<i>Rep-binding Element</i>
rep	Replikations-Gen des adeno-assoziierten viralen Virus
Rep	Replikations-Proteine des adeno-assoziierten viralen Virus
RRS	<i>Rep-recognition Sequence</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RUNX2	<i>Runt-related Transcription Factor 2</i>
s	Sekunde

SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2</i>
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Shc	<i>Src homology and collagen protein</i>
Smad	<i>Small body size and mother against decapentaplegic</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> -Nährmedium mit Glucose
SOS	Nukleotid-Austauschfaktor (<i>Son of Sevenless</i>)
SOX9	<i>SRY (Sex determining Region Y)-related HMG (High-Mobility Group) box 9</i>
ssDNS	einzelsträngige (<i>single-stranded</i>) Desoxyribonukleinsäure
SV40(pA)	Simian-Virus 40 (Polyadenylierungssignal)
TβR-I/II	membrangebunder TGF-β-Typ-I/II-Rezeptor
TE	Tris-EDTA (Puffermittel mit Chelatbildner)
(h)TGF-β	(humaner) transformierender Wachstumsfaktor beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
TNE	Tris-NaCl-EDTA (Puffer für Molekularbiologie)
TNF-β	Tumornekrosefaktor (<i>Tumor Necrosis Factor</i>) alpha
trs	<i>terminal resolution site</i>
U/min	Umdrehungen/Minute
VA	<i>Viral Associated</i>
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VP1, 2, 3	Virionprotein 1, 2, 3
Wnt	<i>Wingless and vertebrate homolog integrated int-1</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid (Substrat der β-Galactosidase)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

1 Zusammenfassung

Fragestellung: Fokale osteochondrale Defekte besitzen kein relevantes intrinsisches Heilungspotential. Eine kurative Therapie existiert nicht. Die direkte Applikation chondrogener Gensequenzen mittels viraler Genvektoren in das Defektareal zur Stimulation intrinsischer chondroreparativer Aktivitäten migrierender mesenchymaler Stromazellen (MSZ) aus dem Knochenmark stellt einen vielversprechenden Therapieansatz dar, ebenso wie die lokale Applikation *ex vivo* genetisch modifizierter MSZ in das Defektareal. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Effekt eines kombinierten rekombinanten adeno-assoziierten viralen (rAAV) Gentransfers der Wachstumsfaktoren des humanen transformierenden Wachstumsfaktors beta (hTGF- β) und des humanen insulinartigen Wachstumsfaktors I (hIGF-I) auf die chondroreparativen Differenzierungsaktivitäten von humanen MSZ *in vitro* und nach Implantation in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo*.

Methoden: Humane MSZ und Knorpelproben stammten von Patienten, die sich einer Knie-Totalendoprothesenimplantation unterzogen. Aus isolierten humanen MSZ wurden hochdichte dreidimensionale (3D-) Zellaggregate hergestellt, diese für 24 h in definiertem chondrogenem Medium kultiviert und anschließend mit rAAV-Vektoren wie folgt transduziert: hTGF- β /hIGF-I, hTGF- β /*lacZ*, hIGF-I/*lacZ*, Reporter-*lacZ*. Die transduzierten humanen 3D-Zellaggregate wurden 21 Tage in chondrogenem Medium bei 37 °C kultiviert (direkter *in vitro*-Ansatz) oder 24 h nach erfolgter Transduktion in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo* implantiert und folgend in chondrogenem Medium 21 Tage bei 37 °C kultiviert (indirekter *ex vivo*-Ansatz). Die chondroreparativen Potentiale der humanen MSZ beider Kulturmodelle wurden mittels biochemischen, histologischen, immunhistochemischen sowie *Real-time* RT-PCR- und Transgenexpressions-Analysen evaluiert.

Ergebnisse: Die kombinierte rAAV-basierte Überexpression von hTGF- β /hIGF-I resultierte in humanen MSZ *in vitro* und nach Implantation in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo* nach 21 Tagen in verbesserten chondroreparativen Differenzierungsaktivitäten im Vergleich zur singulären viralen Genapplikation und zur Negativkontrolle. Die kombinierte rAAV-hTGF- β /hIGF-I-Überexpression in humanen MSZ erreichte signifikante Verbesserungen *in vitro* und im humanen osteochondralen Defektmodell *ex vivo* bezüglich einer erhöhten Zelldichte, eines erhöhten Proteoglykan- und Typ-II-Kollagen-Gehalts und eines verminderten Typ-I- und Typ-X-Kollagen-Gehalts.

Schlussfolgerung: Die kombinierte lokale direkte und indirekte Applikation multipler therapeutischer rAAV-Vektoren in osteochondrale Defekte sind attraktive Ansätze, deren regeneratives Potential in klinisch-relevanten Großtierstudien evaluiert werden sollte, um auf dieser Basis künftig innovative Therapien zu entwickeln.

Abstract

Introduction: Focal osteochondral defects do not regenerate. There is no curative treatment to date for these clinical problems. The direct application of chondroreparative gene vectors in cartilage defects is a powerful approach to directly stimulate the regenerative activities of migrating bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSCs), as well as a local administration of *ex vivo* genetically modified MSCs to sites of cartilage injury. Here, we investigated the ability of combined recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector-mediated delivery of the potent human transforming growth factor beta (hTGF- β) and human insulin-like growth factor I (hIGF-I) to enhance the processes of chondrogenic differentiation in human MSCs *in vitro* and upon implantation in a model of a human osteochondral defect *ex vivo*.

Methods: Human MSCs and articular cartilage biopsies were obtained from patients undergoing total knee arthroplasty. Isolated human MSCs were pelleted and kept in chondrogenic medium for 24 h prior to transduction with the following rAAV vectors: hTGF- β /hIGF-I, hTGF- β /*lacZ*, hIGF-I/*lacZ*, and reporter-*lacZ* (negative control). Transduced aggregates were kept as high-density aggregate cultures in chondrogenic medium for up to 21 days at 37 °C (direct *in vitro*-approach) or implanted in an explant model of a human osteochondral defect (indirect *ex vivo*-approach) 24 h post-transduction and kept in chondrogenic medium for up to 21 days at 37 °C. After 21 days, MSC chondroreparative activities *in vitro* and *ex vivo* were evaluated using established biochemical, histological, immunohistochemical, real-time RT-PCR and ELISA analyses.

Results: Successful concomitant overexpression of hTGF- β /hIGF-I via rAAV led to enhanced proliferative, anabolic, and chondrogenic activities *in vitro* and *ex vivo* while restraining undesirable osteogenic and hypertrophic differentiation. Concomitant rAAV-hTGF- β /hIGF-I overexpression significantly improved cellular densities as well as the proteoglycan and type-II-collagen contents while significantly reducing type-I- and type-X-collagen contents.

Conclusion: Direct and indirect local application of multiple therapeutic rAAV vectors to sites of osteochondral injury are promising approaches and may be tested for their regenerative potential in clinically relevant large animal models as a means to develop innovative clinical therapies in the future.

2 Einleitung

2.1 Problematik

Fokale osteochondrale Defekte sind ein relevantes und ungelöstes Krankheitsbild in der orthopädischen Chirurgie und Unfallchirurgie. Sie sind häufig traumatischer Ätiologie [179] und treten bevorzugt im Bereich des Kniegelenks auf [291]. Der hyaline Gelenkknorpel weist ein äußerst begrenztes intrinsisches Heilungspotential auf [43; 142]. Trotz der Vielzahl aktuell zur Verfügung stehenden und klinisch etablierten chirurgischen Therapiemöglichkeiten gelang es bislang mittels keiner Methode den hyalinen Gelenkknorpel in einer nativen Weise wiederherzustellen [71]. Stattdessen bildet sich ein mechanisch und biologisch minderwertiges Reparaturgewebe, welches sich nicht adäquat in das umliegende, gesunde Knorpelgewebe integriert und somit nicht den notwendigen physikalischen und mechanischen Anforderungen des Gelenkknorpels gerecht wird [43; 76; 142; 229]. Dies führt häufig zu progredienten degenerativen Veränderungen des Gelenks und über das Stadium einer potenziell reversiblen Früharthrose [199] schließlich zum irreversiblen Vollbild einer posttraumatischen Arthrose [258; 338]. Die Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung der erwachsenen Bevölkerung weltweit [154; 328]. Sie geht mit einer immensen physischen und psychischen Lebensbeeinträchtigung der Betroffenen einher und ist mit enormen volkswirtschaftlichen Kosten verbunden [135].

Das Ziel aktueller Forschung und gleichzeitig die größte Herausforderung ist die Entwicklung innovativer Therapiemethoden zur regenerativen Behandlung fokaler Gelenkknorpeldefekte [66]. Die genetische Modifizierung von Progenitorzellen, wie mesenchymaler Stromazellen (MSZ), mittels therapeutischer Transkriptions- und/oder Wachstumsfaktoren stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, der darauf abzielt, chondroreparative anabole Prozesse lokal im Defektareal zu stimulieren und gleichzeitig chondrodestruktive katabole Prozesse zu unterdrücken [74; 99]. Zu diesem Zwecke eignen sich insbesondere rekombinante adeno-assoziierte virale (rAAV) Gentransfervektoren, da sie eine sichere, effektive und dauerhafte Transduktion der Zielzellen im Defektareal ermöglichen, ohne dabei deren chondrogenes Differenzierungspotential zu beeinträchtigen [67; 235; 297; 321]. Eine Reihe therapeutischer Faktoren bewiesen bereits verbesserte chondrogene Differenzierungsaktivitäten von MSZ *in vitro* mittels des rAAV-basierten Gentransfers, beispielsweise der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF- β) [235], der insulinartige Wachstumsfaktor I (IGF-I) [109] und der Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) [67]. Auch im Tiermodell sind verbesserte chondrale Reparaturprozesse mittels des rAAV-basierten Gentransfers von beispielsweise

TGF- β [75] oder IGF-I [70] verifiziert worden. Trotz vielversprechender Resultate wurden verbesserte chondrogene Reparaturaktivitäten bisher nur bis zu einem gewissen Ausmaß erzielt, bei weiterhin begleitenden unerwünschten terminalen und hypertrophen Differenzierungsaktivitäten. Dies erfordert die Erforschung neuer Strategien, basierend auf der Hypothese, dass ein kombinierter Einsatz von Wachstumsfaktoren dem Einsatz eines einzelnen Wachstumsfaktors überlegen ist [308].

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den Effekt eines rAAV-basierten Gentransfers der chondrogenen Wachstumsfaktoren hTGF- β und hIGF-I, jeweils allein und in Kombination, auf die Chondrogenese von humanen MSZ *in vitro* (direkter viraler Gentransfer) und nach deren Implantation in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo* (indirekter viraler Gentransfer) [211; 212], welches ein weitgehend natives Mikromilieu widerspiegelt, vergleichbar mit demjenigen bei Patienten [84; 255]. Ziel war die Überprüfung der übergeordneten Hypothese, dass eine kombinierte rAAV-basierte Überexpression von hTGF- β und hIGF-I in humanen MSZ chondroreparative Differenzierungsaktivitäten in diesen Zellen verbessert, verglichen mit der rAAV-basierten Überexpression des jeweils einzelnen Wachstumsfaktorgens und mit der Negativkontrolle *lacZ*. Hierzu wählten wir einen Untersuchungszeitraum von 21 Tagen, da innerhalb dieser Zeit die chondrogene Differenzierung der humanen MSZ vollständig vollzogen ist und es sich hierbei somit um einen etablierten Zeitraum zur Untersuchung der *in vitro*-Chondrogenese handelt [17; 155; 190]. Zur Evaluation nutzten wir etablierte Transgenexpressionsanalysen sowie biochemische, histologische, immunhistochemische und *Real-time RT-PCR*-Analysen.

2.2 Die osteochondrale Einheit

Die osteochondrale Einheit (**Abbildung 1**) stellt eine funktionelle Einheit dar, deren Komponenten durch vielfältige Interaktionen über die gemeinsame Fähigkeit der Kraftübertragung bei Belastungen verfügen und dadurch eine regelrechte Funktion synovialer Gelenke (Diarthrosen) aufrechterhält [123; 179]. Sie setzt sich aus dem hyalinen Gelenkknorpel, dem darunterliegenden kalzifizierten Knorpel und dem subchondralen Knochen zusammen [123]. Eine Veränderung der physiologischen Zusammensetzung oder der Struktur einer funktionellen Komponente führt dabei konsekutiv zu einer Funktionsbeeinträchtigung der übrigen Komponenten und schließlich zum Verlust der physiologischen Gelenkfunktion [123; 194]. Aufgrund dieser Tatsache ist es sinnvoll, auch bei einem lediglich auf den Gelenkknorpel begrenzten Defekt stets die gesamte osteochondrale Einheit in die Therapieplanung mit einzubeziehen [194].

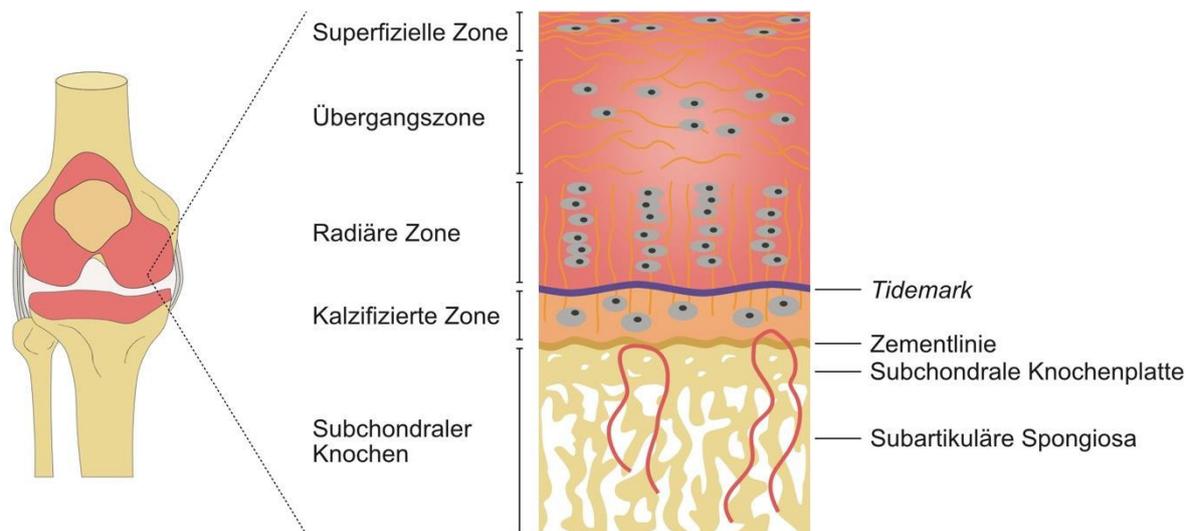


Abbildung 1. Schematischer Aufbau der osteochondralen Einheit. Abbildung modifiziert nach [289].

2.2.1 Der hyaline Gelenkknorpel

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein hochspezialisiertes, avaskuläres, anervales und alymphatisches Gewebe [225], das die ossären Gelenkflächen synovialer Gelenke überzieht und ein nahezu reibungsloses Gleiten der Gelenkflächen ermöglicht [179]. Er hält Scherkräften stand und schützt aufgrund seiner hohen, stoßdämpfenden Druckelastizität den subchondralen Knochen vor mechanischer Überbelastung [54; 202]. Die Schichtdicke des hyalinen Knorpels beträgt ungefähr zwei bis vier Millimeter [289] und korreliert oftmals invers mit dem Grad der Kongruenz der jeweiligen artikulierenden Gelenkflächen; die Gelenkknorpelschicht ist umso dicker, je inkongruenter die artikulierenden Gelenkflächen sind [194].

Der hyaline Knorpel setzt sich zusammen aus einer dichten extrazellulären Matrix (EZM) und darin eingebetteten Chondrozyten [225]. Chondrozyten stellen den einzigen Zelltyp im hyalinen Knorpel dar [202]. Sie sind hochspezialisierte, metabolisch aktive Zellen mesenchymalen Ursprungs, die ungefähr 1-2% des hyalinen Knorpelgewebes ausmachen und für die Bildung, das Aufrechterhalten und die Reparatur der EZM verantwortlich sind [289]. Die EZM besteht hauptsächlich aus Wasser (bis zu 80%), Kollagenfasern und Proteoglykanen. Der hohe Wassergehalt ist für den Erhalt der Knorpel elastizität verantwortlich und unterstützt die zur Ernährung der Chondrozyten essenzielle Diffusion von Nährstoffen aus der Synovialflüssigkeit [202]. Kollagene repräsentieren eine im menschlichen Körper ubiquitär vorkommende, heterogene Familie von Proteinen, die für die strukturelle Integrität von Geweben zuständig ist [114; 115]. Im hyalinen Gelenkknorpel sind sie die form- und strukturgebenden Elemente [202] und regulieren dessen mechanischen Eigenschaften [54].

Typ-II-Kollagen stellt mit einem Anteil von ungefähr 95% das Hauptkollagen des intakten hyalinen Knorpels dar [202] und bildet ein stabiles, viskoelastisches, fibrilläres Netzwerk, welches die enorme Dehnungsfestigkeit des Gelenkknorpels sicherstellt [123]. Dieses wird durch die übrigen im intakten hyalinen Gelenkknorpel vorkommenden Typ-I-, -IV-, -V-, -VI-, -IX- und -XI-Kollagene stabilisiert [289]. Proteoglykane, hauptsächlich Aggrekan, liegen verwoben im fibrillären Kollagennetzwerk vor und vermitteln aufgrund ihrer ausgeprägten osmotischen Eigenschaften die stoßdämpfenden Eigenschaften des hyalinen Knorpels [123]. Aggrekan besitzt eine oder mehrere kovalent gebundene Glykosaminoglykanketten (hauptsächlich Chondroitinsulfat) und ist über Verbindungsproteine (*Link Proteins*) an Hyaluronsäure gebunden [202]. Die intakte EZM fungiert als viskoelastisches hydrodynamisches Dämpfungssystem aus flüssiger (Wasser) und fester (Kollagen) Phase, das enormen Druck- und Scherbelastungen standhält [289]. Eine progrediente Druckbelastung mit konsekutiver Gewebekompression resultiert in einem erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck und einem Ausstrom der hauptsächlich Proteoglykan-gebundenen interstitiellen Flüssigkeit aus der EZM in weniger druckbelastete Areale [187; 289]. Im Gegensatz dazu führt der auf einer Druckentlastung beruhende Rückstrom der interstitiellen Flüssigkeit in die EZM zur Wiederherstellung der ursprünglichen Gelenkknorpelform [187; 289].

Morphologisch und funktionell lässt sich der hyaline Knorpel in vier Zonen einteilen: die superfizielle Zone, die Übergangszone, die radiäre Zone und die kalzifizierte Zone (**Abbildung 1**). Die superfizielle Zone (10-20% der hyalinen Knorpelschichtdicke) weist eine hohe Anzahl parallel zur Gelenkoberfläche ausgerichteter, abgeflachter Chondrozyten auf sowie dünne, dichtgepackte, ebenfalls parallel zur Gelenkoberfläche verlaufende Kollagenfibrillen [289] und einen erniedrigten Proteoglykangehalt [202]. Sie schützt die darunterliegenden Knorpelschichten vor Zug- und Scherkräften, die physiologischerweise durch Gelenkbewegungen induziert werden [202]. In der anschließenden Übergangszone (40-60% der hyalinen Knorpelschichtdicke) befinden sich wenige rundliche Chondrozyten sowie dickere, in querförmig verlaufenden Bündeln angeordnete Kollagenfibrillen und steigende Proteoglykangehalte [202]. In der radiären Zone (ca. 30% der hyalinen Knorpelschichtdicke) liegen die Chondrozyten säulenförmig gruppiert vor und die dicken Kollagenfibrillen verlaufen senkrecht zur Gelenkoberfläche [202; 289]. Die radiäre Zone weist den höchsten Proteoglykangehalt [202] und den niedrigsten Wassergehalt auf [202; 289]. Damit bietet sie durch ihre Zusammensetzung und ihren Aufbau optimale Voraussetzungen enormen Druckkräften standzuhalten [289]. Die kalzifizierte Zone verbindet den Gelenkknorpel mit dem subchondralen Knochen [202] und ist durch einen hohen Gehalt an Typ-X-Kollagen sowie eine geringe Zelldichte hypertropher Chondrozyten charakterisiert [194]. Von den

darüberliegenden nicht-kalzifizierten Zonen ist sie durch die *Tidemark* getrennt [194]. Kollagenfibrillen (hauptsächlich Typ-II-Kollagen) aus der radiären Zone überschreiten die *Tidemark* und verlaufen bis in die kalzifizierte Zone; ein Überschreiten der kalzifizierten Zone in den darunterliegenden subchondralen Knochen findet nicht statt [194].

2.2.2 Der subchondrale Knochen

Der subchondrale Knochen (**Abbildung 1**) schließt sich, getrennt durch die Zementlinie, kaudal der kalzifizierten Zone des Gelenkknorpels an und setzt sich zusammen aus der subchondralen Knochenplatte und der subartikulären Spongiosa [194]. Mit dem darüberliegenden Knorpel ist dieser lediglich über eine passgenaue Oberflächenverzahnung verbunden [146]. Der subchondrale Knochen weist im Gegensatz zum darüberliegenden hyalinen Knorpel eine höhere Steifigkeit auf und begünstigt somit vermutlich durch Scherstress induzierte Gelenkknorpelschäden [194]. Typ-I-Kollagen repräsentiert das Hauptkollagen des subchondralen Knochens [194]. Im Gegensatz zum hyalinen Gelenkknorpel verfügt der subchondrale Knochen über Nerven und Blutgefäße, deren kleine Seitenäste teilweise in die kalzifizierte Zone hineinziehen [179]. Hauptaufgabe des subchondralen Knochens ist die Absorption der durch die Gelenke vermittelten mechanischen Kräfte [124]. Darüber hinaus beeinflusst er die metabolischen Aktivitäten des darüberliegenden Gelenkknorpels [146].

2.3 Knorpelhomöostase

Die Aufrechterhaltung der physiologischen Knorpelhomöostase ist für den Erhalt einer regelrechten Gelenkfunktion, die auf den oben beschriebenen biophysikalischen Eigenschaften des Gelenkknorpels beruht, unabdingbar (**Abbildung 2**) [201]. Im adulten Gelenkknorpel liegen die Chondrozyten in einer weitgehend mitotisch inaktiven, ruhenden Phase vor, in welcher sie aufgrund ihrer metabolischen Eigenschaften ein Gleichgewicht von matrixaufbauenden und matrixabbauenden Prozessen aufrechterhalten [122; 123]. Der Umsatz der Matrixmoleküle ist dabei äußerst gering [123]. Diesbezüglich sind Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sowie Zytokine von zentraler Bedeutung. Zu den anabol wirksamen und damit matrixaufbauenden Agenzien zählen u. a. TGF- β , die knochenmorphogenetischen Proteine (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs), IGF-I und FGF-2 sowie die Transkriptionsfaktoren *Sex-determining Region Y-type High-Mobility Group Box 9* (SOX9) und der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF) [122; 121]. Dem gegenüber stehen die katabol wirksamen und damit matrixabbauenden Agenzien, wie die Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13) und die Aggrekanase ADAMTS (*a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*), der Transkriptionsfaktor RUNX2 (*Runt-related Transcription Factor 2*), das Signalmolekül IHH

(*Indian Hedgehog*) sowie die proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF-}\alpha$) und die Interleukine-1 beta, -17, -18 ($\text{IL-1}\beta$, -17, -18) [122; 201]. Anabole und katabole Signalwege weisen ausgeprägte Interaktionen auf (**Abbildung 2**) [201]. TGF- β ist beispielsweise in der Lage über die Nutzung unterschiedlicher Signalwege sowohl anabole als auch katabole Wirkungen auf den Gelenkknorpel auszuüben, wobei im gesunden Gelenkknorpel unter erhaltener physiologischer Knorpelhomöostase die anabolen Eigenschaften des Wachstumsfaktors überwiegen [319].

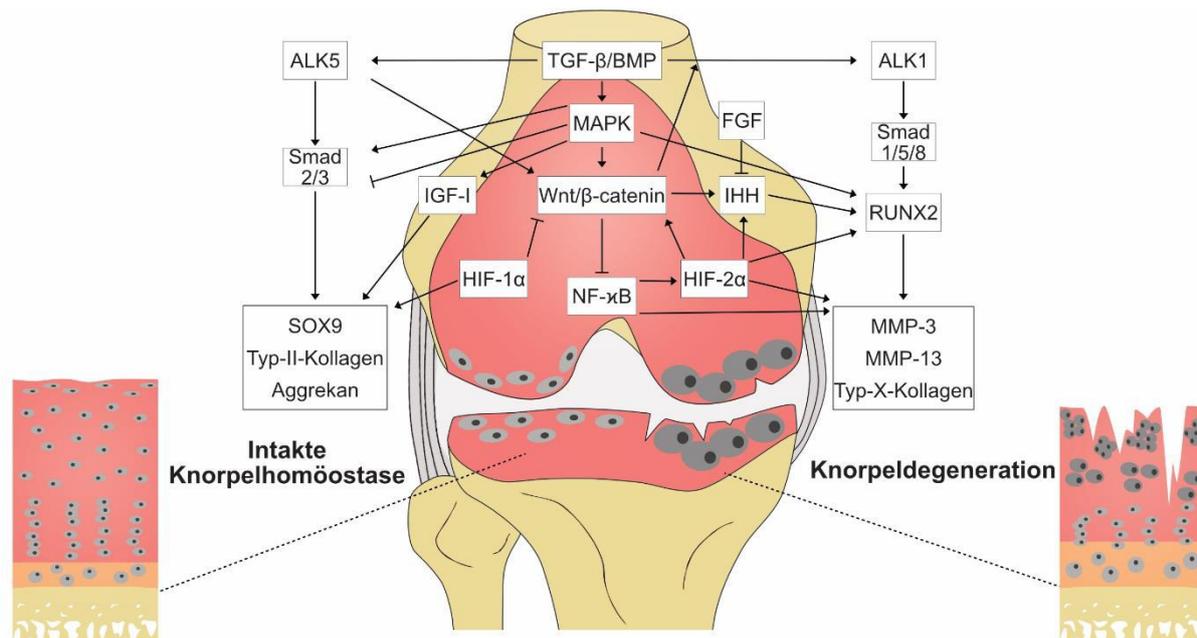


Abbildung 2. Schematische Darstellung der anabolen und katabolen Signalwege im Gelenkknorpel. Eine intakte Knorpelhomöostase beruht auf einem Gleichgewicht anaboler und kataboler Prozesse; eine Dominanz kataboler Prozesse resultiert in einer Knorpeldegeneration. Abbildung modifiziert nach [201].

Traumatische Verletzungen, degenerative Prozesse und Seneszenz beeinflussen die Knorpelhomöostase zugunsten kataboler, matrixabbauender Prozesse [122]. Diese werden vornehmlich über den *Wingless and vertebrate homolog integrated int-1/beta catenin*-Signalweg (Wnt/ β -catenin) und den IHH-Signalweg mit konsekutiver Aktivierung des Transkriptionsfaktors RUNX2 aktiviert [352] und resultieren in einer hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten [121]. Kennzeichnend für das hypertrophe Differenzierungsstadium der Chondrozyten sind eine ubiquitär gesteigerte Expression von Typ-X-Kollagen, welches unter physiologischen Bedingungen ausschließlich in der kalzifizierten Zone des Gelenkknorpels vorliegt (Kapitel 2.2.1), sowie die Expression von MMPs, IHH, alkalischer Phosphatase und VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) [298], welche wiederum die progrediente Destruktion des Gelenkknorpels begünstigen [201]. In frühen Destruktionsstadien treten die Chondrozyten zunächst in eine reaktive

Proliferationsphase ein und weisen als kompensatorischen Reparatursversuch erhöhte anabole Aktivitäten auf mit gesteigerter Produktion an Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen [9; 123]. Im Folgenden überwiegt die Expression hypertrophieassoziiierter Expressionsmarker mit konsekutiven matrixdestruktiven, katabolen Prozessen einschließlich des Abbaus von Typ-II-Kollagen und Proteoglykanen sowie der gesteigerten Produktion von Typ-X-Kollagen [298]. Die kontinuierliche Destruktion der extrazellulären Knorpelmatrix resultiert in einem Verlust der physiologischen Integrität sowie einer Anordnung der Chondrozyten in Zellverbänden (*Cluster*) [123] und schließlich in einer gesteigerten Apoptoserate [196]. Die destruierte Knorpelmatrix ist nicht in der Lage eine physiologische Gelenkfunktion aufrechtzuerhalten (Kapitel 2.2) [179].

2.4 Gelenkknorpeldefekte

Primär werden chondrale (ohne Affektion des subchondralen Knochens) von osteochondralen Defekten unterschieden (**Abbildung 3**) [71]. Während sich teilschichtige chondrale Defekte auf die nicht-kalzifizierte chondrale Zone oberhalb der *Tidemark* beschränken, betreffen vollschichtige chondrale Defekte die gesamte Gelenkknorpelschicht einschließlich der kalzifizierten Zone [71]. Da eine Besiedlung chondraler Defekte mit Progenitorzellen aufgrund fehlender Affektion des subchondralen Knochens ausbleibt und lediglich Synovialzellen diskrete ineffektive reparative Prozesse initiieren, weisen chondrale Defekte kein relevantes intrinsisches Heilungspotential auf [142; 143]. Im Gegensatz dazu betreffen osteochondrale Defekte sowohl den vollschichtigen Gelenkknorpel als auch den subchondralen Knochen [194]. Aufgrund einer Penetration des Markraums und der Affektion subchondraler Gefäße mit konsekutiver Besiedlung des Defektareals mit MSZ sowie Blutbestandteilen und darin enthaltenen Wachstumsfaktoren weisen sie im Vergleich zu chondralen Defekten ein effizienteres, jedoch insgesamt dennoch insuffizientes intrinsisches Heilungspotential auf [142].

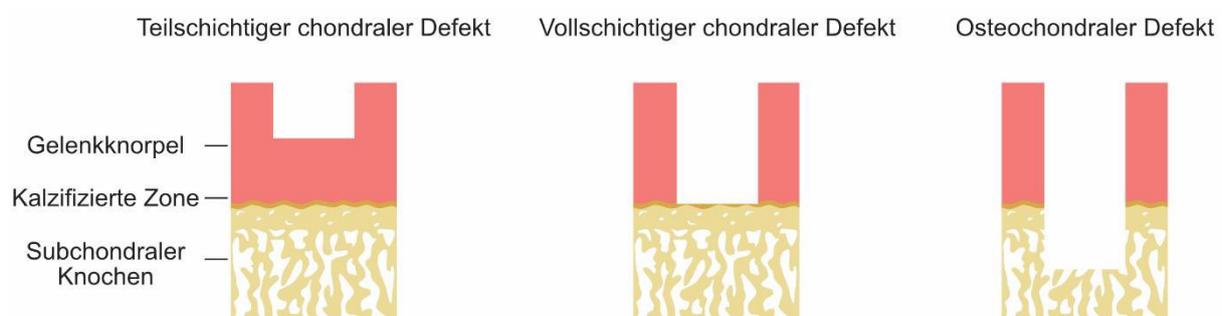


Abbildung 3. Einteilung von Gelenkknorpeldefekten. Abbildung modifiziert nach [71].

(Osteo-)chondrale Defekte können durch ein akutes Trauma entstehen [179]. Bei Jugendlichen und sportlich aktiven Erwachsenen stellt die Osteochondrosis dissecans eine weitere relevante Ursache osteochondraler Defekte dar [19]. Hierbei handelt es sich um eine aseptische Knochennekrose, die den subchondralen Knochen betrifft und deren Ätiologie noch immer unklar ist; repetitiven Mikrotraumen werden jedoch eine zentrale Bedeutung zugeschrieben [1]. Prädilektionsstellen sind neben dem lateralen Aspekt der medialen Femurkondyle das obere Sprunggelenk sowie das Ellbogengelenk [19]. Ohne Therapie führt die Erkrankung in fortgeschrittenen Stadien häufig zur Ablösung eines Knorpel-Knochen-Fragments und konsekutiv zur sekundären Schädigung des Gelenkknorpels [157].

Unbehandelt resultieren große (osteo-)chondrale Defekte nahezu unausweichlich in progredienten degenerativen Gelenkknorpelveränderungen und schließlich im Vollbild einer Arthrose [130; 292]. Die klinische Einteilung der Gelenkknorpeldefekte erfolgt zumeist arthroskopisch unter Anwendung der *ICRS-Klassifikation (International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society)* anhand Tiefenausdehnung und morphologischer Veränderungen des geschädigten Gelenkknorpelbereichs in die Schweregrade 0 bis 4 [39].

2.5 Die osteochondrale Reparatur

Die osteochondralen Reparaturprozesse resultieren in einem faserknorpeligen Reparaturgewebe, welches hauptsächlich aus Typ-I-Kollagen besteht, nicht über die hochorganisierte Struktur des gesunden Gelenkknorpels verfügt und sich somit nicht adäquat in das perifokale Gelenkknorpelgewebe integriert [21; 43; 142]. Folglich wird es den biomechanischen Anforderungen nicht gerecht und es kommt zu progredienten degenerativen Veränderungen [142]. Osteochondrale Reparaturmechanismen beruhen auf der Affektion subchondraler Blutgefäße und einer Penetration des Markraums [43]. Es bildet sich ein Blutgerinnsel, welches den osteochondralen Defekt ausfüllt und schließlich von MSZ aus dem Knochenmark besiedelt wird [43]. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, welche aus den Thrombozyten des Blutgerinnsels freigesetzt werden und ebenso in der subchondralen Knochenmatrix enthalten sind, differenzieren die MSZ zu Chondrozyten; diese produzieren schließlich eine faserknorpelige Matrix [43; 282]. Im Gegensatz zur Defektreparatur bezeichnet die Defektregeneration die vollkommene Wiederherstellung des nativen hyalinen Gelenkknorpels [49]. Im Zuge der Regeneration erfolgt eine Rekapitulation der enchondralen Ossifikation, wie sie in der embryonalen Skelettentwicklung stattfindet [49]. Diese Prozesse finden bei Erwachsenen nicht spontan statt [50].

2.6 Mesenchymale Stromazellen in der Knorpelreparatur

MSZ sind multipotente Progenitorzellen mit der Fähigkeit der Selbsterneuerung (*Self-Renewal*), die u. a. aus dem Knochenmark isoliert werden können und das Potential besitzen in verschiedene mesenchymale Gewebe zu differenzieren, beispielsweise Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder und Fett [51; 242]. Zudem vermitteln sie immunregulatorische respektive immunsupprimierende Effekte, u. a. über eine Inhibition der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, was den therapeutisch motivierten Einsatz allogener MSZ ermöglicht [53]. Aufgrund ihres enormen immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Potentials erfolgt aktuell im Rahmen klinischer Studien ein Einsatz von MSZ in der Behandlung von *SARS-CoV-2* (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) [16; 78]. Die Verabreichung umbilikaler MSZ zur Behandlung einer schweren *SARS-CoV-2*-Infektion resultiert bei Patienten nach einem Jahr in einer verbesserten Rückbildung *SARS-CoV-2*-typischer pulmonaler Läsionen und einer Linderung der Symptome [283]. Zudem wirken MSZ als trophische Mediatoren [52] und sind aufgrund ihrer intrinsischen sekretorischen Aktivität in der Lage, ein Mikromilieu zu generieren, das regenerative Prozesse begünstigt [53]. Sie wurden erstmals im Jahre 1966 von Friedenstein *et al.* entdeckt [107]. Durch das *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* der *International Society for Cellular Therapy* wurden die minimal erforderlichen Standardkriterien zur Definition von MSZ festgesetzt [92]. Unter Standard-Kulturbedingungen müssen diese plastikadhärent sein und über die Fähigkeit verfügen, *in vitro* zu Chondroblasten, Osteoblasten und Adipozyten zu differenzieren [92]. Zudem müssen sie folgendes Expressionsmuster der Oberflächenmarker aufweisen: CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻ (oder CD11b⁻), CD79α⁻ (oder CD19⁻) und HLA-DR⁻ [92].

MSZ differenzieren *in vitro* unter geeigneten Bedingungen (u. a. unter Einfluss von TGF-β und Dexamethason) zu Chondrozyten [156; 155; 190]. Dieser Prozess ist vergleichbar mit demjenigen der enchondralen Ossifikation während der Embryonalentwicklung [213]. TGF-β stellt dabei den stärksten chondroinduktiven Faktor dar, der die mesenchymale Kondensation und Proliferation bewirkt [155; 190]. Im Folgenden differenzieren die kondensierten MSZ unter Einfluss von u. a. SOX9, IGF-I, BMP-2, -4, -7, -14 und FGF-2 über das Stadium der Chondroprogenitorzellen zu reifen Chondrozyten [121]. Diese entsprechen dem Phänotyp des gesunden hyalinen Gelenkknorpels und exprimieren die für dieses Zellstadium kennzeichnenden Matrixkomponenten Typ-II-, -IX- und -XI-Kollagen sowie Aggrekan [121]. Im Rahmen der enchondralen Ossifikation erfolgt im Weiteren unter dem Einfluss von u. a. IHH, *Parathormon-related Protein* (PTHrP) und RUNX2 die terminale Differenzierung der Chondrozyten mit Ausbildung eines hypertrophen Phänotyps und charakteristischer Expression von Typ-X-Kollagen und MMP-13 [121; 213]. Schließlich kalzifiziert die knorpelige

Matrix, die Chondrozyten unterliegen der Apoptose und unter Einfluss von VEGF erfolgt die Invasion von Blutgefäßen [121]. Im finalen Stadium ersetzen hämatogen migrierende Osteoklasten und Osteoblasten unter dem Einfluss von Osterix und Wnt/ β -catenin die kalzifizierte knorpelige Matrix durch Knochen, was sich in der Expression von Typ-I-Kollagen und Osteocalcin widerspiegelt [121].

Aufgrund ihrer genannten Eigenschaften stellen MSZ ein attraktives Werkzeug der regenerativen Medizin dar, insbesondere auch in der Orthopädie und Unfallchirurgie [53; 74; 264; 351]. Zahlreiche klinische Studien verifizierten bereits ihr regeneratives Potential zur Behandlung fokaler Gelenkknorpeldefekte [45; 117; 116; 118; 172; 220; 330] und der Arthrose [80; 329]. Dennoch ist bislang kein Verfahren in der Lage, den hyalinen Gelenkknorpel in einer nativen Weise zu regenerieren, stattdessen bildet sich ein faserknorpeliges Reparaturgewebe aus [43], welches möglicherweise auf das hypertrophe Differenzierungspotential der MSZ [156] im Rahmen einer Rekapitulation der enchondralen Ossifikation zurückzuführen ist [213]. Die therapeutisch motivierte genetische Modifizierung von MSZ mit dem Ziel der Regeneration des hyalinen Gelenkknorpels durch Förderung chondroreparativer Prozesse und gleichzeitiger Verhinderung unerwünschter hypertropher und terminaler Differenzierungsaktivitäten könnte bestehende Therapieoptionen verbessern [74; 198].

2.7 Klinische Relevanz fokaler Gelenkknorpeldefekte

Fokale Gelenkknorpeldefekte sind hochprävalent. In großen arthroskopischen Studien weisen sie eine Inzidenz von bis zu 67% auf [77; 137; 339]. In einer magnetresonanztomographischen Studie mit 115 asymptomatischen Studienteilnehmern wurden bei 57% der Probanden Gelenkknorpeldefekte detektiert; in 41% der Fälle handelte es sich dabei um moderate und/oder sogar schwerwiegende Gelenkknorpeldefekte [140]. Trotz einer Vielzahl an operativen Therapiemöglichkeiten ist aktuell kein Verfahren in der Lage, den defekten hyalinen Gelenkknorpel in einer nativen Weise wiederherzustellen [71]. Häufig kommt es zu degenerativen Veränderungen des Gelenks und schließlich zum irreversiblen Vollbild einer Arthrose [130; 292]. Die Arthrose stellt die häufigste Gelenkerkrankung der erwachsenen Bevölkerung weltweit dar [154; 328], die zu einer ausgeprägten Lebensbeeinträchtigung der Betroffenen führt und mit erheblichen direkten (diagnose- und therapieassoziierten) und indirekten (bedingt durch Arbeitsunfähigkeit) volkswirtschaftlichen Kosten verbunden ist [135]. Im Hinblick auf die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung und dem Vorliegen weiterer Risikofaktoren (u. a. Adipositas), ist von einer kontinuierlich steigenden Prävalenz mit konsekutiv steigender Belastung des Gesundheitssystems auszugehen [154]. Daher ist die Erforschung neuer Therapiemethoden zur Behandlung fokaler Gelenkknorpeldefekte, die eine

Regeneration des hyalinen Gelenkknorpels ermöglicht, von wesentlicher Bedeutung, um die Entstehung einer sekundären posttraumatischen Arthrose zu verhindern.

2.8 Klinisch etablierte Therapieoptionen

Die klinisch etablierten operativen Therapiemethoden (osteo-)chondraler Defekte werden prinzipiell in knochenmarkstimulierende und zell- bzw. gewebsbasierte Verfahren eingeteilt [22]. Die Therapieentscheidung richtet sich dabei nach Tiefe und Größenausdehnung des Defektes [22; 224]. Letztere kann definitiv im Rahmen einer Arthroskopie bestimmt werden [265]. Zur Therapie kleinflächiger Defekte ($< 2,5 \text{ cm}^2$) kommen vor allem markraumstimulierende Verfahren zum Einsatz [22], insbesondere die Mikrofrakturierung [294], aber auch die Pridie-Bohrung [246] und die Abrasionsarthroplastik [153]. Im Rahmen der (arthroskopischen) Defektpräparation wird zunächst die kalzifizierte Zone im Defektareal vollständig entfernt; anschließend wird der subchondrale Knochen mehrfach perforiert und somit der Markraum eröffnet [294]. Dies führt zur Einblutung in den Defekt mit anschließender Ausbildung eines Blutgerinnsels sowie zur Migration von MSZ aus dem Knochenmark [142]. Durch die anschließende Chondrogenese kommt es schließlich zur Defektauffüllung mit einem faserknorpeligen Reparaturgewebe [170]. Unerlässliche Voraussetzung für dieses Verfahren ist ein intaktes, den Defekt umgebendes hyalines Knorpelgewebe [294]. Die klinischen Ergebnisse sind gut [232; 295]. Das Verfahren der matrix-augmentierten Knochenmarkstimulation, bei dem nach erfolgter Mikrofrakturierung das Blutgerinnsel mit einer Biomembran abgedeckt wird [24], postuliert verbesserte Zellmigration, -proliferation und -differenzierung [224]. Eine Überlegenheit gegenüber der konventionellen Mikrofrakturierung ist bislang nicht nachgewiesen [113].

Das zweizeitige Verfahren der (matrixgestützten) autologen Chondrozytentransplantation [(M)ACT] [40; 38] kommt insbesondere bei jungen, sportlich aktiven Erwachsenen ab einer Defektgröße von $2,5 \text{ cm}^2$ zum Einsatz [224]. Hierzu werden osteochondrale Biopsien aus gesunden Arealen außerhalb der Hauptbelastungszonen entnommen [223], die Chondrozyten isoliert, *in vitro* expandiert und nach einer Kultivierungsperiode im Rahmen einer zweiten Operation in den Defekt reimplantiert [38]. Eine Augmentation des Verfahrens besteht in der zusätzlichen Verwendung einer aus Biomaterialien bestehenden Matrix [40]. Die (M)ACT ist der Mikrofrakturierung in der Behandlung größerer chondraler Defekte überlegen [41; 273]. Die Verwendung von Sphäroiden im Rahmen der MACT erwies sich bei Patienten über einen Beobachtungszeitraum von fünf Jahren als gleichermaßen sicher und effektiv bis zu einer Defektgröße von 10 cm^2 [138]. Darüber hinaus wird die MACT zur Behandlung von Knorpeldefekten des Kniegelenks als nachhaltig kosteneffektives Verfahren prognostiziert,

insbesondere im Hinblick auf eine Verhinderung von Reinterventionen oder der Implantation einer Knie-Totalendoprothese [327]. Die Behandlung kleiner osteochondraler Defekte ist mittels eines autologen osteochondralen Transplantats (OAT) möglich [261]. Hierzu wird ein Knorpel-Knochen-Zylinder außerhalb der Hauptbelastungszone entnommen und passgenau in den zu behandelnden osteochondralen Defekt implantiert [261]. Insbesondere junge Patienten mit isolierten Defekten profitieren von dieser Therapie [169; 257].

Der Therapieerfolg ist von vielen patientenindividuellen Faktoren abhängig, beispielsweise vom Alter und vom *Body-Mass-Index* [22] sowie der postoperativen Rehabilitation mit initialer Entlastung, gefolgt von sukzessiv gesteigerter Belastung bis hin zur Vollbelastung [170]. Des Weiteren begünstigt beispielsweise eine Achsfehlstellung mit unikompartimentaler Überbelastung die Entstehung einer Arthrose, während eine Entlastung die Knorpel-degeneration verringert und gleichzeitig den subchondralen Knochen schützt [228]. Trotz der Tatsache, dass Patienten von den genannten Therapieoptionen profitieren, ist keine der aktuell zur Verfügung stehenden Therapien in der Lage, den geschädigten hyalinen Gelenkknorpel in nativer Weise zu regenerieren und somit langfristig eine regelrechte Gelenkfunktion aufrechtzuerhalten [195].

2.9 Experimentelle Therapieansätze

Das Ziel aktueller Forschung ist die Regeneration des hyalinen Gelenkknorpels [66]. Der gentransferbasierte Einsatz therapeutischer Wachstums- und/oder Transkriptionsfaktoren ist eine attraktive Methode, um chondroreparative Prozesse lokal zu stimulieren (Kapitel 2.3).

2.9.1 Überblick über die Gentherapie

Als Gentherapie bezeichnet man im Allgemeinen das therapeutisch motivierte Einschleusen eines oder mehrerer Gene oder Gensequenzen in somatische Zellen mit dem Ziel, eine Krankheit zu behandeln und bestenfalls zu heilen [6]. Das therapeutische, zu transferierende Gen muss dabei im Rahmen des Gentransfers mittels eines Gentransfersystems bzw. eines Gentransfer-Vektors in die Zielzelle eingeschleust und zum Nukleus transportiert werden [192]. Schließlich wird das Transgen (= transferiertes Gen) in das Wirtszellgenom integriert oder es verbleibt als extrachromosomales Episom im Zellkern [192]. Eine wirksame Gentherapie erfordert eine ausreichend hohe und über einen gewissen Zeitraum erfolgende Genexpression [192]. Es werden nicht-virale und virale Gentransfermethoden unterschieden; einen nicht-viralen Gentransfer bezeichnet man Transfektion, während ein viraler Gentransfer als Transduktion bezeichnet wird [192]. Aktuell existieren weltweit ca. 3.180 klinische

Gentherapiestudien. Diese umfassen vorwiegend onkologische Erkrankungen (ca. 67%), wie die akute lymphatische Leukämie [37], das diffuse großzellige B-Zell Lymphom [3] oder das metastasierte Melanom [315], und monogenetische Erkrankungen (ca. 11%), beispielsweise Erkrankungen des Immunsystems [290], neuromuskuläre Erkrankungen [86], Retinopathien [55] oder Störungen der Hämatopoese [275]. Zunehmend werden auch klinische Studien im orthopädischen Bereich durchgeführt, insbesondere zur Behandlung von Arthrose [139; 182].

2.9.2 Gentherapie osteochondraler Defekte

Anders als die Gentherapie im klassischen Sinne zielt die Gentherapie in der Behandlung von fokalen Gelenkknorpeldefekten nicht darauf ab, ein krankhaftes Gen zu ersetzen oder zu reparieren [101]. Sie basiert hingegen auf dem Einsatz therapeutischer Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, deren Überexpression im Defektareal chondrogene, anabole Differenzierungsaktivitäten fördern und idealerweise gleichzeitig katabole Prozesse unterdrücken sollen [304]. Hierzu stehen diverse Möglichkeiten zur Verfügung, welche sich unterschiedlichster Gentransfersysteme, Zelltypen und Kultivierungsmethoden bedienen [73].

2.9.3 Gentransfermethoden

Es wird grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Gentransfermethoden unterschieden (**Abbildung 4**) [74]. Im Rahmen des direkten Gentransfers (*in vivo*-Verfahren) wird der entsprechende Genexpressions-Vektor samt gewünschtem Transgen über eine Arthrotomie direkt in den zu behandelnden osteochondralen Defekt appliziert [66]. Rekombinante AAV-Vektoren eignen sich zu diesem Zweck bevorzugt, da sie im Unterschied zu anderen viralen und nicht-viralen Genvektoren in der Lage sind, die dichte extrazelluläre Knorpelmatrix zu durchdringen und somit nicht nur Zellen innerhalb des Defektareals, sondern auch im angrenzenden gesunden Knorpelgewebe zu transduzieren [191; 196]. Diese direkte Methode erfordert das Vorhandensein einer ausreichend großen Zellpopulation im Defektareal, um therapeutisch wirksame Expressionsspiegel der Transgene zu erzielen [74]. Dies kann *in vivo* beispielsweise durch ergänzende Mikrofrakturierung erreicht werden [142]. Im Gegensatz zum direkten Gentransfer werden beim indirekten Gentransfer (*ex vivo*-Verfahren) *ex vivo* genetisch modifizierte Zellen, beispielsweise Chondrozyten oder MSZ, gezielt in das Defektareal implantiert [66]. Über parakrine Mechanismen stimulieren die sezernierten Wachstumsfaktoren zudem das angrenzende Knorpelgewebe [66]. Beim *ex vivo*-Verfahren handelt es sich um ein zweizeitiges und damit eher kostenintensives Verfahren [74]. Präklinische Studien verifizierten bereits eine verbesserte Knorpeldefektreparatur sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch direkten [75; 70; 69; 156; 211] und indirekten Gentransfer [212;

235]. Gentransfer kann durch Biomaterialien augmentiert werden. Diese begünstigen eine örtlich und zeitlich kontrollierte Freisetzung der Genvektoren [76; 254; 253]. Darüber hinaus sind sie in der Lage, die Chondrogenese von Zielzellen zu verbessern [147].

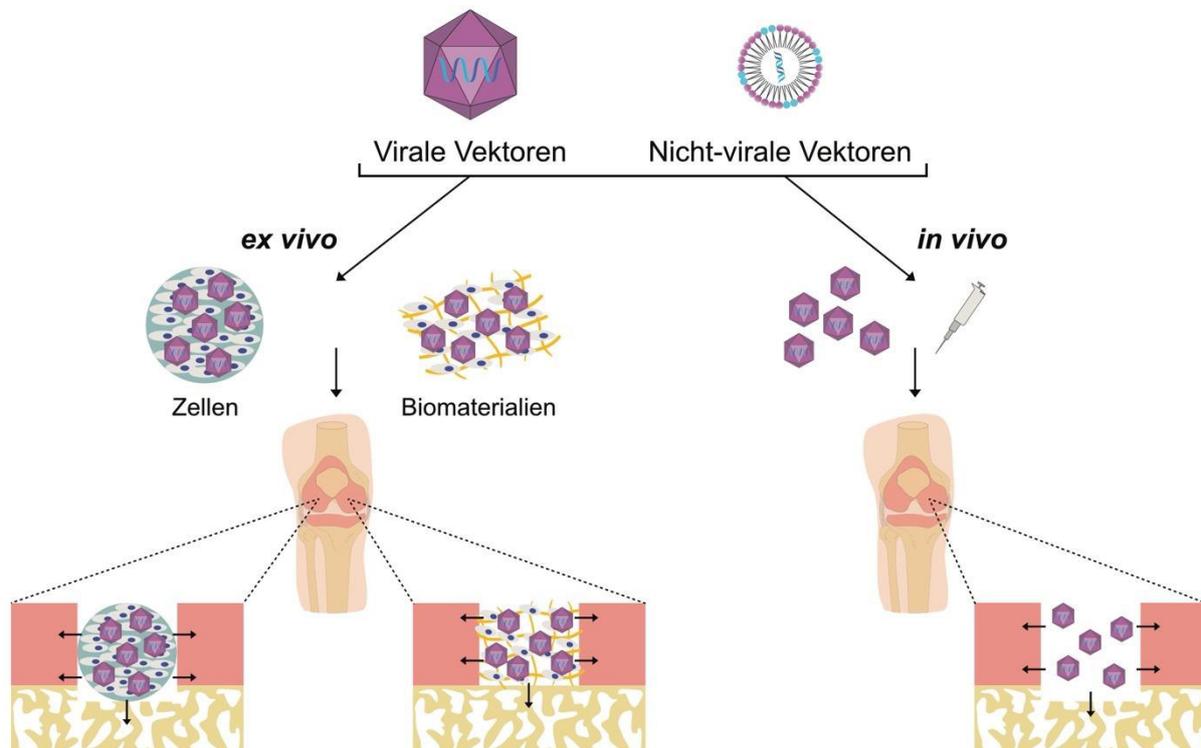


Abbildung 4. Gentransfermethoden für osteochondrale Defekte. Schematische Darstellung der verschiedenen Gentransfermethoden. Ein therapeutisches Gen kann mittels viraler oder nicht-viraler Gentransfervehikel direkt in den zu behandelnden Defekt über eine Arthrotomie appliziert werden (direkter *in vivo*-Ansatz). Alternativ können *ex vivo* genetisch modifizierte Zellen allein oder in Kombination mit biokompatiblen Trägermaterialien in den zu behandelnden Defekt implantiert werden (indirekter *ex vivo*-Ansatz). Abbildung modifiziert nach [74].

2.9.4 Therapeutische Faktoren

Die molekularen und zellulären Vorgänge während der intrinsischen osteochondralen Defektreparatur sind mit denen des natürlichen chondralen Differenzierungsprozesses vergleichbar [66]. Die intrinsische Defektreparatur führt jedoch unausweichlich zur Bildung eines minderwertigen faserknorpeligen Reparaturgewebes [43]. Es ist das Ziel der Genterapie, dies durch eine Überexpression therapeutischer Faktoren zu verhindern, indem die chondrogene Differenzierung von MSZ verbessert wird und eine gesteigerte Zellproliferation sowie adäquate Zellreifung im Defektareal angestrebt wird [72]. Zudem soll die Produktion und der Erhalt einer extrazellulären knorpeligen Matrix gefördert werden, die einen hohen Gehalt an Typ-II-Kollagen und Proteoglykanen aufweist [72]. In diesem Zusammenhang sind insbesondere Wachstumsfaktoren von wesentlicher Bedeutung [44; 306; 307]. Diese vermitteln ihre Effekte über Signaltransduktionskaskaden, die die Induktion von

Genen zur Folge haben, deren Expression beispielsweise die knorpelige Matrixproduktion oder Zellproliferation fördern [44]. Da Wachstumsfaktoren sezerniert werden, üben sie neben autokrinen Effekten auch parakrine Effekte auf nicht-transduzierte Zellen aus [66]. Von besonderer Relevanz sind die anabolen, hochpotent chondrogen wirkenden Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, insbesondere TGF- β 1 und TGF- β 2 [17; 149; 175; 235] sowie BMP-2 [278; 285], BMP-4 [171] und BMP-7 [134; 165; 285]. Darüber hinaus haben FGF-2 [67; 160; 193] und PTHrP [104; 105] chondrogen stimulierende Effekte, während IGF-I ein potenter Stimulator der Matrixsynthese und der Zellproliferation ist [70; 126; 285; 334]. Da die Wachstumsfaktoren in ihrer natürlich vorliegenden Form als Polypeptide eine äußerst kurze Halbwertszeit aufweisen, ist zum Erreichen des therapeutischen Ziels eine gentransferbasierte Applikation notwendig, um ausreichend hohe Expressionsspiegel über einen langen Zeitraum zu gewährleisten [66].

Transkriptionsfaktoren beeinflussen direkt die Expression der für die Chondrogenese relevanten Gene; da die entsprechenden Moleküle, im Gegensatz zu den Wachstumsfaktoren, nicht sezerniert werden, haben diese ausschließlich auf transduzierte Zellen einen regulatorischen Effekt [66]. Dies erfordert eine ausreichend hohe Transduktionsrate, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen [66]. SOX9 ist der zentrale Transkriptionsfaktor der Chondrogenese, der die chondrogene Differenzierung reguliert und den physiologischen Phänotyp der Chondrozyten im hyalinen Gelenkknorpel aufrechterhält [178; 177]. Er aktiviert für die Chondrogenese relevante Gene, die entweder für knorpelmatrixspezifische Komponenten codieren, beispielsweise Typ-II-Kollagen und Aggrekan [31], oder für regulatorische Komponenten, die die Chondrogenese wiederum positiv beeinflussen, beispielsweise den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (FGFR-3) [177]. Darüber hinaus ist die Inhibition kataboler Prozesse ein attraktiver Ansatz, der eine progrediente Zytokin-vermittelte Knorpeldestruktion verhindern soll. Angriffspunkte sind dabei unter anderem die von Synovialzellen oder Chondrozyten synthetisierten inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-17 und TNF- α [239; 280; 308].

Die vorliegende Studie untersucht den Effekt eines rAAV-basierten Gentransfers der chondrogen hochpotenten Wachstumsfaktorgene hTGF- β und hIGF-I, jeweils allein und in Kombination, auf die Chondrogenese von humanen MSZ *in vitro* und nach Implantation in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo* [211; 212]. Verbesserte chondrogene Differenzierungsaktivitäten von humanen MSZ nach rAAV-vermitteltem Gentransfer von hTGF- β [108; 235] oder hIGF-I [109] wurden zwar innerhalb eines gewissen Ausmaßes bereits nachgewiesen, jedoch unter gleichzeitig weiterhin vorliegenden unerwünschten hypertrophen

und terminalen Differenzierungsaktivitäten. Dies erfordert die Untersuchung neuer Strategien, basierend auf der Hypothese, dass ein kombinierter Einsatz von Wachstumsfaktorgenen dem Einsatz eines einzelnen Wachstumsfaktorgens überlegen ist [308].

2.9.4.1 TGF- β als therapeutischer Faktor

Die TGF- β -Superfamilie besteht aus mehreren Subklassen, zu denen neben der TGF- β -Subklasse mit den drei Isotypen TGF- β 1 bis TGF- β 3 auch die BMP-Subklasse gezählt wird [132]. Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie üben vielfältige biologische Effekte auf unterschiedliche Zelltypen aus, indem sie beispielsweise Zellwachstum und -differenzierung regulieren [132]. Zudem sind sie an Prozessen im Rahmen der Gewebespezifizierung während der Embryonalentwicklung beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung oder der Modulation des Immunsystems [132]. TGF- β 1 stellt den Prototypen der TGF- β -Superfamilie dar und ist einer der wichtigsten anabolen Wachstumsfaktoren in der Knorpelentwicklung [44; 121]. TGF- β 1 ist ein hochpotenter Induktor der Chondrogenese von humanen MSZ [133; 155; 190; 242] und bewirkt in erster Linie die mesenchymale Kondensation [121]. Zudem fördert TGF- β 1 die Bildung der gelenkknorpeltypischen extrazellulären Matrix, bestehend aus u. a. Typ-II-Kollagen, Proteoglykanen und Aggrekan [190; 353], trägt zur Aufrechterhaltung eines normalen chondrozytären Phänotyps bei [201] und verhindert ungewünschte Differenzierungsprozesse [316]. Im Widerspruch zu dieser Aussage steht die Tatsache, dass TGF- β 1 gleichzeitig terminale und hypertrophe Differenzierungsprozesse begünstigen kann, was sich u. a. durch gesteigerte Expression von Typ-X-Kollagen [318] oder MMP-13 [34] äußert. Diese entgegengesetzten Effekte liegen in der Aktivierung verschiedener Signalwege durch TGF- β 1 begründet (**Abbildung 5**) [303].

Die Bindung von TGF- β 1 an den membrangebundenen TGF- β 1-Typ-II-Rezeptor (T β R-II) resultiert in der Phosphorylierung und Rekrutierung eines TGF- β 1-Rezeptors (T β R-I) und der konsekutiven Bildung eines funktionellen heteromeren Rezeptorkomplexes [201; 303]. Es existieren multiple Typ-I-Rezeptoren, die als *Activin Receptor-like* Kinasen (ALK) bezeichnet werden; von wesentlicher Bedeutung im Zusammenhang mit chondrogenen bzw. terminalen Differenzierungsprozessen sind die ALK5 und die ALK1 [34]. Die Aktivierung des T β R-II/ALK5-Komplexes führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der intrazellulären Rezeptor-regulierten Proteine *Small body size mother against decapentaplegic homolog 2/3* (Smads2/3); diese bilden einen Komplex mit dem *common*-Smad4, welcher schließlich in den Zellkern transloziert wird und dort die Aktivierung des chondrogenen Transkriptionsfaktors SOX9 [112; 303] bei simultaner Hemmung des hypertrophen und osteogenen Transkriptionsfaktors RUNX2 [158;

303] bewirkt. Der T β R-II/ALK5-Smad2/3-Signalweg bewirkt die Aufrechterhaltung des gesunden chondrozytären Phänotyps [201] und induziert die Bildung von Aggrecan sowie Typ-II-Kollagen [103; 133; 353] bei simultaner Inhibierung hypertropher Differenzierungsprozesse [347]. Die Aktivierung des T β R-II/ALK1-Komplexes führt im Gegensatz dazu zur Phosphorylierung und Aktivierung der intrazellulären Rezeptor-regulierten Smads1/5/8; diese bilden einen Komplex mit dem *common*-Smad4, welcher schließlich in den Zellkern transloziert wird und dort die Aktivierung des hypertrophen und osteogenen Transkriptionsfaktors RUNX2 bewirkt [158; 303], während der chondrogene Transkriptionsfaktor SOX9 gehemmt wird [112; 303]. Dies induziert hypertrophe und terminale Differenzierungsaktivitäten mit gesteigerter Bildung von u. a. Typ-X-Kollagen, MMP-13 und alkalischer Phosphatase [133].

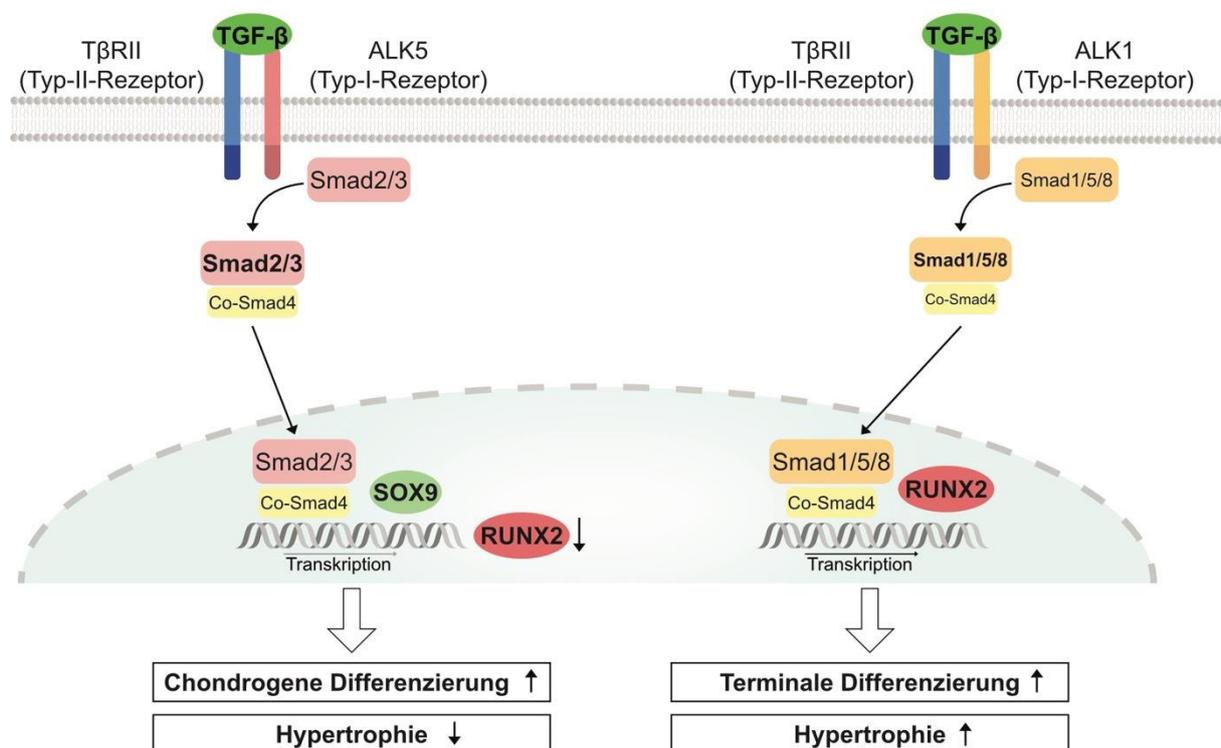


Abbildung 5. Signaltransduktionswege von TGF- β und deren Einflüsse auf den Gelenkknorpel. ALK = *Activin Receptor-like Kinase*; RUNX2 = *Runt-related Transcription Factor 2*; Smad = *Small body size and mother against decapentaplegic*; SOX9 = *SRY-related HMG box 9*; T β RII = TGF- β -Typ-II-Rezeptor; TGF- β = transformierender Wachstumsfaktor beta. Abbildung modifiziert nach [316].

Darüber hinaus existieren Smad-unabhängige Signalwege, die über die *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK), *Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2* (ERK1/2), *c-Jun-N-terminale Kinase* (JNK) und *p38-MAPK-Kinase* vermittelt werden [89]. Die molekularen Mechanismen sind bisher nur wenig erforscht und ausgeprägte Interaktionen (*Crosstalks*) zwischen den Signalwegen werden diskutiert [333].

2.9.4.2 IGF-I als therapeutischer Faktor

IGF-I ist ein Polypeptidhormon, das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird und dessen Synthese und Freisetzung unter Kontrolle des hypophysären Wachstumshormons (*Growth Hormone*, GH) steht [32]. Darüber hinaus wird es von vielen weiteren Geweben und Zelltypen gebildet, u. a. von Chondrozyten [106], und wirkt über auto- und parakrine Effekte [32]. IGF-I übt vielfältige biologische Effekte auf unterschiedliche Zelltypen aus, sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch postnatal [247]. IGF-I beeinflusst die muskuloskelettale Entwicklung und das Wachstum, die Entwicklung des zentralen Nervensystems und des kardiovaskulären Systems sowie die Gametogenese und übt immunmodulatorische Effekte aus [247]. Im hyalinen Gelenkknorpel stellt IGF-I einen entscheidenden Faktor dar, der aufgrund seiner anabolen Eigenschaften die Homöostase des gesunden Gelenkknorpels aufrechterhält, indem es die EZM-Synthese anregt [106; 185]. Neben der Synthese von Typ-II-Kollagen [106] und Proteoglykanen [189] begünstigt IGF-I die chondrozytäre Proliferation [70; 305]. IGF-I vermittelt seine Effekte vorrangig über den transmembranären IGF-I-Rezeptor (IGF-IR), der über eine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität verfügt (**Abbildung 6**) [32]. Nach erfolgter Rezeptorbindung von IGF-I und konsekutiver Aktivierung der intrinsischen Tyrosin-Kinase-Aktivität werden zwei Signalwege unterschieden [185].

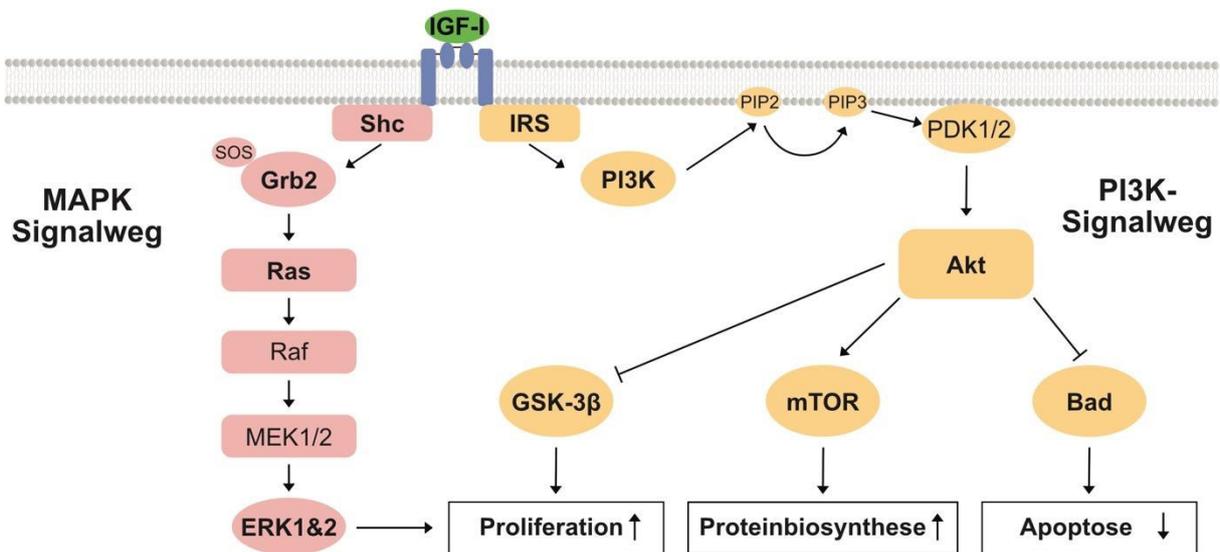


Abbildung 6. Signaltransduktionswege von IGF-I und deren Einflüsse auf den Gelenkknorpel. IGF-I = insulinartiger Wachstumsfaktor I; MAPK = *Mitogen-activated Protein Kinase*; Shc = *Src homology and collagen protein*; Grb2 = *Growth Factor Receptor-bound Protein 2*; SOS = *Son of Sevenless* (GTP-Austauschfaktor); Ras = *Rat sarcoma* (Protoonkogen); Raf = *Rapidly accelerated fibrosarcoma* (Protoonkogen); MEK = *Mitogen-activated Protein Kinase*; ERK = *Extracellular Signal-regulated Kinase*; PI3K = *Phosphoinositid-3-Kinase*; IRS = *Insulin-Rezeptor-Substrat*; PIP = *Phosphatidylinositolphosphat*; PDK = *Phosphoinositid-dependent Kinase*; Akt = *Proteinkinase B*; GSK-3β = *Glykogen Synthase Kinase-3 beta*; mTOR = *mechanistic Target of Rapamycin*; Bad = *Bcl (B-cell-lymphoma)-2 associated agonist of cell death*. Abbildung modifiziert nach [32].

Im Rahmen des MAPK-ERK-Signalweges wird die ERK1/2 schließlich in den Zellkern transloziert und aktiviert dort entsprechende Transkriptionsfaktoren, beispielsweise c-Jun, die die Zellreifung und Proliferation begünstigen [32]. Alternativ kann nach erfolgter Rezeptorbindung des IGF-I und anschließender Aktivierung der Tyrosin-Kinase der Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase-B-Signalweg (PI3K/Akt) über die Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats 1 (IRS1) durchlaufen werden, der schließlich zur Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) führt [32]. Aufgrund seiner multiplen Substrate übt die aktivierte Akt vielfältige biologische Effekte aus. Die Zellproliferation [32; 243] und Proteinsynthese werden gesteigert [32] und gleichzeitig die Zellapoptose reduziert [32]. Beide Signalwege werden vermutlich zu gleichen Anteilen durchlaufen [185].

2.9.5 Vektorsysteme

Die gewünschten Gensequenzen oder komplementäre (*complementary*) Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Sequenzen (cDNS) können mittels unterschiedlicher Gentransfersysteme in die Zielzelle eingebracht werden, hierbei wird zwischen nicht-viralen und viralen Vektorsystemen unterschieden.

Zu den nicht-viralen Vektorsystemen zählen unter anderem physikalische Methoden (beispielsweise Mikroinjektion, Genkanone, Elektroporation) und chemische Methoden (beispielsweise Calcium-Phosphat-Präzipitation, kationische Polymere, Liposome) [73]. Diese Systeme zeichnen sich einerseits durch ihre Sicherheit aus, da sie keine Toxizität oder Immunogenität besitzen, andererseits sind sie einfach und kostengünstig herzustellen und verfügen über eine große Vektorkapazität, was das Einbringen großer Gene ermöglicht [73]. Nachteilig ist jedoch neben der geringen Transfektionseffizienz (ungefähr 20-40%) die kurze Expressionsdauer der transferierten Gene von wenigen Tagen sowie die Tatsache, dass lediglich teilungsfähige Zellen transfiziert werden können [73].

Virale Vektorsysteme dringen auf natürliche Weise in die Zielzellen ein. Zum Zweck der Genterapie wurden bisher unterschiedliche Viren auf ihre Eigenschaften untersucht und manipuliert. Adenovirale Vektoren sind die am häufigsten angewandten viralen Vektoren (ungefähr 18% der klinischen Studien). Sie transduzieren zwar teilungsfähige und nicht-teilungsfähige Zellen mit einer Transduktionseffizienz von bis zu 100%, integrieren jedoch nicht in das Wirtszellgenom und ermöglichen somit nur eine kurzzeitige Transgenexpression von bis zu ungefähr zwei Wochen [73]. Daneben existieren Vektoren basierend auf dem Herpes-simplex-Virus sowie retro- und lentivirale Vektoren, die jedoch teils toxisches und/oder kanzerogenes Potential aufweisen [73]. rAAV-Vektoren sind weniger immunogen und toxisch

als adenovirale oder auf dem Herpes-simplex-Virus basierende Vektoren [74]. Sie transduzieren hocheffizient teilungs- und nicht-teilungsfähige Zellen (bis zu 100%) und erlauben aufgrund ihrer Persistenz als freie Episome eine langfristige, stabile Transgenexpression von bis bis zu mehreren Jahren [73; 191; 288; 342]. Dies macht sie zu einem attraktiven Werkzeug in der Gentherapie, wie auch in der vorliegenden Studie.

2.9.6 rAAV-Vektoren

2.9.6.1 Adeno-assoziierte Viren

Grundlage der angewandten Genvektoren sind adeno-assoziierte Viren (AAV) aus der Familie der *Parvoviridae* (**Abbildung 7**). Hierbei handelt es sich um unbehüllte, nicht-replikative Viren ikosahedrales Form mit einem Durchmesser von 20-26 nm [28]. Sie besitzen ein einzelsträngiges [260], eingekapseltes DNS-Genom mit einer Länge von 4,7 kb und von entweder positiver oder negativer Polarität [28]. Bislang wurden 12 humane (AAV-1 bis AAV-12) und über 100 nicht-humane AAV-Serotypen entdeckt [82]. Die Prävalenz von Wildtyp-AAV ist in der menschlichen Bevölkerung sehr hoch, schätzungsweise 80% der Bevölkerung ist seropositiv für AAV-2 [57; 144]. Eine eindeutig nachgewiesene Assoziation einer Wildtyp-AAV-Infektion mit einer Erkrankung oder klinischen Pathologie liegt bislang nicht vor [28; 29; 337]. Die meisten eingesetzten Genvektoren basierten bisher auf AAV-2 aufgrund umfangreichster Untersuchungen an diesem Serotyp [337], mittlerweile werden jedoch auch weitere AAV-Serotypen analysiert und getestet, beispielsweise AAV-5 für muskuloskelettale Fragestellungen [254; 253].

Das AAV-2-Genom setzt sich aus zwei offenen Leserahmen (*Open Reading Frames, ORF*) zusammen [91]. Der linke *ORF* beinhaltet die *rep* (Replikations)-Gene, die unter Kontrolle der Promotorsequenzen p5 und p19 sowie unter alternativem Spleißen die vier regulatorischen Replikations-Proteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep48 codieren [62]. Diese sind für die Replikation des Genoms essenziell und besitzen unter anderem Helicase- und ATPase-Aktivitäten [82; 145]. Der rechte *ORF* beinhaltet die *cap* (Kapsid)-Gene, die unter Kontrolle des Promotors p40 stehen und unter alternativem Spleißen die drei viralen Kapsidproteine VP (Virionprotein) 1, VP2 und VP3 bilden [82]. Aus diesen setzt sich das Kapsid eines reifen AAV-Virions im Verhältnis 1:1:10 zusammen [337]. An beiden Enden wird das AAV-2-Genom von jeweils einem 145-bp langen *Inverted Terminal Repeat (ITR)* flankiert, das sich aufgrund seiner 125-bp langen palindromischen Sequenz selbst über komplementäre Basenpaarungen faltet und die charakteristische T-förmige Haarnadelstruktur annimmt [82; 167; 188]. Innerhalb des *ITRs* befinden sich die für die Replikation entscheidenden *Rep-binding Elements (RBEs)*

und die *terminal resolution site* (*trs*) [82]. Die *ITRs* sind die einzigen *cis*-wirkenden Elemente des AAV-Genoms, die für die Virusreplikation und für das *Packaging* benötigt werden [62]. Sie dienen mit ihrer freien 3'OH-Gruppe als Replikationsursprung (*Origin of Replication, ORI*) [26] sowie als *Primer* für die Zweitstrangsynthese durch die DNS-Polymerase [82].

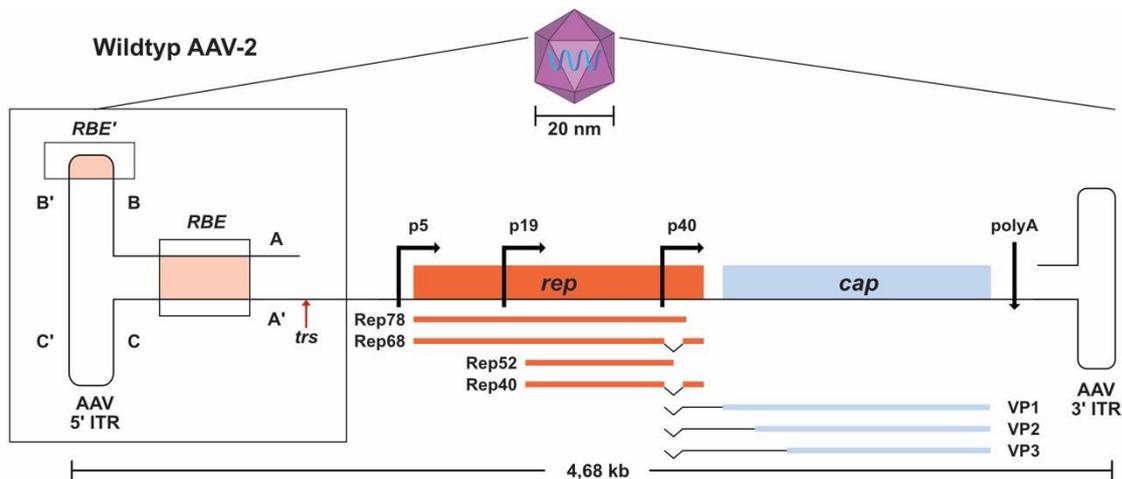


Abbildung 7. Schematische Darstellung des AAV-2-Genoms (Wildtyp). AAV = Adeno-assoziiertes Virus; cap = Kapsid-Gen; ITR = *Inverted Terminal Repeat*; p = Promotor; polyA = Polyadenylierungssignal; RBE = *Rep-binding Element*; rep = Replikations-Gen; Rep = Replikations-Proteine; trs = *terminal resolution site*; VP = Virionprotein. Abbildung modifiziert nach [82].

2.9.6.2 Wirtszellinfektion

Atchinsons et al. entdeckten 1965 erstmals AAV als DNS-haltige kontaminierende Partikel in einer aufgereinigten simianen Adenovirus-Präparation, deren Replikation nur unter gleichzeitiger Anwesenheit eines Adenovirus (Ad) möglich war [12]. AAV gehören aufgrund ihrer Abhängigkeit von Helferviren zur produktiven Wirtszellinfektion und effektiven Replikation zur Gattung der *Dependoviridae* [28]. Zu den Helferviren zählen unter anderem Adenoviren [12] und Herpes-simplex-Viren [46; 61], jedoch ist eine effektive Wirtszellinfektion auch unter Einfluss einiger Agenzien, wie Hydroxyurea, oder unter ultravioletter Strahlung möglich [26]. Eine effektive Wirtszellinfektion (**Abbildung 8**) erfordert im ersten Schritt die Bindung des AAV-Virions an spezifische Oberflächenrezeptoren [91].

Summerford *et al.* identifizierten 1997 den membranassoziierten Herparansulfat-Proteoglykan (HSPG)-Rezeptor als Hauptrezeptor für AAV-2 [299], der unter Einwirkung von Co-Rezeptoren, beispielsweise des humanen FGF-1-Rezeptors [248], des Hepatozyten-Wachstumsfaktorrezeptors (c-met) [159], des Lamininrezeptors [2] oder der Integrine $\alpha V\beta 5$ [300] und $\alpha 5\beta 1$ [11], die Internalisierung des Virus bewirkt. Im Gegensatz dazu beschrieben Mizukami *et al.* bereits 1996 die Bindung von AAV-2 an ein bis dahin unbekanntes 150 kDa

großes Membran-Glykoprotein [210]. Aufgrund der Korrelation infizierter Zellen mit dem Vorhandensein des Proteins, stellten sie die Vermutung auf, dass es sich hierbei um einen zellulären Rezeptor für AAV-2 handele [210]. Pillay *et al.* entdeckten 20 Jahre später den AAV-Rezeptor (AAVR) als einen Schlüsselrezeptor der Wirtszellinfektion mit AAV *in vitro* und *in vivo*, der AAV-2 direkt bindet und effizient endozytosevermittelt von der Plasmamembran zum *trans*-Golgi-Netzwerk transportiert [240]. Interessanterweise handelt es sich hierbei um den identischen Rezeptor, den Mizukami *et al.* bereits 20 Jahre zuvor beschrieben haben [241].

Nach ihrer Bindung an Oberflächenrezeptoren erfolgt die Aufnahme der AAV-Virione samt Rezeptor in die Wirtszelle mittels Clathrin-vermittelter und Dynamin-regulierter Endozytose [18; 95]. Seisenberger *et al.* zeigten mittels Visualisierung der Wirtszellinfektion durch ein einzelnes AAV-Virion in Echtzeit, dass dessen Aufnahme in die Wirtszelle äußerst schnell, im Mittel innerhalb von 62 ms, erfolgt [277]. Es schließt sich ein mehrschrittiger Prozess an. Dieser beinhaltet den intrazellulären endosomalen Transport der AAV-Virione, deren Freisetzung aus den Endosomen sowie deren nukleären Import und die Freisetzung des viralen Genoms [82]. Die molekularen Mechanismen sind aktuell noch nicht vollständig aufgeklärt. Diskutiert wird die Abhängigkeit des intrazellulären Transports der Endosome zum *trans*-Golgi-Netzwerk unter anderem von der Aktivierung des PI3K-Signalwegs [272] sowie von einer Reihe Rab (*Ras related in brain*)-Proteine [91]. Die Virusfreisetzung aus den Endosomen ins Zytosol erfordert neben einem niedrigen endosomalen pH-Wert [18] die Aktivierung der Phospholipase A2 Domäne der VP1 Region von AAV-2 [119; 293]. Nach ihrer Freisetzung ins Zytosol gelangen intakte AAV-Virione über den Kernporenkomplex (*Nuclear Pore Complex, NPC*) in den Zellkern [162]. Dieser Prozess wird möglicherweise durch Kernlokalisierungssignale (*Nuclear Localization Signal, NLS*) unterstützt, die in Form von Aminosäuresequenzen in den N-terminalen Regionen der AAV-Kapsidproteine VP1 und VP2 vorliegen [152; 244]. Die Freisetzung des viralen einzelsträngigen DNS-Genoms (ssDNS) aus seiner Kapsidhülle (*Uncoating*) erfolgt erst im Zellkern [151; 162].

Nach erfolgreicher Wirtszellinfektion und erfolgter komplementärer Zweitstrangsynthese durch DNS-Polymerasen der Wirtszelle setzt sich der komplexe Lebenszyklus der AAV entweder in Form eines lytischen Zyklus (unter Anwesenheit eines Helfervirus) oder in Form eines lysogenen Zyklus (unter Abwesenheit eines Helfervirus) fort [82]. Bei Anwesenheit eines entsprechenden Helfervirus (Adenovirus oder Herpes-Simplex-Virus) erfolgen im Rahmen der produktiven Infektion der Wirtszelle mit AAV die Replikation und das *Packaging* der viralen DNS (Kapitel 2.9.6.3) sowie die virale Genexpression [82]. Innerhalb des lytischen Zyklus werden die neu synthetisierten AAV-Virione per Zellyse freigesetzt [82].

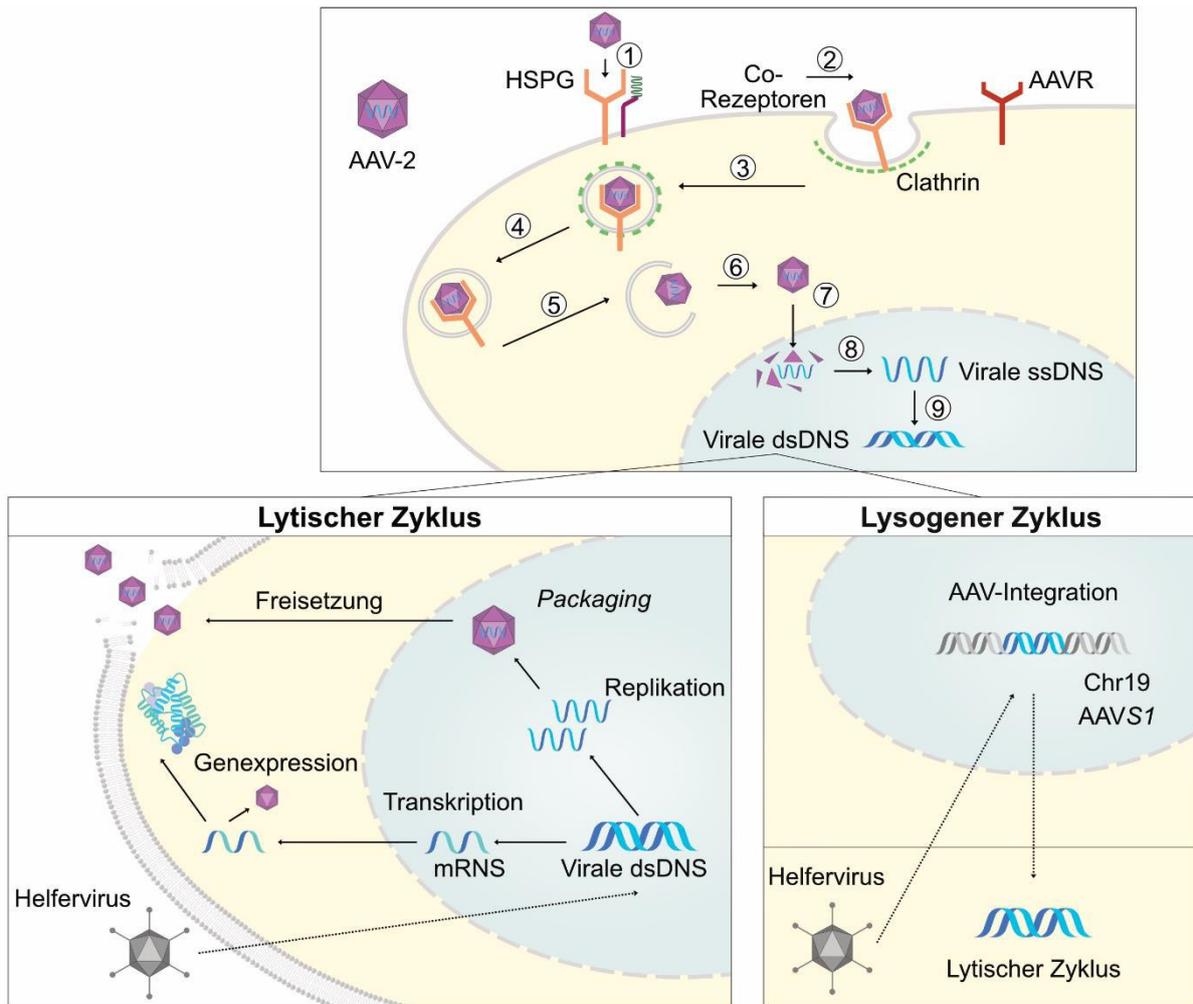


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Wirtszellinfektion am Beispiel des AAV-2 (Wildtyp). AAV = Adeno-assoziiertes Virus; AAVR = AAV-Rezeptor; AAVS1 = AAV *Integration Site 1*; Chr = Chromosom; dsDNS = doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure; HSPG = Heparansulfat-Proteoglykan; mRNS = *messenger* Ribonukleinsäure; ssDNS = einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure. Abbildung modifiziert nach [82].

Bei Abwesenheit eines entsprechenden Helfervirus bilden Wildtyp-AAV unter ortsspezifischer Integration ihres Genoms in die Wirtszell-DNS [82] oder unter Persistenz als freie Episome [274] eine latente Infektion der Wirtszelle aus. AAV sind die einzigen bekannten DNS-Viren, die ihr Genom ortsspezifisch in eine bestimmte Region des menschlichen Genoms integrieren [268]. Diese liegt auf dem kurzen Arm (q-Arm) von Chromosom 19 (AAV *Integration Site 1*, AAVS1) [168; 183; 268]. Der Integrationsvorgang ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Innerhalb der AAVS1-Region befinden sich bestimmte DNS-Sequenzen, die für die ortsspezifische Integration des AAV-Genoms in die Wirtszell-DNS essenziell sind. Hierbei handelt es sich um die *Rep-Recognition Sequence (RRS)*, deren Sequenz derjenigen des *RBEs* des AAV-Genoms ähnelt [336], sowie um die *terminal resolution site (trs)*, die ebenfalls derjenigen des AAV-Genoms ähnelt [184]. Die viralen Proteine Rep78 und Rep68 binden spezifisch an die AAVS1-RRS, interagieren mit AAVS1-trs und vermitteln über eine

Komplexbildung zwischen der Wirtszell-DNS von Chromosom 19 und der viralen *ITR*-DNS die ortsspezifische Integration des AAV-Genoms in die Wirtszell-DNS [183; 336]. Im Rahmen dessen wird ein nicht-homologes *End-Joining* diskutiert [83]. Die darauffolgende Superinfektion einer latent infizierten Zelle mit einem entsprechenden Helfervirus führt zu einer durch Rep-Proteine vermittelten Exzision des AAV-Provirus aus dem Wirtszellchromosom (*Rescue*) und einer anschließenden Einleitung des lytischen Zyklus, einschließlich Replikation und *Packaging* des viralen Genoms sowie Virusfreisetzung durch Zellyse [125].

2.9.6.3 Virale DNS-Replikation und virales DNS-*Packaging*

Die virale DNS-Replikation beinhaltet die Transkription viraler Gene, um Proteine bereitzustellen, die die Amplifikation des viralen DNS-Genoms unterstützen [204]. Die Initiierung der viralen DNS-Replikation erfolgt jedoch unabhängig hiervon, indem die nicht codierenden *ITRs* zunächst aufgrund ihrer Fähigkeit des *Self-Annealings* die sekundäre charakteristische T-förmige Haarnadelstruktur annehmen, welche die für die Replikation essenziellen palindromischen Sequenzen des *RBE* sowie des *trs* enthält [30; 204; 269]. *RBE* und *trs* bilden gemeinsam den Replikationsursprung, von welchem schließlich die Initiierung der Replikation mittels *Self-Priming* erfolgt [204; 269]. AAV codieren nicht für eigene DNS-Polymerasen und sind daher auf die Replikationsenzyme der Wirtszelle angewiesen [217]. Es entsteht zunächst ein lineares, kovalent geschlossenes, doppelsträngiges Molekül, dessen Struktur im nächsten Schritt an der *trs* über eine virusspezifische Knickbildung aufgelöst wird [125; 269]. Im Folgenden werden die entwundenen *ITRs* erneut mittels *Self-Priming* repliziert, die anschließend wieder die T-förmige Haarnadelstruktur annehmen [125; 269]. Zum Schluss entstehen im Sinne eines unidirektionalen *Single-Strand Displacements* ein einzelsträngiges Haarnadel-Molekül und ein doppelsträngiges replikatives Zwischenprodukt [269].

Diese Replikationsprozesse sowie das virale *Packaging* werden durch die viralen Replikations-Proteine Rep78/68 und Rep 52/40 unterstützt und erfordern gleichzeitig die Anwesenheit eines Helfervirus, beispielsweise eines Adenovirus (**Abbildung 9**) [28]. Das Vorhandensein der adenoviralen Proteine E1A, E1B, E2A, E4 sowie der VA (*Viral Associated*)-RNS (Ribonukleinsäure) stellt die essenzielle Grundvoraussetzung für eine effiziente AAV-Replikation dar [337]. E1A und E2A stellen dabei die wichtigsten Helferfaktoren dar, da sie die Aktivierung der Promotorsequenzen p5 und p19 bewirken, welche schließlich die Transkription und Translation der für die Replikation sowie für das virale *Packaging* notwendigen rep-Gene induzieren [206; 337]. Rep78/68 binden innerhalb der *ITR* an das *RBE* sowie an dessen palindromisches Korrelat und induzieren die für den Replikationsprozess notwendige ortsspezifische Knickbildung an der *trs* [206]. Die kleineren Rep-Proteine Rep52/40 sind nicht

am Replikationsprozess beteiligt, jedoch an der daran anschließenden Bildung der einzelsträngigen AAV-Genome aus den replikativen doppelsträngigen Zwischenprodukten [125; 164] sowie an der Akkumulation der einzelsträngigen AAV-DNS [82]. Basierend auf den Erkenntnissen von Myers und Carter geht man bis heute davon aus, dass das einzelsträngige AAV-Genom in vorgefertigte leere Kapsidhüllen transloziert wird [216].

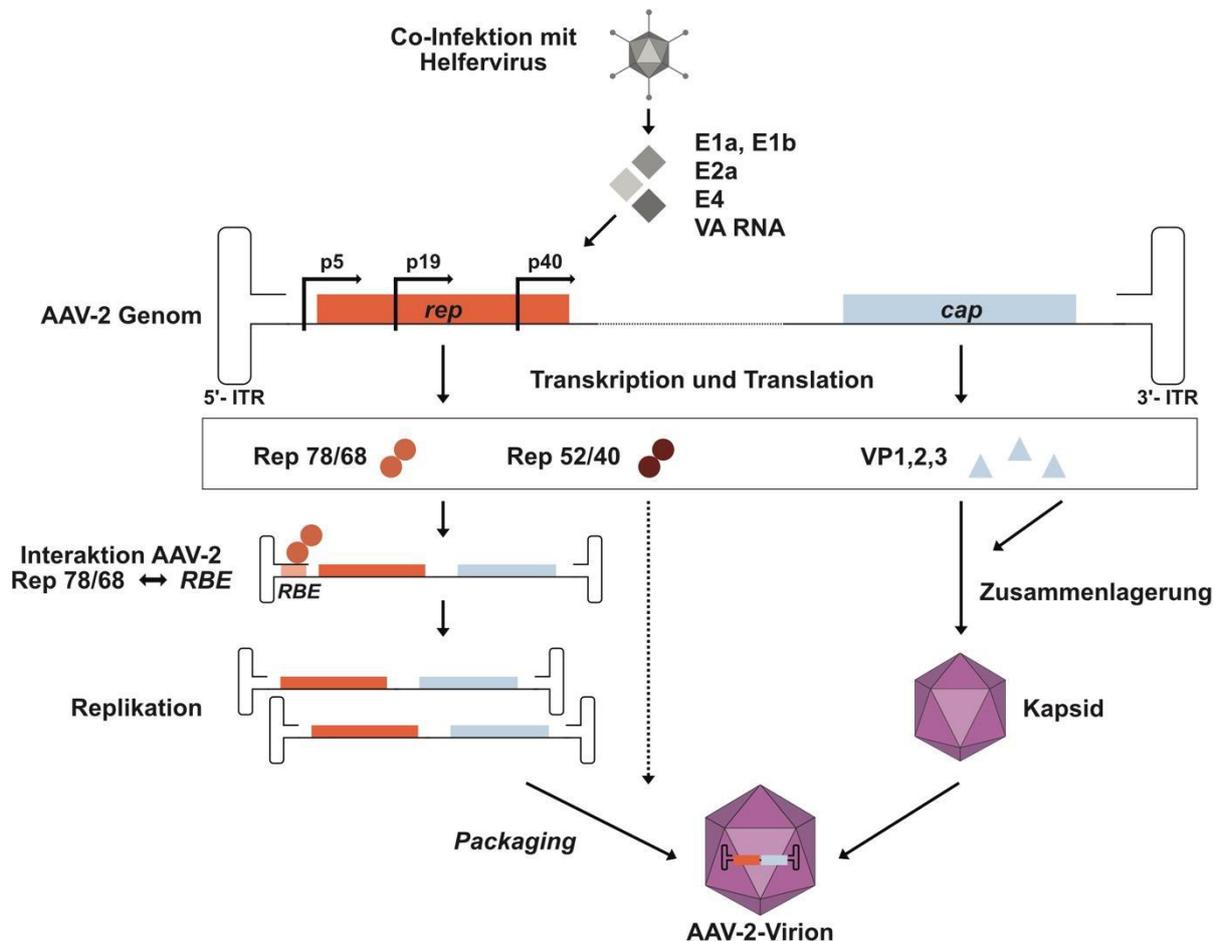


Abbildung 9. Schematische Darstellung des viralen *Packings*. AAV = Adeno-assoziertes Virus; cap = Kapsid-Gen; E1A, E1B, E2A, E4, VA = adenovirale Proteine; p = Promotor; RBE = *Rep-binding Element*; rep = Replikations-Gen; Rep = Replikations-Proteine; VP = Virionprotein. Abbildung modifiziert nach [28].

Die viralen Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3, jeweils codiert durch das cap-Gen, dessen Transkription durch den Promotor p40 kontrolliert wird, lagern sich im Verhältnis 1:1:10 zu leeren Kapsiden zusammen [82]. Die Translokation des einzelsträngigen AAV-Genoms in die leeren AAV-Kapside erfolgt unter anderem aufgrund der Helicase-Aktivität der kleinen Rep-Proteine Rep52/40 [147]. Die neu synthetisierten AAV-Virione werden schließlich über eine Helfervirus-induzierte Zelllyse freigesetzt [113].

2.9.6.4 rAAV-Vektoren

rAAV-Vektoren stammen hauptsächlich vom AAV2-Wildtyp ab [82]. Sie enthalten lediglich die das Genom flankierenden *ITRs*, da diese die einzigen *cis*-wirkenden Elemente darstellen, die für die Genomreplikation und das virale Kapsid-*Packaging* benötigt werden (**Abbildung 10**) [27; 128; 205]. Die codierenden viralen *rep*- und *cap*-Sequenzen, die ca. 96% der viralen Genomsequenz ausmachen, werden vollständig entfernt und durch eine gewünschte therapeutische cDNS-Sequenz sowie durch regulatorische Promotor- und Polyadenylierungssignale ersetzt [180; 331]. Hierdurch werden rAAV-Vektoren zu replikations-defekten Konstrukten, die lediglich dazu in der Lage sind, ihre DNS in die Nuclei der Wirtszelle einzuschleusen [7]. Die vollständige Entfernung aller codierenden viralen Sequenzen ermöglicht somit eine maximale Ausnutzung der *Packaging*-Kapazität der rekombinanten viralen Vektoren und verringert gleichzeitig deren Immunogenität und Zytotoxizität [331]. Aufgrund der Abwesenheit der *rep*-Gene liegen die rAAV-Genome hauptsächlich als stabile doppelsträngige Episome vor, was deren Integration in das Wirtszellgenom beachtlich reduziert [59].

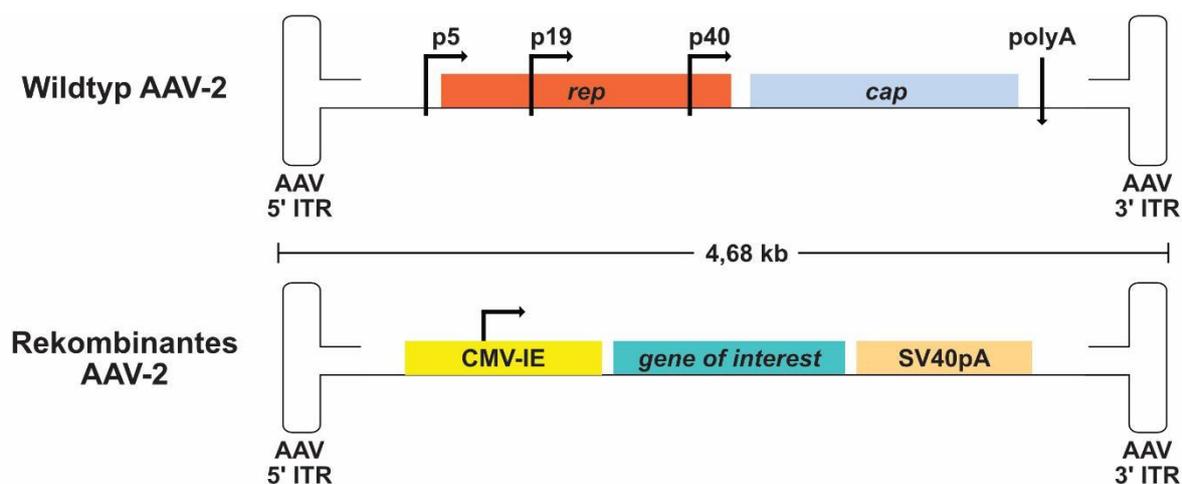


Abbildung 10. Schematische Darstellung des Wildtyp-AAV-2 und des rAAV-2. AAV = Adeno-assoziiertes Virus; cap = Kapsid-Gen; CMV-IE = Cytomegalovirus-*Immediate Early*-Promotor; ITR = *Inverted Terminal Repeat*; kb = Kilobase; p = Promotor; rep = Replikations-Gen; SV40pA = Simian-Virus 40-Polyadenylierungssignal. Abbildung modifiziert nach [72].

Als regulatorische Sequenzen werden starke, konstitutiv aktive Promotoren eingesetzt, die hohe Expressionsniveaus des therapeutischen Gens ermöglichen, wie der heterologe Cytomegalovirus-*Immediate Early* (CMV-IE)-Promotor/*Enhancer* und das SV40pA (Simian-Virus 40-Polyadenylierungssignal) [218]. Rekombinante AAV-Vektoren sind in der Lage sowohl teilungsfähige Zellen (beispielsweise MSZ) als auch nicht-teilungsfähige Zellen

(beispielsweise Chondrozyten) mit hoher Effizienz (bis zu 100%) zu transduzieren [8; 73; 67; 191; 211; 297; 321].

Die komplexe Herstellung von rAAV-Vektoren kann auf verschiedene Weise erfolgen. Gebräuchlich sind heutzutage unterschiedliche Methoden, die jeweils stets weiterentwickelt und modifiziert werden. Eine weitverbreitete Methode basiert auf der Bi- oder Triplasmid-Transfektion von *HEK (Human Embryonic Kidney)-293-Zellen*, einer menschlichen, mittels eines Adenovirus transduzierten Nierenzelllinie, die konstitutiv die adenoviralen Gene E1a und E1b exprimiert [343]. Das *cis*-Plasmid enthält dabei das rAAV-Genom mit der gewünschten therapeutischen cDNS-Sequenz [267; 270]. Die für die Replikation und Zusammenlagerung der Virione erforderlichen Helferfunktionen werden über ein zweites adenovirales *trans*-Plasmid (Ad-Hilfplasmid) zur Verfügung gestellt, welches die *rep*- und *cap*-Gene codiert [270]. Die übrigen erforderlichen Helfergene werden entweder durch eine Co-Infektion mit dem Helfervirus Adenovirus 5 (Biplasmid-Transfektionssystem) oder alternativ codiert auf einem dritten Hilfplasmid (Triplasmid-Transfektionssystem) zur Verfügung gestellt [128; 270].

Darüber hinaus ist die Herstellung von rAAV-Vektoren in speziellen Produktions-Zelllinien, wie der HeLa-Zelllinie, einer humanen Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms, möglich. Diese exprimieren nach Transfektion die *rep*- und *cap*-Gene sowie das gewünschte rAAV-Genom [203]. Die Produktion der Vektoren wird schließlich durch eine Co-Infektion mit einem Adenovirus induziert [60; 203]. Daneben existieren auch Methoden zur Herstellung von rAAV-Vektoren, die ohne den Einsatz von Säugerzellen auskommen. Diese basieren hauptsächlich auf der Infektion von Zellen der Schmetterlingsart *Spodoptera frugiperda (Sf9)* mittels rekombinanten Baculoviren [209; 314; 326]. Hierbei wird eine Kontamination durch DNS-Sequenzen der *Packaging*-Zell-Genome beachtlich reduziert [209].

Die in der vorliegenden Studie eingesetzten rAAV-Vektoren wurden als konventionelle Vektoren unter Anwendung eines Helfer-basierten Systems hergestellt (Kapitel 6.4) [67].

3 Hypothesen

1. Simultaner kombinierter rAAV-basierter Gentransfer der therapeutischen Wachstumsfaktorgene hTGF- β und hIGF-I resultiert in humanen 3D-MSZ-Aggregaten in verbesserten Expressionsniveaus der jeweiligen Wachstumsfaktorgene über einen Zeitraum von 21 Tagen verglichen mit der singulären rAAV-basierten Applikation des entsprechenden Wachstumsfaktorgens und verglichen mit dem Reporter gen *lacZ*.
2. Dauerhafte und effektive kombinierte rAAV-hTGF- β /hIGF-I-Überexpression verbessert proliferative, biosynthetische und chondrogene Differenzierungsaktivitäten von humanen 3D-MSZ-Aggregaten nach 21 Tagen verglichen mit der singulären rAAV-basierten Überexpression des entsprechenden Wachstumsfaktorgens (hTGF- β oder hIGF-I) und verglichen mit dem Reporter gen *lacZ*.
3. Dauerhafte und effektive kombinierte rAAV-hTGF- β /hIGF-I-Überexpression vermindert osteogene und hypertrophe Differenzierungsaktivitäten von humanen 3D-MSZ-Aggregaten nach 21 Tagen verglichen mit der singulären rAAV-basierten Überexpression des entsprechenden Wachstumsfaktorgens (hTGF- β oder hIGF-I) und verglichen mit dem Reporter gen *lacZ*.
4. Die Hypothesen 1-3 besitzen ebenfalls Gültigkeit nach Implantation von kombiniert rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ in humane osteochondrale Defektmodelle *ex vivo*.
5. Die Implantation von rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ in humane osteochondrale Defektmodelle *ex vivo* führt zu verbesserten proliferativen, biosynthetischen und chondrogenen Differenzierungsaktivitäten im perifokalen Knorpelgewebe nach 21 Tagen verglichen mit der singulären rAAV-basierten Überexpression des entsprechenden Wachstumsfaktorgens (hTGF- β oder hIGF-I) und verglichen mit dem Reporter gen *lacZ*.
6. Die Implantation von rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ in humane osteochondrale Defektmodelle *ex vivo* führt zu verminderten osteogenen, hypertrophen und terminalen Differenzierungsaktivitäten im perifokalen Knorpelgewebe nach 21 Tagen verglichen mit der singulären rAAV-basierten Überexpression des entsprechenden Wachstumsfaktorgens (hTGF- β oder hIGF-I) und verglichen mit dem Reporter gen *lacZ*.

4 Konzept der Studie

Die vorliegende Arbeit untersucht zwei verschiedene experimentelle Ansätze zur Therapie fokaler osteochondraler Defekte (**Abbildung 11**). Anhand eines direkten Gentransfermodells in Form von humanen hochdichten 3D-MSZ-Aggregaten (2×10^5 Zellen/Aggregat) wurde der experimentelle Therapieansatz des direkten rAAV-basierten Gentransfers simuliert, indem diese direkt mittels therapeutischen rAAV-Vektoren behandelt wurden. Mittels eines indirekten Gentransfermodells wurde der experimentelle Therapieansatz des indirekten rAAV-basierten Gentransfers simuliert. Hierzu erfolgte zunächst eine *ex vivo*-Modifikation von humanen MSZ mit therapeutischen rAAV-Vektoren. Anschließend wurden die genetisch modifizierten humanen 3D-MSZ-Aggregate in humane osteochondrale Defektmodelle *ex vivo* implantiert. Diese gewährleisteten ein weitgehend natürliches Mikromilieu, vergleichbar mit demjenigen bei Patienten [84; 255], und erlaubten die Beurteilung des Reparaturgewebes sowie des perifokalen Knorpelgewebes nach Induktion intrinsischer chondroreparativer Differenzierungsprozesse durch rAAV-basiert modifizierte humane MSZ.

Die Fähigkeit genetisch modifizierter humaner MSZ zur Aktivierung chondroreparativer Differenzierungsvorgänge wurde in früheren Studien gezeigt [17; 156; 190]. Über die klinische Relevanz [73] und die Eignung von rAAV-Vektoren zur sicheren und dauerhaften Transduktion von humanen MSZ mit einer Effizienz von bis zu 100% über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen ohne Beeinträchtigung proliferativer oder metabolischer Differenzierungsaktivitäten wurde ebenfalls bereits berichtet [17; 67; 68; 235; 249; 297; 321]. Aus diesem Grund erfolgte im Rahmen der vorliegenden Studie keine Analyse nicht-transduzierter Proben.

Frühere Studien berichteten bereits über erfolgreiche rAAV-basierte Überexpression therapeutischer chondrogener Wachstumsfaktorgene oder Transkriptionsfaktoren in humanen MSZ und die dadurch bedingten verbesserten chondrogenen Differenzierungsaktivitäten. Entsprechende Studien wurden u. a. durchgeführt unter Verwendung von TGF- β [108; 235], FGF-2 [67], IGF-I [109] sowie unter Verwendung des Transkriptionsfaktors SOX9 alleine [321] oder in Kombination mit TGF- β [302]. Verbesserte chondrogene Differenzierungspotentiale sind dabei jedoch nur bis zu einem gewissen Ausmaß beobachtet worden. Aus diesem Grund untersuchte die vorliegende Studie, ob ein simultaner kombinierter Einsatz von zwei pleiotropen und hochpotent chondrogenen Wachstumsfaktorgenen der Anwendung eines einzelnen therapeutischen Wachstumsfaktorgens überlegen ist. Eine Reihe von *in vitro*-Studien wiesen bereits sowohl für den singulären rAAV-basierten Gentransfer von TGF- β als auch für den singulären rAAV-basierten Gentransfer von IGF-I in humanen MSZ eine

erfolgreiche Überexpression dieser therapeutischen Wachstumsfaktorgene sowie dadurch bedingte verbesserte chondrogene Differenzierungspotentiale nach [108; 109]. Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchte die vorliegende Studie den Effekt eines simultanen kombinierten rAAV-basierten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I auf die chondrogenen Differenzierungspotentiale von humanen MSZ *in vitro* sowie nach deren Implantation in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo*. Als Negativkontrolle diente das Reporterogen *lacZ*, welches gleichzeitig im Vergleich mit den rAAV-basiert transduzierten Proben mit hTGF- β und/oder hIGF-I eine Unterscheidung zwischen endogener und exogener Expression der entsprechenden Wachstumsfaktoren erlaubte.

Es wurden drei Patienten in die Studie eingeschlossen (N = 3). Für jede Analyse beider Gentransfermodelle wurden jeweils vier Proben (jeweils für biochemische, histologische, immunhistochemische und *Real-time* RT-PCR-Analysen) in Doppelbestimmung (n = 2) angesetzt. Es wurden gleiche Volumina der jeweiligen therapeutischen rAAV-Vektoren appliziert und es erfolgte eine entsprechende Zugabe von rAAV-*lacZ* zu den Proben, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde. Dies gewährleistete gleiche Gesamtvolumina an zugeführten rAAV-Vektoren zu jeder Probe und damit die Vergleichbarkeit untereinander. Jede Transduktion wurde mit einer Multiplizität der Infektion (*Multiplicity of Infection, MOI*) von 8 durchgeführt.

Die transduzierten Kulturen des direkten und des indirekten viralen Gentransfermodells wurden jeweils für 21 Tage in definiertem chondrogenem Medium inkubiert. Innerhalb dieser Zeit ist die chondrogene Differenzierung der humanen MSZ vollständig vollzogen, sodass es sich hierbei um einen etablierten Zeitraum zur Evaluation der *in vitro*-Chondrogenese handelt [17; 155; 190]. Anschließend erfolgten Transgenexpressionsanalysen, Analysen der chondrogenen Differenzierungsaktivitäten, der proliferativen und biosynthetischen Eigenschaften sowie osteogener und hypertropher Differenzierungsaktivitäten.

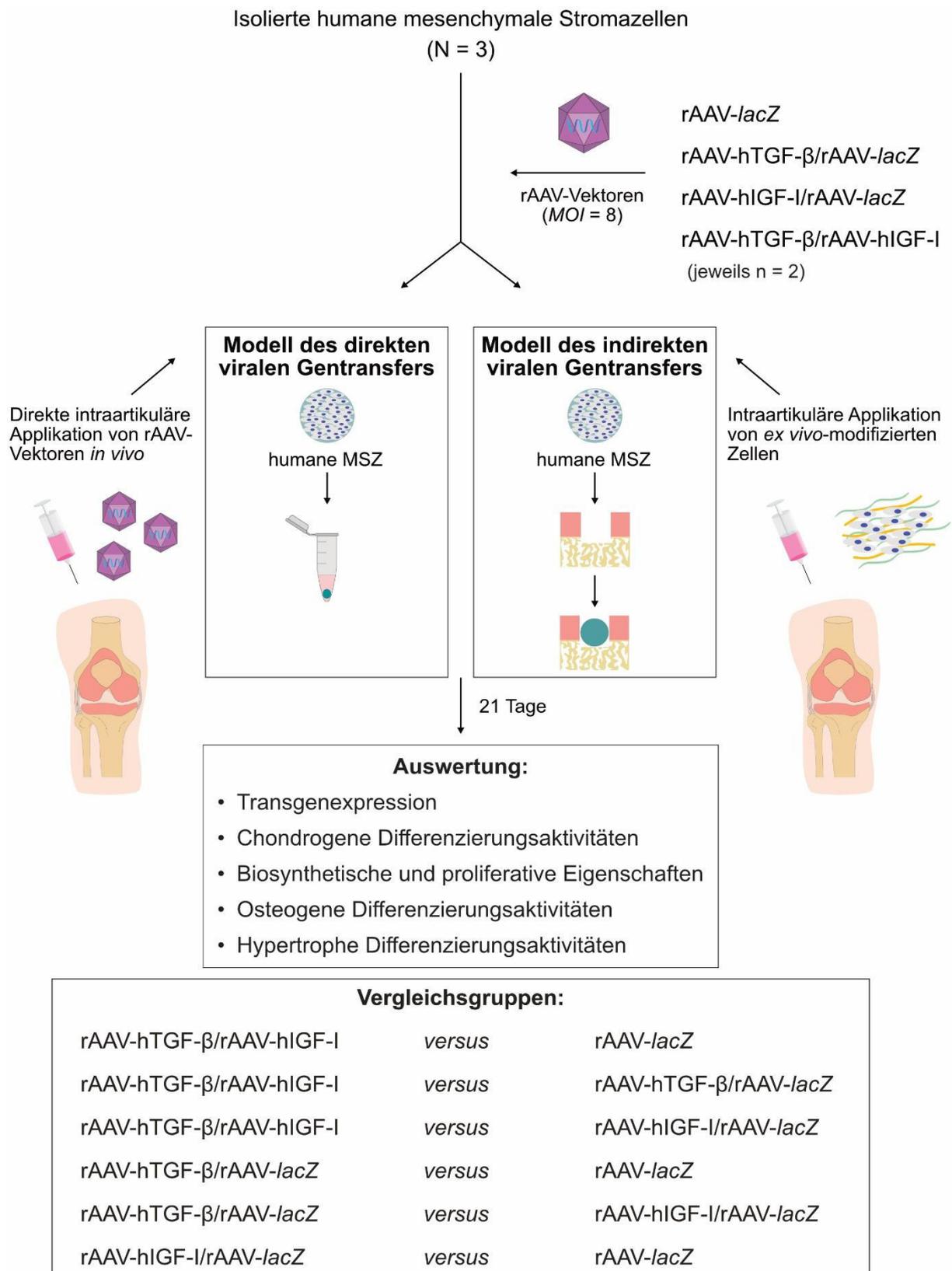


Abbildung 11. Konzept der Studie. hIGF-I = humaner insulinartiger Wachstumsfaktor I; hTGF- β = humaner transformierender Wachstumsfaktor beta; MSZ = mesenchymale Stromazellen; *lacZ* = Reporter gen; MOI = Multiplizität der Infektion; N = Anzahl der Patienten; n = Anzahl der Proben pro Analyse je Patient; rAAV = rekombinantes adeno-assoziiertes Virus.

5 Materialien

5.1 Chemikalien

Tabelle 1. Verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
1,9-Dimethylmethylenblau	Serva (Heidelberg, Deutschland)
0,5 M EDTA	Invitrogen (Schwerte, Deutschland)
ABC-Reagenz (Avidin-Peroxidase-Reagenz)	Vector (Burlingame, CA, USA)
Agarose	Bioline Meridian Life Science Inc. (Memphis, TN, USA)
Alizarin-Rot	EMD Millipore Corp./Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure	Fisher Chemical (Schwerte, Deutschland)
Ampicillin (100 mg/ml)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Invitrogen™ BlueJuice™ Gel Loading Buffer, 10X	Invitrogen (Schwerte, Deutschland)
Bisbenzimid (Hoechst 33258)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
CaCl ₂	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chloroquin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
D-Cysteinhydrochloridmonohydrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Gibco (Schwerte, Deutschland)
DNS Ladder 1 kb	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
DNS Natriumsalz aus Kalbsthymus	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Echtgrün	MP Biomedicals (Schwerte, Deutschland)
Eosin G	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (99%)	Caesar & Loretz (Hilden, Deutschland)
Ethanol (99%)	SAV LP GmbH (Flintsbach, Deutschland)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
FBS (Fetales Kälberserum)	Gibco (Schwerte, Deutschland)
Formaldehyd (37%)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formaldehyd-Lösung (4%)	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
(L-)Glutamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hämatoxylin nach Harris	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Fisher BioReagents (Schwerte, Deutschland)
Isopropanol	Arcos Organics (Schwerte, Deutschland)
ITS (Insulin-Transferrin-Selen A)	Gibco (Schwerte, Deutschland)
LB (Luria Broth Base [Miller's LB Broth Base])	Invitrogen (Schwerte, Deutschland)
NaCl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Opti-MEM I Serumreduziertes Medium	Gibco (Schwerte, Deutschland)
Surgipath Paraplast X-TRA	Leica Biosystems (Nussloch, Deutschland)
PBS (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
PCR Wasser für die Molekularbiologie	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin (10 ⁴ U/ml)-Streptomycin (10 ⁴ µg/ml)-Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
<i>Red Blood Cell Lysing Buffer</i>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Safranin-O	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (37%)	VWR (Darmstadt, Deutschland)
SOC-Medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TAE-Puffer	Gibco (Schwerte, Deutschland)
Thermo Scientific™ D(+)-Sucrose, 99%+ für Biochemie, RNase-, DNase- und Proteasefrei	Thermo-Scientific (Schwerte, Deutschland)
Toluidinblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tris-HCl	Gibco (Schwerte, Deutschland)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin-EDTA 10 x	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Wasserstoffperoxid	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Xylol	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)

5.2 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 2. Verwendete Lösungen, Puffer und Medien.

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Konzentration, Menge, Volumen
0,1 x TE-Lösung	Tris/HCl (pH 8)	10 mM
	EDTA	1 mM

1 x TNE-Lösung	Tris/HCl (pH 7,4)	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	100 mM
2 x HBS (pH 7,1)	5,6 ml 5 M NaCl	280 mM
	10 ml 0,5 M HEPES, pH 7,1	50 mM
	1 ml 0,15 M Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1,5 mM
	83,4 ml H ₂ O dest.	ad 100 ml
2,5 M CaCl ₂	CaCl ₂	3,675 g
	H ₂ O dest.	ad 10 ml
Basismedium für Zellkultur	DMEM	89 (V/V)
	FBS	10 (V/V)
	Penicillin (10 ⁴ U/ml)-Streptomycin (10 ⁴ µg/ml)-Lösung	1 (V/V)
Blockierungs-Puffer	Rinderalbumin (7,5%)	6 ml
	PBS	200 ml
chondrogenes Medium	TGF-β3 (100 µg/ml)	2,5 µl
	Penicillin (10 ⁴ U/ml)-Streptomycin (10 ⁴ µg/ml)-Lösung	250 µl
	Dexamethason (0,1 mM)	25 µl
	Ascorbinsäure (20 mg/ml)	62,5 µl
	Natriumpyruvat, 100x (11 mg/ml)	250 µl
	Insulin-Transferrin-Selen A, 100x	250 µl
	DMEM	ad 25 ml
DAB-Lösung	H ₂ O dest.	5 ml
	Puffer (pH 7,5)	2 Tropfen
	3,3´ Diaminobenzidin (DAB)	4 Tropfen
	H ₂ O ₂	2 Tropfen
DMEM	D-Glukose	4.500 mg/l
	L-Glutamin	580 mg/l
	Phenolrot	15 mg/l
	Nicht-essentielle Aminosäuren, Vitamine, anorganische Salze	nach Herstellerangaben
DMMB-Färbelösung (pH 3,5)	1,9-Dimethylmethylene blue-chloride	16 mg
	Natriumhydroxid (1 M)	25,6 ml
	Ethanol (95)	5 ml
	Ameisensäure (90%)	3 ml
	H ₂ O dest.	ad 1.000 ml
DMMB-Lösung-A	D-Cysteinhydrochloridmonohydrat	50 mg
	PBE	30 ml
DMMB-Lösung-B	Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz	53 mg

	DMMB-Lösung-A	1 ml
DMMB-Lösung-C	DMMB-Lösung-A	24,95 ml
	DMMB-Lösung-B	0,05 ml
DNS-Standardlösung	DNS Natriumsalz aus Kalbsthymus (1 mg/ml)	1 mg
	PBE	1 ml
Echtgrün-Lösung (0,02%)	Echtgrün FCF	200 mg
	H ₂ O dest.	ad 1.000 ml
Entkalkungs-Lösung	Tri-Natriumzitat-Dihydrat	50 g
	Ameisensäure (90%)	125 ml
	H ₂ O dest.	ad 500 ml
Eosin-Lösung	Eosin G	10 g
	H ₂ O dest.	ad 2.000 ml
Essigsäure (1%)	Essigsäure	1 ml
	H ₂ O dest.	ad 100 ml
Formalin-Lösung (pH 7,4)	KH ₂ PO ₄	9,07 g
	Na ₂ HPO ₄	11,86 g
	Formalin-Stammlösung 4 %	140 ml
	H ₂ O	ad 1.000 ml
HCl-Lösung (1%)	HCl (37%)	5,4 ml
	H ₂ O dest.	ad 200 ml
H ₂ O ₂ (0,09%)	H ₂ O ₂ (30%)	600 µl
	H ₂ O dest.	200 ml
Hämatoxylin-Lösung nach Weigert	Hämatoxylinlösung A nach Weigert	100 ml
	Hämatoxylinlösung B nach Weigert	100 ml
Medium für Agar- Selektions-Nährböden	Luria Agar (10 g Caseinpepton, 5 g Hefe- extrakt, 10 g Natriumchlorid, 12 g Agar)	37 g
	Agar-Platten	Ampicillin (50 mg/ml)
PBE	H ₂ O	ad 1.000 ml
	Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	7,1 g
	EDTA-(Na ²⁺)	1,86 g
PBS	H ₂ O	ad 500 ml
	Kaliumchlorid (pH 7,2)	2,7 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	1,7 mM
	Natriumchlorid	136 mM
Safranin-O-Lösung	Dinatriumhydrogenphosphat	10 mM
	Safranin-Orange	1 g
Wachstumsmedium für Zellkultur	H ₂ O	ad 1.000 ml
	DMEM	89% (V/V)
	FBS (fetales Kälberserum)	10% (V/V)
	Penicillin (10 ⁴ U/ml)-Streptomycin	1% (V/V)

5.3 Analyse-Sets

Tabelle 3. Verwendete Analyse-Sets.

Bezeichnung	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
DAB Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Genopure Plasmid Maxi Kit	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo-Scientific (Schwerte, Deutschland)
RNeasy Mini Kit	Quiagen (Hilden, Deutschland)
Human TGF-beta 1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
Human IGF-I/IGF-1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
VECTASTAIN® ABC-Peroxidase Kit	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
β-Gal Staining Set	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Puffer und Enzyme (Restriktionsverdau)	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)

5.4 Biologische Materialien

5.4.1 Zellen und Gelenkknorpel

5.4.1.1 Humane mesenchymale Stromazellen und Knorpelimplantate

Die humanen Knochenmarkaspirate, aus denen die Isolation der humanen MSZ erfolgte, sowie die osteochondralen Explantate (Femurkondylen) stammten von hämatologisch gesunden Patienten, die sich in der Klinik für Orthopädie und orthopädische Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, einer Kniearthroplastik unterzogen. Vor Studieneinschluss haben alle Patienten nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme gegeben. Alle angewandten Verfahren und Methoden wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und vom klinischen Ethikkomitee des Saarlandes befürwortet (Ethikantrag 270-17).

5.4.1.2 Human Embryonic Kidney (HEK)-293-Zellen

Die zur Herstellung der rAAV-Vektoren verwendeten HEK-293-Zellen, einer humanen, mittels eines Adenovirus transduzierten Nierenzelllinie, die konstitutiv die adenoviralen Gene E1a und E1b exprimiert, wurden freundlicherweise von X. Xiao (The Gene Therapy Center, University of Pittsburgh, PA, USA) bereitgestellt.

5.4.2 Plasmide

Die zur Herstellung der rAAV-Vektoren verwendeten AAV-2-genomischen Plasmidklone aus dem pSSV9-Stamm sowie das Hilfsplasmid Ad8 und das Helfervirus Ad5 wurden freundlicherweise von R.J. Samulski (The Gene Therapy Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA) bereitgestellt. Die cDNS des verwendeten humanen TGF- β wurde von Invivogen (pORF9-hTGFB1, Toulouse, Frankreich) bezogen. Die cDNS des verwendeten humanen IGF-I wurde von Jansen *et al.* bezogen [150]. Die DNS des Reportergens *lacZ* wurde von Du *et al.* bezogen [94]. Die im Rahmen der Transformation verwendeten Bakterien *Escherichia coli DH 5 α* wurden von Thermo-Scientific (Schwerte, Deutschland) bezogen.

5.4.3 Antikörper und Enzyme

Tabelle 4. Verwendete Antikörper und Enzyme.

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Anti-IGF-I-Antikörper	Ziege	R&D bio-techne (Wiesbaden, Deutschland)
Anti-Kaninchen-IgG (biotinyliert)	Ziege	Vector (Burlingame, CA, USA)
Anti-Maus-IgG (biotinyliert)	Ziege	Vector (Burlingame, CA, USA)
Anti-TGF- β 1-Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-Typ-I-Kollagen	Maus	Abcam (Berlin, Deutschland)
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	DSHB (Iowa City, IA, USA)
Anti-Typ-X-Kollagen	Maus	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Anti-Ziege-IgG (biotinyliert)	Pferd	Vector (Burlingame, CA, USA)
Papain	-	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin	-	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

5.4.4 Primer

Tabelle 5. Verwendete Primer.

Bezeichnung	Hersteller
<i>ACAN</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>GAPDH</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>COL1A1</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>COL2A1</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>COL10A1</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>MMP-13</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>SOX9</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

5.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

5.5.1 Geräte

Tabelle 6. Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, England)
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)
Gelelektrophorese-Apparatur	Bio-Rad (Feldkirchen, Deutschland)
GENios Mikroplattenleser	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Inkubator (62 °C)	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Inkubator CB 150 (37 °C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Kühlschrank 4 °C	Bosch (Stuttgart, Deutschland)
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer (C-Chip)	Science Services GmbH (München, Deutschland)
Pap-Pen für Immunhistochemie	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
pH-Meter pH 210 Microprocessor	Hanna Instruments (Kehl am Rhein, Deutschland)
Photometer	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Quantitative PCR (QPCR) System	Stratagene MX 3000P (CA, USA.)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
Schüttler IH 50	Noctua (Wien, Österreich)
Sterilwerkbank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Vortex-Schüttler	Neo-Lab (Heidelberg, Deutschland)
Waage EW-600-2M	Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wärmeschrank 37 °C	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wärmeschrank 62 °C	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Wasserbad HI 1210 (für histologische Schnitte)	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wasserbad WB-7	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Zentrifuge Z-300	Hermle (Wehingen, Deutschland)

5.5.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7. Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
24-, 48- und 96- <i>well</i> -Platten	Greiner-BD-Falcon (Franklin Lakes, NJ, USA)
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, Biopure	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Röhrchen (15 ml, 30 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Kulturschalen (100 mm)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 μ l, 200 μ l, 1.000 μ l)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Corning Life Science (Wiesbaden, Deutschland)
Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Stanze (1 mm, 6 mm)	pfm medical (Köln, Deutschland)
T75-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one (Frickenhausen, Deutschland)

5.5.3 Software

Die Analyse digitaler Bilder erfolgte mittels *analySIS* Software (Soft Imaging System, Münster, Deutschland) und *cellSens* Standard (Olympus, Hamburg, Deutschland). Die *real-time* RT-PCR-Analysen erfolgten mittels *MxPro QPCR* (Stratagene, Kalifornien, USA). Abbildungen wurden mittels *Affinity Designer* (Serif, Nottingham, Großbritannien) erstellt, Bilder wurden mittels *Affinity Photo* (Serif, Nottingham, Großbritannien) bearbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Excel 2019* (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

6 Methoden

6.1 Versuchsaufbau

Gemäß der Fragestellung wurden im Rahmen der vorliegenden Studie aus isolierten undifferenzierten humanen MSZ dreier Patienten (N = 3) hochdichte Zellaggregate mit einer definierten Zellzahl von 2×10^5 Zellen pro Aggregat hergestellt. Diese wurden durch Zugabe definierten chondrogenen Mediums als chondrogen differenzierende 3D-Zellkultursysteme kultiviert und im Nachfolgenden mit verschiedenen therapeutischen rAAV-Vektoren ($MOI = 8$) gemäß der Gruppeneinteilung (Kapitel 6.1.1) transduziert. Es erfolgte entweder eine simultane kombinierte Applikation zweier therapeutischer Wachstumsfaktorgene mittels rAAV-basierten Gentransfers (rAAV-hTGF- β /rAAV-hIGF-I), eine rAAV-basierte Applikation eines einzelnen therapeutischen Wachstumsfaktorgens (rAAV-hTGF- β oder rAAV-hIGF-I) oder es erfolgte eine Zugabe von rAAV-*lacZ* anstatt eines therapeutischen Wachstumsfaktorgens (Reporter-rAAV-*lacZ* und Negativkontrolle). Im Weiteren wurde zwischen einem direkten (Kapitel 6.1.2) und einem indirekten (Kapitel 6.1.3) viralen Gentransfermodell differenziert.

6.1.1 Gruppeneinteilung

Im Rahmen der Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurden die humanen 3D-MSZ-Kultursysteme sowohl für das direkte als auch für das indirekte virale Gentransfermodell jeweils vier zu untersuchenden Gruppen zugeordnet.

Proben jeder Gruppe wurden dabei mit einer definierten Menge von insgesamt 80 μ l rAAV-Vektoren transduziert, wobei jeder therapeutische Vektor (rAAV-hTGF- β , -hIGF-I) in einer Menge von 40 μ l appliziert wurde. Proben der Gruppe 1 erhielten eine therapeutische rAAV-Vektorkombination von jeweils 40 μ l rAAV-hTGF- β und 40 μ l rAAV-hIGF-I. Den Proben der Gruppen 2 und 3 wurden hingegen nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert. Proben der Gruppe 2 erhielten 40 μ l rAAV-hTGF- β und 40 μ l Reporter-rAAV-*lacZ*, um gleiche Gesamtvolumina an applizierten rAAV-Vektoren in allen Gruppen zu gewährleisten. Proben der Gruppe 3 wurden jeweils 40 μ l rAAV-hIGF-I und 40 μ l Reporter-rAAV-*lacZ* appliziert. Proben der Gruppe 4 stellten die Negativkontrolle dar und erhielten keine rAAV-basierte Zugabe therapeutischer Wachstumsfaktorgene, stattdessen erfolgte eine Applikation von 80 μ l Reporter-rAAV-*lacZ*, welche für die *Escherichia coli* β -Galactosidase codieren [67; 321].

6.1.2 Direktes virales Gentransfermodell

Im Rahmen des direkten rekombinanten adeno-assoziierten viralen Gentransfermodells, welches den experimentellen Therapieansatz des direkten viralen Gentransfers simuliert (Kapitel 2.9.3), wurden die aus dem Knochenmark der Spender isolierten humanen MSZ als hochdichte Zellaggregate in Form von chondrogen differenzierenden 3D-Zellkultursystemen als Grundlage für die weiteren Experimente verwendet (**Abbildung 12**). Die humanen 3D-MSZ-Aggregate wurden durch direkte Applikation von rAAV-Vektoren gemäß der oben genannten Gruppeneinteilung (Kapitel 6.1.1) genetisch modifiziert (rAAV-hTGF- β /hIGF-I, rAAV-hTGF- β /*lacZ*, rAAV-hIGF-I/*lacZ* versus Reporter gen und Negativkontrolle rAAV-*lacZ*) und für 21 Tage in definiertem chondrogenen Medium kultiviert.

Die Überprüfung der Transgenexpression anhand der Sekretion der therapeutischen Proteine erfolgte zu vier festgesetzten Zeitpunkten an Tag 2, 7, 14 und 21 nach erfolgter Transduktion mit rAAV-Vektoren. Im Weiteren wurde der Einfluss der Überexpression der therapeutischen Gene auf die biosynthetischen Eigenschaften sowie auf die chondrogenen, osteogenen und hypertrophen Differenzierungsprozesse der humanen MSZ-Aggregate mittels biochemischen, histologischen und immunhistochemischen sowie *Real-time* RT-PCR-Analysen untersucht.

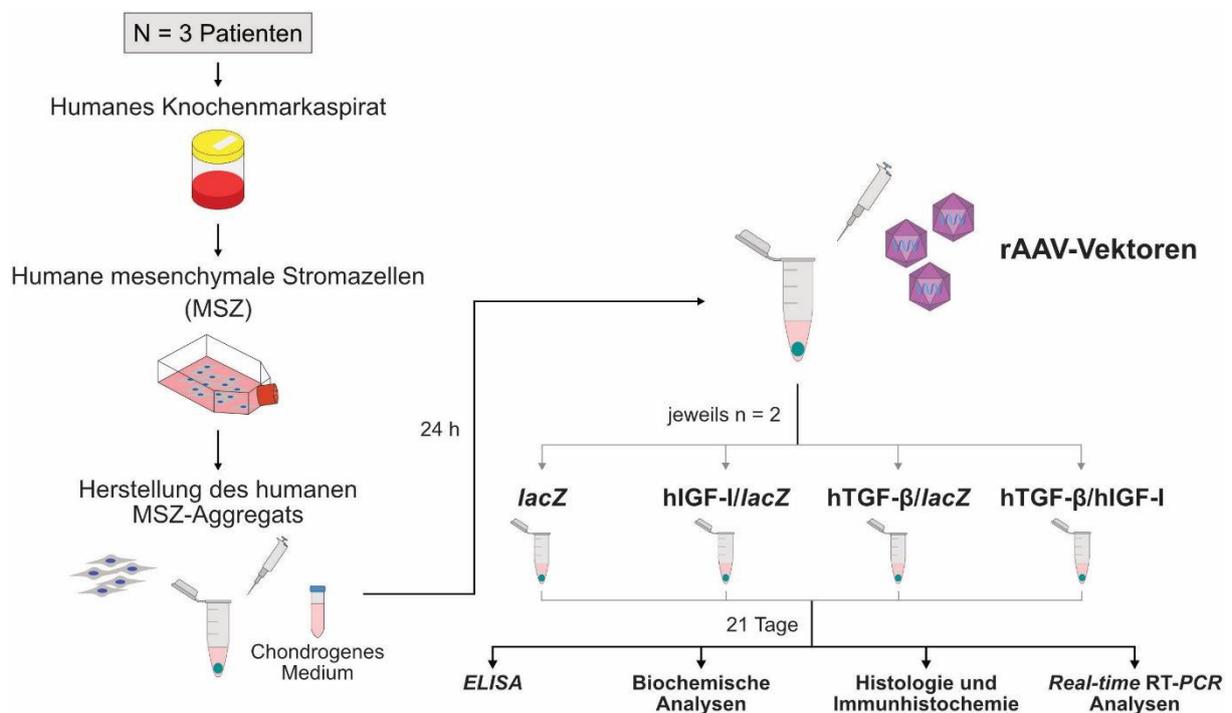


Abbildung 12. Schematische Übersicht über das direkte rekombinante adeno-assoziierte virale Gentransfermodell. hIGF-I = humaner insulinartiger Wachstumsfaktor I; hTGF- β = humaner transformierender Wachstumsfaktor beta; MSZ = mesenchymale Stromazellen; N = Anzahl der Patienten; n = Anzahl der Proben pro Analyse je Patient; rAAV = rekombinantes adeno-assoziiertes Virus.

6.1.3 Indirektes virales Gentransfermodell

Im Rahmen des indirekten rekombinanten adeno-assoziierten viralen Gentransfermodells, welches den experimentellen Therapieansatz des indirekten viralen Gentransfers simuliert (Kapitel 2.9.3), erfolgte ein mehrstufiges Prozedere (**Abbildung 13**). Zunächst wurden aus den isolierten humanen MSZ hochdichte Zellaggregate in Form von chondrogen differenzierenden 3D-Zellkultursystemen hergestellt. Diese wurden durch direkte Applikation von rAAV-Vektoren gemäß der oben genannten Gruppeneinteilung (Kapitel 6.1.1) genetisch modifiziert (rAAV-hTGF- β /hIGF-I, rAAV-hTGF- β /*lacZ*, rAAV-hIGF-I/*lacZ* versus Reporter gen und Negativkontrolle rAAV-*lacZ*) und für 24 h in definiertem chondrogenem Medium kultiviert. Anschließend wurden diese in humane osteochondrale Defektmodelle *ex vivo* implantiert und für 21 Tage in chondrogenem Medium kultiviert. Nach Beendung der Kultivierungsperiode erfolgte die Überprüfung der Transgenexpression anhand der Sekretion der therapeutischen Proteine. Im Weiteren wurde der Einfluss der Überexpression der therapeutischen Gene auf die biosynthetischen Eigenschaften sowie auf die chondrogenen, osteogenen und hypertrophen Differenzierungsprozesse im osteochondralen Defekt und im perifokalen Knorpelgewebe untersucht. Dazu erfolgten biochemische, histologische und immunhistochemische sowie *Real-time RT-PCR*-Analysen.

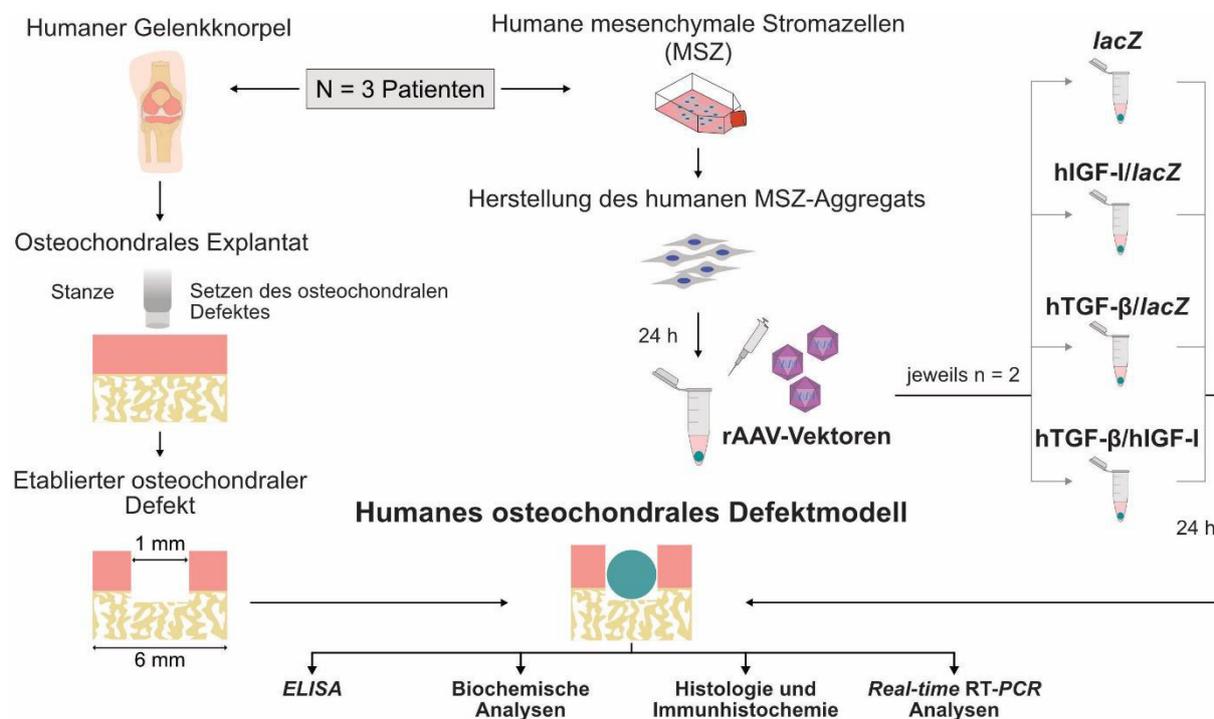


Abbildung 13. Schematische Übersicht über das indirekte rekombinante adeno-assoziierte virale Gentransfermodell. hIGF-I = humaner insulinartiger Wachstumsfaktor I; hTGF- β = humaner transformierender Wachstumsfaktor beta; MSZ = mesenchymale Stromazellen; N = Anzahl der Patienten; n = Anzahl der Proben pro Analyse je Patient; rAAV = rekombinantes adeno-assoziiertes Virus.

6.2 Zellkultur

Alle den humanen MSZ zugeführten Lösungen, Puffer oder Medien wurden, falls nicht anders angegeben, vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

6.2.1 Isolierung und Kultivierung humaner MSZ aus Knochenmarkaspiraten

Die Isolierung sowie die anschließende Kultivierung von humanen MSZ aus sterilen Knochenmarkaspiraten erfolgte gemäß nachfolgendem, langjährig etablierten Standardprotokoll, dessen Eignung mittels Durchflusszytometrie in vergangenen Studien zweifelsfrei verifiziert wurde [67; 190; 242; 321]:

Tag 1: Das steril entnommene Knochenmarkaspirat wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, die Probe durch Auffüllen des Zentrifugenröhrchens auf 50 ml mit serumfreiem DMEM gewaschen und für 5 min bei 1.500 U/min (RT) zentrifugiert. Mit einer Pipette mit großer Öffnung (*wide-mouth*) wurde der Überstand entfernt, das Präzipitat durch erneutes Auffüllen des Zentrifugenröhrchens mit serumfreiem DMEM auf 50 ml gewaschen und für 5 min bei 1.500 U/min (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 5 ml serumfreiem DMEM und 5 ml *Red Blood Cell Lysing Buffer* sowie gründlicher Durchmischung wurde das Zentrifugenröhrchen mit serumfreiem DMEM auf 30 ml aufgefüllt und für 5 min bei 1.500 U/min (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat unter Zugabe von 15-20 ml DMEM, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin (Kulturmedium) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine T75-Zellkulturflasche überführt und für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Tag 2: Durch vorsichtiges Schütteln der T75-Zellkulturflasche wurden die noch nicht am Flaschenboden angewachsenen Zellen im Überstand gelöst. Die Zellsuspension wurde in eine zweite, neue T75-Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellkulturflasche, in denen sich die humanen MSZ bereits abgesetzt hatten, wurde mit 15-20 ml Kulturmedium bei 37 °C und 5% CO₂ weiter kultiviert.

Tag 3: Hier wurde, wenn notwendig, das Prozedere von Tag 2 wiederholt, um humane MSZ in weiteren T75-Zellkulturflaschen zu kultivieren.

Ab Tag 4: Es erfolgte eine Zugabe des Wachstumsfaktors FGF-2 zum Kulturmedium (Konzentration im Kulturmedium 1 ng/ml). Dies gewährleistete eine reine Zellproliferation, ohne dabei das Differenzierungspotential zu beeinflussen [67].

6.2.2 Passagieren von Zellen

Die kultivierten, proliferierenden humanen MSZ wurden bei Erreichen eines Konfluenzniveaus von 75-85% im Verhältnis 1:3 passagiert. Dies erfolgte gemäß nachfolgendem Standardprozedere unter Verdünnung der bisherigen Zellsuspension und Überführung dieser in neue T75-Zellkulturflaschen: Zunächst wurde das Medium vollständig aus den T75-Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen durch Zugabe von 10-15 ml serumfreiem DMEM gewaschen. Das Medium wurde entfernt und es erfolgte eine gleichmäßige Benetzung des Zellrasens mit 5 ml Trypsin. Die Trypsinierung führt zu einer Proteasenreaktion, welche das Ablösen der adhären humanen MSZ vom Boden der Zellkulturflasche bewirkt. Nach Inkubation für 15 min bei 37 °C und 5% CO₂ erfolgte durch Zugabe von 10 ml DMEM/FBS auf die bereits vorgelösten humanen MSZ ein Abstoppen der Trypsinierung. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension und ein Abspülen der Kulturoberfläche bewirkte ein vollständiges Ablösen der humanen MSZ vom Boden der Zellkulturflaschen. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, dieses mit serumfreiem DMEM bis auf 30 ml aufgefüllt und für 5 min bei 1.500 U/min (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellaggregat in 10 ml DMEM, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert und die Zellzahl in der Zellsuspension mittels Neubauer Zählkammer (Kapitel 6.2.3) bestimmt. Auf dieser Grundlage erfolgte die Einstellung der angestrebten Zellzahl mit DMEM und Überführung des jeweiligen Volumens Zellsuspension in neue T75-Zellkulturflaschen. Diese wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Verwendung der humanen MSZ erfolgte im Rahmen der vorliegenden Studie in niedriger Passage (≤ 2).

6.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension erfolgte mittels Vitalfärbung der Zellen mit Trypanblau sowie unter Verwendung der Neubauer Zählkammer. Zytotoxisches Trypanblau wird nur von nicht-vitalen Zellen aufgenommen und färbt diese entsprechend blau, da es aufgrund seiner Molekülgröße die intakte Zellmembran vitaler Zellen nicht passieren kann [64]. Die Auszählung der Zellen erfolgte in Doppelbestimmung mit anschließender Mittelwertbildung. Zur Vorbereitung der Trypanblau-Zell-Lösung wurden jeweils 10 μ l Trypanblau und 10 μ l Zellsuspension in ein steriles Reaktionsgefäß überführt (Verdünnungsfaktor 2). Jedes der beiden unabhängigen Zählfelder der Neubauer Zählkammer wurde mit jeweils 10 μ l der Trypanblau-Zell-Lösung beschickt, die Zellen lichtmikroskopisch ausgezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Mittelwert gebildet (Ergebnis: Zellzahl/ μ l).

6.2.4 Herstellung von humanen 3D-MSZ-Aggregaten

Nach erfolgter Isolierung und Kultivierung von humanen MSZ aus sterilen Knochenmarkaspiraten wurden hochdichte Zellaggregate mit jeweils 2×10^5 Zellen als 3D-Zellkultursysteme hergestellt. Diese dienten als Grundlage für die Durchführung der weiteren Experimente. Die Herstellung dieser hochdichten humanen 3D-MSZ-Aggregate erfolgte gemäß nachfolgendem Standardprozedere [67]: Zunächst wurden die in den Kapiteln 6.2.2 (Passagieren von Zellen) und 6.2.3 (Bestimmung der Zellzahl) beschriebenen Arbeitsschritte durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung von jeweils 3-4 T75-Zellkulturflaschen pro Patienten mit einem Konfluenzniveau von etwa 85%. Das errechnete Zellsuspensionsvolumen, welches jeweils 2×10^5 Zellen enthielt, wurde in sterile Reaktionsgefäße überführt, für 5 min bei 1.500 U/min (RT) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig, ohne Aspiration des humanen 3D-MSZ-Aggregats, mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurden jedem humanen 3D-MSZ-Aggregat 150 μ l chondrogenes Medium zugegeben (**Abbildung 14, A**) und die Reaktionsgefäße mit geöffneten Deckeln in einen mit Ethanol (95%) sterilisierten Reaktionsgefäß-Ständer überführt (**Abbildung 14, B**). Dieser wurde wiederum in ein sterilisiertes Glasgefäß mit ebenfalls sterilisiertem Aluminiumdeckel gesetzt und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert (**Abbildung 14, B und C**). Ein Mediumwechsel wurde alle 48 h durchgeführt. Dies erfolgte durch vorsichtiges Abpipettieren und Verwerfen des Überstands, ohne Aspiration des humanen 3D-MSZ-Aggregats, sowie durch Zugabe von jeweils 150 μ l frischem chondrogenem Medium.



Abbildung 14. Kultivierung von humanen 3D-MSZ-Aggregaten. **A:** Je ein humanes MSZ-Aggregat (Pfeil) wurde in einem Reaktionsgefäß mit chondrogenem Medium kultiviert. **B:** Die geöffneten Reaktionsgefäße mit humanen MSZ-Aggregaten wurden in einen sterilisierten Reaktionsgefäß-Ständer überführt und dieser in ein sterilisiertes Glasgefäß platziert. **C:** Sterilisiertes Glasgefäß mit Aluminiumdeckel zur Kultivierung humaner 3D-MSZ-Aggregate.

6.3 Vorbereitung von rAAV-Plasmiden

Die in der vorliegenden Studie eingesetzten rAAV-Vektoren wurden als konventionelle Vektoren unter Anwendung eines Helfer-basierten Systems hergestellt [67]. Dieses erforderte neben den rAAV-Plasmiden mit dem jeweiligen gewünschten Transgen das Hilfsplasmid Ad8

sowie die Co-Infektion mit Adenovirus 5 [67; 321]. Alle rAAV-Vektoren stammten von AAV-2-genomischen Klonen aus dem pSSV9-Stamm ab [266; 267], einem Derivat des pEMBL8-Plasmids [88], kreiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. J. Samulski.

6.3.1 Plasmid-Aufbau

Basierend auf dem pSSV9-Plasmid [266; 267] erfolgt durch Klonierung die Herstellung von zwei Basisplasmiden, dem AAV-Plasmid mit variabler multipler Klonierungsstelle (*Multiple Cloning Site, MCS*) und dem Ad8-Hilfsplasmid. Das rekombinante pSSV9-Plasmid enthält das vollständige intakte AAV-Genom, einschließlich der *rep*- und *cap*-Sequenzen, der AAV-*ITRs* sowie der regulatorischen Promotor- und Polyadenylierungs-Sequenzen [267] (**Abbildung 15**). Darüber hinaus enthält es einen Replikationsursprung (*Origin of Replication; ORI*), der die autonome Replikation des Plasmids ermöglicht [87], sowie als Selektionsmarker das β -Lactamase-Gen (Amp^R). Im hierauf basierenden (r)AAV-Plasmid bleiben lediglich die *cis*-wirkenden AAV-*ITRs* des AAV-Genoms erhalten [267]. Der heterologe Promotor/*Enhancer* CMV-*IE* ermöglicht eine hohe Transgenexpression, während das Polyadenylierungssignal Simian-Virus 40 (SV40pA) entscheidend ist für die Stabilität der *messenger* Ribonukleinsäure (mRNS) sowie deren nukleären Export und anschließenden Translation [218; 245]. Die multiple Klonierungsstelle (*Multiple Cloning Site; MCS*) ermöglicht die Integration des entsprechend gewünschten Transgens (cDNS) und somit die Herstellung des rAAV-Plasmids [350].

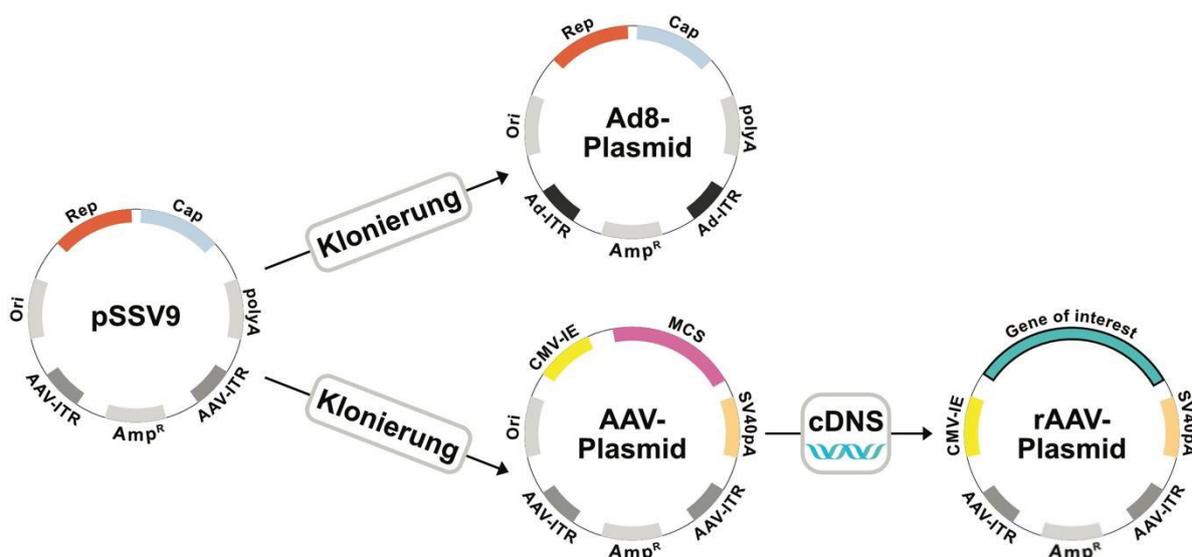


Abbildung 15. Schematischer Plasmid-Aufbau. pSSV9 = Grundplasmid; AAV-Plasmid = Basisplasmid; Ad8-Plasmid = Basis- bzw. Hilfsplasmid; Ad = Adenovirus; Ad-ITR = Adenovirales *Inverted Terminal Repeat*; Amp^R = β -Lactamase-Gen; cap = Kapsid-Gen; cDNS = komplementäre Desoxyribonukleinsäure; CMV-IE = Cytomegalovirus-*Immediate Early*-Promotor; MCS = Multiple Klonierungsstelle; ORI = Replikationsursprung; polyA = Polyadenylierungssignal; rep = Replikations-Gen; SV40pA = Simian-Virus 40-Polyadenylierungssignal.

Im Gegensatz dazu enthält das Ad8-Hilfsplasmid lediglich die *trans*-wirkenden rep- und cap-Sequenzen des AAV-2-Genoms, die für die Replikation und die Kapsidbildung essenziell sind [267; 321]. Das Ersetzen der AAV-ITRs durch Adenovirus-ITRs im Ad8-Hilfsplasmid verhindert weitestgehend homologe Rekombinationen und damit Wildtyp-ähnliche, replikationsfähige AAV-Kontaminationen im folgenden Transfektionsprozess [205; 267; 270].

Im Rahmen der vorliegenden Studie verwendeten wir in Plasmiden klonierte hTGF- β - [322] und hIGF-I-Sequenzen [334], freundlicherweise von Frau Prof. rer. nat. M. Cucchiarini hergestellt und zur Verfügung gestellt, sowie in Plasmiden klonierte *lacZ*-cDNS-Sequenzen [94], freundlicherweise von Du *et al.* hergestellt und zur Verfügung gestellt. Alle Zielgene standen unter der Kontrolle des CMV-*IE*-Promotors/*Enhancers*. Der anschließende Vorgang der Transformation beschreibt das Einschleusen dieser Plasmide in Bakterien (hier: *Escherichia coli*) (Kapitel 6.3.2), welche schließlich in Form eines Glycerolstocks zur Verwendung bereitstanden. Nach erfolgter Bakterianreicherung (Kapitel 6.3.3) erfolgte die Isolation der rAAV-Plasmide (Kapitel 6.3.4). Durch photometrische Messungen wurden die Konzentration sowie die Reinheit der isolierten Plasmid-DNS bestimmt. Der Erfolg der Transformation und nachfolgenden Plasmidisolation wurde über einen Nachweis der DNS (hTGF- β , hIGF-I und *lacZ*) mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das gesamte Prozedere erfolgte nicht unter strikt sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank, es wurde jedoch durch das Arbeiten in geringem Abstand zur Ethanol-Flamme eine weitgehend sterile Arbeitsweise gewährleistet.

6.3.2 Transformation

Die Transformation humaner TGF- β -, humaner IGF-I- und *lacZ*-cDNS-Sequenzen-tragender Plasmide in *Escherichia coli* erfolgte unter Anwendung der Hitzeschock-Methode gemäß nachfolgendem etablierten Standardprotokoll: In jedes Reaktionsgefäß (je Plasmid ein Reaktionsgefäß) wurden 100 μ l Bakteriensuspension und 100 ng des jeweiligen Plasmids (hTGF- β , hIGF-I und *lacZ*) gegeben. Anschließend erfolgte eine Kühlung für 30 min auf Eis mit nachfolgendem Hitzeschock für 1 min im Wasserbad bei 40 °C sowie erneuter Kühlung auf Eis für 2 min. Eine maximale Transformationseffizienz wurde durch Zugabe von 900 μ l SOC-Medium [131] und anschließender Inkubation für 90 min bei 30 °C und 250 U/min im Schüttler erreicht. Nach Beendung der Inkubation wurden jeweils 10 μ l der Bakterien-Plasmid-Suspension auf Ampicillin-haltige Agarplatten appliziert, für 24 h bei 30 °C inkubiert und schließlich in Form eines Glycerolstocks bei -20 °C gelagert.

6.3.3 Bakterienanreicherung

Die Anreicherung der Bakterien erfolgte in Form einer Übernacht-Vorkultur und einer daran anschließenden Übernacht-Bakterienkultur entsprechend nachfolgendem etablierten Standardprotokoll:

Tag 1 (Übernacht-Vorkultur):

Zunächst erfolgte eine optische Qualitätskontrolle des LB-Mediums (Nährmedium für Bakterien); das Vorliegen einer klaren, gelben Flüssigkeit sprach dabei für einen einwandfreien Zustand des Mediums. Je verwendetem Glycerolstock wurden 3 Reaktionsgefäße vorbereitet. Zur Herstellung der *Pre-Mix* Lösung wurden pro Reaktionsgefäß 5 ml LB-Medium in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und OD^{500nm} Ampicillin (50 mg/ml) zugefügt. In jedes Reaktionsgefäß wurden 5 ml *Pre-Mix* Lösung sowie eine kleine Menge (etwa eine Pipettenspitze) des jeweiligen gefrorenen Glycerolstocks überführt. Die Entnahme und Zugabe des gefrorenen Glycerolstocks erfolgte dabei mittels einer sterilen Pipettenspitze. Es erfolgte eine anschließende Inkubation für 12-18 h über Nacht bei 30 °C und 250 U/min im Schüttler. Hierbei handelt es sich um die optimale Temperatur, bei der intramolekulare Rekombinationen der AAV-Plasmide verhindert werden [65].

Tag 2 (Übernacht-Bakterienkultur):

Nach optischer Qualitätskontrolle des LB-Mediums wurde je verwendetem Reaktionsgefäß der Übernacht-Vorkultur ein Erlenmeyerkolben vorbereitet. Pro Erlenmeyerkolben erfolgte die Zugabe von jeweils 200 ml LB-Medium sowie von OD^{500nm} Ampicillin (50 mg/ml). Durch leichtes Schwenken der Übernacht-Vorkulturen wurden diese durchmischt und anschließend in den jeweils dafür vorgesehenen Erlenmeyerkolben überführt. Es erfolgte eine Inkubation für 12-18 h über Nacht bei 30 °C und 250 U/min im Schüttler.

6.3.4 Plasmidisolation

Die Isolation der Plasmide erfolgte unter Verwendung des *Genopure Plasmid Maxi Kits* (Roche Applied Science) sowie nach dessen Protokoll. Zunächst wurden die Bakterienkulturen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, dabei wurde jede Bakterienkultur auf 4 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Diese wurden für 10 min bei 5.500 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand von je 2 Zentrifugenröhrchen einer Kultur verworfen. Von den 2 verbliebenen Zentrifugenröhrchen einer Kultur wurden jeweils 30 ml des Überstands verworfen, das Bakterien-Aggregat im restlichen Medium resuspendiert und die resultierenden Bakteriensuspensionen in die 2 zur jeweiligen Bakterienkultur gehörenden Zentrifugen-

röhrchen mit bereits verworfenem Überstand überführt. Diese wurden erneut für 10 min bei 5.500 U/min (4 °C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Unmittelbar daran anschließend erfolgte die Plasmidisolation. Alternativ ist ein Einfrieren der Bakterien-Aggregate bei -80 °C sowie eine Durchführung des weiteren Prozederes zu einem späteren Zeitpunkt möglich. Zur Plasmidisolation erfolgte zunächst eine Aufnahme der Bakterien-Aggregate in jeweils 12 ml gekühlten *Suspension Buffer + RNase* sowie eine Zugabe von 12 ml *Lysis Buffer* pro Bakterien-Aggregat. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die Suspension durchmischt und für 2-3 min (RT) inkubiert. Jeder Suspension wurden 12 ml gekühlter *Neutralisation Buffer* zugegeben und nach sofortiger Durchmischung für 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte die Filtration der Lysate mittels *Equilibration Buffer* angefeuchteter Filter und die Vorbereitung der Säulen. Die Equilibrierung der Säulen erfolgte mit jeweils 6 ml *Equilibration Buffer*. Um ein Austrocknen der Säulen zu verhindern, wurden unmittelbar nach Abschluss des Equilibrierungsprozesses die filtrierten Überstände auf die vorbereiteten Säulen überführt. Der Durchfluss wurde verworfen, 16 ml *Wash Buffer* auf die Säulen gegeben, der Durchfluss wiederum verworfen und erneut 16 ml *Wash Buffer* auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden auf neue 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und jeweils 15 ml vorgewärmter (50 °C) *Elution Buffer* auf die Säulen gegeben. Anschließend wurden die Säulen verworfen, dem Durchfluss jeweils 11 ml Isopropanol zugegeben und dieser nach Durchmischung für 30 min bei 8.000 U/min (4 °C) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands erfolgte die Zugabe von 4 ml gekühltem Ethanol (70%) sowie eine Zentrifugation für 30 min bei 8.000 U/min (4 °C). Verbleibende Reste des Überstands wurden abpipettiert, anschließend erfolgte eine Lufttrocknung der Aggregate für 10 min (RT) sowie eine Aufnahme der getrockneten Aggregate in jeweils 300 µl *PCR-Wasser*. Diese wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgte die photometrische Bestimmung der Plasmid-Konzentration sowie der Reinheit der Plasmid-DNS (Kapitel 6.3.5). Die Plasmide wurden bei -80 °C gelagert.

6.3.5 Bestimmung der Plasmidkonzentration und -reinheit

Die photometrische Bestimmung der Plasmid-Konzentration sowie der Reinheit der Plasmid-DNS erfolgte unter Verwendung einer 1:500 Verdünnung des Plasmids mit *PCR-Wasser*. Hierzu wurde die Absorption (A) bei 260 nm ($OD^{260\text{ nm}}$) und 280 nm ($OD^{280\text{ nm}}$) gemessen. Es erfolgte die Messung des Leerwerts (500 µl *PCR-Wasser*) sowie die Messung der einzelnen Proben (5 µl Probe + 495 µl *PCR-Wasser*).

Die Plasmid-Konzentration in µg/ml wurde auf folgender Grundlage bestimmt:

1 $OD^{260\text{ nm}} \triangleq 50 \mu\text{g/ml}$ (gilt für doppelsträngige Plasmid-DNS)

Die Überprüfung der Reinheit der Plasmid-DNS erfolgte auf Grundlage nachstehender Gesetzmäßigkeit: $OD^{260nm}/OD^{280nm} = 1,8-2$ (gilt für reine DNS-Proben)

6.3.6 Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese

Eine erfolgreiche Transformation und nachfolgende Plasmidisolation wurden über einen Nachweis der spezifischen Plasmid-DNS (hTGF- β , hIGF-I, *lacZ* und Ad8) mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu erfolgte zwecks eindeutiger Identifikation der jeweiligen Plasmide im Rahmen des Restriktionsverdaus zunächst eine sequenzspezifische Erkennung und Spaltung der Plasmid-DNS an definierten Positionen durch Restriktionsendonucleasen [287]. Hierdurch wurde die Plasmid-DNS in definierte DNS-Fragmente mit bekannter Anzahl an Basenpaaren aufgetrennt [328]. Auf Grundlage der jeweiligen Plasmidkarten, welche unter anderem Informationen über Restriktionsschnittstellen und Anzahl der Basenpaare enthalten, erfolgt die Auswahl der jeweiligen Restriktionsendonucleasen sowie die Berechnung der erwarteten Größe des DNS-Fragments im Restriktionsverdau (**Tabelle 8**).

Der Restriktionsverdau erfolgte gemäß nachfolgendem Protokoll entsprechend den Instruktionen von Roche Applied Science: In sterile Reaktionsgefäße wurden 500 ng der jeweiligen Plasmide überführt und jeweils 1 μ l Puffer sowie 1 μ l Enzym zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden mit destilliertem Wasser bis auf 10 μ l aufgefüllt und zum Restriktionsverdau für mindestens 2 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Auftrennung der DNS-Fragmente entsprechend ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese [176] unter Verwendung eines Agarosegels (1,5 g Agarose, 150 ml Wasser, 15 ml TAE-Puffer, 10 μ l Ethidiumbromid) sowie von *BlueJuice™ Gel Loading Buffer* (Invitrogen), eines DNS-Markers (AppliChem) und einer entsprechenden Gelelektrophorese-Apparatur (Bio-Rad), jeweils nach Herstellerangaben. Ein Vergleich der entstandenen Banden der Plasmide mit den Bandenpositionen des DNS-Markers mit bekannten Fragmentgrößen erlaubte eine eindeutige Größenzuordnung und Identifikation der jeweiligen Plasmid-DNS.

Tabelle 8. Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese.

Plasmid-DNS	Restriktionsenzym	Puffer	Fragmentgröße [bp]
Ad8	XbaI + EcoRI	H	3.500, 2.500, 1.500, 218, 115
<i>lacZ</i>	SmaI	A	5.120, 3.740
TGF- β	SmaI	A	3.900, 1.230, 630, 550
IGF-I	PvuII	M	3.660, 2.250

Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese wurden gemäß den Instruktionen von Roche Applied Science durchgeführt.

6.4 Herstellung von rAAV-Vektoren

Die in dieser Studie eingesetzten rAAV-Vektoren wurden als konventionelle Vektoren unter Anwendung eines Helfer-basierten Systems hergestellt (**Abbildung 16**) [67]. Alle rAAV-Vektoren stammten von denselben AAV-2-genomischen Klonen aus dem pSSV9-Stamm (**Abbildung 15**) ab [266; 267]. HEK-293-Zellen wurden zunächst mit dem Helfervirus Ad5 infiziert. Anschließend wurden diese mit dem jeweiligen rAAV-Plasmid mit entsprechendem gewünschtem Zielgen (hTGF- β , hIGF-I oder *lacZ*) sowie mit dem Hilfsplasmid Ad8 unter Anwendung der Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode co-transfiziert. Die Co-Infektion mit Ad5 bewirkt die Transkription und Translation der für die Replikation sowie für das virale *Packaging* notwendigen *rep*-Gene des Ad8-Hilfsplasmids [180]. Analog zur AAV-Replikation (Kapitel 2.9.6.3) entstehen zunächst doppelsträngige replikative Zwischenprodukte und anschließend einzelsträngige rAAV-DNS Konstrukte. Die viralen Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3, jeweils codiert durch das *cap*-Gen des Ad8-Hilfsplasmids, lagern sich zu leeren Kapsiden zusammen, die schließlich jeweils ein einzelsträngiges rAAV-Genom aufnehmen.

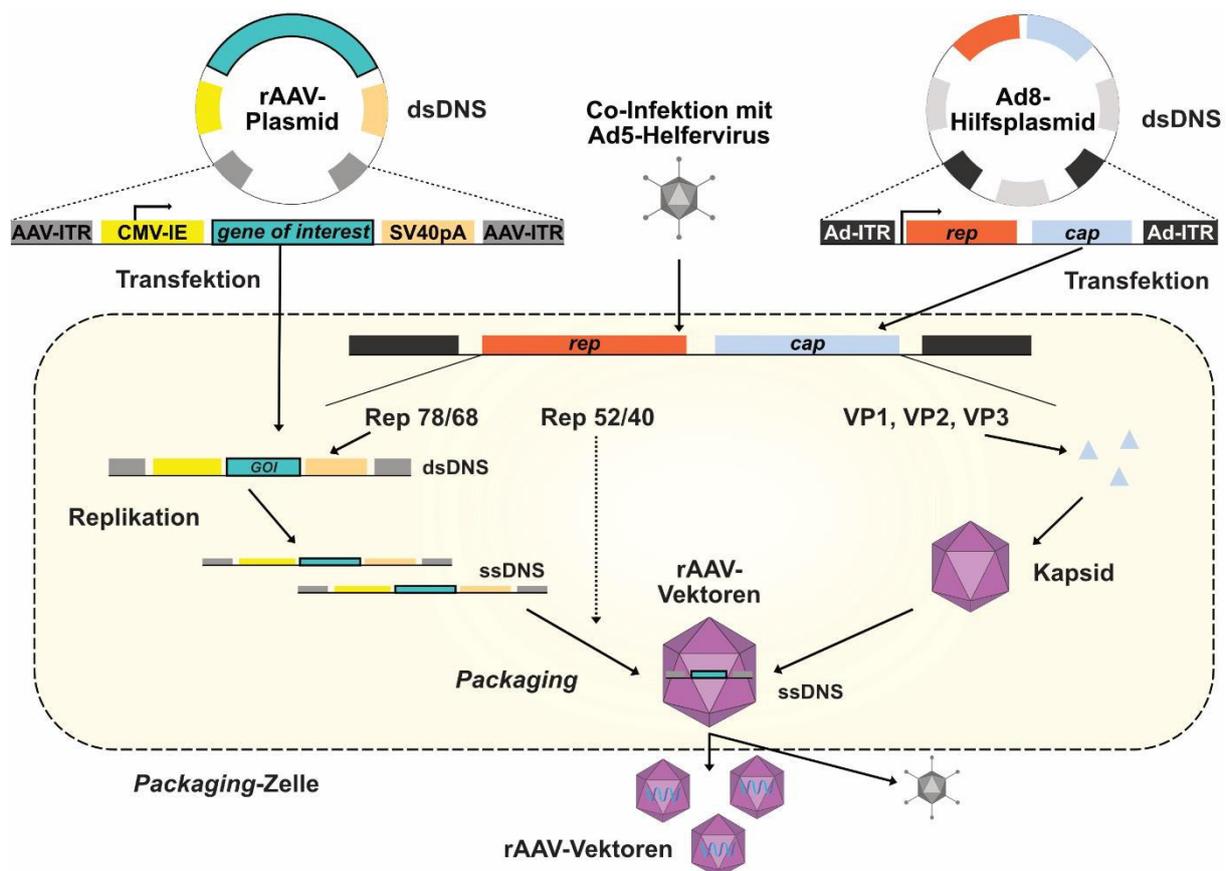


Abbildung 16. Schematische Darstellung des rekombinanten adeno-assoziierten viralen *Packings*. Ad = Adenovirus; ITR = *Inverted Terminal Repeat*; cap = Kapsid-Gen; CMV-IE = Cytomegalovirus-*Immediate Early*-Promotor; dsDNS = doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure; rAAV = rekombinantes adeno-assoziiertes Virus; rep = Replikations-Gen; Rep = Replikations-Proteine; SV40pA = Simian-Virus 40-Polyadenylierungssignal; ssDNS = einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure; VP = Virionprotein. Abbildung modifiziert nach [125].

Die rAAV-Vektoren wurden schließlich durch mechanische und thermische Stimulation freigesetzt.

6.4.1 Transfektion

Zur Herstellung der rAAV-Vektoren (*Packaging*) erfolgte im Rahmen der Transfektion das Einbringen der zuvor isolierten rAAV-Plasmide (hTGF- β , hIGF-I, *lacZ*) in *HEK-293*-Zellen gemäß nachfolgendem etablierten Standardprotokoll [67]:

Tag 1:

Zunächst erfolgte das Überführen von $1,8 \times 10^6$ *HEK-293*-Zellen unter Zugabe von 10 ml DMEM in eine Petrischale (100 mm x 20 mm) und eine anschließende Inkubation für 48 h bei 37 °C und 5% CO₂.

Tag 3:

Die Zellen sollten für das weitere Prozedere eine Konfluenz von 60-70% aufweisen, ggf. wurden die Petrischalen für weitere 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Herstellung des Vorinfektions-Ansatzes wurden pro Petrischale 4 ml serumfreies DMEM sowie 3 μ l Ad5 in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und durchmischt. Das Medium aus den Petrischalen wurde entfernt und verworfen. Im Rahmen der Vorinfektion erfolgte eine Zugabe von jeweils 4 ml des entsprechenden Vorinfektions-Ansatzes auf die Zellen und eine Inkubation für 90 min bei 37 °C und 5% CO₂. Zwischenzeitlich erfolgte die Herstellung des CaPO₄-Ansatzes sowie des Transfektions-Mediums-1. Zur Herstellung des CaPO₄-Ansatzes wurden pro Petrischale 6 μ g Ad8, 18 μ g der jeweiligen rAAV-Plasmide und 450 μ l 1/10 TE (Tris-EDTA) in ein 10 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Tröpfchenweise wurden pro Petrischale 50 μ l CaCl₂ (2,5 M) sowie unmittelbar danach 500 μ l HBS (280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 7,1) zugegeben und für mindestens 30 min (RT) inkubiert. Zur Herstellung des Transfektions-Mediums-1 wurden pro Petrischale 4,5 ml Opti-MEM, 0,5 ml FBS und 3 μ l Chlorochin (120 μ M) in eine 500 ml-Glasflasche überführt, durchmischt und im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Medium entfernt und jeder Petrischale 5 ml Transfektions-Medium-1 zugegeben. Anschließend erfolgte eine tröpfchenweise Zugabe von jeweils 1 ml des CaPO₄-Ansatzes pro Petrischale sowie eine anschließende Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂.

Tag 4:

Zur Herstellung des Transfektions-Mediums-2 wurden pro Petrischale jeweils 6 ml DMEM mit 15% FBS und 60 μ l Glutamin in eine 500 ml-Glasflasche überführt. Das Medium aus den inkubierten Petrischalen wurde entfernt. Es erfolgte eine Zugabe von jeweils 6 ml des Transfektions-Mediums-2 pro Petrischale und eine Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂.

Tag 5:

Das Medium wurde entfernt und jeder Petrischale jeweils 6 ml Sucrose 10% zugegeben. Anschließend erfolgte das Ablösen der adhärennten Zellen vom Boden der Petrischalen unter Verwendung eines Zellschabers. Nach wiederholtem Abspülen des Bodens der Petrischalen mit einer 1 ml-Pipette wurde die Zellsuspension jeder Petrischale in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1.500 U/min (RT) zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde verworfen, verbliebene Reste wurden abpipettiert. Jedem Zellaggregat wurden 150 μ l Sucrose 10% zugegeben, die Zellaggregate anschließend unter Verwendung einer Pipette mit großer Öffnung (*wide-mouth*) aufgenommen und in sterile Reaktionsgefäße überführt. Das Zellaggregat wurde in Sucrose resuspendiert und die Zellsuspension bei -20 °C gelagert.

Tag 6:

Zunächst erfolgte das Durchlaufen von 3 Frost-Tau-Zyklen. Hierzu wurden die am Vortag eingefrorenen Zellsuspensionen je Zyklus für 5 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, für 2 min im Vortex-Schüttler durchmischt und für 30 min bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min (Wasserbad, 37 °C), ein Durchmischen im Vortex-Schüttler für 2 min sowie eine Zentrifugation für 10 min bei 2.000 U/min (4 °C). Die Überstände wurden in neue sterile Reaktionsgefäße überführt, für 45 min (Wasserbad, 52 °C) inkubiert und für 10 min bei 10.000 U/min (4 °C) zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue sterile Reaktionsgefäße überführt, jedem Überstand wurden jeweils 3 μ l DNase (1 U/ μ l) zugegeben und für 60 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Vektoren wurden direkt zur Transduktion verwendet oder alternativ bei -20 °C gelagert.

6.4.2 X-Gal-Färbung

Die Überprüfung der Effizienz des viralen *Packagings* erfolgte mittels Transduktion (Kapitel 6.5) von HEK-293-Zellen mit den zuvor hergestellten rAAV-*lacZ*-Vektoren und nachfolgender X-Gal-Färbung [47] (**Abbildung 17**). Rekombinante AAV-*lacZ* Vektoren tragen das für die *Escherichia coli* β -Galaktosidase (*β -gal*) codierende Gen. Nach Transduktion von HEK-293-Zellen mit erfolgreich hergestellten rAAV-*lacZ*-Vektoren tragen diese das *lacZ*-Gen und exprimieren die *Escherichia coli* β -Galaktosidase [65; 191]. Durch Zugabe von X-Gal (5-

Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid), einem Substrat der *Escherichia coli* β -Galaktosidase, wird dieses zu 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl hydrolysiert [47]. Enzymatisch abgespaltenes Indoxyl wird unter Luftsauerstoff zum unlöslichen Indigo oxidiert. Hierdurch erfolgt durch Blaufärbung eine Visualisierung der Transduktion von *HEK-293*-Zellen mit erfolgreich hergestellten rAAV-*lacZ*-Vektoren.

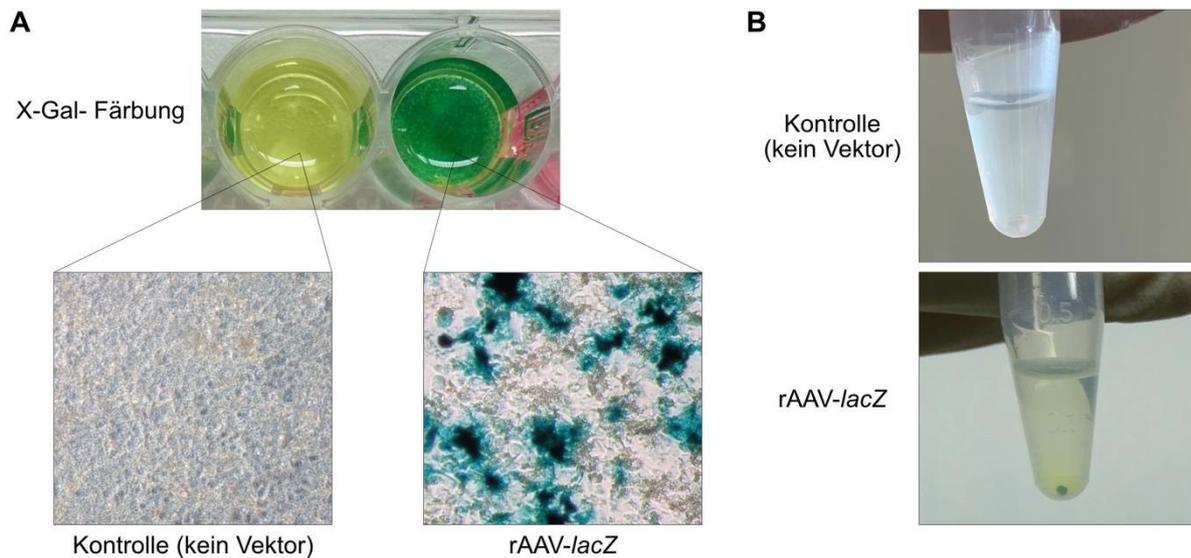


Abbildung 17. Transduktionsnachweis mittels X-Gal-Färbung. Eine sichtbare Blaufärbung indiziert eine Transduktion von *HEK 293*-Zellen mit erfolgreich hergestellten rAAV-*lacZ*-Vektoren. rAAV = rekombinantes adeno-assoziiertes Virus. **A:** *Monolayer*-Kulturen. **B:** 3D-Zellaggregatkulturen.

Die X-Gal-Färbung erfolgte in *Monolayer*- sowie in 3D-Zellaggregatkulturen gemäß nachfolgendem Standardprotokoll: Zunächst erfolgte die Herstellung der Färbelösung. Es wurde jeweils 0,5 ml Färbelösung pro *Monolayer*- bzw. Zellaggregatkultur verwendet. Hierzu wurden 1 Volumenanteil X-Gal-Lösung mit 19 Volumenanteilen *Iron Buffer* in einem Zentrifugenröhrchen durchmischt und für mindestens 10 min (RT) lichtgeschützt und rotierend inkubiert. Vor Verwendung wurde die Färbelösung steril filtriert. Anschließend wurden die mit rAAV-*lacZ* transduzierten Zellen vorbereitet. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und für 15 min (RT) in 500 μ l Formaldehyd (2%) fixiert. Nach dreimaligem Waschen der fixierten Zellen mit PBS wurden den *Monolayer*- bzw. den Zellaggregatkulturen jeweils 500 μ l Färbelösung zugegeben und diese bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Eine makroskopisch sichtbare Blaufärbung im Falle einer Transduktion mit erfolgreich hergestellten rAAV-*lacZ*-Vektoren war nach etwa 3 h nachweisbar. Alternativ kann eine Beurteilung der Effizienz des *Packagings* mittels Titer-Bestimmung aufgereinigter rAAV-Vektorpräparationen unter Anwendung von *Real-time* PCR-Analysen erfolgen [67; 321].

6.5 Transduktion

Aus humanen MSZ wurden zunächst (Tag 0) hochdichte 3D-Zellaggregate mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen/Aggregat hergestellt (Kapitel 6.2.4) und diese in 150 μ l chondrogenem Medium mit dem Ziel der Induktion einer chondrogenen Differenzierung für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend (Tag 1) erfolgte die Transduktion der humanen MSZ-Aggregate mit rAAV-Vektoren ($MOI = 8$) entsprechend der oben genannten Gruppeneinteilung (Kapitel 6.1.1). Hierzu wurden die benötigten Vektoren (rAAV-hTGF- β , -hIGF-I, -*lacZ*) auf Eis bereitgestellt. Nach Entfernen des chondrogenen Mediums wurde das humane MSZ-Aggregat durch zwei aufeinanderfolgende Waschschriffe gereinigt. Hierzu wurden den humanen MSZ-Aggregaten jeweils nacheinander 150 μ l DMEM und 150 μ l PBS zugegeben und wieder abpipettiert. Anschließend erfolgte die direkte Applikation der rAAV-Vektoren entsprechend der Gruppeneinteilung der vorliegenden Studie auf die humanen MSZ-Aggregate wie folgt:

- Gruppe 1: 40 μ l rAAV-hTGF- β und 40 μ l rAAV-hIGF-I
- Gruppe 2: 40 μ l rAAV-hTGF- β und 40 μ l rAAV-*lacZ*
- Gruppe 3: 40 μ l rAAV-hIGF-I und 40 μ l rAAV-*lacZ*
- Negativkontrolle: 80 μ l rAAV-*lacZ*

Nach einminütiger Inkubation (RT) wurden den humanen MSZ-Aggregaten 75 μ l chondrogenes Medium zugegeben. Die transduzierten humanen MSZ-Aggregate wurden für 90 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Zugabe von 75 μ l chondrogenem Medium und eine Inkubation der humanen MSZ-Aggregate für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Medium vollständig entfernt, durch 150 μ l frisches chondrogenes Medium ersetzt und die transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregate im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Dauer der Kultivierungsperiode war dabei vom jeweiligen untersuchten viralen Gentransfermodell abhängig.

6.5.1 Kultivierung des direkten viralen Gentransfermodells

Im Rahmen des direkten rekombinanten adeno-assoziierten viralen Gentransfermodells erfolgte die Herstellung der chondrogen differenzierenden und mit rAAV-Vektoren transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregate entsprechend des in Kapitel 6.5 dargestellten Prozedere. Die mit rAAV-Vektoren transduzierten humanen MSZ-Aggregate wurden im Inkubator für 21 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ bei geöffneten Deckeln der Reaktionsgefäße kultiviert (**Abbildung 14**). Hierbei handelt sich um einen etablierten Zeitraum zur Evaluation

der *in vitro*-Chondrogenese, da innerhalb dieser Kultivierungsperiode die chondrogene Differenzierung von humanen MSZ vollständig vollzogen ist [17; 110; 156; 155; 190]. Ein Wechsel des chondrogenen Mediums erfolgte alle 48 h.

6.5.2 Kultivierung des indirekten viralen Gentransfermodells

Die mit rAAV-Vektoren transduzierten humanen MSZ-Aggregate wurden im Rahmen des indirekten viralen Gentransfermodells im Inkubator für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ bei geöffneten Deckeln der Reaktionsgefäße kultiviert. Anschließend erfolgte die Implantation der humanen MSZ-Aggregate in die humanen osteochondralen Defektmodelle (Kapitel 6.6).

6.6 Herstellung humaner osteochondraler Defektmodelle

Im Rahmen des indirekten viralen Gentransfermodells erfolgte die Herstellung humaner osteochondraler Defektmodelle (**Abbildung 18**). Hierzu wurden aus humanen osteochondralen Explantaten (Femurkondylen) mittels einer Stanze (Durchmesser: 6 mm) standardisierte zylindrische osteochondrale Modelle *ex vivo* hergestellt (**Abbildung 18, A und B**). Mithilfe einer weiteren Stanze (Durchmesser: 1 mm) wurde je zylindrisch ausgestanztem osteochondralen Explantat ein standardisierter zirkulärer osteochondraler Defekt mit einem Durchmesser von 1 mm erzeugt (**Abbildung 18, C**). Die Tiefe des Defekts war von der Dicke des Knorpels abhängig. Jeder gesetzte Defekt reichte bis in den subchondralen Knochen und wies einen zum Knorpel bzw. subchondralen Knochen senkrecht verlaufenden Stanzkanal auf. Der Stanzkanal wurde von Resten des Knorpels und des subchondralen Knochens befreit. Anschließend erfolgte die Implantation der am Vortag mittels rAAV-Vektoren transduzierten humanen MSZ-Aggregate (**Abbildung 18, D**) in die humanen osteochondralen Defektmodelle. In jedes humane osteochondrale Defektmodell wurde ein transduziertes humanes MSZ-Aggregat implantiert. Hierzu wurde das jeweilige humane MSZ-Aggregat mittels einer Pipette mit großer Öffnung (*wide-mouth*) aufgenommen und in eine Petrischale überführt. Das humane MSZ-Aggregat wurde mit einem Skalpell aufgenommen (**Abbildung 18, E**) und mithilfe einer sterilen Pipettenspitze ohne die Verwendung ergänzender Biomaterialien in den osteochondralen Defekt eingesetzt (**Abbildung 18, F**). Das implantierte transduzierte humane MSZ-Aggregat füllte den osteochondralen Defekt nahezu vollständig aus (**Abbildung 18, G und H**). Die humanen osteochondralen Defektmodelle wurden in eine *Multiwell*-Platte überführt (**Abbildung 18, I**). Jedem osteochondralen Defektmodell wurden 600 µl chondrogenes Medium zugegeben.

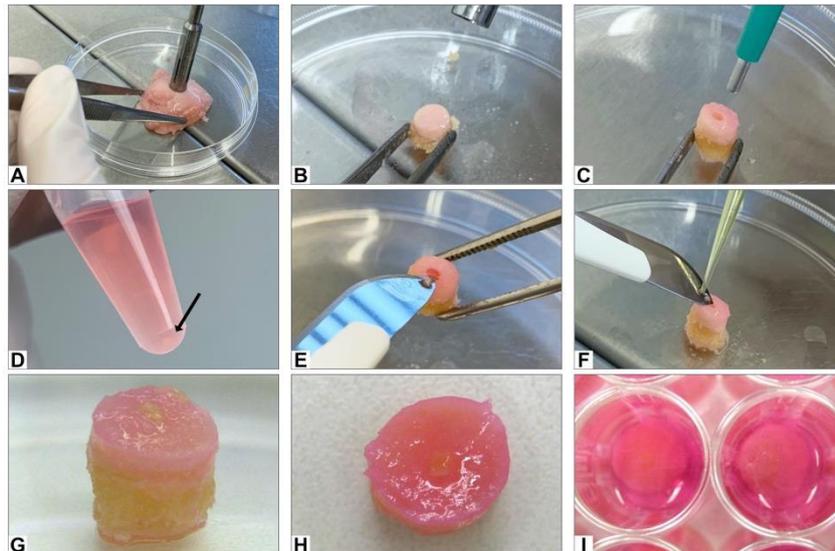


Abbildung 18. Herstellung humaner osteochondraler Defektmodelle. **A:** Herstellung standardisierter osteochondraler Modelle aus humanen osteochondralen Explantaten (Femurkondylen) mittels Stanze. **B:** Zylindrisches osteochondrales Modell. **C:** Erzeugung eines standardisierten osteochondralen Defektes. **D:** Transduziertes humanes MSZ-Aggregat kultiviert in chondrogenem Medium im Reaktionsgefäß. **E** und **F:** Implantation des transduzierten humanen MSZ-Aggregats in den etablierten osteochondralen Defekt. **G** und **H:** Humanes osteochondrales Defektmodell mit implantiertem transduzierten humanen MSZ-Aggregat. **I:** Kultivierung der indirekt transduzierten humanen osteochondralen Defektmodelle in chondrogenem Medium in einer *Multiwell*-Platte.

Die humanen osteochondralen Defektmodelle wurden anschließend analog zu den humanen 3D-MSZ-Aggregaten für 21 Tage im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Ein Wechsel des chondrogenen Mediums erfolgte alle 48 h.

6.7 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Der Nachweis sowie die quantitative Evaluation der erfolgreichen Transgenexpression erfolgte über die Bestimmung der Sekretionsspiegel der therapeutischen Proteine hTGF- β und hIGF-I mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* unter Verwendung entsprechender Analyse-Sets (*R&D Systems*) [67]. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion im Rahmen einer spezifischen immunologischen Reaktion [13]. Hierzu ist ein gegen das jeweilige nachzuweisende Antigen (hTGF- β bzw. hIGF-I) gerichteter, gentechnisch hergestellter Antikörper auf einer Mikrotiterplatte gebunden. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe binden die darin enthaltenen Antigene spezifisch an die gegen sie gerichteten Antikörper. Anschließend erfolgt die Zugabe eines zweiten Antikörpers. Dieser bindet ebenfalls an das nachzuweisende Antigen, jedoch an einer anderen Stelle. Zudem ist der zweite Antikörper an ein Enzym gekoppelt. Bei den verwendeten Analyse-Sets (*R&D Systems*) handelt es sich dabei um das Enzym Meerrettichperoxidase (*HRP, Horseradish Peroxidase*). Nach Zugabe des geeigneten chromogenen Substrates Tetramethylbenzidin

(TMB) bildet sich ein farbiges Reaktionsprodukt. Die Enzymaktivität ist photometrisch messbar. Sie ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Antigens. Somit lässt sich unter Zuhilfenahme der Kalibrierungskurve die Konzentration des gebundenen Antigens berechnen (entsprechend den Herstellerangaben von R&D Systems).

Die quantitative Überprüfung der Sekretion der therapeutischen Proteine hTGF- β und hIGF-I durch die transduzierten Proben erfolgte im Rahmen des direkten viralen Gentransfermodells zu vier festgesetzten Zeitpunkten an Tag 2, 7, 14 und 21 nach erfolgter Transduktion mit rAAV-Vektoren. Im Rahmen des indirekten viralen Gentransfermodells fand ein quantitativer Nachweis der Transgenexpression über die Ermittlung der Sekretion der therapeutischen Proteine hTGF- β und hIGF-I nach Beendigung der Kultivierungsperiode an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mit rAAV-Vektoren statt. Hierzu wurde jeweils 24 h vor Überprüfung der Sekretionsspiegel der therapeutischen Proteine das chondrogene Medium der Kultursysteme durch serumfreies DMEM ersetzt (humanes MSZ-Aggregat: 150 μ l; humanes osteochondrales Defektmodell: 600 μ l). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden diese Überstände entnommen und in sterile Reaktionsgefäße überführt. Anschließend erfolgte die quantitative Analyse mittels *ELISA*.

6.7.1 Durchführung des hTGF- β -*ELISA*

Die Ermittlung der Sekretionsspiegel von hTGF- β erfolgte unter Verwendung des *Quantikine ELISA Human TGF- β 1-Kits (R&D Systems)* sowie nach dessen Instruktionen. Zunächst wurden die benötigten Reagenzien und die Verdünnungsreihe gemäß Herstellerangaben vorbereitet. Alle Lösungen und Puffer wurden auf RT vorgewärmt.

- *Wash Buffer*: 500 ml als 1:4 Verdünnung mit destilliertem Wasser
- *Calibrator Diluent RD5-53*: 80 ml als 1:4 Verdünnung mit destilliertem Wasser
- hTGF- β 1-Standard (2.000 pg/ml): Pulver in 2 ml *Calibrator Diluent RD5-53* auflösen; vor Ansetzen der Verdünnungsreihe mindestens 5 min (RT) inkubieren und gründlich durchmischen
- Serielle Verdünnungsreihe: Unverdünntes hTGF- β 1-Standard stellte dabei die zu verdünnende Ausgangskonzentration dar. *Calibrator Diluent RD5-53* diene als Nullstandard und Kontrolle. Die Verdünnung erfolge mit *Calibrator Diluent RD5-53* (**Abbildung 19**).

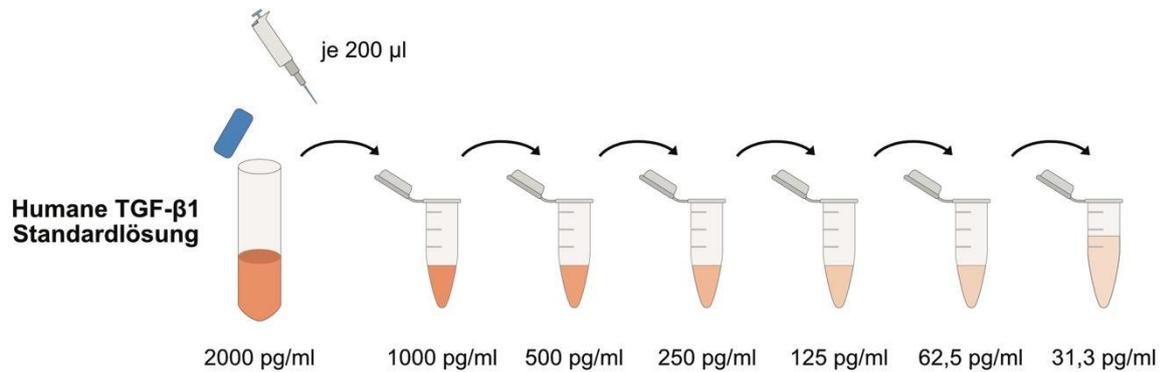


Abbildung 19. Serielle Verdünnungsreihe zur Durchführung des hTGF- β 1-*ELISA*. TGF- β 1 = transformierender Wachstumsfaktor beta 1. Abbildung modifiziert nach den Herstellerinformationen von R&D Systems *Quantikine ELISA* hTGF- β 1.

Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Proben zur Aktivierung des nachzuweisenden Antigens hTGF- β . Hierzu wurden die Proben zunächst für 2 min bei 2.000 U/min zentrifugiert, sodass sich eventuell in der Probe befindliche Zellen am Boden absetzten. Anschließend wurden 100 μ l jeder Probe in neue Reaktionsgefäße überführt. Dabei wurde auf eine geringe Eintauchtiefe der Pipettenspitze geachtet werden, um keine am Boden befindlichen Zellen mit in die zu untersuchende Probe aufzunehmen, welche den optimalen Ablauf des *ELISA* hätten beeinträchtigen können. Jeder Probe wurden 20 μ l 1 N HCl zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sorgfältig durchmischt. Nach einer Inkubation von 10 min (RT) wurde die angesäuerte Probe durch Zugabe von 20 μ l 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES neutralisiert. Die aktivierten Proben wurden unmittelbar mittels *ELISA* gemäß nachfolgendem Prozedere untersucht: Jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 μ l *Assay Diluent RD1-21* zugegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 50 μ l Standard, Kontrolle oder aktivierter Probe sowie eine Inkubation für 2 h (RT). Nach viermaligem Waschen jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte mit *Wash Buffer* unter Verwendung einer Mehrkanalpipette wurde jede Vertiefung mit 100 μ l *TGF- β 1 Conjugate* beladen und erneut für 2 h (RT) inkubiert. 15 min vor Beendigung der Inkubation wurde die Substratlösung durch Vermischen von *Color Reagent A* und *B* im gleichen Volumenverhältnis in einem mit Aluminiumfolie umwickelten Zentrifugenröhrchen lichtgeschützt vorbereitet. Anschließend erfolgte nach erneutem viermaligem Waschen der Mikrotiterplatte eine Induktion der Peroxidasereaktion durch Zugabe von 100 μ l Substratlösung im abgedunkelten Raum. Nach einer Inkubation von 30 min (RT) und unter lichtgeschützten Bedingungen wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung beendet. Unmittelbar danach wurde die optische Dichte jeder Vertiefung bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels *GENios*-Mikroplattenleser gemessen.

6.7.2 Durchführung des hIGF-I-ELISA

Die Ermittlung der Sekretionsspiegel von hIGF-I erfolgte unter Verwendung des *Quantikine ELISA Human IGF-I-Kits* (R&D Systems) sowie nach dessen Instruktionen. Zunächst wurden die benötigten Reagenzien und die Verdünnungsreihe gemäß Herstellerangaben vorbereitet. Alle Lösungen und Puffer wurden auf RT vorgewärmt.

- *Wash Buffer*: 500 ml als 1:4 Verdünnung mit destilliertem Wasser
- *Human IGF-I Standard* (60 ng/ml): Pulver in 1 ml destilliertem Wasser auflösen; vor Ansetzen der Verdünnungsreihe mindestens 15 min (RT) inkubieren und vermischen
- Serielle Verdünnungsreihe: *Human IGF-I-Standard* stellte dabei die zu verdünnende Ausgangskonzentration dar. *Calibrator Diluent RD5-22* diente als Nullstandard und Kontrolle. Die Verdünnung erfolgte mittels *Calibrator Diluent RD5-22* (**Abbildung 20**).

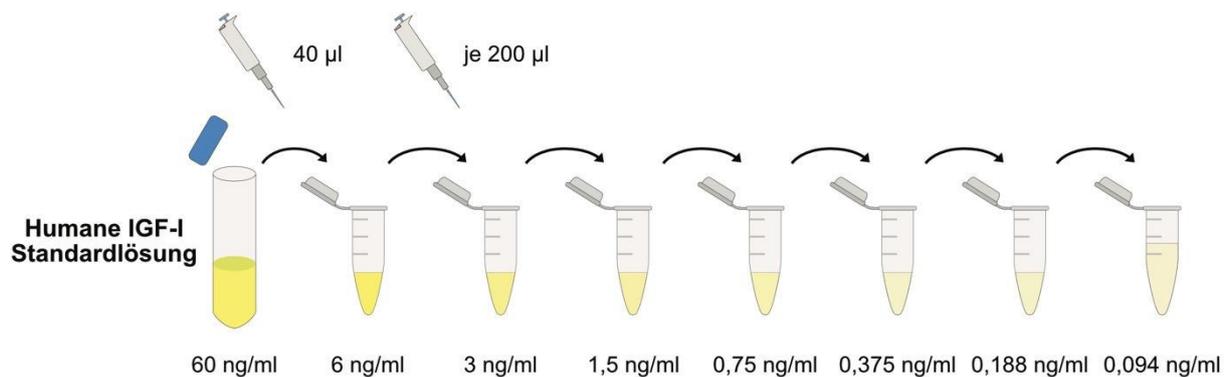


Abbildung 20. Serielle Verdünnungsreihe zur Durchführung des hIGF-I-ELISA. IGF-I = insulinartiger Wachstumsfaktor I. Abbildung modifiziert nach den Herstellerinformationen von R&D Systems *Quantikine ELISA* hIGF-I.

Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Proben, indem diese für 2 min bei 2.000 U/min zentrifugiert wurden und anschließend 100 µl jeder Probe in neue Reaktionsgefäße überführt wurden. Diese wurden schließlich mittels *ELISA* gemäß folgendem Prozedere untersucht: Jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 µl *Assay Diluent RD1-53* zugegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe und eine Inkubation für 2 h bei 4 °C. Nach viermaligem Waschen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit *Wash Buffer* wurde jede Vertiefung mit 200 µl kaltem (4 °C) *Human IGF-I Conjugate* beladen und für 1 h bei 4 °C inkubiert. 15 min vor Beendigung der Inkubation wurde Substratlösung durch Vermischen von *Color Reagent A* und *B* im gleichen Volumenverhältnis lichtgeschützt vorbereitet. Anschließend erfolgte nach erneutem viermaligem Waschen der Mikrotiterplatte eine Induktion der Peroxidase-reaktion durch Zugabe von 200 µl Substratlösung im abgedunkelten

Raum. Nach lichtgeschützter Inkubation von 30 min (RT) wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 μ l Stopplösung beendet. Unmittelbar danach wurde die optische Dichte jeder Vertiefung bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels *GENios*-Mikroplattenleser gemessen.

6.8 Biochemische Analysen

Sowohl die humanen 3D-MSZ-Aggregate als auch die humanen osteochondralen Defektmodelle wurden nach Beenden der Kultivierungsperiode von 21 Tagen biochemischen Analysen unterzogen. Es erfolgte ein Dimethylmethylenblau-Test (DMMB-Test) zur Erfassung des Proteoglykangehalts, ein Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test) zur Erfassung des Gesamtproteingehalts sowie ein DNS-Test mittels Hoechst 33258 zur Erfassung des DNS-Gehalts [67; 108; 109; 255; 321].

6.8.1 Papain-Verdau

Für die Durchführung der biochemischen Analysen wurden die Proben zunächst einem Papain-Verdau unterzogen, um die zu erfassenden Strukturen in Lösung zu bringen [67; 255; 252; 321]. Hier unterschied sich das Vorgehen für die humanen 3D-MSZ-Aggregate von demjenigen für die osteochondralen Defektmodelle.

6.8.1.1 Humane 3D-MSZ-Aggregate

Die Papain-Stammlösung (25 mg/ml) wurde mit PBS-Puffer (pH 6,5) auf 125 μ g/ml verdünnt. Jeder Probe wurden 150 μ l verdünnte Papain-Lösung zugegeben. Die Ansätze wurden mittels Vortex-Schüttler 1 min durchmischt und anschließend für 1 h bei 65 °C im Wärmeschrank inkubiert. Währenddessen wurden die Proben alle 20 min für jeweils 1 min mittels Vortex-Schüttler durchmischt. Das Zellaggregat wurde vollständig aufgelöst. Die Lösung wurde für die folgenden biochemischen Analysen verwendet.

6.8.1.2 Humane osteochondrale Defektmodelle

Die Papain-Stammlösung (25 mg/ml) wurde mit PBS-Puffer (pH 6,5) auf 500 μ g/ml verdünnt. Die humanen osteochondralen Defektmodelle wurden in einer Petrischale mittels einer Skalpellklinge zerkleinert und in Reaktionsgefäße überführt. Jeder Probe wurden 300 μ l verdünnte Papain-Lösung zugegeben. Die Ansätze wurden mittels Vortex-Schüttler 5 min durchmischt und anschließend für 72 h bei 65 °C im Wärmeschrank inkubiert. Währenddessen

wurden die Proben mehrmals für einige Minuten mittels Vortex-Schüttler durchmischt. Der Überstand wurde für die folgenden biochemischen Analysen verwendet.

6.8.2 Proteoglykan-Bestimmung mittels DMMB-Test

Der DMMB-Test (Dimethylmethylenblau-Test) wurde zur quantitativen Erfassung des extrazellulären Proteoglykangehalts der jeweiligen Kultursysteme gemäß Standardprotokoll durchgeführt [67; 255; 321]. Eine gleichzeitige Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels des BCA-Tests (Kapitel 6.8.3) ermöglichte eine noch präzisere Evaluation des Proteoglykangehalts eines Kultursystems, indem der Anteil von Proteoglykanen am Gesamtproteingehalt erfasst wurde. DMMB bindet Proteoglykane und Chondroitinsulfat bei ebenfalls vergleichbarer photometrischer Detektion [102]. Basierend auf dieser Tatsache wurde eine Standardreihe A-F mit bekannten Konzentrationen an Chondroitinsulfat in Doppelbestimmung angelegt (**Tabelle 9**). Hierzu wurden zunächst die drei benötigten Lösungen A, B und C vorbereitet. Zur Herstellung von Lösung A wurden 0,05 g D-Cysteinhydrochloridmonohydrat eingewogen und in 30 ml PBE-Puffer mittels Vortex-Schüttler aufgelöst. Für Lösung B wurden 0,053 g Chondroitin-6-Sulfat-Natriumsalz in 1 ml Lösung A mittels Vortex-Schüttler aufgelöst. Lösung C wurde für das Anlegen der Standardreihe verwendet und bestand aus 24,95 ml Lösung A und 0,05 ml Lösung B. In einer transparenten Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde zunächst die Standardreihe angelegt. Von den papainverdauten Proben wurden jeweils 20 μl pro Vertiefung vorgelegt und anschließend 20 μl Lösung A hinzugefügt. Jeder Vertiefung (Standard und Probe) wurden 250 μl DMMB-Lösung appliziert. Unmittelbar daran anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 530 nm mittels *GENios*-Mikroplattenleser. Auf Grundlage der Standardreihe wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt und anhand derer die Konzentration des Proteoglykangehalts jeder untersuchten Probe berechnet.

Tabelle 9. Schema zur Herstellung der Standardkurve für den DMMB-Test.

Standard	Lösung A [μl]	Lösung C [μl]	Chondroitinsulfat-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
A	0	40	100
B	10	30	80
C	20	20	60
D	30	10	40
E	35	5	20
F	40	0	0

6.8.3 Gesamtprotein-Bestimmung mittels BCA-Test

Der BCA-Test (Bicinchoninsäure-Tests) wurde zur quantitativen Erfassung des Gesamtproteingehalts der jeweiligen viralen Gentransfersysteme durchgeführt [251]. Die Durchführung dieses Tests erfolgte unter Verwendung des *Pierce™ BCA Protein Assay-Kits* (Thermo Fisher Scientific) sowie nach dessen Instruktionen. Der BCA-Test basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Komplexbildung mit Proteinen in alkalischem Milieu; die Konzentration des Gesamtproteins ist dabei direkt proportional zur Menge des reduzierten Kupfers [141]. Zunächst wurde das benötigte *Working Reagent* aus einer 50:1-Mischung aus *BCA Reagent A* und *B* hergestellt. In einer transparenten Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde eine Standardreihe bekannter BCA-Konzentrationen in Doppelbestimmung angelegt (**Tabelle 10**). Von den papainverdauten Proben wurden jeweils 5 μl pro Vertiefung vorgelegt und 20 μl destilliertes Wasser hinzugefügt. Anschließend wurden 200 μl *Working Reagent* appliziert. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C und 5% CO_2 erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 530 nm mittels *GENios*-Mikroplattenleser. Auf Grundlage der Standardreihe wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt und anhand derer die Konzentration des Gesamtproteingehalts jeder untersuchten Probe berechnet.

Tabelle 10. Schema zur Herstellung der Standardkurve für den BCA-Test.

Standard	H ₂ O [μl]	BSA [μl]	BSA-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
A	0	75,0 (Stammlösung)	2.000
B	31,3	93,8 (Stammlösung)	1.500
C	81,3	81,3 (Stammlösung)	1.000
D	43,8	43,8 (von B)	750
E	81,3	81,3 (von C)	500
F	81,3	81,3 (von E)	250
G	81,3	81,3 (von F)	125
H	100	25,0 (von G)	25
I	100	0	0

6.8.4 DNS-Bestimmung mittels Hoechst 33258-Test

Der DNS-Test (Hoechst 33258-Test) wurde zur quantitativen Bestimmung des DNS-Gehalts der jeweiligen viralen Gentransfersysteme durchgeführt [67; 321]. Der DNS-Test basiert auf einer Fluoreszenzmessung zur Detektion von doppelsträngiger DNS. Der Bisbenzimidazol-Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 interkaliert in die DNS. In einer schwarzen Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde eine Standardreihe bekannter DNS-

Konzentrationen in Doppelbestimmung angelegt (**Tabelle 11**). Entsprechende Verdünnungen wurden mit einer kommerziell erwerblichen Standard-DNS (10 µg/ml) und TNE-Puffer (pH 7,4) hergestellt. Von den papainverdauten Proben wurden jeweils 10 µl pro Vertiefung vorgelegt und anschließend 90 µl TNE-Puffer hinzugefügt. Hoechst 33258-Stammlösung (1 mg/ml H₂O) wurde in einem Zentrifugenröhrchen lichtgeschützt im Verhältnis 1:500 mit TNE-Puffer verdünnt. Jeder Vertiefung (Standard und Probe) wurden im abgedunkelten Raum 100 µl Hoechst 33258 appliziert. Hierbei handelt es sich um eine zeitabhängige Reaktion. Anschließend erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm die Detektion der Emissionen einer Wellenlänge von 450 nm. Auf Grundlage der Standardreihe wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt und anhand derer die Konzentration des DNS-Gehalts jeder untersuchten Probe berechnet.

Tabelle 11. Schema zur Herstellung der Standardkurve für den Hoechst 33258-Test.

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

6.9 Histologische und immunhistochemische Analysen

6.9.1 Aufarbeitung der humanen 3D-MSZ-Aggregate

Nach Beendigung der Kultivierungsperiode von 21 Tagen wurden die humanen MSZ-Aggregate gemäß nachfolgendem Standardprotokoll für die Durchführung histologischer und immunhistochemischer Untersuchungen vorbereitet [108; 109; 301]: Diese wurden zunächst mit 500 µl PBS gewaschen, in 500 µl Formalinlösung (4%) für 1 h (RT) fixiert und zwei Mal mit jeweils 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die humanen MSZ-Aggregate in einer Alkoholreihe mit aufsteigenden Ethanolverdünnungen entwässert (70%, 80%, 2 x 95%, 2 x 100%; jeweils 1 h), zwei Mal für jeweils 30 min in Xylol gegeben und für 1 h in einem 1:1-Gemisch aus Xylol und Paraffin bei 62 °C inkubiert. Es folgte eine Inkubation über 24 h bei 62 °C in reinem Paraffin. Die für 24 h in reinem Paraffin inkubierten Proben wurden am Folgetag nacheinander in mit flüssigem Paraffin gefüllten Metallkassetten eingebettet und für 1 h zum Abkühlen und Aushärten auf einer Eisplatte gelagert. Die eingebetteten Proben wurden bis zum Schneiden bei -20 °C aufbewahrt. Dies führte zu einer festeren Aushärtung

des Paraffins und sorgte für ein qualitativ besseres Ergebnis der angefertigten Schnitte mittels Rotationsmikrotom. Es wurden von allen Proben Schnitte mit einer Dicke von 3 μm hergestellt. Diese wurden mit einem Pinsel vom Messer abgenommen, unmittelbar danach in ein warmes Wasserbad (24 °C) überführt und anschließend ebenmäßig auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden zur Aushärtung zunächst für 1 h auf einer Wärmeplatte bei 42 °C und anschließend für 24 h im Wärmeschrank bei 62 °C gelagert. Zur histologischen Auswertung wurden die Schnitte aus der Mitte der humanen MSZ-Aggregat-Proben verwendet.

6.9.2 Aufarbeitung der humanen osteochondralen Defektmodelle

Nach Beendigung der Kultivierungsperiode von 21 Tagen wurden die humanen osteochondralen Defektmodelle zunächst analog zu den humanen MSZ-Aggregaten mit 500 μl PBS gewaschen, in 500 μl Formalinlösung (4%) für 1 h (RT) fixiert und zwei Mal mit jeweils 500 μl PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe einer Entkalkungs-Lösung aus Natriumcitrat, Ameisensäure und Wasser für insgesamt zwei Wochen entkalkt. Die Entkalkungs-Lösung wurde nach einer Woche gewechselt und es wurde stets darauf geachtet, dass die humanen osteochondralen Defektmodelle zu jeder Zeit vollständig mit Entkalkungslösung bedeckt waren. Um beim Schneiden der Proben eine streng in der Frontalebene verlaufende Schnittführung zu gewährleisten, wurden die zylindrischen osteochondralen Defektmodelle nach erfolgter Entkalkung in einem Abstand von 1 mm zum osteochondralen Defekt streng parallel zum senkrecht verlaufenden Defektkanal mittels einer Skalpellklinge geschnitten (**Abbildung 21**). Anschließend wurden die humanen osteochondralen Defektmodelle analog zum Vorgehen im Rahmen der Aufarbeitung der humanen 3D-MSZ-Aggregate (Kapitel 6.9.1) einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt, in Xylol sowie in ein Gemisch aus Xylol und Paraffin gegeben und für 24 h bei 62 °C in reinem Paraffin inkubiert [255].

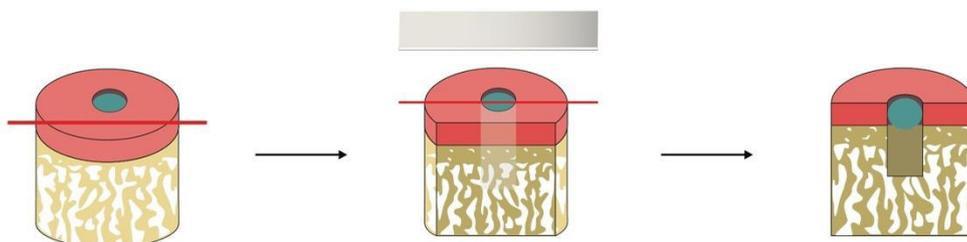


Abbildung 21. Aufarbeitung humaner osteochondraler Defektmodelle für histologische und immunhistochemische Analysen. Die humanen osteochondralen Defektmodelle wurden in einem Abstand von 1 mm zum osteochondralen Defekt mit einer Klinge parallel zum senkrecht verlaufenden Defektkanal geschnitten. Anschließend wurden die Explantate mit implantiertem rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregat mit der Schnittfläche nach unten in die Metallkassette gesetzt und in Paraffin eingebettet. Dies gewährleistete beim Schneiden der Proben eine streng in der Frontalebene verlaufende und zum Defektkanal parallele Schnittführung.

Das Einbetten und Schneiden der humanen osteochondralen Defektmodelle erfolgte ebenfalls analog zum Vorgehen im Rahmen der Aufarbeitung der humanen MSZ-Aggregate (Kapitel 6.9.1). Es wurde beim Einbetten der Proben jedoch strikt darauf geachtet, diese mit der Schnittfläche nach unten in die mit flüssigem Paraffin befüllten Metallkassetten zu platzieren. Dies gewährleistete die streng in der Frontalebene verlaufende und zum Defektkanal parallele Schnittführung der osteochondralen Defektmodelle. Hierdurch wurde eine vollständige Darstellung des osteochondralen Defekts und des perifokalen Knorpelgewebes in den histologischen Schnitten sichergestellt. Es wurden von allen Proben Schnitte mit einer Dicke von 10 µm hergestellt. Zur histologischen Auswertung wurden die Schnitte aus der Mitte der osteochondralen Defektmodell-Proben verwendet.

6.9.3 Histologische Färbungen

6.9.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung wurde zur Darstellung und histologischen Bestimmung der Zelldichte in den humanen MSZ-Aggregaten sowie in den humanen osteochondralen Defektmodellen nach etabliertem Standardprotokoll durchgeführt [67; 321]. Hämatoxylin ist ein regressiver, natürlich vorkommender Farbstoff, der nach Oxidation zu Hämatein mit Aluminium-Ionen positiv geladene Komplexe bildet und als Hämalan im sauren Milieu basophile Strukturen (z. B. DNS des Zellkernchromatins) blau färbt [56]. Eosin ist ein synthetischer, negativ geladener Farbstoff, der in der Gegenfärbung azidophile Strukturen (z. B. Proteine des Zytoplasmas, Kollagene) rot färbt [56]. Zunächst wurden die histologischen Schnitte zum Entparaffinieren zwei Mal für jeweils 5 min in Xylol gegeben und zur Rehydrierung einer Alkoholreihe mit absteigenden Ethanol-Verdünnungen zugeführt (2 x 100%, 2 x 95%, 80%, jeweils 2,5 min). Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser gewaschen, für 10 min in Hämatoxylin-Lösung nach Harris gefärbt und die überschüssige Färbelösung durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser entfernt. Nach Differenzierung durch kurzes Eintauchen in HCl-Lösung (2%, für 2 s) wurden die Schnitte in 60 °C warmem Leitungswasser gebläut, erneut mit Hämatoxylin-Lösung nach Harris für 2,5 min gefärbt und drei Mal mit Leitungswasser gewaschen. Die Schnitte wurden zur Gegenfärbung für 1,5 min einer Eosin-Lösung zugeführt, mit Leitungswasser gewaschen und zur Fixierung und Entwässerung einer Alkoholreihe mit aufsteigenden Ethanol-Verdünnungen (2 x 80%, 2 x 95%, 2 x 100%, jeweils 2,5 min) zugeführt sowie in Xylol gebadet. Anschließend wurden die gefärbten Proben auf den Objektträgern unter Verwendung eines Einschlussmittels unter einem Deckglas eingedeckt und diese über Nacht ausgetrocknet.

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX45) bei 10- und 20-facher Vergrößerung beurteilt. Hierzu erfolgte mittels Zellzählung die Angabe der Zelldichte (Zellen/mm²).

6.9.3.2 Toluidinblau-Färbung

Die Toluidinblau-Färbung wurde zur Detektion der durch die humanen MSZ-Aggregate produzierten Proteoglykane durchgeführt [67; 321]. Toluidinblau ist ein basischer Thiazin-Farbstoff, der sich an die negativ geladenen Proteoglykane anlagert und diese blau anfärbt [25]. Zunächst wurden die histologischen Schnitte, wie in Kapitel 6.9.3.1 beschrieben, entparaffiniert und rehydriert, anschließend unter Zugabe von 500 µl Toluidinblau-Lösung für 20 min unter Inkubation in einer Nasskammer (RT) entsprechend etabliertem Standardprotokoll gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden nach dreimaligem Waschen in Leitungswasser analog zum dem in Kapitel 6.9.3.1 beschriebenen Prozedere fixiert, dehydriert und unter Deckgläsern eingedeckt, jedoch wurden die einzelnen Verdünnungen der aufsteigenden Ethanolreihe jeweils nur für 1 min durchlaufen.

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX45) bei 10- und 20-facher Vergrößerung beurteilt. Hierzu erfolgte unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern (Kapitel 6.9.5) eine semiquantitative Analyse der Blaufärbung in Bezug auf Intensität und Gleichmäßigkeit.

6.9.3.3 Safranin-O-Färbung

Die Safranin-O (Orange)-Färbung wurde zur Darstellung des Knorpels sowie des entkalkten subchondralen Knochens durchgeführt und diente der Detektion der durch die osteochondralen Defektmodelle produzierten Proteoglykane [256]. Subchondraler Knochen, Zytoplasma und Kollagen wurden mittels Echtgrün-Lösung grün gefärbt. Zellkerne wurden mittels Hämatoxylin nach Weigert dunkel dargestellt. Durch Gegenfärbung mittels Safranin-O, einem basischen Azin-Farbstoff, der sich an negativ geladene Proteoglykane anlagert, wurden diese rot angefärbt; die Intensität der Rotfärbung verhält sich dabei direkt proportional zum jeweiligen Proteoglykangehalt [48] und wurde somit als semiquantitative Methode zur Evaluation des Proteoglykangehalts der osteochondralen Defektmodelle angewandt. Zunächst wurden die histologischen Schnitte, wie in Kapitel 6.9.3.1 beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser gewaschen, für 10 min in Hämatoxylin-Lösung nach Weigert gefärbt und die überschüssige Färbelösung durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser entfernt. Nach Färbung der Schnitte für 4 min in Echtgrün-Lösung und

dreimaligem kurzen Eintauchen in Essigsäure erfolgte eine Gegenfärbung mit Safranin-O-Lösung für 12 min. Überschüssige Färbelösung wurde durch Waschen mit Leitungswasser entfernt und die gefärbten Proben, wie in Kapitel 6.9.3.1 beschrieben, fixiert, entwässert und unter Deckgläsern eingedeckt.

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX45) bei 10- und 20-facher Vergrößerung beurteilt. Hierzu erfolgte unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern (Kapitel 6.9.5) eine semiquantitative Analyse der Rotfärbung in Bezug auf Intensität und Gleichmäßigkeit.

6.9.3.4 Alizarin-Rot-Färbung

Die Alizarin-Rot-Färbung wurde zur Detektion des durch die humanen MSZ-Aggregate produzierten Calciumphosphats durchgeführt [67; 321]. Dieses wird im Rahmen hypertropher Differenzierungsprozesse gebildet und resultiert in einer zunehmenden Mineralisierung der EZM [121]. Zunächst wurden die histologischen Schnitte, wie in Kapitel 6.9.3.1 beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Nach Waschen der Schnitte in Leitungswasser wurden diese für 2 min mit Alizarin-Rot-Lösung gefärbt, für 10 s in destilliertem Wasser gewaschen und für 15 s in Ethanol und HCl differenziert. Zur Fixierung und Entwässerung wurden die Schnitte zwei Mal für jeweils 2,5 min in 100% Ethanol sowie zwei Mal für jeweils 5 min in Xylol überführt und anschließend unter Deckgläsern eingedeckt, wie in Kapitel 6.9.3.1 beschrieben.

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX45) bei 10- und 20-facher Vergrößerung beurteilt. Hierzu erfolgte unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern (Kapitel 6.9.5) eine semiquantitative Analyse der Rotfärbung in Bezug auf Intensität und Gleichmäßigkeit.

6.9.4 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Untersuchungen wurden zur Detektion folgender von den jeweiligen viralen Gentransfermodellen produzierten Antigene durchgeführt: hTGF- β , hIGF-I sowie Kollagen Typ-I, -II und -X. Diese dienten der Untersuchung der Transgenexpression (hTGF- β und hIGF-I) sowie der Evaluation chondrogener (Typ-II-Kollagen), osteogener (Typ-I-Kollagen) und hypertropher (Typ-X-Kollagen) Differenzierungsprozesse in den jeweiligen viralen Gentransfermodellen [67]. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion im Rahmen einer spezifischen immunologischen Reaktion unter Anwendung der Biotin-Avidin-Methode [36; 67; 255; 321]. Zunächst bindet ein primärer

Antikörper spezifisch an das jeweilige korrespondierende und nachzuweisende Antigen [36]. Ein biotinylierter sekundärer Antikörper bindet an den primären Antikörper [36]. Das Glykoprotein Avidin, welches mit einer Peroxidase gekoppelt ist, bindet mit hoher Affinität an das Biotin des sekundären Antikörpers [36]. Die Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) führt zur Oxidation der an Avidin gekoppelten Peroxidase und resultiert schließlich in einer Braunfärbung [36]. Die Intensität der Braunfärbung reflektiert den Gehalt der jeweiligen untersuchten Antigene [67; 255]. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten gemäß nachfolgendem Protokoll sowie unter Anwendung des Vectastain ABC-Peroxidase-Kits und des DAB-Substrat-Kits für Peroxidase (Vector Laboratories):

Zunächst wurden die Schnitte, wie in Kapitel 6.9.3.1 beschrieben, entparaffiniert, rehydriert und mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min (RT) in einer Wasserstoff-Peroxid-Verdünnung (0,3%) inkubiert, zwei Mal in PBS für jeweils 5 min gewaschen und zur Andauung für 10 min in Trypsin-Lösung (0,1%) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte für 30 min in Blockierungspuffer (200 ml PBS und 6 ml BSA, 7,5%) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in eine Nasskammer überführt und der jeweilige primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung mit Blockierungspuffer (**Tabelle 12**) direkt auf die Proben aufgetragen. Hierbei verhinderte ein Umranden der Proben mittels eines Fettstifts ein Abfließen der Antikörper-Lösung. Die Schnitte der humanen MSZ-Aggregate wurden für 24 h bei 4 °C inkubiert, die der humanen osteochondralen Defektmodelle für 1 h (RT). Alle übrigen Schritte unterschieden sich nicht für die einzelnen viralen Gentransfermodelle. Nach Beendigung der Inkubation wurde überschüssige Antikörper-Lösung durch zweimaliges Waschen der Schnitte in PBS entfernt. Anschließend wurde der korrespondierende biotinylierte sekundäre Antikörper in entsprechender Verdünnung mit PBS (**Tabelle 12**) auf die jeweiligen Proben gegeben und diese für 1 h (RT) inkubiert. Nach Inkubation und dreimaligem Waschen der Schnitte für jeweils 5 min in PBS wurde Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz (ABC-Reagenz) auf die Proben gegeben, diese für 30 min (RT) inkubiert, erneut drei Mal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen und für 7 min (RT) in DAB-Lösung inkubiert. Die gefärbten Schnitte wurden nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 min und einmaligem Waschen in Leitungswasser für 1 min analog zu dem in Kapitel 6.9.3.1 beschriebenen Prozedere fixiert, dehydriert und unter Deckgläsern eingedeckt.

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX45) bei 10- und 20-facher Vergrößerung beurteilt. Die Evaluation der Transgenexpression (hTGF- β und hIGF-I) erfolgte mittels Bestimmung des Anteils positiver immunreaktiver Zellen (braun gefärbte Zellen) im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in Prozent. Zur Evaluation der Immunreaktivität für

Typ-I-, -II- und -X-Kollagen erfolgte unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern (Kapitel 6.9.5) eine semiquantitative Analyse der Braunfärbung in Bezug auf Intensität und Gleichmäßigkeit.

Tabelle 12. Verwendete Antikörperlösungen und entsprechende Verdünnungen für immunhistochemische Analysen.

Antigen	Primärer Antikörper (Spezies)	Verdünnung (primärer Antikörper: Blockierungspuffer)
hTGF- β	Anti-TGF- β (Kaninchen)	1:50
hIGF-I	Anti-IGF-I (Ziege)	1:25
Typ-I-Kollagen	Anti-Typ-I-Kollagen (Maus)	1:200
Typ-II-Kollagen	Anti-Typ-II-Kollagen (Maus)	unverdünnt
Typ-X-Kollagen	Anti-Typ-X-Kollagen (Maus)	humane 3D-MSZ-Aggregate: 1:200 humane osteochondrale Defektmodelle: 1:100
	Sekundärer Antikörper	Verdünnung (sekundärer Antikörper: PBS)
	Anti-Kaninchen IgG	1:200
	Anti-Maus IgG	1:200
	Anti-Ziege IgG	1:200

6.9.5 Modifiziertes Bewertungssystem aus Bern

Die Beurteilung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen erfolgte anhand des modifizierten Bewertungssystems aus Bern [252], welches ursprünglich von Grogan *et al.* entwickelt wurde [129]. Hierbei handelt es sich um ein semiquantitatives histologisches bzw. immunhistochemisches Bewertungssystem, basierend auf den Parametern „Intensität“ und „Gleichmäßigkeit“ der jeweiligen Färbung (**Tabelle 13**). Die Höhe des errechneten Punktwerts nach dem modifizierten Bewertungssystem aus Bern reflektiert dabei das Ausmaß der Transgenexpression (hTGF- β und hIGF-I) sowie der histologisch und immunhistochemisch untersuchten Indikatoren der chondrogenen (Proteoglykangehalt, Typ-II-Kollagendichte), osteogenen (Typ-I-Kollagendichte) und hypertrophen (EZM-Mineralisierung, Typ-X-Kollagendichte) Differenzierungsprozesse [252].

Je höher der errechnete Punktwert, desto stärker ausgeprägt ist die entsprechende Expression des jeweils untersuchten Parameters [252]. Zur Ermittlung des Punktwertes nach dem modifizierten Bewertungssystem aus Bern wurden mindestens vier Bereiche gleicher Größe einer Probe in 10- und 20-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX45) gemäß den Angaben aus **Tabelle 13** beurteilt, anschließend wurde der Mittelwert gebildet.

Tabelle 13. Modifiziertes Bewertungssystem aus Bern.

Gleichmäßigkeit und Intensität der Färbung	Punkte
Keine Färbung	0
Heterogene und/oder schwache Färbung	1
Homogene und/oder moderate Färbung	2
Homogene und/oder starke Färbung	3
Intensive Färbung	4

Semiquantitatives Bewertungssystem zur histologischen und immunhistochemischen Analyse der rAAV-basiert transduzierten Proben [252].

6.9.6 *Real-time RT-PCR*-Analysen

Zur Verifikation und relativen Quantifizierung der Expression bestimmter Gene, welche das Ausmaß der chondrogenen, osteogenen und hypertrophen Differenzierungsprozesse in den untersuchten Kultursystemen reflektieren, erfolgte die Durchführung von *Real-time RT-PCR*-Analysen. Folgende Gene wurden auf ihre Expression überprüft: SOX9, Typ-II-Kollagen (*COL2A1*), Aggrekan (*ACAN*), Typ-I-Kollagen (*COL1A1*), Typ-X-Kollagen (*COL10A1*), und Matrix-Metalloproteinase 13 (*MMP-13*). Hierzu wurde zunächst die RNS isoliert, in cDNS umgeschrieben und diese anschließend mittels *Real-time RT-PCR* amplifiziert.

6.9.7 RNS-Isolation

Hierzu wurde nach Beendigung der Kultivierungsperiode von 21 Tagen zunächst die RNS der humanen MSZ-Aggregate und der humanen osteochondralen Defektmodelle unter Verwendung des *RNeasy Protect Mini-Kits* (Quiagen) sowie nach dessen Instruktionen extrahiert. Dies erfolgte gemäß Herstellerangaben auf der Grundlage, dass RNS mit einer Länge von mindestens 200 Basenpaaren selektiv an eine Silicamembran (synthetisches SiO₂) mit einer Bindungskapazität von insgesamt 100 µg RNS bindet. Die Extraktion der RNS erfolgte für die humanen MSZ-Aggregate und die humanen osteochondralen Defektmodelle nach dem gleichen Prozedere, jedoch wurden für die RNS-Isolation der osteochondralen Defektmodelle, wenn angegeben, abweichende Mengen entsprechender Lösungen oder Puffer verwendet. Zudem wurde nur der mittels einer Klinge vom subchondralen Knochen abgetragene Knorpel einschließlich des implantierten Zellaggregats der RNS-Isolation unterzogen.

Die Proben wurden zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurde jede Probe durch Zugabe von 300 µl (humane osteochondrale Defektmodelle: 600 µl) guanidino-cyanathaltigen *RLT*-Lysierungspuffers + β-Mercaptoethanol (1 µl β-Mercaptoethanol/1 ml *RLT*-Puffer) lysiert

und homogenisiert. Hierzu wurden die Proben mittels Vortex-Schüttler für 2 min durchmischt, für 15 min in ein Ultraschallbad überführt und für 3 min bei 1.330 U/min (25 °C) zentrifugiert. β -Mercaptoethanol bewirkte eine Inaktivierung der RNAsen und gewährleistete somit eine Extraktion intakter RNS. Der Überstand wurde in DNase-freie Reaktionsgefäße überführt, 300 μ l (humane osteochondrale Defektmodelle: 600 μ l) Ethanol (70%) zugegeben und durch Pipettieren sorgfältig durchmischt. Dies schaffte optimale Bedingungen für eine nahezu unbeeinträchtigte Bindung der RNS an die Silicamembran, da alkohollösliche Substanzen in Lösung gingen. Der gesamte Inhalt der DNase-freien Reaktionsgefäße wurde auf *RNeasy-Mini-Spin*-Säulen mit silicahaltiger Membran überführt, für 1,5 min bei Hochgeschwindigkeit (25 °C) zentrifugiert und der Durchfluss entsorgt.

Jede Probe wurde unter Zugabe von 70 μ l *RDD*-Puffer + 10 μ l DNase (RT) inkubiert, um eine fortwährende Bindung der RNS an die Säulen sicherzustellen. Zum Waschen der an die silicahaltigen Säulen gebundenen RNS wurde jeder Probe 700 μ l *RW1*-Puffer zugegeben, für 1,5 min bei Hochgeschwindigkeit (25 °C) zentrifugiert und der Durchfluss entsorgt. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal mit 500 μ l *RPE*-Puffer wiederholt. Anschließend wurden die Filter auf neue Reaktionsgefäße (Eppendorf Biopur®) überführt, für 2 min (RT) zum Austrocknen inkubiert und die Filter wiederholt auf neue Reaktionsgefäße (Eppendorf Biopur®) überführt. Zur Elution der membrangebundenen RNS wurden auf jeden Filter 40 μ l RNase freies Wasser gegeben, diese für 1 min (RT) inkubiert und für 2 min bei Hochgeschwindigkeit (25 °C) zentrifugiert. Die isolierte RNS wurde bei -80 °C gelagert.

6.9.8 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der isolierten RNS zur nachfolgenden Amplifikation mittels *PCR* erfolgte unter Verwendung des *First Strand cDNA Synthesis-Kits* - aviäres Myeloblastis Virus - (Roche Applied Science) sowie nach dessen Instruktionen. Im Rahmen der reversen Transkription wird die RNS in ihre cDNS umgeschrieben. Diese Reaktion wird durch das Enzym reverse Transkriptase katalysiert. Dieses synthetisiert zunächst aufgrund seiner Aktivität als RNS-abhängige DNS-Polymerase einen zum RNS-*Template* hybriden cDNS-Strang [14]. Aufgrund seiner Aktivität als Ribonuklease H baut es anschließend die in DNS/RNS-Hybridsträngen vorliegende RNS ab, sodass nur noch einzelsträngige cDNS vorliegt [14]. Für die reverse Transkription wurde zunächst der *Mastermix* hergestellt. Dieser enthielt, mit Ausnahme der *Template*-RNS, alle für die Reaktion benötigten Reagenzien. Alle benötigten Reagenzien wurden auf Eis angesetzt und gelagert. Für die Herstellung des *Mastermix* wurden pro Probe 2 μ l *AMV Reaction Buffer* (2-fach), 4 μ l $MgCl_2$ (2,5 mM),

2 μ l Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dTNP-Mix), 2 μ l *Random Primer-Mix* (60 μ M), 1 μ l *RNAse Inhibitor* und 0,8 μ l *AMV Reverse Transcription-Enzyme Mix* (10-fach) in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 11,8 μ l *Mastermix* und 8,2 μ l der jeweils umzuschreibenden RNS in *PCR-Tubes* überführt und für 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte zur Synthese der cDNS eine Inkubation der Proben für 1 h bei 42 °C. Durch anschließendes Erhitzen der Proben für 5 min auf 99 °C wurde die reverse Transkription beendet und die Proben für 5 min bei 4 °C abgekühlt.

6.9.9 Ablauf der *Real-time RT-PCR*

Zur Amplifikation der cDNS erfolgte die Durchführung einer *SYBR Green Real-time RT-PCR* (Stratagene, Agilent Technologies). Hierbei wurde die Reaktion in Echtzeit überwacht und der Zeitpunkt der erstmaligen Detektion der jeweiligen amplifizierten und zu erfassenden Gensequenz als Grundlage für dessen weitere Quantifizierung festgelegt. Die Detektion der Gensequenzen erfolgte dabei mittels *SYBR Green*, einem Fluoreszenzfarbstoff, der sich mit hoher Affinität der kleinen Furche doppelsträngiger DNS anlagert [10].

Zur Durchführung der *Real-time RT-PCR* wurde zunächst die Reaktionslösung hergestellt (**Tabelle 14**). Diese enthielt, mit Ausnahme der cDNS, alle für die Reaktion benötigten Reagenzien. Alle benötigten Reagenzien wurden auf Eis angesetzt und gelagert. Jeder *PCR*-Ansatz bestand aus einem Gesamt-Reaktionsvolumen von 50 μ l und setzte sich wie folgt zusammen: 2 μ l cDNS, 25 μ l *SYBR Green Mastermix* (2-fach), 150 nM *forward* Primer, 150 nM *reverse* Primer sowie nukleasefreies *PCR-Wasser ad 50 μ l*. Hierzu wurden, mit Ausnahme der cDNS, alle Reagenzien in ein Reaktionsgefäß überführt und gründlich durchmischt. In die Vertiefungen einer auf Eis gelagerten *PCR*-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurden jeweils 2 μ l cDNS und anschließend 48 μ l der vorbereiteten Reaktionslösung überführt und vorsichtig durchmischt. Dies erfolgte streng unter Vermeidung einer Blasenbildung, da dies eine Beeinträchtigung der Fluoreszenz bewirkt hätte. Es erfolgte eine Kontrolle mit jeweils 2 μ l Wasser sowie mit nicht-revers transkribierter mRNA. Die Durchführung der *Real-time PCR* erfolgte unter Anwendung eines quantitativen *PCR* (QPCR)-Instruments gemäß nachfolgendem Ablauf: Zur Denaturierung der Proben und um eine maximale Aktivierung der DNS-Polymerase zu gewährleisten, erfolgte eine initiale Inkubation für 10 min bei 95 °C [67]. Anschließend folgten 55 Amplifikationszyklen bestehend aus Denaturierung (95 °C, 30 s), *Annealing* (55 °C, 1 min), Elongation (72 °C, 30 s), Denaturierung (95 °C, 1 min) [67; 301; 321]. Zum Schluss erfolgte eine Inkubation bei 55 °C für 30 s [67]. Da die DNS in denaturierten Proben als Einzelstrang vorliegt, bindet *SYBR Green* während dieser

Phase nicht an die DNS und erzeugt lediglich eine minimale Fluoreszenz [332]. Während der *Annealing*-Phase erfolgt über die Anlagerung der Primer an ihr jeweiliges cDNS-*Template* eine beginnende Bildung von DNS-Doppelsträngen, sodass sich der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* zunehmend anlagert [332]. Während der *Elongations*-Phase werden die Primer durch Anlagerung von zum cDNS-*Template* komplementärer Basen verlängert, sodass vollständige DNS-Doppelstränge entstehen und eine maximal mögliche Menge *SYBR Green* gebunden und detektiert wird [10]. Die Überprüfung der Spezifität des jeweiligen amplifizierten Genprodukts erfolgte mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse sowie mittels Agarose-Gelelektrophorese [67].

Tabelle 14. Verwendete Primer (Sequenzen) für *Real-time RT-PCR*-Analysen.

Gen		Sequenz
GAPDH (<i>Housekeeping</i> -Gen und Kontrolle)	<i>forward</i>	5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'
	<i>reverse</i>	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
SOX9 (chondrogener Marker)	<i>forward</i>	5'-ACACACAGCTCACTCGACCTTG-3'
	<i>reverse</i>	5'-GGGAATTCTGGTTGGTCCTCT-3'
Aggrekan (<i>ACAN</i>) (chondrogener Marker)	<i>forward</i>	5'-GAGATGGAGGGTGAGGTC-3'
	<i>reverse</i>	5'-ACGCTGCCTCGGG CTTC-3'
Typ-II-Kollagen (<i>COL2A1</i>) (chondrogener Marker)	<i>forward</i>	5'-GGACTTTTCTCCCCTCTCT-3'
	<i>reverse</i>	5'-GACCCGAAGGTCTTACAGGA-3'
Typ-I-Kollagen (<i>COL1A1</i>) (osteogener Marker)	<i>forward</i>	5'-ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC-3'
	<i>reverse</i>	5'-ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC-3'
Typ-X-Kollagen (<i>COL10A1</i>) (hypertrophieassoziierter Marker)	<i>forward</i>	5'-CCCTCTTGTTAGTGCCAACC-3'
	<i>reverse</i>	5'-AGATTCCAGTCCTTGGGTCA-3'
Matrix-Metalloproteinase 13 (<i>MMP-13</i>) (kataboler Marker)	<i>forward</i>	5'-AATTTTCACTTTTGGCAATGA-3'
	<i>reverse</i>	5'-CAAATAATTTATGAAAAGGGATGC-3'

Im Rahmen der *Real-time RT-PCR*-Analysen verwendete sequenzspezifische Primer (Invitrogen) für relevante Marker-Gene in Bezug auf chondrogene, osteogene, hypertrophe und katabole Differenzierungsaktivitäten von rAAV-basiert transduzierten Proben.

Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte unter Verwendung der vergleichenden Ct-Methode [67]. Für jedes Zielgen der amplifizierten Proben wurde der Ct-Wert (*Cycle-Threshold*, Schwellenwertzyklus) gemessen; hierbei handelt es sich um den Schnittpunkt einer Amplifikationskurve mit der Schwellenwertlinie und entspricht der relativen Konzentration eines Zielgens in der *PCR* [309]. Anschließend erfolgte die relative Quantifizierung der jeweiligen Expressionsprodukte gegen das nicht-regulierte *Housekeeping*-Gen GAPDH (Referenzgen). Die Berechnung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode [67]. Die Formel gibt dabei den

relativen Expressionsunterschied zwischen der jeweiligen Probe und der Kontrolle bezogen auf das Referenzgen an und berechnet sich wie folgt [67; 321]:

- $Ct_{(Zielgen)} - Ct_{(Referenzgen)} = \Delta Ct$
 - $\Delta Ct_{(Probe)} - \Delta Ct_{(Kontrolle)} = \Delta \Delta Ct$
- $2^{-\Delta \Delta Ct}$

6.10 Statistische Analysen

Es wurden insgesamt drei Patienten in die Studie eingeschlossen (N = 3). Alle Untersuchungen wurden in Doppelbestimmung (n = 2) in drei voneinander unabhängigen Experimenten (N = 3) durchgeführt. Die Ergebnisse aller Untersuchungen sind jeweils als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Hierzu erfolgte zunächst eine jeweils patientenbezogene Bestimmung des Mittelwerts jeder in Doppelbestimmung durchgeführter Untersuchung. Anschließend erfolgte die Mittelwertbildung aus den Mittelwerten der drei untersuchten Patientenproben.

Die Ermittlung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels Anwendung des t-Tests. Im Rahmen der gesamten Analysen der vorliegenden Arbeit wurden *P*-Werte < 0,05 (5%) als statistisch signifikant betrachtet. Alle Berechnungen und statistischen Analysen erfolgten mittels *Microsoft Excel*.

Die Verifikation sowie quantitative Analyse der Transgenexpression erfolgte über eine Ermittlung der Sekretionsspiegel der therapeutischen Proteine hTGF- β und hIGF-I der rAAV-basiert transduzierten Proben mittels *ELISA* sowie mittels immunhistochemischen Färbungen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern zur Detektion der entsprechenden Antigene hTGF- β und hIGF-I.

Die Evaluation biosynthetischer und chondrogener Differenzierungspotentiale erfolgte mittels biochemischen Analysen (DMMB-, BCA-, Hoechst 33258-Test), histologischen Färbungen (Safranin-O-, Hämatoxylin und Eosin-, Toluidinblau-Färbung), immunhistochemischen Färbungen (Typ-II-Kollagen) sowie mittels *Real-time RT-PCR*-Analysen (SOX9, COL2A1, ACAN).

Osteogene Differenzierungspotentiale wurden mittels immunhistochemischen Färbungen (Typ-I-Kollagen) sowie mittels *Real-time RT-PCR*-Analysen (COL1A1) beurteilt.

Die Analyse hypertropher Differenzierungspotentiale erfolgte mittels immunhistochemischen Färbungen (Typ-X-Kollagen), histologischen Färbungen (Alizarin-Rot) sowie mittels *Real-time RT-PCR*-Analysen (*COL10A1*).

Die Beurteilung terminaler und kataboler Differenzierungspotentiale erfolgte in den humanen osteochondralen Defektmodellen mittels *Real-time RT-PCR*-Analysen (*MMP-13*).

7 Ergebnisse

7.1 Humane 3D-MSZ-Aggregate

7.1.1 Analysen der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I

7.1.1.1 Analyse der Transgenexpression mittels *ELISA*

Eine erfolgreiche und dauerhafte rAAV-basierte Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I wurde über eine dauerhafte Sekretion der entsprechenden therapeutischen Proteine für alle untersuchten behandelten Gruppen verglichen mit der Negativkontrolle über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen mittels *ELISA* nachgewiesen (**Tabelle 15**). Die quantitativ höchsten Sekretionsspiegel von hTGF- β und hIGF-I wurden dabei zu jedem untersuchten Zeitpunkt jeweils in den kombiniert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten mit hTGF- β und hIGF-I erzielt. Die Sekretion von hTGF- β war in den mit hTGF- β /hIGF-I kombiniert transduzierten MSZ-Aggregaten an den Tagen 2, 7, 14 und 21 jeweils 1,8-, 2,7-, 6,4-, und 8,7-fach höher verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* ($P \leq 0,050$) sowie 1,5-, 1,4-, 1,5-, und 1,7-fach höher verglichen mit den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P = 0,030$; $P = 0,059$; $P = 0,070$; $P = 0,056$). Zu den gleichen Zeitpunkten waren die Sekretionsspiegel von hTGF- β in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten 1,7-, 2,3-, 5,5-, und 6,4-fach höher als in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P \leq 0,034$). In den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde zu den gleichen untersuchten Zeitpunkten eine 1,2-, 1,9-, 4,2-, und 5,0-fach höhere Sekretion von hTGF- β nachgewiesen verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* ($P = 0,148$; $P = 0,040$; $P = 0,053$; $P = 0,040$) sowie eine 1,2-, 1,6-, 3,6- und 3,7-fach höhere Sekretion von hTGF- β verglichen mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P = 0,042$; $P = 0,015$; $P = 0,054$; $P = 0,059$). Zwischen den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten und der Negativkontrolle *lacZ* zeigte sich entweder nur ein geringer oder kein signifikanter Unterschied bezüglich der hTGF- β -Sekretionsspiegel ($P = 0,440$; $P = 0,087$; $P = 0,217$; $P = 0,010$).

Die erreichten Sekretionsspiegel von hIGF-I waren in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten an den Tagen 2, 7, 14 und 21 jeweils 1,8-, 1,5-, 1,4-, und 1,3-fach höher verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* ($P \leq 0,030$) sowie 1,6-, 1,4-, 1,4-, und 1,4-fach höher verglichen mit den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P = 0,052$; $P = 0,030$; $P = 0,014$; $P = 0,003$). Zwischen den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen

MSZ-Aggregaten und den hIGF-I/*lacZ* transduzierten humanen MSZ-Aggregaten zeigte sich nur ein geringer Unterschied in Bezug auf die Sekretion von hIGF-I (hTGF- β /hIGF-I *versus* hIGF-I/*lacZ*: 1,2-, 1,2-, 1,1-, und 1,1-fach erhöhte Sekretion, $P \geq 0,120$). In den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurden zu den gleichen untersuchten Zeitpunkten 1,5-, 1,3-, 1,3-, und 1,3-fach höhere Sekretionsspiegel von hIGF-I nachgewiesen verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* ($P \leq 0,010$) sowie 1,3-, 1,2-, 1,3- und 1,4-fach höhere Sekretionsspiegel von hIGF-I verglichen mit den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P \leq 0,009$). Zwischen den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten und der Negativkontrolle *lacZ* fand sich kein Unterschied hinsichtlich einer Sekretion von hIGF-I ($P \geq 0,100$). Insgesamt waren die erzielten Sekretionsspiegel von hTGF- β in allen untersuchten und mit therapeutischen Wachstumsfaktorgenen rAAV-basiert behandelten Gruppen deutlich höher als diejenigen von hIGF-I.

Tabelle 15. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels *ELISA*.

<i>ELISA</i>	Untersuchungszeitpunkt	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
hTGF- β [pg/ml]	Tag 2	162 \pm 158	196 \pm 121 ^c	166 \pm 127	286 \pm 169 ^{a,b,c}
	Tag 7	89 \pm 93	169 \pm 119 ^{a,c}	105 \pm 93	241 \pm 183 ^{a,c}
	Tag 14	19 \pm 8	80 \pm 73	22 \pm 6	121 \pm 97 ^{a,c}
	Tag 21	11 \pm 3	55 \pm 51 ^a	15 \pm 4 ^a	96 \pm 80 ^{a,c}
hIGF-I [pg/ml]	Tag 2	52 \pm 16	59 \pm 22	76 \pm 27 ^{a,b}	93 \pm 53 ^a
	Tag 7	52 \pm 11	53 \pm 14	65 \pm 17 ^{a,b}	76 \pm 29 ^{a,b}
	Tag 14	54 \pm 13	52 \pm 15	69 \pm 15 ^{a,b}	73 \pm 17 ^{a,b}
	Tag 21	53 \pm 16	49 \pm 16	67 \pm 18 ^{a,b}	71 \pm 16 ^{a,b}

Die Transgenexpression von hTGF- β und IGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner MSZ-Aggregate wurde an Tag 2, 7, 14 und 21 nach erfolgter Transduktion anhand der Sekretion der entsprechenden therapeutischen Proteine mittels *ELISA* untersucht. Die Sekretionsniveaus von hTGF- β und hIGF-I sind in pg/ml angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.1.1.2 Analyse der Transgenexpression mittels immunhistochemischen Färbungen

Die Ergebnisse der *ELISA*-Analysen wurden mittels spezifischen immunhistochemischen Färbungen nach Beendigung der Kultivierungsperiode von 21 Tagen verifiziert. Hierzu wurde der Anteil immunreaktiver Zellen für hTGF- β (**Tabelle 16** und **Abbildung 22**) und hIGF-I (**Tabelle 17** und **Abbildung 23**) an der Gesamtzellzahl ermittelt.

Analyse der Transgenexpression von hTGF- β

Die kombiniert transduzierten humanen MSZ-Aggregate mit hTGF- β /hIGF-I zeigten an Tag 21 die signifikant höchste Immunreaktivität sowohl für hTGF- β ($P \leq 0,030$) als auch für hIGF-I ($P \leq 0,050$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* und mit den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (hTGF- β /*lacZ* oder hIGF-I/*lacZ*) (**Tabelle 16** und **Abbildung 22**). Die Immunreaktivität für hTGF- β war in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten 3,4-fach höher als in Proben der Negativkontrolle *lacZ*, 1,1-fach höher als in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten und 3,1-fach höher als in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (jeweils $P \leq 0,030$). Signifikant höhere Immunreaktivität für hTGF- β wurde auch in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten nachgewiesen ($P \leq 0,020$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (3,2-fache Differenz) und mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (2,9-fache Differenz). Zwischen den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten und der Negativkontrolle *lacZ* zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Immunreaktivität für hTGF- β ($P = 0,500$).

Tabelle 16. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β rAAV-basiert transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels TGF- β -Immunhistochemie.

Immunreaktivität	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
hTGF- β ⁺ Zellen [%]	26 \pm 6	84 \pm 6 ^{a,c}	29 \pm 12	89 \pm 4 ^{a,b,c}

Die Transgenexpression von hTGF- β rAAV-basiert transduzierter humaner MSZ-Aggregate wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mittels immunhistochemischer Färbung analysiert. Der Anteil hTGF- β ⁺-Zellen ist in % angegeben bezogen auf die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

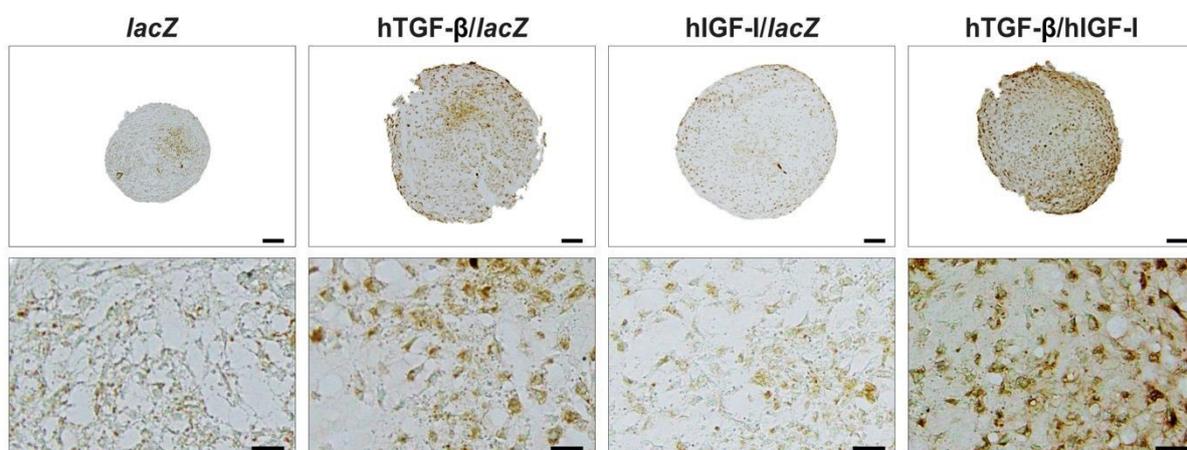


Abbildung 22. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β rAAV-basiert transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels TGF- β -Immunhistochemie. Die Intensität der Braunfärbung reflektiert die Immunreaktivität für TGF- β . Maßstabebalken: 100 μ m (obere Reihe) und 25 μ m (untere Reihe).

Analyse der Transgenexpression von hIGF-I

Die Immunreaktivität für hIGF-I war in den kombiniert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten mit hTGF- β /hIGF-I 3,3-fach höher als in Proben der Negativkontrolle *lacZ*, 2,7-fach höher als in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten und 1,1-fach höher als in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (jeweils $P \leq 0,050$) (**Tabelle 17** und **Abbildung 23**). Signifikant erhöhte Immunreaktivität für hIGF-I wurde auch in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten nachgewiesen ($P \leq 0,050$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (3-fache Differenz) und den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (2,5-fache Differenz). Zwischen den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten und der Negativkontrolle *lacZ* fand sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Immunreaktivität für hIGF-I ($P > 0,050$).

Tabelle 17. Analyse der Transgenexpression von hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels IGF-I-Immunhistochemie.

Immunreaktivität	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
hIGF-I ⁺ Zellen [%]	27 \pm 14	33 \pm 8	82 \pm 4 ^{a,b}	90 \pm 5 ^{a,b,c}

Die Transgenexpression von hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner MSZ-Aggregate wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mittels immunhistochemischer Färbung analysiert. Der Anteil hIGF-I⁺-Zellen ist in % angegeben bezogen auf die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

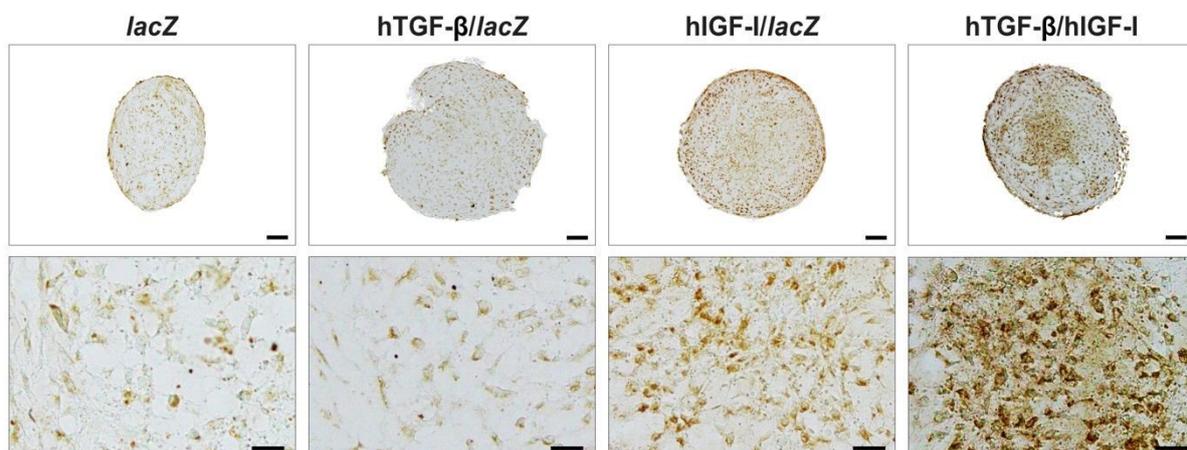


Abbildung 23. Analyse der Transgenexpression von hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner 3D-MSZ-Aggregate mittels IGF-I-Immunhistochemie. Die Intensität der Braunfärbung reflektiert die Immunreaktivität für IGF-I. Maßstab: 100 μ m (obere Reihe) und 25 μ m (untere Reihe).

7.1.2 Evaluation biosynthetischer, proliferativer und chondrogener Differenzierungsaktivitäten

7.1.2.1 Analyse der Zellzahl mittels DNS-Bestimmung

Der DNS-Gehalt diente als Bezugsparameter für die Zellzahl (**Tabelle 18**). Die kombiniert transduzierten humanen MSZ-Aggregate mit hTGF- β /hIGF-I wiesen nach Beendigung der Kultivierungsperiode von 21 Tagen einen signifikant erhöhten DNS-Gehalt auf verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,6-fache Differenz, $P = 0,004$) und mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,4-fache Differenz, $P = 0,010$). Gegenüber den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten kein signifikanter Effekt nachgewiesen ($P = 0,323$). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate erzielten 1,4-fach höhere DNS-Gehalte verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* ($P = 0,073$) und 1,2-fach höhere DNS-Gehalte verglichen mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P = 0,094$). Ein signifikant erhöhter DNS-Gehalt fand sich in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (1,2-fache Differenz, $P = 0,010$).

Tabelle 18. Analyse der Zellzahl von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Bestimmung des DNS-Gehalts.

DNS-Gehalt	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
ng/mg Gesamtprotein	0,029 \pm 0,006	0,042 \pm 0,018 ^a	0,034 \pm 0,009 ^a	0,046 \pm 0,010 ^{a,c}

Die Zellzahl von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion über eine biochemische Bestimmung des DNS-Gehalts analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.1.2.2 Analyse der Zellzahl mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Ergebnisse des DNS-Gehalts als Indikator für die Zellzahl wurden mittels Bestimmung der Zelldichte anhand histologisch gefärbter Proben mit Hämatoxylin und Eosin verifiziert (**Tabelle 19** und **Abbildung 24**). Die hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregate zeigten an Tag 21 eine signifikant höhere Zelldichte ($P \leq 0,010$) verglichen mit Proben der Negativkontrolle *lacZ* (3-fache Differenz) und den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (1,6-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*; 2,5-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen signifikant höhere Zelldichten auf ($P \leq 0,010$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (1,9-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-

Aggregaten (1,6-fache Differenz). Die hIGF-I//lacZ-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen eine 1,2-fach erhöhte Zelldichte auf verglichen mit der Negativkontrolle lacZ ($P = 0,106$).

Tabelle 19. Analyse der Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Zelldichte	lacZ	hTGF-β//lacZ	hIGF-I//lacZ	hTGF-β/hIGF-I
Zellen/mm ²	4.817 ± 1.348	9.061 ± 840 ^{a,c}	5.628 ± 1.116	14.267 ± 1.224 ^{a,b,c}

Die Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung untersucht. Die Zelldichte ist als Zellzahl/mm² angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^alacZ, ^bhTGF-β//lacZ, ^chIGF-I//lacZ.

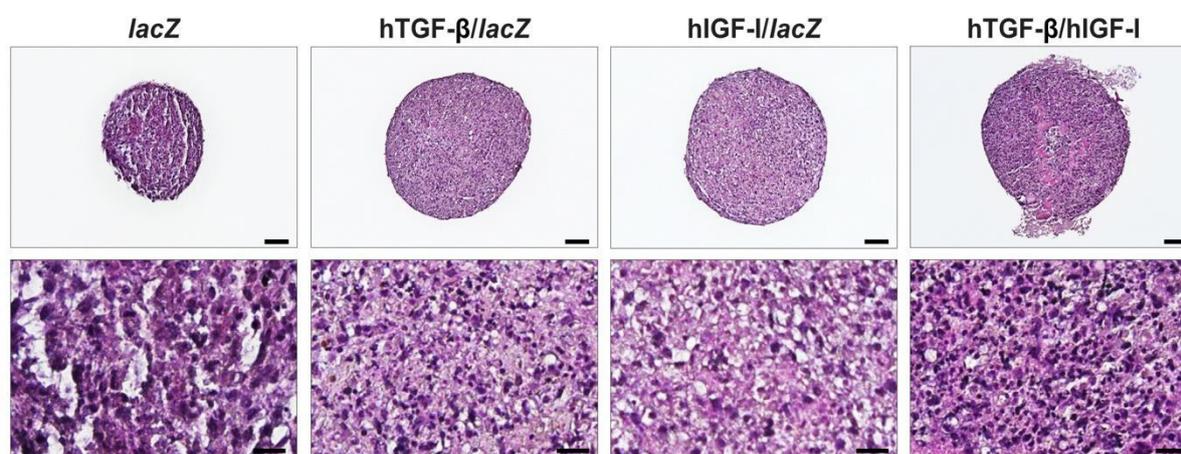


Abbildung 24. Analyse der Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Zellkerne sind rot angefärbt; dies ermöglicht eine Auszählung der Zellen pro Fläche. Maßstabstabschen: 100 µm (obere Reihe) und 25 µm (untere Reihe).

7.1.2.3 Analyse des Proteoglykangehalts mittels biochemischen Analysen

Die kombiniert transduzierten humanen MSZ-Aggregate mit hTGF-β und hIGF-I zeigten nach Beendigung der Kultivierungsperiode an Tag 21 einen signifikant höheren Proteoglykangehalt in der Matrix ($P \leq 0,030$) verglichen mit der Negativkontrolle lacZ (3,3-fache Differenz) und verglichen mit den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (1,3-fache Differenz versus hTGF-β//lacZ; 1,7-fache Differenz versus hIGF-I//lacZ) (**Tabelle 20**). Die hTGF-β//lacZ-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen erhöhte Proteoglykangehalte auf gegenüber der Negativkontrolle lacZ (2,7-fache Differenz) und den hIGF-I//lacZ-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,3-fache Differenz), das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht ($P \geq 0,05$). Die hIGF-I//lacZ-transduzierten humanen MSZ-Aggregate zeigten einen 2-fach

erhöhten Proteoglykangehalt verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* ($P = 0,060$). In den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde zudem ein signifikant erhöhter Proteoglykangehalt bezogen auf den DNS-Gehalt nachgewiesen ($P \leq 0,040$) im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* (2,6-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,6-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,4-fache Differenz). Ein signifikant erhöhter Proteoglykangehalt bezogen auf den DNS-Gehalt fand sich auch in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,6-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,8-fache Differenz) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* ($P \leq 0,030$). Zwischen den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde, wiesen wir keinen signifikanten Effekt hinsichtlich des Proteoglykangehalts bezogen auf den DNS-Gehalt nach.

Tabelle 20. Analyse biosynthetischer Aktivitäten von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels biochemischen Untersuchungen.

Proteoglykane	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
Proteoglykangehalt [μ g/mg Gesamtprotein]	0,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,7	0,6 \pm 0,5	1,0 \pm 0,8 ^{a,b,c}
Proteoglykangehalt/ DNS-Gehalt [μ g/ng]	0,011 \pm 0,004	0,018 \pm 0,010 ^a	0,020 \pm 0,011 ^a	0,028 \pm 0,015 ^{a,b,c}

Die biosynthetischen Aktivitäten von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurden an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mittels biochemischer Bestimmung des Proteoglykangehalts untersucht. Der Bezug des Proteoglykangehalts auf den DNS-Gehalt gibt das Verhältnis der proliferativen Aktivitäten bezogen auf die metabolischen (anabolen) Aktivitäten an. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a/*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.1.2.4 Analyse des Proteoglykangehalts mittels Toluidinblau-Färbung

Die Beurteilung des Proteoglykangehalts nach Beendigung der Kultivierungsperiode an Tag 21 in histologisch gefärbten Proben mit Toluidinblau erfolgte anhand des modifizierten Bewertungssystems aus Bern (Kapitel 6.9.5; **Tabelle 21** und **Abbildung 25**). Die kombiniert transduzierten humanen MSZ-Aggregate mit hTGF- β /hIGF-I waren deutlich stärker angefärbt als die Proben der Negativkontrolle und als die humanen MSZ-Aggregate, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (hTGF- β /*lacZ* und hIGF-I/*lacZ*) als Ausdruck einer erhöhten Proteoglykan-Expression. Eine signifikant erhöhte Expression von Proteoglykanen wurde in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten nachgewiesen verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,6-fache Differenz, $P = 0,007$) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,2-fache

Differenz, $P = 0,030$). Gegenüber den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wiesen die hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregate keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Proteoglykangehalts auf ($P = 0,196$). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen signifikant erhöhte Proteoglykangehalte auf verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,5-fache Differenz, $P = 0,008$) und 1,2-fach erhöhte Proteoglykangehalte verglichen mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P = 0,091$). Ein erhöhter Proteoglykangehalt wurde auch in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten nachgewiesen verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,3-fache Differenz, $P = 0,108$).

Tabelle 21. Analyse des Proteoglykangehalts von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Toluidinblau-Färbung.

Färbung	<i>lacZ</i>	TGF- β / <i>lacZ</i>	IGF-I/ <i>lacZ</i>	TGF- β /IGF-I
Toluidinblau	2,50 \pm 0,58	3,75 \pm 0,50 ^a	3,25 \pm 0,50	4,00 \pm 0,01 ^{a,c}

Der Proteoglykangehalt von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mittels Toluidinblau-Färbung unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

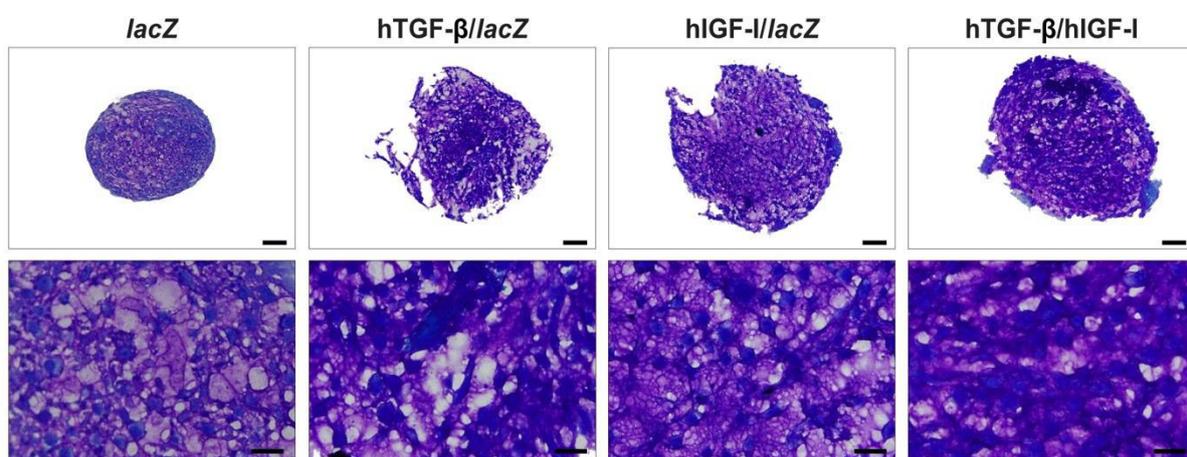


Abbildung 25. Analyse des Proteoglykangehalts von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Toluidinblau-Färbung. Die Intensität der Blaufärbung reflektiert den Proteoglykangehalt. Maßstab Balken: 100 μ m (obere Reihe) und 25 μ m (untere Reihe).

7.1.2.5 Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression mittels immunhistochemischer Färbung

Die Beurteilung chondrogener Differenzierungspotentiale anhand der Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen nach Beendigung der Kultivierungsperiode an Tag 21 in immunhistochemisch gefärbten Proben erfolgte anhand des modifizierten Bewertungssystems aus Bern (Kapitel 6.9.5; **Tabelle 22** und **Abbildung 26**). Die kombiniert transduzierten humanen MSZ-

Aggregate mit hTGF- β /hIGF-I wiesen eine signifikant höhere Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen auf ($P \leq 0,013$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (2,9-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,3-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,7-fache Differenz). Signifikant erhöhte Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen fand sich auch in hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P \leq 0,024$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (2,3-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,3-fache Differenz). Die hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen eine signifikante, 1,7-fach erhöhte Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen auf verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* ($P \leq 0,001$).

Tabelle 22. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie.

Immunreaktivität	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
Typ-II-Kollagen	1,10 \pm 0,32	2,50 \pm 0,67 ^{a,c}	1,92 \pm 0,67 ^a	3,20 \pm 0,42 ^{a,b,c}

Die Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion anhand der Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

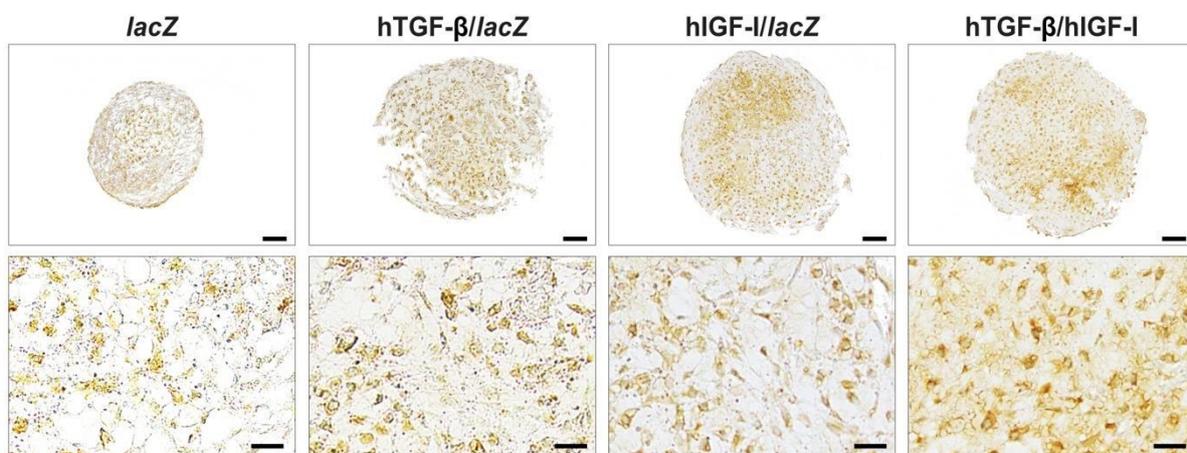


Abbildung 26. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie. Die Intensität der Braunfärbung reflektiert die Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen. Maßstabebenen: 100 μ m (obere Reihe) und 25 μ m (untere Reihe).

7.1.3 Evaluation osteogener und hypertropher Differenzierungsaktivitäten

7.1.3.1 Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression mittels immunhistochemischer Färbung

Die Beurteilung osteogener Differenzierungsprozesse erfolgte anhand einer semiquantitativen Analyse der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen in immunhistochemisch gefärbten Proben unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern (Kapitel 6.9.5; **Tabelle 23**

und **Abbildung 27**). Die hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen eine signifikant geringere Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen auf verglichen mit Proben der Negativkontrolle *lacZ* (2,0-fache Differenz, $P \leq 0,001$) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,5-fache Differenz, $P = 0,048$). Verglichen mit den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten eine 1,5-fach verminderte Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen nachgewiesen, das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht ($P = 0,308$). Eine signifikante Verminderung der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen fand sich in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten jeweils gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (1,7- und 1,3-fache Differenz, jeweils $P = 0,005$). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen eine 1,3-fach verminderte Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen auf verglichen mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P = 0,112$).

Tabelle 23. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Typ-I-Kollagen-Immunhistochemie.

Immunreaktivität	<i>lacZ</i>	TGF- β / <i>lacZ</i>	IGF-I/ <i>lacZ</i>	TGF- β /IGF-I
Typ-I-Kollagen	2,60 \pm 0,51	1,50 \pm 0,52 ^a	2,00 \pm 0,67 ^a	1,30 \pm 0,89 ^{a,c}

Die Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion anhand der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

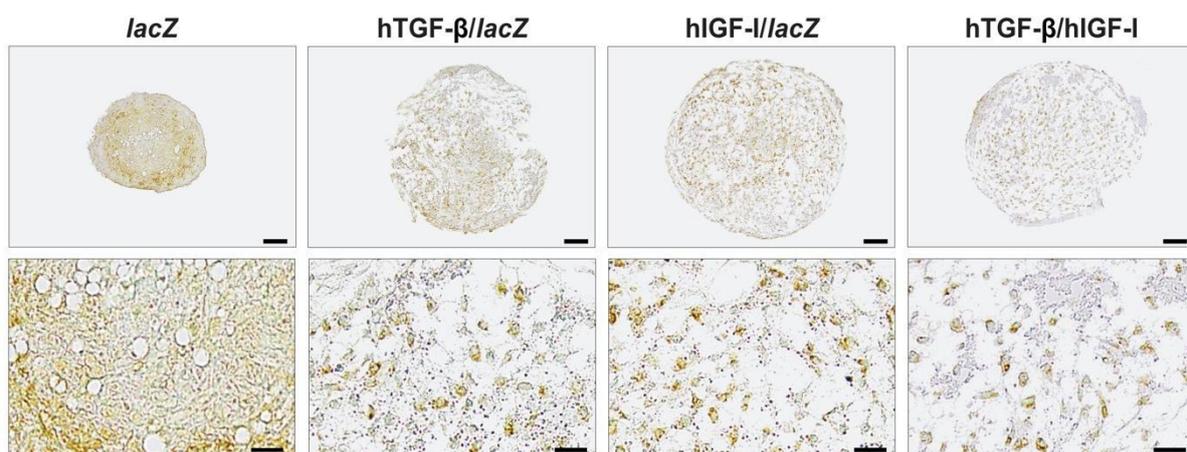


Abbildung 27. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Typ-I-Kollagen-Immunhistochemie. Die Intensität der Braunfärbung reflektiert die Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen. Maßstabballen: 100 μ m (obere Reihe) und 25 μ m (untere Reihe).

7.1.3.2 Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression mittels immunhistochemischer Färbung

Die Beurteilung hypertropher Differenzierungsprozesse anhand der Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen nach Beendung der Kultivierungsperiode an Tag 21 in immunhistochemisch gefärbten Proben erfolgte unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern (Kapitel 6.9.5; **Tabelle 24** und **Abbildung 28**). Die kombiniert transduzierten humanen MSZ-Aggregate mit hTGF- β /hIGF-I wiesen eine signifikante Verminderung der Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen auf ($P \leq 0,009$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (2,6-fache Differenz) und mit den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (1,7-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*; 2,2-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen eine signifikant verminderte Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen auf ($P \leq 0,010$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,5-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,3-fache Differenz). Signifikant verminderte Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen wurde auch in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten nachgewiesen gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (1,2-fache Differenz, $P = 0,004$).

Tabelle 24. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie.

Immunreaktivität	<i>lacZ</i>	TGF- β / <i>lacZ</i>	IGF-I/ <i>lacZ</i>	TGF- β /IGF-I
Typ-X-Kollagen	3,40 \pm 0,67	2,20 \pm 0,83 ^{a,c}	2,90 \pm 0,67 ^a	1,30 \pm 0,65 ^{a,b,c}

Die Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion anhand der Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

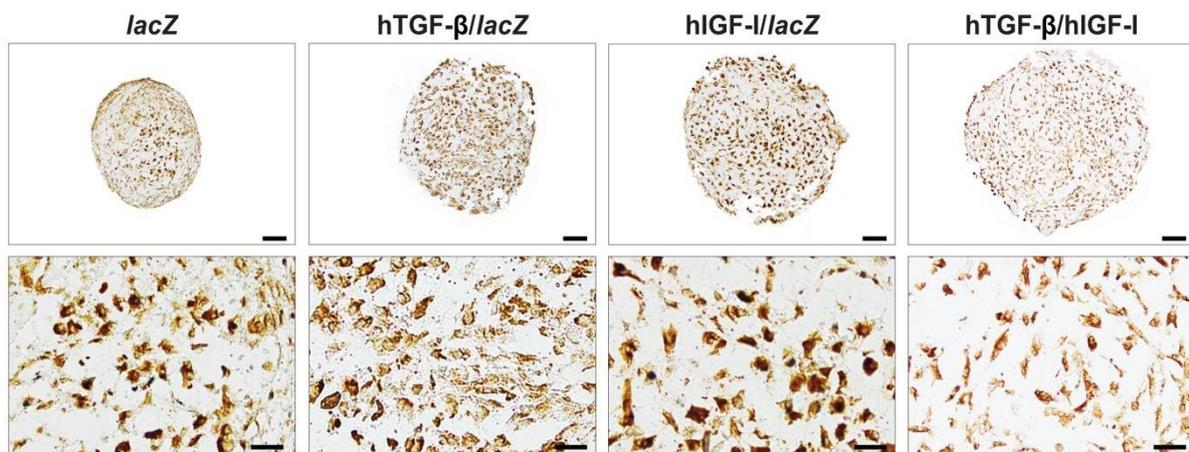


Abbildung 28. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie. Die Intensität der Braunfärbung reflektiert die Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen. Maßstababalken: 100 μ m (obere Reihe) und 25 μ m (untere Reihe).

7.1.3.3 Analyse des Calciumphosphatgehalts mittels Alizarin-Rot-Färbung

Die Beurteilung hypertropher Differenzierungsprozesse erfolgte zudem anhand histologisch gefärbter Schnitte mit Alizarin-Rot zur Detektion des Calciumphosphatgehalts, welches bei zunehmender Matrixkalzifizierung gebildet wird, unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern (Kapitel 6.9.5; **Tabelle 25** und **Abbildung 29**). In den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde eine signifikant verminderte Bildung von Calciumphosphat nachgewiesen ($P \leq 0,020$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (2,6-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,5-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (2,2-fache Differenz). Eine signifikant verminderte Bildung von Calciumphosphat fand sich auch in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P \leq 0,040$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,8-fache Differenz) und mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,5-fache Differenz). Die hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen eine 1,2-fach verminderte Calciumphosphatbildung auf verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* ($P = 0,052$).

Tabelle 25. Analyse des Calciumphosphatgehalts von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Alizarin-Rot-Färbung.

Färbung	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
Alizarin-Rot	2,90 \pm 0,64	1,60 \pm 0,74 ^{a,c}	2,40 \pm 0,52	1,10 \pm 0,64 ^{a,b,c}

Der Calciumphosphatgehalt von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mittels Alizarin-Rot-Färbung unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

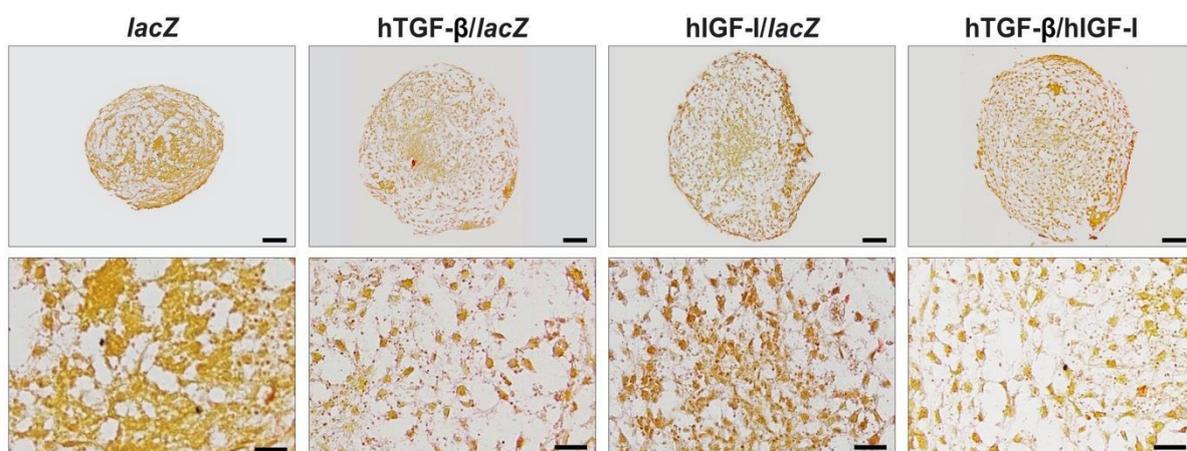


Abbildung 29. Analyse des Calciumphosphatgehalts von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Alizarin-Rot-Färbung. Die Intensität der Rotfärbung reflektiert den Calciumphosphatgehalt. Maßstabbalken: 100 μ m (obere Reihe) und 25 μ m (untere Reihe).

7.1.4 Real-time RT-PCR-Analysen

7.1.4.1 Analyse der SOX9-Expression

Verbesserte chondrogene Differenzierungspotentiale wurden nach 21 Tagen in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten anhand einer erhöhten Expression von SOX9 nachgewiesen im Vergleich mit den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (1,9-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*, $P = 0,059$; 2,9-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*, $P = 0,047$) und gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (5,3-fache, Differenz $P = 0,083$) (**Tabelle 26** und **Abbildung 30**). Erhöhte Expression von SOX9 fand sich auch in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten verglichen mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,5-fache Differenz, $P = 0,048$) und mit der Negativkontrolle *lacZ* (2,7-fache Differenz, $P = 0,146$) sowie in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (1,8-fache Differenz, $P = 0,240$).

Tabelle 26. Analyse der SOX9-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels Real-time RT-PCR.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
SOX9	1,00 \pm 0,05	2,74 \pm 2,13 ^c	1,79 \pm 1,59	5,25 \pm 3,44 ^c

Die Evaluation der SOX9-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.1.4.2 Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression

Signifikant erhöhte Expression von Typ-II-Kollagen (*COL2A1*) indizierte nach 21 Tagen verbesserte chondrogene Differenzierungspotentiale in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (jeweils $P = 0,039$) im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* (19-fache Differenz) und zu den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (2-fache Differenz) (**Tabelle 27** und **Abbildung 30**). Gegenüber den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wurde in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten eine 1,5-fach erhöhte Expression von Typ-II-Kollagen nachgewiesen ($P = 0,058$). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen eine signifikant erhöhte Expression von Typ-II-Kollagen auf ($P \leq 0,031$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (12,8-fache Differenz) sowie mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,4-fache Differenz). Eine signifikant

erhöhte Typ-II-Kollagen-Expression wiesen auch die hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate auf gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (9,5-fache Differenz, $P = 0,040$).

Tabelle 27. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels *Real-time* RT-PCR.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
<i>COL2A1</i>	1,00 \pm 0,05	12,83 \pm 5,37 ^{a,c}	9,49 \pm 4,43 ^a	18,98 \pm 9,30 ^{a,c}

Die Evaluation der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.1.4.3 Analyse der Aggrekan-Expression

Verbesserte chondrogene Differenzierungspotentiale fanden sich nach 21 Tagen in den kombiniert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten mit hTGF- β /hIGF-I anhand einer erhöhten Expression von Aggrekan (*ACAN*) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (8,6-fache Differenz, $P = 0,072$) und mit den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (1,9-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*, $P = 0,056$; 3,2-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*, $P = 0,041$) (**Tabelle 28** und **Abbildung 30**). Eine erhöhte Expression von Aggrekan fand sich in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (4,4-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten (1,6-fache Differenz), das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht ($P \geq 0,102$). Die hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen eine 2,7-fach erhöhte Aggrekan-Expression auf gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* ($P = 0,223$).

Tabelle 28. Analyse der Aggrekan-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels *Real-time* RT-PCR.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
<i>ACAN</i>	1,00 \pm 0,05	4,41 \pm 4,70	2,69 \pm 3,11	8,57 \pm 5,62 ^c

Die Evaluation der Aggrekan-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.1.4.4 Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression

Eine signifikante Verminderung der Expression von Typ-I-Kollagen (*COL1A1*) indizierte reduzierte osteogene Differenzierungsaktivitäten nach 21 Tagen in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten ($P \leq 0,032$) im Vergleich mit der Negativkontrolle *lacZ* (30,4-fache Differenz) und mit den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (8,7-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*; 16,9-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*) (**Tabelle 29** und **Abbildung 30**). Eine signifikant reduzierte Typ-I-Kollagen-Expression fand sich auch in den hTGF- β /*lacZ*- und in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten jeweils verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (3,5- und 1,8-fache Differenz, $P = 0,006$ und $P = 0,039$). Gegenüber den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten wiesen die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate eine 1,9-fach verminderte Expression von Typ-I-Kollagen auf ($P = 0,146$).

Tabelle 29. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels *Real-time* RT-PCR.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
<i>COL1A1</i>	1,00 \pm 0,01	0,29 \pm 0,14 ^a	0,56 \pm 0,23 ^a	0,03 \pm 0,03 ^{a,b,c}

Die Evaluation der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.1.4.5 Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression

Eine signifikante Reduktion hypertropher Differenzierungsprozesse fand sich nach 21 Tagen in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten anhand einer verminderten Expression von Typ-X-Kollagen (*COL10A1*) ($P \leq 0,036$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (3,6-fache Differenz) und den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (2,9-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*; 3,4-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*) (**Tabelle 30** und **Abbildung 30**). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregate wiesen eine signifikant verminderte Expression von Typ-X-Kollagen auf verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,2-fache Differenz, $P < 0,001$) sowie eine reduzierte Typ-X-Kollagen-Expression gegenüber den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten, (1,2-fache Differenz, $P = 0,063$). Zwischen den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten und der Negativkontrolle *lacZ* lag kein signifikanter Effekt bezüglich einer Typ-X-Kollagen Expression vor ($P = 0,440$).

Tabelle 30. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels *Real-time RT-PCR*.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
<i>COL10A1</i>	1,00 \pm 0,01	0,82 \pm 0,00	0,96 \pm 0,41 ^a	0,28 \pm 0,24 ^{a,b,c}

Die Evaluation der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

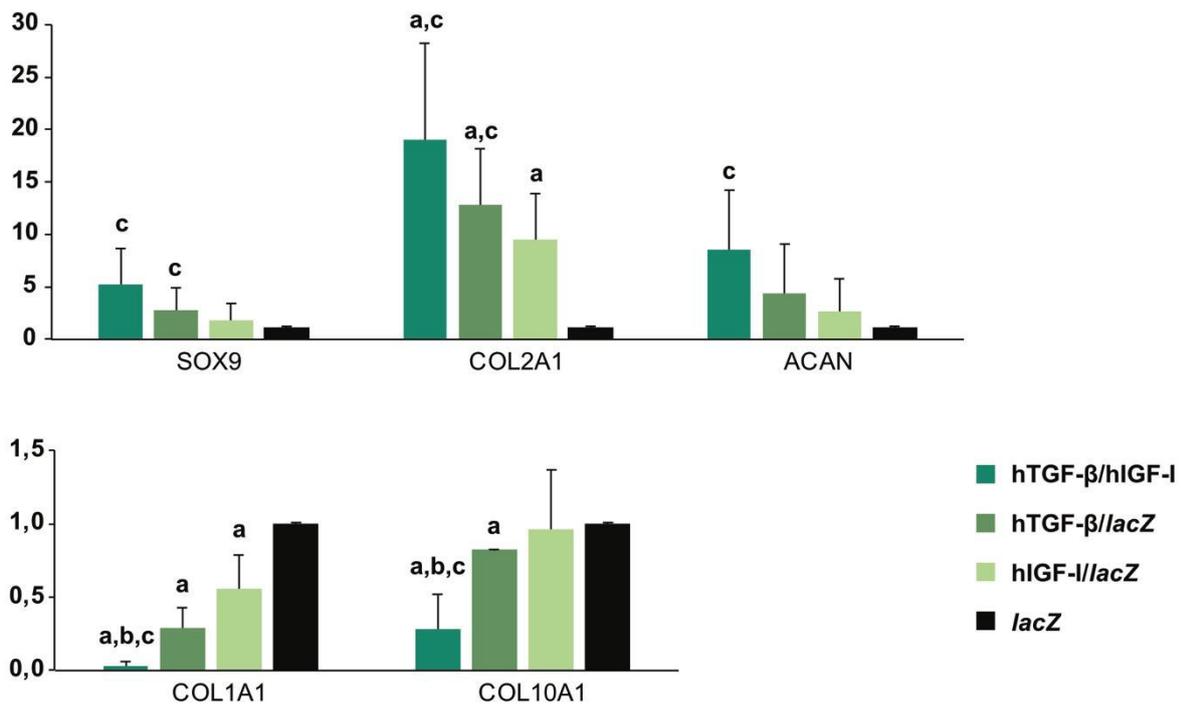


Abbildung 30. Übersicht über die Ergebnisse der *Real-time RT-PCR*-Analysen von rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten. Die *Real-time RT-PCR* wurde 21 Tage nach erfolgter Transduktion durchgeführt.

7.2 Humane osteochondrale Defektmodelle

7.2.1 Analysen der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I

Eine erfolgreiche und dauerhafte rAAV-basierte Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I wurde für alle untersuchten Gruppen verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen mittels *ELISA* über eine dauerhafte Sekretion der entsprechenden therapeutischen Proteine sowie mittels immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen. Die quantitativ höchsten Expressionsniveaus von hTGF- β und hIGF-I wurden nach Beendigung der Kultivierungsperiode von 21 Tagen jeweils in den kombiniert-transduzierten Proben mit hTGF- β /hIGF-I erzielt (**Tabelle 31** und **Tabelle 32**).

7.2.1.1 Analyse der Transgenexpression mittels *ELISA*

Die hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben wiesen signifikant höhere Sekretionsspiegel von hTGF- β auf ($P \leq 0,001$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (3,6-fache Differenz) und mit den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (1,7-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*; 3,5-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*) (**Tabelle 31**). Eine signifikant höhere Sekretion von hTGF- β fand sich auch in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben ($P \leq 0,010$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (jeweils 2,1-fache Differenz). Zwischen den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben und der Negativkontrolle *lacZ* wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich einer Sekretion von hTGF- β nachgewiesen ($P = 0,500$). Die hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben wiesen ebenfalls signifikant höhere Sekretionsspiegel von hIGF-I auf (jeweils $P = 0,010$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,4-fache Differenz) und mit den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (1,3-fache Differenz). Gegenüber den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Sekretion von hIGF-I in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben ($P = 0,430$). Die hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben wiesen eine signifikante Erhöhung der Sekretionsspiegel von hIGF-I auf im Vergleich zu den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben und zur Negativkontrolle (jeweils 1,3-fache Differenz, $P \leq 0,040$). Es lag kein signifikanter Unterschied in Bezug auf eine Sekretion von hIGF-I zwischen den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben und der Negativkontrolle *lacZ* vor ($P = 0,353$).

Tabelle 31. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner osteochondraler Defektmodelle mittels *ELISA*.

<i>ELISA</i>	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
TGF- β [pg/ml]	156 \pm 74	333 \pm 58 ^a	158 \pm 90	556 \pm 70 ^{a,b,c}
IGF-I [pg/ml]	53 \pm 7	55 \pm 8	71 \pm 16 ^{a,b}	73 \pm 18 ^{a,b}

Die Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner osteochondraler Defektmodelle wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion anhand der Sekretion der entsprechenden Proteine mittels *ELISA* untersucht. Die Sekretionsniveaus von hTGF- β und hIGF-I sind in pg/ml angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a/*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.2.1.2 Analyse der Transgenexpression mittels immunhistochemischen Färbungen

Die Ergebnisse der *ELISA*-Analysen wurden mittels spezifischen immunhistochemischen Färbungen nach Beendigung der Kultivierungsperiode von 21 Tagen bestätigt, indem der Anteil immunreaktiver Zellen für hTGF- β und hIGF-I an der Gesamtzellzahl ermittelt wurde (**Tabelle 32** und **Abbildung 31**).

Analyse der Transgenexpression von hTGF- β

Signifikant erhöhte Immunreaktivität für hTGF- β wiesen wir im Bereich des osteochondralen Defekts in den kombiniert-transduzierten Proben mit hTGF- β /hIGF-I ($P \leq 0,020$) nach verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (7,8-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (1,2-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (7,8-fache Differenz) (**Tabelle 32** und **Abbildung 31**). Ebenfalls fand sich eine signifikant erhöhte Immunreaktivität für hTGF- β im perifokalen Knorpelgewebe der hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben ($P \leq 0,040$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (37-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (1,2-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (24,7-fache Differenz). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben wiesen ebenfalls signifikant erhöhte Immunreaktivität für hTGF- β auf im Bereich des osteochondralen Defekts ($P \leq 0,001$) und im perifokalen Knorpelgewebe (jeweils $P = 0,005$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (6,4- und 31,0-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (6,4- und 20,7-fache Differenz). Zwischen den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben und der Negativkontrolle *lacZ* lag kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Immunreaktivität für hTGF- β vor (osteochondraler Defekt: $P = 0,500$; perifokales Knorpelgewebe: $P = 0,232$).

Analyse der Transgenexpression von hIGF-I

Die kombiniert-transduzierten Proben mit hTGF- β /hIGF-I wiesen ebenfalls eine signifikant höhere Immunreaktivität für hIGF-I im Bereich des osteochondralen Defekts auf ($P \leq 0,002$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (6,6-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (4,8-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,2-fache Differenz) (**Tabelle 32** und **Abbildung 31**). Signifikant erhöhte Immunreaktivität für hIGF-I fand sich in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben auch im perifokalen Knorpelgewebe ($P \leq 0,041$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (10,7-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (4,3-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,2-fache Differenz). Signifikant erhöhte Immunreaktivität für hIGF-I wurde ebenfalls in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben nachgewiesen im Bereich des osteochondralen Defekts ($P \leq 0,001$) und im perifokalen Knorpelgewebe ($P \leq 0,020$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (5,8- und 9,3-fache Differenz) und den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (4,2- und 3,7-fache Differenz). Zwischen den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben und der Negativkontrolle *lacZ* fand sich kein signifikanter Effekt in Bezug auf eine Immunreaktivität für hIGF-I (osteochondraler Defekt: $P = 0,077$; perifokales Knorpelgewebe $P = 0,240$).

Tabelle 32. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner osteochondraler Defektmodelle mittels TGF- β - und IGF-I-Immunhistochemie.

Immunreaktivität	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
hTGF-β⁺-Zellen [%]				
osteochondraler Defekt	12 \pm 2	77 \pm 8 ^{a,c}	12 \pm 5	93 \pm 1 ^{a,b,c}
perifokales Knorpelgewebe	2 \pm 1	62 \pm 6 ^{a,c}	3 \pm 1	74 \pm 6 ^{a,b,c}
hIGF-I⁺-Zellen [%]				
osteochondraler Defekt	13 \pm 3	18 \pm 4	76 \pm 3 ^{a,b}	86 \pm 2 ^{a,b,c}
perifokales Knorpelgewebe	6 \pm 2	15 \pm 4	56 \pm 3 ^{a,b}	64 \pm 5 ^{a,b,c}

Die Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner osteochondraler Defektmodelle wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion anhand der Immunreaktivität für TGF- β und IGF-I untersucht. Es erfolgte eine separate Evaluation des osteochondralen Defekts und des perifokalen Knorpelgewebes. Der Anteil hTGF- β ⁺-Zellen und hIGF-I⁺-Zellen ist jeweils in % angegeben bezogen auf die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

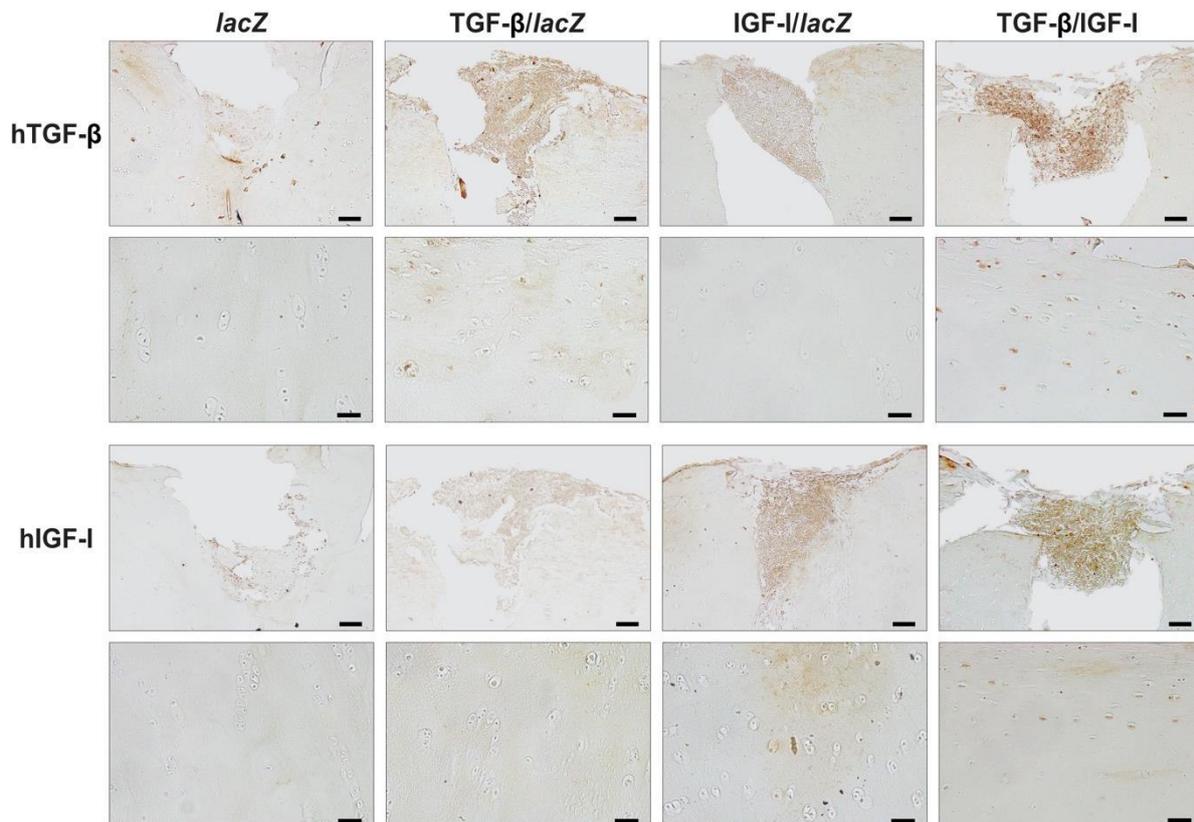


Abbildung 31. Analyse der Transgenexpression von hTGF- β und hIGF-I rAAV-basiert transduzierter humaner osteochondraler Defektmodelle mittels TGF- β - und IGF-I-Immunhistochemie. Darstellung des osteochondralen Defekts (jeweils obere Reihe) und des perifokalen Knorpelgewebes (jeweils untere Reihe). Die Intensität der Braunfärbung reflektiert die Immunreaktivität für hTGF- β bzw. hIGF-I. Maßstabebenen: 100 μ m (jeweils obere Reihe) und 50 μ m (jeweils untere Reihe).

7.2.2 Evaluation biosynthetischer, proliferativer und chondrogener Differenzierungsaktivitäten

7.2.2.1 Analyse der Zellzahl mittels DNS-Bestimmung

Der DNS-Gehalt diente als Bezugsparameter für die Zellzahl (**Tabelle 33**). Signifikant erhöhte DNS-Gehalte fanden sich in den kombiniert-transduzierten Proben mit hTGF- β /hIGF-I ($P \leq 0,020$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,3-fache Differenz) und den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (1,2-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*; 1,3-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben wiesen erhöhte DNS-Gehalte gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben auf (jeweils 1,2-fache Differenz, $P \geq 0,060$). Zwischen den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben und der Negativkontrolle *lacZ* lag kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des DNS-Gehalts vor ($P = 0,440$).

Tabelle 33. Analyse der Zellzahl von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Bestimmung des DNS-Gehalts.

DNS	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
DNS-Gehalt [ng/ μ g Gesamtprotein]	0,39 \pm 0,26	0,45 \pm 0,30	0,39 \pm 0,25	0,52 \pm 0,32 ^{a,b,c}

Die Zellzahl von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mittels biochemischer Bestimmung des DNS-Gehalts untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung in ng/ μ g angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a/*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.2.2.2 Analyse der Zellzahl mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die kombiniert transduzierten Proben mit hTGF- β /hIGF-I wiesen eine signifikant erhöhte Zelldichte im implantierten humanen MSZ-Aggregat auf ($P \leq 0,020$) im Vergleich zu den Proben der Negativkontrolle *lacZ* (3,2-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (jeweils 2,0-fache Differenz) (**Tabelle 34** und **Abbildung 32**). Eine signifikant erhöhte Zelldichte detektierten wir in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben ($P \leq 0,040$) ebenfalls im perifokalen Knorpelgewebe gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (2,0-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (1,2-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,7-fache Differenz). In den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben wurde im implantierten humanen MSZ-Aggregat jeweils eine signifikant erhöhte Zelldichte nachgewiesen verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,7-fache und 1,6-fache Differenz,

$P = 0,044$ und $P = 0,006$). Zwischen den hTGF- β /*lacZ*- und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben fand sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Zelldichte im implantierten humanen MSZ-Aggregat ($P = 0,390$). Signifikant erhöhte Zelldichten detektierten wir hingegen im perifokalen Knorpelgewebe der hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben ($P \leq 0,040$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,6-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,4-fache Differenz). Das perifokale Knorpelgewebe der hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben wies keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zelldichte auf gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* ($P = 0,090$).

Tabelle 34. Analyse der Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Zelldichte [Zellen/mm ²]	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
osteochondraler Defekt	3.467 \pm 115	5.767 \pm 1.156 ^a	5.608 \pm 300 ^a	11.308 \pm 1.556 ^{a,b,c}
perifokales Knorpelgewebe	145 \pm 21	238 \pm 75 ^{a,c}	168 \pm 11	286 \pm 80 ^{a,b,c}

Analyse der Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen 21 Tage nach erfolgter Transduktion mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

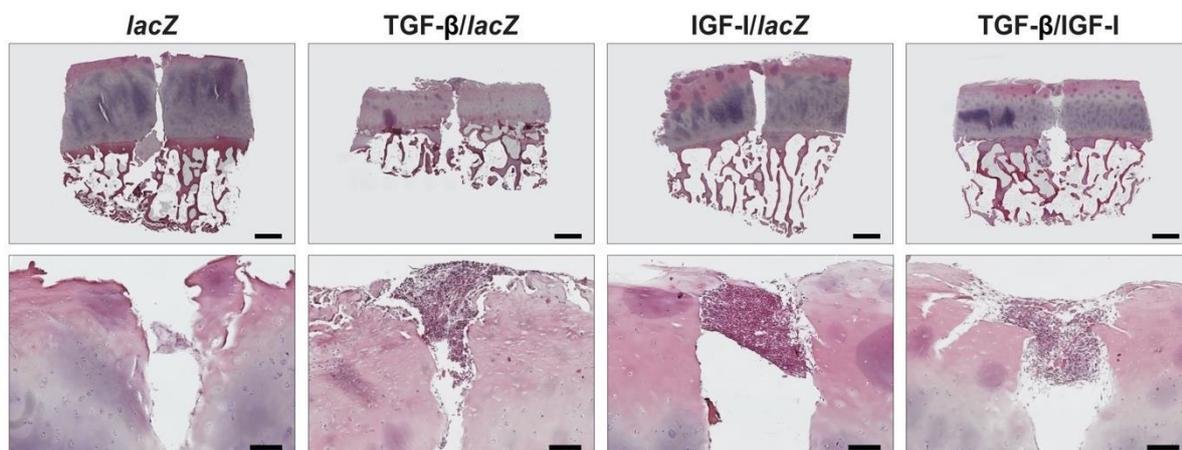


Abbildung 32. Analyse der Zelldichte von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Zellkerne sind rot angefärbt; dies ermöglicht eine Auszählung der Zellen pro Fläche. Vollständiges Präparat (obere Reihe) und Vergrößerung des osteochondralen Defekts (untere Reihe). Maßstab Balken: 1 mm (obere Reihe) und 200 μ m (untere Reihe).

7.2.2.3 Analyse des Proteoglykangehalts mittels biochemischen Analysen

Ein signifikant erhöhter Proteoglykangehalt lag in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben vor ($P \leq 0,020$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,8-fache Differenz) und den

Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Gen rAAV-basiert appliziert wurde (1,3-fache Differenz *versus* hTGF- β //*lacZ*; 1,5-fache Differenz *versus* hIGF-I//*lacZ*) (**Tabelle 35**). Die hTGF- β //*lacZ*-transduzierten Proben wiesen einen signifikant erhöhten Proteoglykangehalt gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* auf (1,4-fache Differenz, $P = 0,030$), jedoch keinen signifikanten Unterschied gegenüber den hIGF-I//*lacZ*-transduzierten Proben ($P = 0,200$). In den hIGF-I//*lacZ*-transduzierten Proben lag ein 1,3-fach erhöhter Proteoglykangehalt vor verglichen mit Negativkontrolle *lacZ* ($P = 0,090$). Die kombiniert transduzierten Proben mit hTGF- β /hIGF-I wiesen zudem einen signifikant erhöhten Proteoglykangehalt bezogen auf den DNS-Gehalt auf ($P \leq 0,030$) im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* (1,4-fache Differenz), den hTGF- β //*lacZ*-transduzierten Proben (1,2-fache Differenz) und den hIGF-I//*lacZ*-transduzierten Proben (1,3-fache Differenz). Ein signifikant erhöhter Proteoglykangehalt bezogen auf den DNS-Gehalt lag in den hTGF- β //*lacZ*-transduzierten Proben vor verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,2-fache Differenz, $P = 0,030$). Zwischen den hTGF- β //*lacZ*-transduzierten Proben und den hIGF-I//*lacZ*-transduzierten Proben sowie zwischen den hIGF-I//*lacZ*-transduzierten Proben und der Negativkontrolle *lacZ* lag kein signifikanter Effekt hinsichtlich des Proteoglykangehalts bezogen auf den DNS-Gehalt vor ($P \geq 0,150$).

Tabelle 35. Analyse biosynthetischer Aktivitäten von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels biochemischen Untersuchungen.

Proteoglykane	<i>lacZ</i>	hTGF- β // <i>lacZ</i>	hIGF-I// <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
Proteoglykangehalt [$\mu\text{g}/\text{mg}$ Gesamtprotein]	12 ± 7	$17 \pm 12^{\text{a}}$	15 ± 8	$22 \pm 13^{\text{a,b,c}}$
Proteoglykangehalt/ DNS-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{ng}$]	$0,11 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,07^{\text{a}}$	$0,12 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,07^{\text{a,b,c}}$

Die biosynthetischen Aktivitäten von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen wurden an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mittels biochemischer Bestimmung des Proteoglykangehalts untersucht. Der Bezug des Proteoglykangehalts auf den DNS-Gehalt gibt das Verhältnis der proliferativen Aktivitäten bezogen auf die metabolischen (anabolen) Aktivitäten an. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β //*lacZ*, ^chIGF-I//*lacZ*.

7.2.2.4 Analyse des Proteoglykangehalts mittels Safranin-O-Färbung

Die Ergebnisse des biochemisch bestimmten Proteoglykangehalts der transduzierten Proben wurden histologisch mittels Safranin-O-Färbung verifiziert (**Tabelle 36** und **Abbildung 33**). Unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern lag ein signifikant erhöhter Proteoglykangehalt im implantierten humanen MSZ-Aggregat der hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben vor ($P \leq 0,001$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (8,0-fache Differenz) und den hIGF-I//*lacZ*-transduzierten Proben (24,0-fache Differenz); es fand sich kein

signifikanter Unterschied bezüglich des Proteoglykangehalts gegenüber den hTGF- β //lacZ-transduzierten Proben ($P = 0,260$). Im perifokalen Knorpelgewebe fand sich in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben ein signifikant erhöhter Proteoglykangehalt ($P \leq 0,030$) verglichen mit der Negativkontrolle lacZ (2,9-fache Differenz), den hTGF- β //lacZ-transduzierten Proben (1,5-fache Differenz) und den hIGF-I//lacZ-transduzierten Proben (2,0-fache Differenz). Die hTGF- β //lacZ-transduzierten Proben wiesen im implantierten humanen MSZ-Aggregat einen signifikant erhöhten Proteoglykangehalt auf ($P \leq 0,001$) gegenüber der Negativkontrolle lacZ (7-fache Differenz) und den hIGF-I//lacZ-transduzierten Proben (21-fache Differenz). Im perifokalen Knorpelgewebe wiesen sie einen signifikant erhöhten Proteoglykangehalt auf verglichen mit der Negativkontrolle lacZ (2,0-fache Differenz, $P = 0,010$). Zwischen den hIGF-I//lacZ-transduzierten Proben und der Negativkontrolle lacZ lag kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Proteoglykangehalt im implantierten humanen MSZ-Aggregat vor ($P = 0,500$), im perifokalen Knorpelgewebe wurde gegenüber der Negativkontrolle lacZ ein signifikant erhöhter Proteoglykangehalt nachgewiesen (1,5-fache Differenz, $P < 0,030$).

Tabelle 36. Analyse des Proteoglykangehalts von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Safranin-O-Färbung.

Proteoglykane	lacZ	hTGF- β //lacZ	hIGF-I//lacZ	hTGF- β /hIGF-I
osteochondraler Defekt	0,3 \pm 0,4	2,1 \pm 0,8 ^{a,c}	0,1 \pm 0,4	2,4 \pm 0,7 ^{a,c}
perifokales Knorpelgewebe	1,3 \pm 0,5	2,6 \pm 1,0 ^a	1,9 \pm 0,6 ^a	3,8 \pm 0,5 ^{a,b,c}

Der Proteoglykangehalt von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion mittels Safranin-O-Färbung untersucht. Es erfolgte eine separate Evaluation des osteochondralen Defekts und des perifokalen Knorpelgewebes unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^alacZ, ^bhTGF- β //lacZ, ^chIGF-I//lacZ.

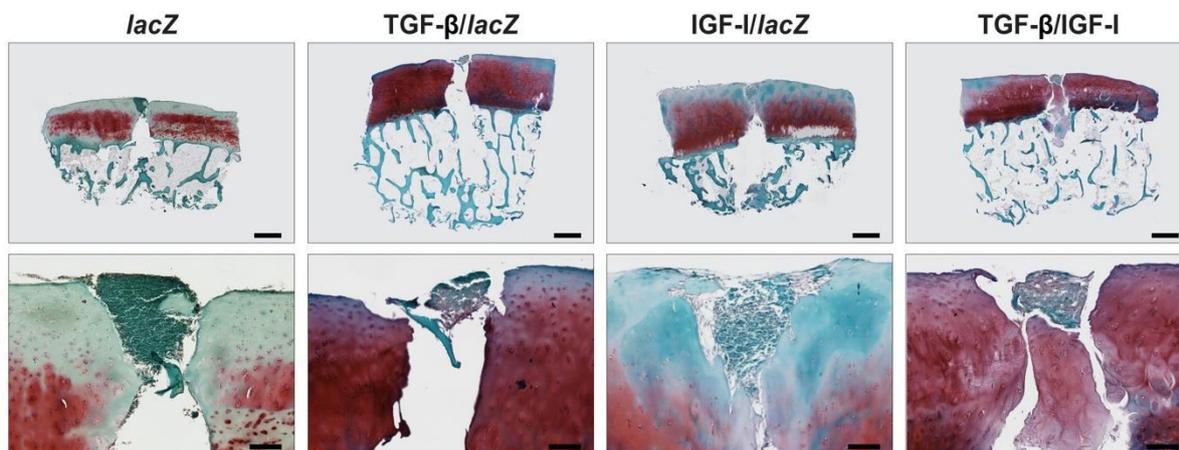


Abbildung 33. Analyse des Proteoglykangehalts von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Safranin-O-Färbung. Die Intensität der Rotfärbung reflektiert den Proteoglykangehalt. Vollständiges Präparat (obere Reihe) und Vergrößerung des osteochondralen Defekts (untere Reihe). Maßstabalken: 1 mm (obere Reihe) und 200 μ m (untere Reihe).

7.2.2.5 Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression mittels immunhistochemischer Färbung

Signifikant erhöhte Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen fand sich in den implantierten humanen MSZ-Aggregaten der kombiniert transduzierten Proben mit hTGF- β und hIGF-I ($P \leq 0,030$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (3,8-fache Differenz) und den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (1,3-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*; 1,7-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*) (**Tabelle 37** und **Abbildung 34**). Das perifokale Knorpelgewebe wies in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben ebenfalls signifikant erhöhte Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen auf gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (6,0-fache Differenz, $P = 0,002$) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,7-fache Differenz, $P = 0,040$). Gegenüber den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben wiesen die hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben eine 1,2-fach erhöhte Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen im perifokalen Knorpelgewebe auf ($P = 0,100$). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben wiesen eine signifikant erhöhte Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen im implantierten humanen MSZ-Aggregat ($P \leq 0,030$) und im perifokalen Knorpelgewebe ($P \leq 0,030$) auf im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* (3,0- und 5,0-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,3- und 1,4-fache Differenz). In den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben zeigte sich im implantierten humanen MSZ-Aggregat ($P = 0,010$) und im perifokalen Knorpelgewebe ($P = 0,040$) eine signifikante Erhöhung der Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (2,3- und 3,6-fache Differenz).

Tabelle 37. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie.

Typ-II-Kollagen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
osteochondraler Defekt	1,0 \pm 0,8	3,0 \pm 0,1 ^{a,c}	2,3 \pm 0,5 ^a	3,8 \pm 0,5 ^{a,b,c}
perifokales Knorpelgewebe	0,5 \pm 0,1	2,5 \pm 0,6 ^{a,c}	1,8 \pm 0,5 ^a	3,0 \pm 0,8 ^{a,c}

Die Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion anhand der Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern untersucht. Es erfolgte eine separate Evaluation des osteochondralen Defektes und des perifokalen Knorpelgewebes. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

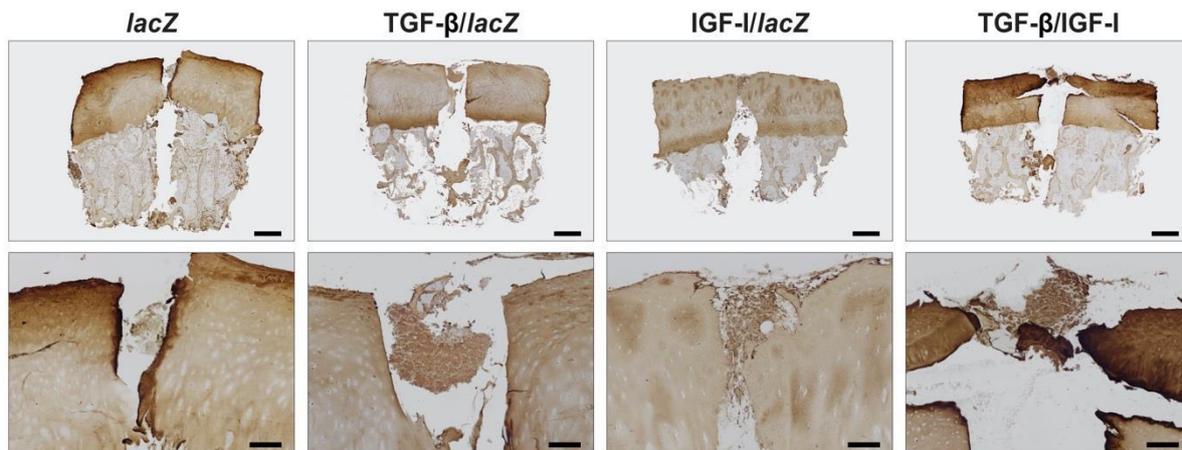


Abbildung 34. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie. Die Intensität der Braunfärbung reflektiert die Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen. Vollständiges Präparat (obere Reihe) und Vergrößerung des osteochondralen Defekts (untere Reihe). Maßstabstrecken: 1 mm (obere Reihe) und 200 μ m (untere Reihe).

7.2.3 Evaluation osteogener und hypertropher Differenzierungsaktivitäten

7.2.3.1 Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression mittels immunhistochemischer Färbung

Signifikant verminderte osteogene Differenzierungsaktivitäten, entsprechend einer erniedrigten Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen, fanden sich in den implantierten humanen MSZ-Aggregaten der hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* (2,8-fache Differenz, $P < 0,001$) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (2,7-fache Differenz, $P < 0,001$) (**Tabelle 38** und **Abbildung 35**). Gegenüber den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben fand sich im implantierten humanen MSZ-Aggregat der hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben eine 1,4-fach geringere Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen ($P = 0,090$). Im perifokalen Knorpelgewebe der hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben lag gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (1,9-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,7-fache Differenz) eine signifikant verminderte Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen vor ($P \leq 0,001$). Gegenüber den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben detektierten wir im perifokalen Knorpelgewebe der hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben eine 1,3-fache Verminderung der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen ($P = 0,120$). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben wiesen im implantierten humanen MSZ-Aggregat eine signifikant verminderte Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen auf ($P \leq 0,001$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (2,1-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (2,0-fache Differenz). Im perifokalen Knorpelgewebe wiesen die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben eine signifikant erniedrigte Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen auf gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (1,5-fache Differenz, $P = 0,020$). Gegenüber den hIGF-I/*lacZ*-

transduzierten Proben fand sich eine 1,3-fache Verminderung der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen im perifokalen Knorpelgewebe der hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben ($P = 0,130$). Zwischen den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben und der Negativkontrolle *lacZ* fand sich weder im implantierten humanen MSZ-Aggregat noch im perifokalen Knorpelgewebe ein relevanter Unterschied bezüglich der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen ($P \geq 0,230$).

Tabelle 38. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Typ-I-Kollagen-Immunhistochemie.

Typ-I-Kollagen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
osteochondraler Defekt	3,1 \pm 0,8	1,5 \pm 0,7 ^{a,c}	3,0 \pm 0,5	1,1 \pm 0,4 ^{a,c}
perifokales Knorpelgewebe	2,9 \pm 0,6	2,0 \pm 0,8 ^a	2,6 \pm 0,7	1,5 \pm 0,5 ^{a,c}

Die Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion anhand der Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern untersucht. Es erfolgte eine separate Evaluation des osteochondralen Defekts und des perifokalen Knorpelgewebes. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

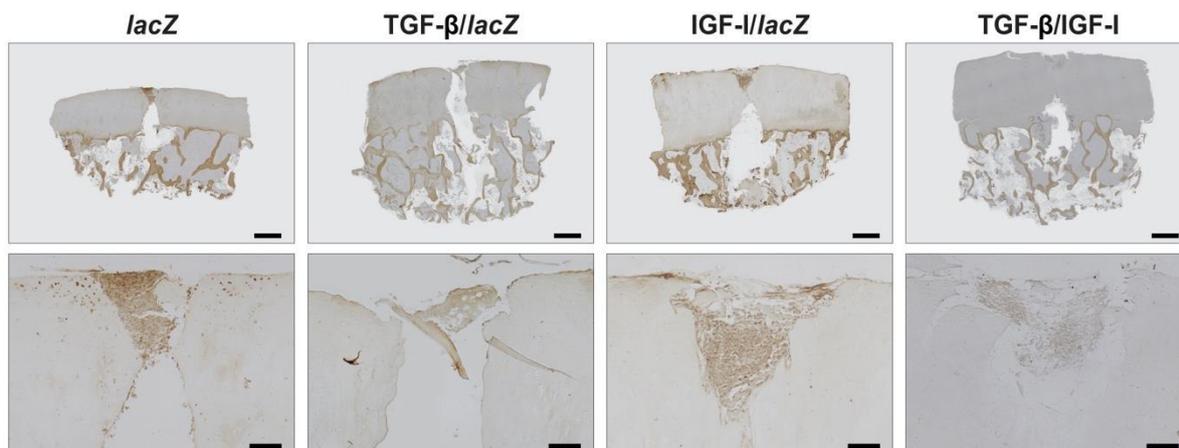


Abbildung 35. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Typ-I-Kollagen-Immunhistochemie. Die Intensität der Braunfärbung reflektiert die Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen. Vollständiges Präparat (obere Reihe) und Vergrößerung des osteochondralen Defekts (untere Reihe). Maßstab Balken: 1 mm (obere Reihe) und 200 μ m (untere Reihe).

7.2.3.2 Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression mittels immunhistochemischer Färbung

Eine signifikante Verminderung hypertropher Differenzierungsaktivitäten, entsprechend einer verminderten Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen, lag im implantierten humanen MSZ-Aggregat der hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben vor verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (2,3-fache Differenz, $P \leq 0,001$) (**Tabelle 39** und **Abbildung 36**); gegenüber den Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes therapeutisches Gen rAAV-basiert appliziert wurde, fand sich eine Verminderung der Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen im implantierten

humanen MSZ-Aggregat (1,5-fache Differenz *versus* hTGF- β /*lacZ*; 1,8-fache Differenz *versus* hIGF-I/*lacZ*; jeweils $P = 0,100$). Im perifokalen Knorpelgewebe fand sich in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben eine signifikant verminderte Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen ($P \leq 0,007$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (3,6-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (3,3-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (2,6-fache Differenz). Die implantierten humanen MSZ-Aggregate der hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben wiesen eine signifikant verminderte Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen auf verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,6-fache Differenz, $P \leq 0,001$); verglichen mit den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben lag kein signifikanter Effekt vor ($P = 0,260$). Im perifokalen Knorpel der hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben lag ebenfalls keine signifikante Verminderung der Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen vor im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben ($P = 0,230$). Weiterhin lag kein signifikanter Effekt im implantierten humanen MSZ-Aggregat und im perifokalen Knorpelgewebe der hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* vor ($P \geq 0,060$).

Tabelle 39. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie.

Typ-X-Kollagen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
osteochondraler Defekt	3,0 \pm 0,8	1,9 \pm 1,1 ^a	2,3 \pm 0,9	1,3 \pm 0,5 ^a
perifokales Knorpelgewebe	2,9 \pm 0,6	2,6 \pm 0,5	2,1 \pm 1,0	0,8 \pm 0,7 ^{a,b,c}

Die Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen wurde an Tag 21 nach erfolgter Transduktion anhand der Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen unter Anwendung des modifizierten Bewertungssystems aus Bern untersucht. Es erfolgte eine separate Evaluation des osteochondralen Defekts und des perifokalen Knorpelgewebes. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

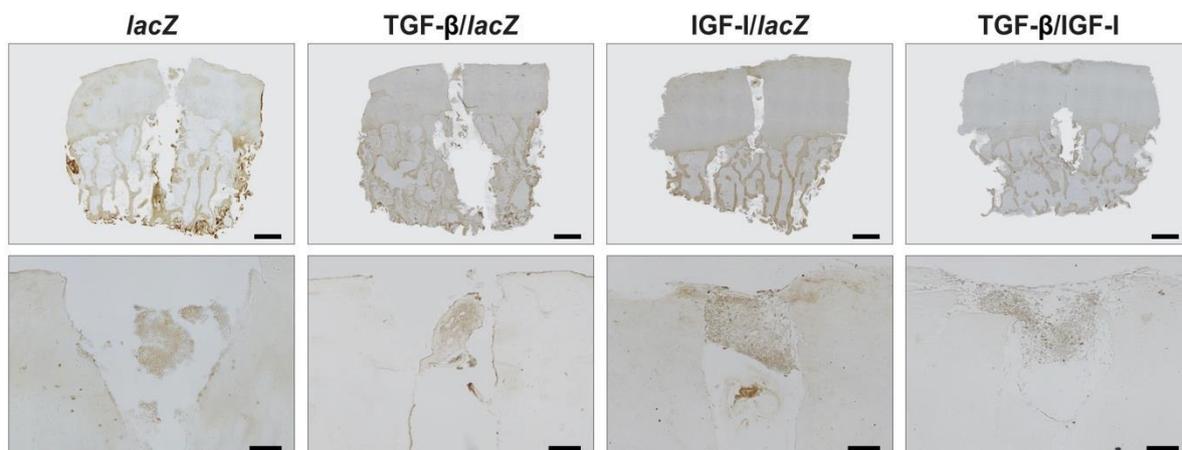


Abbildung 36. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie. Die Intensität der Braunfärbung reflektiert die Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen. Vollständiges Präparat (obere Reihe) und Vergrößerung des osteochondralen Defekts (untere Reihe). Maßstab: 1 mm (obere Reihe) und 200 μ m (untere Reihe).

7.2.4 Real-time RT-PCR-Analysen

7.2.4.1 Analyse der SOX9-Expression

Signifikant verbesserte chondrogene Differenzierungsaktivitäten nach 21 Tagen, entsprechend einer signifikant erhöhten SOX9-Expression, fanden sich in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben ($P \leq 0,014$) im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* (6,4-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (3,1-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (3,7-fache Differenz) (**Tabelle 40** und **Abbildung 37**). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben wiesen ebenfalls eine signifikant erhöhte SOX9-Expression auf ($P \leq 0,042$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (2,1-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,7-fache Differenz). Weiterhin wiesen die hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben eine signifikante Erhöhung der SOX9-Expression auf verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,7-fache Differenz, $P \leq 0,001$).

Tabelle 40. Analyse der SOX9-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels *Real-time* RT-PCR.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
SOX9	1,00 \pm 0,00	2,07 \pm 0,04 ^{a,c}	1,74 \pm 0,10 ^a	6,37 \pm 0,31 ^{a,b,c}

Die Evaluation der SOX9-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.2.4.2 Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression

Signifikant verbesserte chondrogene Differenzierungsaktivitäten nach 21 Tagen, entsprechend einer signifikant erhöhten Typ-II-Kollagen-Expression (*COL2A1*), lag in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben vor verglichen mit den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (2,7-fache Differenz, $P = 0,032$) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (5,3-fache Differenz, $P \leq 0,001$) (**Tabelle 41** und **Abbildung 37**). Gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* wiesen die hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben eine 6,1-fach höhere Typ-II-Kollagen-Expression auf ($P = 0,057$). Eine erhöhte Expression von Typ-II-Kollagen fand sich in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (2,2-fache Differenz, $P = 0,099$) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (2,0-fache Differenz, $P = 0,198$). Zwischen den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben und der Negativkontrolle *lacZ* lag kein signifikanter Effekt in Bezug auf eine Expression von Typ-II-Kollagen vor ($P = 0,118$).

Tabelle 41. Analyse der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels *Real-time RT-PCR*.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
<i>COL2A1</i>	1,00 \pm 0,00	2,24 \pm 1,43	1,15 \pm 0,19	6,06 \pm 0,12 ^{b,c}

Die Evaluation der Typ-II-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.2.4.3 Analyse der Aggrekan-Expression

Eine signifikant erhöhte Expression von Aggrekan (*ACAN*) indizierte nach 21 Tagen verbesserte chondrogene Differenzierungsaktivitäten in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* (6,4-fache Differenz, $P = 0,012$) (**Tabelle 42** und **Abbildung 37**). Die hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben wiesen eine erhöhte Aggrekan-Expression auf gegenüber den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (3,0-fache Differenz, $P = 0,066$) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (4,1-fache Differenz, $P = 0,054$). Eine erhöhte Expression von Aggrekan fand ebenfalls in den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben statt verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (2,2-fache Differenz, $P = 0,007$) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,4-fache Differenz, $P = 0,186$). Die hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben wiesen eine 1,6-fach erhöhte Aggrekan-Expression auf im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* ($P = 0,083$).

Tabelle 42. Analyse der Aggrekan-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels *Real-time RT-PCR*.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
<i>ACAN</i>	1,00 \pm 0,00	2,16 \pm 0,43 ^a	1,57 \pm 0,59	6,42 \pm 2,40 ^a

Die Evaluation der Aggrekan-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

7.2.4.4 Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression

Signifikant verminderte osteogene Differenzierungsaktivitäten nach 21 Tagen, entsprechend einer signifikant verminderten Expression von Typ-I-Kollagen (*COL1A1*), fanden in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben statt ($P \leq 0,001$) im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ* (1,6-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (1,3-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,5-fache Differenz) (**Tabelle 43** und **Abbildung 37**). Die

hTGF- β //*lacZ*-transduzierten Proben wiesen eine signifikant verminderte Typ-I-Kollagen-Expression auf verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* und den hIGF-I//*lacZ*-transduzierten Proben (jeweils 1,2-fache Differenz, $P \leq 0,036$). Die hIGF-I//*lacZ*-transduzierten Proben wiesen eine 1,1-fache, signifikant verminderte Expression von Typ-I-Kollagen auf gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* ($P = 0,002$).

Tabelle 43. Analyse der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels *Real-time RT-PCR*.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β // <i>lacZ</i>	hIGF-I// <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
<i>COL1A1</i>	1,00 \pm 0,00	0,80 \pm 0,07 ^{a,c}	0,95 \pm 0,01 ^a	0,63 \pm 0,03 ^{a,b,c}

Die Evaluation der Typ-I-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β //*lacZ*, ^chIGF-I//*lacZ*.

7.2.4.5 Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression

Signifikant verminderte hypertrophe Differenzierungsaktivitäten nach 21 Tagen, entsprechend einer signifikanten Reduktion der Expression von Typ-X-Kollagen (*COL10A1*), fanden in den hTGF β /hIGF-I-transduzierten Proben statt verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (1,4-fache Differenz, $P = 0,002$) und den hIGF-I//*lacZ*-transduzierten Proben (1,4-fache Differenz, $P = 0,018$) (**Tabelle 44** und **Abbildung 37**). Gegenüber den hTGF- β //*lacZ*-transduzierten Proben wiesen die hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben eine 1,3-fach verminderte Expression von Typ-X-Kollagen auf ($P = 0,069$). Die Gruppen, welchen jeweils nur ein einzelnes Wachstumsfaktorgen rAAV-basiert appliziert wurde (hTGF- β //*lacZ* und hIGF-I//*lacZ*) wiesen untereinander keinen signifikanten Effekt in Bezug auf eine Typ-X-Kollagen-Expression auf sowie jeweils gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* ($P \geq 0,200$).

Tabelle 44. Analyse der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels *Real-time RT-PCR*.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β // <i>lacZ</i>	hIGF-I// <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
<i>COL10A1</i>	1,00 \pm 0,00	0,92 \pm 0,15	0,97 \pm 0,29	0,72 \pm 0,08 ^{a,c}

Die Evaluation der Typ-X-Kollagen-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β //*lacZ*, ^chIGF-I//*lacZ*.

7.2.4.6 Analyse der Matrix-Metalloproteinase 13-Expression

Eine signifikante Verminderung kataboler Prozesse, entsprechend einer reduzierten Expression von MMP-13, fand in den hTGF- β /hIGF-I-transduzierten Proben statt ($P \leq 0,005$) verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (16,7-fache Differenz), den hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben (1,4-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,7-fache Differenz) (**Tabelle 45** und **Abbildung 37**). Die hTGF- β /*lacZ*-transduzierten Proben wiesen eine reduzierte MMP-13-Expression auf ($P \leq 0,001$) gegenüber der Negativkontrolle *lacZ* (12,5-fache Differenz) und den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben (1,3-fache Differenz). Reduzierte MMP-13-Expression fand auch in den hIGF-I/*lacZ*-transduzierten Proben statt verglichen mit der Negativkontrolle *lacZ* (10-fache Differenz, $P \leq 0,001$).

Tabelle 45. Analyse der Matrix-Metalloproteinase 13-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen mittels *Real-time* RT-PCR.

Gen	<i>lacZ</i>	hTGF- β / <i>lacZ</i>	hIGF-I/ <i>lacZ</i>	hTGF- β /hIGF-I
<i>MMP-13</i>	1,00 \pm 0,00	0,08 \pm 0,01 ^{a,c}	0,11 \pm 0,01 ^{a,b}	0,06 \pm 0,01 ^{a,b,c}

Die Evaluation der Matrix-Metalloproteinase 13-Expression von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen erfolgte 21 Tage nach stattgehabter Transduktion anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode relativ zur Kontrolle GAPDH als Normierungskonstante. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Indizes markieren die statistische Signifikanz gegenüber ^a*lacZ*, ^bhTGF- β /*lacZ*, ^chIGF-I/*lacZ*.

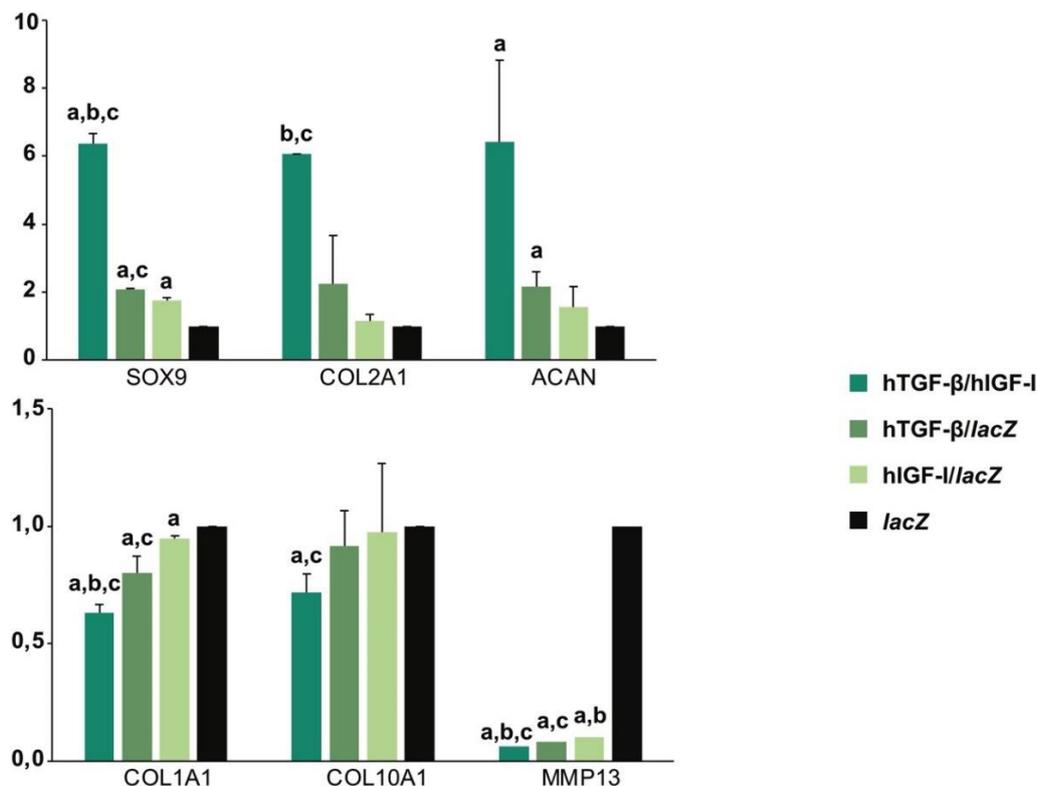


Abbildung 37. Übersicht über die Ergebnisse der *Real-time* RT-PCR-Analysen von rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen. Die *Real-time* RT-PCR-Analysen wurden 21 Tage nach erfolgter Transduktion durchgeführt.

8 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht zwei verschiedene experimentelle Therapieansätze zur Behandlung fokaler osteochondraler Defekte basierend auf der genetischen Modifizierung von humanen MSZ mittels rAAV-Vektoren (**Abbildung 38**). Wir evaluierten einerseits den Effekt eines direkten kombinierten rAAV-basierten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I auf die chondrogenen Differenzierungsaktivitäten von humanen 3D-MSZ-Aggregaten *in vitro* (direktes virales Gentransfermodell) sowie andererseits nach deren Implantation in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo* (indirektes virales Gentransfermodell). Für beide Modelle untersuchten wir die übergeordnete Hypothese, dass ein kombinierter rAAV-basierter Gentransfer von hTGF- β und hIGF-I der Applikation des jeweils einzelnen therapeutischen Wachstumsfaktorgens mittels rAAV-Vektoren in Bezug auf chondroreparative Differenzierungsprozesse überlegen ist.

Das erste wesentliche Ergebnis dieser Studie zeigt, dass der kombinierte rAAV-vermittelte Gentransfer von hTGF- β und hIGF-I nach 21 Tagen sowohl in den humanen 3D-MSZ-Aggregaten (direkter viraler Gentransfer) als auch in den humanen osteochondralen Defektmodellen (indirekter viraler Gentransfer) zu signifikant verbesserten chondrogenen Differenzierungsaktivitäten führt verglichen mit der rAAV-basierten Applikation des jeweils einzelnen therapeutischen Wachstumsfaktorgens und verglichen mit der Negativkontrolle. Das zweite wesentliche Ergebnis dieser Studie belegt, dass der kombinierte rAAV-vermittelte Gentransfer von hTGF- β und hIGF-I nach 21 Tagen ebenfalls sowohl in den humanen 3D-MSZ-Aggregaten (direkter viraler Gentransfer) als auch in den humanen osteochondralen Defektmodellen (indirekter viraler Gentransfer) gleichzeitig zu signifikant verminderten osteogenen, hypertrophen und terminalen Differenzierungsaktivitäten führt.

Die entscheidenden Aspekte dieser Studie zur Verifizierung signifikant verbesserter chondrogener Differenzierungsaktivitäten des direkten und indirekten kombinierten rAAV-vermittelten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I sind signifikant erhöhte Proteoglykangehalte, eine signifikant erhöhte Zellzahl respektive Zelldichte sowie ein erhöhter Typ-II-Kollagen-Gehalt. Die auf der kombinierten direkten und indirekten rAAV-vermittelten Überexpression von hTGF- β und hIGF-I basierenden signifikant verminderten osteogenen und hypertrophen Differenzierungsaktivitäten wurden unter anderem durch signifikant verminderte Produktion von Typ-I- und Typ-X-Kollagen erfasst.

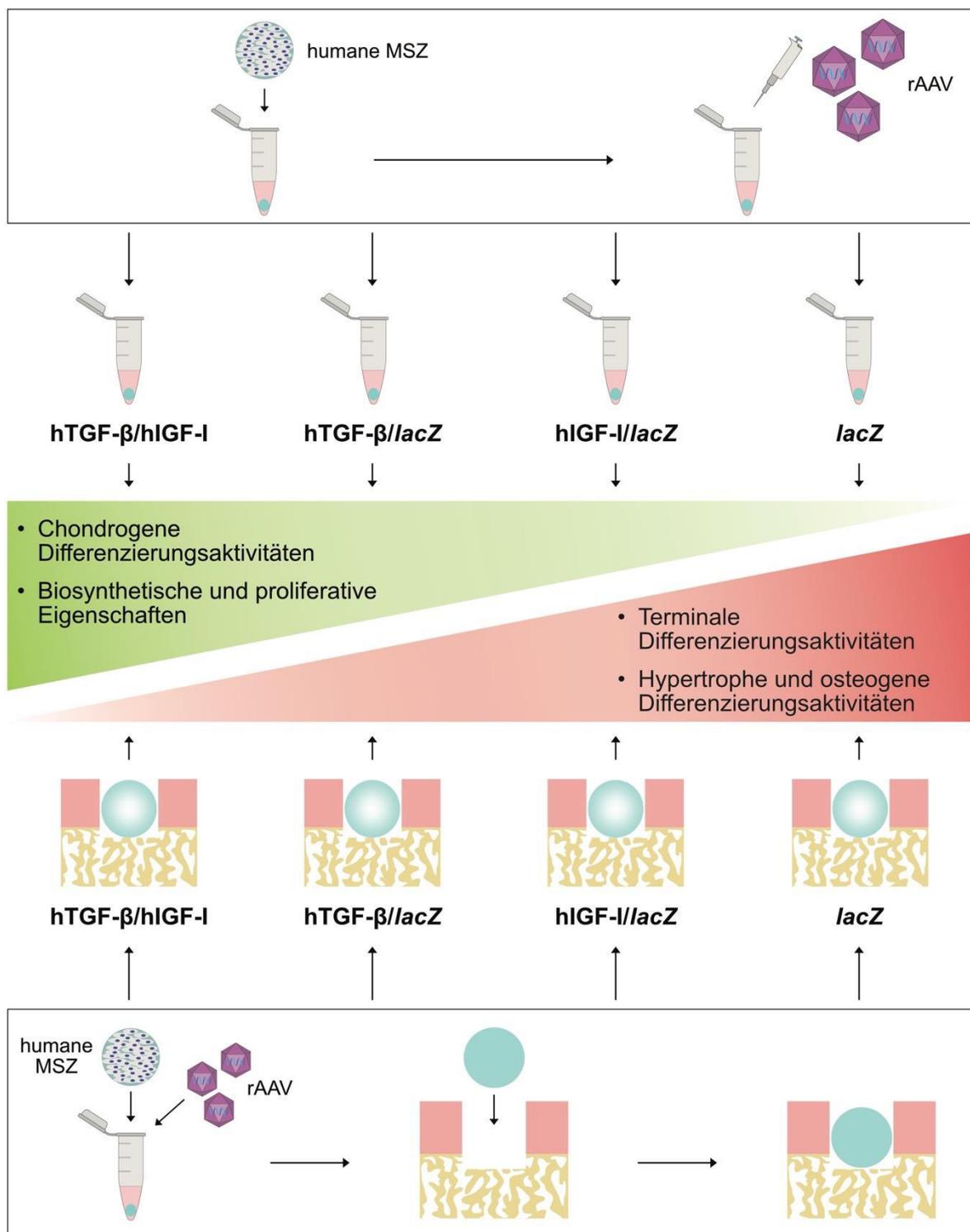


Abbildung 38. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse. hIGF-I = humaner insulinartiger Wachstumsfaktor I; hTGF- β = humaner transformierender Wachstumsfaktor beta; *lacZ* = Reportergen; MSZ = mesenchymale Stromazellen; rAAV = rekombinante adeno-assoziierte virale Vektoren.

8.1 Wirkung eines direkten und indirekten kombinierten rAAV-basierten Gentransfers auf chondroreparative Differenzierungsaktivitäten von humanen mesenchymalen Stromazellen

8.1.1 Analysen der Transgenexpression

Transgenexpression im Rahmen des direkten viralen Gentransfers

Die Daten der vorliegenden Arbeit beweisen eine erfolgreiche und dauerhafte Transgenexpression der therapeutischen Wachstumsfaktoren hTGF- β und hIGF-I mittels rAAV-Vektoren ($MOI = 8$) in humanen 3D-MSZ-Aggregaten in allen untersuchten Gruppen verglichen mit dem Reporter gen *lacZ* über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen [211]. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit denen früherer Studien [67; 108; 109; 235; 301; 321]. Die in den hTGF- β /*lacZ*- und in den hIGF-I/*lacZ*-rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten erzielten Sekretionsspiegel der jeweiligen untersuchten Wachstumsfaktoren korrelierten dabei gut mit denjenigen früherer vergleichbarer Studien von ungefähr 70-100 pg/ml bei einer MOI von 8 [108; 109]. Darüber hinaus erfolgte als wichtigstes Ergebnis hinsichtlich der Transgenexpressionsanalyse der Nachweis einer simultanen Überexpression der beiden untersuchten therapeutischen Wachstumsfaktoren hTGF- β und hIGF-I in humanen 3D-MSZ-Aggregaten über den gesamten Untersuchungszeitraum mittels des kombinierten rAAV-basierten Gentransfers der beiden Wachstumsfaktorgene [211]. Dies lässt auf einen dauerhaften Verbleib der therapeutischen rAAV-Vektoren in diesen Zellen schließen unter vermutlicher Abwesenheit von Interferenzen zwischen den jeweiligen verschiedenen rAAV-Vektoren [301]. Interessanterweise führte der simultane kombinierte rAAV-vermittelte Gentransfer von hTGF- β und hIGF-I in humanen 3D-MSZ-Aggregaten zu jedem Untersuchungszeitpunkt unserer Studie (Tag 2, 7, 14 und 21) zu den höchsten Sekretionsniveaus von hTGF- β und hIGF-I im Vergleich zur separaten rAAV-basierten Applikation der entsprechenden therapeutischen Wachstumsfaktorgene sowie im Vergleich zur Negativkontrolle *lacZ*, sodass eine synergistische Interaktion der eingesetzten Wachstumsfaktoren untereinander anzunehmen ist [211], wie sie bereits mittels adenoviralem Gentransfer in bovinen Chondrozyten [286] und bovinen MSZ [296] vorbeschrieben wurde.

In der vorliegenden Arbeit waren die maximal erzielten Sekretionsspiegel von hTGF- β in allen untersuchten und mit therapeutischen Wachstumsfaktorgenen rAAV-basiert transduzierten Gruppen zu jedem Untersuchungszeitpunkt deutlich höher als diejenigen von hIGF-I. In den rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregaten beobachteten wir zu Untersuchungsbeginn eine dreifach höhere Sekretion von hTGF- β als von hIGF-I, während die

Sekretion von hTGF- β an Tag 21 noch um den Faktor 1,3 erhöht war verglichen mit der Sekretion von hIGF-I [211]. Dies lässt auf eine effektivere rAAV-vermittelte Transgenexpression von hTGF- β schließen verglichen mit der Effektivität der Transgenexpression von hIGF-I. Zu beachten ist jedoch, dass die mittleren Sekretionsspiegel von hTGF- β bei allen untersuchten Gruppen während des gesamten Untersuchungszeitraums von 21 Tagen einer fortlaufenden Verminderung unterlagen, wie sie auch in bovinen MSZ [296] und humanen Knochenmarkspiraten [111] vorzufinden war. Hierbei ist bemerkenswerterweise hervorzuheben, dass die rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregate die geringste Reduktion des hTGF- β -Sekretionsniveaus aufwiesen im Vergleich zu den übrigen untersuchten Gruppen und somit bei kombinierter rAAV-basierter Applikation von hTGF- β /hIGF-I insgesamt eine prolongierte hTGF- β -Expression vorlag. Folglich ist anzunehmen, dass eine regulatorische Interaktion zwischen den jeweiligen Wachstumsfaktoren nicht nur das Ausmaß ihrer Transgenexpression in humanen MSZ beeinflusst, sondern gleichzeitig auch die Überexpression im zeitlichen Verlauf reguliert, vergleichbar mit den Regulationsvorgängen in bovinen Chondrozyten [284; 286].

Im Gegensatz zu den Sekretionsspiegeln von hTGF- β wiesen diejenigen von hIGF-I in der vorliegenden Arbeit keine vergleichbare Dynamik im Verlauf des Untersuchungszeitraums auf. Zwar fand sich in den rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten zu Untersuchungsbeginn an Tag 2 eine gering höhere Sekretion von hIGF-I als in den hIGF-I/*lacZ*-rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten, am Ende des Untersuchungszeitraums wiesen jedoch beide Gruppen ein weitgehend gleiches und gegenüber dem Ausgangswert nur gering reduziertes Sekretionsniveau von hIGF-I auf. Es wurde jedoch zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine höhere Transgenexpression von hIGF-I erreicht als in den Gruppen, welchen kein hIGF-I therapeutisch rAAV-basiert appliziert wurde. Die Negativkontrolle *lacZ* sowie die rAAV-hTGF- β /*lacZ*-transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregate wiesen eine weitgehend gleiche und konstante endogene Sekretion von hIGF-I über den gesamten Untersuchungszeitraum auf. Der simultane rAAV-basierte Gentransfer von hTGF- β und hIGF-I scheint die Expression von hTGF- β positiv zu beeinflussen, während diejenige von hIGF-I weitgehend unverändert bleibt. IGF-I übt daher in erster Linie modulatorische Effekte auf TGF- β aus [226]. Ein nachteiliger Effekt auf die hIGF-I-Transgenexpression, wie bei kombiniertem adenoviralen Gentransfer von SOX9 und IGF-I in humanen MSZ vorbeschrieben [335], stellten wir in Kombination mit hTGF- β jedoch nicht fest.

Unser Nachweis einer erfolgreichen rAAV-basierten simultanen Überexpression von hTGF- β und hIGF-I steht jedoch in Kontrast zu einer früheren Studie von Kawamura *et al.* (2005) [161].

Analog zu unserem Vorgehen transduzierten sie humane MSZ kombiniert und jeweils singular mit TGF- β und IGF-I, im Unterschied zu unserem Vorgehen jedoch bei einer 18,75-fach höheren *MOI* von 150 und unter Verwendung adenoviraler Vektoren [161]. Die TGF- β /IGF-I-transduzierten humanen MSZ lieferten nur geringe Sekretionsniveaus von TGF- β und IGF-I, die deutlich unter denjenigen nach Transduktion mit dem entsprechenden einzelnen Wachstumsfaktorgen lagen [161]. Die resultierenden geringen Expressionsniveaus bei kombiniertem adenoviralem Gentransfer können auf die hohe Vektordosis zurückzuführen sein und einen dadurch bedingten zytotoxischen Effekt [161]. Dementsprechend ist die Auswahl der geeigneten Vektordosis sowie des Vektorsystems (adenoviral *versus* rekombinant adenoviral) kritisch zu prüfen, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Transgenexpression im Rahmen des indirekten viralen Gentransfers

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen ebenfalls eine erfolgreiche und dauerhafte Überexpression der therapeutischen Wachstumsfaktorgene hTGF- β und hIGF-I mittels rAAV-Vektoren (*MOI* = 8) in den humanen osteochondralen Defektmodellen in allen untersuchten Gruppen verglichen mit dem Reporter gen *lacZ* über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen [212]. Analog zu den Ergebnissen der humanen MSZ-Aggregate erfolgte als wichtigstes Ergebnis hinsichtlich der Transgenexpressionsanalyse ebenfalls der Nachweis einer simultanen Überexpression der beiden untersuchten therapeutischen Wachstumsfaktorgene hTGF- β und hIGF-I in den implantierten humanen MSZ-Aggregaten über den gesamten Untersuchungszeitraum mittels des kombinierten rAAV-basierten Gentransfers der beiden Wachstumsfaktorgene [212]. Bemerkenswerterweise war die (kombinierte) Transgenexpression auch im unmittelbar an den osteochondralen Defekt angrenzenden Gelenkknorpel nachweisbar [212]. Dies lässt parakrine Effekte der Wachstumsfaktoren vermuten, die von den *ex vivo* modifizierten Zellen sezerniert werden und schließlich nicht nur lokal begrenzte Wirkungen zeigen, sondern auch über eine gewisse räumliche Distanz hinausgehend [212].

Insgesamt werden auf Grundlage unserer Daten und in Zusammenschau mit den Arbeiten von Kawamura *et al.* (2005) [161], Steinert *et al.* (2009) [296], Shi *et al.* (2013) [286] und Weissenberger *et al.* (2020) [335] fünf Erkenntnisse hinsichtlich eines direkten und indirekten kombinierten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I mittels rAAV-Vektoren gegenüber deren jeweils einzelnen Applikation deutlich: Erstens führt der kombinierte Gentransfer von hTGF- β und hIGF-I mittels rAAV-Vektoren in humanen MSZ zu jedem Untersuchungszeitpunkt zu erhöhten Sekretionsniveaus der jeweiligen Wachstumsfaktoren. Zweitens werden allgemein höhere Sekretionsniveaus von hTGF- β erreicht als von hIGF-I. Drittens ist durch kombinierten

rAAV-basierten Gentransfer von hTGF- β und hIGF-I eine prolongierte Transgenexpression beider angewandter Gene zu erzielen, jedoch ist dieser Effekt aufgrund multipler Interaktionen nicht auf jede beliebige Genkombination übertragbar. Viertens unterliegt die Sekretion von hTGF- β nach initial hohem Ausgangswert im Untersuchungsverlauf einer fortlaufenden Verminderung, wohingegen die Sekretionsniveaus von hIGF-I nahezu konstant sind. Fünftens ist die Auswahl des Vektors und der optimalen Vektordosis entscheidend, um den erwünschten Effekt der kombinierten Überexpression zu erzielen.

8.1.2 Proliferative, biosynthetische und chondrogene Differenzierungsaktivitäten

Proliferative, biosynthetische und chondrogene Differenzierungsaktivitäten im Rahmen des direkten viralen Gentransfers

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die erfolgreiche kombinierte rAAV-basierte Überexpression von hTGF- β und hIGF-I über den Untersuchungszeitraum von 21 Tagen zu signifikant verbesserten chondroreparativen Differenzierungsprozessen von humanen 3D-MSZ-Aggregaten führt im Vergleich zur singulären rAAV-basierten Applikation des jeweiligen Wachstumsfaktorgens und im Vergleich zum Reporter-gen [211]. Dies ist auf mögliche synergistische und additive Effekte der Wachstumsfaktoren zurückzuführen [226; 234; 312], die in den zahlreichen Interaktionen ihrer jeweiligen Signalwege begründet liegen [79; 344]. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den bereits bekannten chondrogenen Eigenschaften der jeweiligen Wachstumsfaktoren [17; 155; 190; 235] und mit den Ergebnissen früherer Studien, in denen humane MSZ *in vitro* mittels rAAV-basiertem Gentransfer entweder mit hTGF- β [108] oder mit hIGF-I [109] transduziert wurden. Bemerkenswerterweise zeigte sich in den kombiniert rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten als Ausdruck der verbesserten chondroreparativen Eigenschaften immunhistochemisch unter Verwendung des semiquantitativen modifizierten Bewertungssystems aus Bern [129; 252] ein signifikant erhöhter Typ-II-Kollagen-Gehalt verglichen mit der jeweils singulären rAAV-basierten Applikation des entsprechenden Wachstumsfaktors und verglichen mit der Negativkontrolle [211]. Typ-II-Kollagen stellt mit einem Anteil von ungefähr 95% das Hauptkollagen des intakten hyalinen Gelenkknorpels dar und bildet ein stabiles, viskoelastisches, fibrilläres Netzwerk [202], in welches unter anderem Proteoglykane, hauptsächlich Aggrekan, verwoben vorliegen [123]. Dieser Aufbau gewährleistet die physiologischen biomechanischen Eigenschaften des intakten hyalinen Gelenkknorpels. Interessanterweise detektierten wir im Einklang mit dem physiologischen Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels (Kapitel 2.2.1) und folglich im Sinne einer signifikanten Verbesserung der chondroreparativen Eigenschaften der kombiniert rAAV-basiert

transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregate mit hTGF- β und hIGF-I gegenüber den singulär rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten und der Negativkontrolle anhand biochemischer Analysen eine signifikant erhöhte Proteoglykan-Produktion [211]. Zudem wiesen die kombiniert rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ-Aggregate einen signifikant erhöhten Proteoglykangehalt bezogen auf den DNS-Gehalt auf, verglichen mit den singulär rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten und mit der Negativkontrolle [211]. Der DNS-Gehalt reflektiert die Zellzahl. Eine signifikant erhöhte Zellzahl wurde in den kombiniert rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mittels histologischer Bestimmung der Zelldichte gegenüber den übrigen Gruppen verifiziert [211].

In Zusammenschau der einzelnen signifikant verbesserten Parameter „Typ-II-Kollagen Produktion“, „Proteoglykangehalt“ und „Zellzahl“ gelang es mittels erfolgreicher rAAV-basierter Überexpression von hTGF- β und hIGF-I nach 21 Tagen das chondrogene Differenzierungspotential humaner 3D-MSZ-Aggregate signifikant zu verbessern im Vergleich zur singulären rAAV-basierten Applikation des entsprechenden Wachstumsfaktorgens und im Vergleich zur Negativkontrolle. Im Einklang mit früheren *in vitro*-Studien [108; 109] detektierten wir auch in den singulär rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mit entweder hTGF- β oder hIGF-I bis zu einem gewissen Ausmaß verbesserte chondrogene Differenzierungsaktivitäten gegenüber der Negativkontrolle [211]. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen jedoch zweifelsfrei die Überlegenheit der simultanen kombinierten rAAV-basierten Transduktion von humanen 3D-MSZ-Aggregaten mit hTGF- β und hIGF-I [211].

Proliferative, biosynthetische und chondrogene Differenzierungsaktivitäten im Rahmen des indirekten viralen Gentransfers

Die erfolgreiche kombinierte rAAV-basierte Überexpression von hTGF- β und hIGF-I über den Untersuchungszeitraum von 21 Tagen resultiert in signifikant verbesserten chondro-reparativen Differenzierungsprozessen von humanen osteochondralen Defektmodellen im Vergleich zur singulären rAAV-basierten Applikation des jeweiligen Wachstumsfaktorgens und im Vergleich zum Reporter gen [212]. Analog zu den Ergebnissen der rAAV-basiert transduzierten humanen MSZ-Aggregate fand sich als wesentliches Ergebnis hinsichtlich der verbesserten chondrogenen Differenzierungsaktivitäten immunhistochemisch unter Verwendung des semiquantitativen modifizierten Bewertungssystems aus Bern [129; 252] eine signifikant erhöhte Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen des Reparaturgewebes verglichen mit der singulären rAAV-basierten Applikation des jeweiligen Wachstumsfaktorgens und verglichen mit der Negativkontrolle [212]. Als Ausdruck signifikant verbesserter

chondroreparativer Differenzierungsaktivitäten wiesen die kombiniert rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen osteochondralen Defektmodelle biochemisch eine signifikant erhöhte Bildung von Proteoglykanen auf verglichen mit den singulär rAAV-basiert transduzierten Gruppen und mit der Negativkontrolle [212]. Auffallend war zudem ein histologisch signifikant erhöhter Proteoglykangehalt des unmittelbar an den osteochondralen Defekt angrenzenden intakten Gelenkknorpels der rAAV-basiert kombiniert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodelle verglichen mit den übrigen Gruppen [212]. Dieser Effekt kann zum einen auf eine Expression der entsprechenden therapeutischen Wachstumsfaktorgene über eine gewisse Distanz hinaus zurückzuführen sein, zum anderen in parakrinen Effekten der sezernierten Wachstumsfaktoren begründet sein [212]. Die biochemische Ermittlung des DNS-Gehalts (als Bezugsparameter für die Zellzahl) bewies eine für chondroreparative Prozesse essenzielle signifikant erhöhte Zellzahl in den kombiniert rAAV-basiert transduzierten humanen osteochondralen Defektmodellen verglichen mit der singulären rAAV-basierten Überexpression des jeweiligen Wachstumsfaktorgens und mit der Negativkontrolle [212]. Histologische Analysen bestätigen dieses Ergebnis interessanterweise sowohl für das Reparaturgewebe als auch für den perifokalen Gelenkknorpel [212].

In Zusammenschau der einzelnen signifikant verbesserten Parameter „Typ-II-Kollagen-Produktion“, „Proteoglykangehalt“ und „Zellzahl“ gelang es mittels Implantation von *ex vivo* erfolgreich kombiniert rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen MSZ in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo* nach 21 Tagen signifikant verbesserte chondrogene Differenzierungsaktivitäten des Reparaturgewebes zu erzielen verglichen mit der singulären rAAV-basierten Applikation des jeweiligen Wachstumsfaktorgens und mit der Negativkontrolle [212]. Dieses Ergebnis steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen der signifikant verbesserten chondrogenen Differenzierungsaktivitäten der kombiniert rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregate [211]. Auffallend war jedoch die große Variabilität der einzelnen Ergebnisse, welche höchstwahrscheinlich auf die interindividuellen Eigenschaften der Spender zurückzuführen sind (Kapitel 8.3). Ähnliche Spender-interindividuelle Diskrepanzen wurden bereits von Mackay *et al.* vorbeschrieben [190]. Trotz der Tatsache, dass die kombiniert rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten und in den osteochondralen Defekt implantierten humanen MSZ-Aggregate signifikant verbesserte chondroreparative Differenzierungsaktivitäten aufwiesen, deren Effekte zudem bemerkenswerterweise auch im perifokalen intakten Gelenkknorpel erfasst wurden, blieb eine vollständige Integration des Reparaturgewebes in das umliegende intakte Knorpelgewebe aus. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit derjenigen einer früheren Studie an osteochondralen Defektmodellen [84]. Eine verbesserte Integration des Reparaturgewebes in

das angrenzende intakte Knorpelgewebe könnte möglicherweise durch einen verlängerten Beobachtungszeitraum erreicht werden [15; 163]. Wir entschieden uns in der vorliegenden Studie jedoch bewusst für einen Beobachtungszeitraum von 21 Tagen, da innerhalb dieser Zeit die vollständige chondrogene Differenzierung humaner MSZ vollzogen ist [17; 155; 190] und hinsichtlich dessen eine direkte Vergleichbarkeit zwischen direktem und indirektem viralen Gentransferansatz gegeben ist.

Zusammenfassend ist eine Überlegenheit des simultanen kombinierten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I im Rahmen des indirekten Gentransfermodells [212] analog zu demjenigen des direkten viralen Gentransferansatzes in humanen MSZ [211] verifiziert worden.

8.1.3 Osteogene, hypertrophe und terminale Differenzierungsaktivitäten

Osteogene und hypertrophe Differenzierungsaktivitäten im Rahmen des direkten viralen Gentransfers

Ein überaus bemerkenswertes Ergebnis der vorliegenden Studie ist, dass die kombinierte rAAV-basierte Überexpression von hTGF- β und hIGF-I über den Untersuchungszeitraum von 21 Tagen zu signifikant verringerten osteogenen und hypertrophen Differenzierungsaktivitäten von humanen 3D-MSZ-Aggregaten führt, verglichen mit der singulären rAAV-basierten Überexpression des jeweiligen Wachstumsfaktorgens und mit der Negativkontrolle. Im Vergleich zu den übrigen Gruppen wiesen die kombiniert rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregate signifikant verminderte Expressionsniveaus von Typ-I- und Typ-X-Kollagen auf [211]. Beide Kollagen-Typen sind nicht Bestandteil des intakten hyalinen Gelenkknorpels oberhalb der *Tidemark* (Kapitel 2.2.1, **Abbildung 1**). Typ-I-Kollagen repräsentiert physiologischerweise das Hauptkollagen des subchondralen Knochens [194]; zudem resultieren insuffiziente osteochondrale Reparaturprozesse in der Ausbildung eines faserknorpeligen Reparaturgewebes, welches ebenfalls hauptsächlich aus Typ-I-Kollagen aufgebaut ist [43]. Typ-X-Kollagen findet sich ausschließlich in der kalzifizierten Zone [194]. Infolgedessen indizieren verringerte Expressionsniveaus von Typ-I- und Typ-X-Kollagen verringerte osteogene und hypertrophe Differenzierungsaktivitäten und folglich verbesserte chondroreparative Differenzierungspotentiale. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine erhöhte Expression des anti-hypertroph wirkenden Transkriptionsfaktors SOX9 zurückzuführen, welcher vermehrt in hTGF- β - und hIGF-I-transduzierten Zellen exprimiert wird [121; 311; 321]. Verifiziert wurden die signifikant verminderten hypertrophen Differenzierungsaktivitäten der kombiniert rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregate immunhistochemisch anhand signifikant verringerter Immunreaktivität für Typ-X-Kollagen sowie

histologisch anhand eines signifikant verringerten Nachweises von Calciumphosphat verglichen mit den übrigen Gruppen [211]. Interessanterweise wurden verringerte hypertrophe und osteogene Differenzierungsaktivitäten auch in den singular rAAV-basiert transduzierten humanen 3D-MSZ-Aggregaten mit hTGF- β oder hIGF-I im Vergleich zum Reporter gen festgestellt; insgesamt jedoch in weniger ausgeprägtem Ausmaß als in den kombiniert transduzierten humanen MSZ-Aggregaten [211]. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu Ergebnissen früherer Studien, in denen der singuläre rAAV-basierte Gentransfer von hTGF- β oder hIGF-I hypertrophe und osteogene Differenzierungsaktivitäten von humanen MSZ begünstigte [108; 109]. Im Unterschied zu der vorliegenden Studie applizierten Frisch *et al.* die entsprechenden rAAV-Vektoren mit einer 2,5-fach höheren *MOI* von 20. Aufgrund dieser Tatsache sollte die angewandte Vektordosis kritisch geprüft werden, um den erwünschten Effekt zu erzielen [211].

Insgesamt belegen die Daten der vorliegenden Studie eine Überlegenheit des direkten simultanen kombinierten rAAV-basierten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I in Bezug auf eine Verminderung unerwünschter hypertropher und osteogener Differenzierungsaktivitäten humaner MSZ im Vergleich zur singulären Applikation des entsprechenden therapeutischen Wachstumsfaktorgens [211].

Osteogene, hypertrophe und terminale Differenzierungsaktivitäten im Rahmen des indirekten viralen Gentransfers

Analog zu den Ergebnissen des direkten Gentransferverfahrens zeigt ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Studie die Fähigkeit der indirekten kombinierten rAAV-basierten Überexpression von hTGF- β und hIGF-I in humanen osteochondralen Defektmodellen signifikant hypertrophe, terminale und osteogene Differenzierungsaktivitäten des Reparaturgewebes zu unterdrücken, verglichen mit der singulären rAAV-basierten Applikation des entsprechenden Wachstumsfaktorgens und mit der Negativkontrolle [212]. Diese Ergebnisse stehen wiederum in gutem Einklang mit denjenigen des direkten viralen Gentransferverfahrens [211]. Als Ausdruck der signifikant verringerten osteogenen und terminalen Differenzierungsaktivitäten der kombiniert rAAV-basiert transduzierten osteochondralen Defektmodelle erfassten wir signifikant verringerte Expressionsniveaus von Typ-I-Kollagen und MMP-13 [212]. Die kombiniert mit hTGF- β und hIGF-I rAAV-basiert transduzierten und in den osteochondralen Defekt implantierten humanen MSZ-Aggregate führten nicht nur zu signifikant verringerten osteogenen und hypertrophen Differenzierungsaktivitäten des Reparaturgewebes sondern übten diesen Effekt

bemerkenswerterweise auch auf das den Defekt unmittelbar angrenzende intakte Knorpelgewebe aus [212]. Als Ausdruck dessen detektierten wir unter anderem eine immunhistochemisch signifikant verringerte Typ-X-Kollagen-Expression im perifokalen Gelenkknorpel, welche wiederum auf die Überexpression der Wachstumsfaktorgene über eine gewisse Distanz hinaus schließen lässt und/oder auf parakrine Effekte der sezernierten Wachstumsfaktoren zurückzuführen ist [212]. Gleichzeitig detektierten wir ein signifikant erhöhtes SOX9-Expressionsniveau; dieses unterstreicht wiederum die anti-hypertrophe Wirkung des Transkriptionsfaktors SOX9, welcher in hTGF- β - und hIGF-I-transduzierten Zellen vermehrt exprimiert wird [121; 321].

Schlussfolgernd zeigt sich auch in Bezug auf eine Verringerung unerwünschter hypertropher, osteogener und terminaler Differenzierungsaktivitäten in den humanen osteochondralen Defektmodellen analog zum direkten viralen Gentransferansatz [211] eine eindeutige Überlegenheit des simultanen kombinierten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I [212]. Diese positiven Effekte waren sowohl im Reparaturgewebe als auch interessanterweise im perifokalen intakten hyalinen Gelenkknorpelgewebe nachweisbar [212].

8.2 Vorgehensweise

8.2.1 Konzept der Studie

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effekte eines direkten und indirekten simultanen kombinierten rAAV-basierten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I auf die chondroreparativen Differenzierungsprozesse von humanen MSZ *in vitro* über einen Beobachtungszeitraum von 21 Tagen. Bei unserem gewählten Untersuchungszeitraum handelt es sich um einen ausreichenden und etablierten Zeitraum um die chondrogenen und möglichen hypertrophen, osteogenen und terminalen Differenzierungsaktivitäten humaner MSZ zu evaluieren, da innerhalb diesen Zeitraums die Chondrogenese der Progenitorzellen vollständig vollzogen ist [17; 155; 190].

Im Rahmen der vorliegenden Studie isolierten wir humane MSZ aus Knochenmarkaspiraten der distalen Femora von drei hämatologisch gesunden Patienten im Alter von 59 bis 67 Jahren, die sich einer Knie-Totalendoprothese unterzogen. Die Rekrutierung von Patienten gestaltet sich schwierig. Nichtsdestotrotz sind basierend auf zuvor publizierten Studien mit Progenitorzellen drei Patienten ausreichend, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten [251]. Der verhältnismäßig äußerst geringe Anteil von MSZ in Knochenmarkaspiraten und die gleichzeitige Notwendigkeit einer ausreichend hohen Zellzahl zwecks experimentell-

therapeutischer Absichten erfordert eine *in vitro*-Expansion der Zellen [42]. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unterliegen MSZ der Seneszenz [222]. Dies äußert sich *in vitro* in einer progredienten Abnahme der Replikationsfähigkeit der MSZ [35; 222] sowie in einer veränderten Morphologie und Funktionalität einschließlich eines veränderten sekretorischen Verhaltens [222]. Es werden mit zunehmender Expansionszeit verringerte immunsuppressive Fähigkeiten der MSZ beobachtet [85] sowie ein progredienter Verlust des Proliferations- und Differenzierungspotentials [222; 313]. Die hierdurch veränderten funktionalen Eigenschaften der MSZ beeinflussen deren Effektivität sowie deren therapeutische Sicherheit und können nicht nur in einem Therapieversagen resultieren, sondern schlimmstenfalls in schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen, wie der Exazerbation einer Entzündungsreaktion oder einer möglichen Zelltransformation und Tumorinduktion [222]. Um das volle therapeutische Potential der MSZ zu nutzen und Risiken weitgehend zu minimieren ist es daher unabdingbar, Zellen mit geringer Expansionszeit zu verwenden [221; 222]. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, verwendeten wir in der vorliegenden Studie humane MSZ der ersten oder zweiten Passage.

Die osteochondralen Proben zur Evaluation des indirekten Therapieansatzes stammten von insgesamt neun Patienten, die sich ebenfalls einer Knie-Totalendoprothese unterzogen. Hierbei handelte es sich um arthrotische osteochondrale Explantate von Femurkondylen, die nach dem Bewertungssystem von Mankin einen durchschnittlichen Punktwert von 7 bis 9 aufwiesen und somit insgesamt einer mittelgradig schweren Arthrose entsprachen [237]. Das Ziel der vorliegenden Studie war die Evaluation des chondroreparativen Potentials fokaler Gelenkknorpeldefekte mittels viraler gentherapeutischer Methoden. Aus diesem Grund wurde bei der Probenauswahl streng darauf geachtet im Rahmen der durchgeführten Experimente makroskopisch unauffällige, nicht arthrotisch veränderte Bereiche der osteochondralen Explantate zu verwenden, um die Ergebnisse nicht durch bereits vorgeschädigten perifokalen Gelenkknorpel zu verzerren. Sofern humane MSZ und osteochondrale Explantate desselben Patienten zur Verfügung standen, wurden diese innerhalb eines Experiments verwendet. Aufgrund ihres immunsuppressiven Potentials ist der therapeutisch motivierte Einsatz allogener humaner MSZ möglich; dies ermöglicht die Ausnutzung weiterer Zellquellen für potentielle zellbasierte Therapien [53].

Es existiert nach unserem besten Wissen bislang keine vergleichbare Studie, die den kombinierten direkten oder indirekten Gentransfer von hTGF- β und hIGF-I mittels der klinisch relevanten und translational geeigneten rAAV-Vektoren in humanen MSZ niedriger Zellpassage untersucht. Zudem zeigen wir in der vorliegenden Studie erstmals und nach unserem besten Wissen eine erfolgreiche Implantation *ex vivo* kombiniert

rAAV-hTGF- β /hIGF-I-transduzierter humaner MSZ in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo*. Dieses simuliert ein weitgehend natives 3D-Mikromilieu, welches annähernd demjenigen bei Patienten *in vivo* entspricht [84; 255]. Aus diesem Grund liefert die vorliegende Studie wegweisende und grundlegende Erkenntnisse, die eine Überlegenheit des kombinierten direkten und indirekten rAAV-basierten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I gegenüber deren singulären rAAV-basierten Applikation belegt [211; 212].

8.2.2 Analyseverfahren

Sämtliche im Rahmen der vorliegenden Studie angewandten Analyseverfahren basieren auf langjährig etablierten und standardisierten Methoden, die eine sensitive Evaluation der Knorpelreparatur *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* mit allgemeiner Akzeptanz erlaubt [75; 67; 84; 155; 190; 235; 322]. Hierzu führten wir *ELISA*-Analysen, histologische, immunhistochemische, biochemische und *Real-time RT-PCR*-Analysen durch. Ein Hauptaugenmerk liegt auf der histologischen und immunhistochemischen Beurteilung, da diese eine valide und objektive Evaluation des knorpeligen Reparaturgewebes ermöglicht [230]. In der vorliegenden Studie erfolgte dies unter Anwendung des etablierten modifizierten Bewertungssystems aus Bern [252], das ursprünglich von Grogan *et al.* entwickelt wurde [129].

8.2.3 rAAV-Vektoren

In der vorliegenden Studie wiesen wir eine erfolgreiche kombinierte Überexpression der Wachstumsfaktorgene hTGF- β und hIGF-I mittels des rAAV-basierten Gentransfers in humanen MSZ *in vitro* (direkter viraler gentherapeutischer Ansatz) und nach deren Implantation in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo* (indirekter viraler gentherapeutischer Ansatz) über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Tagen nach [211; 212]. Der Einsatz von rAAV-basierten Vektoren zur Behandlung osteochondraler Erkrankungen, wie fokalen Defekten oder der Arthrose, ist in der klinischen Forschung etabliert [73; 323]. Verbesserte chondrale Differenzierungsaktivitäten wurden mittels direkten Gentransfermethoden rAAV-basiert in humanen MSZ *in vitro* unter anderem mit den Wachstumsfaktoren TGF- β [235], IGF-I [109], FGF-2 [67] sowie dem Transkriptionsfaktor SOX9 [109] bis zu einem gewissen Ausmaß nachgewiesen. Die Anwendung direkter und indirekter rAAV-basierter Gentransfermethoden resultierte in orthotopen Tiermodellen *in vivo* bereits in verbesserten chondroreparativen Differenzierungsaktivitäten [75; 70; 69; 136; 200; 235; 349]. Die direkte lokale rAAV-basierte Applikation von SOX9 in osteochondrale Defekte führte *in vivo* am Kaninchen nach 16 Wochen zu verbesserten chondrogenen Reparaturaktivitäten bei gleichzeitiger Verzögerung terminaler und hypertropher

Differenzierungsaktivitäten; zudem wurden positive Effekte auf den subchondralen Knochen detektiert [69]. Die Implantation rAAV5-basiert transduzierter autologer Chondrozyten mit IGF-I in vollschichtige chondrale Defekte resultierte am Pferd *in vivo* nach acht Monaten in einem verbesserten chondralen Reparaturgewebe mit einer erhöhten Anzahl von Chondrozyten sowie in einem erhöhten Typ-II-Kollagen-Gehalt [233].

Der therapeutische Einsatz viraler Genvektoren beim Menschen stellt aufgrund deren natürlichen Abstammung von einem humanpathogenen Virus und dem damit verbundenen möglichen toxischen und immunogenen Potential eine Herausforderung für deren klinische Anwendung am Menschen dar [73; 76]. Im Gegensatz zu den im Rahmen klinischer Studien aktuell am häufigsten angewandten adenoviralen Vektoren oder anderen viralen Vektoren weisen rAAV-Vektoren aufgrund der vollständigen Entfernung aller pathogenen viralen Sequenzen eine deutlich geringere Immunogenität und Toxizität auf [73]. Aktuell existieren drei zugelassene rAAV-basierte Gentherapien. Hierzu zählen das durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) zugelassene Produkt „Glybera“ zur Behandlung des Lipoproteinlipasemangels [348] sowie die beiden von der U.S.-amerikanischen *Food and Drug Administration (FDA)* zugelassenen *in vivo*-gentherapeutischen Produkte „Luxturna“ zur Behandlung der *Amaurosis congenita* Leber, einer Netzhautdystrophie [263], und „Zolgensma“ zur Behandlung der spinalen Muskelatrophie [207]. Rekombinante AAV-Vektoren haben sich als sichere und klinisch relevante Gentransfervehikel etabliert [73; 74; 180; 323; 331], insbesondere auch im Fachgebiet der Orthopädie, da sie die dichte extrazelluläre Matrix des hyalinen Gelenkknorpels durchdringen können und somit den entsprechenden Erfordernissen gerecht werden [76; 191].

Nichtsdestotrotz ist eine *in vivo*-Anwendung von rAAV-Vektoren nicht risikofrei. Insbesondere Interaktionen des menschlichen angeborenen und spezifischen Immunsystems mit den Kapsidproteinen der rAAV-Vektoren oder Bestandteilen des rekombinanten DNS-Genoms sind limitierende Faktoren im effektiven und sicheren Einsatz von rAAV-Vektoren [259; 331]. Hierbei sind insbesondere vorbestehende neutralisierende Antikörper mit einer erhöhten Kreuzreaktivität innerhalb der unterschiedlichen Serotypen aufgrund einer früheren Infektion mit dem Wildtyp-AAV von wesentlicher Bedeutung sowie CD4⁺- und CD8⁺-positive T-Lymphozyten und eine Aktivierung des Komplementsystems [97; 214; 325]. Im Rahmen einer Studie zur systemisch applizierten rAAV8-basierten gentherapeutischen Behandlung der myotubulären Myopathie kam es zu zwei Todesfällen [341]. Die genaue Todesursache ist bislang nicht geklärt, es wird jedoch unter anderem eine Aktivierung des angeborenen und/oder des Komplementsystems durch vorbestehende Antikörper gegen Wildtyp-AAV vermutet [214]. Aus diesem Grund ist die Erforschung von Verfahren zur Prävention

immunvermittelter Toxizitäten von wesentlicher Bedeutung, um einen sicheren Einsatz der rAAV-Vektoren zu gewährleisten [214]. Dies gelingt beispielsweise durch eine Immunsuppression [186]. Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt stellt die Modifizierung der Genexpressionskassette der rAAV-Vektoren selbst dar, beispielsweise durch den Einsatz eines regulierbaren (Tetrazyklin-kontrollierten) oder gewebespezifischen Promotors (SOX9 oder Typ-II-Kollagen) [120] anstelle des starken, ubiquitären CMV Promotors/*Enhancers* [218], sodass die rAAV-basierte Transduktion bestmöglich auf die Zielzellen begrenzt bleibt mit einer konsekutiven Reduktion unerwünschter systemischer Reaktionen [180]. Eine weitere Strategie basiert auf der genetischen Modifizierung der rAAV-Kapside, die darauf abzielt immunogene Kapsidstrukturen zu identifizieren und so zu verändern, dass sie der humoralen und zellulären Immunantwort entgehen [310]. In diesem Zusammenhang stellen hybride Serotypen einen interessanten Ansatz dar [58].

Eine begleitende therapeutische Antikoagulation mit Heparinen verringert die Transduktionseffizienz von rAAV-Vektoren, indem diese die Adsorption der rAAV-Vektoren an die Zielzellen verhindern [249]. Das Polypeptid Hirudin zeigt diesen inhibitorischen Effekt *in vitro* nicht und stellt somit eine vielversprechende Alternative im Falle einer notwendigen begleitenden Antikoagulation *in vivo* dar [249]. Eine andere Möglichkeit die Transduktionseffizienz zu erhöhen ist der Einsatz selbst-komplementärer AAV-Vektoren (*self-complementary AAV*, *scAAV*), sodass der limitierende Schritt der erforderlichen Zweitstrangsynthese umgangen werden kann [74; 127].

Ein weiterer limitierender Faktor im Einsatz von rAAV-Vektoren ist deren begrenzte *Packaging*-Kapazität von ungefähr 4,8 kb für das gewünschte Transgen einschließlich der regulierenden Promotor- und Polyadenylierungssignale sowie der adenoviralen *ITR*-Sequenzen [331]. Es existieren verschiedene Ansätze, die dennoch einen Transfer größerer Gene ermöglichen. Vielversprechende Resultate zeigt bereits der Transfer einer verkürzten Version des gewünschten Gens, welches dennoch für ein funktionales und dem Phänotyp abgeschwächt entsprechendes Protein codiert [331]. Der Transfer eines solchen Mikro-Dystrophin-Gens wurde AAV-basiert bereits erfolgreich durchgeführt [96]. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Verwendung eines dualen rAAV-Vektorsystems, bei dem jeder Vektor einen Teil des zu transferierenden Gens sowie regulatorische Sequenzen trägt [236]. Innerhalb der Zielzelle unterliegen die viralen rekombinanten Genome einer intermolekularen Rekombination und bilden schließlich das vollständige intakte Transgen aus [180]. Der intrazelluläre Rekombinationsmechanismus beruht entweder auf *trans*-Spleißsignalen, der homologen Rekombination überlappender Genregionen oder einer Kombination aus beiden Mechanismen, entsprechend eines hybriden Systems [236].

Ein wesentlicher Vorteil von rAAV-Vektoren ist ihre Fähigkeit sowohl teilende als auch nicht-teilende Zellen mit hoher Effizienz von bis zu 100% zu transduzieren [73]. Da rAAV-Vektoren hauptsächlich als nicht-replikationsfähige stabile Episome in den Zielzellen persistieren ermöglichen sie zwar eine langfristige Transgenexpression [73], welche jedoch in mitotisch aktiven Zellen graduell verloren geht [331]. Ein Vorteil der Persistenz als freie Episome liegt unumstritten in einem deutlich verminderten Risiko des Auftretens einer Insertionsmutagenese [59; 110]. Eine Assoziation von AAV mit der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms im Rahmen einer Insertionsmutagenese wird kontrovers diskutiert [173; 219; 262]. Eine gezielte Integration der rAAV-DNS in das Wirtszellgenom im Rahmen der Genom-Editierung repräsentiert einen attraktiven und vielversprechenden Ansatz einen dauerhaften Verbleib des rAAV-Genoms in der Zielzelle zu ermöglichen mit konsekutiv dauerhafter Transgenexpression ohne das begleitende Risiko einer Mutagenese, wie sie bei einer zufälligen (und unter Umständen nur partiellen) Integration des rAAV-Genoms in das Wirtszellgenom vorliegen kann [331]. Ein weiterer vielversprechender und aktuell weit untersuchter Ansatz, um bestehende Limitationen im therapeutischen Einsatz von rAAV-Vektoren zur Therapie osteochondraler Defekte zu beseitigen, ist der Einsatz biokompatibler Materialien, in welche die rAAV-Vektoren eingebettet werden [76]. Durch die zielgenaue Implantation der rAAV-beladenen Biomaterialien in den zu behandelnden osteochondralen Defekt wird eine kontrollierte diffusionsvermittelte Freisetzung der rAAV-Vektoren ermöglicht [76]. Hierdurch bleibt die rAAV-vermittelte Transduktion weitgehend auf die Zielzellen des (perifokalen) Defektareals beschränkt, wodurch das Risiko humoraler und zellulärer Immunantworten beachtlich reduziert wird [73; 74; 253]. Dies gewährleistet eine sichere, effektive und langanhaltende Transgenexpression [76]. Diesbezüglich sind weitere, insbesondere auch grundlegende Forschungen unumgänglich, da beispielsweise die optimale therapeutische Expressionsdauer der transferierten Gene zur Induktion und Aufrechterhaltung der chondroreparativen/chondroregenerativen Differenzierungsaktivitäten des Reparaturgewebes zur Behandlung osteochondraler Defekte nicht bekannt ist [76].

Humane MSZ wurden erfolgreich mit dem Transkriptionsfaktor SOX9 mittels des Poloxamers Polythylenoxid-Polypropylenoxid-Polyethylenoxid (PEO-PPO-PEO) rAAV-basiert transduziert und wiesen erstaunlicherweise sogar unter Gentransfer-inhibierenden Bedingungen, beispielsweise der Anwesenheit von Antikörpern gegen das rAAV-Kapsid, ein verbessertes chondrogenes Differenzierungspotential auf [250]. Die Verifizierung dessen gelang bereits *in vivo* erfolgreich nach erfolgter Mikrofrakturierung am orthotopen Großtiermodell [200]. Neben dem Einsatz solcher polymeren Mizellen stellen Hydrogele [251], solide Trägermaterialien [324] sowie kohlenstoffhaltige biokompatible Nanomaterialien [148; 208] weitere interessante Biomaterialien dar zur gezielten rAAV-basierten Gentherapie osteochondraler Defekte, deren

Effektivität in weiteren Studien untersucht werden sollte, um die bisherigen Limitationen und Herausforderungen im sicheren Einsatz von rAAV-Vektoren künftig zu reduzieren.

8.2.4 TGF- β und IGF-I als therapeutische Faktoren

Das hochpotente chondrogene Potential der Wachstumsfaktoren TGF- β und IGF-I wurde bereits zweifelsfrei verifiziert [17; 155; 190; 234]. Im Widerspruch zu dieser Aussage steht die Tatsache, dass TGF- β jedoch auch gleichzeitig terminale und hypertrophe Differenzierungsprozesse begünstigt [318]. Diese entgegengesetzten Effekte von TGF- β auf die Chondrogenese liegen in der Aktivierung verschiedener Signalwege begründet [303]. In alterndem und arthrotischem Gelenkknorpel wird eine Dominanz des prohypertrophen Signalwegs diskutiert [33; 317]. Die singuläre direkte rAAV-basierte Applikation von hTGF- β in osteochondrale Kniedefekte resultierte im translationalen Tiermodell am Minischwein in verbesserten frühen chondrogenen Reparaturaktivitäten nach vier Wochen [75]. Indirekte Gentransfermethoden bewiesen beispielsweise im Rahmen einer Implantation von *ex vivo* TGF- β -AAV-basiert transduzierter humaner MSZ in osteochondrale Defekte athymischer Ratten nach 12 Wochen die Ausbildung eines verbesserten knorpeligen Reparaturgewebes [235]. Auch die singuläre direkte rAAV-basierte Applikation von hIGF-I in osteochondrale Defekte zeigte im translationalen Tiermodell an Kaninchen nach drei Wochen vielversprechende Ergebnisse im Sinne verbesserter chondrogener Reparaturaktivitäten einschließlich verbesserter Zellproliferation und Matrixsynthese sowie gleichzeitig verzögerter terminaler und hypertropher Differenzierungsaktivitäten im Reparaturgewebe [70]. Der Beweis des positiven chondrogenen Reparaturpotentials von IGF-I im Rahmen eines indirekten Gentransfers erfolgte unter anderem im Pferdmodell 8 Wochen nach Implantation *ex vivo* rAAV-basiert modifizierter autologer Chondrozyten mit IGF-I in vollschichtige chondrale Defekte [233].

Ein möglicher vorteilhafter Effekt der kombinierten Anwendung von TGF- β und IGF-I auf die Matrixsynthese wurde bereits an ausdifferenzierten bovinen Chondrozyten diskutiert [81]. Es existiert bislang jedoch keine vergleichbare *in vitro*-Studie die den simultanen kombinierten direkten und indirekten Gentransfer der chondrogen hochpotenten Wachstumsfaktorgene TGF- β und IGF-I in humanen MSZ mittels der klinisch relevanten rAAV-Vektoren untersucht. Beide Wachstumsfaktoren bewiesen vorteilhafte Effekte auf das knorpelige Reparaturgewebe in ihrer singulären Verwendung bereits erfolgreich *in vivo* bis zu einem gewissen Ausmaß [75; 70]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die eine Überlegenheit des kombinierten simultanen rAAV-basierten Gentransfers von hTGF- β und hIGF-I in humanen MSZ in Bezug

auf chondroreparative Differenzierungsprozesse belegen [211; 212] im Vergleich zur jeweils singulären rAAV-basierten Applikation [108; 109], stellen somit eine vielversprechende Basis dar, deren Potential nachfolgend in klinisch relevanten orthotopen Tiermodellen evaluiert werden sollte.

8.2.5 Zielzellen

Die vorliegende Studie basiert auf der rAAV-basierten Modifizierung humaner MSZ. MSZ differenzieren unter geeigneten Bedingungen (u. a. unter Einfluss von TGF- β und Dexamethason) zu Chondrozyten [156; 155; 190]. Diese Tatsache sowie ihre sekretorischen und immunmodulatorischen Fähigkeiten machen sie zu einer attraktiven Grundlage zellbasierter Optionen zur Behandlung von Erkrankungen des Gelenkknorpels [53]. Die therapeutische Verwendung humaner MSZ unterliegt jedoch auch einigen Limitationen insbesondere bedingt durch Seneszenz [181] sowie interindividuelle Spendereigenschaften [215; 238]. Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) stellen eine weitere vielversprechende Zellquelle dar [72; 346]. Diese ermöglichen eine nahezu unbegrenzte Expansion *in vitro* aus einer geringen Zellzahl somatischen Ursprungs, ohne deren Differenzierungskapazitäten zu beeinflussen [346]. Die Differenzierung humaner iPSCs zu Chondrozyten gelang *in vitro* bereits erfolgreich; deren Phänotyp entsprach demjenigen juveniler Chondrozyten mit einer erhöhten Proteoglykan-Expression und gleichzeitiger Abwesenheit hypertropher Expressionsmarker [90]. Aufgrund ihres kanzerogenen Potentials [20; 345] sollte eine klinische Translation kritisch geprüft werden.

8.3 Limitationen

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Effekte eines direkten und indirekten Gentransfers auf die chondroreparativen Differenzierungsaktivitäten von humanen MSZ *in vitro* (direkter viraler Gentransferansatz) und nach Implantation in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo* (indirekter viraler Gentransferansatz) über einen Zeitraum von 21 Tagen, da dieser zur Evaluation der *in vitro*-Chondrogenese etabliert ist [17; 155; 190]. Zur Analyse langfristiger Effekte der kombinierten simultanen rAAV-basierten Applikation von hTGF- β und hIGF-I auf chondroreparative Differenzierungsaktivitäten sollten in künftigen Studien längere Untersuchungszeiträume festgelegt werden. Dies erscheint insbesondere im Hinblick auf den indirekten simultanen rAAV-basierten Gentransfer zur Evaluation der Integrität des Reparaturgewebes in das perifokale intakte Gelenkknorpelgewebe von wesentlicher Bedeutung zu sein. Ebenso wäre zukünftig eine Modifizierung des Applikationsmodus, beispielsweise eine repetitive oder zeitlich versetzte Vektorapplikation, denkbar. Wie bereits

erwähnt, ist eine örtlich und zeitlich kontrollierte Freisetzung der rAAV-Vektoren erstrebenswert [254]. Um diese zu erreichen, könnte der indirekte virale Gentransferansatz dahingehend modifiziert werden, dass kombiniert rAAV-basiert transduzierte humane MSZ in Kombination mit biokompatiblen Materialien in osteochondrale Defekte implantiert werden [76]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sollten nun durch analoge *in vivo*-Versuche in translationalen (orthotopen) Tiermodellen evaluiert werden, insbesondere auch im Hinblick auf mögliche Immunreaktionen, welche *in vitro* nicht beurteilbar sind (**Abbildung 39**). Anschließend kann eine klinische Translation erfolgen.

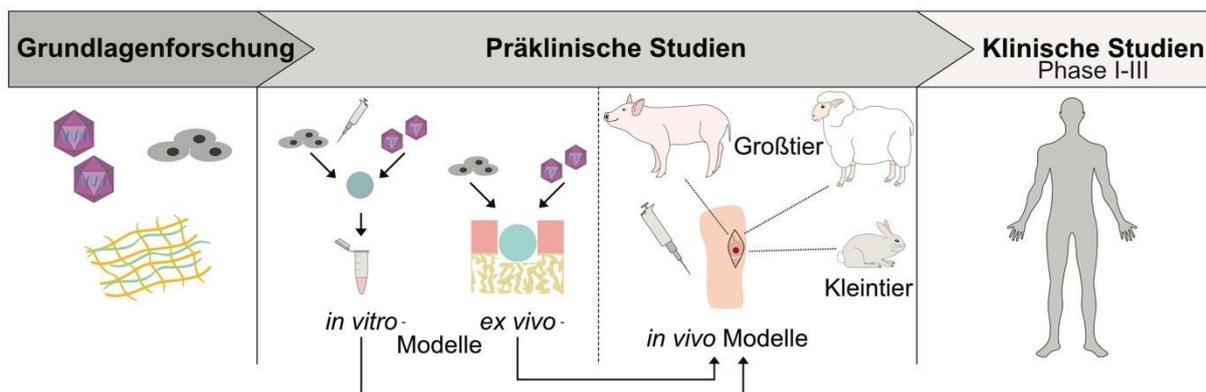


Abbildung 39. Übersicht über den translationalen Forschungsansatz.

Die Verwendung eines humanen osteochondralen Defektmodells *ex vivo* zur Evaluation des indirekten viralen Gentransferansatzes, welches ein weitgehend physiologisches Mikromilieu imitiert [84], stellt zwar eine attraktive Möglichkeit dar, Versuchsbedingungen zu generieren, die denjenigen im Patienten *in vivo* ähneln, ersetzen jedoch letztendlich keine translationalen Tiermodelle. Diese sind insbesondere zur Evaluation der Sicherheit eines neuartigen Therapieansatzes erforderlich einschließlich der Beurteilung möglicher potentieller lokaler und/oder systemischer Toxizitäten sowie onkogener Potentiale [76]. Bei der Auswahl des geeigneten Tiermodells ist es unerlässlich, dass dieses die menschlichen anatomischen Gegebenheiten bestmöglich widerspiegelt, um auf den Menschen übertragbare Ergebnisse zu generieren [197]. Hierbei sollte unter anderem die Schichtdicke des hyalinen Gelenkknorpels und des subchondralen Knochens, das Alter der Tiere sowie die Defektgröße, -tiefe, und -lokalisierung berücksichtigt werden [197]. Zur Evaluation der Knorpelreparatur eignen sich als translationale Großtiermodelle insbesondere Schafe [227; 231], Minischweine [75; 227] und Pferde [233]. Nichtsdestotrotz stellen *ex vivo*-humane osteochondrale Defektmodelle eine attraktive Möglichkeit dar, die Integrität eines zellbasierten Implantats in das perifokale Knorpelgewebe unter kontrollierten Bedingungen zu analysieren, sodass auch eine

Modifizierung derer künftig von wesentlicher Bedeutung ist, beispielsweise durch die Erzeugung von Organoiden [166].

8.4 Klinische Relevanz

Aktuell existieren 17 klinische Studien zur Evaluation von Gentherapien der rheumatoiden Arthritis und der Arthrose [101]. Im Jahr 2017 wurde in Südkorea die erste Gentherapie zur Behandlung der Arthrose („Invossa“) zugelassen [101]. Hierbei handelt es sich um eine intraartikuläre Injektionstherapie von *ex vivo*-retroviral-basiert transduzierten juvenilen allogenen Chondrozyten mit TGF- β 1 [101; 279]. Im Rahmen von Unregelmäßigkeiten während einer klinischen Phase III-Studie wurde „Invossa“ temporär die Zulassung entzogen [101]. Da jedoch keine schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse auftraten wird die Phase III-Studie in den USA aktuell weitergeführt [101]. Eine Placebo-kontrollierte, multizentrische Phase-II-Doppelblindstudie belegt den vorteilhaften und sicheren Effekt einer intraartikulären Injektion von *ex vivo*-retroviral-basiert transduzierten Chondrozyten zur Behandlung der moderaten Gonarthrose (Arthrosegrad III nach dem radiologischen *Kellgren-Lawrence*-Bewertungssystem) [174]. Verglichen mit der Kontrollgruppe wies die Interventionsgruppe nach 24 Monaten signifikant verbesserte *Patient-reported Outcomes (PROMs)* ohne unerwünschte schwerwiegende Ereignisse auf [174].

Eine klinische Studie, die direkt auf die gentherapeutische Behandlung fokaler osteochondraler Defekte abzielt, existiert bis heute nicht. Die Tatsache, dass sich die Gentherapie in der Behandlung degenerativer Gelenkerkrankungen in klinischen Studien zunehmend als effektiv erweist [100], ebnet den Weg für zukünftige klinische Entwicklungen [101]. Die Therapie fokaler osteochondraler Defekte besteht aktuell insbesondere aus kombinierter autologer Chondrozytentransplantation und autologer Spongiosatransplantation [38] oder osteochondraler autologer Transferv Verfahren [5; 261]. Gentherapeutische Methoden zu ihrer Behandlung sind ein vielversprechender Ansatz zur Augmentation bereits etablierter chirurgischer Verfahren. Präklinische Studien belegten bereits verbesserte chondroreparative Aktivitäten nach direkter rAAV-basierter intraartikulärer Injektion von beispielsweise hIGF-I [70] oder hTGF- β 1 [75] nach Mikrofrakturierung. Diese direkten markraumeröffnenden Verfahren können durch den Einsatz biokompatibler Materialien weiter modifiziert werden [76] und ermöglichen hierdurch eine kontrollierte Freisetzung der verwendeten Gentransfervehikel *in situ* [200]. Auch indirekte Gentransfermethoden, die *Tissue Engineering* (Gewebszüchtung)-Verfahren mit dem Einsatz von viralen Genvektoren und ggf. biokompatiblen Materialien kombinieren, sind zur Behandlung fokaler osteochondraler Defekte vorstellbar [74; 233; 235].

In präklinischen Studien war bislang der Einsatz von rAAV-Vektoren sicher und effektiv, was sie zu einem attraktiven Gentransfervehikel prädestiniert [73].

8.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend verbessert die simultane kombinierte rAAV-basierte Überexpression von hTGF- β und hIGF-I das chondrogene Differenzierungspotential humaner MSZ *in vitro* (direkter viraler Gentransferansatz) und nach Implantation in ein humanes osteochondrales Defektmodell *ex vivo* (indirekter viraler Gentransferansatz) nach 21 Tagen [211; 212].

Die vorliegende Studie liefert vielversprechende grundlegende Erkenntnisse einer verbesserten Knorpelreparatur, deren Potential in weiterführenden präklinischen Studien evaluiert werden sollte. Hierzu sind insbesondere anschließende *in vivo*-Studien in translationalen (orthotopen) Tiermodellen von wesentlicher Bedeutung, um einerseits die Verträglichkeit sowie mögliche Immunreaktionen zu evaluieren und um andererseits das tatsächliche chondrogene Reparaturpotential *in vivo* beurteilen zu können [197]. Hierbei ist insbesondere auch die Evaluation der optimalen Vektordosis von wesentlicher Bedeutung, um toxische Effekte zu verhindern [161] sowie die Untersuchung weiterer Genvektor-Kombinationen. Darüber hinaus sind weitere Modifizierungen der untersuchten rAAV-basierten Gentransferansätze denkbar, beispielsweise eine Kombination mit biokompatiblen Trägermaterialien, die eine örtlich und zeitlich kontrollierte Vektorfreisetzung ermöglichen [76]. Einen vielversprechenden Ansatz stellt auch eine Kombination mit Biomaterialien dar, welche den Aufbau eines hyalinartigen Knorpelgewebes begünstigen können [147]. Typ-II-Kollagen- und hyaluronsäure-haltige Biomaterialien verbesserten bereits *in vitro* die Chondrogenese von MSZ [147]. Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Augmentation mittels 3D-Druckverfahren künstlich erzeugter Gewebe [63; 281] durch genterapeutische Verfahren.

Durch den Einsatz der Genom-Editierung werden weitere vielversprechende Möglichkeiten hinsichtlich der Modifizierung genterapeutischer Ansätze eröffnet, indem Gene gezielt innerhalb des Genoms dauerhaft modifiziert werden können, ohne dabei die Zielzelle in ihren Replikations- oder Differenzierungsaktivitäten einzuschränken [4; 271]. In diesem Zusammenhang ist insbesondere das CRISPR/Cas9-System (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated Protein 9*) von wesentlicher Bedeutung [93]. Dieses basiert auf einem adaptiven Immunmechanismus von Bakterien zur gezielten Abwehr von Bakteriophagen [93; 340]. Beispielsweise wiesen Chondrozyten, deren MMP-13-Gen mittels CRISPR/Cas9-basierter Genom-Editierung modifiziert wurde, eine signifikant verringerte MMP-13-Enzymaktivität auf bei gleichzeitig signifikant erhöhter Typ-II-Kollagen-

Expression [276]. CRISPR/Cas9 kann mittels viralen und nicht viralen Vektoren in die Zielzellen eingebracht werden [4]. AAV-basierte Vektoren stellen in der Gentherapie etablierte Transfervehikel dar, im Zusammenhang mit einer *in vivo*-Applikation von CRISPR/Cas9 sind sie bislang nur bedingt geeignet [23]. Eine sichere und effiziente Anwendung der Genom-Editierung *in vivo* stellt eine große Herausforderung dar [23]. Hierbei ist insbesondere die Erforschung effizienter Transfervehikel von wesentlicher Bedeutung, die unter anderem eine effiziente intrazelluläre Freisetzung sowie nachfolgende Translokation des CRISPR/Cas9-Systems in den Zellkern erlauben [23]. In diesem Zusammenhang liefern hinsichtlich einer vorteilhaften Bioverfügbarkeit auch nicht-virale Vektoren vielversprechende Ergebnisse [320]. Eine sichere *in vivo*-Applikation erfordert zudem eine zelltypspezifische Modifizierung von Genen, um unerwünschte *Off-target*-Effekte zu verhindern, welche in einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen resultieren können mit konsekutiv erhöhter Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von Krebserkrankungen.

Die klinische Translation gentherapeutischer Ansätze ist ein langwieriger Prozess, der jedoch zukünftig eine sichere Anwendung am Menschen ermöglichen wird [76; 101]. Insbesondere eine Kombination bereits etablierter orthopädisch-chirurgischer Verfahren mit innovativen gentherapeutischen Methoden zur Therapie osteochondraler Defekte repräsentiert einen vielversprechenden Ansatz einer zukünftig erfolgreichen Therapie. Hierbei sind hinsichtlich der Kosteneffizienz insbesondere einzeitige Verfahren von wesentlicher Bedeutung; gleichzeitig sind diese aufgrund der Notwendigkeit eines einzigen operativen Eingriffes schonender für den Patienten [74]. Im Gegensatz zu den bisher zugelassenen systemischen Gentherapien basieren gentherapeutische Therapieansätze für osteochondrale Defekte zumeist auf der lokalen Applikation kleiner Mengen Genvektoren bzw. genetisch modifizierter Zellen [101]. Aus diesem Grund ist zukünftig davon auszugehen, dass gentherapeutische Verfahren in der Orthopädie und Unfallchirurgie über das Potential verfügen, erschwingliche Therapien darzustellen [98; 101].

Die direkte oder indirekte (*via ex vivo*-modifizierter Zellen) kombinierte Applikation multipler therapeutischer rAAV-Vektoren stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie fokaler osteochondraler Defekte dar. Sie haben das theoretische Potential, zukünftig verbesserte chondroreparative Differenzierungsaktivitäten im Reparaturgewebe *in vivo* zu erzielen.

9 Referenzen

1. Accadbled F, Vial J, Sales de Gauzy J (2018) Osteochondritis dissecans of the knee. *Orthop Traumatol Surg Res* 104:97-105
2. Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA (2006) The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol* 80:9831-9836
3. AlDallal SM (2020) Yescarta: A New Era for Non-Hodgkin Lymphoma Patients. *Cureus* 12:e11504
4. Almarza D, Cucchiarini M, Loughlin J (2017) Genome editing for human osteoarthritis - a perspective. *Osteoarthritis Cartilage* 25:1195-1198
5. Anders S, Grifka J (2022) Surgical treatment of focal cartilage defects in the knee : Indications, techniques, modifications and results. *Orthopäde* 51:151-164
6. Anderson WF (1998) Human gene therapy. *Nature* 392:25-30
7. Aponte-Ubillus JJ, Barajas D, Peltier J, Bardliving C, Shamlou P, Gold D (2018) Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:1045-1054
8. 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
9. Armiento AR, Stoddart MJ, Alini M, Eglin D (2018) Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta Biomater* 65:1-20
10. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5:209-219
11. Asokan A, Hamra JB, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *J Virol* 80:8961-8969
12. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM (1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149:754-756
13. Aydin S (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72:4-15
14. Bachman J (2013) Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol* 530:67-74
15. Bal BS, Rahaman MN, Jayabalan P, Kuroki K, Cockrell MK, Yao JQ, Cook JL (2010) In vivo outcomes of tissue-engineered osteochondral grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 93:164-174
16. Barros I, Silva A, de Almeida LP, Miranda CO (2021) Mesenchymal stromal cells to fight SARS-CoV-2: Taking advantage of a pleiotropic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 58:114-133
17. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM (2001) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 268:189-200

18. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 74:2777-2785
19. Bauer KL, Polousky JD (2017) Management of Osteochondritis Dissecans Lesions of the Knee, Elbow and Ankle. *Clin Sports Med* 36:469-487
20. Bauge C, Boumediene K (2015) Use of Adult Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering: Current Status and Future Developments. *Stem Cells Int* 2015:438026
21. Becerra J, Andrades JA, Guerado E, Zamora-Navas P, Lopez-Puertas JM, Reddi AH (2010) Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 16:617-627
22. Becher C, Imhoff A (2021) Guidelines for the treatment of unicompartmental cartilage defects of the knee-Cartilage repair, osteotomy, mini-implant or arthroplasty?. *Orthopäde* 50:88-95
23. Behr M, Zhou J, Xu B, Zhang H (2021) In vivo delivery of CRISPR-Cas9 therapeutics: Progress and challenges. *Acta Pharm Sin B* 11:2150-2171
24. Benthien JP, Behrens P (2010) Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC): Combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing. *Cartilage* 1:65-68
25. Bergholt NL, Lysdahl H, Lind M, Foldager CB (2019) A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage* 10:370-374
26. Berns KI (1990) Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54:316-329
27. Berns KI, Giraud C (1995) Adenovirus and adeno-associated virus as vectors for gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 772:95-104
28. Berns KI, Giraud C (1996) Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 218:1-23
29. Berns KI, Muzyczka N (2017) AAV: An Overview of Unanswered Questions. *Hum Gene Ther* 28:308-313
30. Berns KI (2020) The Unusual Properties of the AAV Inverted Terminal Repeat. *Hum Gene Ther* 31:518-523
31. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85-89
32. Bikle DD, Tahimic C, Chang W, Wang Y, Philippou A, Barton ER (2015) Role of IGF-I signaling in muscle bone interactions. *Bone* 80:79-88
33. Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (2005) Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther* 7:R1338-1347
34. Blaney Davidson EN, Remst DF, Vitters EL, van Beuningen HM, Blom AB, Goumans MJ, van den Berg WB, van der Kraan PM (2009) Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *J Immunol* 182:7937-7945
35. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 7:14
36. Bratthauer GL (2010) The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods Mol Biol* 588:257-270

37. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, Borquez-Ojeda O, Qu J, Wasielewska T, He Q, Bernal Y, Rijo IV, Hedvat C, Kobos R, Curran K, Steinherz P, Jurcic J, Rosenblat T, Maslak P, Frattini M, Sadelain M (2013) CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 5:177ra138
38. 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
39. Brittberg M, Winalski CS (2003) Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2:58-69
40. 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
41. Brittberg M, Recker D, Ilgenfritz J, Saris DBF, Group SES (2018) Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Five-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Am J Sports Med* 46:1343-1351
42. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S (1998) Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*:S247-256
43. Buckwalter JA (1998) Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 28:192-202
44. Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 41:1331-1342
45. Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B, Cenacchi A, Giannini S (2010) Osteochondral lesions of the knee: a new one-step repair technique with bone-marrow-derived cells. *J Bone Joint Surg Am* 92 Suppl 2:2-11
46. Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA (1981) Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40:241-247
47. Burn SF (2012) Detection of beta-galactosidase activity: X-gal staining. *Methods Mol Biol* 886:241-250
48. Camplejohn KL, Allard SA (1988) Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry* 89:185-188
49. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM (1997) Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res*:254-269
50. Caplan AI, Goldberg VM (1999) Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res*:S12-16
51. Caplan AI, Bruder SP (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7:259-264
52. Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98:1076-1084
53. Caplan AI (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213:341-347

54. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA (2017) Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med* 36:413-425
55. Casey GA, Papp KM, MacDonald IM (2020) Ocular Gene Therapy with Adeno-associated Virus Vectors: Current Outlook for Patients and Researchers. *J Ophthalmic Vis Res* 15:396-399
56. Chan JK (2014) The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol* 22:12-32
57. Chen CL, Jensen RL, Schnepf BC, Connell MJ, Shell R, Sferra TJ, Bartlett JS, Clark KR, Johnson PR (2005) Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol* 79:14781-14792
58. Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ (2005) AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 5:299-310
59. Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ (2006) Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing. *J Virol* 80:10346-10356
60. Clark KR, Voulgaropoulou F, Fraley DM, Johnson PR (1995) Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 6:1329-1341
61. Conway JE, Zolotukhin S, Muzyczka N, Hayward GS, Byrne BJ (1997) Recombinant adeno-associated virus type 2 replication and packaging is entirely supported by a herpes simplex virus type 1 amplicon expressing Rep and Cap. *J Virol* 71:8780-8789
62. Coura Rdos S, Nardi NB (2007) The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology* 4:99
63. Critchley S, Sheehy EJ, Cunniffe G, Diaz-Payno P, Carroll SF, Jeon O, Alsberg E, Brama PAJ, Kelly DJ (2020) 3D printing of fibre-reinforced cartilaginous templates for the regeneration of osteochondral defects. *Acta Biomater* 113:130-143
64. Crowley LC, Marfell BJ, Christensen ME, Waterhouse NJ (2016) Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* 2016; 2016(7):10.1101/pdb.prot087155
65. Cucchiari M, Ren XL, Perides G, Terwilliger EF (2003) Selective gene expression in brain microglia mediated via adeno-associated virus type 2 and type 5 vectors. *Gene Ther* 10:657-667
66. Cucchiari M, Madry H (2005) Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* 7:1495-1509
67. Cucchiari M, Ekici M, Schetting S, Kohn D, Madry H (2011) Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A* 17:1921-1933
68. Cucchiari M, Venkatesan JK, Ekici M, Schmitt G, Madry H (2012) Human mesenchymal stem cells overexpressing therapeutic genes: from basic science to clinical applications for articular cartilage repair. *Biomed Mater Eng* 22:197-208
69. Cucchiari 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
70. Cucchiari M, Madry H (2014) Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo. *Gene Ther* 21:811-819

71. 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
72. Cucchiarini M, Henrionnet C, Mainard D, Pinzano A, Madry H (2015) New trends in articular cartilage repair. *J Exp Orthop* 2:8
73. Cucchiarini M (2016) Human gene therapy: novel approaches to improve the current gene delivery systems. *Discov Med* 21:495-506
74. Cucchiarini M (2017) New cell engineering approaches for cartilage regenerative medicine. *Biomed Mater Eng* 28:201-207
75. 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* 46:1987-1996
76. Cucchiarini M, Madry H (2019) Biomaterial-guided delivery of gene vectors for targeted articular cartilage repair. *Nat Rev Rheumatol* 15:18-29
77. 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
78. da Silva KN, Gobatto ALN, Costa-Ferro ZSM, Cavalcante BRR, Caria ACI, de Aragao Franca LS, Nonaka CKV, de Macedo Lima F, Lopes-Pacheco M, Rocco PRM, de Freitas Souza BS (2021) Is there a place for mesenchymal stromal cell-based therapies in the therapeutic armamentarium against COVID-19? *Stem Cell Res Ther* 12:425
79. Danielpour D, Song K (2006) Cross-talk between IGF-I and TGF-beta signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:59-74
80. Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M, Shahram F, Nikbin B (2011) Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis* 14:211-215
81. Davies LC, Blain EJ, Gilbert SJ, Caterson B, Duance VC (2008) The potential of IGF-1 and TGFbeta1 for promoting "adult" articular cartilage repair: an in vitro study. *Tissue Eng Part A* 14:1251-1261
82. Daya S, Berns KI (2008) Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21:583-593
83. Daya S, Cortez N, Berns KI (2009) Adeno-associated virus site-specific integration is mediated by proteins of the nonhomologous end-joining pathway. *J Virol* 83:11655-11664
84. de Vries-van Melle ML, Mandl EW, Kops N, Koevoet WJ, Verhaar JA, van Osch GJ (2012) An osteochondral culture model to study mechanisms involved in articular cartilage repair. *Tissue Eng Part C Methods* 18:45-53
85. de Witte SFH, Lambert EE, Merino A, Strini T, Douben H, O'Flynn L, Elliman SJ, de Klein A, Newsome PN, Baan CC, Hoogduijn MJ (2017) Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. *Cytherapy* 19:798-807
86. Dean R, Jensen I, Cyr P, Miller B, Maru B, Sproule DM, Feltner DE, Wiesner T, Malone DC, Bischof M, Toro W, Dabbous O (2021) An updated cost-utility model for onasemnogene abeparvovec (Zolgensma(R)) in spinal muscular atrophy type 1 patients and comparison with evaluation by the Institute for Clinical and Effectiveness Review (ICER). *J Mark Access Health Policy* 9:1889841

87. del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:434-464
88. Dente L, Cesareni G, Cortese R (1983) pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Res* 11:1645-1655
89. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-584
90. Diederichs S, Klampfleuthner FAM, Moradi B, Richter W (2019) Chondral Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Without Progression Into the Endochondral Pathway. *Front Cell Dev Biol* 7:270
91. Ding W, Zhang L, Yan Z, Engelhardt JF (2005) Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 12:873-880
92. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317
93. Doudna JA, Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096
94. Du B, Wu P, Boldt-Houle DM, Terwilliger EF (1996) Efficient transduction of human neurons with an adeno-associated virus vector. *Gene Ther* 3:254-261
95. Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF (1999) Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 73:10371-10376
96. Duan D (2018) Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther* 26:2337-2356
97. Ertl HCJ, High KA (2017) Impact of AAV Capsid-Specific T-Cell Responses on Design and Outcome of Clinical Gene Transfer Trials with Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors: An Evolving Controversy. *Hum Gene Ther* 28:328-337
98. Evans CH (2004) Orthopaedics: gene therapy's dark horse. *Gene Ther* 11:343
99. Evans CH, Huard J (2015) Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol* 11:234-242
100. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD (2018) Arthritis gene therapy is becoming a reality. *Nat Rev Rheumatol* 14:381-382
101. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD (2021) Orthopaedic Gene Therapy: Twenty-Five Years On. *JBJS Rev* 9:10.2106/JBJS.RVW.20.00220
102. 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
103. Finnsen KW, Parker WL, ten Dijke P, Thorikay M, Philip A (2008) ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res* 23:896-906
104. Fischer J, Aulmann A, Dexheimer V, Grossner T, Richter W (2014) Intermittent PTHrP(1-34) exposure augments chondrogenesis and reduces hypertrophy of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev* 23:2513-2523

105. Fischer J, Ortel M, Hagmann S, Hoeflich A, Richter W (2016) Role of PTHrP(1-34) Pulse Frequency Versus Pulse Duration to Enhance Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenesis. *J Cell Physiol* 231:2673-2681
106. Fortier LA, Balkman CE, Sandell LJ, Ratcliffe A, Nixon AJ (2001) Insulin-like growth factor-I gene expression patterns during spontaneous repair of acute articular cartilage injury. *J Orthop Res* 19:720-728
107. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16:381-390
108. Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M (2014) Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor-beta via recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 25:1050-1060
109. Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M (2014) Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 5:103
110. Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Madry H, Cucchiari M (2015) Current progress in stem cell-based gene therapy for articular cartilage repair. *Curr Stem Cell Res Ther* 10:121-131
111. Frisch J, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M (2016) TGF-beta gene transfer and overexpression via rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates. *J Cell Mol Med* 20:430-440
112. Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H (2005) Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J Biol Chem* 280:8343-8350
113. Gao L, Orth P, Cucchiari M, Madry H (2019) Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. *Am J Sports Med* 47:222-231
114. Gay S, Miller EJ (1983) What is collagen, what is not. *Ultrastruct Pathol* 4:365-377
115. Gelse K, Poschl E, Aigner T (2003) Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1531-1546
116. Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B (2009) One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin Orthop Relat Res* 467:3307-3320
117. Giannini S, Buda R, Cavallo M, Ruffilli A, Cenacchi A, Cavallo C, Vannini F (2010) Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury* 41:1196-1203
118. Gigante A, Calcagno S, Cecconi S, Ramazzotti D, Manzotti S, Enea D (2011) Use of collagen scaffold and autologous bone marrow concentrate as a one-step cartilage repair in the knee: histological results of second-look biopsies at 1 year follow-up. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24:69-72
119. Girod A, Wobus CE, Zadori Z, Ried M, Leike K, Tijssen P, Kleinschmidt JA, Hallek M (2002) The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* 83:973-978

120. 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
121. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97:33-44
122. Goldring MB, Marcu KB (2009) Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 11:224
123. Goldring SR, Goldring MB (2016) Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol* 12:632-644
124. Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, Kon E (2010) The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:434-447
125. Goncalves MA (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 2:43
126. Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ (2007) Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br* 89:672-685
127. Goodrich LR, Phillips JN, McIlwraith CW, Foti SB, Grieger JC, Gray SJ, Samulski RJ (2013) Optimization of scAAVIL-1ra In Vitro and In Vivo to Deliver High Levels of Therapeutic Protein for Treatment of Osteoarthritis. *Mol Ther Nucleic Acids* 2:e70
128. Grieger JC, Samulski RJ (2012) Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol* 507:229-254
129. Grogan SP, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons JS, O'Driscoll S, Martin I, Mainil-Varlet P (2006) Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage. *Tissue Eng* 12:2141-2149
130. Guermazi A, Hayashi D, Roemer FW, Niu J, Quinn EK, Crema MD, Nevitt MC, Torner J, Lewis CE, Felson DT (2017) Brief Report: Partial- and Full-Thickness Focal Cartilage Defects Contribute Equally to Development of New Cartilage Damage in Knee Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheumatol* 69:560-564
131. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
132. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471
133. Hellingman CA, Davidson EN, Koevoet W, Vitters EL, van den Berg WB, van Osch GJ, van der Kraan PM (2011) Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: inhibition of Smad1/5/8P prevents terminal differentiation and calcification. *Tissue Eng Part A* 17:1157-1167
134. 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
135. Hilgsmann M, Cooper C, Arden N, Boers M, Branco JC, Luisa Brandi M, Bruyere O, Guillemin F, Hochberg MC, Hunter DJ, Kanis JA, Kvien TK, Laslop A, Pelletier JP, Pinto D, Reiter-Niesert S, Rizzoli R, Rovati LC, Severens JL, Silverman S, Tsouderos

- Y, Tugwell P, Reginster JY (2013) Health economics in the field of osteoarthritis: an expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum* 43:303-313
136. Hiraide A, Yokoo N, Xin KQ, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Saito T (2005) Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther* 16:1413-1421
137. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M (2002) Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 18:730-734
138. Hoburg A, Niemeyer P, Laute V, Zinser W, John T, Becher C, Izadpanah K, Diehl P, Kolombe T, Fay J, Siebold R, Fickert S (2022) Safety and Efficacy of Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation With Spheroids for Patellofemoral or Tibiofemoral Defects: A 5-Year Follow-up of a Phase 2, Dose-Confirmation Trial. *Orthop J Sports Med* 10:23259671211053380
139. Hochberg MC, Guermazi A, Guehring H, Aydemir A, Wax S, Fleuranceau-Morel P, Reinstrup Bihlet A, Byrjalsen I, Ragnar Andersen J, Eckstein F (2019) Effect of Intra-Articular Sprifermin vs Placebo on Femorotibial Joint Cartilage Thickness in Patients With Osteoarthritis: The FORWARD Randomized Clinical Trial. *JAMA* 322:1360-1370
140. Horga LM, Hirschmann AC, Henckel J, Fotiadou A, Di Laura A, Torlasco C, D'Silva A, Sharma S, Moon JC, Hart AJ (2020) Prevalence of abnormal findings in 230 knees of asymptomatic adults using 3.0 T MRI. *Skeletal Radiol* 49:1099-1107
141. Huang T, Long M, Huo B (2010) Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. *Open Biomed Eng J* 4:271-278
142. Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10:432-463
143. 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
144. Huser D, Khalid D, Lutter T, Hammer EM, Weger S, Hessler M, Kalus U, Tauchmann Y, Hensel-Wiegel K, Lassner D, Heilbronn R (2017) High Prevalence of Infectious Adeno-associated Virus (AAV) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicative of T Lymphocytes as Sites of AAV Persistence. *J Virol* 91:e02137-16
145. Im DS, Muzyczka N (1990) The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61:447-457
146. 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
147. Intini C, Lemoine M, Hodgkinson T, Casey S, Gleeson JP, O'Brien FJ (2022) A highly porous type II collagen containing scaffold for the treatment of cartilage defects enhances MSC chondrogenesis and early cartilaginous matrix deposition. *Biomater Sci* 10:970-983
148. Islam M, Lantada AD, Mager D, Korvink JG (2022) Carbon-Based Materials for Articular Tissue Engineering: From Innovative Scaffolding Materials toward Engineered Living Carbon. *Adv Healthc Mater* 11:e2101834
149. Ivkovic A, Pascher A, Hudetz D, Maticic D, Jelic M, Dickinson S, Loparic M, Haspl M, Windhager R, Pecina M (2010) Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. *Gene Ther* 17:779-789

150. Jansen M, van Schaik FM, Ricker AT, Bullock B, Woods DE, Gabbay KH, Nussbaum AL, Sussenbach JS, Van den Brande JL (1983) Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* 306:609-611
151. Johnson JS, Samulski RJ (2009) Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *J Virol* 83:2632-2644
152. Johnson JS, Li C, DiPrimio N, Weinberg MS, McCown TJ, Samulski RJ (2010) Mutagenesis of adeno-associated virus type 2 capsid protein VP1 uncovers new roles for basic amino acids in trafficking and cell-specific transduction. *J Virol* 84:8888-8902
153. Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2:54-69
154. Johnson VL, Hunter DJ (2014) The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28:5-15
155. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-272
156. 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
157. Jones MH, Williams AM (2016) Osteochondritis dissecans of the knee: a practical guide for surgeons. *Bone Joint J* 98-B:723-729
158. Kang JS, Alliston T, Delston R, Derynck R (2005) Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J* 24:2543-2555
159. Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, Nakamura T, Watanabe M, Oshimi K, Daida H (2005) Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 79:609-614
160. Kaul G, Cucchiari M, Arntzen D, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Madry H (2006) Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med* 8:100-111
161. Kawamura K, Chu CR, Sobajima S, Robbins PD, Fu FH, Izzo NJ, Niyibizi C (2005) Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp Hematol* 33:865-872
162. Kelich JM, Ma J, Dong B, Wang Q, Chin M, Magura CM, Xiao W, Yang W (2015) Super-resolution imaging of nuclear import of adeno-associated virus in live cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2:15047
163. 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
164. King JA, Dubielzig R, Grimm D, Kleinschmidt JA (2001) DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J* 20:3282-3291
165. Klein-Nulend J, Louwense RT, Heyligers IC, Wuisman PI, Semeins CM, Goei SW, Burger EH (1998) Osteogenic protein (OP-1, BMP-7) stimulates cartilage

- differentiation of human and goat perichondrium tissue in vitro. *J Biomed Mater Res* 40:614-620
166. Kleuskens MWA, Crispim JF, van Donkelaar CC, Janssen RPA, Ito K (2022) Evaluating Initial Integration of Cell-Based Chondrogenic Constructs in Human Osteochondral Explants. *Tissue Eng Part C Methods* 28:34-44
 167. Koczot FJ, Carter BJ, Garon CF, Rose JA (1973) Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:215-219
 168. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI (1990) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2211-2215
 169. Krych AJ, Robertson CM, Williams RJ, 3rd, Cartilage Study G (2012) Return to athletic activity after osteochondral allograft transplantation in the knee. *Am J Sports Med* 40:1053-1059
 170. Krych AJ, Saris DBF, Stuart MJ, Hacken B (2020) Cartilage Injury in the Knee: Assessment and Treatment Options. *J Am Acad Orthop Surg* 28:914-922
 171. Kuroda R, Usas A, Kubo S, Corsi K, Peng H, Rose T, Cummins J, Fu FH, Huard J (2006) Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum* 54:433-442
 172. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M (2007) Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 15:226-231
 173. La Bella T, Imbeaud S, Peneau C, Mami I, Datta S, Bayard Q, Caruso S, Hirsch TZ, Calderaro J, Morcrette G, Guettier C, Paradis V, Amaddeo G, Laurent A, Possenti L, Chiche L, Bioulac-Sage P, Blanc JF, Letouze E, Nault JC, Zucman-Rossi J (2020) Adeno-associated virus in the liver: natural history and consequences in tumour development. *Gut* 69:737-747
 174. Lee B, Parvizi J, Bramlet D, Romness DW, Guermazi A, Noh M, Sodhi N, Khlopas A, Mont MA (2020) Results of a Phase II Study to Determine the Efficacy and Safety of Genetically Engineered Allogeneic Human Chondrocytes Expressing TGF-beta1. *J Knee Surg* 33:167-172
 175. Lee KH, Song SU, Hwang TS, Yi Y, Oh IS, Lee JY, Choi KB, Choi MS, Kim SJ (2001) Regeneration of hyaline cartilage by cell-mediated gene therapy using transforming growth factor beta 1-producing fibroblasts. *Hum Gene Ther* 12:1805-1813
 176. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*:3923
 177. Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M (2017) SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connect Tissue Res* 58:2-14
 178. Lefebvre V, Angelozzi M, Haseeb A (2019) SOX9 in cartilage development and disease. *Curr Opin Cell Biol* 61:39-47
 179. Lepage SIM, Robson N, Gilmore H, Davis O, Hooper A, St John S, Kamesan V, Gelis P, Carvajal D, Hurtig M, Koch TG (2019) Beyond Cartilage Repair: The Role of the Osteochondral Unit in Joint Health and Disease. *Tissue Eng Part B Rev* 25:114-125
 180. Li C, Samulski RJ (2020) Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 21:255-272

181. Li J, Pei M (2012) Cell senescence: a challenge in cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 18:270-287
182. Lim CL, Lee YJ, Cho JH, Choi H, Lee B, Lee MC, Kim S (2017) Immunogenicity and immunomodulatory effects of the human chondrocytes, hChonJ. *BMC Musculoskelet Disord* 18:199
183. Linden RM, Ward P, Giraud C, Winocour E, Berns KI (1996) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11288-11294
184. Linden RM, Winocour E, Berns KI (1996) The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7966-7972
185. Longobardi L, Granero-Molto F, O'Rear L, Myers TJ, Li T, Kregor PJ, Spagnoli A (2009) Subcellular localization of IRS-1 in IGF-I-mediated chondrogenic proliferation, differentiation and hypertrophy of bone marrow mesenchymal stem cells. *Growth Factors* 27:309-320
186. Louis Jeune V, Joergensen JA, Hajjar RJ, Weber T (2013) Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* 24:59-67
187. Lu XL, Mow VC (2008) Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med Sci Sports Exerc* 40:193-199
188. Lusby E, Fife KH, Berns KI (1980) Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol* 34:402-409
189. Luyten FP, Hascall VC, Nissley SP, Morales TI, Reddi AH (1988) Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 267:416-425
190. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4:415-428
191. 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
192. Madry H, Kohn D, Cucchiari M (2006) [Gene therapy in orthopaedic surgery]. *Orthopäde* 35:1193-1202
193. Madry H, Orth P, Kaul G, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Cucchiari M (2010) Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 130:1311-1322
194. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M (2010) The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:419-433
195. Madry H, Grun UW, Knutsen G (2011) Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int* 108:669-677
196. Madry H, Orth P, Cucchiari M (2011) Gene Therapy for Cartilage Repair. *Cartilage* 2:201-225
197. Madry H, Ochi M, Cucchiari M, Pape D, Seil R (2015) Large animal models in experimental knee sports surgery: focus on clinical translation. *J Exp Orthop* 2:9
198. Madry H, Cucchiari M (2016) Gene therapy for human osteoarthritis: principles and clinical translation. *Expert Opin Biol Ther* 16:331-346

199. Madry H, Kon E, Condello V, Peretti GM, Steinwachs M, Seil R, Berruto M, Engebretsen L, Filardo G, Angele P (2016) Early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 24:1753-1762
200. 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, Cucchiari 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. *Adv Mater* 32:e1906508
201. Mariani E, Pulsatelli L, Facchini A (2014) Signaling pathways in cartilage repair. *Int J Mol Sci* 15:8667-8698
202. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ (2008) Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22:351-384
203. Martin J, Frederick A, Luo Y, Jackson R, Joubert M, Sol B, Poulin F, Pastor E, Armentano D, Wadsworth S, Vincent K (2013) Generation and characterization of adeno-associated virus producer cell lines for research and preclinical vector production. *Hum Gene Ther Methods* 24:253-269
204. Maurer AC, Weitzman MD (2020) Adeno-Associated Virus Genome Interactions Important for Vector Production and Transduction. *Hum Gene Ther* 31:499-511
205. McLaughlin SK, Collis P, Hermonat PL, Muzyczka N (1988) Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62:1963-1973
206. Meier AF, Fraefel C, Seyffert M (2020) The Interplay between Adeno-Associated Virus and its Helper Viruses. *Viruses* 12:662
207. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, Lowes L, Alfano L, Berry K, Church K, Kissel JT, Nagendran S, L'Italien J, Sproule DM, Wells C, Cardenas JA, Heitzer MD, Kaspar A, Corcoran S, Braun L, Likhite S, Miranda C, Meyer K, Foust KD, Burghes AHM, Kaspar BK (2017) Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 377:1713-1722
208. Meng W, Rey-Rico A, Claudel M, Schmitt G, Speicher-Mentges S, Pons F, Lebeau L, Venkatesan JK, Cucchiari M (2020) rAAV-Mediated Overexpression of SOX9 and TGF-beta via Carbon Dot-Guided Vector Delivery Enhances the Biological Activities in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Nanomaterials (Basel)* 10:885
209. Mietzsch M, Hering H, Hammer EM, Agbandje-McKenna M, Zolotukhin S, Heilbronn R (2017) OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal Encapsulation of Foreign DNA. *Hum Gene Ther Methods* 28:15-22
210. Mizukami H, Young NS, Brown KE (1996) Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-kilodalton cell membrane glycoprotein. *Virology* 217:124-130
211. Morscheid S, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M, Venkatesan JK (2019) Therapeutic Effects of rAAV-Mediated Concomitant Gene Transfer and Overexpression of TGF-beta and IGF-I on the Chondrogenesis of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 20:2591
212. Morscheid S, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Cucchiari M (2019) Remodeling of Human Osteochondral Defects via rAAV-Mediated Co-Overexpression of TGF-beta and IGF-I from Implanted Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *J Clin Med* 8:1326

213. Mueller MB, Tuan RS (2008) Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 58:1377-1388
214. Muhuri M, Maeda Y, Ma H, Ram S, Fitzgerald KA, Tai PW, Gao G (2021) Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors. *J Clin Invest* 131:e143780
215. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F (2002) Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46:704-713
216. Myers MW, Carter BJ (1980) Assembly of adeno-associated virus. *Virology* 102:71-82
217. Nash K, Chen W, Muzyczka N (2008) Complete in vitro reconstitution of adeno-associated virus DNA replication requires the minichromosome maintenance complex proteins. *J Virol* 82:1458-1464
218. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, 3rd, Strohl WR (2017) Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31:317-334
219. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, Letouze E, Pilati C, Verret B, Blanc JF, Balabaud C, Calderaro J, Laurent A, Letexier M, Bioulac-Sage P, Calvo F, Zucman-Rossi J (2015) Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 47:1187-1193
220. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, Lee EH (2010) Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med* 38:1110-1116
221. Neri S (2019) Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect. *Int J Mol Sci* 20:2406
222. Neri S, Borzi RM (2020) Molecular Mechanisms Contributing to Mesenchymal Stromal Cell Aging. *Biomolecules* 10:340
223. Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, Salzmänn GM, Kostler W, Sudkamp NP, Steinwachs M (2010) Standardized cartilage biopsies from the intercondylar notch for autologous chondrocyte implantation (ACI). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:1122-1127
224. Niemeyer P, Becher C, Brucker PU, Buhs M, Fickert S, Gelse K, Gunther D, Kaelin R, Kreuz P, Lutzner J, Nehrer S, Madry H, Marlovits S, Mehl J, Ott H, Pietschmann M, Spahn G, Tischer T, Volz M, Walther M, Welsch G, Zellner J, Zinser W, Angele P (2018) [Significance of Matrix-augmented Bone Marrow Stimulation for Treatment of Cartilage Defects of the Knee: A Consensus Statement of the DGOU Working Group on Tissue Regeneration]. *Z Orthop Unfall* 156:513-532
225. O'Driscoll SW (1998) The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 80:1795-1812
226. O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Rosier RN (1994) Effects of transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factor on DNA synthesis in growth plate chondrocytes are enhanced by insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res* 12:299-310
227. Olah T, Cai X, Michaelis JC, Madry H (2021) Comparative anatomy and morphology of the knee in translational models for articular cartilage disorders. Part I: Large animals. *Ann Anat* 235:151680

228. Olah T, Reinhard J, Laschke MW, Goebel LKH, Walter F, Schmitt G, Speicher-Mentges S, Menger MD, Cucchiarini M, Pape D, Madry H (2022) Axial alignment is a critical regulator of knee osteoarthritis. *Sci Transl Med* 14:eabn0179
229. Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Madry H, Cucchiarini M (2014) Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning* 7:1-17
230. Orth P, Madry H (2015) Complex and elementary histological scoring systems for articular cartilage repair. *Histol Histopathol* 30:911-919
231. Orth P, Eldracher M, Cucchiarini M, Madry H (2020) Small-Diameter Subchondral Drilling Improves DNA and Proteoglycan Content of the Cartilaginous Repair Tissue in a Large Animal Model of a Full-Thickness Chondral Defect. *J Clin Med* 9:1903
232. Orth P, Gao L, Madry H (2020) Microfracture for cartilage repair in the knee: a systematic review of the contemporary literature. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 28:670-706
233. Orved KF, Begum L, Mohammed HO, Nixon AJ (2015) Implantation of rAAV5-IGF-I transduced autologous chondrocytes improves cartilage repair in full-thickness defects in the equine model. *Mol Ther* 23:363-373
234. Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ (1989) Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *J Orthop Res* 7:35-42
235. Pagnotto MR, Wang Z, Karpie JC, Ferretti M, Xiao X, Chu CR (2007) Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* 14:804-813
236. Patel A, Zhao J, Duan D, Lai Y (2019) Design of AAV Vectors for Delivery of Large or Multiple Transgenes. *Methods Mol Biol* 1950:19-33
237. Pauli C, Whiteside R, Heras FL, Nestic D, Koziol J, Grogan SP, Matyas J, Pritzker KP, D'Lima DD, Lotz MK (2012) Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. *Osteoarthritis Cartilage* 20:476-485
238. Payne KA, Didiano DM, Chu CR (2010) Donor sex and age influence the chondrogenic potential of human femoral bone marrow stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 18:705-713
239. Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, McCollum R, Martel-Pelletier J (1993) Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am* 19:545-568
240. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, Jae LT, Wosen JE, Nagamine CM, Chapman MS, Carette JE (2016) An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 530:108-112
241. Pillay S, Zou W, Cheng F, Puschnik AS, Meyer NL, Ganaie SS, Deng X, Wosen JE, Davulcu O, Yan Z, Engelhardt JF, Brown KE, Chapman MS, Qiu J, Carette JE (2017) Adeno-associated Virus (AAV) Serotypes Have Distinctive Interactions with Domains of the Cellular AAV Receptor. *J Virol* 91:e00391-17
242. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147

243. Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM (2000) Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12103-12108
244. Popa-Wagner R, Sonntag F, Schmidt K, King J, Kleinschmidt JA (2012) Nuclear translocation of adeno-associated virus type 2 capsid proteins for virion assembly. *J Gen Virol* 93:1887-1898
245. Powell SK, Rivera-Soto R, Gray SJ (2015) Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med* 19:49-57
246. Pridie KH (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee. *J Bone Joint Surg Am* 41:618-619
247. Puche JE, Castilla-Cortazar I (2012) Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Transl Med* 10:224
248. Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A (1999) Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5:71-77
249. 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
250. Rey-Rico A, Venkatesan JK, Frisch J, Rial-Hermida I, Schmitt G, Concheiro A, Madry H, Alvarez-Lorenzo C, Cucchiari M (2015) PEO-PPO-PEO micelles as effective rAAV-mediated gene delivery systems to target human mesenchymal stem cells without altering their differentiation potency. *Acta Biomater* 27:42-52
251. Rey-Rico A, Venkatesan JK, Frisch J, Schmitt G, Monge-Marcet A, Lopez-Chicon P, Mata A, Semino C, Madry H, Cucchiari M (2015) Effective and durable genetic modification of human mesenchymal stem cells via controlled release of rAAV vectors from self-assembling peptide hydrogels with a maintained differentiation potency. *Acta Biomater* 18:118-127
252. Rey-Rico A, Venkatesan JK, Sohler J, Moroni L, Cucchiari M, Madry H (2015) Adapted chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells via controlled release of TGF-beta1 from poly(ethylene oxide)-terephthalate/poly(butylene terephthalate) multiblock scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 103:371-383
253. Rey-Rico A, Cucchiari M (2016) Recent tissue engineering-based advances for effective rAAV-mediated gene transfer in the musculoskeletal system. *Bioengineered* 7:175-188
254. Rey-Rico A, Cucchiari M (2016) Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery. *Acta Biomater* 29:1-10
255. 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
256. Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Concheiro A, Madry H, Alvarez-Lorenzo C, Cucchiari M (2017) rAAV-mediated overexpression of TGF-beta via vector delivery in polymeric micelles stimulates the biological and reparative activities of human

- articular chondrocytes in vitro and in a human osteochondral defect model. *Int J Nanomedicine* 12:6985-6996
257. Richter DL, Tanksley JA, Miller MD (2016) Osteochondral Autograft Transplantation: A Review of the Surgical Technique and Outcomes. *Sports Med Arthrosc Rev* 24:74-78
258. Riegger J, Brenner RE (2020) Pathomechanisms of Posttraumatic Osteoarthritis: Chondrocyte Behavior and Fate in a Precarious Environment. *Int J Mol Sci* 21:1560
259. Ronzitti G, Gross DA, Mingozi F (2020) Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front Immunol* 11:670
260. Rose JA, Berns KI, Hoggan MD, Kocot FJ (1969) Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:863-869
261. Rowland R, Colello M, Wyland DJ (2019) Osteochondral Autograft Transfer Procedure: Arthroscopic Technique and Technical Pearls. *Arthrosc Tech* 8:e713-e719
262. Russell DW, Grompe M (2015) Adeno-associated virus finds its disease. *Nat Genet* 47:1104-1105
263. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, Wittes J, Pappas J, Elci O, McCague S, Cross D, Marshall KA, Walshire J, Kehoe TL, Reichert H, Davis M, Raffini L, George LA, Hudson FP, Dingfield L, Zhu X, Haller JA, Sohn EH, Mahajan VB, Pfeifer W, Weckmann M, Johnson C, Gewaily D, Drack A, Stone E, Wachtel K, Simonelli F, Leroy BP, Wright JF, High KA, Maguire AM (2017) Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 390:849-860
264. Saghati S, Nasrabadi HT, Khoshfetrat AB, Moharamzadeh K, Hassani A, Mohammadi SM, Rahbarghazi R, Fathi Karkan S (2021) Tissue Engineering Strategies to Increase Osteochondral Regeneration of Stem Cells; a Close Look at Different Modalities. *Stem Cell Rev Rep* 17:1294-1311
265. Salem HS, Chaudhry ZS, Lucenti L, Tucker BS, Freedman KB (2022) The Importance of Staging Arthroscopy for Chondral Defects of the Knee. *J Knee Surg* 35:145-149
266. 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
267. 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
268. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 10:3941-3950
269. Samulski RJ (1993) Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr Opin Genet Dev* 3:74-80
270. Samulski RJ, Muzyczka N (2014) AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annu Rev Virol* 1:427-451

271. Sandoval IM, Collier TJ, Manfredsson FP (2019) Design and Assembly of CRISPR/Cas9 Lentiviral and rAAV Vectors for Targeted Genome Editing. *Methods Mol Biol* 1937:29-45
272. Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T, Engelhardt JF (2000) Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* 74:9184-9196
273. Saris D, Price A, Widuchowski W, Bertrand-Marchand M, Caron J, Drogset JO, Emans P, Podskubka A, Tsuchida A, Kili S, Levine D, Brittberg M, group Ss (2014) Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Two-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Am J Sports Med* 42:1384-1394
274. Schnepf BC, Jensen RL, Clark KR, Johnson PR (2009) Infectious molecular clones of adeno-associated virus isolated directly from human tissues. *J Virol* 83:1456-1464
275. Schuessler-Lenz M, Enzmann H, Vamvakas S (2020) Regulators' Advice Can Make a Difference: European Medicines Agency Approval of Zynteglo for Beta Thalassemia. *Clin Pharmacol Ther* 107:492-494
276. Seidl CI, Fulga TA, Murphy CL (2019) CRISPR-Cas9 targeting of MMP13 in human chondrocytes leads to significantly reduced levels of the metalloproteinase and enhanced type II collagen accumulation. *Osteoarthritis Cartilage* 27:140-147
277. Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M, Brauchle C (2001) Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 294:1929-1932
278. 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
279. Shah SS, Mithoefer K (2020) Current Applications of Growth Factors for Knee Cartilage Repair and Osteoarthritis Treatment. *Curr Rev Musculoskelet Med* 13:641-650
280. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M (1998) Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* 273:27467-27473
281. Shamma RN, Sayed RH, Madry H, El Sayed NS, Cucchiari M (2022) Triblock Copolymer Bioinks in Hydrogel Three-Dimensional Printing for Regenerative Medicine: A Focus on Pluronic F127. *Tissue Eng Part B Rev* 28:451-463
282. 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
283. Shi L, Yuan X, Yao W, Wang S, Zhang C, Zhang B, Song J, Huang L, Xu Z, Fu JL, Li Y, Xu R, Li TT, Dong J, Cai J, Li G, Xie Y, Shi M, Li Y, Zhang Y, Xie WF, Wang FS (2022) Human mesenchymal stem cells treatment for severe COVID-19: 1-year follow-up results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *EBioMedicine* 75:103789
284. Shi S, Mercer S, Eckert GJ, Trippel SB (2009) Growth factor regulation of growth factors in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 284:6697-6704
285. Shi S, Mercer S, Eckert GJ, Trippel SB (2012) Regulation of articular chondrocyte aggrecan and collagen gene expression by multiple growth factor gene transfer. *J Orthop Res* 30:1026-1031

286. Shi S, Mercer S, Eckert GJ, Trippel SB (2013) Growth factor regulation of growth factor production by multiple gene transfer to chondrocytes. *Growth Factors* 31:32-38
287. Smith DR (1993) Restriction endonuclease digestion of DNA. *Methods Mol Biol* 18:427-431
288. Snyder RO, Spratt SK, Lagarde C, Bohl D, Kaspar B, Sloan B, Cohen LK, Danos O (1997) Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther* 8:1891-1900
289. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1:461-468
290. South E, Cox E, Meader N, Woolacott N, Griffin S (2019) Strimvelis((R)) for Treating Severe Combined Immunodeficiency Caused by Adenosine Deaminase Deficiency: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Highly Specialised Technology Evaluation. *Pharmacoecon Open* 3:151-161
291. Southworth TM, Naveen NB, Nwachukwu BU, Cole BJ, Frank RM (2019) Orthobiologics for Focal Articular Cartilage Defects. *Clin Sports Med* 38:109-122
292. Spahn G, Hofmann GO (2014) Focal cartilage defects within the medial knee compartment. predictors for osteoarthritis progression. *Z Orthop Unfall* 152:480-488
293. Stahnke S, Lux K, Uhrig S, Kreppel F, Hosel M, Coutelle O, Ogris M, Hallek M, Buning H (2011) Intrinsic phospholipase A2 activity of adeno-associated virus is involved in endosomal escape of incoming particles. *Virology* 409:77-83
294. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK (2010) Microfracture: Its History and Experience of the Developing Surgeon. *Cartilage* 1:78-86
295. Steadman JR, Briggs KK, Matheny LM, Guillet A, Hanson CM, Willimon SC (2015) Outcomes following microfracture of full-thickness articular cartilage lesions of the knee in adolescent patients. *J Knee Surg* 28:145-150
296. Steinert AF, Palmer GD, Pilapil C, Noth U, Evans CH, Ghivizzani SC (2009) Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng Part A* 15:1127-1139
297. Stender S, Murphy M, O'Brien T, Stengaard C, Ulrich-Vinther M, Soballe K, Barry F (2007) Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 13:93-99
298. 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
299. Summerford C, Samulski RJ (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72:1438-1445
300. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ (1999) AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5:78-82
301. Tao K, Frisch J, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Lin J, Cucchiaroni M (2016) Co-overexpression of TGF-beta and SOX9 via rAAV gene transfer modulates the metabolic and chondrogenic activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 7:20
302. Tao K, Rey-Rico A, Frisch J, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Lin J, Cucchiaroni M (2016) rAAV-mediated combined gene transfer and overexpression of TGF-beta

- and SOX9 remodels human osteoarthritic articular cartilage. *J Orthop Res* 34:2181-2190
303. Thielen NGM, van der Kraan PM, van Caam APM (2019) TGFbeta/BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. *Cells* 8:969
 304. Trippel S, Cucchiarini M, Madry H, Shi S, Wang C (2007) Gene therapy for articular cartilage repair. *Proc Inst Mech Eng H* 221:451-459
 305. Trippel SB, Corvol MT, Dumontier MF, Rappaport R, Hung HH, Mankin HJ (1989) Effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and growth hormone on cultured growth plate and articular chondrocytes. *Pediatr Res* 25:76-82
 306. Trippel SB (1995) Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 43:129-132
 307. Trippel SB (1997) Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect* 46:473-476
 308. Trippel SB, Ghivizzani SC, Nixon AJ (2004) Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Ther* 11:351-359
 309. Tse C, Capeau J (2003) [Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids]. *Ann Biol Clin (Paris)* 61:279-293
 310. Tseng YS, Agbandje-McKenna M (2014) Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors. *Front Immunol* 5:9
 311. 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
 312. Tsukazaki T, Usa T, Matsumoto T, Enomoto H, Ohtsuru A, Namba H, Iwasaki K, Yamashita S (1994) Effect of transforming growth factor-beta on the insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 215:9-16
 313. Turinetto V, Vitale E, Giachino C (2016) Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci* 17:1164
 314. Urabe M, Ding C, Kotin RM (2002) Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* 13:1935-1943
 315. van Akkooi ACJ, Haferkamp S, Papa S, Franke V, Pinter A, Weishaupt C, Huber MA, Loquai C, Richtig E, Gokani P, Ohrling K, Louie KS, Mohr P (2021) A Retrospective Chart Review Study of Real-World Use of Talimogene Laherparepvec in Unresectable Stage IIIB-IVM1a Melanoma in Four European Countries. *Adv Ther* 38:1245-1262
 316. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB (2009) TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage* 17:1539-1545
 317. van der Kraan PM, Goumans MJ, Blaney Davidson E, ten Dijke P (2012) Age-dependent alteration of TGF-beta signalling in osteoarthritis. *Cell Tissue Res* 347:257-265

318. van der Kraan PM, van den Berg WB (2012) Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage* 20:223-232
319. van der Kraan PM (2017) The changing role of TGFbeta in healthy, ageing and osteoarthritic joints. *Nat Rev Rheumatol* 13:155-163
320. van Hees M, Slott S, Hansen AH, Kim HS, Ji HP, Astakhova K (2022) New approaches to moderate CRISPR-Cas9 activity: Addressing issues of cellular uptake and endosomal escape. *Mol Ther* 30:32-46
321. 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
322. Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Wezel A, Madry H, Cucchiari M (2013) rAAV-mediated overexpression of TGF-beta stably restructures human osteoarthritic articular cartilage in situ. *J Transl Med* 11:211
323. Venkatesan JK, Rey-Rico A, Cucchiari M (2019) Current Trends in Viral Gene Therapy for Human Orthopaedic Regenerative Medicine. *Tissue Eng Regen Med* 16:345-355
324. Venkatesan JK, Falentin-Daudre C, Leroux A, Migonney V, Cucchiari M (2020) Biomaterial-Guided Recombinant Adeno-associated Virus Delivery from Poly(Sodium Styrene Sulfonate)-Grafted Poly(varepsilon-Caprolactone) Films to Target Human Bone Marrow Aspirates. *Tissue Eng Part A* 26:450-459
325. Verdera HC, Kuranda K, Mingozzi F (2020) AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer. *Mol Ther* 28:723-746
326. Virag T, Cecchini S, Kotin RM (2009) Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: overcoming production limitations using a baculovirus-insect cell expression strategy. *Hum Gene Ther* 20:807-817
327. Vogelmann T, Roessler PP, Buhs M, Ostermeier S, Gille J, Hoburg A, Zollner Y, Schwarz S, Schubert T, Grebe M, Zinser W (2022) Long-term cost-effectiveness of matrix-associated chondrocyte implantation in the German health care system: a discrete event simulation. *Arch Orthop Trauma Surg* 2022 Jan 22. Epub ahead of print.
328. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn SY, Ali MK, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Bahalim AN, Barker-Collo S, Barrero LH, Bartels DH, Basanez MG, Baxter A, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bernabe E, Bhalla K, Bhandari B, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Black JA, Blencowe H, Blore JD, Blyth F, Bolliger I, Bonaventure A, Boufous S, Bourne R, Boussinesq M, Braithwaite T, Brayne C, Bridgett L, Brooker S, Brooks P, Brugha TS, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Buckle G, Budke CM, Burch M, Burney P, Burstein R, Calabria B, Campbell B, Canter CE, Carabin H, Carapetis J, Carmona L, Cella C, Charlson F, Chen H, Cheng AT, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahiya M, Dahodwala N, Damsere-Derry J, Danaei G, Davis A, De Leo D, Degenhardt L, Dellavalle R, Delossantos A, Denenberg J, Derrett S, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dherani M, Diaz-Torne C, Dolk H, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Edmond K, Elbaz A, Ali SE, Erskine H, Erwin PJ, Espindola P, Ewoigbokhan SE, Farzadfar F, Feigin V,

- Felson DT, Ferrari A, Ferri CP, Fevre EM, Finucane MM, Flaxman S, Flood L, Foreman K, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabbe BJ, Gabriel SE, Gakidou E, Ganatra HA, Garcia B, Gaspari F, Gillum RF, Gmel G, Gosselin R, Grainger R, Groeger J, Guillemin F, Gunnell D, Gupta R, Haagsma J, Hagan H, Halasa YA, Hall W, Haring D, Haro JM, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Higashi H, Hill C, Hoen B, Hoffman H, Hotez PJ, Hoy D, Huang JJ, Ibeanusi SE, Jacobsen KH, James SL, Jarvis D, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Jonas JB, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kawakami N, Keren A, Khoo JP, King CH, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Laloo R, Laslett LL, Lathlean T, Leasher JL, Lee YY, Leigh J, Lim SS, Limb E, Lin JK, Lipnick M, Lipshultz SE, Liu W, Loane M, Ohno SL, Lyons R, Ma J, Mabweijano J, MacIntyre MF, Malekzadeh R, Mallinger L, Manivannan S, Marcenes W, March L, Margolis DJ, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGill N, McGrath J, Medina-Mora ME, Meltzer M, Mensah GA, Merriman TR, Meyer AC, Miglioli V, Miller M, Miller TR, Mitchell PB, Mocumbi AO, Moffitt TE, Mokdad AA, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moran A, Morawska L, Mori R, Murdoch ME, Mwaniki MK, Naidoo K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nelson PK, Nelson RG, Nevitt MC, Newton CR, Nolte S, Norman P, Norman R, O'Donnell M, O'Hanlon S, Olives C, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Page A, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Patten SB, Pearce N, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Pesudovs K, Phillips D, Phillips MR, Pierce K, Pion S, Polanczyk GV, Polinder S, Pope CA, 3rd, Popova S, Porrini E, Pourmalek F, Prince M, Pullan RL, Ramaiah KD, Ranganathan D, Razavi H, Regan M, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Richardson K, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, De Leon FR, Ronfani L, Room R, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Saha S, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Schwebel DC, Scott JG, Segui-Gomez M, Shahraz S, Shepard DS, Shin H, Shivakoti R, Singh D, Singh GM, Singh JA, Singleton J, Sleet DA, Sliwa K, Smith E, Smith JL, Stapelberg NJ, Steer A, Steiner T, Stolk WA, Stovner LJ, Sudfeld C, Syed S, Tamburlini G, Tavakkoli M, Taylor HR, Taylor JA, Taylor WJ, Thomas B, Thomson WM, Thurston GD, Tleyjeh IM, Tonelli M, Towbin JA, Truelsen T, Tsilimbaris MK, Ubeda C, Undurraga EA, van der Werf MJ, van Os J, Vavilala MS, Venketasubramanian N, Wang M, Wang W, Watt K, Weatherall DJ, Weinstock MA, Weintraub R, Weisskopf MG, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams SR, Witt E, Wolfe F, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Zaidi AK, Zheng ZJ, Zonies D, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA (2012) Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2163-2196
329. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M (2002) Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10:199-206
330. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H (2007) Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med* 1:74-79
331. Wang D, Tai PWL, Gao G (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov* 18:358-378
332. Wang Y, Zhu W, Levy DE (2006) Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. *Methods* 39:356-362
333. Watanabe H, de Caestecker MP, Yamada Y (2001) Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways

- regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J Biol Chem* 276:14466-14473
334. Weimer A, Madry H, Venkatesan JK, Schmitt G, Frisch J, Wezel A, Jung J, Kohn D, Terwilliger EF, Trippel SB, Cucchiari M (2012) Benefits of recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated insulinlike growth factor I (IGF-I) overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF-I axis. *Mol Med* 18:346-358
335. Weissenberger M, Weissenberger MH, Gilbert F, Groll J, Evans CH, Steinert AF (2020) Reduced hypertrophy in vitro after chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells following adenoviral SOX9 gene delivery. *BMC Musculoskelet Disord* 21:109
336. Weitzman MD, Kyostio SR, Kotin RM, Owens RA (1994) Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5808-5812
337. Weitzman MD, Linden RM (2011) Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol* 807:1-23
338. Whittaker JL, Roos EM (2020) Infographic. Risk profile for sport-related post-traumatic knee osteoarthritis. *Br J Sports Med* 54:362-363
339. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T (2007) Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee* 14:177-182
340. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482:331-338
341. Wilson JM, Flotte TR (2020) Moving Forward After Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy. *Hum Gene Ther* 31:695-696
342. 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
343. Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72:2224-2232
344. Yaeger PC, Masi TL, de Ortiz JL, Binette F, Tubo R, McPherson JM (1997) Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 237:318-325
345. Yamashita A, Liu S, Woltjen K, Thomas B, Meng G, Hotta A, Takahashi K, Ellis J, Yamanaka S, Rancourt DE (2013) Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 3:1978
346. Yamashita A, Tamamura Y, Morioka M, Karagiannis P, Shima N, Tsumaki N (2018) Considerations in hiPSC-derived cartilage for articular cartilage repair. *Inflamm Regen* 38:17
347. Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX (2001) TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol* 153:35-46
348. Yla-Herttuala S (2012) Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther* 20:1831-1832
349. Yokoo N, Saito T, Uesugi M, Kobayashi N, Xin KQ, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Koshino T (2005) Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of

-
- basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum* 52:164-170
350. Yue Y, Dongsheng D (2002) Development of multiple cloning site cis-vectors for recombinant adeno-associated virus production. *Biotechniques* 33:672, 674, 676-678
351. Zhang R, Ma J, Han J, Zhang W, Ma J (2019) Mesenchymal stem cell related therapies for cartilage lesions and osteoarthritis. *Am J Transl Res* 11:6275-6289
352. Zhong L, Huang X, Karperien M, Post JN (2015) The Regulatory Role of Signaling Crosstalk in Hypertrophy of MSCs and Human Articular Chondrocytes. *Int J Mol Sci* 16:19225-19247
353. Zhu Y, Tao H, Jin C, Liu Y, Lu X, Hu X, Wang X (2015) Transforming growth factor-beta1 induces type II collagen and aggrecan expression via activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad2/3 signaling pathways. *Mol Med Rep* 12:5573-5579

10 Publikationen und Abstracts

Publikationen:

1. **Morscheid S**, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M, Venkatesan JK (2019) **Therapeutic Effects of rAAV-Mediated Concomittant Gene Transfer and Overexpression of TGF-beta and IGF-I on the Chondrogenesis of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.** Int J Mol Sci 20:2591.

(Impact Factor 2019: 4.556)

2. **Morscheid S**, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Cucchiari M (2019) **Remodeling of Human Osteochondral Defects via rAAV-Mediated Co-Overexpression of TGF- β and IGF-I from Implanted Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells.** J Clin Med 8:1326.

(Impact Factor 2019: 5.688)

Abstracts:

1. **Morscheid S**, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M, Venkatesan JK. Efficacy of **rAAV-mediated gene transfer and co-overexpression of TGF- β and IGF-I on the chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*.** Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting 2019, Austin, Texas, USA (Poster).

2. **Morscheid S**, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M. **Co-overexpression of TGF- β and IGF-I via rAAV vectors activates the chondrogenic activities in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells upon implantation in a human osteochondral defect model.** Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting 2019, Austin, Texas, USA (ePoster-Vortrag).

3. **Morscheid S**, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M. **Chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells upon rAAV mediated co-overexpression of TGF- β and IGF-I.** Osteoarthritis Research Society International (OARSI) 2019 World Congress, Toronto, Canada (Poster)

4. **Morscheid S**, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiarini M, Venkatesan JK. **rAAV mediated combined gene transfer and overexpression of TGF- β and IGF-I in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells upon implantation in a human osteochondral defect model.** Osteoarthritis Research Society International (OARSI) 2019 World Congress, Toronto, Canada (Poster)

11 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für experimentelle Orthopädie und Arthroreforschung der Universität des Saarlandes erstellt.

Mein besonderer Dank gilt **Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Madry (geb. Cucchiarini)** für die Bereitstellung dieses interessanten Promotionsthemas sowie für ihre intensive Betreuung und uneingeschränkte, geduldige Bereitschaft zur Unterstützung jeder Phase der Promotion. Ihre konstruktiven Anregungen und die regelmäßigen fachlichen Diskussionen waren für mich ausgesprochen hilfreich und inspirierend. Dankbar anerkennen möchte ich insbesondere auch die motivierenden Gespräche auf persönlicher Ebene, die mich jederzeit positiv beeinflusst haben und für mich von unschätzbbarer Bedeutung waren.

Herrn Prof. Dr. med. H. Madry gilt mein aufrichtiger Dank für seine freundliche Mitbetreuung dieser Arbeit. Seine kritischen, wertvollen und fachlichen Anmerkungen sowie sein Engagement, mir stets in wissenschaftlichen und persönlichen Belangen als Ansprechpartner zur Verfügung zu stehen, waren für mich von außerordentlicher Bedeutung.

Dr. rer. nat. Ana Rey-Rico und **Dr. rer. nat. Jagadeesh K. Venkatesan** danke ich für die ausgezeichnete und erfahrene Unterstützung während der Durchführung der Experimente sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die freundliche Aufnahme in das Laborteam.

Frau Gertrud Schmitt danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Arbeiten im Labor sowie für die anregenden und freundschaftlichen Gespräche.

Allen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Orthopädie und Arthroreforschung danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für eine wunderbare, unvergessliche Zeit in einer ausgesprochen angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Ein ausgesprochener Dank gilt der **Graduiertenförderung der Universität des Saarlandes** (GradUS) und dem **Deutschen Akademischen Austauschdienst** (DAAD) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Präsentation der Ergebnisse dieser Arbeit auf dem *Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2019* in Austin, Texas.

Ein besonderer Dank gilt von ganzem Herzen **meiner Familie**, die mir stets mit uneingeschränkter und liebevoller Unterstützung zur Seite stand.

12 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.