

Aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung
Zentrum für Experimentelle Orthopädie, Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. Henning Madry

Chondrozyten in Umgebungen mit hoher Dichte

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von: **Oliver Daniels, geb. Müller**

geboren am: 20.08.1990 in Wadern

Tag der Promotion: 28.11.2022

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

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Magali Madry. geb. Cucchiarini

Prof. Dr. med. Thomas Tschernig

*Meinen Eltern und meiner
Ehefrau Nina.*

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einführung	5
2.1 Thematik.....	5
2.2 Der Knorpel des Kniegelenks.....	6
2.3 Grundlagen der Arthrose.....	8
2.4 Grundlagen fokaler Knorpeldefekte.....	9
2.5 Therapie der Gonarthrose.....	11
2.5.1 Konservative und medikamentöse Therapie.....	11
2.5.2 Operative Therapie.....	11
2.6 Grundlagen der Gentherapie.....	13
2.7 Gentransfersysteme.....	13
2.7.1 Transfektion/Transduktion.....	14
2.7.2 Genom-Editierung.....	16
2.8 In vivo- und in vitro-Gentransfer.....	16
2.9 Grundlagen des <i>Tissue Engineering</i>	17
2.10 Das Kniegelenk als primärer Angriffspunkt der Gentherapie.....	19
3. Hypothesen	21
4. Studienaufbau	22
4.1 Pelletstudien.....	22
4.2 Knorpelgewebe-Analogen-Studie.....	24
5. Materialien	27
5.1 Chemikalien.....	27
5.2 Antikörper und Enzyme.....	28
5.3 Vektoren.....	29
5.4 Primer für die Echtzeit-RT-PCR.....	29
5.5 Vorgefertigte Reagenzien zur biochemischen Auswertung.....	30
5.6 Lösungen und Medien.....	30
5.7 Verbrauchsmaterial.....	33
5.8 Instrumente.....	33
5.9 Software.....	33
5.10 Großgeräte und elektronische Gerätschaften.....	34
6. Methoden	36

6.1	Zellkultur	36
6.1.1	Gewinn und Charakterisierung primärer humaner adulter Chondrozyten	36
6.1.2	Isolation primärer humaner adulter Chondrozyten.....	36
6.1.3	Kultivierung humaner adulter Chondrozyten.....	37
6.1.4	Pellet-Herstellung und Transduktion.....	37
6.1.5	Knorpelgewebe-Analagon-Herstellung und Transduktion.....	37
6.2	Herstellung von rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren	38
6.2.1	<i>Packaging</i> und Amplifikation	38
6.2.2	Multiplizität der Infektion im Pellet	39
6.2.3	Multiplizität der Infektion im Knorpelgewebe-Analog	39
6.3	Nachweis der Tansgenexpression	40
6.3.1	Optische Nachweisverfahren.....	40
6.3.2	Zellviabilität – WST-1-Test	41
6.3.3	Biochemische Nachweisverfahren	41
6.3.4	Papain-Verdau	42
6.3.5	BCA-Test	42
6.3.6	Hoechst 33258 Test	42
6.3.7	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	43
6.3.8	Echtzeit-RT-PCR.....	44
6.4	Histologische Nachweisverfahren	45
6.4.1	Fixierung und Entwässern.....	45
6.4.2	Einbetten und Schneiden	45
6.4.3	Safranin-O/Echtgrün-Färbung	46
6.4.4	Toluidinblau-Färbung	46
6.4.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	47
6.4.6	Immunhistochemische Verfahren	47
6.5	Kriterien zur histologischen Evaluation.....	49
6.5.1	Evaluation der immunhistochemischen Verfahren.....	49
6.5.2	Bestimmung der Zellzahl.....	49
6.5.3	Evaluation der Färbequalität	49
6.5.4	Statistische Analyse	50
7.	Ergebnisse	51
7.1	Pelletkulturen – Studienarm A.....	51
7.1.1	Direkte β -Galactosidase-Nachweise.....	52
7.1.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	55

7.1.3	Zellviabilität – WST-1-Test	56
7.2	Pelletkulturen – Studienarm B.....	58
7.2.1	Safranin-O/Echtgrün-Färbung	58
7.2.2	Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie	60
7.2.3	SOX9-Immunhistochemie	61
7.2.4	Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie	62
7.2.5	HE-Färbung – Evaluation der Zellzahl.....	63
7.2.6	BCA-Test	64
7.2.7	ELISA.....	65
7.2.8	Echtzeit-RT-PCR.....	66
7.3	Knorpelgewebe-Analogon („ <i>Cartilage tissue analog</i> “)	68
7.3.1	Makroskopische Beurteilung des Knorpelgewebe-Analogon	68
7.3.2	X-Gal-Färbung	69
7.3.3	Fluoreszenzmikroskopie – RFP.....	72
8.	Diskussion	73
8.1	Pelletkulturen	73
8.1.1	Vektordosis und Transgenexpression im zeitlichen Verlauf.....	73
8.1.2	Zellviabilität und Vektordosis.....	74
8.1.3	Vergleich von therapeutischem Vektor und Kontrollgruppen	74
8.1.4	Marker der Chondrogenese	75
8.1.5	Marker der Hypertrophie	75
8.1.6	Schlussfolgerung.....	75
8.2	Knorpelgewebe-Analogon („ <i>Cartilage tissue analog</i> “)	76
8.2.1	Transgenexpression und zeitlicher Verlauf.....	76
8.2.2	Gewinnung von Probenmaterial	77
8.2.3	Handhabung in der Zellkultur	77
8.2.4	Schlussfolgerung.....	78
8.3	Klinische Perspektive und Ausblick in die Zukunft.....	79
9.	Literaturverzeichnis.....	82
10.	Publikationen.....	94
10.1	Veröffentlichungen	94
10.2	Poster	94
11.	Danksagungen.....	96
12.	Lebenslauf	97

Abbildungen

Abbildung 1: Zoneneinteilung des hyalinen Kniegelenkknorpels.....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der osteochondralen Einheit	10
Abbildung 3: Übersicht der Gentransfersysteme.....	14
Abbildung 4: Vergleich Gentransfer In vivo/In vitro	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Gewebszüchtung	19
Abbildung 6: Aufnahme eines Pellets	22
Abbildung 7: Studiendesign der Pelletstudie.....	23
Abbildung 8: Aufnahme eines Knorpelgewebe-Analogons	24
Abbildung 9: Studiendesign der Knorpelgewebe-Analogen-Studie	25
Abbildung 10: Größenvergleich Pellet gegen ein Knorpelgewebe-Analogen	26
Abbildung 11: X-Gal-Färbung kompletter Pellets	52
Abbildung 12: β -Galaktosidase-Expression	54
Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopie	55
Abbildung 14: Zellviabilität.....	57
Abbildung 15: Safranin-O/Echtgrün-Färbung.....	59
Abbildung 16: Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie.....	60
Abbildung 17: SOX9-Immunhistochemie	61
Abbildung 18: Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie	63
Abbildung 19: HE-Färbung	64
Abbildung 20: Echtzeit-RT-PCR	67
Abbildung 21: Knorpelgewebe-Analogen makroskopisch	68
Abbildung 22: Knorpelgewebe-Analogen im Medium	69
Abbildung 23: Knorpelgewebe-Analoga nach X-Gal-Färbung an Tag 8.....	70
Abbildung 24: Knorpelgewebe-Analoga nach X-Gal-Färbung an Tag 30.....	70
Abbildung 25: Knorpelgewebe-Analoga nach X-Gal-Färbung an Tag 84.....	71
Abbildung 26: Lichtmikroskopische Ansicht einer X-Gal-Färbung.....	71
Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopie der Knorpelgewebe-Analoga.....	72

Tabellen

Tabelle 1: Chemikalien	27
Tabelle 2: Antikörper und Enzyme.....	28
Tabelle 3: Vektoren	29
Tabelle 4: Primer für die Echtzeit-RT-PCR	29
Tabelle 5: Reagenzien zur biochemischen Auswertung.....	30
Tabelle 6: Lösungen und Medien	30
Tabelle 7: Verbrauchsmaterial.....	33
Tabelle 8: Großgeräte und elektronische Gerätschaften.....	34
Tabelle 9: Modifiziertes Bern-Bewertungssystem	50
Tabelle 10: Beta-Glo [®] -Test.....	53
Tabelle 11: WST-1-Test	56
Tabelle 12: Safranin-O/Echtgrün-Färbung.....	59
Tabelle 13: Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie.....	60
Tabelle 14: SOX9-Immunhistochemie	61
Tabelle 15: Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie	62
Tabelle 16: HE-Färbung	63
Tabelle 17: BCA-Test	64
Tabelle 18: ELISA	65
Tabelle 19: Echtzeit-RT-PCR	66

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
aqua bidest.	<i>aqua bidestillata</i> = destilliertes Wasser
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> = Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	Stoffmengenkonzentration
cDNS	komplementäre DNS
CMV-IE	<i>cytomegalovirus immediate-early promoter</i> = Cytomegalovirus-Sofort-Früh-Promoter
COL10A1	Typ-X-Kollagen α 1-Gen
COL2A1	Typ-II-Kollagen α 1-Gen
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> = gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen
CRISPR/Cas	<i>CRISPR-associated protein</i> = CRISPR-assoziiertes Protein
CTA	„ <i>Cartilage tissue analog</i> “ = Knorpelgewebe-Analogon
Ct-Wert	<i>Cycle Threshold</i> -Wert
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (standardisiertes Nährmedium)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
engl.	Englisch
EtOH	Ethanol
GAG	Glucosaminoglykan
H ₂ O	Wasser (Leitungswasser)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i> = menschliche embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

hNACs	<i>human normal cartilage/chondrocytes</i> = humane adulte normale Chondrozyten/ „Normale Chondrozyten“
hOACs	<i>human osteoarthritic cartilage/chondrocytes</i> = humane adulte arthrotische Chondrozyten/ „Arthrotische Chondrozyten“
Hoechst 33258	2-[2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl]-6-(1-methyl-4-piperazyl)benzimidazole-trihydrochloride
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
kBp	Kilo-Basenpaar
kg, g, mg, µg, ng	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
Kit	<i>kit</i> = Set, bestehend aus mehreren biochemischen Reagenzien
l, dl, cl, ml, µl, nl	Liter, Deziliter, Zentiliter, Milliliter, Mikroliter, Nanoliter
<i>lacZ</i>	β-Galactosidase-Gen
m, dm, cm, mm, µm, nm	Meter, Dezimeter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM	Molar, Millimolar
MEM	Modified Eagle's Medium (standardisiertes Nährmedium)
mind.	mindestens
Mio.	Million
MOI	<i>multiplicity of infection</i> = Multiplizität der Infektion
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure = Boten-Ribonukleinsäure
NSAR	nicht steroidale Antirheumatika
o. g.	oben genannt(e/r)
OD	<i>optical density</i> = optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
Penicillin/ Streptomycin	Lösung aus Penicillin und Streptomycin
rAAV	Rekombinante adeno-assoziierte Viren
RFP	<i>red fluorescent protein</i> = Rot-fluoreszierendes Protein

<i>RFP</i>	<i>red fluorescent protein gene</i> = Rot-fluoreszierendes Protein Gen
RLU	<i>relative light unit</i> = relative Lichteinheit
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	<i>standard deviation</i> = Standardabweichung
SOX9	sox9-Protein
sox9	sox9-Gen
Tab.	Tabelle
TALENs	<i>transcription activator-like effector nucleases</i> = transkriptionsaktivatorartige Effektornuklease
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> = Transformierender Wachstumsfaktor beta
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vgl.	vergleiche
<i>Well</i>	aus dem Englischen: <i>well</i> = Mulde
WST-1	<i>water soluble tetrazolium</i> = wasserlösliches Tetrazolium, (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZFNs	<i>Zinc finger nucleases</i> = Zinkfingernukleasen
β -Gal	β -Galactosidase-Protein

1. Zusammenfassung

Fragestellung: Rekombinante adeno-assoziierte virale (rAAV) Vektoren können therapeutische Genprodukte bereitstellen und sind daher eine experimentelle Therapieoption der frühen Gonarthrose. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mittels eines rAAV-Vektors, der für den chondrogenen Transkriptionsfaktor SOX9 (rAAV-FLAG-hsox9) kodiert, strukturelle Merkmale des hyalinen Gelenkknorpels selektiv zu verstärken. Dreidimensionale (3D) gerüstfreie Zellkonglomerate aus primären humanen adulten normalen oder arthrotischen Chondrozyten dienten als klinisch-relevantes Modellsystem. Der erste Studienarm befasst sich am Beispiel beider Zelltypen im Pelletmodell mit der Untersuchung des Gentransfers eines therapeutischen Vektors, rAAV-FLAG-hsox9, im Vergleich zur Transduktion der Markervektoren rAAV-*lacZ* und rAAV-*RFP*. Der zweite Studienarm erforscht als Machbarkeitsstudie die Möglichkeit der Vektortransduktion in einem neuartigen knorpelähnlichen Modellsystem („*cartilage tissue analog*“ = CTA), im Folgenden als Knorpelgewebe-Analogon bezeichnet, dessen Synthese zuvor lediglich mit fetalen bovinen Chondrozyten realisiert wurde.

Methoden: In der Pelletstudie wurden Aggregate auf der Basis von humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten mittels rAAV mit therapeutischen Genen und Markergenen transduziert und bis zu 21 Tagen untersucht. Die Knorpelgewebe-Analogon-Studie überprüfte einerseits die Durchführbarkeit der Gewebeszüchtung aus primären humanen Chondrozyten, andererseits den rAAV-vermittelten Gentransfer in diese knorpelähnlichen Strukturen mit anschließenden Beobachtungszeiträumen von bis zu 84 Tagen.

Ergebnisse: Pellets aus humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten waren mittels rAAV-Vektor vergleichbar transduzierbar, ohne negative Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen. In beiden Zellarten kam es zu einer signifikanten Steigerung der Typ-II-Kollagen-Expression um das bis zu 2,7-fache nach Transduktion mit rAAV-FLAG-hsox9 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem verminderte sich die Typ-X-Kollagen-Expression auf bis zu 1/3 des Vergleichswertes. Die Daten der Knorpelgewebe-Analogon-Studie belegen eine erfolgreiche Herstellung eines humanen Knorpelanalogs. Des Weiteren ist in diesen Knorpelanalogs eine erfolgreiche Transgenexpression über einen Zeitraum von bis zu 84 Tagen nachweisbar.

Schlussfolgerungen: Die Transduktion von humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten mit rAAV-sox9 führt zu einer signifikanten Expression von Markern der Chondrogenese bei gleichzeitiger Reduktion von Hypertrophie markern. Somit stellt sox9 ein potentielles Kandidatengenzur Gentherapie der Arthrose dar. Die Ergebnisse zeigen zudem den positiven, langfristigen Einfluss auf gesundes Gewebe, was bei der möglichen klinischen Anwendung bei der Therapie fokaler Knorpeldefekte oder unikompartimentaler Arthrose von Bedeutung sein könnte. Die Technik der Knorpelgewebe-Analogon-Synthese bietet ein neues in-vitro-Forschungsobjekt, das Charakteristika des in-vivo-vorliegenden Knorpelgewebes imitiert. Zudem sind diese Analoga als potenzieller Gewebeersatz bei der Therapie fokaler Defekte verwendbar. Weitere Studien werden die mögliche Kombination mit therapeutischen Vektoren in diesen 3D-Systemen von Chondrozyten in Umgebungen mit hoher Dichte untersuchen.

Abstract

Introduction: Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors offer a possible approach for early osteoarthritis (OA) therapy of the knee. The goal of this thesis is to test the ability of a therapeutic rAAV vector coding for the highly chondrogenic SOX9 transcription factor (rAAV-FLAG-hsox9) to enhance the cartilage-specific activities in human osteoarthritic articular chondrocytes (hOACs) relative to human normal articular chondrocytes (hNACs) in conditions that mimic their three-dimensional (3D) environment as a future scaffold-free, cell therapy for OA. The first part of the thesis aimed at investigating how gene transfer with rAAV affect both cell types in a high-density pellet culture model using rAAV-FLAG-hsox9 *versus* control (marker) rAAV-*lacZ* and rAAV-*RFP* gene vectors. The second part of the study examined the feasibility of translating the gene transfer approach in another 3D model based on an *in vivo*-like cartilage tissue analog (CTA) employed thus far to mimic hyaline cartilage based on the use of bovine articular cartilage.

Methods: In the pellet study, human normal articular chondrocytes and human osteoarthritic articular chondrocytes pellets were transduced by direct administration of the therapeutic and marker gene vectors and evaluation (transgene expression, cellular activities) were monitored for up to 21 days. In the cartilage tissue analog study, rAAV-mediated gene transfer was tested as a proof-of-concept using human cells in a relevant cartilage-like structure for up to 84 days.

Results: Pellets prepared using human normal articular chondrocytes and human osteoarthritic articular chondrocytes were equally transduced with rAAV vectors, without deleterious effects on cell viability. Both types of pellets showed a significant increase in type-II collagen expression following transduction with rAAV-FLAG-hsox9 (up to 2.7-fold difference compared with the control rAAV marker treatment) and a concomitant reduction of type-X collagen expression (up to a third of the value of the control marker treatment). In the cartilage tissue analog study, successful production of a human articular cartilage 3D analog was achieved and long-term rAAV-mediated gene transfer could be reported over a period of 84 days.

Conclusions: Transduction of 3D pellets derived from human normal articular chondrocytes and human osteoarthritic articular chondrocytes using rAAV-FLAG-hsox9 advantageously increases the expression of chondrogenic markers and decrease the expression of markers of hypertrophy. These results support the concept that *sox9* gene transfer via rAAV is a promising option for human gene and cell therapy of osteoarthritis. Of note, healthy tissue was also amenable to therapy, which may be of clinical interest when treating focal defects or unilateral damage. The feasibility of creating cartilage tissue analogs offers a new study model *in vitro* to mimic the target repair tissue for therapy and may be also used as therapeutic platforms for implantation like to treat focal cartilage defects. The potential benefits of this other 3D model using therapeutic rAAV vectors is under examination.

2. Einführung

2.1 Thematik

Die Arthrose ist die am häufigsten auftretende chronische Gelenkerkrankung. Sozioökonomische Faktoren, wie das zunehmende Durchschnittsalter der Bevölkerung und eine Steigerung des durchschnittlichen Körpergewichts, führten in den vergangenen Jahrzehnten zu einer sukzessiven Erhöhung der Inzidenz [1, 2]. Bis zur Etablierung des operativen endoprothetischen Oberflächenersatzes des Kniegelenks in Form einer Total- oder Teil-Endoprothese im letzten Drittel des 20. Jahrhunderts [3, 4] und der damit verbundenen „Heilung“ des Endstadiums der Arthrose, litten Patienten unter stärksten Schmerzen mit konsekutiver Bewegungseinschränkung bis zur Immobilisation. Mit der Entwicklung arthroskopischer Verfahren bestand die Möglichkeit, Arthrose-fördernde Gelenkerkrankungen und Verletzungen des Knorpelgewebes immer frühzeitiger zu diagnostizieren und zu therapieren [5]. Doch auch trotz zunehmend innovativeren Therapiemaßnahmen steht das Gebiet der Orthopädie und Unfallchirurgie auch zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit vor folgendem Dilemma: Schäden des hyalinen Gelenkknorpels regenerieren sich nicht. Es bildet sich in den Defekten allenfalls ein Reparaturgewebe, das jedoch eine geringere Belastbarkeit als das Ursprungsgewebe aufweist. In der Folge führt dies zu einem vermehrten Druck auf das umliegende Gewebe und so zu einem Progress der arthrotischen Veränderungen [6].

Die möglichen Ansatzpunkte für die Lösung des vorliegenden Problems, die Implantation eines Gelenkersatz so weit wie möglich hinauszuzögern bzw. schlussendlich Arthrose zu heilen, sind zahlreich. Mithilfe von Gewebszüchtung (engl. *Tissue Engineering*) besteht die Möglichkeit, Stammzellen oder Zellen des Gelenkknorpels als Allo- oder Autograft in die Defekte einzubringen und so die Bildung eines Reparaturgewebes zu erzielen. Als Trägermaterial werden diverse Verbindungen erforscht. Strukturgebende Komponenten können an den etwaigen Schaden angepasst werden. Einen weiteren Therapieansatz bietet die Gentherapie. Stammzellen, isolierte Chondrozyten oder im Gelenk befindliche Zellen können mithilfe diverser Verfahren genetisch verändert werden, um die Expression bestimmter Proteine zu beeinflussen. Ein „Umprogrammieren“ arthrotischer Zellen zurück zu „gesunden“ Zellen oder aber auch die Überexpression protektiver Faktoren ist denkbar.

Geeignete Verfahren sind die virale und nicht-virale Transfektion oder die Gen-Editierung [7, 8]. Letztlich bietet sich auch die Option, das *Tissue Engineering* mit der Gentherapie zu verbinden. So können einerseits Stammzellen oder Chondrozyten durch genetische Veränderungen gewünschte Moleküle vermehrt exprimieren, andererseits kann durch ein entsprechendes Trägermedium oder eine passende Form der Zellaggregation ein Defektschluss bewirkt werden [9].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei möglichen Formen von Zellaggregaten, die frei einer formgebenden Komponente, einen festen Verbund bilden. Wir beschäftigten uns mit der Wirkung von Transgentherapie auf diese Gerüst-freien Zellverbände, unter anderem unter folgenden Gesichtspunkten: Transgen-Vektordosis-Beziehung, Langzeitexpression therapeutischer Vektoren, Auswirkungen der Transgentherapie auf unterschiedliche Kollagen-Typen, Realisierbarkeit der Kultivierung humaner „*Cartilage tissue analogs*“, Knorpelgewebe-Analoga, unter Transgentherapie.

2.2 Der Knorpel des Kniegelenks

Der Gelenkknorpel, der die Femurkondylen, das Tibiaplateau und Teile der Patellarrückfläche überzieht, wird als hyaliner Knorpel bezeichnet [10]. In gesundem Knorpelgewebe finden sich vorwiegend Typ-II-, aber auch -IX-, -XI-, -VI-, -XIV-Kollagen, wobei sich Typ-II-Kollagen als zuverlässigster Marker für ein gesundes Gewebe erwiesen hat [11]. Diese Art Kollagen bildet mit einem Anteil von 90-95 % den Hauptanteil der Kollagene des Knorpels und ist für dessen Elastizität verantwortlich [12]. Typ-I- und -X-Kollagen hingegen weisen auf Knorpelkalzifizierung und beginnende Ossifikation hin [13-15]. Wesentliche Makromoleküle des hyalinen Knorpels sind die Proteoglykane. Diese bilden zusammen mit den Kollagenen vornehmlich die extrazelluläre Matrix. Darüber hinaus beteiligen sich noch diverse Proteine, die unter dem Begriff der „*cartilage oligomeric matrix protein*“ (*COMP*) zusammengefasst werden. Durch die wasserbindende Eigenschaft der Moleküle der extrazellulären Matrix besteht der hyaline Knorpel je nach Zone zu 65-80 % aus Wasser, wodurch die mechanischen Eigenschaften des Gewebes definiert werden [16, 17]. Knorpelgewebe ist bradytrophes Gewebe, was bedeutet, dass neben dem langsamen Stoffwechsel ein Stofftransport lediglich über die das Gewebe umgebende Flüssigkeit mittels Diffusion erfolgt. Ein Austausch von Wasser über die Zonen ist für den Transport von Nährstoffen neben den dämpfenden und schmierenden Eigenschaften unerlässlich [17, 18].

Der hyaline Knorpel lässt sich in vier, in ihrer Morphologie und funktionsweise unterschiedliche Zonen einteilen [17, 19]:

Oberflächliche Zone: Diese Zone dient insbesondere dem Abpuffern von Druck-, Zug- und Scherkräften. Der Wasseranteil ist in dieser Schicht mit ca. 80 % am höchsten.

Mittlere Zone: Hier findet sich eine geringe Anzahl differenzierter Chondrozyten. Der Anteil an Proteoglykanen und dickeren Kollagenfasern steigt, was die Toleranz gegenüber Druckbelastung erhöht.

Radiale Zone: Der höchste Proteoglykananteil sowie die stärksten Kollagenfibrillen existieren in der radialen Zone. Die Ausrichtung der Kollagene ist vornehmlich senkrecht, sodass hier der stärkste Puffer hinsichtlich axialer Belastung besteht. Diese radiale Zone schließt mit der sog. *Tidemark* ab, die den Übergang zur kalzifizierten Zone bildet.

Kalzifizierte Zone: In dieser Zone sind Chondrozyten des prähypertrophen und hypertrophen Typs vorhanden. Diese liegen dicht gelagert in einer kalzifizierten Extrazellulärmatrix. Diese Schicht dient, durch die sie durchziehenden Kollagenfibrillen, die von der *Tidemark* der radialen Zone hereinreichen, als Verbindung zwischen den Knorpelzonen und dem subchondralen Knochen.

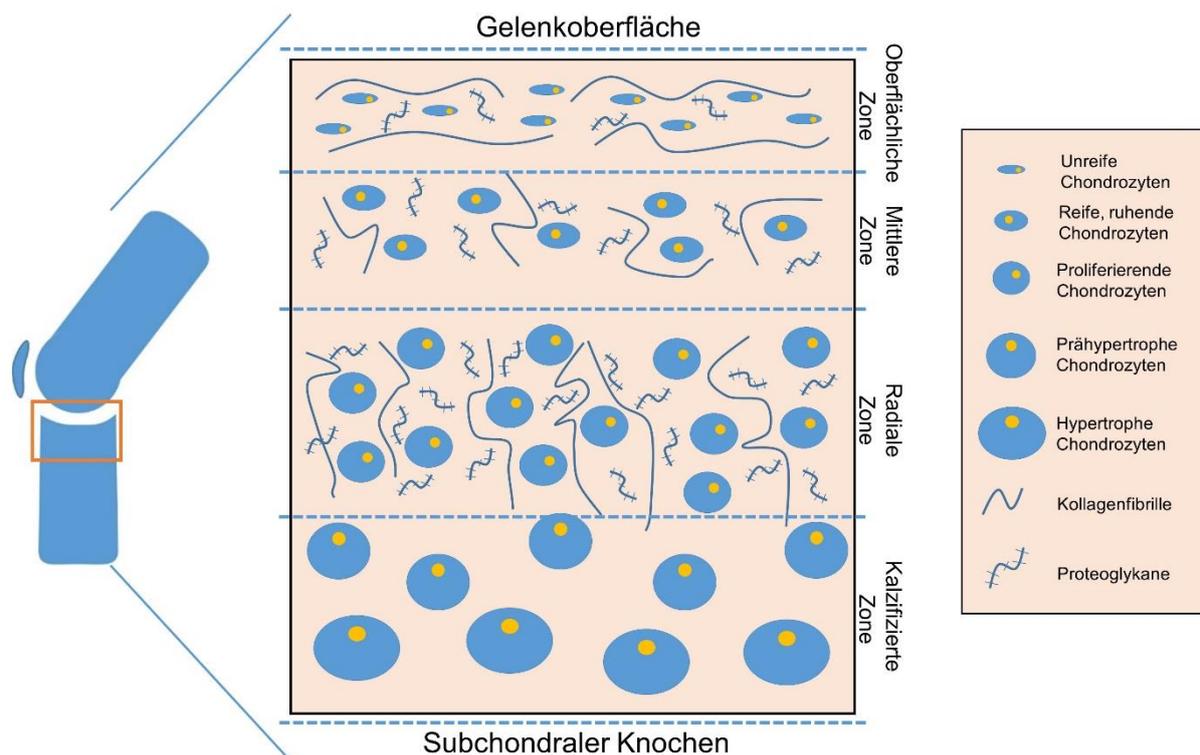


Abbildung 1: Zoneneinteilung des hyalinen Kniegelenkknorpels. Abbildung modifiziert nach [20]. Gezeigt ist der schematische Aufbau des hyalinen Knorpels mit seinen 4 Zonen, welche sich in ihrer Morphologie und funktionsweise unterscheiden.

2.3 Grundlagen der Arthrose

Die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC), zum Zeitpunkt des Verfassens der vorliegenden Arbeit nach inhaltlicher Prüfung gültig bis 29.11.2022, bezeichnet Arthrose im Allgemeinen als „[...] eine multifaktoriell bedingte, degenerative Erkrankung von Gelenken, die zu einem fortschreitenden Umbau der Gelenkstrukturen führt und mit schmerzhaften Funktionseinschränkungen bis hin zum weitgehenden Funktionsverlust betroffener Gelenke verbunden ist.“

Morphologisch zeigt sich eine Knorpelerweichung im Anfangsstadium, was sich bis zu einem Einriss des Knorpels auf den Knochen entwickeln kann. Die Endstrecke stellt der Verlust der gesamten Knorpelschicht dar. Die phänotypischen Veränderungen spiegeln mitunter eine veränderte Genexpression wider. So kommt es unter anderem zu einer Verminderung der Typ-II-Kollagen-Synthese [21]. Kommt es zu Knorpelabrieb (Detritus), stimuliert dieser Fibroblasten

und Makrophagen der Synovialis, die mit der Produktion von Zytokinen reagieren. Hierdurch kommt es zu einer weiteren Degeneration des Knorpels – es entsteht ein quasi Circulus vitiosus der Arthrose [22].

Gemäß einer Datenerhebung des Robert Koch-Instituts (RKI) von Patienten zwischen 18 und 79 Jahren liegt in der Altersgruppe der über 60-Jährigen die Arthrose-Prävalenz bei 20,2 % [23]. Ausgehend von Versicherungsdaten aus dem Jahr 2014 wird für das Jahr 2060 ein Anteil der Personen in Deutschland über 65 Jahre von einem Drittel prognostiziert [24]. Dies unterstreicht die zunehmende sozioökonomische Relevanz sowohl für die Prävention als auch die Rehabilitation der Erkrankung.

2.4 Grundlagen fokaler Knorpeldefekte

Neben dem altersbedingten Verschleiß kann es beispielsweise durch traumatische Ursachen zu einem Knorpelschaden kommen. In der Regel handelt es sich dabei um eine lokal begrenzte Schädigung, sodass von fokalen Knorpeldefekten die Rede ist. Diese lassen sich wie folgt klassifizieren (vgl. Abb. 2):

Chondrale Defekte: Es kommt zu einem teilschichtigen Defekt, bei dem sich lediglich eine oberflächliche Knorpelschicht des Gelenkanteils ablöst, oder es zu einem vollschichtigen Defekt kommt, bei dem das Ablösen des darunterliegenden, kalzifizierten Knorpels resultiert.

Osteochondrale Defekte: Dieser Defekt umfasst sowohl die Knorpelschicht mit dem darunterliegenden, kalzifizierten Knorpel, als auch Anteile des subchondralen Knochens.

Bei arthrotischen Knorpelschäden handelt es sich um chondralen oder osteochondrale Defekte, die aufgrund ihrer Entstehung von fokalen, nicht-arthrotischen Knorpelschäden zwingend abzugrenzen sind. Arthrotische Schäden sind durch eine zumeist großflächige Ausdehnung, unscharfe Begrenzung und andere Begleitpathologien im Gelenk wie beispielsweise Osteophytenbildung gekennzeichnet. Die bradytrophe Charakteristik des Gewebes stellt in diesem Zusammenhang einen großen Nachteil für die körpereigenen Reparaturmechanismen

dar. In Ermangelung einer adäquaten Blutversorgung kommt es lediglich zu einer Migration von Zellen aus dem direkt umgebenden Gewebe. Diese können kein suffizientes Ersatzgewebe bildenden, sodass es in der Folge zur Nekrose des geschädigten Gewebes kommt [18, 25]. Dem entgegen steht der osteochondrale Defekt, bei dem es zu einer Migration von mesenchymalen, pluripotenten Stammzellen aus dem Knochen kommt. Hier bildet sich im Verlauf ein Reparaturgewebe aus, das sich hinsichtlich seiner Charakteristika von denen des hyalinen Knorpels unterscheidet, es bildet sich Faserknorpel. Dieser kann im zeitlichen Verlauf die Degeneration der angrenzenden osteochondralen Einheit begünstigen [18, 25]. Im Folgenden ist die osteochondrale Einheit mit der entsprechenden Schichtung und den möglichen Defektarten in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

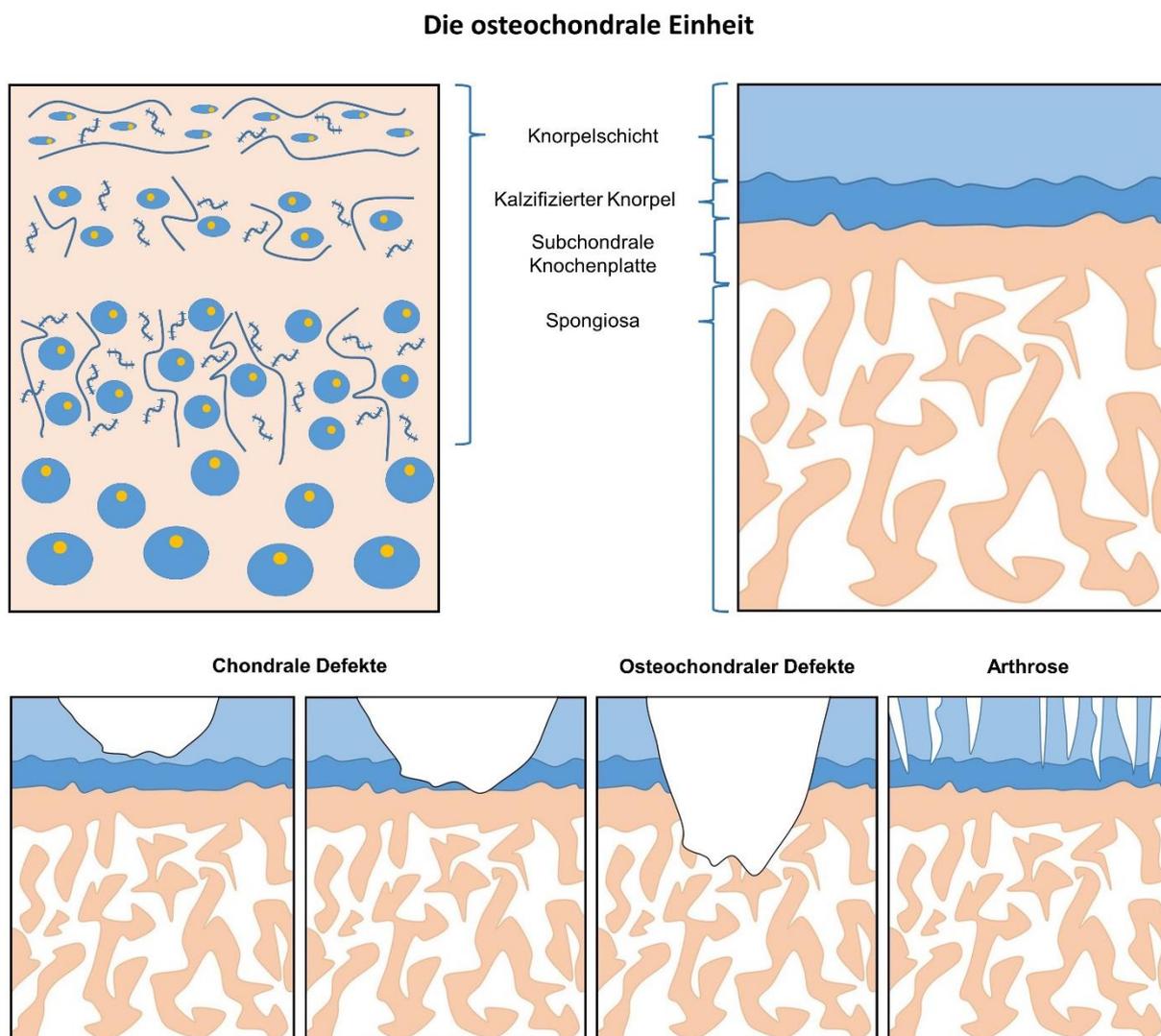


Abbildung 2: Schematische Darstellung der osteochondralen Einheit sowie der verschiedenen Entitäten der möglichen Defekte. Abbildung modifiziert nach [25, 26].

2.5 Therapie der Gonarthrose

Die Therapie der Arthrose des Kniegelenks, auch Gonarthrose genannt, umfasst drei Säulen: die konservative Therapie, die medikamentöse Therapie und die operative Therapie. Diese lassen sich zudem in Ansätze, die den Krankheitsverlauf verzögern, sowie kurative Ansätze differenzieren.

2.5.1 Konservative und medikamentöse Therapie

Die konservative Therapie umfasst physiotherapeutische Beübung, Änderungen in der Lebensführung inkl. Gewichtsreduktion bzw. die Vermeidung einer Gewichtszunahme sowie die Versorgung mittels orthopädietechnischer Hilfsmittel [27-29]. Die symptomatische Therapie durch Analgetika und nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), mit sowohl einer analgetischen als auch einer antiphlogistischen Wirkung, stellt ein probates Mittel insbesondere in solchen Fällen dar, in denen der Arthroseschmerz klinisch im Vordergrund steht [30, 31].

2.5.2 Operative Therapie

Die operative Therapie lässt sich unterteilen in die gelenkerhaltenden und die gelenkersetzenden Verfahren [32]. Das alleinige arthroskopische Débridement des Kniegelenkes im Rahmen der Gonarthrose wird aufgrund mangelnder Evidenz heute nicht mehr durchgeführt. Techniken, die zur Bildung eines knorpeligen Reparaturgewebes führen, wie markkraumeröffnende Techniken der Mikrofrakturierung [33], Pridie-Bohrung [34] und fokale Abrasion oder die autologe Chondrozytentransplantation [35], sind bei hochgradiger Gonarthrose nicht indiziert, können jedoch bei rein fokalen, nicht-arthrotischen Defekten, verwendet werden [36].

Bei isolierter Varus- oder Valgusgonarthrose kann eine entsprechende Varisierungs- oder Valgisierungsosteotomie eine valide therapeutische Option darstellen [37, 38]. Ist die Knorpelregeneration nicht ausreichend oder kommt es allgemein zu einer Progression der Kniegelenksarthrose mit Ausbleiben einer Besserung durch konservative oder medikamentöse Therapie, besteht die Möglichkeit eines Ersatzes einzelner Gelenkanteile bzw. des kompletten Kniegelenks. Die Bandbreite der Endoprothetik erstreckt sich über die etablierten Verfahren, wie die unikondylären Schlittenprothesen bzw. bikondylären Oberflächenersatzverfahren bis hin zum

retropatellaren Oberflächenersatz, wobei die Evidenz des letztgenannten Verfahrens deutlich geringer ist [32, 39-41].

2.5.2.1 Chondrospheren

Zur klinisch durchgeführten Therapieform der autologen Chondrozytentransplantation gehört unter anderem das Konzept der sog. Chondrospheren (Handelsname „Spherox“) [42]. Hierbei handelt es sich um kugelförmige Chondrozytenaggregate, die sich ohne zusätzliche Hilfsmittel durch eigene Adhäsion am subchondralen Knochen eines Knorpeldefekts fixieren. Anders als in verschiedenen parallel erforschten und klinisch verwendeten Therapieoptionen verzichten die Chondrospheren auf (resorbierbare) Trägermaterialien, wie beispielsweise solide Matrices oder Hydrogele, um den Verbleib der eingebrachten Zellen am Zielort zu gewährleisten [43]. Zur Herstellung dieser Spheroide wird im Rahmen eines ersten arthroskopischen Eingriffs am betroffenen Kniegelenk gesunder hyaliner Knorpel gewonnen. Dieser wird aufgearbeitet, 6 bis 8 Wochen in Zellkultur inkubiert, und nach Proliferation der Chondrozyten und Matrixsynthese in Form von Chondrospheren in einem zweiten Eingriff in den Knorpeldefekt eingebracht [44, 45].

Analog zu beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten 3D-Kulturen werden bei der Spherox-Technologie die im ersten Schritt isolierten Chondrozyten in einer einschichtigen Zellkultur inkubiert. Nach stattgehabter Proliferation werden die Zellen anschließend in die Form dreidimensionaler Spheroide überführt. Diese Chondrospheren bestehen aus etwa 200.000 Chondrozyten und weisen einen Durchmesser von etwa 300-600 µm auf. Damit entsprechen die Abmaße denen der Pellets bei vergleichbarer Zellzahl und ähnlichem Durchmesser [46]. Bei der darauffolgenden Applikation in den Knorpeldefekt werden die Chondrospheren im Rahmen eines zumeist arthroskopischen oder offenen Eingriffs direkt auf die zuvor präparierte subchondrale Knochenplatte aufgetragen. Die Spheroide sollten unter trockenen Bedingungen transplantiert werden. Hier kommt es zu einer zellbasierten Adhäsion, die durch die irreguläre Beschaffenheit des subchondralen Knochens unterstützt wird. Eine Applikation von 10-70 Chondrospheren pro cm² Defektgröße ist anzustreben, um eine ausreichende Defektdeckung zu erzielen. Eine zusätzliche Abdeckung der Chondrospheren ist nicht notwendig [46].

2.6 Grundlagen der Gentherapie

Grundlage der Gentherapie bilden die Vorgänge der Transkription und Translation – die durch spezifische Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Sequenzen kodierte Proteinsynthese. Dies gilt sowohl für die Expression der körpereigenen Proteine als auch für therapeutische Gene. Die abgelesene DNS wird im Zellkern in die Boten-RNS (mRNS) umgewandelt. Dieser Prozess wird als Transkription bezeichnet. Nach dem Transfer in das Zytoplasma schließt sich die Translation, die Synthese von Proteinen durch Übersetzen der mRNS, an [47]. Entsprechend des gewünschten Effekts in der Zelle ist die Auswahl der zu transduzierenden Gene entscheidend. So ist sowohl die gesteigerte Expression von strukturenbenden Proteinen denkbar als auch die erhöhte Synthese von Signalproteinen um Stoffwechselforgänge des adressierten Gewebes zu beeinflussen [47].

Die Erforschung möglicher Ansätze zur Gentherapie umfasst neben den therapeutischen Vektoren auch Reporter-Gene. Diese greifen nicht in den Stoffwechsel der Zellen ein. Ihre Produkte können durch spezifische Verfahren quantifiziert werden, um unter anderem die Effizienz der Transduktion zu objektivieren. Zudem kann die Dauer der Genexpression sowie die Auswirkung der viralen Transduktion auf die Zielzelle überprüft werden [48]. Für den Nachweis ist oftmals die Zugabe exogener Substrate vonnöten, daher besteht unter Umständen eine Einschränkung in der Anwendbarkeit, da mit der Untersuchung der exprimierten Proteine die zu untersuchenden Zellen nicht weiter beobachtet werden können. Durch beispielsweise fluoreszierende Proteine kann dies umgangen und eine Expression ohne die Beendigung der Untersuchung vollzogen werden [49].

2.7 Gentransfersysteme

Der Gentransfer im Rahmen der Gentherapie teilt sich in die beiden Kategorien Transfektion bzw. Transduktion und Genom-Editierung auf. Zur Erläuterung der Begrifflichkeiten und der Sicherung eines genaueren Verständnisses dient die folgende Übersichtstafel:

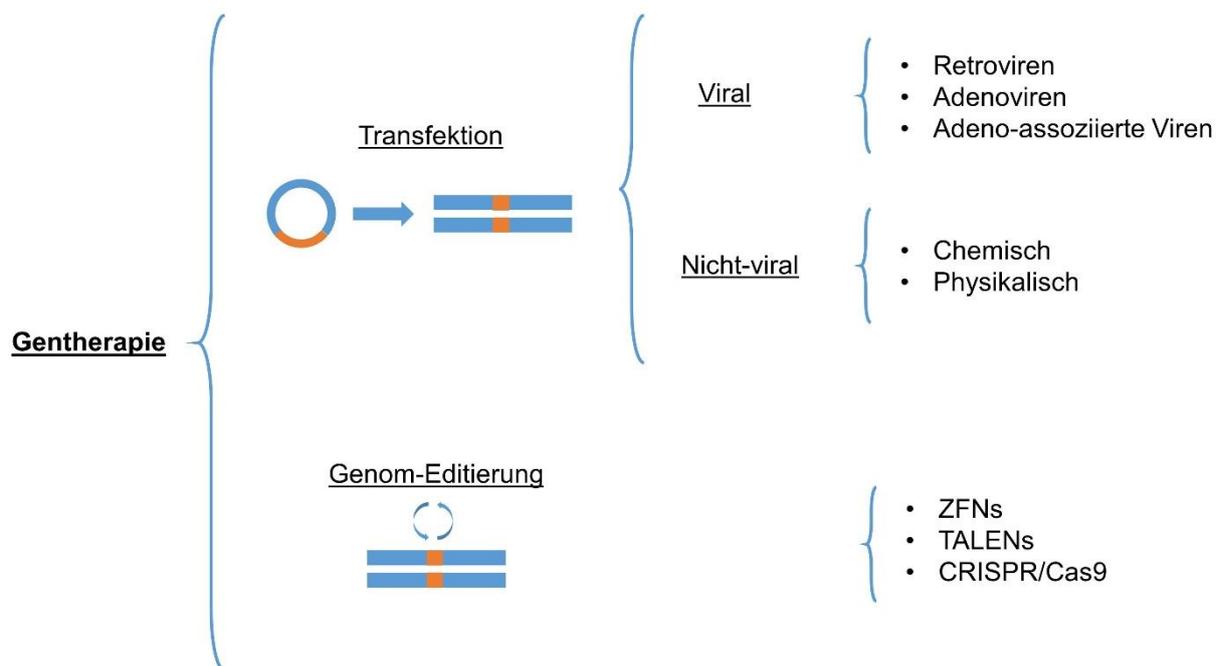


Abbildung 3: Übersicht möglicher Ansatzpunkte der Gentherapie. Die Transfektion umfasst sowohl das zeitweise Einbringen von fremder Erbsubstanz in die Zielzelle, als auch den tatsächlichen Einbau in das Genom der Zielzelle. Die Genom-Editierung beschreibt die Veränderung spezifischer Sequenzen. ZFNs: Zinkfinger-nukleasen; TALENs: transkriptionsaktivatorartige Effektnuklease.

2.7.1 Transfektion/Transduktion

Die Transfektion umfasst alle Verfahren des Einbringens von externer DNS bzw. RNS in die Zielzelle. Zu unterscheiden ist die transiente Transfektion, das zeitweise Verbleiben des genetischen Materials in der Zelle, von der stabilen Transfektion, im Folgenden Integration genannt. Hier erfolgt der Einbau der Nukleinsäuren in das Genom der Zelle. Somit bleibt nach einer Zellteilung die genetische Veränderung erhalten, zudem wird ein vorzeitiger Abbau der körperfremden Nukleinsäuren verhindert [50-52].

2.7.1.1 Viraler Gentransfer - Transduktion

Nachdem die Möglichkeit des viralen Gentransfers durch Rogers & Pfuderer im Jahr 1968 anhand des Tabakmosaikvirus beschrieben wurde, haben sich in den vergangenen Jahrzehnten die Adenoviren, Retroviren und adeno-assoziierten Viren als adäquate Vehikel des Gentransfers, bei viraler Transfektion Transduktion genannt, etabliert [53-56].

Adenoviren weisen als Vektor mit bis zu 100 % eine äußerst hohe Effizienz in der Transduktion der DNS auf. Aufgrund der Struktur des viralen Genoms besteht eine hohe Immunogenität des Vektors. So ist eine Immunreaktion des Wirts nach 1-2 Wochen oder bereits nach einigen Tagen möglich [57]. Jedoch ist die Integration in das Genom der Zielzelle mit Werten $< 0,1$ % gering [58].

Retroviren zeigen als Vektor mit etwa 20 % eine deutlich geringere Rate an transduzierten Zellen. Die Integration für die Expression von Virusprotein obligat ist, besteht in diesem Fall zum einen ein Risiko, Mutagene bzw. Tumorgene in die Zielzellen einzubringen [59], zum anderen ist der Anwendungsbereich in der Gentherapie besonders bei bradytrophen Geweben wie dem hyalinen Knorpel reduziert [60].

Adeno-assoziierte Viren (AAV) als Vektoren basieren auf Viren der Gattung der Dependoviridae. Anders, als bei den bereits genannten Vertretern, ist hier die Virusreplikation nicht durch den Vektor selbst, sondern durch einen zusätzlichen exogenen Faktor nötig. Aufgrund der geringen Größe mit ca. 4,7 kbp Einzelstrang-DNS in den zur Forschung verwendeten Stämmen [61], besteht eine deutlich herabgesetzte Immunogenität. Zudem besitzt der Vektor eine stark erhöhte Penetrationsfähigkeit ob des geringen Durchmessers von ca. 20 nm mit einer Transduktionsrate von bis zu 100 % [62]. In den verwendeten AAVs wurden die für eine mögliche Mutagenität verantwortlichen Gensequenzen entfernt [61, 63, 64]. Die zudem sehr geringe Integrationsrate von 0,1-0,5 % [65] verringert zudem die Wahrscheinlichkeit einer Mutation infolge der Zellteilung.

2.7.1.2 Nicht-viraler Gentransfer - Transfektion

Obgleich in der aktuellen Arthroseforschung dem nicht-viralen Gentransfer eine untergeordnete Rolle zuteilwird, zeigte sich in der Vergangenheit, dass dieser durchaus ein probates Mittel darstellt, um Gene in Zielzellen zu inserieren. Es kann zwischen den chemischen und physikalischen Methoden unterschieden werden [66, 67].

Zu den chemischen Methoden des nicht-viralen Gentransfers gehören die liposomalen und Lipid-basierten Transfektionssysteme, die – wie auch bei den aktuellen COVID-mRNA-Impfungssystemen – die zu transportierende genetische Substanz in einer Lipid-basierten Schutzschicht transportieren [68-71].

Die physikalischen Methoden umfassen die direkte Gen-Injektion in den Nucleus mittels Mikropipette, die Penetration der Zellmembran mittels elektrischer Impulse, Wärme oder ballistischer Methodik, der sog. „gene gun“, bei der an Nanopartikel gebundene Plasmid-DNS in die Zielzelle „gefeuert“ wird [72-74].

2.7.2 Genom-Editierung

Die Genom-Editierung (im Englischen *genome editing*) umfasst mehrere Mechanismen, die der Veränderung spezifischer Sequenzen des Erbguts dienen und somit eine direkte Korrektur von Genen ermöglichen. Die DNS kann durch diese Nuclease-vermittelten Verfahren an festgelegter Stelle in Form von Doppelstrangbrüchen aufgebrochen werden, sodass dort Gene implementiert, verändert oder gänzlich entfernt werden können. So kommt es zu einer Editierung oder Mutation der Patienten-DNS [75]. Die modifizierten Enzyme sind in der Regel bakteriellen Ursprungs und dienen vor ihrer „Zweckentfremdung“ als Verteidigungsmechanismus gegen exogenes Erbmateriale [76]. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Veröffentlichung werden unter anderem Zinkfinger-nucleasen (engl. *zinc finger nucleases* = ZFNs) [77], transkription-saktivatorartige Effektor-nuclease (engl. *transcription activator-like effector nucleases* = TALENs) [78] und in der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion allen voran CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated*) [79, 80] verwendet. Anders, als bei der Gentherapie mittels Transfektion, stellt sich im Fall der Genom-Editierung die Frage nach der Insertion nicht. Aufgrund des Verfahrens kommt es wie beschrieben zu einer Veränderung der DNS der Zielzelle und somit zu einer dauerhaften Veränderung des Genoms. Dies betrifft sowohl die gewünschte Veränderung in beispielsweise der Proteinbiosynthese, aber auch mögliche mutagene Effekte.

2.8 In vivo- und in vitro-Gentransfer

Grundsätzlich gilt es, zwei Wege den Transfer von therapeutischen Genen zu unterscheiden.

In vivo: Der Transfer des therapeutischen Gens erfolgt innerhalb des Organismus, die Vehikel werden in den Patienten eingebracht und die Gensequenzen dann in die Zellen eingepflegt. Es handelt sich somit um einen direkten Gentransfer [54, 81, 82].

In vitro: Der Transfer des therapeutischen Gens erfolgt außerhalb des Organismus (in vitro). Zellen werden durch entsprechende Verfahren aus dem Patienten entnommen, bzw. es werden körperfremde Zellen für die Therapie verwendet. In Zellkultur wird in die entsprechenden Zellen die therapeutische Gensequenz eingebracht. In der Regel schließt sich dann eine Phase der Kultivierung an, um die Zahl der veränderten Zellen zu steigern. Diese werden dann, sobald eine entsprechende Menge ex vivo erreicht wurde, wieder in den Patienten eingebracht und exprimieren dann am Ort der Implantation ihre therapeutische Wirkung. In diesem Fall handelt es sich um einen zellbasierten Gentransfer [54, 81, 82].

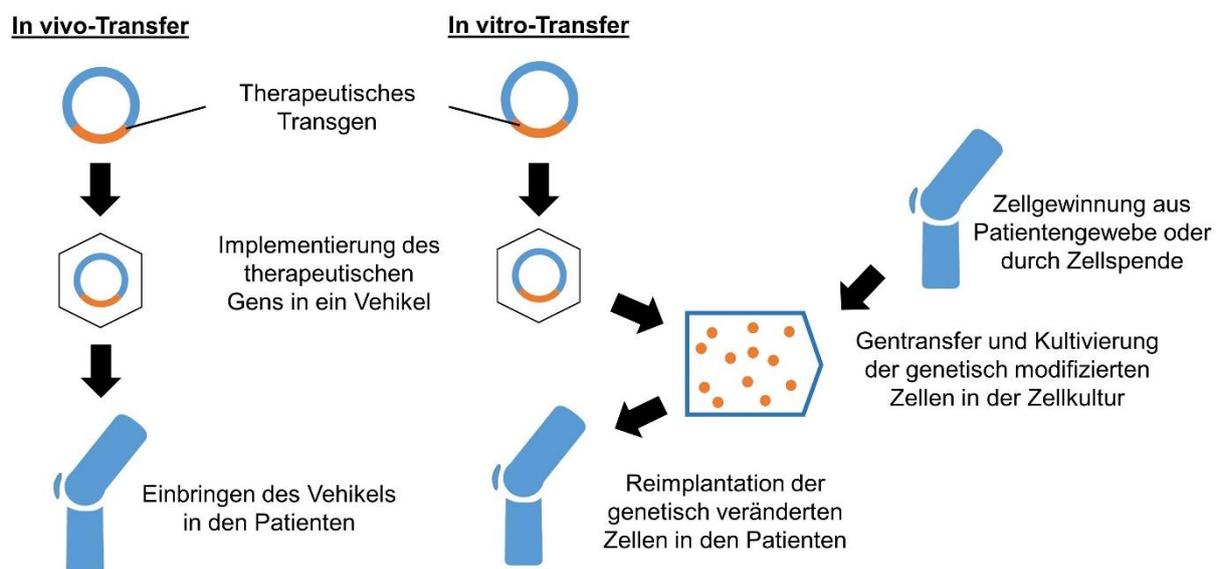


Abbildung 4: Vergleich Gentransfer In vivo/In vitro, abgewandelt aus [81]. Bei einem In vivo Gentransfer erfolgt die Applikation des Therapeutikums direkt am Zielort. Bei der Variante des In vitro Gentransfers werden Zellen des Patienten bzw. Spenderzellen in der Zellkultur genetisch modifiziert und dann in das Zielgewebe eingebracht.

2.9 Grundlagen des *Tissue Engineering*

Der Begriff *Tissue Engineering* beschreibt die Herstellung biologischer Ersatzgewebe, um die Funktion von Geweben wiederherzustellen, zu erhalten oder sie zu verbessern [83]. Bei synthetisch hergestellten Knorpel-Analoga gilt es grundsätzlich, zwischen Aggregaten, die eine strukturgebende Komponente besitzen, und Konglomeraten ohne Gerüst oder vorgegebene Struktur, zu unterscheiden.

Gewebe mit strukturgebender Komponente unterscheiden sich stark in ihrer potenziellen Zusammensetzung. So können Chondrozyten in den Poren abbaubarer Polymerverbindungen aus beispielsweise Polyglykolsäuren, Polysacchariden oder Alginaten eingelagert werden [84-86]. In Gelen auf Kollagen-, Gelatine- oder Fibrin-Basis kann ebenfalls eine Applikation am Bestimmungsort erfolgen [87, 88]. In Wasser unlösliche Hydrogele haben sich in diesem Zusammenhang als besonders geeignetes Vehikel etabliert, da sie die Komposition des in vivo vorliegenden Knorpels im Hinblick auf das Verhältnis von Feststoffen zu Wasseranteil gut abbilden [89].

Gerüstfreie Gewebe sind unter anderem die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pellets, bei denen es zu einer Anlagerung der Chondrozyten unter Zentrifugalkräften kommt. Hier sind keine exogenen Stoffe enthalten, die strukturerhaltende extrazelluläre Matrix wird durch die Chondrozyten selbst gebildet. Durch die Quervernetzung der Zellen bildet sich ein stabiles Konstrukt. Aufgrund des Herstellungsprozesses besteht bei dieser Variante der Ersatzgewebe eine deutlich erhöhte Zellkonzentration im Vergleich zu dem in vivo vorliegenden Knorpeln [90, 91].

Bei dem „*Cartilage tissue analog*“ (CTA), im Folgenden Knorpelgewebe-Analogon genannt, handelt es sich ebenfalls um ein sich-selbst-organisierendes Gewebe. Ermöglicht wird dies durch eine ungeladene, mit einem Hydrogel beschichtete, Oberfläche. So wird ein Anhaften am Reagenzgefäß reduziert und die Vernetzung der Chondrozyten untereinander gefördert. Diese, bereits im Tiermodell beschriebene Methodik [92, 93], wurde von uns erstmals mit humanen adulten Chondrozyten durchgeführt.

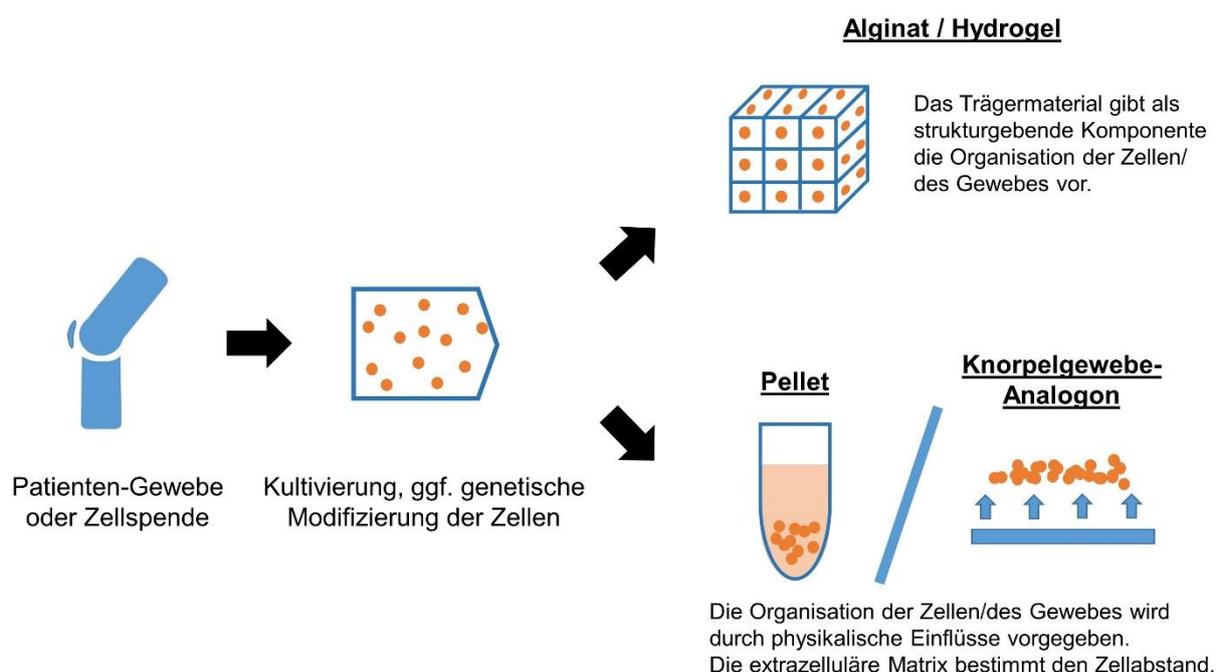


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Gewebszüchtung (Tissue Engineering). Nach der Gewinnung von Zellen aus Gewebsspenden und Kultivierung mit ggf. genetischer Modifikation ist sowohl die Herstellung eines gerüstfreien Gewebes als auch die Synthese eines Gewebes mit strukturgebender Komponente möglich.

2.10 Das Kniegelenk als primärer Angriffspunkt der Gentherapie

Endgültiges Ziel einer Arbeit in der Grundlagenforschung muss, nach unserer Auffassung, die Möglichkeit der Translation in ein Studienmodell und letztendlich die klinische Anwendbarkeit sein. Somit stellt sich die Frage nach dem geeignetsten Gelenk zur Erforschung entsprechender Therapieansätze. Das Kniegelenk ist insofern prädestiniert für unsere Forschungen, da hier die mit Abstand höchste Inzidenz der Erkrankung vorliegt [94]. Damit verbunden ist die über Jahrzehnte etablierte operative Behandlung mittels endoprothetischem Oberflächenersatz. Dem Ablauf der gängigen Verfahren ist geschuldet, dass es im Verlauf der Operationen zu einem beträchtlichen Gewinn von arthrotischem Knorpelgewebe kommt. Somit können Chondrozyten zur Erforschung der Arthrose teilweise aus den entsprechenden Standardeingriffen gewonnen werden.

Die Applikation von mit rAAV-transduzierten Chondrozyten bzw. eine direkte Vektorapplikation in das Kniegelenk zeigen in der klinischen Anwendung ebenfalls diverse Vorzüge. Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten der Gelenkkapsel ist eine Applikation prinzipiell möglich, ohne eine direkte Diffusion in das umliegende Gewebe befürchten zu müssen [81, 95]. Zudem kommt es aufgrund der regelmäßigen Wechsel zwischen Druck und Entlastung im Bereich des Gelenkknorpels zu einem entsprechenden Flüssigkeitsaustausch und in der Konsequenz zu einer physikalisch gesteuerten Aufnahme der Vektoren im Zielgewebe. Darüber hinaus ist das Kniegelenk leicht erreichbar, eine Injektion somit einfach, sicher reproduzierbar und kostengünstig [95]. Die operativen Zugangswege sind etabliert und standardisiert, eine Chondrozyten-Transplantation kann daher ebenfalls sicher erfolgen, ohne einen beträchtlichen Schaden am umliegenden Gewebe zu verursachen.

3. Hypothesen

- (1) *Normale adulte und arthrotische adulte Chondrozyten des Gelenkknorpels sind vergleichbar effektiv durch rAAV transduzierbar.*

- (2) *Die Transduktion von normalen adulten und arthrotischen adulten Chondrozyten durch rAAV-FLAG-hsox9 führt in einer 3D-Zellkultur zu einer vermehrten Expression von Markern der Chondrogenese.*

- (3) *Die Synthese eines artifiziellen Knorpelkonstrukts im Sinne eines Knorpelgewebe-Analogons („Cartilage tissue analog“) ist mit normalen adulten und arthrotischen adulten Chondrozyten realisierbar.*

- (4) *Eine effektive, langfristige Transgenexpression ist sowohl in der Pelletkultur als auch in einem Knorpelgewebe-Analogon möglich.*

4. Studienaufbau

4.1 Pelletstudien

In der durchgeführten Studie wurden Knorpelspenden des Kniegelenkknorpels, wie unter 6.1.1-6.1.4 beschrieben, verarbeitet. Die Einteilung der Zellspenden erfolgte in 2 Gruppen: humane adulte normale Chondrozyten (hNACs) und humane adulte arthrotische Chondrozyten (hOACs). Beide Gruppen umfassten jeweils 4 Zellspenden, bei den normalen Chondrozyten aus einer Altersgruppe von 21 bis 42 Jahren, bei den arthrotischen Chondrozyten aus einer Altersgruppe von 69 bis 81 Jahren. Bei den Knorpelspenden handelte es sich um ausnahmslos weibliche Spender. Die Durchführung der Studie erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 Nöpfchen (Wells), folgend als 96-Well-Titerplatte bezeichnet. Sowohl für die Zentrifugation als auch die weitere Inkubation wurden Platten mit einem U-förmigen Boden verwendet, ähnlich dem Boden eines Eppendorf-Reaktionsgefäßes.

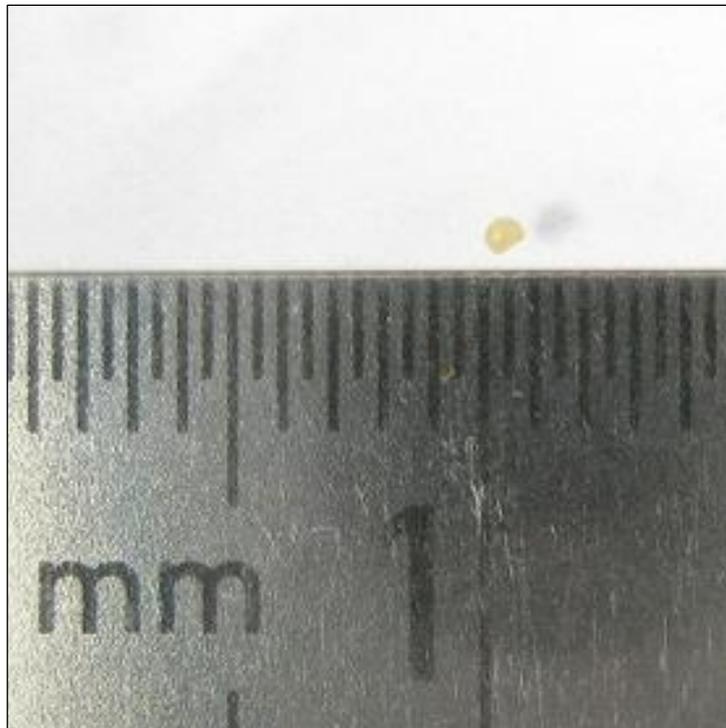


Abbildung 6: Exemplarische, makroskopische Aufnahme eines Pellets mit nominaler Skala. Der Durchmesser des gezeigten Pellets entspricht etwa 0,7 mm. Die Abstände der mittellangen Striche entsprechen 1 mm.

Die Pelletstudie teilt sich in 2 Studienarme auf: Studie A befasste sich mit der Frage nach der Abhängigkeit zwischen Vektordosis und Genexpression. Studie B fokussierte sich auf den Vergleich zwischen therapeutischem Vektor, Marker-Gen und Kontrollgruppe, wobei hier die Erkenntnisse aus Studienarm A hinsichtlich der anzustrebenden Vektordosis angewendet wurden. In beiden Studienarmen wurden jeweils die Gruppen der humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten miteinander verglichen.

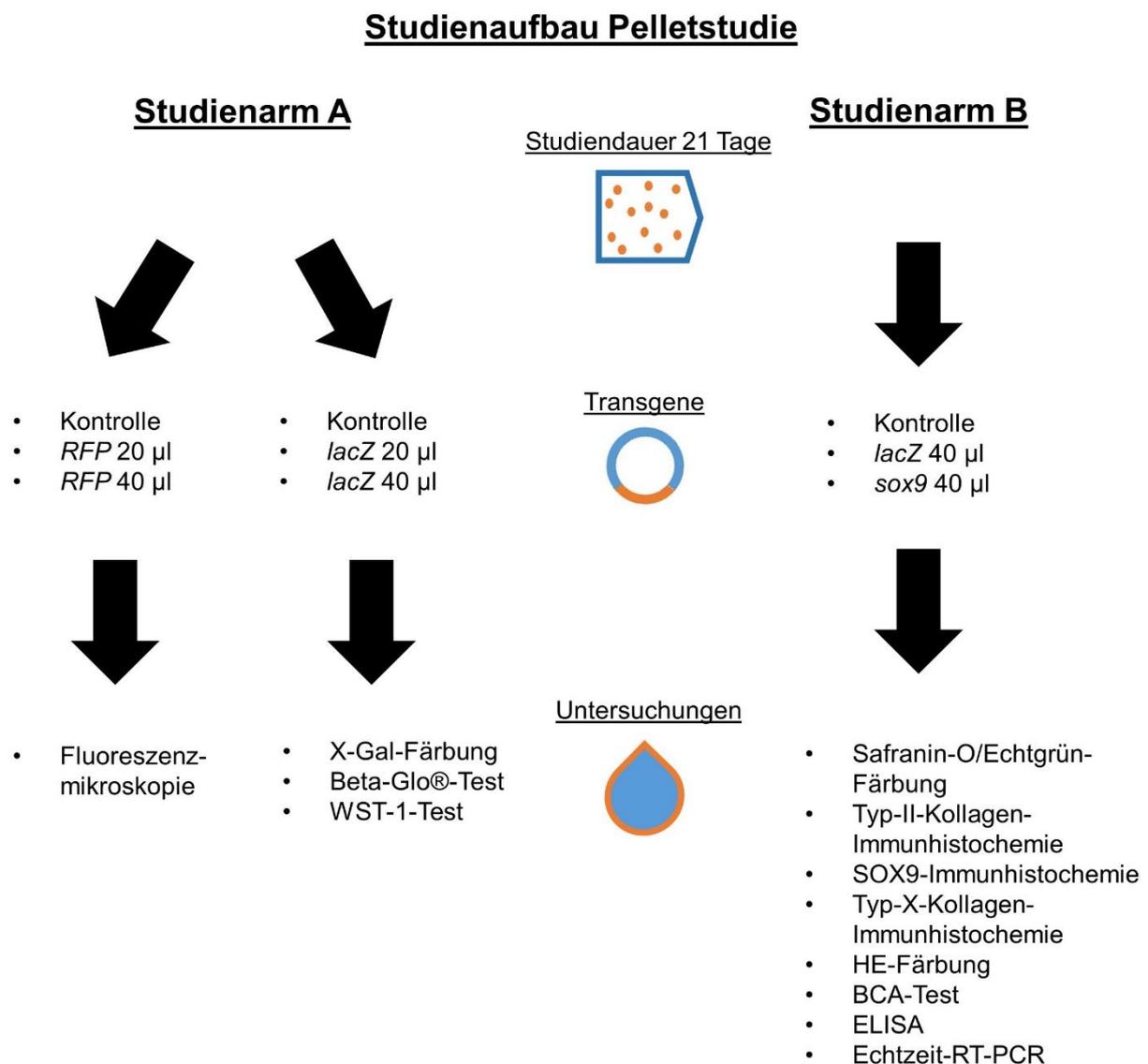


Abbildung 7: Studiendesign der Pelletstudie. Studienarm A untersucht die Beziehung zwischen verwendeter Vektordosis und exprimiertem Transgen. Studienarm B untersucht die Auswirkungen der Transgenexpression mit therapeutischem Vektor und stellt diese der Transduktion des Marker-Gens und der Kontrollgruppe gegenüber. lacZ: β -Galactosidase-Gen; RFP: Rot-fluoreszierendes Protein Gen; sox9: sox9-Gen.

4.2 Knorpelgewebe-Analogon-Studie

In der durchgeführten Studie wurden Knorpelspenden des Kniegelenkknorpels, wie unter 6.1.1-6.1.5 beschrieben, verarbeitet. Die Zellspende umfasste 3 Knorpelspenden von humanen adulten normalen Chondrozyten aus einer Altersgruppe von 28 bis 42 Jahren sowie 5 Spenden von humanen adulten arthrotischen Chondrozyten aus einer Altersgruppe von 69 bis 81 Jahren. Bei den Knorpelspenden der normalen Chondrozyten handelte es sich um ausnahmslos weibliche Spender, unter den Spenden der arthrotischen Chondrozyten befand sich allerdings ein männlicher Proband. Die Durchführung der Studie erfolgte in 96-Well-Titerplatten mit *Ultra-low Attachment Surface*. Die Beobachtungszeiträume in der vorliegenden Arbeit variieren zwischen 8 und 84 Tagen.

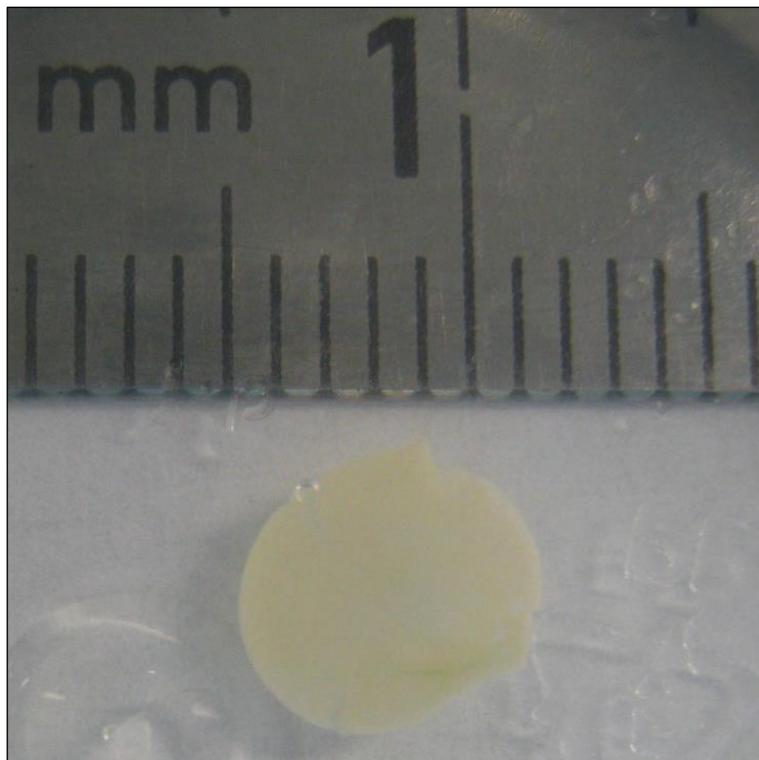


Abbildung 8: Exemplarische, makroskopische Aufnahme eines Knorpelgewebe-Analogons mit nominaler Skala. Der Durchmesser des gezeigten Knorpelgewebe-Analogons ist etwa 0,7 mm. Die Abstände der mittellangen Striche entsprechen 1 mm.

Studienaufbau Knorpelgewebe-Analoga-Studie

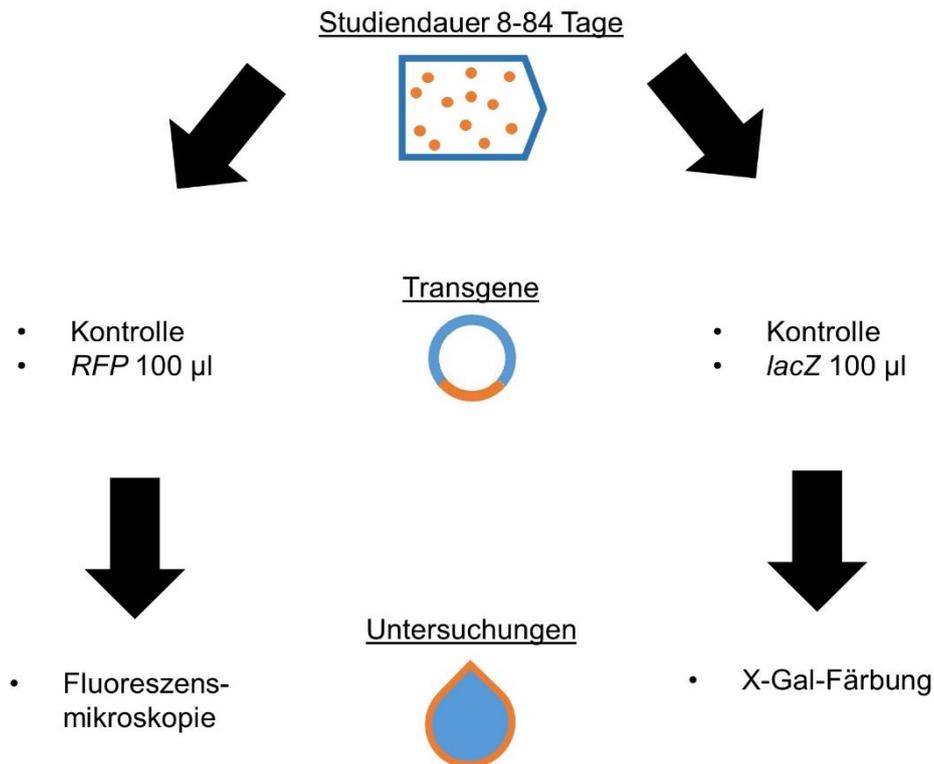


Abbildung 9: Studiendesign der Knorpelgewebe-Analoga-Studie. Es erfolgte der Vergleich der Kontrollgruppe mit Zellen, die mit zwei unterschiedlichen Marker-Genen transduziert wurden. lacZ: β -Galactosidase-Gen; RFP: Rot-fluoreszierendes Protein-Gen.

In der Durchführung der Knorpelgewebe-Analoga-Studie erfolgte, anders als in der Pelletstudie, keine Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen der humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten. Mit dem Wissen des vorangestellten Studienarms A, der Pelletstudie, wurden beide Patientengruppen zusammengefasst. Dies ist der hohen Zellzahl, die zur Durchführung der Experimente benötigt wurde, geschuldet, vgl. 8.2.2 „Gewinnung von Probenmaterial“. In Abbildung 8 ist der makroskopische Größenvergleich eines Pellets gegen ein Knorpelgewebe-Analoga bei gleichem Maßstab abgebildet. In der Handhabung beider Zellkonglomerate ist das Pellet subjektiv fester, was in Teilen der Art der Herstellung geschuldet ist. Beide Gewebe können nur durch relative Anstrengung mithilfe eines Skalpell zerteilt werden. Die strukturelle Integrität ist jedoch verglichen mit Knorpelenden in beiden Fällen geringer.

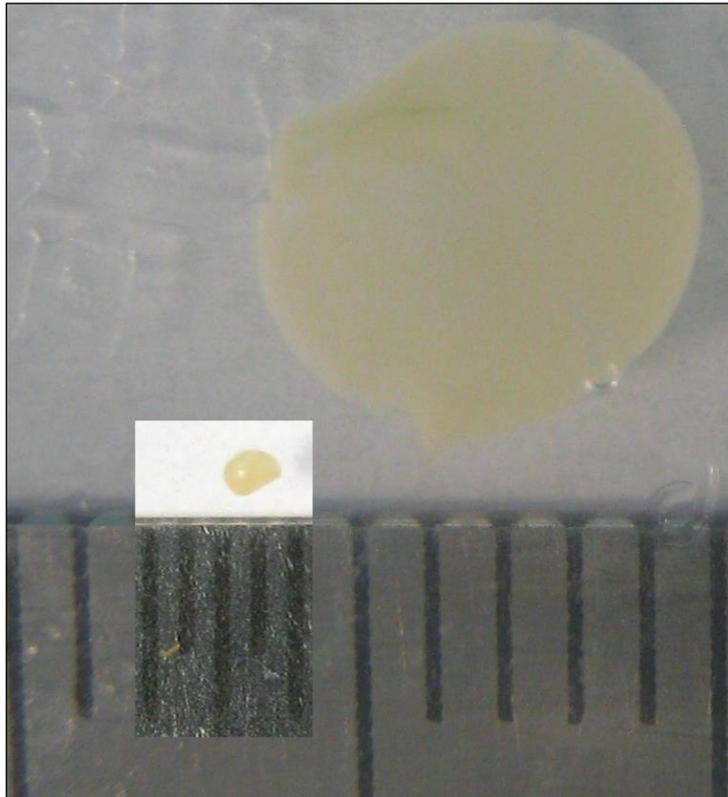


Abbildung 10: Größenvergleich eines Pellets gegen ein Knorpelgewebe-Analogon. Modifizierte makroskopische Abbildung. Die Abstände der mittellangen Striche entsprechen 1 mm.

5. Materialien

5.1 Chemikalien

Die allgemeinen Laborchemikalien zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurden vorwiegend von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Bezugsquellen weiterer Chemikalien sind:

Tabelle 1: Chemikalien

Produkt	Hersteller
Albumin-Standard	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Amphotericin B	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DAB-Reagenz	Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DNS sodium salt from calf thymus (Typ-I, fibers)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Echtgrün (FCF)	ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
Eosin G	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure (1 %)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FBS	Gibco, Fisher Scientific (Gaithersburg, Maryland, USA)
Formalin (4 %)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin nach Weigert (A & B)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES-Puffer	Fisher Bioreagents (Schwerte, Deutschland)
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Insulin-Transferrin-Selen A	Gibco, Fisher Scientific (Gaithersburg, Maryland, USA)
Kollagenase (Pulver)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Modified Eagle's Medium Vitamin Solution (MEM)	Gibco, Fisher Scientific (Gaithersburg, Maryland, USA)
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Paraplast X-TRA	Leica (Nussloch, Deutschland)

PBS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (1 %)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
SYBR Green qPCR Master Mix	Agilent Technologies (Ratingen, Deutschland)
TGF- β 3 (Pulver)	PeptoTech (Rocky Hill, New Jersey, USA)
TRIS-Puffer	Gibco (Schwerte, Deutschland)
Wasserstoff-Peroxid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
WST-1-Reagenz	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Xylol	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

5.2 Antikörper und Enzyme

Tabelle 2: Antikörper und Enzyme

Bezeichnung	Spezies	Hersteller
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)
Anti-Typ-X-Kollagen	Maus	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Anti-SOX9 (C-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
Anti-Maus-IgG (biotinyliert)	Ziege	Vector (Burlingame, Kalifornien, USA)
Trypsin	-	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Papain	-	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

SOX9: sox9-Protein.

5.3 Vektoren

Tabelle 3: Vektoren

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
<i>lacZ</i>	rAAV-Vektor, der das <i>lacZ</i> -Reporter-gen unter der Kontrolle des CMV-IE-Promotors trägt	R.J. Samulski und X. Xiao (The Gene Therapy Center, University of Pittsburgh) (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
<i>sox9</i>	rAAV-Vektor, der das <i>sox9</i> -Gen unter der Kontrolle des CMV-IE-Promotors trägt	Magali Madry (geb. Cucchiarini) (Homburg, Deutschland)
<i>RFP</i>	rAAV-Vektor, der das RFP-Reporter-gen unter der Kontrolle des CMV-IE-Promotors trägt	Magali Madry (geb. Cucchiarini) (Homburg, Deutschland)

lacZ: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen, *RFP*: rot-fluoreszierendes Protein-Gen; rAAV: rekombinante adeno-assoziierte Viren.

5.4 Primer für die Echtzeit-RT-PCR

Die Primer für die durchgeführten Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Echtzeit-RT-PCR) Messungen bezogen wir von der Firma Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland).

Tabelle 4: Primer für die Echtzeit-RT-PCR

Gen	Primersequenzen (5'-3')
COL2A1 = Typ-II-Kollagen α 1	vorwärts: GGACTTTTCTCCCCTCTCT rückwärts: GACCCGAAGGTCTTACAGGA
COL10A1 = Typ-X-Kollagen α 1	vorwärts: CCCTCTTGTTAGTGCCAACC rückwärts: AGATTCCAGTCCTTGGGTCA
GAPDH = Housekeeping-Gen (Kontrolle)	vorwärts: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC rückwärts: GAAGATGGTGATGGGATTTTC
RUNX2 = Runt-related transcription factor	vorwärts: GCAGTTCCCAAGCATTTCAT rückwärts: CACTCTGGCTTTGGGAAGAG

5.5 Vorgefertigte Zusammenstellungen von Reagenzien zur biochemischen Auswertung

Tabelle 5: Reagenzien zur biochemischen Auswertung

Produkt	Hersteller
<i>1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)</i>	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
VECTASTAIN ABC-HRP Kit (Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz)	Vector Laboratories (Burlingame, Kalifornien, USA)
<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Genopure Plasmid Maxi Kit</i>	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
<i>Pierce BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois, USA)
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Typ-II-Kollagen ELISA Kit (Human Collagen alpha-1(II) chain)	Cusabio (College Park, Maryland, USA)
<i>β-Gal (X-Gal) Staining Kit</i>	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Beta-Glo [®] -Test	Promega (Mannheim, Deutschland)

5.6 Lösungen und Medien

Tabelle 6: Lösungen und Medien

Lösung, Puffer	Inhaltsstoffe	Konzentration/Menge/ Volumen
ABC-Reagenz (VECTASTAIN ABC-HRP Kit)	PBS	10 ml
	Lösung A	2 Tropfen
	Lösung B	2 Tropfen
Blockierungspuffer	BSA (7,5 %)	6 ml
	PBS	200 ml
BSA (0,1 %)	BSA (2 mg/ml)	1 μ l
	ddH ₂ O	ad 2.000 μ l

Chondrogenes-Medium (10 ml)	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	9,664 ml
	Penicillin/Streptomycin	100 µl
	Dexamethason (0,1 mM)	10 µl
	Ascorbinsäure (20 mg/ml)	25 µl
	Natriumpyruvat (11 mg/ml)	100 µl
	Insulin-Transferrin-Selen A (100x)	100 µl
	TGF-β3-Lösung (cstock = 100 g/ml)	1 µl
Knorpelgewebe-Analoga- Medium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	
	FBS	10 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %
	Amphotericin B	2,5 µg/ml
	Modified Eagle's Medium	1 %
	Vitamin Solution	
	HEPES-Puffer	25 mM
DAB-Lösung	H ₂ O	5 ml
	Puffer (pH = 7,5)	2 Tropfen
	DAB	4 Tropfen
	H ₂ O ₂	2 Tropfen
Echtgrün-Lösung 0,02 %	Echtgrün (FCF)	0,02 g
	H ₂ O	ad 1.000 ml
Eosin-Lösung	Eosin G	10 g
	H ₂ O	ad 2.000 ml
Formalin-Lösung (pH 7,4)	KH ₂ PO ₄	9,07 g
	Na ₂ HPO ₄	11,86 g
	Formalin-Stammlösung	140 ml
	H ₂ O	ad 1.000 ml
Hämatoxylin-Lösung (nach Harris)	Hämatoxylin	10 g
	Ethanol (100 %)	120 ml
	Natrium-Jodat	10 g
	Aluminiumkaliumsulfat	200 g
	H ₂ O	ad 2.000 ml
HCl-Lösung (Salzsäure)	HCl (40 %)	5,4 ml
	H ₂ O	ad 200 ml
Hoechst 33258-Ursprungs- lösung	Hoechst 33258	1 mg
	H ₂ O	1 ml

Hoechst 33258-Arbeits-Lösung (2 µg/ml)	Hoechst 33258 Ursprungslösung	10 µl
	TEN-Puffer	4.990 µl
Kollagenase-Lösung, (0,2 %)	Kollagenase	0,04 g
	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	20 ml
	Penicillin/Streptomycin	400 µl
Papain-Lösung	Papain	18,75 µg
	PBE-Puffer	ad 150 µl
PBE-Puffer-Lösung	Dinatriumhydrogenphosphat	7,1 g
	EDTA-Na ²⁺	1,86 g
	ddH ₂ O	500 ml
Safranin-Orange-Lösung (0,1 %)	Safranin-Orange	1 g
	H ₂ O	ad 1.000 ml
Standardmedium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	450 ml
	FBS	45 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
TEN-Puffer (10x)	TRIS-Puffer	100 mM (50 ml)
	EDTA (stock: 0,5 M)	10 mM (10 ml)
	NaCl	1 M (100 ml)
	H ₂ O	340 ml
TEN-Puffer (1x)	TEN-Puffer (10x)	50 ml
	H ₂ O	450 ml
TGF-β3-Lösung	TGF-β3	10 µg
	BSA (0,1 %)	10 µl
Trypsin-Lösung (10x)	Trypsin	25 % (V/V)
	PBS	75 % (V/V)
Trypsin-Lösung (1x)	Trypsin-Lösung (10x)	10 % (V/V)
	PBS	90 % (V/V)
Wasserstoff-Peroxid-Lösung (1:1.000)	H ₂ O ₂ (30 %)	0,6 ml
	H ₂ O	200 ml
WST-1-Lösung	WST-1-Reagenz	15 µl
	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	150 µl

5.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
96-well-Titerplatte with Ultra-low Attachment Surface, flat bottom	Corning (New York City, New York, USA)
Deckgläser, Histologie	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Klingen, Rotationsmikrotom	Leica (Nussloch, Deutschland)
Metallkassetten, Paraffin-Einbettung	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Objektträger SuperFrost Plus	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Objektträger, Histologie	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Parafilm	Fisher (Schwerte, Deutschland)
Plastikabdeckungen, Paraffin-Einbettung	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Plastikartikel/Glasbehälter, Zellkultur	Beckton Dickinson (Pont de Claix, Frankreich), Fisher (Schwerte, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland)
Sterilfilter	Fisher (Schwerte, Deutschland)

5.8 Instrumente

Chirurgische Instrumente, wie bspw. Skalpelle und Pinzetten, wurden von den Firmen Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen, Deutschland), Megro (Wesel, Deutschland) und A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz) bezogen.

5.9 Software

Das Erstellen der histologischen Bilder erfolgte mit dem Programm cellSens Version 1.12 (Olympus, Tokio, Japan). Zusammengefügt und bearbeitet wurden diese mit Adobe Photoshop CS6 Version 6.2 (Adobe Systems, San José, Kalifornien, USA) und Microsoft PowerPoint 2013 (Redmond, Washington, USA). Letztgenanntes Programm wurde ebenfalls für die Erstellung der Schaubilder verwendet.

Die Evaluation der Immunhistochemie erfolgte mit ImageJ Version 1.52e (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) und dem Plugin „Immunohistochemistry (IHC) Image Analysis Toolbox“ Version 2 (Jie Shu, North China University of Technology, China; Guoping Qiu und Mohammad Ilyas, University of Nottingham, Großbritannien) sowie SIS analySIS (Olympus, Tokio, Japan) und Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2013 (Redmond, Washington, USA), verfasst wurde die Arbeit mit Microsoft Word 2013 (Redmond, Washington, USA).

5.10 Großgeräte und elektronische Gerätschaften

Tabelle 8: Großgeräte und elektronische Gerätschaften

Gerät	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, Großbritannien)
Digitalkamera CC-12 (Aufsatz für Olympus BX-45)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Digitalkamera Powershot A480	Canon (Neu-Isenburg, Deutschland)
Einbettmaschine EG 1140-C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Fluoreszenz-Beleuchter BX3-URA	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Gefrierschrank -20 °C	Bosch (Gerlingern-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank -80 °C Platinum 550	Angelantoni Industrie (Massa Martana PG, Italien)
Inkubator BD 115 (60 °C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Inkubator CB 150 (37 °C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop CKX-31	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop CKX-41	Olympus (Hamburg, Deutschland)
PCR-Reader Mx3000P	Stratagene (San Diego, Kalifornien, USA)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
Plate-Reader GENios	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
Sicherheitswerkbank Biowizard	Kojair (Vilppula, Finnland)
Sicherheitswerkbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Spannungsquelle U-RFL-T	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Stickstoffbehälter MVE XC 47/11-6	german-cryo (Jüchen, Deutschland)
Vibrationsmischer 7-2020	neoLab (Heidelberg, Deutschland)

Wärmeplatte HI1220

Leica (Nussloch, Deutschland)

Wasserbad HI1210

Leica (Nussloch, Deutschland)

Zentrifuge 5415 D

Eppendorf (Wesseling, Deutschland)

Zentrifuge 5804 R

Eppendorf (Wesseling, Deutschland)

6. Methoden

6.1 Zellkultur

6.1.1 Gewinn und Charakterisierung primärer humaner adulter Chondrozyten

Die Durchführung der Versuche erfolgte mit humanen adulten Chondrozyten. Diese wurden von Patienten gewonnen, die sich einer operativen Behandlung in der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, am Universitätsklinikum des Saarlandes, unterzogen. Humane adulte normale Chondrozyten stammen aus dem femoralen Anteil des Kniegelenks. Die entsprechenden Gewebespenden erhielten wir von Patienten, die im Rahmen einer Tumoroperation eine Amputation des entsprechenden Gelenkanteils erfuhr. Humane adulte arthrotische Chondrozyten stammen ebenfalls aus dem femoralen Anteil des Kniegelenks. Die entsprechenden Gewebespenden erhielten wir von Patienten, die einen endoprothetischen Oberflächenersatz erhielten.

Die Charakterisierung der Knorpelspenden erfolgte mittels des Bewertungssystems nach Mankin. Anhand von mit Safranin-O/Echtgrün-gefärbten Gewebsschnitten wurden die Präparate in humane adulte normale Chondrozyten (Bewertungssystem nach Mankin 1-2) und humane adulte arthrotische Chondrozyten (Bewertungssystem nach Mankin 7-9) eingeteilt [96].

6.1.2 Isolation primärer humaner adulter Chondrozyten

Die Isolation der Chondrozyten erstreckte sich über 2 Tage. Am ersten Tag wurde der Knorpel mithilfe eines Skalpells in kleinen Stücken vom Knochen abgeschabt. Die so gewonnenen Anteile wurden mit DMEM gereinigt und mit 20 ml 0,2-prozentiger Kollagenaselösung mittels eines Sterilfilters auf die Knorpelstücke getropft.

Diese wurden daraufhin 24 Stunden bei Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden verbleibende Gewebsverbände mithilfe einer Glaspipette getrennt. Die entstandene Suspension wurde mit einem Nylonnetz (Porengröße 100 µm) filtriert.

Darauf folgte ein zweimaliges Zentrifugieren für 5 Minuten bei 1.500 rpm mit Verwerfen des Zentrates und sich anschließender Resuspension mit DMEM.

6.1.3 Kultivierung humaner adulter Chondrozyten

Die durch die Isolation gereinigten Zellen wurden unter Standardbedingungen in T-75 Zellkulturflaschen in 15 ml Standardmedium inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte 2 Tage später, mit sich anschließenden Wechseln alle 2 bis 3 Tage. In regelmäßigen Abständen wurden die Kulturen auf die Dichte ihrer Besiedlung in der Flasche hin kontrolliert. Bei einer Zellzahl $> 1 \times 10^6$ pro Kulturflasche wurden die Zellen auf 2 Kulturflaschen aufgeteilt, bei starkem Wachstum und einer Zellzahl $> 1,5 \times 10^6$ pro Kulturflasche auf 3 Kulturflaschen.

6.1.4 Pellet-Herstellung und Transduktion

Zur Herstellung der Pellets wurden Zellen zwischen Passage 1 und 7 verwendet. Nach Trypsinierung der Zellen wurden diese in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und je 200.000 Zellen in DMEM in eine 96-Well-Titerplatte mit U-Boden gegeben. Diese wurde dann bei 4 °C und 2.500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Darauffolgend wurde DMEM entfernt, 200 µl chondrogenes Medium zu den Zellen hinzugegeben und diese bei Standardbedingungen inkubiert. Nach etwa 24 Stunden bildete sich ein solides Pellet. Dieses wurde, im Falle einer angestrebten Transduktion, nach Abnahme des Mediums und Waschens mit DMEM, mit 20 bzw. 40 µl Vektorsuspension bedeckt und bei Standardbedingungen für 2 Minuten inkubiert. Auf das behandelte Pellet wurden in der Folge 80 bzw. 60 µl chondrogenes Medium gegeben. Analog dazu wurden nicht-behandelte Pellets mit 100 µl chondrogenem Medium bedeckt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1,5 Stunden, ebenfalls unter Standardbedingungen, wurden abermals 100 µl chondrogenes Medium auf die Pellets gegeben, die dann über 24 Stunden bei Standardbedingungen inkubiert wurde. Nach dieser Zeit erfolgte der erste Mediumwechsel, mit sich anschließenden Mediumwechseln alle 2 bis 3 Tage.

6.1.5 Knorpelgewebe-Analogon-Herstellung und Transduktion

Aus dem Ausgangsgewebe wurden die Chondrozyten nach Standardprotokoll isoliert und eine Zellzahl von 1×10^6 abgezählt. Anders als bei der Herstellung von Pellets wurden ausschließlich frisch isolierte Chondrozyten verwendet. Die darauffolgenden Arbeitsschritte liefen jedoch analog zur Pellet-Herstellung, bis einschließlich der 1,5-stündigen Inkubation ab. Im Falle einer

Vektortransduktion wurden bei den Knorpelgewebe-Analoga jedoch 100 μ l Vektor-Lösung verwendet. Das verbliebene Pellet wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in 150 μ l Knorpelgewebe-Analoga-Medium resuspendiert. Die auf diese Weise entstandene Zellsuspension wurde in eine 96-Well-Titerplatte mit *Ultra-low Attachment Surface* gegeben. Diese wurde 15 Minuten zuvor mit 50 μ l Knorpelgewebe-Analoga-Medium beimpft und bei Standardbedingungen inkubiert, um die Wirkung der Hydrogelbeschichtung der Platte zu optimieren. Es erfolgte daraufhin die Inkubation unter Standardbedingungen. Die Mediumwechsel fanden an Tag 1 und Tag 2 nach Herstellung jeweils zur Hälfte statt. In den darauffolgenden Tagen wurden die Mediumwechsel abhängig von der Farbe des selbigen vollzogen. Zwischen Tag 5 und Tag 7, nachdem makroskopisch ein fester Zellverband zu erkennen war, wurde das Medium vollständig gewechselt. Über den weiteren Verlauf der Experimente fand dann alle 2 Tage ein kompletter Mediumwechsel statt.

6.2 Herstellung von rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren

Die im Zuge dieser Dissertation vervielfältigten und verwendeten Vektorsysteme bzw. deren Plasmide entstammen dem Virus pSSV9, einem genomischen Klon des AAV-2 [97]. rAAV-*lacZ*, ein Gen des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*), kodiert für das Protein β -Galactosidase (kurz: β -Gal) [98, 99]. rAAV-*RFP* trägt die Gensequenz für das gleichnamige *RFP* (*red fluorescent protein*) der Seeanemone *Discosoma sp.* [100]. rAAV-FLAG-*hsox9* enthält die 1,7 kB lange Sequenz FLAG-*hsox9* (humanes *sox9*), die mit dem Protein-Tag FLAG versehen ist [101]. Sowohl rAAV-*RFP* als auch rAAV-FLAG-*hsox9* sind Klone des rAAV-*lacZ*, in denen die *lacZ*-Sequenz durch die entsprechend andere ausgetauscht wurde. Alle drei Gensequenzen werden über die Promotorsequenz CMV-IE reguliert [98].

6.2.1 Packaging und Amplifikation

Das *Packaging* aller verwendeten rAAVs wurde auf konventionelle Weise mit Zellen der Zelllinie 293 vollzogen. Bei diesen Zellen handelt es sich um sog. HEK-Zellen („*human embryonic kidney cells*“, alternativ als 293-Zellen bezeichnet), humane embryonale und immortalisierte Nierenzellen. Ermöglicht wurde die Transfektion durch das *Packaging*-Plasmid pXX2 und das adenovirale Helfer-Plasmid pXX6 [102, 103].

Die Amplifikation der Plasmid-DNS erfolgte in *E. coli* Bakterien (Stamm DH 5 α). Anschließend erfolgte die Übertragung der Bakteriensuspension auf Selektionsplatten. Aufgrund der Ampicillin-Resistenz der Plasmide wuchsen diese lediglich auf dem entsprechenden Nährboden. Zur Gewinnung der Plasmid-DNS wurde das *Endo Free Plasmid Maxi Kit* gemäß der Herstellerangaben verwendet. Es erfolgte die Denaturierung der vorhandenen DNS mit anschließender Renaturierung der Plasmide. Diese wurden dann isoliert, aufgereinigt und in der Konzentration 1 μg DNS/1 μl aqua bidest. bei -80 °C konserviert. Die Titration durch eine Echtzeit-PCR ergab eine Konzentration von durchschnittlich 10^{10} Transgenkopien pro ml bei einem Verhältnis von der absoluten Viruspartikel zu funktionalen Vektoren von 500 zu 1 [62, 101, 104, 105].

6.2.2 Multiplizität der Infektion im Pellet

Die Multiplizität der Infektion, im Folgenden MOI („multiplicity of infection“) genannt, beschreibt den Quotienten aus funktionalen rekombinanten Viruspartikel Zellzahl des Pellets:

$$MOI = \frac{\text{Anzahl der funktionalen Vektoren}}{\text{Zellzahl}}$$

Bei den verwendeten Viruspartikeln (1×10^{10} Viruskopien und einem Verhältnis der absoluten Viruspartikel zu funktionalen Vektoren von 500 zu 1) ergibt sich demnach eine MOI von 2 für die Vektordosierung 20 μl und eine MOI von 4 für die Vektordosierung 40 μl [98].

6.2.3 Multiplizität der Infektion im Knorpelgewebe-Analog

Analog zu der Berechnung der MOI für Pellets ergibt sich für das Knorpelgewebe-Analog bei einer Zellzahl von 1×10^6 eine MOI von 1 für die Vektordosierung 50 μl und eine MOI von 2 für die Vektordosierung 100 μl .

6.3 Nachweis der Transgenexpression

6.3.1 Optische Nachweisverfahren

6.3.1.1 X-Gal-Färbung

Für den optischen Nachweis der *lacZ*-Transgenexpression verwendeten wir das *X-Gal staining kit*. Die Herstellung der entsprechenden Lösung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die durch das Transgen exprimierte β -Galactosidase (X-Gal) hat, anders als die im Menschen vorkommende Variante, eine optimale enzymatische Aktivität bei einem pH von 7,0 bis 7,5. So kommt es zu einem gezielten Nachweis von Proteinen der Transgenexpression. Durch das Aufspalten von X-Gal entsteht mit anschließender Dimerisierung und Oxidation entsteht der blaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, nicht erfolgreich transduzierte Zellen oder Kontrollgewebe behielten ihre ursprüngliche Farbe [106]. Die Intensität der Färbung erhöht sich im Verlauf der Anwendung. Bei zeitgleicher Applikation lassen sich jedoch Rückschlüsse auf die Zahl transduzierter Zellen bzw. die Effektivität der Genexpression ziehen.

Vor der Behandlung der Pellets bzw. Knorpelgewebe-Analoga wurden selbige mit PBS für 15 Minuten gewaschen. Nach zweimaligem spülen mit PBS wurde die Färbelösung auf die Zellen gegeben. Das Ergebnis der Färbung wurde alle 15 Minuten überprüft. Bei intensiver Färbung der transduzierten Zellen und noch nicht eingetretener Färbung des Kontrollgewebes wurde die Färbelösung gegen PBS getauscht, um Färbeartefakte zu minimieren und bei der Anfertigung der makroskopischen Bilder einen möglichst großen Kontrast zu erzielen.

6.3.1.2 Beta-Glo[®]-Test

Als zusätzliches Mittel zum optischen Nachweis der Transduktion durch rAAV-*lacZ* verwendeten wir den Beta-Glo[®]-Test und führten dieses gemäß den Herstellerangaben durch. Bei dieser Untersuchung vermittelt die β -Galactosidase in einem ersten Schritt die Reaktion von β -Galactopyransoyl-Luciferin zu D-Luciferin, das dann, katalysiert durch das Enzym *firefly luciferase*, unter der Anwesenheit von Sauerstoff zu Oxyluciferin reagiert. Hierbei kommt es zu der Emission von Lichtsignalen [107]. Dieses wurde mit unserem Plate-Reader gemessen, die Signalstärke wird in diesem Fall als Relative Lichteinheit (RLU) angegeben und beschreibt die von dem Gerät gezählten Photonen pro Sekunde. Somit besteht ein direkter Zusammenhang

zwischen emittierten Photonen und der Menge an X-Gal, das zur Initiierung der Reaktion benötigt wird.

6.3.1.3 Fluoreszenzmikroskopie - RFP

Zum optischen Nachweis der *RFP*-Transgenexpression verwendeten wir die Fluoreszenzmikroskopie (Olympus CKX41) mit einem Filter für Licht der Wellenlänge 568 nm und somit nahe an der maximalen Emission von 583 nm [108]. Unter diesen Bedingungen leuchteten transduzierte Zellen rot. Eine Intensivierung des Signals spricht für eine erhöhte Genexpression [109]. Die Gewebe wurden in regelmäßigen Abständen hinsichtlich ihrer Leuchtintensität im Vergleich zum Kontrollgewebe überprüft.

6.3.2 Zellviabilität - WST-1-Test

Um die Zellviabilität in Kultur anhand der Atmungskette zu überprüfen und diese über den Verlauf des Experiments dazustellen, verwendeten wir den WST-1-Test. Die Versuche führten wir nach Herstellerangaben durch. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase wird bei diesem Test durch eine Redox-Reaktion validiert, bei der WST-1 zu dem roten Farbstoff Formazan reduziert wird [110, 111]. Die Messung wurde mit unserem Plate-Reader durchgeführt, wobei sich die Signalstärke analog zum umgesetzten Farbstoff und somit zur Zahl der lebenden Zellen verhält.

Zur Durchführung des Tests wurden die Pellets in eine frisch geöffnete 96-Well-Titerplatte mit flachem Untergrund gegeben. Überschüssiges Medium wurde entfernt und die WST-1-Lösung hinzugegeben. Die Messung der Absorbanz (Extinktion) bei 440 nm erfolgte zwischen Minute 5 und 180. Zwischen den Messungen wurden die Pellets bei Standardbedingungen inkubiert. Spätere Messpunkte wurden aufgrund toxischer Effekte des WST-1 nicht durchgeführt [112].

6.3.3 Biochemische Nachweisverfahren

Wie eingangs beschrieben, hat sich Typ-II-Kollagen als zuverlässiger Indikator für gesundes Knorpelgewebe erwiesen, während Typ-I- und Typ-X-Kollagen vor allem Hypertrophie-, Kalzifizierungs- und Ossifikationsmarker darstellen. Entsprechend testeten wir unsere Proben auf diese etablierten Parameter unter dem Gesichtspunkt der Transgenbehandlung.

6.3.4 Papain-Verdau

Den biochemischen Nachweisverfahren der Transgenexpression steht der Verdau der entsprechenden Proben mit Papain voran. Bei diesem etablierten Verfahren greift das Enzym insbesondere die Aminosäuren Arginin und Lysin an, sodass die Proteine an dieser Stelle aufgetrennt, die restlichen Peptidbindungen jedoch erhalten bleiben [113]. Somit wird die Zahl der Proteine nicht wesentlich beeinflusst und kann in sich anschließenden Testverfahren evaluiert werden.

Die Proben wurden nach Ablauf des Experiments, in unserem Fall an Tag 21, mit Tagen mit je 150 μ l Papain-Lösung versetzt. Dem schloss sich eine Inkubation bei 60 °C über mindestens 60 Minuten an. Während dieser Zeit wurde die Probe in regelmäßigen Abständen mit dem Vortexmischer behandelt bis keine sichtbaren Zellakkumulationen mehr vorhanden waren. Bis zu den entsprechenden biochemischen Analysen wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

6.3.5 BCA-Test

Der BCA-Test wurde verwendet, um die Menge an Gesamtprotein der Proben abzuschätzen und somit Rückschlüsse, sowohl auf die Zahl der proteinproduzierenden Zellen als auch deren aktive Proteinproduktion, zu ziehen. Zudem sollte eine Normierung für die darauffolgenden Messmethoden erfolgen, um Messfehlern durch abweichende Zellzahlen oder unvollständigen Papain-Verdau entgegenzuwirken. Bei der sog. Biuret-Reaktion mit BCA wird Cu^{2+} durch Komplexierung mit Peptidbindungen zu Cu^{1+} reduziert. Dieses bildet dann mit BCA einen 2:1-Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt [114]. Dieses wurde photometrisch gemessen. Mit diesem Wert ist die indirekte Bestimmung des Gesamtproteins möglich. Wir führten den Test mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* gemäß den Herstellerangaben durch.

6.3.6 Hoechst 33258 Test

Der Hoechst 33258 Test wurde verwendet, um die proliferativen Eigenschaften der Zellen anhand des DNS-Gehalts zu überprüfen. Hoechst 33258 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen initiale Lichtemission durch die Interaktion mit DNS-Sequenzen mit erhöhtem Vorkommen (mind. 4 aufeinanderfolgende Basenpaare) der komplementären Basenpaare Adenin und Thymin verstärkt wird [113, 115, 116]. Diese Signalverstärkung wurde mithilfe einer Fluoreszenz-

spektroskopie ausgewertet. Unter Berücksichtigung des Gesamtprotein-Gehaltes der Zelle erfolgten Rückschlüsse auf den DNS-Gehalt der Proben und somit etwaige mitogene Auswirkungen des Gentransfers.

Zur Durchführung des Tests wurde Hoechst 33258 Ursprungslösung direkt vor Anwendung im Verhältnis (1:500) mit TRIS-Puffer verdünnt. Thymus-DNS vom Kalb („*DNA sodium salt from calf thymus*“), mit einer Konzentration von 2 mg/ml, wurde in PBE-Puffer im Verhältnis 1:1 angesetzt. Anschließend erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung, nach der die Lösung mittels PBE-Puffer auf 10 µg/ml verdünnt wurde. Konsekutiv wurde diese Verdünnung im Bereich 0 bis 200 ng pro 100 µl TEN-Puffer in eine schwarze 96-Well-Titerplatte gegeben. Von den zuvor mit Papain verdauten Proben wurden je 1 µl mit 90 µl TEN-Puffer vermischt. Sowohl Proben als auch Standards wurden in Hoechst 33258 1:500 resuspendiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm.

6.3.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Typ-II-Kollagen wurde mittels „*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*“ (ELISA) quantifiziert. In den beschriebenen Fällen verwendeten wir den entsprechenden Sandwich-ELISA der Firma Cusabio. Bei diesem Verfahren wird Typ-II-Kollagen von Antikörpern der entsprechend beschichteten 96-Well-Titerplatte gebunden. Nach einem Waschgang werden Biotin-konjugierte, Typ-II-Kollagen-spezifische Antikörper auf die gebundenen Proteine gegeben, die ebenfalls an das Antigen binden. Nach einem weiteren Waschgang wird durch die Avidin-konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP) hinzugegeben, die an Avidin bindet. Durch Hinzugabe von TMB und dessen Oxidation kommt es zu einem Farbumschlag, der nach Applikation der Stopp-Lösung quantitativ ausgewertet werden kann. Aufgrund der Instabilität von HRP unter Licht empfiehlt es sich, die letzten Arbeitsschritte unter möglichst lichtarmen Bedingungen zu vollziehen [117, 118]. Die ELISA-Messungen zur Detektion wurden gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte mit Verdünnungsfaktor 5, 21,6 µl Papain-Verdau wurden mit 86,4 µl Verdünnungsmittel des Herstellers versetzt. Das gleiche Verdünnungsmittel wurde auch zur Herstellung des Standards verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte binnen 5 Minuten nach Applikation der Stopp-Lösung bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 540 nm).

6.3.8 Echtzeit-RT-PCR

Die Polymerasekettenreaktion („*Polymerase Chain Reaction*“, PCR) ist eine etablierte molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung und zum Nachweis von DNS. Bei diesem Verfahren wird die initial als Doppelstrang vorliegende DNS über Hitze (95 °C) in 2 Einzelstränge aufgespalten. Daran schließt sich das sog. „*primer annealing*“ an, spezielle Oligonukletide binden an die nachzuweisenden Basensequenzen (55 °C). Durch die hitzestabile Polymerase des Bakteriums „*Thermus aquaticus*“, der Taq-Polymerase, wird bei 72 °C an den ursprünglichen DNS-Strängen der Komplementär-Strang synthetisiert (= Elongation). So kommt es bei bspw. 20 Reaktionszyklen des ursprünglichen Einzelstranges zu einer 2^{20} (10^6)-fache Amplifizierung [119].

Anders als bei dem beschriebenen Verfahren wird bei der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) die Prozessierung von mRNA zu cDNS der eigentlichen PCR vorangestellt [120, 121]. Diese wird durch die reverse Transkriptase, in diesem Fall gewonnen aus aviärem Myeloblastose-Virus (AMV), in cDNS umgewandelt. An diese lagert sich ein entsprechender Primer an, um die cDNS analog zur gewöhnlichen PCR zu amplifizieren. Für unser Verfahren verwendeten wir Primer, welche sich unspezifisch an die mRNA anlagern, um so ein Maximum an cDNS zu synthetisieren. Die Quantifizierung der im zweiten Schritt amplifizierten cDNS erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green [122]. Die Intensität der Färbung wird an dem sog. „*cycle threshold*“ (Ct-Wert) gemessen, der Anzahl an Zyklen, die benötigt werden, um den festgelegten Fluoreszenz-Wert zu überschreiten. Je geringer dieser Wert ausfällt, desto höher ist die entsprechende Menge an DNS [123]. Die so entstandenen Messwerte wurden mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode quantifiziert, für die ein nicht reguliertes, ubiquitär und homogen exprimiertes „*Housekeeping-Gen*“ GAPDH, verwendet wurde [120, 124]. Im ersten Schritt dieser Rechen-Methode wurde der der GAPDH-Ct-Wert vom Ct-Wert des Zielgens abgezogen ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{(\text{Zielgen})} - \text{Ct}_{(\text{GAPDH})}$). Im zweiten Schritt wurde der errechnete ΔCt der Kontrolle von dem errechneten ΔCt der transduzierten Probe subtrahiert (Beispiel: ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{(\text{sox9})} - \Delta\text{Ct}_{(\text{Kontrolle})}$). Als letzter Schritt wurde $\Delta\Delta\text{Ct}$ in die Formel $x = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt. Der so erhaltene Wert gibt die relativ gemessene DNS-Menge in den transduzierten Zellen in Relation zu den Zellen der Kontrollgruppe wieder. [125].

Die RNS-Isolation wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* gemäß Protokoll durchgeführt. Nach Zerkleinerung der Pellets mittels beiliegendem „*QIAshredder*“ und Zugabe von Ethanol, wurde die entstandene Lösung auf die Säulen des *Kits* gegeben. Die RNS-Bindung erfolgte in einer Silika-Matrix, die selbst positiv geladen ist und so die negativ geladene RNS koppelt. Ein

DNase-Verdau sowie mehrere sich anschließende Waschschriffe, dienen der Elimination übriggebliebener DNS sowie anderer Verunreinigungen. Durch Hinzugabe von RNase-freiem Wasser wurde die gekoppelte RNS aus der Silika-Matrix wieder gelöst und sammelte sich am Boden des Reaktionsgefäßes [126].

Die Synthese der cDNS durch RT-PCR wurde mit dem *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* durchgeführt. Die anschließende Echtzeit-RT-PCR erfolgte mit dem Mx3000P qPCR Cycler und wurde mit je 2 µl cDNS, 50 µl SYBR Green qPCR Master Mix und 150 nM Primer (Tab. 4 Primer) durchgeführt. Die Arbeitsschritte gliederten sich bei der PCR wie folgt: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 10 Minuten; 55 Zyklen Amplifikation (Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden; Annealing bei 55 °C für 60 Sekunden; Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden), abschließende Denaturierung bei 95 °C für 60 Sekunden, finale Inkubation bei 55 °C für 30 Sekunden.

6.4 Histologische Nachweisverfahren

6.4.1 Fixierung und Entwässern

Nach Ablauf der Experimente wurden die Pellets bzw. Knorpelgewebe-Analoga histologisch aufgearbeitet. Hierzu war im ersten Schritt das Einbetten der Proben in Paraffin notwendig. Am ersten Tag wurden die Gewebe nach Absaugen des Mediums mit PBS gespült, und – nachdem dieses wiederum entfernt wurde – mit 4 % Formaldehyd bei Raumtemperatur für mind. 12 Stunden inkubiert. Am Tag 2 wurde das Gewebe nach zweimaliger Wäsche mit PBS mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 60 Minuten 70 %, 80 %, 2x 95 %, 2x 100 % EtOH bei Raumtemperatur) entwässert. Daran schloss sich eine Behandlung mit reinem Xylol an (2x 30 Minuten bei RT), gefolgt von einem Xylol/Paraffin-Gemisch (Verhältnis 1:1) für 60 Minuten im Wärmeschrank (62 °C). Danach wurden die Gewebe in reines Paraffin überführt und für mindestens 12 Stunden im Wärmeschrank belassen.

6.4.2 Einbetten und Schneiden

Am dritten Tag wurden die Zellen abermals für 60 Minuten in reines Paraffin überführt und bei 62 °C inkubiert. Die Gewebe wurden im Anschluss in einer Metallschale platziert, mit einer Plastikkassette abgedeckt und mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Bei -20 °C für 12 Stunden

wurde der Paraffinblock ausgehärtet. Mittels Rotationsmikrotom wurden die histologischen Schnitte in 3 µm Dicke bei Pellets und 5 µm Dicke bei Knorpelgewebe-Analoga angefertigt. Die Paraffin-Scheiben wurden in 24 °C warmes Wasser überführt, um Unebenheiten auszugleichen und danach auf *SuperFrost Plus* Objektträger aufgebracht. Diese wurden auf einer Wärmeplatte bei 42 °C für 60 Minuten und anschließend für mind. 8 Stunden im Wärmeschrank gelagert, um vollständig auszuhärten.

6.4.3 Safranin-O/Echtgrün-Färbung

Bei dem im Folgenden als Safranin-O-Färbung beschriebenen Verfahren handelt es sich um eine kombinierte Färbung der Farbstoffe Safranin-Orange und Echtgrün. Der Farbstoff Safranin-Orange bindet an die kationischen Glucosaminoglykane (GAGs) der Proteoglykane und bietet so einen quantitativen Nachweis selbiger durch eine orange-rote Färbung [127]. Der Farbstoff Echtgrün ist selbst kationisch und bindet entsprechend an basische Strukturen, so zum Beispiel Proteine des Zytoplasmas. Es kommt zu einer Grünfärbung entsprechender Strukturen [128].

Die histologischen Schnitte wurden zuerst mit Xylol (2x 5 Minuten bei Raumtemperatur) und einer sich anschließenden absteigenden Alkoholreihe (2x 2,5 Minuten 100 %, 2x 2,5 Minuten 95 % und 2,5 Minuten 80 % EtOH bei Raumtemperatur) entparaffiniert und aufgewässert. Daran schloss sich eine zehnmünütige Hämatoxylin-Behandlung an, es folgte ein Waschen der Schnitte mit H₂O. Hiernach wurden die Proben für 5 Minuten mit Echtgrün behandelt, gefolgt von dreimaligem Eintauchen in Essigsäure 1 %. Die Schnitte wurden daraufhin 25 Minuten mit Safranin-Orange-Lösung behandelt und anschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (2, 5 Minuten 80 %, 2x 95 %, 2x 100 % EtOH bei Raumtemperatur) und einer anschließenden Behandlung mit Xylol dehydriert (2x 5 Minuten bei Raumtemperatur). Abschließend wurde das Präparat mit dem *Roti-Histokitt II* und einem Deckglas eingedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

6.4.4 Toluidinblau-Färbung

Toluidinblau ist ein azidophiler, metachromatischer Farbstoff. Bindet er an saure Strukturen, wie beispielsweise DNS oder RNS, kommt es zu einer bläulichen Färbung. Bei der Bindung an komplexere Strukturen mit Molekülen unterschiedlicher Ladungen kommt es zu einer metachromatischen Verfärbung, so z. B. zu einer Lilafärbung von Glucosaminoglykanen [129,

130]. Die Entparaffinierung und Rehydratation erfolgten wie unter Punkt 6.4.3 bereits beschrieben. Anschließend wurde 200 µl Toluidinblau auf die Objektträger gegeben und diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer Nasskammer inkubiert. Die anschließende Dehydratation mittels aufsteigender Alkoholreihe und das Eindecken der Präparate erfolgte wie unter Punkt 6.4.3 beschrieben.

6.4.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Kombinationsfärbung der beiden Stoffe Hämatoxylin und Eosin. Durch den Farbstoff Hämatoxylin werden basophile Strukturen, wie beispielsweise DNS oder Zellkerne, blau-violett gefärbt. Der Farbstoff Eosin hingegen reagiert mit azidophilen Strukturen, so z. B. azidophilen Proteinen des Zellplasmas, Kollagen und Keratin und färbt diese rot-orange [131]. Die Entparaffinierung und Rehydratation erfolgten wie unter Punkt 6.4.3 bereits beschrieben. Daran schloss sich eine 10-minütige Behandlung mit Hämatoxylin-Lösung an, gefolgt von einem dreimaligen Waschen durch Eintauchen in H₂O und schließendes Eintauchen für 10 Sekunden in 1-%iger Salzsäure. Nach einer 4-minütigen Inkubation in H₂O bei 60 °C wurden die Schnitte abermals für 2,5 Minuten mit Hämatoxylin-Lösung behandelt und dreimalig mit H₂O gewaschen. Daran schloss sich eine Färbung mit Eosin-Lösung für 30 Sekunden an, gefolgt von einer Spülung in H₂O für 10 Sekunden. Die Dehydratation und das anschließende Eindecken der Präparate erfolgte wie unter Punkt 6.4.3 beschrieben.

6.4.6 Immunhistochemische Verfahren

Ähnlich dem Kollagennachweis durch ELISA wird bei der immunhistochemischen Färbung die HRP-Reaktion genutzt, um entsprechende Molekülkonzentrationen per Farbreaktion sichtbar zu machen. Dazu werden zwei unterschiedliche IgG Antikörper der Maus verwendet, im Folgenden spezifisch für Type-II- und -X-Kollagen und SOX9, an die wiederum biotinylierte, Maus-IgG-spezifische Antikörpern binden. Im Verlauf des Färbe-Verfahrens reagieren diese mit Avidin-HRP, das seinerseits wiederum mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) reagiert, wodurch es zu einer bräunlichen Färbung kommt, deren Intensität analog zur Menge an Kollagen ist [132].

6.4.6.1 Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie

Die Entparaffinierung und Rehydratation erfolgten wie unter Punkt 6.4.3 bereits beschrieben. Daraufhin wurde das Präparat zweimal für jeweils 60 Sekunden in Leitungswasser gewaschen und anschließend in „Wasserstoff-Peroxid-Lösung“ für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten zwei Waschgänge in PBS für je 5 Minuten mit einer anschließenden Inkubation der Proben in 0,1-%igem Trypsin für 10 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank. Nach zwei weiteren, wie vorrangegangen beschriebenen Waschgängen, wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur im „Blockierungspuffer“ inkubiert. Die Präparate wurden anschließend ohne Waschgang mit 200 µl Antikörperlösung „Anti-Typ-II-Kollagen“ (vgl. Tabelle 4), bestehend aus Antikörper und Blockierungspuffer im Verhältnis 1:45, beimpft und 60 Sekunden bei Raumtemperatur in der Nasskammer inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Schnitte abermals für 2x 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit einer Lösung, bestehend aus dem biotinylierten Anti-Maus-IgG (vgl. Tabelle 4) und PBS im Verhältnis 1:200, beimpft. Applikation und Inkubation erfolgten analog zum ersten Antikörper. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten mit PBS mit sich anschließender Draufgabe des „ABC-Reagenz“ auf die Objektträger und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Abermals wurden die Präparate im Anschluss in 3x 5 Minuten PBS gewaschen und danach mit „DAB-Lösung“ versehen und für 7 Minuten bei Raumtemperatur, unter Berücksichtigung der Färbeintensität, inkubiert. Analog zu dem vorrangegangenen Waschgang wurde dieser abermals durchgeführt und das Präparat anschließend 60 Sekunden in H₂O gewaschen. Die abschließende Dehydratation und das Eindecken erfolgte wie unter Punkt 6.4.3 beschrieben.

6.4.6.2 Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie

Die Entparaffinierung, Rehydratation sowie die Arbeitsschritte, die unter Punkt 6.4.3 beschrieben werden, sind identisch mit denen der Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie. Abweichend wurde bei der ersten Antikörperlösung ein Gemisch aus „Anti-Typ-X-Kollagen“ (vgl. Tabelle 4) und Blockierungspuffer im Verhältnis 1:50 hergestellt. Die zweite Antikörperlösung bestand aus dem biotinylierten Anti-Maus-IgG und PBS im Verhältnis 1:200.

6.4.6.3 SOX9-Immunhistochemie

Die Entparaffinierung, Rehydratation sowie die Arbeitsschritte, die unter Punkt 6.4.3 beschrieben werden, sind identisch mit denen der Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie. Abweichend

wurde bei der ersten Antikörperlösung ein Gemisch aus „Anti-SOX9“ (vgl. Tabelle 4) und Blockierungspuffer im Verhältnis 1:50 hergestellt. Die zweite Antikörperlösung bestand aus dem biotinylierten Anti-Maus-IgG und PBS im Verhältnis 1:200.

6.5 Kriterien zur histologischen Evaluation

Die Bewertung aller histologischen Präparate erfolgte verblindet und wurde von zwei Personen (Oliver Daniels und Dr. Jagadeesh K. Venkatesan), unabhängig voneinander, durchgeführt. Für jedes Gewebe erfolgte eine Anfertigung von 10 Gewebsschnitten pro zu überprüfendem Parameter und Auswertungsmethode. Die Auswertung erfolgte mit den unter Punkt 5.9 genannten Programmen.

6.5.1 Evaluation der immunhistochemischen Verfahren

Zur Bewertung der Immunreaktivität der Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie sowie der SOX9-Immunhistochemie, wurde computergestützt der Prozentsatz reaktiver Zellen ermittelt [133]. Die Auswertung der histologischen Schnitte und Anfertigung von Bildern zur weiteren Untersuchung erfolgte in 20-facher Vergrößerung mittels Lichtmikroskopie. Evaluiert wurden je 4 Sektionen eines Pellets, jeweils eines pro Quadrant [99, 101, 133-135].

6.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde näherungsweise mithilfe der HE-Färbung bestimmt. Histologische Gewebsschnitte wurden lichtmikroskopisch bei 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Pellets wurden in mehrere definierte Abschnitte unterteilt, durch o. g. Verfahren erfolgte die näherungsweise Berechnung der Zellen pro mm².

6.5.3 Evaluation der Färbequalität

Zur Bewertung der Färbequalität sowohl der Safranin-O/Echtgrün-Färbung als auch der Immunreaktivität der Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie wurde eine modifizierte Version des Bern-Bewertungssystems verwendet. Dieses bewertet das Präparat unter den Gesichtspunkten Homogenität und Intensität mithilfe des nachfolgend angegebenen Punktesystems [86,

136]. Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte in 10-facher Vergrößerung mittels Lichtmikroskopie.

Tabelle 9: Modifiziertes Bern-Bewertungssystem

Punkte	Färbequalität
0	Keine Färbung
1	Heterogene und/oder schwache Färbung
2	Homogene und/oder moderate Färbung
3	Homogene und/oder intensive Färbung
4	Sehr intensive Färbung

Das modifizierte Bern-Bewertungssystem dient zur Bewertung histologischer Gewebsschnitte auf Grundlage der Färbequalität. Bei möglichen 0-4 Punkten bedeutet eine höhere Punktwertung eine höhere Qualität der Färbung.

6.5.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der erhobenen Werte erfolgte mittels t-Test unter Zuhilfenahme des Programms Microsoft Excel 2013 (Redmond, Washington, USA). P-Werte kleiner oder gleich 0,05 wurden als signifikant bezeichnet.

7. Ergebnisse

Die in diesem Abschnitt in Tabellen und Abbildungen als „Kontrolle“ deklarierten Werte oder Bilder sind als Chondrozyten, in gleich welcher Organisationsform aggregiert, zu verstehen, die im Rahmen des jeweiligen Experiments keine Behandlung mit einem rAAV erhielten. Werte oder Bilder, welche mit rAAV-*lacZ* oder rAAV-FLAG-*hsox9* markiert sind, beziehen sich auf Chondrozyten, in gleich welcher Organisationsform aggregiert, die im Rahmen des jeweiligen Experiments eine Behandlung mit dem entsprechenden rAAV erhielten. Bei Dosisunterschieden ist die jeweilige Dosierung des Vektors in Klammern angegeben. Bei Ausbleiben einer Deklaration ist die Dosierung 40 μl für Pelletkulturen und 100 μl für Knorpelgewebe-Analogakulturen anzunehmen.

7.1 Pelletkulturen – Studienarm A

Der Studienarm A beschäftigt sich mit der Evaluation der Abhängigkeit zwischen applizierter Vektordosis und gemessener Transgenexpression. Statistisch signifikante Werte ($p \leq 0,05$) sind in den Unterkapiteln 7.1.1 bis 7.1.3 wie folgt gekennzeichnet: *bei einer Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe, *bei einer Signifikanz der mit 40 μl rAAV-*lacZ*-transduzierten Gruppe gegenüber der mit 20 μl rAAV-*lacZ*.

Die Bezeichnungen rAAV-*lacZ* (20/40 μl) und *lacZ* (20/40 μl) sind in den Unterkapiteln 7.1.1 bis 7.1.3 als Synonym anzusehen. Die Bezeichnungen rAAV-*RFP* (20/40 μl) und *RFP* (20/40 μl) sind in den Unterkapiteln 7.1.1 bis 7.1.3 als Synonym anzusehen. Die Durchführung der Experimente der Unterkapitel 7.1.1 bis 7.1.2 erfolgte in dreifacher Ausführung. Somit wurden pro möglicher Behandlungsart 3 Pellets zur jedem Messzeitpunkt getestet. Bei dem Experiment des Unterkapitels 7.1.3 erfolgte eine vierfache Ausführung der möglichen Behandlungsarten. Diese Pellets wurden über den gesamten Zeitraum des Experiments untersucht.

7.1.1 Direkte β -Galactosidase-Nachweise

7.1.1.1 X-Gal-Färbung

Die X-Gal-Färbung wurde wie unter 6.3.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Färbung der Pellets zeigte makroskopisch zum einen eine Abhängigkeit in der Vektordosierung, wobei eine höhere Dosis zu einer intensiveren Blaufärbung führt. Zum anderen bestand ein Unterschied der Farbtintensität zwischen humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten, wobei letztgenannte eine intensivere Blaufärbung aufwiesen. Darüber hinaus unterschieden sich die jeweiligen Messpunkte voneinander, an Tag 2 lag eine höhere X-Gal-Aktivität vor.

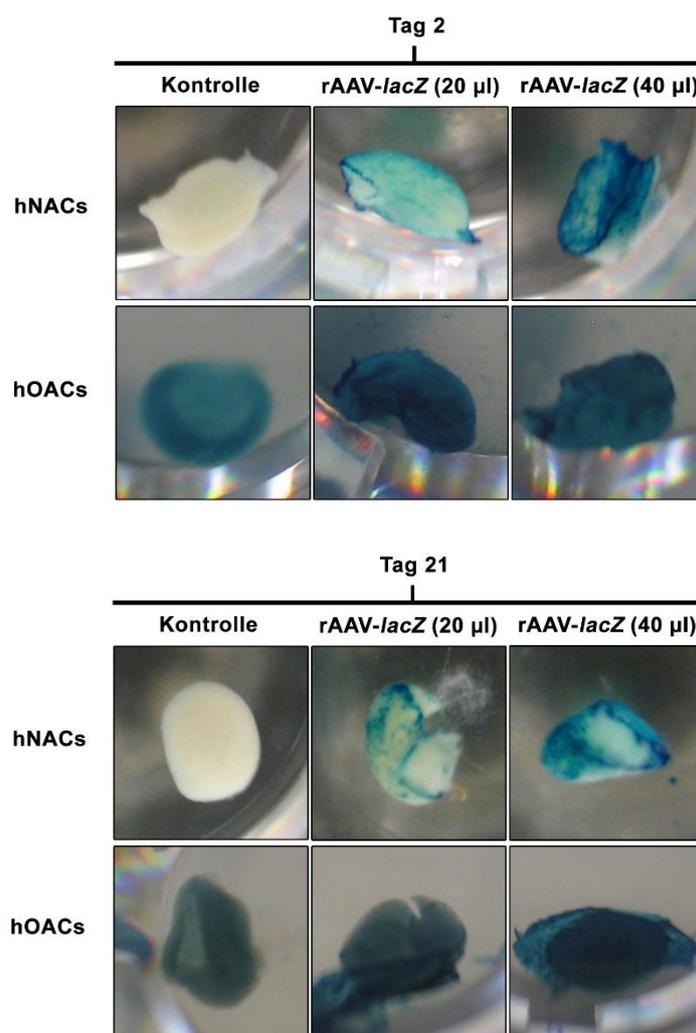


Abbildung 11: Repräsentative X-Gal-Färbung kompletter Pellets. Gezeigt sind die Zeitpunkte Tag 2 und 21. Eine intensivierte Blaufärbung spricht für eine erhöhte β -Galactosidase-Expression. lacZ: β -Galactosidase-Gen; hNACs: humane adulte normale Chondrozyten; hOACs: humane adulte arthrotische Chondrozyten.

7.1.1.2 Beta-Glo[®]-Test

Der Beta-Glo[®]-Test wurde wie unter 6.3.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Messungen zeigten eine deutlich erhöhte X-Gal Expression der transduzierten Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine Erhöhung der Vektordosis bedingte eine stärkere Genexpression. Sowohl die Unterschiede zwischen den beiden transduzierten Gruppen und der Kontrollgruppe waren statistisch relevant ($p \leq 0,005$) als auch die Unterschiede innerhalb der transduzierten Gruppen im Hinblick auf die erhöhte Vektordosierung ($p \leq 0,05$). Darüber hinaus fanden sich statistisch signifikante Unterschiede in der Transgenexpression beim Vergleich der humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten für Tag 21 sowohl bei 20 μl ($p \leq 0,005$) als auch bei 40 μl ($p \leq 0,05$) des Vektors.

Tabelle 10: Ergebnisse des Beta-Glo[®]-Tests

Tag 2		humane adulte Chondrozyten				
		normal			arthrotisch	
	Kontrolle	lacZ 20 μl	lacZ 40 μl	Kontrolle	lacZ 20 μl	lacZ 40 μl
RLU	876	10.533	21.076	881	11.779	22.865
	(± 203)	(± 2.673)*	(± 577)*,+	(± 148)	(± 319)*	(± 2.949)*,+
P-Wert Kontrolle		0,018	$\leq 0,001$		$\leq 0,001$	0,004
P-Wert lacZ 20 μl			0,016			0,017

Tag 21		humane adulte Chondrozyten				
		normal			arthrotisch	
	Kontrolle	lacZ 20 μl	lacZ 40 μl	Kontrolle	lacZ 20 μl	lacZ 40 μl
RLU	897	7.168	12.787	1.614	13.787	16.384
	(151)	(965)*	(1.135)*,+	(792)	(811)*	(296)*,+
P-Wert Kontrolle		0,006	0,002		0,002	$\leq 0,001$
P-Wert lacZ 20 μl			0,017			0,026

Der Beta-Glo[®]-Test dient der Quantifizierung der β -Galactosidase-Expression. Eine erhöhte exprimierte relative Lichteinheit entspricht einer erhöhten Expression von β -Galactosidase in den untersuchten Knorpelzellen. lacZ: β -Galactosidase-Gen; RLU: relative Lichteinheit.

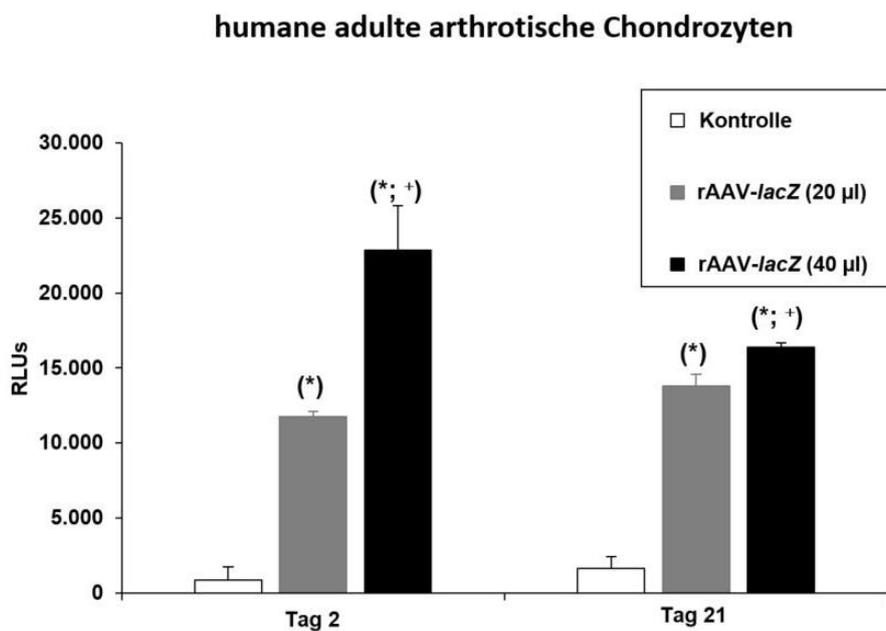
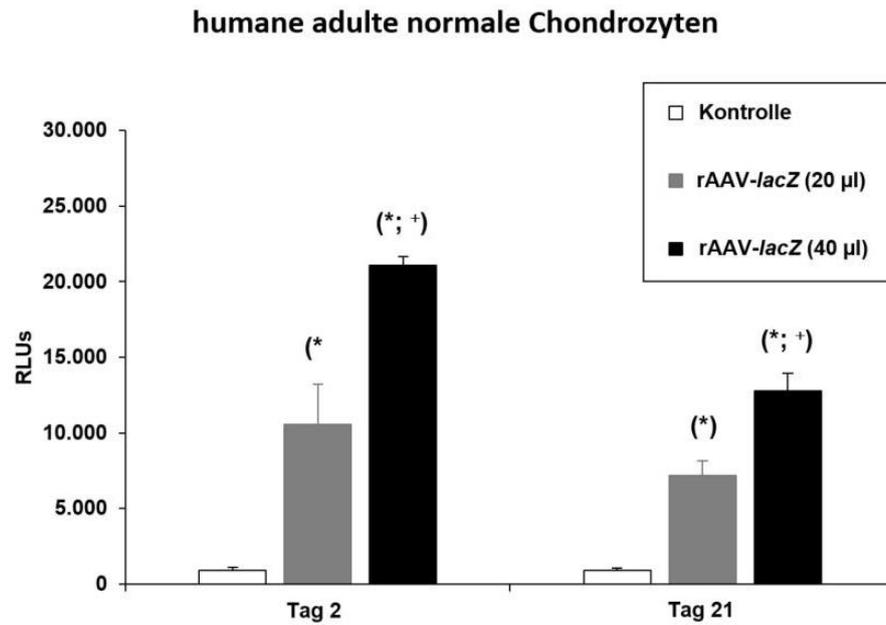


Abbildung 12: Darstellung der β -Galaktosidase-Expression im Balkendiagramm. Eine erhöhte exprimierte relative Lichteinheit entspricht einer erhöhten Expression von β -Galactosidase in den untersuchten Knorpelzellen. lacZ: β -Galactosidase-Gen; RLU: relative Lichteinheit.

7.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde wie unter 6.3.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Evaluation der mit dem *RFP* transduzierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte eine deutliche Signalverstärkung bei Verdopplung der Vektor-Menge. Zudem wiesen die humanen adulten arthrotischen Chondrozyten eine verstärkte Fluoreszenz auf. Bei sowohl normalen als auch arthrotischen Zellen nahm das emittierte Signal über die Dauer von 21 Tagen ab.

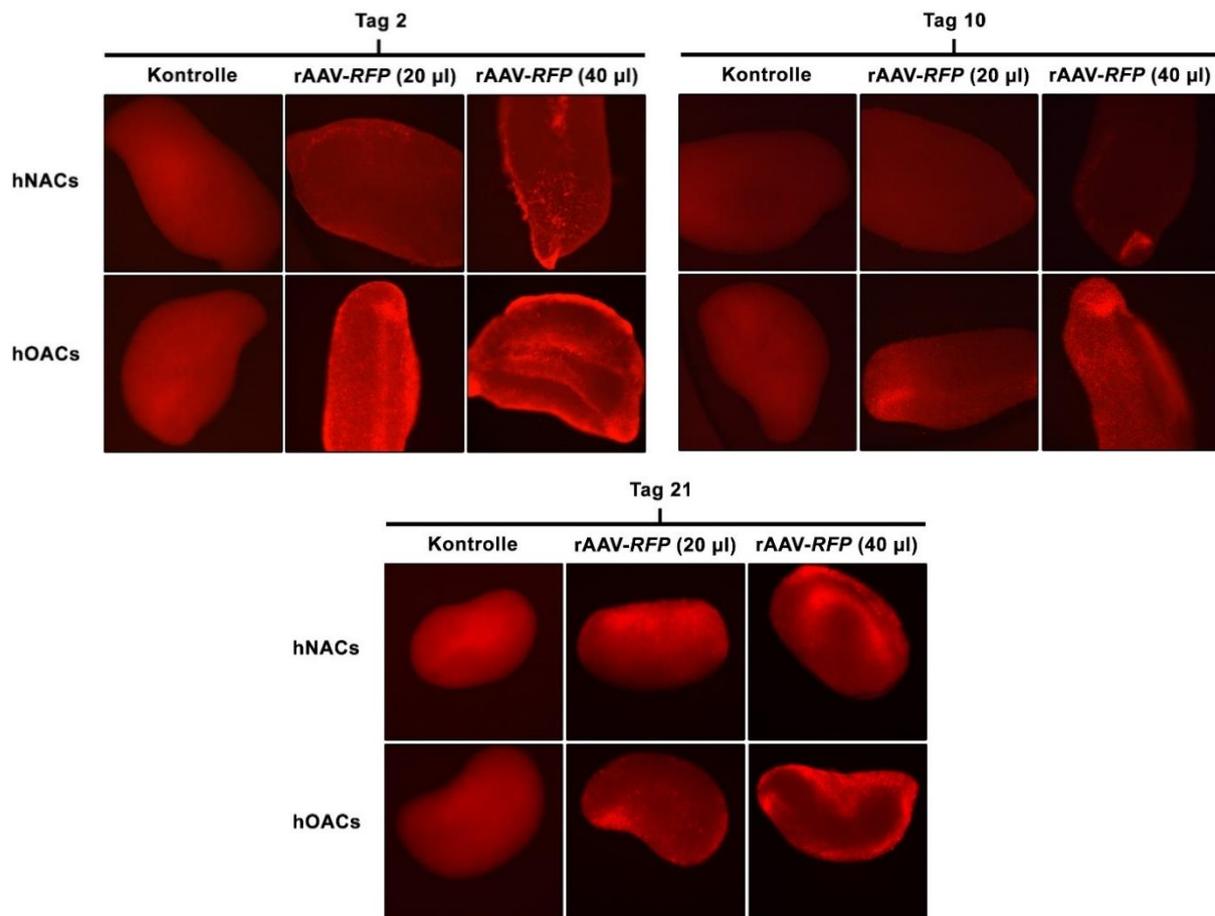


Abbildung 13: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie der mit RFP-transduzierten Pellets. Gezeigt sind die Zeitpunkte Tag 2, 10 und 21. Eine intensivere Färbung entspricht einer erhöhten Genexpression. RFP: Rot-fluoreszierendes Protein Gen; hNACs: humane adulte normale Chondrozyten; hOACs: humane adulte arthrotische Chondrozyten.

7.1.3 Zellviabilität – WST-1-Test

Der WST-1-Test wurde wie unter 6.3.2 beschrieben durchgeführt. Die Messungen zeigten eine vergleichbare Funktionsfähigkeit der Zellen, unabhängig der Transduktion eines Gens. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen der humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten wurden nicht identifiziert, weiterhin bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 11: Ergebnisse des WST-1-Tests

Tag 2	humane adulte Chondrozyten					
		normal			arthrotisch	
	Kontrolle	<i>lacZ</i> 20 μ l	<i>lacZ</i> 40 μ l	Kontrolle	<i>lacZ</i> 20 μ l	<i>lacZ</i> 40 μ l
OD ^{450 nm}	0,47	0,49	0,47	0,49	0,48	0,49
(SD)	(\pm 0,09)	(\pm 0,07)	(\pm 0,10)	(\pm 0,06)	(\pm 0,06)	(\pm 0,05)
P-Wert Kontrolle		0,448	0,483		0,490	0,384
P-Wert <i>lacZ</i> 20 μ l			0,433			0,344

Tag 21	humane adulte Chondrozyten					
		normal			arthrotisch	
	Kontrolle	<i>lacZ</i> 20 μ l	<i>lacZ</i> 40 μ l	Kontrolle	<i>lacZ</i> 20 μ l	<i>lacZ</i> 40 μ l
OD ^{450 nm}	0,47	0,49	0,47	0,49	0,48	0,49
(SD)	(\pm 0,09)	(\pm 0,07)	(\pm 0,10)	(\pm 0,06)	(\pm 0,06)	(\pm 0,05)
P-Wert Kontrolle		0,484	0,495		0,495	0,411
P-Wert <i>lacZ</i> 20 μ l			0,477			0,375

Der WST-1-Test dient zur Objektivierung der Atmungskettenaktivität der zu untersuchenden Knorpelzellen. Die optische Dichte entspricht der Menge an umgesetztem Farbstoff und somit der mitochondrialen Aktivität der Zellen. Die vergleichbaren Zahlen sprechen für eine ähnliche Aktivität der Atmungskette und somit für eine vergleichbare Zahl lebender Zellen. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; OD^{450 nm}: optische Dichte bei 450 nm Wellenlänge; SD: Standardabweichung.

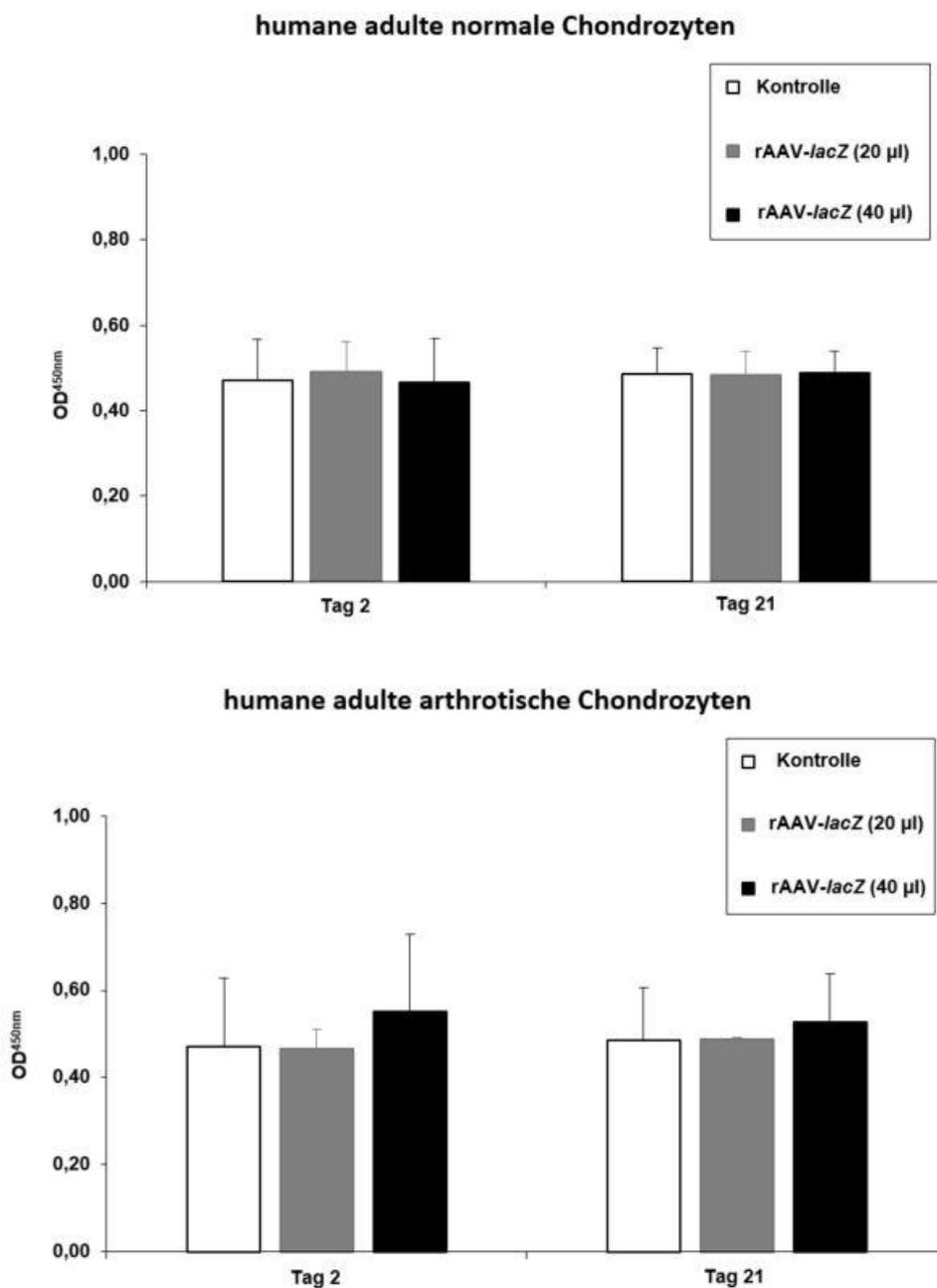


Abbildung 14: Darstellung der Zellviabilität gemäß WST1-Test im Balkendiagramm. Der WST-1-Test dient zur Objektivierung der Atmungskettenaktivität der zu untersuchenden Knorpelzellen. Die optische Dichte entspricht der Menge an umgesetztem Farbstoff und somit der mitochondrialen Aktivität der Zellen. lacZ: β -Galactosidase-Gen; $OD^{450\text{ nm}}$: optische Dichte bei 450 nm Wellenlänge.

7.2 Pelletkulturen – Studienarm B

Der Studienarm B beschäftigt sich mit dem Vergleich zwischen therapeutischem Vektor, Marker-Gen und Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Werte ($P \leq 0,05$) sind in den Unterkapiteln 7.2.1 bis 7.2.8 wie folgt gekennzeichnet: *bei einer Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe, *bei einer Signifikanz gegenüber der mit dem *lacZ*-transduzierten Gruppe. Handelt es sich bei den Markierungen um hoch signifikante Werte ($p \leq 0,005$), so ist dies im Text explizit erwähnt.

Die Bezeichnungen rAAV-*lacZ* und *lacZ*, sowie rAAV-FLAG-*hsox9* und *sox9*, sind in den Unterkapiteln 7.2.1 bis 7.2.8 als Synonym anzusehen. Sofern nicht anders deklariert, ist für rAAV-*lacZ* und rAAV-FLAG-*hsox9* die Dosierung 40 μ l anzunehmen. Die Auswertung des Studienarms erfolgte nach 21 Tagen. Die Durchführung der Experimente der Unterkapitel 7.2.1 bis 7.2.8 erfolgte in vierfacher Ausführung. Somit wurden pro möglicher Behandlungsart 4 Pellets zu o. g. jedem Messzeitpunkt getestet.

7.2.1 Safranin-O/Echtgrün-Färbung

Die SOX9-Immunhistochemie wurde wie unter 6.4.3 beschrieben durchgeführt. Zur Beurteilung der Färbequalität wurde das, unter 6.5.3 beschriebene, modifizierte Bern-Bewertungssystem verwendet. Die mit rAAV-FLAG-*hsox9*-behandelten Zellen beider Gruppen wiesen eine statistisch signifikante Intensivierung der Rotfärbung auf sowohl gegenüber den mit rAAV-*lacZ*-transduzierten Zellen ($p \leq 0,005$) als auch gegenüber der Kontrolle ($p \leq 0,005$).

Tabelle 12: Auswertung der Safranin-O/Echtgrün-Färbung mittels modifiziertem Bern-Bewertungssystem

humane adulte Chondrozyten						
		normal			arthrotisch	
	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>
Bern-Bewertungssystem	1,3	1,6	3,3	1,4	1,6	3,1
(SD)	(± 0,3)	(± 0,3)*	(± 0,3)* ⁺	(± 0,4)	(± 0,4)	(± 0,5)* ⁺
P-Wert Kontrolle		0,002	≤ 0,001		0,074	≤ 0,001
P-Wert <i>lacZ</i>			≤ 0,001			0,002

Die Safranin-O/Echtgrün-Färbung dient der Quantifizierung der Proteoglykan-Synthese. Eine intensive Rotfärbung spricht für eine erhöhte Anwesenheit selbiger und ist somit ein direkter Marker der Chondrogenese. Die Evaluation der Färbintensität erfolgte mittels modifiziertem Bern-Bewertungssystem. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen; SD: Standardabweichung.

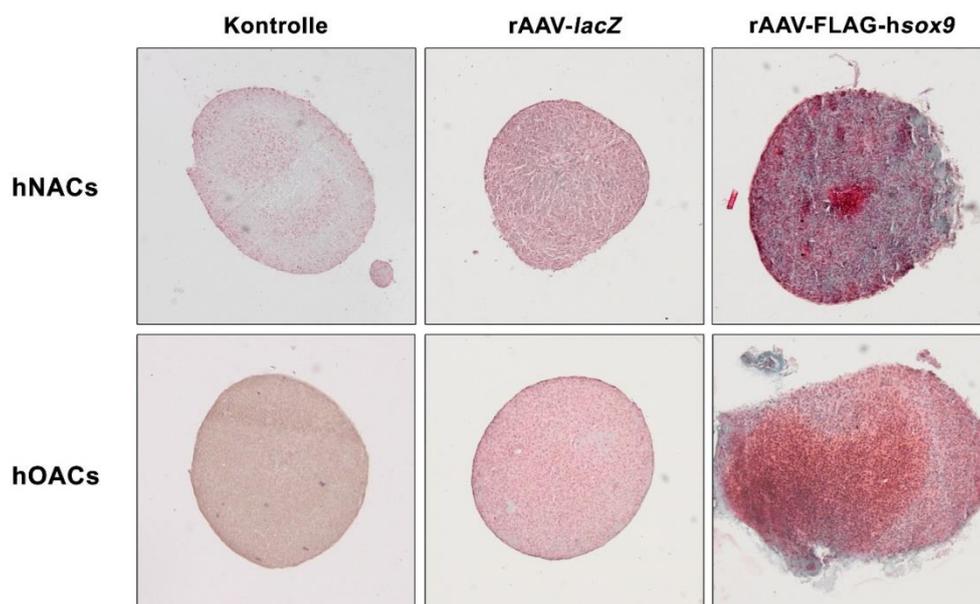


Abbildung 15: Repräsentative Safranin-O/Echtgrün-Färbung. Vergrößerung 10-fach, Schnittdicke 3 μ m. Eine intensive Rotfärbung spricht für eine erhöhte Proteoglykan-Synthese und ist somit ein direkter Marker der Chondrogenese. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen; hNACs: humane adulte normale Chondrozyten; hOACs: humane adulte arthrotische Chondrozyten.

7.2.2 Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie

Die Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie wurde wie unter 6.4.6.1 beschrieben durchgeführt. Zur Beurteilung der Färbequalität wurde das, unter 6.5.3 beschriebene, modifizierte Bern-Bewertungssystem verwendet. Die mit rAAV-FLAG-hsox9-behandelten Zellen beider Gruppen wiesen eine statistisch signifikante Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen auf sowohl gegenüber den mit rAAV-lacZ-transduzierten Zellen ($p \leq 0,005$) als auch gegenüber der Kontrolle ($p \leq 0,005$).

Tabelle 13: Auswertung der Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie mittels modifiziertem Bern-Bewertungssystem

	humane adulte Chondrozyten					
		normal			arthrotisch	
	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>
Bern-Bewertungssystem	2,0	1,6	3,6	1,9	1,7	3,6
(SD)	($\pm 0,3$)	($\pm 0,2$)*	($\pm 0,5$)*,+	($\pm 0,4$)	($\pm 0,3$)	($\pm 0,4$)*,+
P-Wert Kontrolle		0,005	$\leq 0,001$		0,159	$\leq 0,001$
P-Wert <i>lacZ</i>			0,007			0,004

Die Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie dient der Quantifizierung der Typ-II-Kollagen-Konzentration. Eine intensive Braunfärbung spricht für eine erhöhte Anwesenheit des Selbigen und ist somit ein direkter Marker der Chondrogenese. Die Evaluation der Färbeintensität erfolgte mittels modifiziertem Bern-Bewertungssystem. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: sox9-Gen; SD: Standardabweichung.

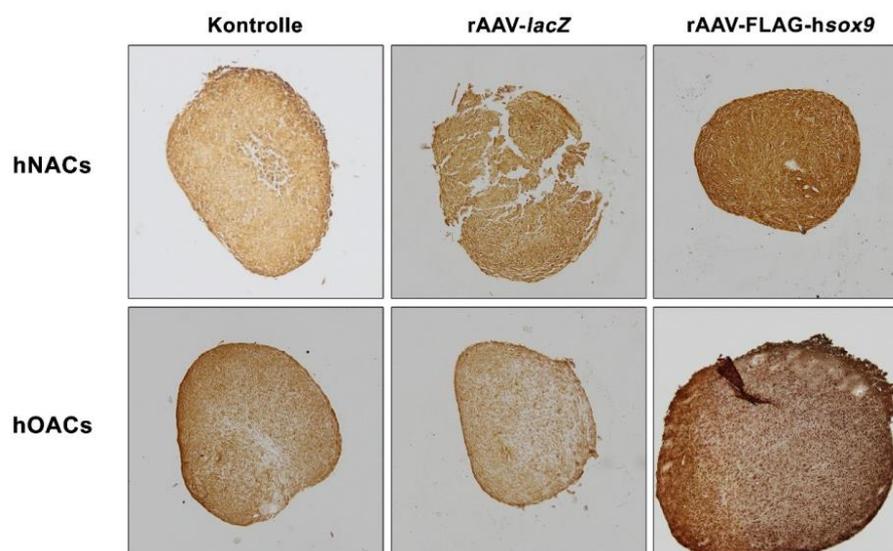


Abbildung 16: Repräsentative Typ-II-Kollagen-Immunhistochemie. Vergrößerung 10-fach, Schnittdicke 3 μm . Eine intensivirte Braunfärbung spricht für eine erhöhte Typ-II-Kollagen-Konzentration und ist somit ein direkter Marker der Chondrogenese. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: sox9-Gen; hNACs: humane adulte normale Chondrozyten; hOACs: humane adulte arthrotische Chondrozyten.

7.2.3 SOX9-Immunhistochemie

Die SOX9-Immunhistochemie wurde wie unter 6.4.6.3 beschrieben durchgeführt. Zur Beurteilung des prozentualen Anteils reaktiver Zellen wurde, wie unter 6.5.2 beschrieben, ein semi-automatisiertes, computergestütztes Verfahren angewendet. Die mit rAAV-FLAG-hsox9-behandelten Proben wiesen eine statistisch signifikant erhöhte Zahl reaktiver Zellen auf – sowohl gegenüber der Kontrolle ($p \leq 0,005$) als auch gegenüber rAAV-*lacZ* ($p \leq 0,005$). Die mit rAAV-*lacZ*-behandelten Proben beider Gruppen wiesen ebenfalls eine signifikant erhöhte Reaktivität gegenüber der Kontrolle ($p \leq 0,05$) auf.

Tabelle 14: Auswertung der SOX9-Immunhistochemie anhand des prozentualen Anteils reaktiver Zellen

	humane adulte Chondrozyten					
	normal			arthrotisch		
	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>
% gefärbter Zellen	4,3	10,3	25,0	4,8	12,3	23,8
(SD)	(± 2,6)	(± 2,5)*	(± 1,4)*,+	(± 1,7)	(± 4,0)*	(± 1,0)*,+
P-Wert Kontrolle		0,008	≤ 0,001		0,007	≤ 0,001
P-Wert <i>lacZ</i>			≤ 0,001			≤ 0,001

Die SOX9-Immunhistochemie dient der Quantifizierung der SOX9-Expression. Eine intensive Braunfärbung spricht für eine erhöhte Anwesenheit des Proteins und weist somit die erhöhte Synthese nach. Die Evaluation der Färbintensität erfolgte mittels Bestimmung der Zahl gefärbter Zellen. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen; SD: Standardabweichung.

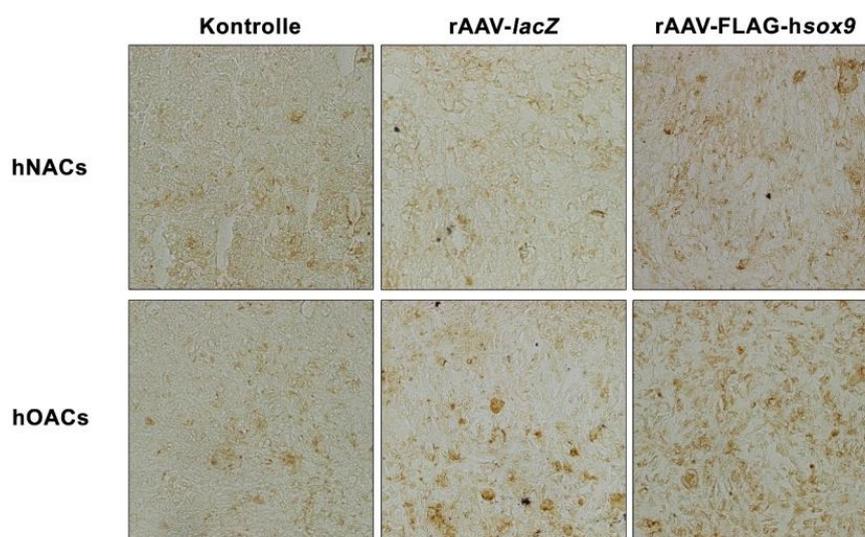


Abbildung 17: Repräsentative SOX9-Immunhistochemie. Vergrößerung 40-fach, Schnittdicke 3 μ m. Eine intensive Braunfärbung spricht für eine erhöhte Anwesenheit des Proteins SOX9 und weist somit die erhöhte Synthese nach. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen; hNACs: humane adulte normale Chondrozyten; hOACs: humane adulte arthrotische Chondrozyten.

7.2.4 Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie

Die Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie wurde wie unter 6.4.6.2 beschrieben durchgeführt. Zur Beurteilung des prozentualen Anteils reaktiver Zellen wurde, wie unter 6.5.2 beschrieben, ein semi-automatisiertes, computergestütztes Verfahren angewendet. Die mit rAAV-FLAG-hsox9-behandelten Proben wiesen eine statistisch signifikant erhöhte Zahl reaktiver Zellen auf – sowohl gegenüber der Kontrollgruppe ($p \leq 0,005$) als auch gegenüber rAAV-*lacZ* ($p \leq 0,005$). Die mit rAAV-*lacZ*-behandelten Proben wiesen in der Gruppe der humanen adulten arthrotischen Chondrozyten ebenfalls eine signifikant erhöhte Reaktivität gegenüber der Kontrolle ($p \leq 0,05$) auf.

Tabelle 15: Auswertung der Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie anhand des Anteils reaktiver Zellen

	humane adulte Chondrozyten					
	normal			arthrotisch		
	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>
% gefärbter Zellen	30,8	31,8	18,3	28,5	24,8	17,3
(SD)	(± 2,2)	(± 2,6)	(± 2,5)*,+	(± 3,5)	(± 0,5)*	(± 3,5)*,+
P-Wert Kontrolle		0,291	≤ 0,001		0,039	0,002
P-Wert <i>lacZ</i>			≤ 0,001			0,003

Die Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie dient der Quantifizierung der Typ-X-Kollagen-Expression. Eine intensive Braunfärbung spricht für eine erhöhte Anwesenheit des Kollagens und ist ein direkter Marker der Hypertrophie von Chondrozyten. Die Evaluation der Färbintensität erfolgte mittels Bestimmung der Zahl gefärbter Zellen. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen; SD: Standardabweichung.

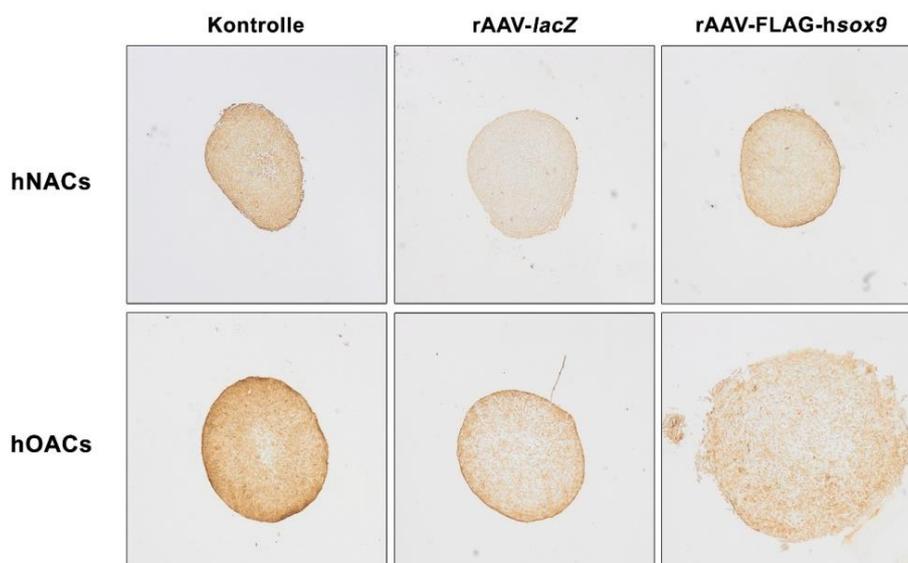


Abbildung 18: Repräsentative Typ-X-Kollagen-Immunhistochemie. Vergrößerung: 10-fach, Schnittdicke: 3 μm . Eine intensive Braunfärbung spricht für eine erhöhte Typ-X-Kollagen-Expression und ist ein direkter Marker der Hypertrophie. *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen; hNACs: humane adulte normale Chondrozyten; hOACs: humane adulte arthrotische Chondrozyten.

7.2.5 HE-Färbung - Evaluation der Zellzahl

Die HE-Färbung wurde wie unter 6.4.5 beschrieben durchgeführt. Zur Beurteilung der relativen Zellzahl pro mm^2 erfolgte die Auswertung der Gewebsschnitte wie unter 6.5.3 beschrieben. Die Auswertung zeigte eine vergleichbare Zellzahl, unabhängig der Transduktion eines Gens. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen der humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten wurden nicht identifiziert, weiterhin bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 16: Bestimmung der Zellzahl mittels HE-Färbung

	humane adulte Chondrozyten						
	Kontrolle	normal			arthrotisch		
		<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>		Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>
Zellen/ mm^2	3.733	3.797	3.907	4.133	3.847	4.072	
(SD)	(± 533)	(± 352)	(± 469)	(± 399)	(± 68)	(± 565)	
P-Wert Kontrolle		0,447	0,357		0,173	0,444	
P-Wert <i>lacZ</i>			0,393			0,303	

Die HE-Färbung dient Bestimmung der Zellzahl. Die Zellkerne werden in einem intensiven Rot angefärbt, sodass eine Auszählung pro Fläche möglich ist. HE-Färbung: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen; SD: Standardabweichung.

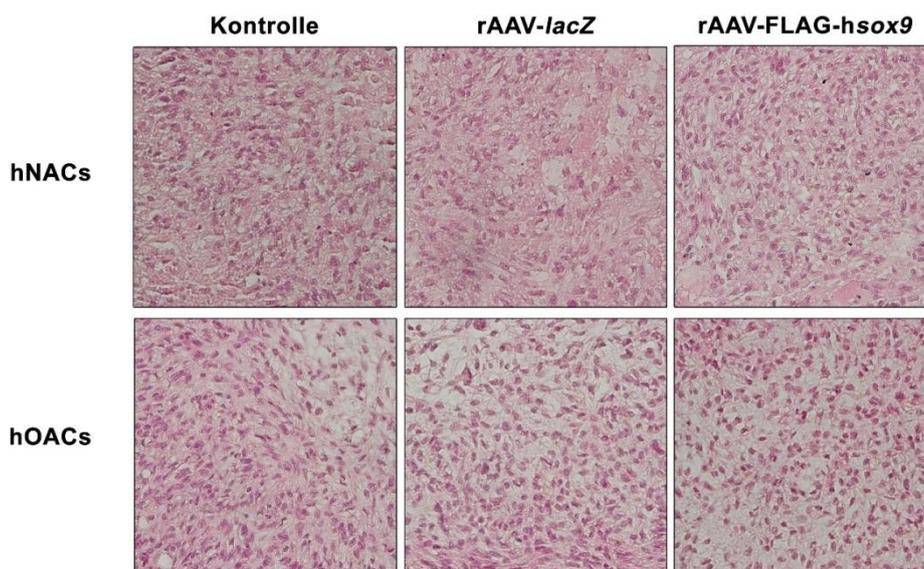


Abbildung 19: Repräsentative HE-Färbung. Vergrößerung: 40-fach, Schnittdicke: 3 μm . Die Zellkerne werden in einem intensiven Rot angefärbt, sodass eine Auszählung pro Fläche möglich ist. HE-Färbung: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; lacZ: β -Galactosidase-Gen; sox9: sox9-Gen; hNACs: humane adulte normale Chondrozyten; hOACs: humane adulte arthrotische Chondrozyten.

7.2.6 BCA-Test

Der BCA-Test wurde wie unter 6.3.5 beschrieben durchgeführt. Die Messungen zeigten eine vergleichbare Menge der Gesamt-DNS. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen der humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten wurden nicht identifiziert, weiterhin bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 17: BCA-Test - Bestimmung der Gesamt-DNS

	humane adulte Chondrozyten					
		normal			arthrotisch	
	Kontrolle	lacZ	sox9	Kontrolle	lacZ	sox9
DNS (mg/ml)	0,39	0,42	0,53	0,46	0,51	0,55
(SD)	($\pm 0,04$)	($\pm 0,16$)	($\pm 0,19$)	($\pm 0,13$)	($\pm 0,04$)	($\pm 0,08$)
P-Wert Kontrolle		0,363	0,129		0,281	0,175
P-Wert lacZ			0,241			0,229

Der BCA-Test gibt die Gesamt-DNS einer Probe, somit eines Pellets an. Somit lassen sich Rückschlüsse auf die Zahl der proteinproduzierenden Zellen, als auch deren aktive Proteinproduktion schließen. lacZ: β -Galactosidase-Gen; sox9: sox9-Gen; SD: Standardabweichung.

7.2.7 ELISA

Der ELISA wurde wie unter 6.3.7 beschrieben durchgeführt. Die mit rAAV-FLAG-hsox9-behandelten Proben humaner adulter normaler Chondrozyten wiesen einen statistisch signifikant erhöhten Typ-II-Kollagen-Gehalt auf – sowohl gegenüber der Kontrolle ($p \leq 0,05$) als auch gegenüber rAAV-*lacZ* ($p \leq 0,05$). Die mit rAAV-FLAG-hsox9-behandelten Proben humaner adulter arthrotischer Chondrozyten wiesen einen statistisch signifikant erhöhten Typ-II-Kollagen-Gehalt gegenüber der Kontrolle auf ($p \leq 0,05$).

Tabelle 18: ELISA - Bestimmung der Typ-II-Kollagen-Expression

	humane adulte Chondrozyten					
	normal			arthrotisch		
	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>	Kontrolle	<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>
Typ-II-Kollagen (ng/ml)	1,4	1,5	2,2	1,2	1,7	2,3
(SD)	(± 0,4)	(± 0,6)	(± 0,6)*,+	(± 0,4)	(± 0,6)*	(± 0,8)*
P-Wert Kontrolle		0,387	0,008		0,043	0,005
P-Wert <i>lacZ</i>			0,025			0,100

Der ELISA ist ein biochemisches, quantitatives Verfahren zum Nachweis von Proteinen, hier Typ-II-Kollagen. Eine erhöhte relative Konzentration lässt auf eine erhöhte Synthese in den untersuchten Zellen schließen. *lacZ* β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen; SD: Standardabweichung.

7.2.8 Echtzeit-RT-PCR

Die Echtzeit-RT-PCR wurde wie unter 6.3.8 beschrieben durchgeführt. Hinsichtlich COL2A1 zeigte sich bei der mit rAAV-FLAG-hsox9-behandelten Proben der humanen adulten arthrotischen Chondrozyten eine statistisch signifikant erhöhte Genexpression gegenüber der Kontrolle ($p \leq 0,05$). Hinsichtlich COL10A1 zeigte sich bei den mit rAAV-FLAG-hsox9-behandelten Proben beider Gruppen eine statistisch signifikant erhöhte Genexpression – sowohl gegenüber der Kontrolle ($p \leq 0,05$) als auch gegenüber rAAV-*lacZ* ($p \leq 0,05$).

Tabelle 19: Echtzeit-RT-PCR – Bestimmung von COL2A1- und COL10A1

COL2A1	humane adulte Chondrozyten					
	Kontrolle	normal		Kontrolle	arthrotisch	
		<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>		<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>
Vervielfachung	1,00	1,03	2,71	1,00	0,74	1,64
(SD)		($\pm 0,12$)	($\pm 0,00$)*,+		($\pm 0,25$)	($\pm 0,22$)*,+
P-Wert Kontrolle		0,344	$\leq 0,001$		0,103	0,006
P-Wert <i>lacZ</i>			$\leq 0,001$			0,013

COL10A1	humane adulte Chondrozyten					
	Kontrolle	normal		Kontrolle	arthrotisch	
		<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>		<i>lacZ</i>	<i>sox9</i>
Vervielfachung	1,00	0,97	0,38	1,00	0,97	0,53
(SD)		($\pm 0,25$)	($\pm 0,09$)*,+		($\pm 0,05$)	($\pm 0,10$)*,+
P-Wert Kontrolle		0,449	0,006		0,211	0,012
P-Wert <i>lacZ</i>			0,042			0,017

Die Echtzeit-RT-PCR ist ein biochemisches, quantitatives Verfahren zum Nachweis von DNS, hier COL2A1 und COL10A1. Eine erhöhte Zahl an Vervielfachungen im Vergleich zur Kontrollgruppe lässt auf eine erhöhte Genexpression und damit indirekt auf eine erhöhte Proteinsynthese schließen. Bei Zahlen < 1 ist gegenteiliges der Fall. COL2A1: Typ-II-Kollagen $\alpha 1$ -Gen; COL10A1: Typ-X-Kollagen $\alpha 1$ -Gen; *lacZ*: β -Galactosidase-Gen; *sox9*: *sox9*-Gen; SD: Standardabweichung.

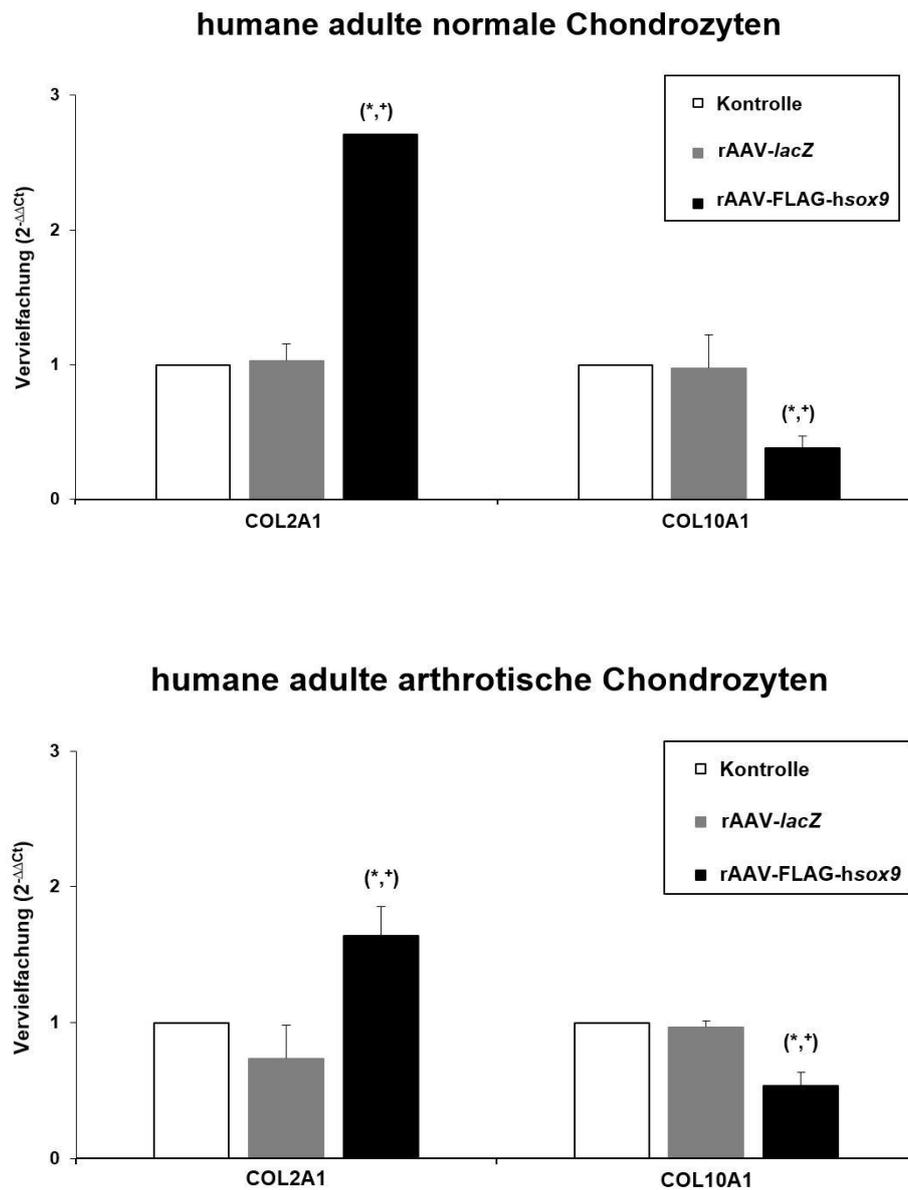


Abbildung 20: Echtzeit-RT-PCR – Bestimmung von COL2A1- und COL10A1-DNS. Eine erhöhte Zahl an Vervielfachungen im Vergleich zur Kontrollgruppe lässt auf eine erhöhte Genexpression und damit indirekt auf eine erhöhte Proteinsynthese schließen. lacZ: β -Galactosidase-Gen; sox9: sox9-Gen; hNACs: humane adulte normale Chondrozyten; hOACs: humane adulte arthrotische Chondrozyten; COL2A1: Typ-II-Kollagen α 1-Gen; COL10A1: Typ-X-Kollagen α 1-Gen.

7.3 Knorpelgewebe-Analogon („*Cartilage tissue analog*“)

Die Bezeichnungen rAAV-*lacZ* und *lacZ* sowie rAAV-*RFP* und *RFP* sind in den Unterkapiteln 7.3.1 bis 7.3.3 als Synonym anzusehen. Sofern nicht anders deklariert, ist für rAAV-*lacZ* und rAAV-*RFP* die Dosierung 100 μ l anzunehmen. Sofern nicht anders deklariert, ist für die gezeigten Knorpelgewebe-Analogon eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ anzunehmen. Über den Verlauf der Knorpelgewebe-Analogon-Studien wurden 41 Knorpelgewebe-Analoga mit einer Zellzahl $\geq 1 \times 10^6$ synthetisiert.

7.3.1 Makroskopische Beurteilung des Knorpelgewebe-Analogon

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarische Bilder der Zellaggregate. Über einen Zeitraum von 1,5 Jahren wurde die Technik zur Erstellung optimiert, entsprechend besteht eine Varianz in der Zellzahl der gezeigten Knorpelgewebe-Analoga. Das in Abb. 21 gezeigte Aggregat wies eine derartige Festigkeit auf, dass es mehrfach von einem Metallspatel auf einen anderen transferiert werden konnte, ohne dabei seine strukturelle Integrität zu verlieren. Das Knorpelgewebe-Analogon ließ sich auf Druck durch ein Skalpell zerkleinern, auch dabei blieb die Grundstruktur erhalten. Bei dem gezeigten Objekt wurde die Zellzahl experimentell auf $1,5 \times 10^6$ erhöht. Auf die subjektive Festigkeit hatte dies keinen Einfluss, jedoch wurde dadurch ein Umschlagen während der Inkubationszeit verhindert, sodass die durch die 96-Well-Titerplatte vorgegebene Struktur gewahrt wurde.

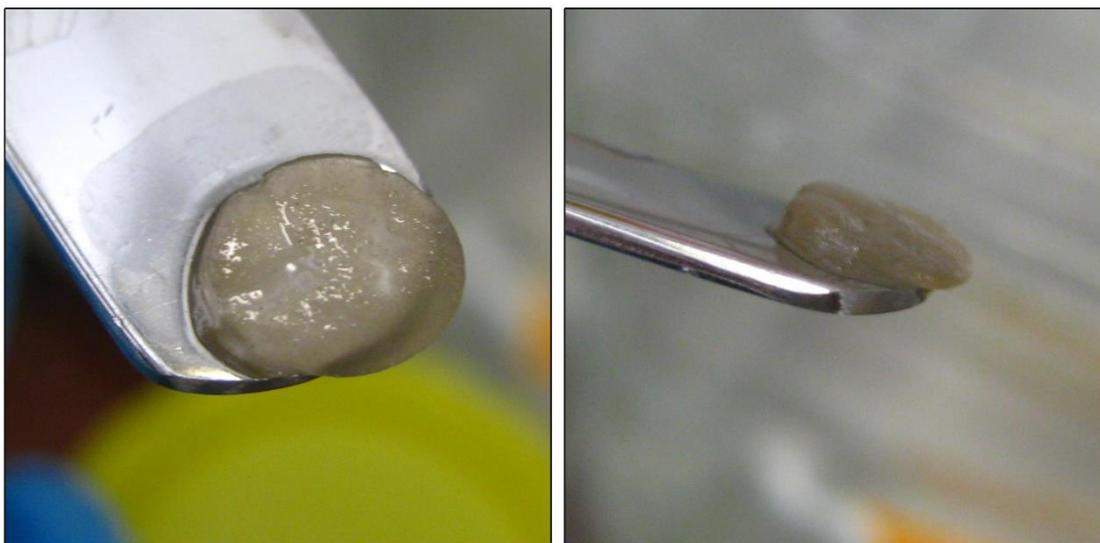


Abbildung 21: Makroskopische Ansicht eines Knorpelgewebe-Analogon auf einem Metall-Spatel (Tag 84). Die Breite des gezeigten Spatels ist ca. 1 cm.

Abb. 22 zeigt ein Knorpelgewebe-Analogon während des Mediumwechsels. Bei gleichbleibendem Flüssigkeitsstrom aus der Pipette ließ sich ein „Schweben“ des Aggregats auf dem abgegebenen Medium provozieren. Ein Abheben der Ränder durch gezielte Medium-Applikation wurde ca. ab Tag 7 erreicht, ohne dabei die Integrität des Knorpelgewebe-Analogons zu zerstören. Durch die experimentelle Nährungsweise zeigte sich, dass bei Zellzahlen $< 1 \times 10^6$ die Wahrscheinlichkeit eines Umschlagens des Aggregats stark erhöht war. Entsprechend wurde diese Zahl als Untergrenze für die Zellzahl in weiteren Experimenten etabliert.

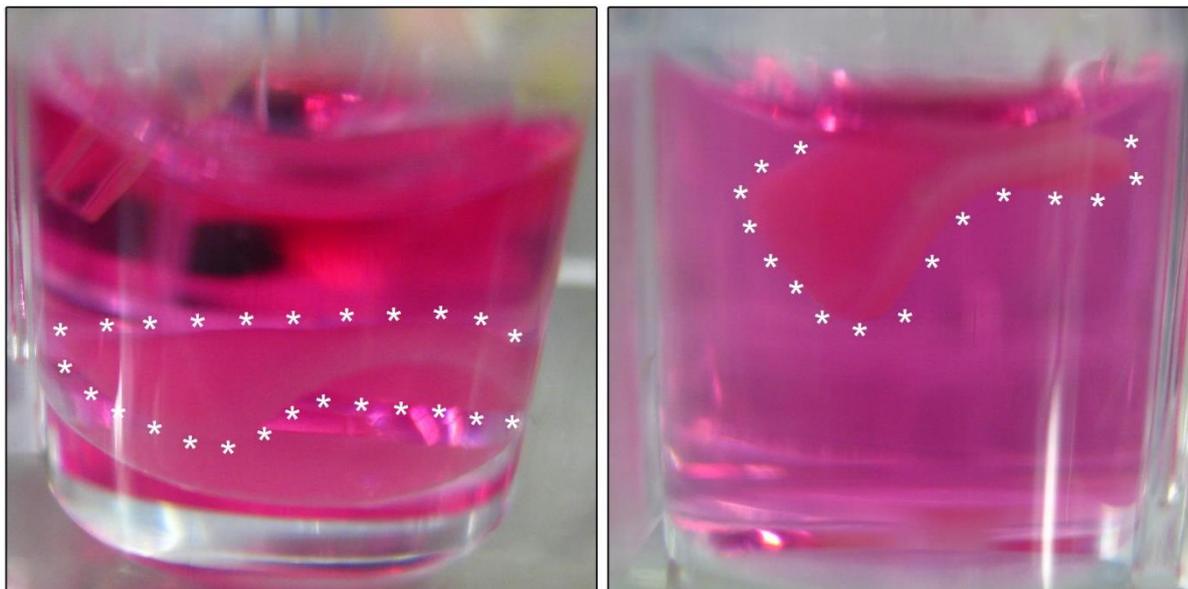


Abbildung 22: Makroskopische Ansicht eines Knorpelgewebe-Analogons im Gefäß einer 96-Well-Titerplatte. Die Aufnahmen entstanden an Tag 30. Während des Mediumwechsels flotierte das Gewebe in der Nährlüssigkeit (Kennzeichnung mittels weißer Sternchen). Im linken oberen Bildrand des linken Bildes ist die Spitze einer Pipette zu sehen.

7.3.2 X-Gal-Färbung

Die X-Gal-Färbung wurde wie unter 6.3.1.1 beschrieben durchgeführt. Makroskopisch zeigte sich eine Abhängigkeit in der Vektordosierung, wobei eine höhere Dosis zu einer intensiveren Blaufärbung führt. Die Anfärbbarkeit der Aggregate wurde in unterschiedlichen Knorpelgewebe-Analoga zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft. Die Abbildungen 23 bis 26 zeigen eine deutliche Farbreaktion, entsprechend eine Transgenexpression zu den genannten Zeitpunkten. Im direkten Vergleich zwischen Abbildung 23 und 24 fällt die durchscheinende Struktur des Aggregats besonders in den Kontrollgruppen auf. Dies ist der teilweise variierenden Zellzahl in den Knorpelgewebe-Analoga geschuldet. Wie eingangs beschrieben wurde über den Verlauf der Untersuchungen die optimale Zellzahl mit $N > 1 \times 10^6$ veranschlagt. Bei geringerer

Dosierung pro Näpfchen ergaben sich entsprechend durchscheinende Aggregate, die mit einer unter 6.1.5 beschriebenen, erhohnten Wahrscheinlichkeit für ein Umschlagen einhergingen. Verglichen wurden insgesamt 11 Knorpelgewebe-Analoga zu den gezeigten Zeitpunkten.

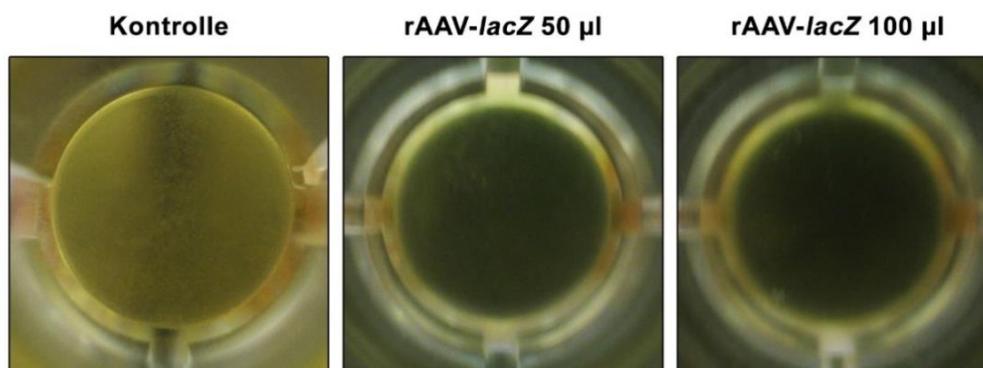


Abbildung 23: Repräsentative makroskopische Ansicht dreier Knorpelgewebe-Analoga nach X-Gal-Färbung. Die Durchführung der Färbung erfolgte an Tag 8. Eine intensiviertere Blaufärbung spricht für eine erhohnte β -Galactosidase-Expression. lacZ: β -Galactosidase-Gen.

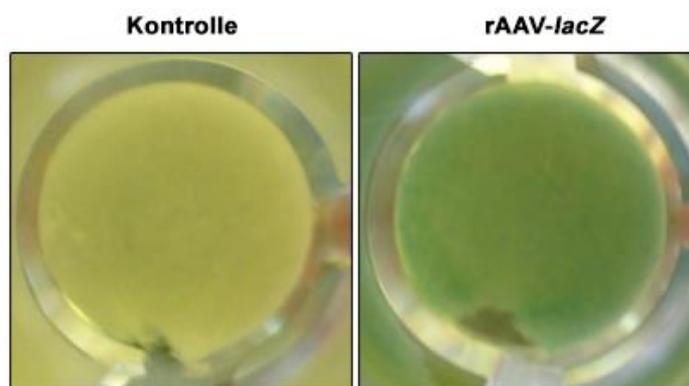


Abbildung 24: Repräsentative Ansicht zweier Knorpelgewebe-Analoga nach X-Gal-Färbung. Die Durchführung der Färbung erfolgte an Tag 30. Eine intensiviertere Blaufärbung spricht für eine erhohnte β -Galactosidase-Expression. Am Unterrand der Gewebe sind jeweils Defekte erkennbar. Diese entstanden durch ein Ansaugen des Aggregats im Zuge des Mediumwechsels in der Frühphase der Versuchsdurchführung. lacZ: β -Galactosidase-Gen.

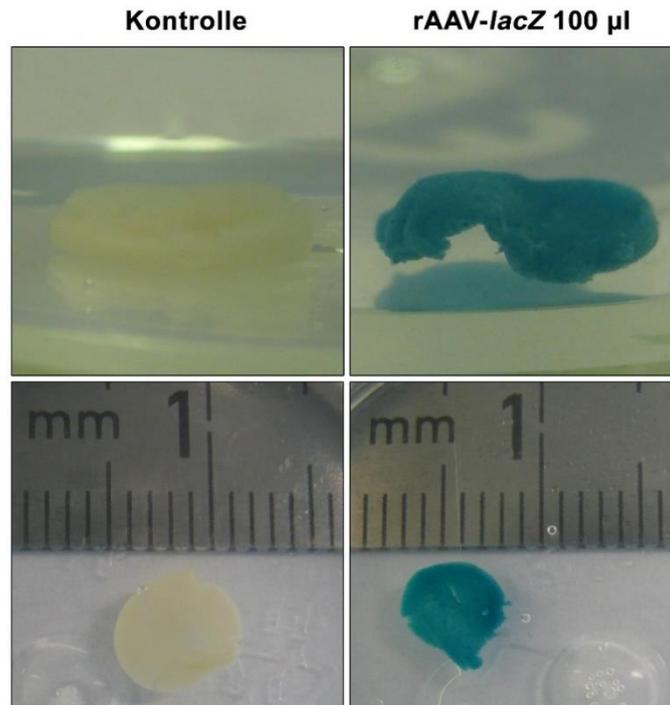


Abbildung 25: Repräsentative makroskopische Ansicht zweier Knorpelgewebe-Analoga nach X-Gal-Färbung. Die Durchführung der Färbung erfolgte an Tag 84. Eine intensivierte Blaufärbung spricht für eine erhöhte β -Galactosidase-Expression. Der Durchmesser der gezeigten Knorpelgewebe-Analoga ist etwa 0,7 cm. Die Abstände der mittellangen Striche entsprechen 1 mm. lacZ: β -Galactosidase-Gen.

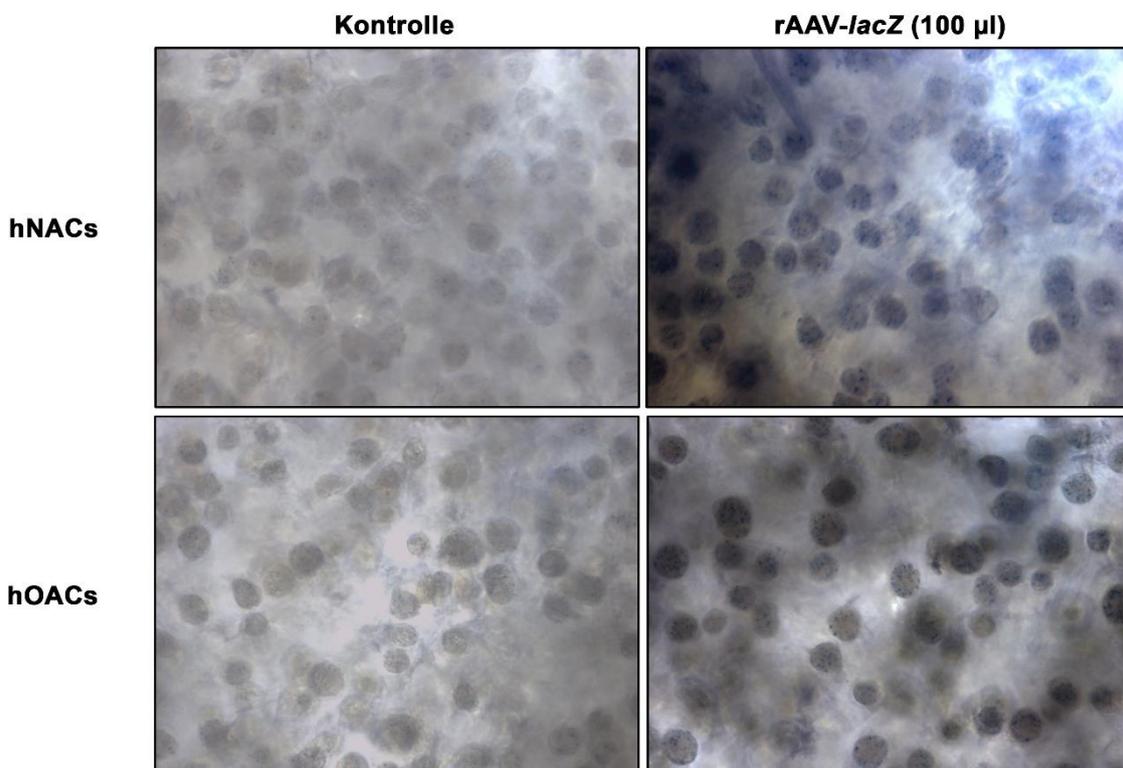


Abbildung 26: Repräsentative lichtmikroskopische Ansicht einer X-Gal-Färbung. Durchführung der Färbung: Tag 43, Vergrößerung: 40-fach. Eine intensivierte Blaufärbung spricht für eine erhöhte β -Galactosidase-Expression. lacZ: β -Galactosidase-Gen; hNACs: humane adulte normale Chondrozyten; hOACs: humane adulte arthrotische Chondrozyten.

7.3.3 Fluoreszenzmikroskopie - RFP

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde wie unter 6.3.1.3 beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich ein deutliches Signal der transduzierten Zellen über den gesamten Verlauf der Untersuchung. Mit voranschreitendem Messzeitpunkt nahm das emittierte Signal zu. Es erhöhte sich in gleichem Zeitraum das Hintergrundleuchten beider untersuchter Gruppen. Verglichen wurden jeweils 2 Knorpelgewebe-Analoga der Kontrollgruppe mit 2 Knorpelgewebe-Analoga nach rAAV-RFP-Transduktion.

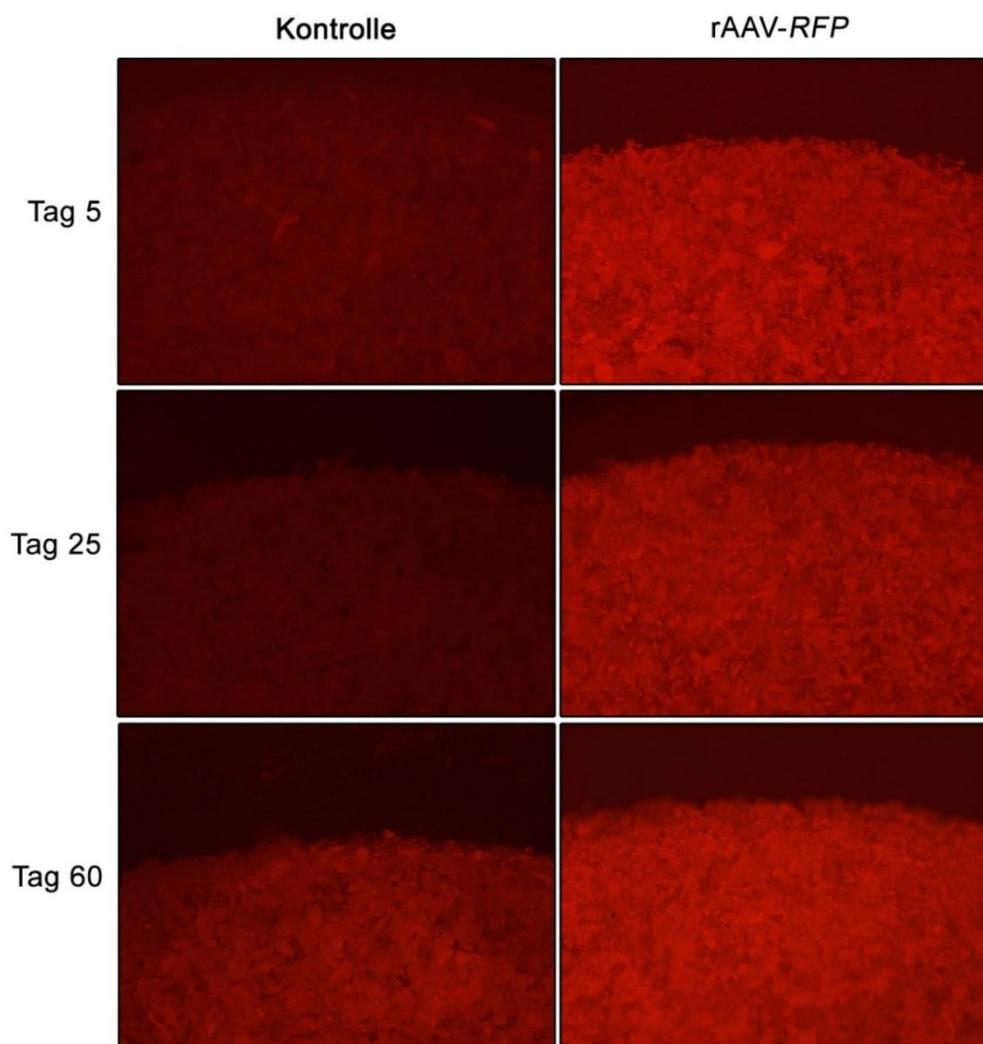


Abbildung 27: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie der mit RFP-transduzierten Knorpelgewebe-Analoga. Gezeigt sind die Zeitpunkte Tag 5, 25 und 60. Vergrößerung: 40-fach. Eine intensivierte Färbung entspricht einer erhöhten Genexpression. RFP: Rot-fluoreszierendes Protein Gen.

8. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht humane adulte arthrotische und normale Chondrozyten in gerüstfreien, dreidimensionalen Modellen und den Einfluss der Transduktion selbiger mit den Markergenen *lacZ* und *RFP*, sowie dem therapeutischen Gen *sox9* auf die spezifische Proteinbiosynthese. Hierzu erfolgte die Kultivierung der Zellen über einen Zeitraum von bis zu 21 Tagen in den Pelletstudien und bis zu 84 Tagen in den Knorpelgewebe-Analoga-Studien.

Die Pelletstudie bestätigt die unter Kapitel 3 getätigten Hypothesen (1), (2) und (4). Humane adulte arthrotische und normale Chondrozyten zeigten ein vergleichbares Ansprechen auf sowohl die Transduktion von Markergenen als auch von therapeutischen Genen mit einer ebenfalls gleichermaßen Steigerung der Expression von Typ-II-Kollagen als Indikator der Chondrogenese. Es kam zudem zu einer verminderten Expression von Hypertrophie-Markern bei konstanter Zellviabilität in beiden Zellgruppen. Diese Ergebnisse wurden über einen prolongierten Zeitraum bestätigt.

Die Studie der Knorpelgewebe-Analoga bestätigt die Hypothesen (3) und (4). Erstmals wurde der Versuchsaufbau der Knorpelgewebe-Analoga aus dem Tiermodell auf den Menschen übertragen und sowohl mit humanen adulten arthrotischen als auch normalen Chondrozyten durchgeführt. Die Synthese der Knorpelgewebe-Analoga zeigte sich über einen ausgedehnten Versuchszeitraum stabil, ebenso wurde eine langfristige Transgenexpression beobachtet.

8.1 Pelletkulturen

8.1.1 Vektordosis und Transgenexpression im zeitlichen Verlauf

Die vorliegenden Daten zeigen, dass humane adulte arthrotische und normale Chondrozyten in ihrer selbst-produzierten Extrazellulärmatrix für die Vektortransduktion mittels rAAV zugänglich sind. Zudem bestätigten wir die bereits durch vorangegangene Studien [62, 137, 138] getroffene Annahme, dass eine konstante Genexpression über einen längeren Zeitraum, in unseren Untersuchungen über 21 Tage, möglich ist (vgl. Abb. 12/13).

Neben der makroskopischen, optischen Nachweisverfahren erfolgte der Beta-Glo[®]-Test um nachzuweisen, dass in beiden gewählten Transgenkonzentrationen für humane adulte arthrotische und gesunde Chondrozyten eine statistisch signifikante Steigerung der Proteinexpression erzielt wurde. Diese Ergebnisse reihen sich in die vorangegangenen Studien ein [62, 137, 138]. Es wurde eine teilweise um mehr als das 20-fache erhöhte Expression von *lacZ* gegenüber nicht-transduzierten Zellen beobachtet (Vgl. Tab. 14).

8.1.2 Zellviabilität und Vektordosis

Unsere Untersuchungen zeigten für humane adulte arthrotische und normale Chondrozyten, aber auch für beide Vektormengen und die entsprechende Kontrollgruppe eine gleichbleibende Transgenexpression über den 21-tägigen Zeitraum der Untersuchungen. Dies lässt auf eine gleichbleibende Viabilität der Zellen schließen. Bei einem signifikanten Zellsterben wäre ein Rückgang der Proteinexpression zu erwarten gewesen. Zudem untersuchten wir die unterschiedlichen untersuchten Objekte mithilfe des WST-1-Tests hinsichtlich der Zellzahl. Diese blieb unabhängig der Behandlungsmethode und des Zelltyps über die Dauer des Experiments konstant. Somit konnten wir auf eine gleichbleibende Zellzahl über die gesamte Dauer der Untersuchung schließen. Zudem zeigte sich kein negativer Einfluss der gesteigerten Transgenmenge auf die Vitalität der Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden in bereits publizierten Studien beschrieben, jedoch ohne einen Bezug zwischen arthrotischen und gesunden Zellen herzustellen [98]. Im vorliegenden Fall war die Viabilität in beiden Zelltypen über den Verlauf des Experiments gleichbleibend (Vgl. Tab. 11).

8.1.3 Vergleich von therapeutischem Vektor und Kontrollgruppen

Unsere Untersuchungen zeigten die erfolgreiche Überexpression von *sox9* in den mit rAAV-FLAG-h*sox9*-transduzierten humanen adulten arthrotischen Chondrozyten, verglichen mit den beiden Kontrollgruppen (*lacZ* Gentransfer sowie Abwesenheit einer Vektortransduktion). Es zeigten sich Unterschiede in der gemessenen SOX9-Menge um mehr als den 5,8-fachen Wert. Ähnliche Ergebnisse lieferten bereits durchgeführte Studien [101], hier erfolgte die Transduktion in einer ebenfalls durch die Zellen selbst geschaffenen, dreidimensionalen Umgebung, jedoch unter weniger physiologischen Bedingungen. Die Menge an exprimiertem *sox9* im Vergleich zwischen arthrotischen und gesunden Zellen war unter den untersuchten Bedingungen vergleichbar (Vgl. Tab. 14).

8.1.4 Marker der Chondrogenese

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass eine Überexpression von *sox9* mittels rAAV in humanen adulten arthrotischen und normalen Chondrozyten zu einer signifikanten Erhöhung der Menge an synthetisierten Proteoglykanen und Typ-II-Kollagen führte (Vgl. Tab. 12/13 sowie Abb. 15/16). Dies ließ sich im Vergleich zu den Kontrollgruppen über einen entsprechenden Zeitraum nachweisen und stimmte mit den Eigenschaften des transkribierten Gens überein [139]. Ähnliche Ergebnisse wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits in vorangegangenen Arbeiten mit künstlichen Zellkultur-Settings beschrieben [101].

8.1.5 Marker der Hypertrophie

Sowohl in zuvor untersuchten Settings [101, 140] als auch in der vorliegenden Studie, hatte SOX9 keine signifikanten Effekte, sowohl auf die Vitalität, als auch die Proliferationsrate der Zelle. Gleiches galt ebenfalls für *lacZ* in selber Dosierung. Unter dem Einfluss von rAAV-FLAG-h*sox9* kam es sogar zu einem Rückgang des hypertrophen Wachstums, angezeigt durch die Reduktion der Typ-X-Kollagen-Expression (Vgl. Tab. 19 und Abb. 18). Diese Ergebnisse stimmen mit denen vorangegangener Studien bezüglich der Eigenschaften von SOX9 überein [140-143].

8.1.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie zeigten sowohl die arthrotischen als auch gesunde Zellen ähnliche Ergebnisse, beide Zelltypen profitieren von der Transgentherapie. Dieser Sachverhalt stützt die Überlegung, beide Zellarten mit den getesteten *sox9* Vektoren therapeutisch zu behandeln. Untersuchungen an Zellen in Matrix-gestützten Kulturen kamen diesbezüglich zu vergleichbaren Schlussfolgerungen [101]. In beiden Zelltypen kam es zu einer erhöhten Typ-II-Kollagen-Expression bei gleichzeitiger Reduktion von Typ-X-Kollagen. Entsprechend wichtig ist dieser Umstand, da das Ziel der Studie die Synthese von Proteinen des hyalinen Knorpels war. Typ-X-Kollagen als Marker der Hypertrophie entspräche genau dem Gegenteil des angestrebten Zustandes.

Inwieweit sich diese Erkenntnisse auf translationale Studien übertragen lassen, muss in weiteren Untersuchungen erarbeitet werden. Zudem müsste bei der klinischen Anwendung eine

entsprechende Vektordosis, bzw. die MOI neu erarbeitet werden. Kyprioutou et al. [144] zeigten bereits in Laborstudien, dass zu hohe Dosierungen von SOX9 möglicherweise die Expression von Typ-II-Kollagen behindern und so zu reduzierten Konzentrationen führen. Die direkte Applikation von rAAV-FLAG-hsox9 im Menschen-nahen Tiermodell [145-148] ist daher unerlässlich, um die in vitro beschriebene Störung der Homöostase [144] ggf. zu verifizieren oder zu widerlegen. Entsprechend wird sich in der Zukunft zeigen, ob eine Regulation der Genexpression über stark steuerbare (Tetrazyklinsensitivität) oder knorpelspezifische (Typ-II-Kollagen bzw. SOX9) Elemente sinnvoller ist. Hierzu gilt es, parallel aktuelle Arbeitsansätze mit starken CMV-IE Promotern zu verfolgen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass rAAV-FLAG-hsox9 Vektoren einen sicheren und effektiven Weg darstellen, in einer 3D Umgebung, ähnlich der in dem in vivo vorliegenden Knorpel, einen Gentransfer in humanen adulten Chondrozyten durchzuführen. Darüber hinaus zeigte sich, dass eine Steuerung der Proteinsynthese zugunsten des präferierten Typ-II-Kollagen erreicht werden kann. Dieser Umstand macht den direkten Gentransfer von *sox9* mittels rAAV zu einer validen Option in der Therapie von Arthrose, mit dem Ziel, den bestehenden, arthrotischen Knorpel zu erneuern. Besonders bei progressiven, aktuell unheilbaren Krankheiten wie Arthrose bietet der Gentransfer einen sinnvollen Therapieansatz, da sich hier die Expression der therapeutischen Gene über einen längeren Zeitraum in direkter räumlicher Nähe zum erkrankten Gewebe als sinnvoll erweist [6, 62, 149, 150].

8.2 Knorpelgewebe-Analogon („*Cartilage tissue analog*“)

8.2.1 Transgenexpression und zeitlicher Verlauf

Analog zu den Experimenten in Pellet-Form wiesen wir in den Knorpelgewebe-Analoga die erfolgreiche Transgenexpression nach. Entsprechend der von der Vektor-Dosis abhängigen Färbeintensität in der X-Gal-Färbung bis hin zu Tag 84 nach Transduktion, zeigte sich in unseren Untersuchungen sowohl die erfolgreiche Transgenexpression als auch eine Dosis-Protein-Beziehung (vgl. Abb. 23-25).

Lichtmikroskopisch ließen sich einzelne Zellen mit denen entsprechender Kontrollgruppen vergleichen. Auch hier war die verstärkte Genexpression mit konsekutiver Färbung der Transgenprodukte zu beobachten. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine zeitlich stabile, erhöhte Fluoreszenz in den transduzierten Zellen bis zum 60. Tag (vgl. Abb.27). Die Handhabung der transduzierten Zellen und der Kontrollgruppe hinsichtlich Stabilität in der Zellkultur unterschied sich während des Beobachtungszeitraums nicht. Weder kam es zu einer auffällig frühzeitigen Beschädigung einzelner Zellkonglomerate, noch unterschied sich deren Festigkeit subjektiv unterhalb der zu untersuchenden Gruppen.

8.2.2 Gewinnung von Probenmaterial

Anders als in der Pellet-Kultur stellt bei der Herstellung von Knorpelgewebe-Analoga die Gewinnung von ausreichend Chondrozyten eine deutliche Herausforderung dar. Über den Verlauf der Forschungsarbeit zeigte sich, dass sich auch für humane adulte Chondrozyten eine Zellzahl mit $N > 1 \times 10^6$ pro Nöpfchen einer 96-Well-Titerplatte als sinnvoll erweist. Diese Erfahrungswerte decken sich mit den Publikationen von G. Dodge et al. auf Grundlage von Tiermodellen [92, 93, 151]. In der Regel ergaben sich aus der Isolation der Chondrozyten von Knorpelspenden nach Implantation eines endoprothetischen Oberflächenersatzes weniger als 1×10^6 Zellen, da es sich hier um Patienten mit nur noch geringer Knorpelsubstanz handelte. Suffiziente Zellzahlen waren nur bei Patienten nach Implantation einer Tumorprothese (normale Chondrozyten) oder bei Patienten mit großer Gelenkfläche und relativ geringer Destruktion der Gelenkfläche bei Implantation des endoprothetischen Oberflächenersatzes (arthrotische Chondrozyten) zu gewinnen. Zudem müssen, um umfassende Studien durchführen zu können, noch deutlich höhere Zahlen an Chondrozyten isoliert werden, um mit den Proben desselben Patienten einen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Vektoren sowie Vektor-Konzentrationen anstellen zu können.

8.2.3 Handhabung in der Zellkultur

Ein limitierender Faktor bei der Durchführung der Studie stellte die Handhabbarkeit der Knorpelgewebe-Analoga in der Zellkultur dar. Aufgrund der erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Destruktion des Aggregats in der Konsolidierungsphase sowie einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Umschlagens bei der Wegnahme oder Applikation von Medium waren diese Maßnahmen nur von einer mit der Kultivierung vertrauten Person durchführbar. Diese Komplexität stellt weitere Studien an dem Knorpelgewebe-Analoga-Modell vor die Herausforderung, dass der Erfolg stark personengebunden ist.

Im direkten Vergleich zur Pellet-Kultur, die nach der Frühphase von 72 Stunden wesentlich weniger fehleranfällig sind, können dort Aufgaben leichter delegiert werden.

8.2.4 Schlussfolgerung

Die Komplexität der Knorpelgewebe-Analoga spiegelt sich im Vergleich zu den Pelletkulturen unter anderem in der geringen Publikationszahl wider. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Dissertation existiert nach unserem Wissen keine Arbeit, die den Forschungsansatz von G. Dodge im humanen Modell überprüft und mit der Möglichkeit der Implementierung von Transgenen kombiniert. Der Vorteil, ein Gewebe ohne strukturgebende Komponente zu erzeugen, ist zeitgleich auch der Schwachpunkt in der Durchführung von Studien dieser Art. Weil eine Kultivierung nur mit frisch gewonnen Chondrozyten zu einem angemessenen Ergebnis führt, muss ein Labor Anschluss an ein orthopädisches Institut mit ansässiger Endoprothetik und onkologischer Orthopädie besitzen. Nur so können Zellspenden aus der Versorgung mit endoprothetischem Oberflächenersatz respektive Tumorprothesen erfolgen, um die Fortführung weiterer Studien zu sichern. Aufgrund der geringen Probenanzahl, die der Menge an benötigten Chondrozyten geschuldet ist, müssen viele unterschiedliche Untersuchungen mit einem Knorpelgewebe-Analoga durchgeführt werden. Dies bietet die Gefahr einer Alphafehler-Kumulierung. Es empfiehlt sich daher eine besondere Vorsicht bei der Interpretation der gewonnenen Daten.

Die Stärke der Knorpelgewebe-Analoga liegt unter anderem in der Größe der Konglomerate selbst. Im Vergleich zu Pellets sind diese größer und weisen verglichen mit den in der vorliegenden Studie verwendeten Pellets eine bis zu siebenfach erhöhte Zellzahl auf. Hieraus ergibt sich ein potenziell großes Reparaturgewebe zur Deckung fokaler Defekte, aber auch ein weiteres Forschungsobjekt für zukünftige in-vitro-Studien. Aufgrund des verwendeten Syntheseprozesses lässt sich ein Gentransfer in den hergestellten Modellen leicht und zuverlässig realisieren. Zudem wurde die bereits mit bovinen Konglomeraten beschriebene Festigkeit der Knorpelgewebe-Analoga reproduziert. So kann neben den synthetisierten Proteinen auch die Festigkeit des Ersatzgewebes überprüft und so der mögliche Einsatz als Defekt-deckendes Material weiter erprobt werden.

8.3 Klinische Perspektive und Ausblick in die Zukunft

Der Studienarm der Knorpelgewebe-Analoga versteht sich als Machbarkeitsstudie. Die erfolgreiche Kultivierung über einen verlängerten Zeitraum sowie der effektive Gentransfer in diesem Knorpelmodell wurden erstmalig beschrieben. Aufgrund der großen Menge an Chondrozyten, die zur Herstellung eines Knorpelgewebe-Analogs vonnöten sind, ist die klinische Anwendbarkeit zum aktuellen Zeitpunkt stark limitiert. Zudem stellt die erhöhte Zellzahl pro mm² insofern ein Problem dar, als dass die physiologische Matrix nicht vollständig imitiert werden kann.

Durch die Erkenntnisse der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Pelletstudien wäre jedoch die Transduktion mit rAAV-FLAG-hsox9 denkbar. Die Steigerung der Typ-II-Kollagen-Expression würde zum einen die Dichte des neu formierten Gewebes reduzieren und dieses hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften dem physiologischen Knorpel annähern. Zum anderen stünde dadurch ein erhöhtes Volumen und somit eine umfangreichere potenzielle Defektdeckung zur Verfügung. Denkbar wäre dadurch die Anwendung nach Implantation eines endoprothetischen Oberflächenersatzes bei einem Patienten mit beidseitiger Gonarthrose. Zellspenden könnten auf der zu operierenden Seite erfolgen und ein Reparaturgewebe für das kontralaterale Gelenk geschaffen werden. So bestünde eine Option, den beidseitigen Gelenkersatz hinauszuzögern, bzw. zu vermeiden.

Der Studienarm der Pelletstudie bedient sich eines bereits in der Forschung etablierten Modells. Die unter Punkt 2.5.2.1 erwähnten Spheroidekulturen bilden ein sich klinisch in Anwendung befindliches Pendant zu dem in der Arbeit verwendeten Zellaggregaten. Hier wäre ebenfalls eine Transduktion von rAAV-FLAG-hsox9 zur Verbesserung der Eigenschaften des Reparaturgewebes Knorpels als mögliche klinische Anwendbarkeit zu diskutieren. Auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten so gegebenenfalls neben normalen auch arthrotische Chondrozyten zur Synthese der Spheroide verwendet werden. So ließe sich nicht nur die traumatische Entnahme von Gewebe im ersten Schritt der autologen Chondrozytentransplantation verringern. Womöglich könnte auf diese Weise auch das Altersspektrum, innerhalb dem das Verfahren Anwendung findet, erweitert werden. Beide untersuchten Forschungsansätze bedienen sich Herangehensweisen, die ohne Stabilität-gebendes Gerüst den humanen Knorpel simulieren. Der größte Vorteil, neben der vereinfachten Umsetzbarkeit, ist die nicht vorhandene Immunogenität.

In Ermangelung an körperfremden Antigenen ist eine körpereigene Reaktion bei potenziellen Empfängern einer autologen Knorpelspende nahezu ausgeschlossen. Gleichzeitig liegt hier auch die Schwäche beider Systeme, denn egal, ob mit oder ohne Zentrifugation der Chondrozyten, die Zelldichte beider Modelle lag in unseren Versuchen deutlich über der des physiologisch vorliegenden Knorpels des Kniegelenks. Hier ist nicht nur die Einheilung in bestehendes Gewebe bei einer potenziellen Implantation zu hinterfragen, auch führt dies unweigerlich dazu, dass trotz adäquater Zellmenge kein entsprechend großes Transplantat hergestellt werden kann. In vivo ist somit die Anwendbarkeit von Pellets und Knorpelgewebe-Analoga zum aktuellen Zeitpunkt auf kleine Defekte reduziert. Beide Modelle eignen sich aufgrund der fehlenden exogenen Einflussfaktoren hervorragend zur Erforschung der Wechselwirkungen zwischen Chondrozyten und potenzieller Vehikel des Gentransfers.

Losgelöst von der vorliegenden Arbeit wurde während des alljährlichen Treffens der *Orthopaedic Research Society (ORS)* 2017 in San Diego eine Podiumsdiskussion in Form einer interaktiven Debatte geführt. Hier standen sich der klinische Orthopäde Joshua Jacobs und der Grundlagenforscher Brian Johnstone gegenüber, zudem nahmen ca. 700 Zuhörerinnen und Zuhörer mittels elektronischer Abstimmung teil. Thema der Diskussion war: „*Will Regenerative Medicine Make Orthopaedic Implants Obsolete in Our Time?*“, sinngemäß übersetzt: „*Wird die regenerative Therapie die operativen Implantat-gestützten Verfahren zu unserer Lebzeit ablösen?*“. Das Ergebnis der Debatte war eindeutig: Es sei unwahrscheinlich, dass jemand der in der Zuhörerschaft Anwesenden den Punkt erleben wird, an dem die operative Medizin durch regenerative Ansätze komplett ersetzt werden wird. Wahrscheinlicher sei eine sich-ergänzende Verwendung der unterschiedlichen Therapieansätze. Entweder, um einen operativen Eingriff zu verzögern, oder um das Ergebnis einer operativen Therapie zu verbessern.

So sollten auch die Ergebnisse der vorliegenden Studien verstanden werden, da sowohl die Möglichkeit gegeben ist, im Bereich des *Tissue Engineering* durch Genterapie ein erweitertes Spektrum an Möglichkeiten zu schaffen, effizienter und gegebenenfalls näher am in vivo Präparat Gewebe zu reproduzieren, bzw. zu ersetzen. Es besteht aber auch die Möglichkeit der direkten Applikation therapeutischer Gene im geschädigten Gelenk und damit ein weiterer möglicher Therapieansatz zur Behandlung und vielleicht Heilung der Gonarthrose. Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Studie, dass Pellets aus humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten mittels rAAV-Vektor vergleichbar transduzierbar sind, ohne, dass sich dies negativ auf die Viabilität der Zellen auswirkt. In beiden Zellarten kam es zu einer signifikanten Steigerung der Typ-II-Kollagen-Expression nach Transduktion mit

rAAV-FLAG-hsox9 im Vergleich zur Kontrollgruppe, zudem verminderte sich die Typ-X-Kollagen-Expression. Im Rahmen der Knorpelgewebe-Analogon-Studie konnten erfolgreich humane Knorpelgewebeanaloge hergestellt werden. In diesen fand ein erfolgreicher Transgenachweis über einen Zeitraum von fast drei Monaten statt.

Die Transduktion von humanen adulten normalen und arthrotischen Chondrozyten mit rAAV-sox9 führt zu einer signifikanten Expression von Markern der Chondrogenese bei gleichzeitiger Reduktion von Hypertrophiemarkern. Somit stellt sox9 eine valide Option zur zukünftigen Gentherapie der Arthrose dar. Zudem zeigt sich ein positiver, langfristiger Einfluss auf gesundes Gewebe, was bei der möglichen klinischen Anwendung bei der Therapie fokaler Knorpeldefekte oder unikompartimentaler Arthrose von Bedeutung sein könnte. Die Technik der Knorpelgewebe-Analogon-Synthese bietet ein neues in-vitro-Forschungsobjekt, das Charakteristika des in-vivo-vorliegenden Knorpelgewebes imitiert. Darüber hinaus sind diese Analoga als potenzieller Gewebeersatz bei der Therapie fokaler Defekte vorstellbar. Zukünftige Studien sollten die mögliche Kombination mit therapeutischen Gen-Vektoren in hoher Dichte untersuchen.

9. Literaturverzeichnis

1. Bijlsma, J.W., F. Berenbaum, and F.P. Lafeber, *Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice*. Lancet, 2011. **377**(9783): p. 2115-26.
2. Hunter, D.J. and S. Bierma-Zeinstra, *Osteoarthritis*. Lancet, 2019. **393**(10182): p. 1745-1759.
3. Peterson, L.F., *Current status of total knee arthroplasty*. Arch Surg, 1977. **112**(9): p. 1099-1104.
4. Ranawat, C.S., *History of total knee replacement*. Journal of the Southern Orthopaedic Association, 2002. **11**(4): p. 218-226.
5. Khan, M., et al., *Knee osteoarthritis: when arthroscopy can help*. Pol Arch Intern Med, 2018. **128**(2): p. 121-125.
6. Cucchiari, M., et al., *Basic science of osteoarthritis*. J Exp Orthop, 2016. **3**(1): p. 22.
7. Cucchiari, M. and H. Madry, *Biomaterial-guided delivery of gene vectors for targeted articular cartilage repair*. Nat Rev Rheumatol, 2019. **15**(1): p. 18-29.
8. Rodriguez-Merchan, E.C. and L.A. Valentino, *The Role of Gene Therapy in Cartilage Repair*. Arch Bone Jt Surg, 2019. **7**(2): p. 79-90.
9. Li, K.C. and Y.C. Hu, *Cartilage tissue engineering: recent advances and perspectives from gene regulation/therapy*. Adv Healthc Mater, 2015. **4**(7): p. 948-68.
10. Becher, C., et al., *Repair of retropatellar cartilage defects in the knee with microfracture and a cell-free polymer-based implant*. Arch Orthop Trauma Surg, 2015. **135**(7): p. 1003-10.
11. Cucchiari, M. and H. Madry, *Genetic modification of mesenchymal stem cells for cartilage repair*. Biomed Mater Eng, 2010. **20**(3): p. 135-43.
12. Hussain, S.M., et al., *Knee osteoarthritis: a review of management options*. Scott Med J, 2016. **61**(1): p. 7-16.
13. Ma, Y., et al., *Anti-hypertrophic effect of synovium-derived stromal cells on costal chondrocytes promotes cartilage repairs*. J Orthop Translat, 2022. **32**: p. 59-68.
14. Shen, G., *The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage*. Orthod Craniofac Res, 2005. **8**(1): p. 11-7.

15. Yamasaki, A., et al., *Expression of type I, type II, and type X collagen genes during altered endochondral ossification in the femoral epiphysis of osteosclerotic (oc/oc) mice*. *Calcif Tissue Int*, 2001. **68**(1): p. 53-60.
16. Frisch, J., et al., *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*, 2014. **5**(4): p. 103.
17. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. *Sports Health*, 2009. **1**(6): p. 461-8.
18. Carballo, C.B., et al., *Basic Science of Articular Cartilage*. *Clin Sports Med*, 2017. **36**(3): p. 413-425.
19. Burr, D.B., *Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004. **12 Suppl A**: p. S20-30.
20. Frisch, J. and M. Cucchiariini, *Gene- and Stem Cell-Based Approaches to Regulate Hypertrophic Differentiation in Articular Cartilage Disorders*. *Stem Cells Dev*, 2016. **25**(20): p. 1495-1512.
21. Wang, J., et al., *Homeostasis of the extracellular matrix of normal and osteoarthritic human articular cartilage chondrocytes in vitro*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. **11**(11): p. 801-9.
22. Mobasheri, A., et al., *The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2017. **13**(5): p. 302-311.
23. Scheidt-Nave, C., et al., *German health interview and examination survey for adults (DEGS) - design, objectives and implementation of the first data collection wave*. *BMC Public Health*, 2012. **12**: p. 730.
24. Postler, A., et al., *Prevalence and treatment of hip and knee osteoarthritis in people aged 60 years or older in Germany: an analysis based on health insurance claims data*. *Clin Interv Aging*, 2018. **13**: p. 2339-2349.
25. Orth, P., et al., *Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair*. *Stem Cells Cloning*, 2014. **7**: p. 1-17.
26. Cucchiariini, M., et al., *A vision on the future of articular cartilage repair*. *Eur Cell Mater*, 2014. **27**: p. 12-6.
27. Finger, S. and L.E. Paulos, *Clinical and biomechanical evaluation of the unloading brace*. *J Knee Surg*, 2002. **15**(3): p. 155-8; discussion 159.

28. Fantini Pagani, C.H., M. Hinrichs, and G.P. Brüggemann, *Kinetic and kinematic changes with the use of valgus knee brace and lateral wedge insoles in patients with medial knee osteoarthritis*. J Orthop Res, 2012. **30**(7): p. 1125-32.
29. Fransen, M., et al., *Exercise for osteoarthritis of the knee: a Cochrane systematic review*. Br J Sports Med, 2015. **49**(24): p. 1554-7.
30. Steinmeyer, J. and Y.T. Kontinen, *Oral treatment options for degenerative joint disease--presence and future*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(2): p. 168-211.
31. Zacher, J., et al., *Topical diclofenac and its role in pain and inflammation: an evidence-based review*. Curr Med Res Opin, 2008. **24**(4): p. 925-50.
32. Madry, H., *Surgical therapy in osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage, 2022, in press, DOI: 10.1016/j.joca.2022.01.012.
33. Lützner, J., et al., *Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **5**(6): p. 309-16.
34. Steadman, J.R., W.G. Rodkey, and K.K. Briggs, *Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes*. J Knee Surg, 2002. **15**(3): p. 170-6.
35. Brittberg, M., *Autologous chondrocyte transplantation*. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S147-55.
36. Angele, P., et al., *Chondral and osteochondral operative treatment in early osteoarthritis*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2016. **24**(6): p. 1743-52.
37. Brouwer, R.W., et al., *Osteotomy for medial compartment arthritis of the knee using a closing wedge or an opening wedge controlled by a Puddu plate. A one-year randomised, controlled study*. J Bone Joint Surg Br, 2006. **88**(11): p. 1454-9.
38. Virolainen, P. and H.T. Aro, *High tibial osteotomy for the treatment of osteoarthritis of the knee: a review of the literature and a meta-analysis of follow-up studies*. Arch Orthop Trauma Surg, 2004. **124**(4): p. 258-61.
39. Ethgen, O., et al., *Health-related quality of life in total hip and total knee arthroplasty. A qualitative and systematic review of the literature*. J Bone Joint Surg Am, 2004. **86**(5): p. 963-74.
40. Parratte, S., et al., *Long-term results of compartmental arthroplasties of the knee: Long term results of partial knee arthroplasty*. Bone Joint J, 2015. **97-b**(10 Suppl A): p. 9-15.

41. Yeo, N.E., et al., *Prospective randomised trial comparing unlinked, modular bicompartmental knee arthroplasty and total knee arthroplasty: a five years follow-up*. *Knee*, 2015. **22**(4): p. 321-7.
42. Armoiry, X., et al., *Autologous Chondrocyte Implantation with Chondrosphere for Treating Articular Cartilage Defects in the Knee: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal*. *Pharmacoeconomics*, 2019. **37**(7): p. 879-886.
43. Riedl, M., et al., *Three-dimensional, Scaffold-Free, Autologous Chondrocyte Transplantation: A Systematic Review*. *Orthop J Sports Med*, 2020. **8**(9): p. 2325967120951152.
44. Shah, S.S. and K. Mithoefer, *Scientific Developments and Clinical Applications Utilizing Chondrons and Chondrocytes with Matrix for Cartilage Repair*. *Cartilage*, 2020: p. 1947603520968884.
45. Hoburg, A., et al., *Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation Is an Effective Treatment at Midterm Follow-up in Adolescents and Young Adults*. *Orthop J Sports Med*, 2019. **7**(4): p. 2325967119841077.
46. Madry, H. *Tissue-Engineered Cartilage*. In: *Principles of Tissue Engineering*, 5th Edition. p. 1034-45. Herausgeber: Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. Verlag: Elsevier, 2020.
47. Trippel, S., et al., *Gene therapy for articular cartilage repair*. *Proc Inst Mech Eng H*, 2007. **221**(5): p. 451-9.
48. Hull, G.A. and M. Devic, *The beta-glucuronidase (gus) reporter gene system. Gene fusions; spectrophotometric, fluorometric, and histochemical detection*. *Methods Mol Biol*, 1995. **49**: p. 125-41.
49. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. *Science*, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
50. Meade, O., et al., *Exploring the design space of AAV transient-transfection in suspension cell lines*. *Methods Enzymol*, 2021. **660**: p. 341-360.
51. Stepanenko, A.A. and H.H. Heng, *Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts*. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2017. **773**: p. 91-103.
52. Kim, T.K. and J.H. Eberwine, *Mammalian cell transfection: the present and the future*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. **397**(8): p. 3173-8.

53. Venkatesan, J.K., A. Rey-Rico, and M. Cucchiari, *Current Trends in Viral Gene Therapy for Human Orthopaedic Regenerative Medicine*. *Tissue Eng Regen Med*, 2019. **16**(4): p. 345-355.
54. High, K.A. and M.G. Roncarolo, *Gene Therapy*. *N Engl J Med*, 2019. **381**(5): p. 455-464.
55. Warnock, J.N., C. Daigre, and M. Al-Rubeai, *Introduction to viral vectors*. *Methods Mol Biol*, 2011. **737**: p. 1-25.
56. Rogers, S. and P. Pfuderer, *Use of viruses as carriers of added genetic information*. *Nature*, 1968. **219**(5155): p. 749-51.
57. Marshall, E., *Gene therapy death prompts review of adenovirus vector*. *Science*, 1999. **286**(5448): p. 2244-5.
58. Stephen, S.L., et al., *Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo*. *J Virol*, 2010. **84**(19): p. 9987-94.
59. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(9): p. 3132-42.
60. Morgan, M.A., et al., *Retroviral gene therapy in Germany with a view on previous experience and future perspectives*. *Gene Ther*, 2021. **28**(9): p. 494-512.
61. Deyle, D.R. and D.W. Russell, *Adeno-associated virus vector integration*. *Curr Opin Mol Ther*, 2009. **11**(4): p. 442-7.
62. Madry, H., et al., *Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage*. *Hum Gene Ther*, 2003. **14**(4): p. 393-402.
63. Gil-Farina, I., et al., *Recombinant AAV Integration Is Not Associated With Hepatic Genotoxicity in Nonhuman Primates and Patients*. *Mol Ther*, 2016. **24**(6): p. 1100-1105.
64. Buning, H., et al., *Recent developments in adeno-associated virus vector technology*. *J Gene Med*, 2008. **10**(7): p. 717-33.
65. McCarty, D.M., S.M. Young, Jr., and R.J. Samulski, *Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors*. *Annu Rev Genet*, 2004. **38**: p. 819-45.
66. Madry, H., et al., *Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system*. *J Gene Med*, 2003. **5**(6): p. 502-9.

67. Wolff, J.A., *The "grand" problem of synthetic delivery*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(8): p. 768-9.
68. Laemmli, U.K., *Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(11): p. 4288-92.
69. Fraley, R., et al., *Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells*. J Biol Chem, 1980. **255**(21): p. 10431-5.
70. Hassett, K.J., et al., *Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines*. Mol Ther Nucleic Acids, 2019. **15**: p. 1-11.
71. Kulkarni, J.A., et al., *The current landscape of nucleic acid therapeutics*. Nat Nanotechnol, 2021. **16**(6): p. 630-643.
72. Klein, T.M., et al., *Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(12): p. 4305-9.
73. Sugar, I.P. and E. Neumann, *Stochastic model for electric field-induced membrane pores. Electroporation*. Biophys Chem, 1984. **19**(3): p. 211-25.
74. Acsadi, G., et al., *Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 815-8.
75. Ormond, K.E., et al., *Human Germline Genome Editing*. Am J Hum Genet, 2017. **101**(2): p. 167-176.
76. Wiedenheft, B., S.H. Sternberg, and J.A. Doudna, *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 331-8.
77. Urnov, F.D., et al., *Genome editing with engineered zinc finger nucleases*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 636-46.
78. Bogdanove, A.J. and D.F. Voytas, *TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting*. Science, 2011. **333**(6051): p. 1843-6.
79. Jinek, M., et al., *RNA-programmed genome editing in human cells*. Elife, 2013. **2**: p. e00471.
80. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
81. Collins, M. and A. Thrasher, *Gene therapy: progress and predictions*. Proc Biol Sci, 2015. **282**(1821): p. 20143003.
82. Friedmann, T., *A brief history of gene therapy*. Nat Genet, 1992. **2**(2): p. 93-8.

83. Langer, R. and J. Vacanti, *Advances in tissue engineering*. J Pediatr Surg, 2016. **51**(1): p. 8-12.
84. Mauck, R.L., et al., *Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels*. J Biomech Eng, 2000. **122**(3): p. 252-60.
85. Häuselmann, H.J., et al., *Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads*. J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 1)**: p. 17-27.
86. Rey-Rico, A., et al., *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, 2015. **18**: p. 118-27.
87. Schneider, U., et al., *A comparative study of 3 different cartilage repair techniques*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2011. **19**(12): p. 2145-52.
88. LaPorta, T.F., et al., *Clinical relevance of scaffolds for cartilage engineering*. Orthop Clin North Am, 2012. **43**(2): p. 245-54, vi.
89. Armiento, A.R., et al., *Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology*. Acta Biomater, 2018. **65**: p. 1-20.
90. Manning, W.K. and W.M. Bonner, Jr., *Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage*. Arthritis Rheum, 1967. **10**(3): p. 235-9.
91. Kato, Y., et al., *Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9552-6.
92. Mohanraj, B., et al., *Time-dependent functional maturation of scaffold-free cartilage tissue analogs*. J Biomech, 2014. **47**(9): p. 2137-42.
93. Kim, M., et al., *Characterization of a cartilage-like engineered biomass using a self-aggregating suspension culture model: molecular composition using FT-IRIS*. J Orthop Res, 2011. **29**(12): p. 1881-7.
94. Oliveria, S.A., et al., *Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(8): p. 1134-41.
95. Evans, C.H., S.C. Ghivizzani, and P.D. Robbins, *Gene Delivery to Joints by Intra-Articular Injection*. Hum Gene Ther, 2018. **29**(1): p. 2-14.

96. Mankin, H.J., et al., *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data.* J Bone Joint Surg Am, 1971. **53**(3): p. 523-37.
97. Weimer, A., et al., *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, 2012. **18**: p. 346-58.
98. Venkatesan, J.K., et al., *SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells.* Stem Cell Res Ther, 2012. **3**(3): p. 22.
99. Cucchiari, M., et al., *Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2.* Tissue Eng Part A, 2011. **17**(15-16): p. 1921-33.
100. Sudbeck, P., et al., *Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9.* Nat Genet, 1996. **13**(2): p. 230-2.
101. Cucchiari, M., et al., *Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(1): p. 158-67.
102. Xiao, X., J. Li, and R.J. Samulski, *Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus.* J Virol, 1998. **72**(3): p. 2224-32.
103. Venkatesan, J.K., et al., *rAAV-mediated overexpression of TGF-beta stably restructures human osteoarthritic articular cartilage in situ.* J Transl Med, 2013. **11**: p. 211.
104. Cucchiari, M., et al., *Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer.* J Cell Mol Med, 2009. **13**(8b): p. 2476-88.
105. Cucchiari, M., et al., *Selective gene expression in brain microglia mediated via adeno-associated virus type 2 and type 5 vectors.* Gene Ther, 2003. **10**(8): p. 657-67.
106. Burn, S.F., *Detection of beta-galactosidase activity: X-gal staining.* Methods Mol Biol, 2012. **886**: p. 241-50.

107. Yang, X., J. Janatova, and J.D. Andrade, *Homogeneous enzyme immunoassay modified for application to luminescence-based biosensors*. Anal Biochem, 2005. **336**(1): p. 102-7.
108. Baird, G.S., D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien, *Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 11984-9.
109. Madry, H. and M. Cucchiaroni, *Clinical potential and challenges of using genetically modified cells for articular cartilage repair*. Croat Med J, 2011. **52**(3): p. 245-61.
110. Peskin, A.V. and C.C. Winterbourn, *A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)*. Clin Chim Acta, 2000. **293**(1-2): p. 157-66.
111. Roberts, L.W., *Survey of factors responsible for reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in plant meristems*. Science, 1951. **113**(2946): p. 692-3.
112. Lutter, A.H., et al., *Applying XTT, WST-1, and WST-8 to human chondrocytes: A comparison of membrane-impermeable tetrazolium salts in 2D and 3D cultures*. Clin Hemorheol Microcirc, 2017.
113. Kim, Y.J., et al., *Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258*. Anal Biochem, 1988. **174**(1): p. 168-76.
114. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
115. Cesarone, C.F., C. Bolognesi, and L. Santi, *Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst*. Anal Biochem, 1979. **100**(1): p. 188-97.
116. Latt, S.A. and G. Stetten, *Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis*. J Histochem Cytochem, 1976. **24**(1): p. 24-33.
117. Martin, T.L., E.J. Mufson, and M.M. Mesulam, *The light side of horseradish peroxidase histochemistry*. J Histochem Cytochem, 1984. **32**(7): p. 793.
118. Aydin, S., *A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA*. Peptides, 2015. **72**: p. 4-15.
119. Ohan, N.W. and J.J. Heikkila, *Reverse transcription-polymerase chain reaction: an overview of the technique and its applications*. Biotechnol Adv, 1993. **11**(1): p. 13-29.

120. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
121. Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. J Mol Endocrinol, 2002. **29**(1): p. 23-39.
122. Yin, J.L., et al., *Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I*. Immunol Cell Biol, 2001. **79**(3): p. 213-21.
123. Hoemann, C.D., et al., *A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage*. Anal Biochem, 2002. **300**(1): p. 1-10.
124. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
125. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
126. Tan, S.C. and B.C. Yiap, *DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present*. J Biomed Biotechnol, 2009. **2009**: p. 574398.
127. Rosenberg, L., *Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1971. **53**(1): p. 69-82.
128. Cucchiaroni, M., et al., *Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2*. Mol Ther, 2005. **12**(2): p. 229-38.
129. Scheuner, G. and J. Hutschenreiter, *[Metachromasia, double refraction and dichroism caused by Toluidine Blue reaction (author's transl)]*. Prog Histochem Cytochem, 1975. **7**(2): p. 1-73.
130. Sridharan, G. and A.A. Shankar, *Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility*. J Oral Maxillofac Pathol, 2012. **16**(2): p. 251-5.
131. Andrés-Manzano, M.J., V. Andrés, and B. Dorado, *Oil Red O and Hematoxylin and Eosin Staining for Quantification of Atherosclerosis Burden in Mouse Aorta and Aortic Root*. Methods Mol Biol, 2015. **1339**: p. 85-99.
132. Nakane, P.K. and A. Kawaoi, *Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation*. J Histochem Cytochem, 1974. **22**(12): p. 1084-91.

133. Shu, J., et al., *Statistical colour models: an automated digital image analysis method for quantification of histological biomarkers*. Biomed Eng Online, 2016. **15**: p. 46.
134. Frisch, J., et al., *Genetic Modification of Human Peripheral Blood Aspirates Using Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Articular Cartilage Repair with a Focus on Chondrogenic Transforming Growth Factor-beta Gene Delivery*. Stem Cells Transl Med, 2017. **6**(1): p. 249-260.
135. Frisch, J., et al., *Chondrogenic Differentiation Processes in Human Bone Marrow Aspirates upon rAAV-Mediated Gene Transfer and Overexpression of the Insulin-Like Growth Factor I*. Tissue Eng Part A, 2015. **21**(17-18): p. 2460-71.
136. Venkatesan, J.K., et al., *Impact of mechanical stimulation on the chondrogenic processes in human bone marrow aspirates modified to overexpress sox9 via rAAV vectors*. J Exp Orthop, 2017. **4**(1): p. 22.
137. Arai, Y., et al., *Gene delivery to human chondrocytes by an adeno associated virus vector*. J Rheumatol, 2000. **27**(4): p. 979-82.
138. Ulrich-Vinther, M., et al., *Adeno-associated vector mediated gene transfer of transforming growth factor-beta1 to normal and osteoarthritic human chondrocytes stimulates cartilage anabolism*. Eur Cell Mater, 2005. **10**: p. 40-50.
139. Lefebvre, V., et al., *SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 2336-46.
140. Akiyama, H., et al., *Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation*. Genes Dev, 2004. **18**(9): p. 1072-87.
141. Rey-Rico, A., et al., *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, 2015. **103**(1): p. 371-83.
142. Goldring, M.B., K. Tsuchimochi, and K. Ijiri, *The control of chondrogenesis*. J Cell Biochem, 2006. **97**(1): p. 33-44.
143. Akiyama, H., et al., *The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2813-28.
144. Kypriotou, M., et al., *SOX9 exerts a bifunctional effect on type II collagen gene (COL2A1) expression in chondrocytes depending on the differentiation state*. DNA Cell Biol, 2003. **22**(2): p. 119-29.

145. Lee, H.H., et al., *Persistence, localization, and external control of transgene expression after single injection of adeno-associated virus into injured joints*. Hum Gene Ther, 2013. **24**(4): p. 457-66.
146. Watson Levings, R.S., et al., *Self-Complementary Adeno-Associated Virus-Mediated Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Delivery for the Treatment of Osteoarthritis: Test of Efficacy in an Equine Model*. Hum Gene Ther Clin Dev, 2018. **29**(2): p. 101-112.
147. Cucchiarini, M., H. Madry, and E.F. Terwilliger, *Enhanced expression of the central survival of motor neuron (SMN) protein during the pathogenesis of osteoarthritis*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(1): p. 115-24.
148. Lange, C., et al., *rAAV-Mediated sox9 Overexpression Improves the Repair of Osteochondral Defects in a Clinically Relevant Large Animal Model Over Time In Vivo and Reduces Perifocal Osteoarthritic Changes*. Am J Sports Med, 2021. **49**(13): p. 3696-3707.
149. Evans, C.H. and J. Huard, *Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(4): p. 234-42.
150. Madry, H. and M. Cucchiarini, *Gene therapy for human osteoarthritis: principles and clinical translation*. Expert Opin Biol Ther, 2016. **16**(3): p. 331-46.
151. Mohanraj, B., et al., *A high-throughput model of post-traumatic osteoarthritis using engineered cartilage tissue analogs*. Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**(9): p. 1282-90.

10. Publikationen

10.1 Veröffentlichungen

Daniels, O., Frisch, J., Venkatesan, J.K., Rey-Rico, A., Schmitt, G., Cucchiarini, M., *Effects of rAAV-mediated sox9 overexpression on the biological activities of human osteoarthritic articular chondrocytes in their intrinsic three-dimensional environment.* Journal of Clinical Medicine, 2019. 8(10): p. 1637 (Impact-Faktor 2019: 5.688)

Cai, X., **Daniels, O.**, Cucchiarini, M., Madry, H., *Ectopic models recapitulating morphological and functional features of articular cartilage.* Annals of Anatomy, 2021. 237: p. 151721 (Impact-Faktor 2021: 2.388)

10.2 Poster

Oliver Mueller, Janina Frisch, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K. Venkatesan, Gertrud Schmitt, Henning Madry, Magali Cucchiarini, *rAAV-mediated gene transfer as a potential means to genetically modify human normal and osteoarthritic articular chondrocytes in a high density, three-dimensional environment.* Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) 24.10.-27.10.2017, Berlin, Deutschland; Posterpräsentation am 25.10.2017

Nominiert für die Preisträgersitzung der besten experimentellen Poster.

Oliver Mueller, Janina Frisch, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K. Venkatesan, Gertrud Schmitt, Henning Madry, George R. Dodge, Magali Cucchiarini, *Effective genetic modification of human articular chondrocytes via rAAV vectors in cartilage tissue analogs for cartilage engineering*. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) 24.10.-27.10.2017, Berlin, Deutschland; Posterpräsentation am 25.10.2017

Oliver Mueller, Janina Frisch, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K. Venkatesan, Gertrud Schmitt, Henning Madry, George R. Dodge, Magali Cucchiarini, *Effective, durable rAAV-mediated gene transfer in human articular chondrocytes in a tissue engineered scaffold-free cartilage analog platform*. Jahreskongress der Orthopaedic Research Society (ORS) 19.03.-22.03.2017, San Diego, Kalifornien, USA; Posterpräsentation am 21. und 22.03.2017

Oliver Mueller, Janina Frisch, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K. Venkatesan, Gertrud Schmitt, Henning Madry, Magali Cucchiarini, *Durable rAAV-mediated gene transfer in human normal and osteoarthritic articular chondrocytes in three-dimensional culture conditions*. Jahreskongress der Orthopaedic Research Society (ORS) 19.03.-22.03.2017, San Diego, Kalifornien, USA; Posterpräsentation am 21. und 22.03.2017

11. Danksagungen

Am Ende der vorliegenden Arbeit spreche ich meinen tiefsten Dank allen Personen und Institutionen aus, die mich auf dem Weg zur Vollendung der Dissertation begleitet haben.

Frau Professor Magali Cucchiarini Madry, meiner Doktormutter, für den offenen und herzlichen Umgang über den gesamten Verlauf der Promotion. Während der Arbeit im Labor und darüber hinaus war und ist es ihr stetes Bestreben, die gemeinsame wissenschaftliche Arbeit durch fortwährenden Diskurs auf Augenhöhe und ein Zusammengehörigkeitsgefühl in der Arbeitsgruppe zu fördern.

Herr Professor Henning Madry, der im Herbst 2010 durch eine Arthroskopie meines rechten Kniegelenks den Grundstein für mein Interesse am Fach Orthopädie legte. Einige Jahre später durfte ich unter ihm mit großen Freiheiten forschen und auch eigene Denkansätze experimentell verfolgen.

Beide Professoren engagierten sich für eine sowohl nationale, als auch internationale Präsentation der geleisteten Forschungsarbeit. So wurden mir Reisen nach Berlin und San Diego ermöglicht, für die ich bis heute überaus dankbar bin.

Frau Doktor Ana Rey-Rico, Frau Doktor Janine Frisch, Herrn Doktor Jagadeesh K. Venkatesan und Frau Gertrud Schmitt für die umfassende Einarbeitung und Unterstützung bei Arbeitsabläufen. Aus kollegialen Beziehungen wurden Freundschaften, die auch über die gemeinsame Zeit im Labor anhalten.

Herr Professor George R. Dodge, Universität von Pennsylvania, für die Einarbeitung in seine „*Cartilage tissue analog*“-Experimente, das Überlassen von Labormaterialien und Denkanstöße während der experimentellen Arbeit.

Der **Universität des Saarlandes**, insbesondere dem Graduiertenprogramm GradUS, und dem **Jungen Forum O&U der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie**, die durch ihre Stipendien die Reise in die USA zum Jahreskongress der *Orthopaedic Research Society (ORS)* in San Diego und zum Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie nach Berlin ermöglichen haben.

Abschließend danke ich meinen **Eltern** und meiner **Ehefrau Nina Daniels**, die mich als emotionale Stütze auf dem Weg zur Fertigstellung meiner Arbeit begleitet haben.

12. Lebenslauf