

Aus der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. D. Kohn

Gentransfer zur Verbesserung der Knorpelreparatur

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008

vorgelegt von: Patrick Orth
geboren am: 19. Dezember 1980 in Groß-Gerau

Für Christina und meine Eltern.

Inhalt

1.	Zusammenfassung/Abstract	1
2.	Einleitung	3
2.1	Problematik und Überblick	3
2.2	Biologische Grundlagen des hyalinen Gelenkknorpels	4
2.3	Einteilung der Knorpeldefekte	5
2.4	Klinische Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten	6
2.5	Experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten	7
2.5.1	Allgemeine Prinzipien des Gentransfers	7
2.5.2	Gentransfersysteme	8
2.5.3	Therapeutische Faktoren	9
2.5.4	Gentransfer-basierte Therapie fokaler Gelenkknorpeldefekte	10
2.5.5	Konzept der vorliegenden Arbeit	11
3.	Fragestellung	13
4.	Material	14
4.1	Lösungen, Puffer und Medien	14
4.2	Chemikalien	17
4.3	Biologische Materialien	18
4.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
5.	Methoden	22
5.1	Überblick	22
5.2	Zellkultur	23
5.3	Amplifikation der Plasmid-DNS	24
5.4	Evaluation von Gentransfersystemen	25
5.5	Herstellung der Alginate-Sphäroide	30
5.6	<i>In vitro</i> Experimente	32
5.6.1	Zeitverlauf-Studie	32
5.6.2	Verschiedene Sphäroide <i>in vitro</i>	33

5.7	<i>In vivo</i> Experimente	34
5.7.1	Implantation der Alginat-Sphäroide	34
5.7.2	Sektion der Tiere	36
5.7.3	Evaluation der Synovialflüssigkeit	36
5.7.4	Biochemische Evaluation des Reparaturgewebes	36
5.7.5	Histologische Evaluation der Gelenke	38
5.8	Statistische Analyse	42
6.	Ergebnisse	43
6.1	Evaluation von Gentransfersystemen	43
6.2	<i>In vitro</i> Experimente	49
6.2.1	Zeitverlauf-Studie	49
6.2.2	Verschiedene Sphäroide <i>in vitro</i>	51
6.3	<i>In vivo</i> Experimente	53
6.3.1	Evaluation der Synovialflüssigkeit	53
6.3.2	Biochemische Evaluation des Reparaturgewebes	54
6.3.3	Histologische Evaluation der Gelenke	55
7.	Diskussion	61
7.1.	Evaluation von Gentransfersystemen	61
7.2.	<i>In vitro</i> Experimente	65
7.3.	<i>In vivo</i> Experimente	67
7.4.	Ausblick	77
8.	Literaturverzeichnis	79
9.	Publikationen	96
10.	Danksagung	98
11.	Lebenslauf	99

Abbildungen

Abb. 1:	Mikroskopischer Aufbau des lapinen hyalinen Gelenkknorpels	5
Abb. 2:	Übersicht über die durchgeführten Experimente und Evaluationen	22
Abb. 3:	Implantation der Alginat-Sphäroide	35
Abb. 4:	Analyse der Transgenexpression von Gelenkchondrozyten	43
Abb. 5:	Analyse der Transgenexpression von Muskelzellen	44
Abb. 6:	Analyse der Transgenexpression von Zellen einer fibrösen Dysplasie	45
Abb. 7:	Analyse der Transgenexpression von Osteosarkomzellen	45
Abb. 8:	Analyse der Transgenexpression von Chondrosarkomzellen	46
Abb. 9:	Analyse der Transgenexpression von embryonalen Nierenzellen	46
Abb. 10:	Analyse der Transgenexpression von dermalen Fibroblasten	47
Abb. 11:	Zusammenfassung der Effizienz verschiedener Transfektionssysteme	47
Abb. 12:	Histologische Darstellung der Alginat-Sphäroide	52
Abb. 13:	HE-gefärbte histologische Schnitte der Defekte	55
Abb. 14:	Immunhistochemisch gefärbte histologische Schnitte der Defekte	56
Abb. 15:	Safranin-O-gefärbte histologische Schnitte der Defekte	58

Tabellen

Tab. 1:	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien	14
Tab. 2:	Bezugsquellen weiterer Chemikalien	17
Tab. 3:	Herkunft der verwendeten Zellen und Zelllinien	18
Tab. 4:	Eigenschaften der verwendeten Vektoren	19
Tab. 5:	Verwendete monoklonale Antikörper	19
Tab. 6:	Eingesetzte Laborgeräte	20
Tab. 7:	Zellzahlen/ <i>well</i> bei Aussaat	25
Tab. 8:	Eingesetzte Transfektionsreagenzien	25
Tab. 9:	Schema des DMMB-Test	37
Tab. 10:	Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Synovialmembran	39
Tab. 11:	Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Knorpelreparatur	41
Tab. 12:	Proliferation und Vitalität verkapselter Zellen sowie Sekretion der Wachstumsfaktoren im Zeitverlauf	50
Tab. 13:	Zellproliferation und Vitalität in verschiedenen Sphäroiden über 21 Tage <i>in vitro</i>	51
Tab. 14:	Biochemische Evaluation der Reparaturgewebe	54
Tab. 15:	Entzündungszeichen der Synovialmembran in der IGF-I-Gruppe	55
Tab. 16:	Entzündungszeichen der Synovialmembran in der IGF-I/FGF-2-Gruppe	56
Tab. 17:	Semiquantitative Auswertung der Typ-I-Kollagen-Immunreaktivität	57
Tab. 18:	Semiquantitative Auswertung der Typ-II-Kollagen-Immunreaktivität	57
Tab. 19:	Effekte der IGF-I-Sphäroide auf die histologische Beurteilung der Knorpelreparatur	59
Tab. 20:	Effekte der IGF-I/FGF-2-Sphäroide auf die histologische Beurteilung der Knorpelreparatur	59

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ABC	<i>avidin-biotin-peroxidase complex</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
aqua bidest.	aqua bidestillata
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DAC	3β-[N-(N,N'-dimethylaminoethan)carbonyl]-Cholesterol
D-MEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblau
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOSPER	1,3-Dioleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid
DOTAP	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammoniumpropan
DOTMA	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	et alii/et aliae
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm; Schwerebeschleunigung
G	<i>Gauge</i>
GDF	<i>growth/differentiation factor</i>
h	Stunde(n)
HBS	<i>HEPES-buffered saline</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IGF-I	insulinartiger Wachstumsfaktor I
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase-Gen
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
m/V	Masse/Volumen
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
ms	Millisekunde
n.b.	nicht bestimmt
ng	Nanogramm
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
o.g.	oben genannt(e/r)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<i>P. pyralis</i>	<i>Photinus pyralis</i>
PTHrP	<i>parathyroid hormone-related protein</i>
RLU	<i>relative light units</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunde
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNE	Tris-Natrium-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
U	<i>unit</i>
u.a.	unter anderem/n
vgl.	vergleiche
V/V	Volumen/Volumen
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1. Zusammenfassung/Abstract

Fragestellung. Defekte des hyalinen Gelenkknorpels heilen nicht. Gentransfer-basierte Therapiestrategien sind ein experimenteller Ansatz zur Lösung dieses Problems. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Hypothesen, dass (1) Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates effizient mittels nicht-viralem Gentransfer modifizierbar sind, dass (2) transfizierte Zellen -verkapselt in Alginate- eine hohe Vitalität und Transgenexpression von humanem insulinartigem Wachstumsfaktor I (IGF-I) und Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) *in vitro* zeigen und dass (3) die kombinierte Überexpression von IGF-I und FGF-2 durch modifizierte Fibroblasten die Knorpelreparatur im Kaninchenmodell in höherem Maß verbessert als die alleinige Überexpression von IGF-I.

Methoden. Primäre lapine Gelenkchondrozyten, lapine Muskelzellen und humane Zellen der fibrösen Dysplasie sowie etablierte humane Osteosarkomzellen (SAOS-2), Chondrosarkomzellen (CS-1), murine Fibroblasten (NIH 3T3) und embryonale Nierenzellen (293) wurden unter optimierten Bedingungen mittels Nanofectin 1 und 2, Superfect, JetPEI, Escort III, GeneJammer, Effectene, TransPass D2, FuGENE 6, Lipofectamine 2000, Metafectene, Dreamfect und Calciumphosphat Co-Präzipitaten transfiziert und die maximale Transgenexpression bestimmt. Alginate-Sphäroide mit FuGENE 6-transfizierten NIH 3T3 Fibroblasten wurden *in vitro* auf Zellzahl, Vitalität der Zellen und Sekretion von rekombinantem IGF-I und FGF-2 untersucht. *In vivo* beurteilten wir die Reparatur osteochondraler Defekte 3 Wochen nach Implantation von IGF-I- und IGF-I/FGF-2-Sphäroiden in lapine Kniegelenke gemäß biochemischer, immunhistochemischer und histologischer Analyse.

Ergebnisse. NIH 3T3 Fibroblasten liessen sich effizient mit nicht-viralen Methoden transfizieren (Effizienz: $48,9 \pm 13,0\%$). *In vitro* sezernierten diese Zellen in Alginate relevante Mengen IGF-I ($314 \text{ ng}/10^7 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$) über mindestens sieben Tage und FGF-2 ($32 \text{ ng}/10^7 \text{ Zellen}/24 \text{ h}$) über mindestens vier Tage. In den Sphäroiden nahm die Gesamtzahl der Zellen über 21 Tage zu, ihre Vitalität jedoch ab. *In vivo* resultierte der kombinierte Gentransfer von IGF-I und FGF-2 in einer signifikant besseren Reparatur osteochondraler Defekte als die alleinige Behandlung mit IGF-I.

Schlussfolgerungen. Optimierte nicht-virale Gentransfer-Methoden erzielten relativ hohe Effizienzen in Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates. Alginate-verkapselte, IGF-I- und FGF-2-transfizierte NIH 3T3 Fibroblasten zeichneten sich durch eine relativ kurzzeitige, aber hohe Transgenexpression aus, die therapeutische Effekte *in vivo* induzierte. Die Daten belegen den potentiellen Nutzen gentherapeutischer Ansätze zur Behandlung fokaler Knorpeldefekte und die Überlegenheit des kombinierten Gentransfers gegenüber einer Monotherapie. Nachfolgende Studien sollten die Möglichkeiten einer verlängerten Transgenexpression sowie die Eigenschaften des Reparaturgewebes über längere Beobachtungszeiträume untersuchen.

Gene transfer for enhanced cartilage repair

Introduction. Articular cartilage defects do not heal spontaneously. Gene-based therapeutic concepts are an experimental approach to solve this problem. In the present study we tested the hypotheses whether (1) cells of the musculoskeletal system can be transfected efficiently using nonviral gene transfers systems, whether (2) transfected cells -encapsulated in alginate spheres- show high viability and transgene expression of the insulin-like growth-factor I (IGF-I) and fibroblast growth factor 2 (FGF-2) *in vitro* and whether (3) combined overexpression of IGF-I and FGF-2 by genetically modified fibroblasts enhances cartilage repair in a rabbit model in a magnitude that is larger than with IGF-I alone.

Methods. Primary cultures of lapine articular chondrocytes, lapine skeletal muscle cells, human cells from fibrous dysplasia and cell lines established from human osteosarcoma (SAOS-2) or chondrosarcoma (CS-1), human embryonic kidney cells (293) and murine fibroblasts (NIH 3T3) were transfected under optimized conditions using Nanofectin 1 and 2, Superfect, JetPEI, Escort III, GeneJammer, Effectene, TransPass D2, FuGENE 6, Lipofectamine 2000, Metafectene, Dreamfect and calcium phosphate co-precipitates. *In vitro*, alginate spheres containing transfected NIH 3T3 cells were examined for cell numbers, viability of the cells and expression patterns of recombinant IGF-I and FGF-2. *In vivo*, 21 days after transplantation of IGF-I and IGF-I/FGF-2 spheres into rabbit knee joints, we evaluated the repair of osteochondral defects by biochemical, immunohistochemical and histological analysis.

Results. NIH 3T3 fibroblasts can be transfected at high efficiencies using nonviral systems ($48,9 \pm 13,0\%$). Transfected cells secrete relevant amounts of IGF-I ($314 \text{ ng}/10^7 \text{ cells}/24 \text{ h}$) for at least seven days and FGF-2 ($32 \text{ ng}/10^7 \text{ cells}/24 \text{ h}$) for at least four days *in vitro*. Within the spheres, total cell numbers increased but cell viability decreased over 21 days. *In vivo*, combined gene transfer of IGF-I and FGF-2 significantly improved the repair of cartilage defects compared to the treatment with IGF-I alone.

Conclusions. Nonviral gene transfer methods can be optimized to achieve relatively high transfection efficiencies in cells of the musculoskeletal system. IGF-I- and FGF-2-transfected NIH 3T3 cells embedded in alginate show a comparatively high but short-term transgene expression, sufficient to promote therapeutic effects *in vivo*. The data prove the potential value of gene-based approaches for the treatment of focal cartilage defects and suggest that gene delivery of combinations of growth factors may be more beneficial than the application of single factors alone. Future studies need to focus on prolonging transgene expression and to evaluate the long-term properties of the repair tissue.

2. Einleitung

2.1 Problematik und Überblick

Hyaliner Gelenkknorpel hat nur eine eingeschränkte Heilungsfähigkeit (O'Driscoll, 1998; Hunziker, 2002). Knorpeldefekte sind daher ein ungelöstes Problem in der klinischen Orthopädie. Bislang hat kein Therapieansatz zu einer kompletten Knorpelregeneration geführt (Buckwalter und Mankin, 1998). Defekte des hyalinen Gelenkknorpels entstehen durch verschiedene Mechanismen, wie vor allem traumatische Schädigungen oder auch eine Osteochondrosis dissecans. Diese Defekte können in der Folge durch ein Reparaturgewebe aufgefüllt werden, welches strukturelle Ähnlichkeit mit dem gesunden Knorpelgewebe aufweist. Es handelt sich jedoch um Faserknorpel, der nicht in der Lage ist, über einen längeren Zeitraum mechanischer Belastung standzuhalten. Sollten derartige Defekte nicht behandelt werden, droht die Entstehung einer sekundären Arthrose (Mankin, 1982; Madry und Pape, 2008). Ziel aller Therapieverfahren muss daher die Bildung eines Regenerationsgewebes sein, welches dem normalen Knorpel identisch und in der Lage ist, den physiologischen Belastungen des Gelenks auf Dauer standzuhalten.

Wachstumsfaktoren sind chemische Boten, die die Knorpelreparatur verbessern (Trippel, 1997; Goldberg, 2001). Jedoch wird ihre therapeutische Wirksamkeit durch eine sehr kurze intraartikuläre Halbwertszeit deutlich reduziert (Shida et al., 1996; Chuma et al., 2004). Der Transfer von Wachstumsfaktor-Genen in Zellen des Reparaturgewebes ist eine interessante Strategie, um diese therapeutischen Faktoren lokal über prolongierte Zeiträume zur Verfügung zu stellen: Werden genetisch modifizierte Zellen in Knorpeldefekte implantiert, kann ihre Wachstumsfaktor-Sekretion die Defektreparatur nachhaltig verbessern (Cucchiari und Madry, 2005).

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir, welche Zellen hierfür am besten geeignet sind. Dabei wurden insgesamt dreizehn verschiedene Transfektionssysteme in sieben unterschiedlichen Zelltypen evaluiert. Anschließend transfizierten wir murine NIH 3T3 Fibroblasten mit Plasmidexpressionsvektoren für IGF-I und FGF-2, verkapselten die Zellen in Alginate und implantierten sie in osteochondrale Defekte in den Kniegelenken von Kaninchen. Die Knorpelreparatur wurde nach drei Wochen anhand etablierter Bewertungssysteme beurteilt. Zusätzlich bestimmten wir den Typ-I- und Typ-II-Kollagen-, den DNS- sowie den Proteoglykan-Gehalt im Reparaturgewebe sowie die Wachstumsfaktor-Konzentration der Synovialflüssigkeit.

2.2 Biologische Grundlagen des hyalinen Gelenkknorpels

Hyaliner Gelenkknorpel ist ein bradytrophes, avaskuläres, anervales und alymphatisches Gewebe. Chondrozyten sind die spezifischen Zellen des Knorpelgewebes und werden durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit ernährt (Buckwalter, 1983). Sie machen nur circa 10% des Gewebavolumens aus und produzieren die sie umgebende Matrix. Ihre Aktivität ist altersabhängig: Nach Ablauf der Wachstumsphase reduzieren diese Zellen ihre metabolische und mitotische Aktivität und ihre Anzahl verringert sich (Buckwalter et al., 1993; Buckwalter und Mankin, 1998; Martin et al., 2003). Die Chondrozyten sind in ein dichtes Netzwerk aus extrazellulärer Matrix eingebettet. Diese ist reich an makromolekularen Protein-Polysaccharid-Komplexen, sogenannten Proteoglykanen. Das für den Gelenkknorpel charakteristische Proteoglykan ist Aggrekan (Hardingham und Fosang, 1992). Proteoglykanuntereinheiten lagern an Hyaluronsäure an und wirken stark hydrophil -der Grund für den hohen hydrodynamischen Druck des Knorpelgewebes. Kollagen vom Typ II ist das Hauptkollagen des hyalinen Knorpels. Es macht etwa 50% der Trockenmasse dieses Gewebes und 90-95% des Gesamtkollagens aus und zeichnet im Wesentlichen verantwortlich für die speziellen Materialeigenschaften des Gelenkknorpels (Bora und Miller, 1987). Des Weiteren findet man im hyalinen Gelenkknorpel Kollagene vom Typ V, VI, IX, X, XI und XIV sowie eine Reihe anderer Makromoleküle, darunter *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), Decorin, Fibronectin oder Fibromodulin. Typ-I-Kollagen ist hingegen ein Indikator für fibrösen Reparaturknorpel, wie er bei der spontanen Heilung unbehandelter Knorpeldefekte entsteht.

Architektonisch gliedert sich der hyaline Gelenkknorpel in vier Schichten (Abb. 1). Apikal bildet die Lamina splendens die Oberfläche des Gelenks. Diese fibröse Schicht mit zahlreichen, parallel zur Oberfläche angeordneten Kollagenfibrillen fungiert als selektive Barriere bei der trophischen Versorgung der Chondrozyten. Es schließt sich nach basal die Tangentialzone mit abgeflachten Chondrozyten an. In der Transitionalzone finden sich rundliche, typischerweise in senkrecht zur Oberfläche verlaufenden Säulen angeordnete Knorpelzellen. Die ebenfalls senkrecht zur Gelenkoberfläche verlaufenden Kollagenfasern verhindern ein horizontales Ablösen der einzelnen Schichten voneinander. Als *tidemark* wird die Grenze zwischen verknöchertem Knorpelgewebe und der Transitionalzone bezeichnet. In der basal dazu gelegenen Zone verknöcherten Knorpels finden sich hypertrophe Chondrozyten. Hier wird über solide Verbindungen die Übertragung von Scherkräften vom Gelenkknorpel auf den subchondralen Knochen ermöglicht.

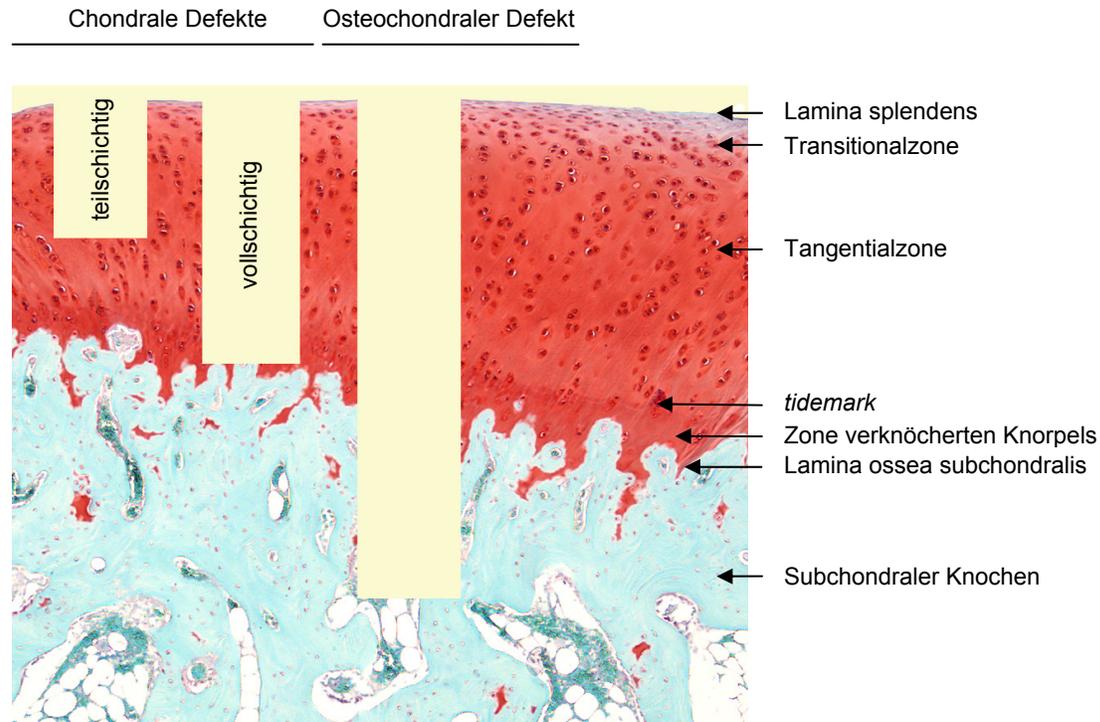


Abb. 1: Mikroskopischer Aufbau des lapinen hyalinen Gelenkknorpels (Safranin-O-Färbung; Vergrößerung: 40x).

2.3 Einteilung der Knorpeldefekte

Defekte des Gelenkknorpels werden nach ihrer Ausdehnungstiefe klassifiziert (Abb. 1). Bei einer Beschränkung der Läsion auf das Knorpelgewebe spricht man von chondralen Defekten. Diese werden wiederum unterteilt in teilschichtige (*partial thickness*) und vollschichtige (*full thickness*) Defekte, je nachdem, ob sich der Defekt nur oberflächlich darstellt oder basal bis auf die Lamina ossea subchondralis hinabreicht. Im klinischen Alltag findet sich diese wichtige Einteilung in den arthroskopischen Klassifikationen nach Noyes und Stabler (1989) oder der *International Cartilage Research Society* (Brittberg und Winalski, 2003) wieder, die sich von der Klassifikation nach Outerbridge (1961) durch eine exaktere Beschreibung der Defekttiefe unterscheiden. Chondrale Knorpeldefekte können durch eingewanderte Synoviozyten aufgefüllt werden (Hunziker und Rosenberg, 1996; Hunziker, 2002).

Ist bei einem Knorpeldefekt auch der subchondrale Knochen verletzt, so spricht man von einem osteochondralen Defekt. Durch die Kommunikation des betreffenden Knorpelareals mit dem Knochenmark kann sich in diesem Fall ein Blutgerinnsel im Defekt bilden (Furukawa et al., 1980; Shapiro et al., 1993; Jackson et al., 2001). Die darin enthaltenen pluripotenten mesenchymalen Zellen ermöglichen die Neubildung sowohl von knorpeligem Reparaturgewebe als auch von subchondralem Knochen.

Bei beiden Defekttypen erscheint das Reparaturgewebe bereits nach einigen Monaten faserartig, ist der mechanischen Beanspruchung nicht länger gewachsen und degeneriert nach einigen Jahren (Jackson et al., 2001). Eine Ausbreitung des Defekts in angrenzende Knorpelregionen kann häufig nicht verhindert werden. Knorpelreparatur meint folglich die Bildung eines Gewebes, das in seiner Struktur dem normalen Knorpel lediglich ähnlich ist. Der Terminus Knorpelregeneration beschreibt hingegen den Ersatz durch vollwertigen hyalinen Gelenkknorpel ohne das Auftreten faserknorpeliger Degeneration (Madry, 2004).

2.4 Klinische Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten

In der klinischen Orthopädie wird eine Vielzahl von Ansätzen zur Behandlung von Knorpeldefekten verfolgt. An konservativen Maßnahmen stehen verschiedene Optionen wie Physiotherapie, orthopädietechnische Versorgung oder Kryo- und Elektrotherapie zur Verfügung. Die Gabe von Analgetika wie NSAR oder Opioiden sind weitere Standbeine der konservativen symptomatischen Therapie (Fritz et al., 2006).

Operative Therapieansätze gliedern sich in zell- und gewebebasierte Verfahren. Dabei verfolgen zellbasierte operative Ansätze wie subchondrale Bohrungen (Pridie, 1959), die Abrasionsarthroplastik (Johnson, 1986) oder Mikrofrakturierungen (Steadman et al., 1999) das Ziel der Eröffnung des Markraumes. Durch die konsekutive Immigration von Knochenmarkszellen in den Defekt wird die zelluläre Grundlage für das Reparaturgewebe geschaffen (siehe 2.3). Die autologe Chondrozytentransplantation ohne (Brittberg et al., 1994) oder mit (Ochi et al., 2002) einer biodegradierbaren Trägersubstanz stellt ein weiteres zellbasiertes operatives Verfahren zur Behandlung von Knorpeldefekten dar, das jedoch im Gegensatz zu oben genannten Ansätzen ohne eine Markraumeröffnung auskommt (Jones und Peterson, 2006; Madry und Pape, 2008).

Dem gegenüber stehen die gewebebasierten operativen Verfahren, die sich auf die Transplantation chondrogener periostaler (O'Driscoll und Salter, 1984) oder perichondrialer (Bulstra et al., 1990) Gewebe stützen. In diese Gruppe fallen außerdem die Methoden der autologen oder allogenen osteochondralen Transplantation (Hangody et al., 1998; Braun et al., 2007). Dabei sind das *Osteochondral-Autograft-Transfer-System* (OATS) und die Mosaikplastik zu nennen, bei denen Knorpel-Knochen-Zylinder unterschiedlicher Größe aus gering belasteten Regionen des Gelenks in den Bereich der Knorpeldefekte der Belastungszonen transplantiert werden (Imhoff et al., 1999; Schnettler et al., 2008).

2.5 Experimentelle Therapiestrategien bei fokalen Gelenkknorpeldefekten

Neben den etablierten operativen und konservativen Möglichkeiten der Behandlung fokaler Knorpeldefekte stehen alternativ experimentelle Wege offen. Diese basieren grundsätzlich auf der Applikation therapeutischer Faktoren in die Defektareale mit dem Ziel der Intervention in die Knorpelhomöostase. Man unterscheidet dabei zwischen Förderung anaboler Prozesse, beispielsweise durch Wachstumsfaktoren wie IGF-I oder FGF-2, und Hemmung kataboler Prozesse.

Am Beispiel verschiedener therapeutischer Faktoren wurde gezeigt, dass diese sowohl als Protein frei in die Gelenkhöhle injiziert (Jentzsch et al., 1980; van Beuningen et al., 1988; Rogachefsky et al., 1993; Yamamoto et al., 2004) als auch gebunden an eine Trägersubstanz in Knorpeldefekte eingebracht werden können (Sellers et al., 1997; Nixon et al., 1999; Fortier et al., 2002; Mierisch et al., 2002; Tuncel et al., 2005; Sohler et al., 2007). Limitiert wird dieser konzeptionell einfache Ansatz durch die kurze Halbwertszeit der Peptide, speziell von IGF-I und FGF-2 (Chuma et al., 2004). Dadurch ist ihr Nachweis in der Synovialflüssigkeit bereits eine Stunde nach intraartikulärer Injektion nicht mehr möglich (Shida et al., 1996). Um trotzdem einen therapeutischen Effekt der Faktoren zu erzielen, müssen entweder hohe Dosen des Proteins verabreicht werden (Fujimoto et al., 1999) oder die Applikation erfolgt kontinuierlich (Otsuka et al., 1997; Mizuta et al., 2004).

Alternativ besteht die Möglichkeit, DNS-Sequenzen der therapeutischen Faktoren in jene Zellen einzubringen, die an der Besiedelung der Defektareale teilnehmen. Diese genetische Modifikation, auch als Gentransfer bezeichnet, ermöglicht den Zellen die kontinuierliche Sekretion der Faktoren lokal innerhalb der Läsion (Cucchiari und Madry, 2005). Im Folgenden sollen die Grundzüge der Gentransfer-basierten Behandlung fokaler Knorpeldefekte dargestellt werden.

2.5.1 Allgemeine Prinzipien des Gentransfers

Unter dem Begriff Gentransfer versteht man das Einschleusen fremder Gensequenzen in Zielzellen. Hierfür muss das entsprechende Gen zunächst isoliert, in eine cDNS umgeschrieben und in einen Expressionsvektor (Plasmid) integriert werden. Die Aufnahme der mittels eines Gentransfersystems (vgl. 2.5.2) gebundenen Gensequenzen in die Zellen erfolgt dann üblicherweise durch Endozytose. Dabei handelt es sich um einen mehrschrittigen Prozess, in dessen Verlauf es zur Bindung der Transfektionskomplexe an die Zielzellen, Internalisierung und Bildung von Endosomen kommt (Luo und Saltzman, 2000). Nur ein Bruchteil der aufgenommenen Komplexe entgeht jedoch der nachfolgenden intrazellulären Degradation (Zhou und Huang, 1994; Crystal, 1995). Im Zellkern werden die Plasmide extrachromosomal, seltener auch episomal, transkribiert. Die Effizienz dieser Protein-Biosynthese ist im Wesentlichen

anhängig von der Struktur des Expressionsvektors, beispielsweise von der Wirksamkeit eingebauter Promotoren.

2.5.2 Gentransfersysteme

Gentransfersysteme erleichtern die Aufnahme genetischen Materials in die Zielzelle und werden in virale und nicht-virale Systeme unterteilt. Transfektion wird der Gentransfer mit nicht-viralen Systemen, Transduktion der Gentransfer mit viralen Systemen genannt.

Nicht-virale Transfektionssysteme besitzen gegenüber viralen Systemen einige Vorteile (Thomas et al., 2003): Das transfizierte Plasmid verbleibt extrachromosomal im Zellkern und führt so in der Regel nur zu einer transienten Genexpression. Die Integration der zugeführten DNS in das Genom der Zielzelle ist hingegen ein sehr seltenes Ereignis (Malone et al., 1989; Ledley, 1994). Da diese Systeme, anders als adenovirale Methoden, keine Immunreaktion induzieren, ist eine wiederholte Anwendung möglich. Sie weisen außerdem eine wesentlich niedrigere Toxizität als virale Systeme auf. Des Weiteren sind nicht-virale Techniken -im Gegensatz zu den retroviralen Systemen- unabhängig vom Zellzyklus der Zielzelle. Diese Vorteile, neben einer höheren Aufnahmekapazität für genetisches Material, sind vor allem für klinische Anwendungen bedeutsam. Der wesentliche Nachteil nicht-viraler Transfektionstechniken bestand bislang in ihrer vergleichsweise niedrigen Transfektionseffizienz.

2.5.2.1 Nicht-virale Systeme

Diese heterogene Gruppe setzt sich aus diversen chemischen und physikalischen Methoden zusammen. Das generelle Prinzip chemischer Transfektionsmethoden besteht in einer extrazellulären Komplexbildung positiv geladener Chemikalien mit der DNS, die eine negative Oberflächenspannung aufweist. Die verschiedenen Systeme dieser Gruppe können anhand ihrer chemischen Hauptbestandteile klassifiziert werden (Felgner, 1990): Zu Beginn der Entwicklung dieser Transfektionssysteme (Vaheri und Pagano, 1965) wurden hohe Salzkonzentrationen oder polykationische Proteine verwendet, um die Ladung der DNS zu neutralisieren. Ab 1965 kamen zu diesem Zweck beispielsweise Calciumphosphat-Präzipitate zum Einsatz. Ein entscheidender Fortschritt gelang Felgner und Kollegen (1987) mit der Entwicklung des kationischen Lipids DOTMA. Dabei handelt es sich um ein positiv geladenes Liposom, das aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte Komplexe mit Nukleinsäuren bildet. Die Transfektionsreagenzien Lipofectamine 2000, Metafectene und Dreamfect stellen aktuelle Vertreter dieser Gruppe dar. Dendrimere wie Superfect (Hudde et al., 1999) sind verzweigte Polymere, die ebenfalls Anwendung als Transfektionsreagenz finden. Für diese Substanzgruppe wurde bislang nur minimale Zytotoxizität beschrieben (Kukowska-Latallo et al., 1996; Gebhart und Kabanov, 2001). Bei den Nanopartikel-basierten Gentransfersystemen wie Nanofectin 1 und 2 werden Verbindungen aus Nanopartikeln und positiv geladenen Polymeren gebildet (Ravi Kumar et al., 2004). Bei dem Reagenz JetPEI handelt es sich um ein lineares Polyethylenimin (Chemin et al., 1998; Godbey et al., 1999).

Mittlerweile stellen neuere lipid-basierte Systeme wie Escort III, Gene Jammer, Effectene, TransPass D2 oder FuGENE 6 die am häufigsten verwendeten Transferreagenzien dar (Schwendener, 2007; Gao et al., 2007; Orth et al., 2008).

Darüber hinaus existieren verschiedenste mechanische und elektrische Methoden der Transfektion. Die direkte Injektion von nicht-komplexierter DNS in den Zellkern (Mikroinjektion) stellt den einfachsten Ansatz dar (Luo und Saltzman, 2000). Die Anwendung von Überdruck (Mann et al., 1999) oder hydrodynamischen Drücken (Liu et al., 1999) sind andere etablierte Techniken. Weitere Möglichkeiten umfassen u.a. die Elektroporation (Neumann et al., 1982) oder das *particle bombardment* (Yang et al., 1990).

2.5.2.2 Virale Systeme

Zahlreiche Studien wiesen nach, dass Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates effizient mittels viraler Systeme transduziert werden können (Kawashima et al., 2003; Cao and Huard, 2004; Ketola et al., 2004; Dai und Rabie, 2007). Diese Systeme bedienen sich der Eigenschaft von Viren, ihre genetische Information effektiv in Fremdzellen einzubringen. Es werden hierfür replikationsdefekte Viren verwendet. Trotzdem besteht bei Verwendung viraler Systeme immer ein Restrisiko für den Erwerb von Replikations-Kompetenz (Crystal, 1995; Tripathy et al., 1996). Weitere Nachteile von viralen Systemen sind ihre immunogenen (Yei et al., 1994; Bessis et al., 2004; Vandenberghe und Wilson, 2007) und onkogenen (Anderson et al., 1992; Li et al., 2002) Eigenschaften. Bei den am häufigsten für Transduktionszwecke verwendeten Viren handelt es sich um Retroviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren (AAV). Seltener kommen Herpesviren oder Lentiviren zum Einsatz (Lazo und Yunta, 2000; Thomas et al., 2003).

2.5.3 Therapeutische Faktoren

Therapeutische Faktoren sollten idealerweise in der Lage sein, Chondrogenese zu stimulieren, Zellproliferation und Zellreifung im Defektgewebe zu induzieren und die Matrixsynthese zu steigern. Als anabole Proteine sind Wachstumsfaktoren in der Lage, Knorpelreparation durch Einfluß auf Chondrogenese und Matrixsynthese zu verbessern (Trippel, 1995 und 1997; Goldberg, 2001). Sie erzielen ihre Wirkung auf Knorpelzellen über spezifische, membrangebundene Rezeptoren und intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse (Lo und Cruz, 1995; Fortier et al., 2004).

Der insulinartige Wachstumsfaktor I, ein 7,6 kDa großes Polypeptid, induziert Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Trippel, 1995; Hunziker und Rosenberg, 1996; Nixon et al., 1999; Nakajima et al., 1998; Ewton et al., 2002; Jin et al., 2006). Matrixsynthese wird ebenfalls durch IGF-I gefördert (Trippel et al., 1983), wobei die Produktion von Typ-II-Kollagen, Proteoglykan und Aggrecan angeregt wird, den Hauptbestandteilen der Matrix des hyalinen Knorpels (Trippel et al., 1989; Nakajima et al., 1998; Neidel und Schulze, 2000; Mierisch et al., 2002; Goodrich et al.,

2007). Die Gentransfer-basierte IGF-I-Therapie kann zu einer global verbesserten Knorpelreparatur führen (Gelse et al., 2003; Madry et al., 2005; Goodrich et al., 2007).

Der Fibroblastenwachstumsfaktor 2 mit einer Größe von 17,2 kDa unterstützt vor allem die Differenzierung zu Chondrozyten *in vivo* (Schofield und Wolpert, 1990; Kato, 1992; Frenz et al., 1994). Er besitzt einen mitogenen Stimulus auf Chondrozyten (Sah et al., 1994; Madry et al., 2004). Darüber hinaus fördert FGF-2 die Freisetzung anderer chondrogener Faktoren wie beispielsweise des Transkriptionsfaktors Sox9 (Murakami et al., 2000) oder die Expression entsprechender Rezeptoren (Hernandez-Sanchez et al., 1997). In tierexperimentellen Studien zum Gentransfer von FGF-2 bestätigte sich dessen günstiger Effekt auf die Reparatur von Knorpeldefekten (Cucchiari et al., 2005; Hiraide et al., 2005; Yokoo et al., 2005; Kaul et al., 2006).

Andere Wachstumsfaktoren zur Verbesserung der Knorpelheilung umfassen Mitglieder der *transforming growth factor beta* (TGF- β)-Familie wie TGF- β 1 oder TGF- β 2 (Joyce et al., 1990; Hanada et al., 2001; Guo et al., 2006), Vertreter der *bone morphogenetic protein* (BMP)-Familie wie BMP-2 (Sellers et al., 1997; Gelse et al., 2008; Salentey et al., 2008) oder BMP-7 (Asahina et al., 1996; Klein-Nulend et al., 1998), den *growth/differentiation factor 5* (GDF-5; Hotten et al., 1996) oder das *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP; Amizuka et al., 1994; Vortkamp et al., 1996).

Ferner eignet sich zur Stimulation anaboler Prozesse im Knorpelgewebe die Applikation von Transkriptionsfaktoren wie Sox9 (Bi et al., 1999), Cbfa-1/Runx-2 (Inada et al., 1999), Cart-1 (Zhao et al., 1994) oder von Mitgliedern der Ets-Familie (Sumarsono et al., 1996). Auch für Matrixproteine sind derartige Effekte beschrieben (Mackie et al., 1987).

Bei der Inhibierung kataboler Prozesse stellen Zytokine, die die Degradation des Reparaturgewebes vermitteln, mögliche Angriffspunkte dar (Pelletier et al., 1993). Im Speziellen kommen Interleukin-1 (IL-1; Goldring et al., 1994), Interleukin-17 (IL-17; Shalom-Barak et al., 1998) oder der Tumornekrosefaktor (TNF; Stadler et al., 1991) in Betracht.

2.5.4 Gentransfer-basierte Therapie fokaler Gelenkknorpeldefekte

Das Ziel Gentransfer-basierter Konzepte ist die Aufrechterhaltung hoher Wirkspiegel der therapeutischen Faktoren lokal im Knorpeldefekt. Initiale Konzentrationsspitzen im Gelenk bei nur kurzer Halbwertszeit der therapeutischen Peptide sollen durch die kontinuierliche Sekretion mittels transfizierter Zellen umgangen werden. Das Hauptproblem bei der Gentransfer-basierten Behandlung fokaler Defekte stellt jedoch ihre intraartikuläre Lokalisation dar. Um Gene dennoch sicher und effizient in Defektareale zu applizieren, existieren zwei Methoden: Man unterscheidet die *in vivo* Applikation von Genvektoren in Defekte und ortsständige Zellen nach Arthrotomie (Eröffnung des Gelenks) von der Arthrotomie mit Implantation *ex vivo* genetisch modifizierter Zellen (Cucchiari et al., 2005).

2.5.4.1 Applikation von Genvektoren mit Arthrotomie

Die direkte Applikation von therapeutischen Genen in Knorpeldefekte war lange Zeit limitiert durch das Unvermögen adenoviraler, retroviraler oder nicht-viraler Transfektionsvektoren, die Knorpelmatrix zu penetrieren. Dadurch konnten die Gene nicht zu den Chondrozyten gelangen und dort ihre Wirkung nicht entfalten. Mit der Entwicklung verbesserter Transfermethoden wie beispielsweise dem rekombinanten Adeno-assoziierten Virus, erlebte die Methode einen Aufschwung (Madry et al., 2003; Cucchiarini et al., 2005). Dabei wurde Transgenexpression allerdings auch in Zellen der Synovialmembran nachgewiesen, was auf eine Diffusion der Faktoren aus dem Defekt hinweist (Madry et al., 2003; Ulrich-Vinther et al., 2004; Pascher et al., 2004; Cucchiarini et al., 2005).

2.5.4.2 Applikation von ex vivo transfizierten Zellen

Autogene, allogene oder xenogene Zellen werden isoliert, kultiviert und *ex vivo* genetisch modifiziert. Nach ihrer Implantation sezernieren diese Zellen bestimmte Genprodukte lokal im Defektareal in relativ hohen Konzentrationen (Gelse und Schneider; 2006). Kang und Kollegen (1997) beschrieben erstmalig die erfolgreiche Transplantation genetisch veränderter Zellen in Knorpeldefekte *in vivo*. Durch Mason und Kollegen (2000) wurde zum ersten Mal ein Wachstumsfaktor, BMP-7, in einen Knorpeldefekt eingebracht.

2.5.5 Konzept der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Studie zur Reparatur fokaler Knorpeldefekte verfolgten wir den Ansatz der Transplantation *ex vivo* modifizierter Zellen weiter. Hierbei ist zur Verbesserung der Defektreparatur *in vivo* eine optimale Abstimmung einzelner Faktoren unerlässlich: Die Effizienz des Gentransfersystems beeinflusst den Erfolg *in vivo* maßgeblich. Es wurde bereits über die erfolgreiche Anwendung von Adenoviren (Baragi et al., 1997; Ikeda et al., 2000; Pascher et al., 2004), Retroviren (Kang et al., 1997; Mason et al., 1998; Adachi et al., 2002; Hirschmann et al., 2002; Mierisch et al., 2003), Adeno-assoziierten Viren (Kobayashi et al., 2002) oder von nicht-viralen Transfektionsmethoden (Goomer et al., 2001; Madry et al., 2003; Ueblacker et al., 2004) berichtet. Ferner kommen verschiedene Zelltypen als Sekretionsorgan des therapeutischen Faktors in Betracht. Bislang stellen Chondrozyten die mit Abstand am häufigsten verwendete Zellpopulation dar (Kang et al., 1997; Mierisch et al., 2003; Hidaka et al., 2003; Madry et al., 2003; Ueblacker et al., 2004). Darüber hinaus kamen perichondriale (Goomer et al., 2001) oder periostale Zellen (Kobayashi et al., 2002) sowie Muskelzellen (Adachi et al., 2002) zum Einsatz. Um systematisch einen Überblick über die Fähigkeit zum Gentransfer in Zellen des Stütz und Bewegungsapparates zu erhalten, ermittelten wir die Effizienz von dreizehn nicht-viralen Transfektionssystemen in primären Chondrozyten, Muskelzellen sowie Zellen einer fibrösen Dysplasie und verglichen diese mit etablierten Osteosarkom- und Chondrosarkomzellen, embryonalen Nierenzellen und einer Fibroblastenzelllinie. Obwohl für jeden dieser Zelltypen

Berichte zu nicht-viralen Transfektionen vorliegen (Evans et al., 2000; Blanton et al., 2000; Marit et al., 2000; Hirao et al., 2003; Welter et al., 2004; Li et al., 2005; Park et al., 2005), wurde eine systematische Analyse der erzielbaren Transfektionseffizienzen bislang nicht ausgeführt.

Im Anschluss an diese Arbeiten transfizierten wir murine Fibroblasten (NIH 3T3) mit den für IGF-I und FGF-2 kodierenden DNS-Sequenzen und verkapselten die modifizierten Zellen in der Trägersubstanz Alginat. Die resultierenden Sphäroide wurden *in vitro* analysiert und *in vivo* in osteochondrale Defekte in den Kniegelenken von Kaninchen implantiert. Der Einfluß von IGF-I und FGF-2 auf die Defektreparatur wurde mittels biochemischer und histologischer Verfahren analysiert.

Studien zur Knorpelreparatur wurden bereits an diversen Tiermodellen durchgeführt, darunter Ratten Schweine oder das Pferd. Die umfassendste Datenlage besteht allerdings zu Kaninchen (Sellers et al., 1997; Mierisch et al., 2003, Madry et al., 2005). Der Einsatz von NIH 3T3 Zellen bei der Gentransfer-basierten Therapie orthopädischer Erkrankungen ist ebenfalls gut dokumentiert (Bakker et al., 1997; Lee et al. 2001). Gleiches gilt für das nicht-virale Transfektionsreagenz FuGENE 6, welches wir für den Transfer der therapeutischen Gene in die Fibroblasten verwendeten (Madry et al., 2005; Kaul et al., 2006). Die Kombination aus NIH 3T3 Zellen und FuGENE 6 stellt eine etablierte Methode dar (Hellgren et al., 2000; Song und Chen, 2003; Arulanandam et al., 2004; Guo et al., 2006) und zeichnete sich in dieser Arbeit durch eine hohe Transfektionseffizienz aus.

Als Trägersubstanz für die modifizierten Zellen wurden bislang synthetische Gerüstwerke, so genannte *scaffolds* (Freed et al., 1994; Perka et al., 2000; Schaefer et al., 2002; Kim et al., 2006), Agarose (Rahfoth et al., 1998; Hunter et al., 2004) sowie Fibrin- oder Typ-I-Kollagen-Gels (Kawamura et al., 1998; Driesang und Hunziker, 2000) verwendet. Auch Alginat, eine Verbindung negativ geladener Co-Polymere, die aus der Braunalge gewonnen wird, steht als Träger zur Verfügung. Die Eignung dieser Substanz selbst für Studien am Menschen (Soon-Shiong et al., 1994) wurde bereits beschrieben (Diduch et al., 2000; Fragonas et al., 2000; Madry et al., 2003; Madry et al., 2005; Kaul et al., 2006). Alginat-verkapselte NIH 3T3 Zellen zeichnen sich durch die langfristige Aufrechterhaltung einer hohen Vitalität aus (Read et al., 1999).

Gentransfer von IGF-I (Gelse et al., 2003; Madry et al., 2005; Goodrich et al., 2007) oder FGF-2 (Yokoo et al., 2005; Kaul et al., 2006) in fokale Knorpeldefekte resultiert in einem strukturell und biochemisch signifikant verbesserten Reparaturgewebe. Wir wählten diese Wachstumsfaktoren daher als therapeutische Kandidaten und untersuchten ihren Effekt auf die Knorpelreparatur alleine und in Kombination.

3. Fragestellung

- (1) Welche Zelltypen kombiniert mit welchen nicht-viralen Transfektionssystemen eignen sich speziell im Rahmen dieser Arbeit und generell für gentherapeutische Ansätze?
- (2) Wie verhalten sich Transgenexpression und Vitalität von transfizierten NIH 3T3 Fibroblasten in einem dreidimensionalen Kultursystem *in vitro*?
- (3) Führt die Implantation von Alginat-Sphäroiden, in welche IGF-I- und FGF-2-transfizierte NIH 3T3 Fibroblasten verkapselt sind, zu einer Verbesserung der Reparatur osteochondraler Defekte *in vivo*?

4. Material

4.1 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden mit aqua bidest. angesetzt. Als Standardmedium für die Zellkulturen verwendeten wir D-MEM. Dieses bezogen wir, ebenso wie PBS und OptiMEM, von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Fetales Kälberserum (FKS) wurde von Biochrom (Berlin, Deutschland) hergestellt, SOC-Medium von Sigma (Taufkirchen, Deutschland).

<i>Lösung, Puffer, Medium</i>	<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Konzentration, Menge, Volumen</i>
0,1x TE-Lösung	Tris/HCl (pH 8,0)	1 mM
	EDTA	1,86 mg (0,1 mM)
102 mM CaCl ₂ -Lösung	CaCl ₂ • H ₂ O	14,99 g (2 M)
	H ₂ O	ad 1000 ml
1x TNE-Puffer	NaCl	5,8 g (100 mM)
	Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	372 mg (1 mM)
	Tris/HCl (pH 7,4)	1322 mg (10 mM)
	H ₂ O	ad 1000 ml
2 M CaCl ₂	CaCl ₂ • H ₂ O	5,88 g (2 M)
	H ₂ O	ad 20 ml
2x HBS (pH 7,05)	NaCl	1,62 g (280 mM)
	KCl	75 mg (10 mM)
	Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	40 mg (1,5 mM)
	Dextrose	216 mg (12 mM)
	HEPES	1,2 g (50 mM)
	H ₂ O	ad 100 ml
Alginate-Suspension	Alginate (L-Glucuronsäure und D-Mennuronsäure; Braunalge)	1,2% (m/V)
Basalmedium für Zellkultur	D-MEM	99% (V/V)
	Penicillin (100 U/ml)-Streptomycin (100 µg/ml)-Lösung	1% (V/V)
<i>blocking buffer</i>	Rinderalbumin	2 ml
	PBS	198 ml
D-MEM	D-Glukose	4500 mg/l
	L-Glutamin	580 mg/l
	Phenolrot	15 mg/l
	nicht-essentielle Aminosäuren, Vitamine und anorganische Salze	nach Herstellerangaben
DMMB-Lösung A	Cystein	105 mg

<i>Lösung, Puffer, Medium</i>	<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Konzentration, Menge, Volumen</i>
	PBS	60 ml
DMMB-Lösung B	Chondroitinsulfat	50 mg
	Lösung A	1 ml
DMMB-Lösung C	Lösung B	1 µl
	H ₂ O	ad 500 µl
DMMB-Färbelösung (pH 3,0)	1,9-Dimethylmethylenblau	21 mg
	Natriumformiat	2 g
	Ethanol (100%)	5 ml
	Ameisensäure (90%)	titratorisch
	H ₂ O	ad 1000 ml
DNS-Lösung	Plasmid-DNS	40 µg
(Calciumphosphat Co- Präzipitations-Methode)	0,1x TE-Lösung	1 ml
Echtgrün- (<i>fast green</i> -) Lösung	<i>fast green</i>	200 mg
	H ₂ O	ad 1000 ml
Entkalkungs-Lösung	Natrium-Citrat	50 g
	Ameisensäure (90%)	125 ml
	H ₂ O	ad 500 ml
Eosin-Lösung	Eosin G	10 g
	H ₂ O	ad 2000 ml
Formalin-Lösung (pH 7,4)	KH ₂ PO ₄	9,07 g
	Na ₂ HPO ₄	11,86 g
	Formalin-Stammlösung	140 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
Hämatoxylin-Lösung	Hämatoxylin	10 g
	Ethanol (100%)	120 ml
	Natrium-Jodat	10 g
	Aluminiumkaliumsulfat	200 g
	H ₂ O	ad 2000 ml
HCl-Lösung	HCl (40%)	5,4 ml
	H ₂ O	ad 200 ml
Kollagenase-Lösung (0,05%)	Typ-I-Kollagenase (232 U/mg)	25 mg
	D-MEM	ad 50 ml
Kollagenase-Lösung (0,2%)	Typ-I-Kollagenase (232 U/mg)	100 mg
	D-MEM	ad 50 ml
Medium für Agar-Selektions- Nährböden	Luria Agar (10 g Caseinpepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 12 g Agar)	37 g
	Ampicillin (50 mg/ml)	0,2% (V/V)
	H ₂ O	ad 1000 ml

<i>Lösung, Puffer, Medium</i>	<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Konzentration, Menge, Volumen</i>
Medium für Flüssigkultur	Luria Broth Base	37 g
	(10 g Caseinpepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid)	
	Ampicillin (50 mg/ml)	0,2% (V/V)
	H ₂ O	ad 1000 ml
Medium für Muskelexplantate	D-MEM	84% (V/V)
	Penicillin (100 U/ml)-Streptomycin (100 µg/ml)-Lösung	10% (V/V)
	FKS	5% (V/V)
	Amphotericin B (250 µg/ml)	1% (V/V)
NaCl-Lösung (150 mM)	NaCl	435 mg
	H ₂ O	ad 50 ml
Natrium-Citrat-Lösung	Tri-Natrium-Citrat	1618 mg
	H ₂ O	ad 100 ml
OptiMEM	Natrium-Bicarbonat	2,4 g/l
	Phenolrot	1,1 mg/l
	L-Glutamin, HEPES, Natrium- Pyruvat, Hypoxanthin, Thymidin, Spurenelemente und Wachstumsfaktoren	nach Herstellerangaben
Papain-Lösung	Papain	5 mg
	H ₂ O	200 µl
	PBS	ad 40 ml
PBS	Kaliumchlorid (pH 7,2)	2,7 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	1,7 mM
	Natriumchlorid	136 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O)	10 mM
Safranin-Orange-Lösung	Safranin-Orange	1 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
SOC-Medium	Trypton	2% (m/V)
	Hefeextrakt	0,5% (m/V)
	NaCl	8,6 mM
	KCl	2,5 mM
	MgSO ₄	20 mM
	Glukose	20 mM
Trypsin-Lösung (0,1%)	Trypsin-Stammlösung (25%)	800 µl
	PBS	ad 200 ml
Trypsin-Stammlösung	Trypsin	25% (V/V)
	PBS	75% (V/V)

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

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

4.2 Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Bezugsquellen weiterer Chemikalien:

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
1,9-Dimethylmethylenblau	Serva (Darmstadt, Deutschland)
ABC-Reagenz	PerBio (Bonn, Deutschland)
Alginat	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Amphotericin B (250 µg/ml)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ampicillin (50 mg/ml)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Bisbenzimid Hoechst 33258	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Braunol	Braun (Melsungen, Deutschland)
Chondroitin-6-Sulfat	Fluka (Buchs, Schweiz)
DAB-Reagenz	Roche (Mannheim, Deutschland)
Dreamfect	Oz Bioscience (Marseille, Frankreich)
Echtgrün (<i>fast green</i> FCF)	MP Biomedicals (Illkirch, Frankreich)
Effectene	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Eisessig	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Eosin G	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Escort III	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Essigsäure (3%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Formaldehyd-Lösung (4%)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Formalin-Stammlösung (37%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
FuGENE 6	Roche (Mannheim, Deutschland)
Gene Jammer	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Isopropanolol	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
JetPEI	PolyPlus Transfection (Illkirch, Frankreich)
Ketavet (Ketamin-Hydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn (Erlangen, Deutschland)

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
L-Cystein	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Lipofectamine 2000	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Luciferase Assay System	Promega (Madison, WI, USA)
Metafectene	Biontex (München, Deutschland)
Nanofectin 1	PAA (Pasching, Österreich)
Nanofectin 2	PAA (Pasching, Österreich)
Paraffin-Granulat	Leica (Nussloch, Deutschland)
Penicillin (100 U/ml)-Streptomycin (100 µg/ml)-Lösung	Fisher (Schwerte, Deutschland)
Narcoren (Natrium-Pentobarbital)	Merial (Hallbergmoos, Deutschland)
Quantikine human FGF basic (ELISA)	R&B Systems (Minneapolis, MN, USA)
Quantikine human IGF-I (ELISA)	R&B Systems (Minneapolis, MN, USA)
Rinderalbumin	PerBio (Bonn, Deutschland)
Rompun (Xylazin-Hydrochlorid)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
Roti-Histokitt II (Eindeckmittel)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Safranin-Orange	MP Biomedicals (Illkirch, Frankreich)
Standard-DNS-Lösung (10 µg/ml; Kalbsthymus)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Superfect	Qiagen (Hilden, Deutschland)
TransPass D2	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Trypan-Blau-Lösung (0,4%)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Wasserstoff-Peroxid	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
X-gal <i>staining set</i>	Roche (Mannheim, Deutschland)
Xylen	Universitätsklinikum des Saarlandes, Apotheke

Tab. 2: Bezugsquellen weiterer Chemikalien.

4.3 Biologische Materialien

4.3.1 Zellen und Zelllinien

Die Herkunft der verwendeten Zellen und Zelllinien ist Tabelle 3 zu entnehmen:

<i>Zelltyp und Definition</i>	<i>Herkunft</i>
Lapine Gelenkchondrozyten	aus Primärkultur
Lapine Muskelzellen	aus Primärkultur
Humane Zellen einer fibrösen Dysplasie	aus Primärkultur
SAOS-2: Humane Osteosarkomzellen	Spende von Y. Mehraein (Fogh, 1975)
CS-1: Humane Chondrosarkomzellen	Spende von F. J. Hornicek und L. Weissbach (Shao et al., 2003)
293-Zellen: Adenoviral transformierte, humane embryonale Nierenzellen	Spende von V. Flockerzi (Graham et al., 1977)
NIH 3T3: Murine dermale Fibroblasten	Spende von V. Flockerzi (Jainchill et al., 1969)

Tab. 3: Herkunft der verwendeten Zellen und Zelllinien.

4.3.2 Vektoren

Eine Übersicht der Eigenschaften der eingesetzten Vektoren gibt Tabelle 4. Die Plasmide wurden in einer Konzentration von 1 µg Plasmid-DNS zu 1 µl aqua bidest. verdünnt.

<i>Plasmid</i>	<i>Regulatorische Sequenz/kodiertes Protein</i>	<i>Herkunft/Referenz</i>
pCMVluciferase	CMV-IE-Promoter/Enhancer/ <i>P. pyralis</i> Luciferase	Promega (Madison, WI, USA)
pCMVlacZ	CMV-IE-Promoter/Enhancer/ <i>E. coli</i> β-Galactosidase	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
pCMVhIGF-I	CMV-IE-Promoter/Enhancer/ humaner IGF-I	H. Madry (Madry et al., 2001)
pCMVhFGF-2	CMV-IE-Promoter/Enhancer/ humaner FGF-2	H. Madry (Madry et al., 2004)

Tab. 4: Eigenschaften der verwendeten Vektoren.

4.3.3 Antikörper

Zur Charakterisierung der Primärkultur von lapinen Muskelzellen sowie zur immunhistochemischen Darstellung von Typ-I- und Typ-II-Kollagen in den Knorpelreparaturgeweben wurden folgende monoklonale Antikörper verwendet:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Spezies</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Desmin	Maus	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Anti-Typ-I-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)
Anti-Typ-II-Kollagen	Maus	Acris Antibodies (Hiddenhausen, Deutschland)
Anti-Maus-IgG (biotiniliert)	Ziege	Vector Laboratories (Grünberg, Deutschland)

Tab. 5: Verwendete monoklonale Antikörper.

4.3.4 Enzyme

Bei der Herstellung der Primärkulturen verwendeten wir Typ-I-Kollagenase (Aktivität: 232 U/mg; Biochrom, Berlin, Deutschland). Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) fand sowohl bei der Zellkultur als auch bei immunhistochemischen Färbungen in verschiedenen Konzentrationen Anwendung. Zum Verdau des extrahierten Defektgewebes kam Papain zum Einsatz, welches von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen wurde.

4.3.5 Bakterienstämme

Die Plasmidvektoren wurden in dem kompetenten *E. coli* Bakterienstamm DH 5α (One Shot TOP 10; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) amplifiziert.

4.3.6 Tierstämme

12 weibliche Chinchilla Bastard Kaninchen (mittlere Körpermasse $2,8 \pm 0,4$ kg) bezogen wir von Charles River (Sulzfeld, Deutschland).

4.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.4.1 Geräte

Neben allgemeinen Laborgeräten fanden zusätzlich Anwendung:

Gerät	Hersteller
Autoklav AMA-240	Astell (Sidcup, England)
Digitalkamera Camedia C-5050 ZOOM	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Digitalkamera CC-12 (auf Mikroskop BX-45)	Soft Imaging System (Münster, Deutschland)
Einbettmaschine EG 1140-C	Leica (Nussloch, Deutschland)
Gefrierschrank -20°C	Bosch (Gerlingern-Schillerhöhe, Deutschland)
Gefrierschrank -74°C NapCOIL UF 400	Napco (St. Herblain, Frankreich)
GENios microplate reader	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Inkubator (62°C)	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Inkubator CB 150 (37°C)	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Lyophilisator Unicryo MC 2L-60	Uniequip (Martinsried, Deutschland)
Magnetrührer multi stirr 4	Bellco Glass (Vineland, NJ, USA)
Photometer Bio Photometer	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Mikroskop BX-45	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop CK-2	Olympus (Hamburg, Deutschland)
pH Meter pH 210 Microprocessor	Hanna Instruments (Kehl am Rhein, Deutschland)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica (Nussloch, Deutschland)
Schüttler IH 50	Noctua (Wien, Österreich)
Tischzentrifuge Qualitron Microcentrifuge	Krackeler Scientific (Albany, NY, USA)
Waage EW-600-2M	Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeplatte HI 1220	Leica (Nussloch, Deutschland)
Wasserbad WB-7	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad HI 1210 (für histologische Schnitte)	Leica (Nussloch, Deutschland)
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Zentrifuge Z-300	Hermle (Wehingen, Deutschland)

Tab. 6: Eingesetzte Laborgeräte.

4.4.2 Software

Zur Analyse digitaler Bilder verwendeten wir die *analySIS* Software (Soft Imaging System, Münster, Deutschland). Zur statistischen Auswertung kamen ANOVA (*analysis of variance*; Microsoft Excel, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) und die SPSS Software (Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) zum Einsatz.

4.4.3 Operationsinstrumentarium und -materialien

Die verwendeten chirurgischen Instrumente bezogen wir größtenteils von den Firmen Martin (Tuttlingen, Deutschland), Medicon (Tuttlingen, Deutschland), Megro (Wesel, Deutschland) und

A. Dumont & Fils (Montignez, Schweiz). Der Hohlbohrer zum Erzeugen der osteochondralen Defekte wurde von der Firma Synthes (Umkirch, Deutschland) hergestellt. Nahtmaterial, Spritzen und Nadeln stammten von Braun (Melsungen, Deutschland).

4.4.4 Verbrauchsmaterialien

Plastikartikel und Glasbehälter wurden von Falcon (Beckton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich), Fisher (Schwerte, Deutschland), neoLab (Heidelberg, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Nylonnetze (Porengrößen: 40, 100, 125 µm), Sterilfilter sowie Parafilm stammen von Fisher (Schwerte, Deutschland). Metallkassetten und Plastikabdeckungen für die Paraffin-Einbettung, Objektträger und Deckgläser für histologische Schnitte wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) geliefert. Klingen für das Rotationsmikrotom stammten von Leica (Nussloch, Deutschland).

5. Methoden

5.1 Überblick

Gemäß den Fragestellungen wurden die Versuche der vorliegenden Arbeit in drei Teile gegliedert (Abb. 2): (1) Evaluation von Gentransfersystemen, (2) *in vitro* Experimente und (3) *in vivo* Experimente.

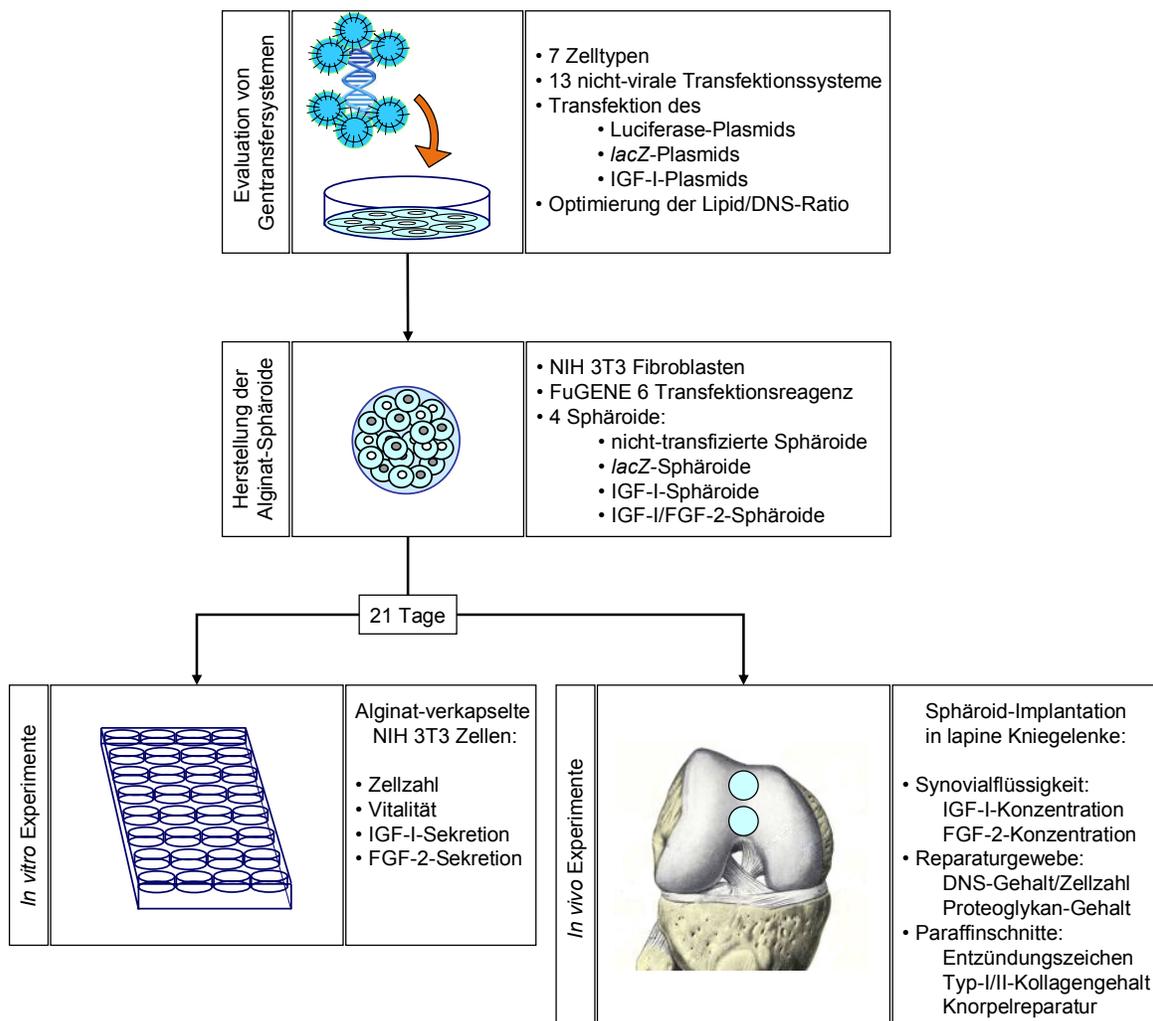


Abb. 2: Übersicht über die durchgeführten Experimente und Evaluationen.

5.2 Zellkultur

5.2.1 Lapine Gelenkchondrozyten

Lapiner Gelenkknorpel aus den Knie- und Hüftgelenken männlicher Chinchilla Bastard Kaninchen wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, zerkleinert (2 x 2 x 0,5 mm) und in ein Glasgefäß überführt, auf dessen Boden ein Stabmagnet rotiert (*spinner bottle*). Bei Standardbedingungen (37°C und 5% CO₂) wurde die Suspension in 0,05%iger Kollagenase-Lösung inkubiert (16 h) und dann zur Trennung von unverdauter Matrix durch ein Nylonnetz (Porengröße 125 µm) gefiltert. Die Kultivierung der Chondrozyten erfolgte in 75 cm² Kulturflaschen mit Mediumwechsel (Wachstumsmedium) im Abstand von drei Tagen. Zur Aufteilung der Zellkultur bei Konfluenz des Zellrasens wurde das Wachstumsmedium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gespült und unter Standardbedingungen in Trypsin (3 ml, 12 min) inkubiert. Die Suspension gelöster Zellen wurde auf zwei 75 cm² Kulturflaschen aufgeteilt und in Wachstumsmedium kultiviert.

5.2.2 Lapine Muskelzellen

Im Rahmen einer sterilen Sektion (vgl. 5.7.2.2) wurden Chinchilla Bastard Kaninchen Muskelstücke (1 cm³) aus dem Musculus quadriceps entnommen, für 3 h in Medium für Muskelexplantate (Lindl und Bauer, 1993) überführt und im Anschluss weiter zerkleinert (8 mm³). Die Isolierung der Myozyten aus dem Explantat erfolgte analog zu Chondrozyten. Die resultierende Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz der Porengröße 40 µm gefiltert. Die Charakterisierung dieser Primärkultur gelang durch den Nachweis der Anlagerung eines primären Anti-Desmin Antikörpers. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie für Knorpelzellen beschrieben bei viertägigem Mediumwechsel mit Wachstumsmedium (Bonavaud et al., 1997).

5.2.3 Humane fibröse Dysplasie

Das Gewebe einer fibrösen Dysplasie wurde während eines tumorchirurgischen Eingriffs am Femur eines 28-jährigen Patienten an der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, entnommen und in 0,2%iger Kollagenase-Lösung bei Standardbedingungen für 16 h in einer *spinner bottle* inkubiert. Anschließend filterten wir die Zellsuspension durch ein Nylonnetz (Porengröße 100 µm). Die Zellkultur erfolgte wie bei lapinen Muskelzellen.

5.2.4 Humane Osteosarkomzellen (SAOS-2), Chondrosarkomzellen (CS-1), embryonale Nierenzellen (293), murine dermale Fibroblasten (NIH 3T3)

Diese etablierten Zelllinien bezogen wir von verschiedenen Quellen (siehe Tab. 3). Die Zellkultur erfolgte analog zu Chondrozyten.

5.3 Amplifikation der Plasmid-DNS

5.3.1 Plasmid-DNS

In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir Plasmide mit dem *P. pyralis* Luciferase-Gen, dem *E. coli lacZ*-Gen, dem humanen IGF-I-Gen oder dem humanen FGF-2-Gen. Alle Plasmide enthielten außerdem ein Resistenzgen gegen Ampicillin.

5.3.2 Transformation kompetenter *E. coli*

Die Amplifikation der Plasmid-DNS erfolgte nach Transfer in sich rasch vermehrende Zellen (*E. coli* Bakterien des Stammes DH 5 α). Von dieser Zellsuspension wurden 100 μ l mit 1 μ l der zu amplifizierenden DNS (Konzentration 1 μ g/1 μ l) gemischt, 30 min auf Eis gelagert und für 45 s einem Hitzschock (Wasserbad, 42°C) ausgesetzt. Nach erneuter Zwischenlagerung auf Eis und Zugabe von 500 μ l SOC-Medium erfolgte die Inkubation bei Standardbedingungen (60 min). Es resultierten verschieden transformierten Bakteriensuspensionen (*lacZ*, Luciferase, IGF-I, FGF-2).

5.3.3 Übertragung auf Selektionsplatten

Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (2 min, 2000 g), der Überstand abgenommen und der Zell-Niederschlag (Pellet) in 25 μ l sterilisiertem OptiMEM resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf vorab hergestellte Selektions-Nährböden ausgestrichen. Der Ampicillin-Gehalt der Nährböden erlaubte nur das Wachstum erfolgreich transformierter Bakterien mit einem Resistenzgen. Die Platten wurden über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert.

5.3.4 Anlage einer Flüssigkultur

Das Medium für die Flüssigkulturen wurde autoklaviert (121°C, 15 min), Ampicillin wurde erst danach hinzu gegeben. Wir übertrugen je eine Kolonie der transformierten *E. coli* Bakterien (*lacZ*, Luciferase, IGF-I oder FGF-2) von ihrem Selektions-Agar in die Flüssigkultur (je 10 ml). Nach einer ersten Inkubation über 6 h bei 37°C unter konstantem Schütteln (Frequenz: 250/min) wurden diese 10 ml in jeweils 400 ml des Flüssigkultur-Mediums gegeben und unter den gleichen Bedingungen über Nacht inkubiert.

5.3.5 DNS-Isolierung aus Bakterienkultur

Zur Gewinnung des amplifizierten Plasmids aus den *E. coli* Bakterien wurde der EndoFree Plasmid Maxi Kit verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurde ein Aufschließen der Bakterien, die Denaturierung aller DNS-Formen in der Flüssigkultur (chromosomale und Plasmid-DNS) und danach eine Renaturierung von ausschließlich der Plasmid-DNS erreicht, welche im Anschluss isoliert werden konnte. Die gewonnenen Plasmide wurden auf eine Endkonzentration von 1 μ g DNS/ μ l in aqua bidest. verdünnt und bei -80°C konserviert.

5.4 Evaluation von Gentransfersystemen

5.4.1 Ausplattieren

In Vorversuchen hatten wir anhand des Parameters Transfektionseffizienz zunächst die optimale Zellzahl pro Kavität in einer Zellkultur-Testplatte (im Folgenden auch als *well* und 24-*well*-Platte bezeichnet) ermittelt:

<i>Zelltyp</i>	<i>Zellzahl/well bei Aussaat (24-well-Platte)</i>
Lapine Gelenkchondrozyten	38 x 10 ³
Lapine Muskelzellen	20 x 10 ³
Humane fibröse Dysplasie	33 x 10 ³
Humane Osteosarkomzellen (SAOS-2)	20 x 10 ³
Humane Chondrosarkomzellen (CS-1)	20 x 10 ³
Humane embryonale Nierenzellen (293)	20 x 10 ³
Murine dermale Fibroblasten (NIH 3T3)	20 x 10 ³

Tab. 7: Zellzahlen/*well* bei Aussaat.

Die Zellen wurden den 75 cm² Kulturflaschen entnommen und zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde resuspendiert und seine Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Wir verdünnten die benötigten Volumina der Resuspension mit Wachstumsmedium und applizierten jeweils 1 ml dieser Verdünnung pro *well*. Die Platte wurde unter Standardbedingungen über 24 h inkubiert, bevor die anschließenden Transfektionen bei einer Konfluenz des Zellrasens von 60-70% durchgeführt wurden.

5.4.2 Verwendete Transfektionsreagenzien

Die folgenden nicht-viralen Transfektionsreagenzien wurden systematisch auf ihre Effizienz bei der Transfektion oben genannter Zelltypen untersucht:

<i>Transfektionsprinzip</i>	<i>Transfektionsreagenz</i>
Lipid-basierte Systeme	Escort III
	Gene Jammer
	Effectene
	TransPass D2
	FuGENE 6
Kationische Liposomen	Lipofectamine 2000
	Metafectene
	Dreamfect
Nanopartikel-basierte Systeme	Nanofectin 1

<i>Transfektionsprinzip</i>	<i>Transfektionsreagenz</i>
	Nanofectin 2
Aktiviertes Dendrimer	Superfect
Lineares Polyethylenimin	JetPEI
Calciumphosphat Co-Präzipitations-Methode	CaPO ₄

Tab. 8: Eingesetzte Transfektionsreagenzien.

5.4.3 Transfektionen

Die Transfektionen mit dem für das Luciferase-Gen codierenden Plasmid wurden bei allen sieben Zelllinien und mit allen dreizehn Transfektionssystemen ausgeführt. Auf diese Weise ermittelten wir für jeden Zelltyp zunächst das effizienteste Reagenz. Mit diesem spezifischen Reagenz wurden daraufhin die entsprechenden Zellen mit dem für *lacZ* codierenden Plasmid (Transfektionseffizienz) und mit dem IGF-I-Plasmid (Transgenexpression) transfiziert.

Alle Transfektionen führten wir in sterilen Polypropylen-Röhrchen bei Raumtemperatur durch. Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten war das Procedere unabhängig von verwendetem Plasmid oder Zelltyp. Die Massen- und Volumenangaben beziehen sich auf die Transfektion der Zellen eines *well*s in einer 24-*well*-Platte.

Vorversuche hatten ergeben, dass sich der Einfluß der Expositionszeit der Zellen gegenüber den Transfektionskomplexen biphasisch darstellte: Die Transfektionseffizienzen aller Reagenzien waren nach 48stündiger Exposition höher als nach 24 h oder 72 h.

5.4.3.1 Nanofectin 1 und 2

In zwei Ansätzen wurden 1 µg der Plasmid-DNS bzw. 3,2 µl des Transfektionsreagenzes in 50 µl NaCl-Lösung (150 mM) gelöst. Beide Ansätze wurden miteinander vermischt und über 25 min bei Raumtemperatur zur Bildung von DNS-Nanopartikel-Komplexen inkubiert. Nach einem Mediumwechsel (500 µl Wachstumsmedium) wurden 104,2 µl der DNS-Nanofectin-Lösung in jeden *well* pipettiert, die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ über 2 h inkubiert und anschließend weitere 500 µl Wachstumsmedium hinzugefügt. Nach 48 h wurde die Transfektionseffizienz ermittelt (siehe 5.4.4).

5.4.3.2 Superfect

Die Plasmid-DNS (1 µg) wurde in OptiMEM (60 µl) aufgenommen, mit 5 µl Superfect-Transfektionsreagenz vermischt und inkubiert (10 min, Raumtemperatur). Nach einem Mediumwechsel (Wachstumsmedium) wurden 350 µl Wachstumsmedium zu den DNS-Superfect-Komplexen gegeben und pro *well* 415 µl Transfektionslösung appliziert. Nach Inkubation über 2,5 h bei Standardbedingungen ersetzten wir das Transfektionsmedium durch Wachstumsmedium. Eine Inkubation über 48 h schloss sich an.

5.4.3.3 JetPEI

In je 50 μ l einer 150 mM NaCl-Lösung lösten wir sowohl DNS (1 μ g) als auch JetPEI-Transfektionsreagenzes (2 μ l) und vereinten beide Verdünnungen. Während einer Inkubation zur Formierung von Transformationskomplexen aus DNS und Polyethylenimin-Molekülen (25 min, Raumtemperatur) wurde in den *wells* ein Mediumwechsel mit 500 μ l Wachstumsmedium durchgeführt. Wir gaben dann 103 μ l der Transfektionslösung in die *wells* und bestimmten 48 h später die Effizienz des Gentransfers.

5.4.3.4 Escort III

Pro *well* wurden 0,3 μ g DNS und 0,6 μ l Escort III in jeweils 20 μ l OptiMEM verdünnt. Die Lösungen wurden gemischt und über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wir spülten die Zellen (200 μ l OptiMEM), legten 160 μ l OptiMEM in jede Kavität vor und gaben die DNS-Escort III-Komplexe (40,9 μ l/*well*) hinzu. Nach Inkubation (6 h, Standardbedingungen) wurden zusätzlich 200 μ l eines modifizierten Wachstumsmediums (20% FKS; 10 ml FKS zu 40 ml Basalmedium) pro *well* appliziert. Nach weiteren 22 h ersetzten wir dieses durch Wachstumsmedium (500 μ l; 10% FKS), welches bei 5% CO₂ und 37°C für 24 h auf den Zellen belassen wurde.

5.4.3.5 Gene Jammer

Zu 100 μ l OptiMEM wurden zunächst 3 μ l des Gene Jammer-Reagenzes und nach 10 min 1 μ g der jeweiligen Plasmid-DNS gegeben. Während weiterer 10 min (Raumtemperatur) führten wir in den *wells* einen Mediumwechsel mit 150 μ l Wachstumsmedium durch. Zunächst wurden dann 104 μ l der Transfektionslösung und nach Inkubation über 3 h unter Standardbedingungen weitere 200 μ l Wachstumsmedium in die *wells* pipettiert. Nach 48 h ermittelten wir die Transfektionseffizienz.

5.4.3.6 Effectene

Nach Herstellerangaben wurden 0,2 μ g Plasmid-DNS mit 59,8 μ l Puffer EC gemischt, bevor 1,6 μ l *enhancer* zugegeben wurden. Nach Inkubation bei Raumtemperatur (5 min) fügten wir 5 μ l des Effectene-Reagenzes hinzu. Nach erneuter Inkubationsphase (10 min) und Mediumwechsel (350 μ l Wachstumsmedium) ergänzten wir die Transfektionslösung um 350 μ l Wachstumsmedium. Das resultierende Gesamtvolumen von 416,6 μ l wurde auf die Zellen pipettiert, welche dann für 48 h unter Standardbedingungen inkubiert wurden.

5.4.3.7 TransPass D2

In 300 μ l OptiMEM wurden 0,4 μ g DNS und 0,8 μ l TransPass D2-Transfektionreagenz verdünnt. Während der Bildung von Transfektionskomplexen (30 min, Standardbedingungen) spülten wir die Zellen im *well* mit OptiMEM. Auf den Zellrasen wurden dann 301,2 μ l der Transfektionslösung

gegeben. Die Zellen wurden 2,5 h unter Standardbedingungen inkubiert, bevor das Transfektionsmedium durch 500 µl Wachstumsmedium ersetzt wurde. Eine 48stündige Inkubation schloss sich an.

5.4.3.8 FuGENE 6

In 90 µl OptiMEM wurden FuGENE 6-Transfektionsreagenz (2 µl) und Plasmid-DNS (1 µg) gelöst. Diese 93 µl Lipid-DNS-Lösung applizierten wir nach Inkubation (15 min, Raumtemperatur) und Mediumwechsel (500 µl Wachstumsmedium) in die *wells*. Die Zellen wurden für weitere 48 h unter Standardbedingungen inkubiert, bevor die Transfektionseffizienz bestimmt wurde.

5.4.3.9 Lipofectamine 2000

In jeweils 50 µl OptiMEM gaben wir 0,8 µg Plasmid-DNS und 2 µl des Transfektionsreagenzes. Beide Ansätze wurden miteinander vereint und zur Komplexbildung aus DNS und kationischen Liposomen inkubiert (20 min, Raumtemperatur), während ein Wechsel des Wachstumsmediums (500 µl) vollzogen wurde. Wir verabreichten 102,8 µl der Transfektionslösung, bevor die Zellen über 48 h unter Standardbedingungen inkubiert wurden.

5.4.3.10 Metafectene

Es wurden 0,5 µg DNS und 2,5 µl Metafectene-Transfektionsreagenz in je 30 µl OptiMEM verdünnt. Nach Vereinigung beider Lösungen, Inkubation bei Raumtemperatur (20 min) und Mediumwechsel im *well* (500 µl Wachstumsmedium) gaben wir diese 63 µl Transfektionsmedium auf die Zellen. Die Transfektionsnachweise wurden 48 h danach durchgeführt.

5.4.3.11 Dreamfect

Sowohl die Plasmid-DNS (0,5 µg) als auch das Transfektionsreagenz (2 µl) verdünnten wir in OptiMEM (je 50 µl). Nach Vereinigung beider Verdünnungen und Inkubation über 20 min (Raumtemperatur) ersetzten wir das Medium über den Zellen durch 500 µl Wachstumsmedium. Die Komplexe aus Dreamfect und der DNS wurden auf die Zellen gegeben und diese für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

5.4.3.12 Calciumphosphat Co-Präzipitations-Methode

Der pH-Wert der 2x HEPES-gepufferten Salzlösung (2x HBS) wurde durch titratorische Zugabe von NaOH auf 7,05 eingestellt. Pro *well* wurden 22 µl der DNS-Lösung mit 25 µl 2x HBS vermischt. Zu diesem Gemisch gaben wir 3,1 µl der 2M CaCl₂-Lösung. Die Lösung wurde nach homogener Durchmischung inkubiert (30 min, Raumtemperatur), während wir einen Mediumwechsel in den *wells* durchführten (500 µl Wachstumsmedium). Danach resuspendierten wir die geformten Präzipitate in der Lösung, applizierten Volumina von jeweils 51,1 µl

Transfektionslösung pro *well* und inkubierten die Zellen im Anschluss über 24 h unter Standardbedingungen.

5.4.4 Detektion der Transgenproduktion

Die Effizienz der durchgeführten Transfektionen untersuchten wir nach 48stündigen Inkubationsphasen anhand von drei Detektions-Systemen: Alle Zellen waren in einem ersten Schritt mit dem Plasmid für Luciferase transfiziert worden. Dabei kamen alle dreizehn Reagenzien zum Einsatz. Die relative Effizienz des Gentransfers bestimmten wir mit dem Luciferase Assay System.

In einem zweiten Schritt wurde nur das speziell für einen Zelltyp erfolgreichste Reagenz verwendet, um das *E. coli lacZ*-Gen zu übertragen. Die Bestimmung der Effizienz gelang durch X-gal Färbung mit anschließender digitaler Fotodokumentation. In diesem Schritt wurde außerdem die Lipid/DNS-Ratio optimiert.

In einem dritten Schritt transferierten wir das IGF-I-Plasmid in die sieben verschiedenen Zelltypen. Die dabei erzielte Transgenexpression wurde mittels IGF-I-ELISA quantifiziert.

5.4.4.1 Luciferase-Bestimmung

Den Luciferase-transfizierten Zellen in den *wells* nahmen wir das Medium ab und spülten sie mit PBS. Nach Herstellerangaben gaben wir für 5 min 100 µl des 1x *lysis-buffer* auf die Zellen. Die lysierten Zellen wurden mechanisch vom Boden der Kavität abgelöst. Das komplette Lysat eines *wells* wurde in 1,7 ml Plastik-Reaktionsgefäße (Eppendorf-Röhrchen) überführt und zentrifugiert (15 s, 2000 g). Wir reicherten 20 µl des Überstandes mit 50 µl Luciferase Assay-Reagenz in einem *well* einer schwarzen 96-*well*-Platte an und bestimmten die Intensität der Lumineszenz (GENios microplate reader; Messdauer 1000 ms/*well*). Die ermittelten Werte (Einheit RLU: *relative light units*) ermöglichten den Vergleich der Effizienzen der einzelnen Transfektionsreagenzien bei einem Zelltyp. Eine prozentuale Bestimmung der Effizienz war anhand der RLU nicht möglich.

5.4.4.2 X-gal-Detektion

Die Färbelösung des X-gal *staining set* wurde gemäß den Herstellerangaben angesetzt. Zur Fixierung der Zellen ersetzten wir das Wachstumsmedium der *wells* durch 4%ige Formaldehyd-Lösung (5 min, 300 µl). Nach Spülung der Zellen mit PBS applizierten wir 300 µl Färbelösung (5 h). Erfolgreich transfizierte Zellen wurden blau angefärbt, nicht-transfizierten Zellen stellten sich farblos dar.

Bei 10-facher Vergrößerung fertigten wir dann von jedem *well* fünf digitale Fotos an. Diese wurden standardisiert sowohl zentral als auch entlang der virtuellen horizontalen und vertikalen

Achsen, jedoch nicht im Randbereich eines *well*s, aufgenommen. Die Fotos werteten wir digital mit der *analySIS* Software aus, d.h. alle transfizierten (blau) und alle nicht-transfizierten Zellen (farblos) wurden gezählt. Die Transfektionseffizienz wurde als der Quotient gefärbte Zellen/gesamte Zellen bestimmt.

5.4.4.3 IGF-I-ELISA

Den transfizierten Zellen wurde das Medium abgenommen, durch 300 μ l Basalmedium ersetzt und dieses nach Inkubation (24 h, Standardbedingungen) auf seine IGF-I-Konzentration untersucht: Der ELISA auf IGF-I wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Prinzipiell konnten vorhandene IGF-I-Moleküle in den Überständen durch Bindung an einen Peroxidasegekoppelten IGF-I-Antikörper nachgewiesen werden. Es schloss sich die Bestimmung der Intensität einer Peroxidase-vermittelte Farbreaktionen am Antikörper an (GENios microplate reader). Aufgrund der proportionalen Beziehung zwischen Farbintensität und Menge an Wachstumsfaktor im Überstand konnten wir die IGF-I-Sekretion/24 h/ 10^6 Zellen berechnen.

5.5 Herstellung der Alginate-Sphäroide

5.5.1 Zelltyp, Transfektionsreagenz und Plasmid-DNS

Nach Evaluation der Effizienz verschiedener Transfektions-Systeme und Zelllinien wählten wir für die folgenden Versuche murine dermale Fibroblasten (NIH 3T3) sowie das Lipid-basierte Transfektionsreagenz FuGENE 6 (vgl. 7.1.4). Es kamen die Plasmide mit dem *E. coli lacZ*-Gen, mit dem für IGF-I codierenden Gen sowie das FGF-2-Plasmid zum Einsatz.

5.5.2 Zellkultur und Zellzählung

Die Kultivierung der NIH 3T3 Zellen erfolgte wie unter 5.2.1 beschrieben in 225 cm^2 Kulturflaschen. Wir führten nach jeweils drei Tagen einen Mediumwechsel mit Wachstumsmedium durch. Bei einer Zellzahl von 8×10^4 Zellen pro Alginate-Sphäroid (Madry et al., 2005; Kaul et al., 2006) und für eine adäquate Aussaat der Fibroblasten zu Transfektionszwecken erfolgten Zellzählungen mittels Neubauer-Zählkammer.

5.5.3 Transfektionen

Die Transfektionen der NIH 3T3 Zellen mit o.g. Plasmiden führten wir in 10 cm-Petrischalen durch. In jede Schale wurden $0,7 \times 10^6$ Zellen in 10 ml Wachstumsmedium gegeben. Nach Inkubation (24 h, Standardbedingungen) wies der Zellrasen eine 60-70%ige Konfluenz auf. Die

Transfektionen erfolgten analog zu dem in 5.4.3.8 beschriebenen Ablauf. Pro Schale wurden dabei 177 μ l OptiMEM mit 87 μ l FuGENE 6-Transfektionsreagenz sowie 29 μ g Plasmid-DNS appliziert. Bei dem kombinierten Gentransfer von IGF-I und FGF-2 wurde das Lipid/DNS-Verhältnis von 3:1 beibehalten; jeweils 29 μ g beider Plasmid-DNS wurden mit insgesamt 174 μ l FuGENE 6 inkubiert.

5.5.4 Herstellung der Alginate-Sphäroide

Die verschieden transfizierten NIH 3T3 Zellen sowie nicht-transfizierte Zellen wurden nach einer 24stündigen Inkubation in Alginate verkapselt:

5.5.4.1 Zellisolation und Zellzählung

Die Zellen wurden durch Zugabe von Trypsin (2 ml, 10 min) vom Boden der Petrischalen abgelöst und in 50 ml-Plastikröhrchen überführt. Dabei erfolgte die Aufteilung gemäß dem transfizierten Fremdgen in nicht-transfizierte Zellen, *lacZ*-, IGF-I- oder IGF-I/FGF-2-Zellen. Alle vier Plastikröhrchen füllten wir mit Wachstumsmedium auf 40 ml auf. Die Bestimmung der Zellzahl pro Gruppe erfolgte durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer.

5.5.4.2 Alginate-Zell-Suspension

Die unterschiedlich modifizierten Fibroblasten wurden zentrifugiert (10 min, 260 g). Den Überstand nahmen wir ab und resuspendierten die Zellen vorsichtig in 1,2%iger Alginate-Lösung. Bei bekannter Zellzahl/Pellet wurde eine Konzentration von 8×10^6 Zellen pro 1 ml Alginate erzielt.

5.5.4.3 Herstellung der Sphäroide

Wir gaben 15 ml einer 102 mM CaCl_2 -Lösung in eine 75 cm^2 -Kulturflasche. Unter gleichmäßigem Schütteln der Kulturflasche wurde die Alginate-Zell-Suspension über eine 21-G-Nadel tropfenweise in die Lösung appliziert. Die Ca^{2+} -Kationen bewirken eine Quervernetzung der Co-Polymere im Alginate und die Ausbildung von Sphäroiden. Diese Alginate-Sphäroide wurden für 10 min in der CaCl_2 -Lösung belassen. Danach wurden sie mit NaCl-Lösung (150mM, 15 ml) und im Abstand von 10 min weitere zwei Male mit Basalmedium (15 ml) gewaschen. Es resultierten vier Typen von Alginate-Sphäroiden:

- Sphäroide mit nicht-transfizierten NIH 3T3 Zellen (nicht-transfizierte Sphäroide),
- Sphäroide mit *lacZ*-transfizierten NIH 3T3 Zellen (*lacZ*-Sphäroide),
- Sphäroide mit IGF-I-transfizierten NIH 3T3 Zellen (IGF-I-Sphäroide) und
- Sphäroide mit IGF-I/FGF-2-transfizierten NIH 3T3 Zellen (IGF-I/FGF-2-Sphäroide).

5.6 *In vitro* Experimente

Alle Alginat-Sphäroide wurden in einem gemeinsamen Ansatz hergestellt, um die Vergleichbarkeit der Daten aus den *in vitro* Versuchsansätzen mit den Tierexperimenten (siehe 5.7) zu gewährleisten.

5.6.1 Zeitverlauf-Studie

Die Alginat-Sphäroide wurden über 21 Tage in Basalmedium kultiviert. Zellzahl und Vitalität von IGF-I- und IGF-I/FGF-2-Sphäroiden sowie deren Wachstumsfaktor-Sekretion untersuchten wir im Zeitverlauf. Nicht-transfizierte Sphäroide fungierten als Kontrollgruppe.

5.6.1.1 *Procedere*

Zu den Zeitpunkten 1, 2, 4, 7, 14 und 21 Tage nach Transfektion analysierten wir Sphäroide der IGF-I- und IGF-I/FGF-2-Gruppe ($n = 3$) sowie der Kontrollgruppe ($n = 1$). Die Kultivierung der Sphäroide erfolgte in einer 96-*well*-Platte mit jeweils einem Sphäroid pro *well*. Mediumwechsel führten wir alle 48 h und zusätzlich 24 h vor o.g. Zeitpunkten durch. Aus dem abgenommenen Medium konnte mittels ELISA jene Menge Wachstumsfaktor ermittelt werden, die die Sphäroide über 24 h sezerniert hatten.

5.6.1.2 *Analyse*

Zur Bestimmung von Gesamtzellzahl und Anteil vitaler Zellen wurden die Alginat-Sphäroide in je 100 μ l Natrium-Citrat aufgelöst (55 mM, 10 min). Im Anschluss gaben wir zu jedem Reaktionsgefäß 0,4%ige Trypan-Blau-Lösung (2 μ l, 10 min). Dieser Farbstoff färbt abgestorbenen Zellen blau an, vitalen Zellen bleiben farblos. Zur Zellzählung wurden 10 μ l dieser Suspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Vitalität berechnete sich als prozentualer Anteil der farblosen Zellen an der Gesamtzahl aller Zellen.

An Tag 1 nach Transfektion, also dem Tag der Verkapselung (vgl. 5.5), konnte noch keine Wachstumsfaktor-Sekretion/24 h bestimmt werden. Zu den übrigen Zeitpunkten führten wir einen ELISA auf IGF-I für die Überstände aller drei Gruppen durch. Ein FGF-2-ELISA wurde hingegen nur für die Kontrollgruppe und das Medium über IGF-I/FGF-2-Sphäroiden ausgeführt. Die Durchführung des ELISA auf FGF-2 erfolgte analog zum IGF-I-ELISA wie unter 5.4.4.3 beschrieben.

5.6.2 Verschiedene Sphäroide *in vitro*

IGF-I-, IGF-I/FGF-2- und *lacZ*-Sphäroide wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen in Basalmedium kultiviert. Zellzahl, Vitalität der Zellen und Histologie der Sphäroide untersuchten wir 1 und 21 Tage nach Transfektion. In diesem Versuch erhoben wir *in vitro* Daten über Sphäroide, die analog auch *in vivo* verwendet wurden.

5.6.2.1 *Procedere*

In einer Kavität einer 24-well-Platte wurden *lacZ*- ($n = 6$), IGF-I- ($n = 6$) oder IGF-I/FGF-2-Sphäroide ($n = 5$) über 21 Tage kultiviert. Mediumwechsel mit 400 μ l Basalmedium führten wir alle 48 h durch. Die Analyse von Zellproliferation und Vitalität erfolgte wie unter 5.6.1.2 beschrieben. Zu beiden o.g. Zeitpunkten wurde je ein Sphäroid pro Gruppe zwecks histologischer Untersuchung weiterbehandelt. Auch nicht-transfizierte Sphäroide (5.6.1) wurden histologisch aufbereitet.

5.6.2.2 *Histologie der Alginat-Sphäroide*

Fixierung und Entwässerung

Zu beiden Zeitpunkten erfolgte zunächst die Fixierung der Sphäroide in 4%iger Formaldehydlösung (1 min). Zur Entwässerung durchliefen die Sphäroide dann im Abstand von jeweils 1 h eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 80%, 2x 95%, 2x 100%) und wurden Xylen ausgesetzt (zweimal 30 min). Anschließend gaben wir ein Paraffin-Xylen Gemisch (1:1) auf die Sphäroide (1 h, 62°C). Schließlich wurde dieses durch reines Paraffin ersetzt (16 h, 62°C, dreimal gewechselt).

Einbetten und Schneiden

In eine Metallkassette plazierten wir zentral das Sphäroid und füllten die Kassette mit flüssigem Paraffin auf. Nach Aushärtung des Paraffinblocks wurden mittels Rotationsmikrotom histologische Schnitte angefertigt (Schnitttiefe 6-7 μ m, Neigungswinkel der Klinge 6-7°). Die gewonnenen Paraffinschnitte wurden in ein Wasserbad überführt (24°C), auf Objektträger übertragen und zum Aushärten über Nacht auf einer Wärmeplatte gelagert.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Darstellung der Zellen innerhalb der Sphäroide führten wir eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (im Folgenden als HE-Färbung bezeichnet) durch. Alle Teilschritte aller in dieser Arbeit beschriebenen Färbemethoden wurden in 200 ml-Glasbehältern ausgeführt.

Zum Entparaffinieren gaben wir die histologischen Schnitte in Xylen (zweimal 5 min) und Ethanol (100%, 95%, 80%; je zweimal 1 min).

Bevor und nachdem wir die Präparate dann für 10 min in der Hämatoxylin-Lösung anfärbten, spülten wir sie in Leitungswasser. Danach wurden sie 2-3 s in einer HCl-Lösung differenziert, über 3-5 min in warmem Wasser gebläut und 10 s in Eosinlösung (Zusatz von 2-3 Tropfen 3%iger Essigsäure) angefärbt. Nach der Eosin-Färbung wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült.

Zum Entwässern durchliefen die Präparate eine aufsteigende Alkoholreihe (umgekehrt zu den Schritten des Entparaffinierens) und wurden schließlich mit Roti-Histokitt II eingedeckt. Den fertigen Präparaten wurde bei Lagerung über Nacht ein Austrocknen ermöglicht.

5.7 In vivo Experimente

Im Folgenden werden die Implantation von IGF-I-, IGF-I/FGF-2- und *lacZ*-Sphäroiden in osteochondrale Defekte in den Kniegelenken von Kaninchen sowie die nachfolgenden biochemischen und histologischen Untersuchungen beschrieben.

5.7.1 Implantation der Alginate-Sphäroide

5.7.1.1 Versuchstiere

In diesem Experiment verwendeten wir zwölf weibliche Chinchilla Bastard Kaninchen als Versuchstiere. Die Tiere wurden in klimatisierten Ställen des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, gehalten. Sie wurden einer konstanten Umgebungstemperatur und einer dem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus nachempfundenen Beleuchtung ausgesetzt. Außerdem wurden die Kaninchen nach einem standardisierten Futterplan ernährt und erhielten Wasser *ad libitum*. Direkt postoperativ war den Tieren die Belastung der operierten Knie in vollem Umfang gestattet; wir führten keine Immobilisation der Gelenke durch.

5.7.1.2 Vorbereitung

Sechs Tiere erhielten IGF-I-Sphäroide in beide Defekte eines Gelenks. Den übrigen sechs Tieren wurden IGF-I/FGF-2-Sphäroide in die Defekte eines Knies implantiert. In beiden Gruppen wurden in das kontralaterale Gelenk (rechts und links alternierend) je zwei *lacZ*-Sphäroide als Kontrolle eingesetzt.

5.7.1.3 Operation zur Sphäroid-Implantation

Alle Tierversuche waren von der Saarländischen Tierschutzkommission genehmigt worden. Die Eingriffe erfolgten unter sterilen Kautelen im Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, durch PD Dr. H. Madry unter Assistenz von P. Orth. Die Tiere wurden durch intramuskuläre Injektion von Xylazin (Rompun; 4 mg/kg Körpermasse) und Ketamin (Ketavet; 0,75 mg/kg Körpermasse) analgosediert. Nach Rasur, sterilem Abwaschen und Abdecken des Kniegelenks stellten wir über einen medialen parapatellaren Hautschnitt und nach lateraler Luxation der Patella in 60° Flexionsstellung die Facies patellaris femoris dar. Mit einem Hohlbohrer (Durchmesser 3,2 mm) setzten wir in der Trochlea femoris manuell zwei zylindrische osteochondrale Defekte. Nach Spülung mit PBS wurden die Alginat-Sphäroide *press-fit* in die Defekte implantiert. Nach Reposition der Patella überprüften wir die korrekte Lage der Implantate auch unter Bewegung. Hiernach erfolgte der schichtweise Wundverschluss mit sorgfältiger Naht der Gelenkkapsel und intrakutaner Hautnaht.

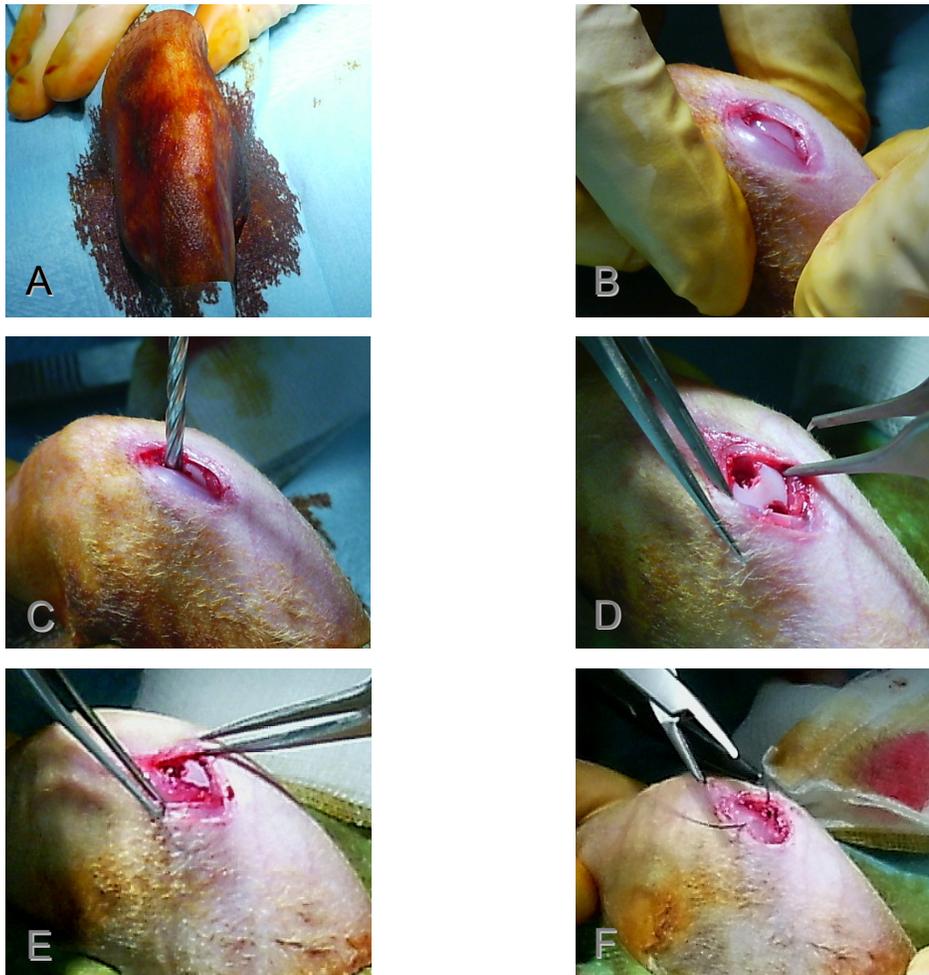


Abb. 3: Implantation der Alginat-Sphäroide. A: Hautdesinfektion mit Braunol, B: Arthrotomie und Luxation der Patella nach lateral sowie Darstellung der Trochlea femoris, C: Setzen der osteochondralen Defekte, D: Darstellung der zwei Defekte in der Trochlea femoris, E: *press-fit* Implantation der Sphäroide, F: Wundverschluss.

5.7.2 Sektion der Tiere

5.7.2.1 Vorbereitung

Nach Bestimmung der Körpermasse und Analgosedierung mittels Xylazin und Ketamin wie oben beschrieben (5.7.1.3) wurden die Tiere durch intravenöse Injektion von zunächst Pentobarbital (Narcoren; 150 mg/kg Körpermasse) und danach Luft (10 ml) eingeschläfert.

5.7.2.2 Sektion

Die Eingriffe erfolgten unsteril im Sektionssaal des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes. Vor der Sektion dokumentierten wir einen etwaigen Erguss oder eine Luxation des Gelenks. Nach dem Hautschnitt über die Streckseite des Gelenks und Explantation der Patella wurde durch Gelenkspülung mit 1,5 ml PBS die Synovialflüssigkeit gewonnen. Wir entfernten circa 0,5 cm² der Synovialmembran und dokumentierten makroskopische Zeichen einer Synovialitis. Daraufhin präparierten wir das distale Femur und stellten die Defekte dar. Diese wurden makroskopisch nach den Kriterien Farbe, Abgrenzbarkeit vom umgebenden Knorpel und Erhabenheit über das Niveau des umgebenden Knorpels beurteilt. Das Reparaturgewebe des proximal gelegenen Defekts wurde mit einem scharfen Löffel gewonnen und in einem Eppendorf-Röhrchen (Leermasse bekannt) bei -80°C konserviert. Schließlich wurde das Femur in Höhe der Kondylen mit einer Weber-Zange fixiert, der Knochen 3 cm proximal der Defekte durchtrennt und mitsamt der Patella für 24 h in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Bei einem Tier entnahmen wir aus den Musculi quadriceps beider Hinterläufe je circa 1 cm³ große Muskelstücke zur Anlage einer Zellkultur (vgl. 5.2.2).

5.7.3 Evaluation der Synovialflüssigkeit

Wir untersuchten, in welchem Ausmaß die von den transfizierten Zellen produzierten Wachstumsfaktoren in die Synovialflüssigkeit diffundierten, anstatt lokal am Ort der Knorpelreparatur zu wirken. Hierzu wurden für die gewonnenen Synovialflüssigkeiten aus insgesamt 24 Gelenken ELISA auf IGF-I und FGF-2 durchgeführt. Die Methode ist bereits unter 5.4.4.3 und 5.6.1.2 beschrieben.

5.7.4 Biochemische Evaluation des Reparaturgewebes

Das *in toto* gewonnene Reparaturgewebe der proximalen Defekte von 12 Tieren (24 Proben) wurde einem DNS-Test zur Bestimmung von DNS-Gehalt und Zellzahl sowie einem Dimethylmethyleneblau-Test (DMMB-Test) zur Ermittlung des Proteoglykan-Gehaltes unterzogen.

5.7.4.1 Masse und Wassergehalt

Die Leermasse des jeweiligen Eppendorf-Röhrchens war vorab bestimmt worden. Nach Zugabe des Reparaturgewebes eines Defektes konnte so dessen Nassmasse berechnet werden. Danach wurde das extrahierte Defektgewebe in den Röhrchen über 5 h lyophilisiert und nach erneutem Wiegen dessen Trockenmasse und Wassergehalt berechnet.

5.7.4.2 Papain-Verdau

Zu allen 24 Proben lyophilisierten Reparaturgewebes gaben wir je 100 µl Papain-Lösung. Die Ansätze wurden im Wasserbad bei 60°C über Nacht inkubiert.

5.7.4.3 DNS-Bestimmung

In einer schwarzen 96-well-Platte legten wir zunächst eine Standardreihe an: 130, 100, 50, 10 und 0 µl einer kommerziell erhältlichen Standard-DNS (10 µg/ml) wurden in TNE-Puffer auf 130 µl verdünnt. Von den in Papain verdauten Reparaturgeweben wurden pro well konstant 1,5 µl in 128,5 µl TNE-Puffer verdünnt. Bisbenzimid Hoechst 33258 interkaliert mit der DNS durch Bindung überwiegend an das Basenpaar Adenin/Thymin (Brunck et al., 1979). Wir verdünnten diesen Farbstoff im Verhältnis 1:1000 mit TNE-Puffer und applizierten hiervon 100 µl/well. Bei einer Exzitations-Wellenlänge von 360 nm wurden die Emissionen der Wellenlänge 465 nm detektiert. Wir bestimmten bei bekanntem DNS-Gehalt der Standardreihe zunächst eine Kalibriergerade, berechneten damit die DNS-Menge in den Proben und extrapolierten bei einem durchschnittlichen DNS-Gehalt von 7,6 pg DNS/Zelle auf die Zellzahl im Defektgewebe.

5.7.4.4 Proteoglykan-Bestimmung

Die DMMB-Färbelösung wurde auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt (vgl. 4.1). Sowohl Chondroitinsulfat als auch das Proteoglykan in den Proben binden an DMMB; die photometrische Detektion beider Substanzen ist vergleichbar (Farndale et al., 1986). Vor diesem Hintergrund legten wir eine Standardreihe mit bekannten Mengen Chondroitinsulfat an (Tab. 9). Von den papainverdauten Defektgeweben wurden je 5 µl/well (transparente 96-well-Platte) appliziert. Wir gaben zu allen wells 250 µl DMMB-Färbelösung und bestimmten die Absorption der Blaufärbung bei 530 nm. Anhand der Absorptionswerte für Chondroitinsulfat aus der Standardreihe erstellten wir eine Kalibriergerade, mit der wir die Menge Proteoglykan in den Proben berechneten.

well	Lösung A	Lösung C	µg Chondroitinsulfat
1.	0 µl	40 µl	4
2.	10 µl	30 µl	3
3.	20 µl	20 µl	2
4.	30 µl	10 µl	1
5.	35 µl	5 µl	0,5
6.	40 µl	0 µl	0

Tab. 9: Schema des DMMB-Test.

5.7.5 Histologische Evaluation der Gelenke

5.7.5.1 Entkalkung

Nach Fixierung der Femora in Formaldehyd-Lösung (24 h) wurde diese durch 30 ml Entkalkungs-Lösung ersetzt. Insgesamt wurden die Explantate über 4 Wochen entkalkt bei wöchentlichen Wechseln der Entkalkungs-Lösung. Durch regelmäßiges Zuschneiden verkleinerten wir die Präparate sukzessive.

5.7.5.2 Anfertigung histologischer Schnitte

Fixierung und Entwässerung

Die entkalkten Femora wurden über 24 h in Formalinlösung (pH 7,4) fixiert, 2 h in Leitungswasser gespült und aufsteigenden Ethanolverdünnungen ausgesetzt (20%, 40%, 60%, 80%, 90%; je 1 h). Im Anschluss gaben wir die Präparate über Nacht in 100% Ethanol und am Folgetag in Xylen (dreimal 1 h). Eine Inkubation bei 62°C in einem 1:1 Xylen-Paraffin-Gemisch (1 h) und in reinem Paraffin (20 h) schloss sich an.

Einbetten und Schneiden

Analog zu den Beschreibungen unter 5.6.2.2 wurden die Präparate in einen Paraffinblock eingebettet und histologische Schnitte angefertigt. Wir achteten auf eine Schnittführung in der Frontalebene mit Darstellung sowohl der Defekte in ganzer Tiefe als auch der angrenzenden Knorpeloberflächen. Die Schnitte wurden aus einem Bereich von ± 1 mm um das Zentrum des Defektes und in Abständen von jeweils 200 μ m gewonnen.

5.7.5.3 Färbungen und Auswertung

Die Beurteilung der Synovialmembran auf etwaige Entzündungszeichen erfolgte mittels eines Bewertungssystems an HE-gefärbten Schnitten. Außerdem wurden die Präparate immunhistochemisch auf die Verteilung von Typ-I- und Typ-II-Kollagen untersucht. Zur histologischen Evaluation der Knorpelreparatur färbten wir die Schnitte mit Safranin-Orange und Echtgrün (*fast green*) an (im Folgenden als Safranin-O-Färbung bezeichnet) und beurteilten sie mittels eines etablierten Bewertungssystems.

5.7.5.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Durchführung der HE-Färbung wurde bereits beschrieben (5.6.2.2).

Evaluation

Die Beurteilung etwaiger Entzündungszeichen erfolgte anhand des von Fortier et al. (2002) beschriebenen Bewertungssystems an je 5 Schnitten pro Gelenk mit Anteilen von

Synovialmembran. Dieses liefert eine Skala, die von 0 (keine Entzündungszeichen) bis 9 Punkte (starke Entzündungszeichen) reicht (Tab. 10). Die Beurteilung der Schnitte wurde von einem Untersucher verblindet durchgeführt und erfolgte bei 20- und 40-facher Vergrößerung.

1.Villus-Fibrosierung	Punkte
Normal	0
Leicht	1
Mittelstark	2
Stark	3
<hr/>	
2.Villusarchitektur	
Normal	0
Leichte Verklumpung	1
Mittelstarke Verklumpung	2
Starke Verklumpung	3
<hr/>	
3.Entzündliches Zellinfiltrat	
Normal (kein Infiltrat)	0
Leicht	1
Mittelstark	2
Stark	3

Tab. 10: Bewertungssystem zur histologischen Beurteilung der Synovialmembran (Fortier et al., 2002).

5.7.5.3.2 Immunhistochemische Typ-I/II-Kollagen-Färbungen

Nach dem Entparaffinieren (vgl. 5.6.2.2) wurden die Schnitte in eine 0,3%ige Wasserstoff-Peroxid-Verdünnung (H_2O_2 , 30 min) überführt. Nach zweimaliger Spülung in PBS gaben wir sie zum Andauen in eine 0,1%ige Trypsin-Lösung (10 min) und nach erneuter PBS-Spülung in *blocking buffer*. Die Präparate der internen Kontrollgruppe wurden in diesem *blocking buffer* belassen und später lediglich mit dem sekundären Antikörper versehen.

Auf die anzufärbenden Schnitte hingegen wurde nach einer halben Stunde ein monoklonaler primärer Anti-Typ-I-Kollagen- bzw. Anti-Typ-II-Kollagen-Antikörper gegeben (0,5 mg/ml; Verdünnung 1:100 in *blocking buffer*). Nach der Inkubation (1 h) spülten wir die Objektträger zweimal in PBS. Alle Schnitte (Typ-I-, Typ-II-Kollagen und Kontrolle) wurden dann mit einem sekundären Antikörper (biotiniliert; 1,5 mg/ml; Verdünnung 1:500 in PBS) versehen und über 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert.

Wir spülten dann den Überschuss dreimalig mit PBS ab und applizierten das nach Herstellerangaben vorbereitete ABC-Reagenz. Nach Inkubation (30 min, Raumtemperatur) und PBS-Spülungen gaben wir die DAB-Lösung (Zubereitung nach Herstellerangaben) für 7 min auf die Präparaten. Durch diesen Schritt wurde überall dort eine Farbreaktion (braun) hervorgerufen, wo die Peroxidase des ABC-Reagenz an sekundären Antikörpern haftete. Die Intensität der

lokale Verfärbung wies auf die Konzentration des entsprechenden Kollagens hin. Entwässern und Eindecken erfolgten wie unter 5.6.2.2 beschrieben.

Evaluation

Die Immunreaktivität auf Typ-I- und Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe beurteilten wir mit Hilfe eines semiquantitativen Bewertungssystems, bei welchem die Intensität der Braunverfärbung als Indikator der Kollagendichte herangezogen wird. Bei der Anfärbung von Typ-I-Kollagen fungierte der subchondrale Knochen als Positivkontrolle und der normale Gelenkknorpel als Negativkontrolle. Bei der Anfärbung von Typ-II-Kollagen wurde umgekehrt verfahren. Die Immunreaktivität bewerteten wir wie folgt: (-) keine Immunreaktivität, (+) schwächere Immunreaktivität, (++) gleiche Immunreaktivität, (+++) stärkere Immunreaktivität als in der Positivkontrolle. Von jedem Kniegelenk wurden 10 Schnitte bei 20- und 40-facher Vergrößerung von einem Untersucher verblindet evaluiert.

5.7.5.3.3 Safranin-O-Färbung

Das Entparaffinieren erfolgte wie unter 5.6.2.2 dargestellt. Wir gaben die Schnitte zur Grünfärbung von Cytoplasma und Kollagen in eine Echtgrün- (*fast green*-) Lösung (0,02%, 2 min). Nach Spülung in Leitungswasser wurden sie in Eisessig (1%) eingetaucht und die in der Knorpelmatrix lokalisierten Mucopolysaccharide mittels Safranin-Orange-Lösung (0,1%, 5 min) gegengefärbt. Abschließendes Entwässern und Eindecken wie beschrieben.

Evaluation

Zur quantitativen Evaluation der Defektreparatur werteten wir die Safranin-O-gefärbten histologischen Schnitte anhand des unten dargestellten Bewertungssystems aus (Tab. 11; Sellers et al., 1997). Dieses liefert eine Skala, die von 31 Punkten (leerer Defekt ohne jegliches Reparaturgewebe) bis 0 Punkte (normaler Gelenkknorpel, komplette Regeneration) reicht. Es wurden für jeden Defekt mindestens 9 und insgesamt 274 Schnitte evaluiert. Diese beurteilten zwei unabhängige Untersucher verblindet bei 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung.

1. Defektfüllung		Punkte
in Relation zum	111 – 125%	1
angrenzenden gesunden Knorpel	91 – 110 %	0
	76 – 90%	1
	51 – 75%	2
	26 – 50%	3
	< 25%	4
2. Integration		
des Reparaturgewebes mit dem	normale Kontinuität	0
angrenzenden gesunden Knorpel	verminderte Zellularität	1
	Spalte auf einer Seite	2
	Spalte auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbbarkeit		
mit Safranin-Orange	normal	0
	leicht vermindert	1
	mittelstark vermindert	2
	stark vermindert	3
	keine Anfärbbarkeit	4
4. Zellmorphologie		
(a) normal		0
(b) vorwiegend runde Zellen, Chondrozytenmorphologie	75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	0
	25 – 75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	1
	< 25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
(c) 50 % runde Zellen, Chondrozytenmorphologie	75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	25 – 75% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	3
	< 25% der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
(d) vorwiegend Fibroblasten- ähnliche Zellen		5
5. Defektarchitektur		
ohne Berücksichtigung der Defektränder	normal	0
	1 – 3 kleine Defekte	1
	1 – 3 große Defekte	2
	> 3 große Defekte	3
	Risse/Spalten	4
6. Oberflächenarchitektur		
Fibrillation = Auffaserung der Oberfläche	normal	0
	leichte Fibrillationen	1
	mittelstarke Fibrillationen	2
	starke Fibrillationen	3
7. Subchondraler Knochen		
Neubildung unterhalb des Knorpelreparaturgewebes	90 – 100%	0
	75 – 89%	1
	50 – 74%	2
	25 – 49%	3
	< 25%	4
8. tidemark		
Ossifikationsfront;	vollständig	0
Übergangszone zwischen	75 – 99%	1
transitorischem und verkalktem	50 – 74%	2
Knorpel (vgl. Abb. 1)	25 – 49%	3
	< 25%	4

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

5.8 Statistische Analyse

5.8.1 Evaluation von Gentransfersystemen

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Bei der Transfektion des Luciferase-Plasmids wurden für jeden Zelltyp und jedes Transfektionssystem drei bis vier voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Innerhalb eines jeden Experiments werteten wir drei *wells* pro Testkondition (Transfektionsreagenz und Zelltyp) aus. Jede Messung der RLU eines *wells* erfolgte in doppelter Ausführung. Für die Transfektion des *lacZ*-Plasmids bestimmten wir vorab in einfachen Ansätzen orientierend die optimale Zellzahl/*well* sowie die optimale Expositionszeit der Zellen gegenüber den DNS-Komplexen. Bei der Optimierung der Lipid/DNS-Ratio wurden alle Experimente unabhängig voneinander drei- bis fünfmal durchgeführt mit jeweils zwei bis drei untersuchten *wells* pro Ansatz. Die IGF-I-Transfektionen führten wir jeweils in doppelter Ausführung durch. Innerhalb eines jeden Experiments untersuchten wir zwei *wells* für jede Testkondition. Eine eigene Kontrollgruppe wurde für jedes Experiment erstellt. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels ANOVA (*analysis of variance*). *P*-Werte $< 0,05$ (5%) wurden im Rahmen der gesamten Arbeit als statistisch signifikant angesehen.

5.8.2 *In vitro* Experimente

Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente sind ebenfalls als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Bei Zellzählungen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden zur Berechnung des Mittelwertes mindestens vier Quadranten ausgezählt. Es erfolgte zu jedem Analyse-Zeitpunkt die Bestimmung des Mittelwertes der Mittelwerte der Sphäroide einer Gruppe. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz verwendeten wir auch hier ANOVA.

5.8.3 *In vivo* Experimente

Für die Auswertung der HE-gefärbten Präparate (Entzündungsreaktion), den DNS- und DMMB-Test wie auch für die ELISA sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Der ELISA auf IGF-I und FGF-2 in der Synovialflüssigkeit wurde einfach durchgeführt, bei der DNS- und DMMB-Bestimmung wurden die Experimente doppelt ausgeführt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz verwendeten wir ANOVA.

Im Rahmen der semiquantitativen Auswertung der Typ-I- und Typ-II-Kollagen-Färbung war die Bestimmung eines signifikanten Unterschieds zwischen den Gruppen nicht möglich. Die Ergebnisse sind daher als Spanne der schwächsten bis zur stärksten Immunreaktion angegeben.

Die statistische Auswertung der Safranin-O-Färbungen wurde von D. Zurakowski, Ph.D., Department of Biostatistics, Harvard University (Boston, MA, USA) mit Hilfe der SPSS Software (Version 12.0) durchgeführt. Auf der Grundlage von Literaturangaben (Madry et al., 2005; Kaul et al., 2006) wurde zum Erreichen eines Signifikanzniveaus von 0,05 ein minimaler Stichprobenumfang von sechs Tieren in jeder Gruppe ermittelt. Es wurden Mittelwerte für die Einzelkategorien wie auch für den Gesamtpunktwert gebildet und als Mittelwert \pm 95%-Konfidenzintervall angegeben.

6. Ergebnisse

Im Ergebnisteil dieser Arbeit sind (1) die Evaluation von dreizehn nicht-viralen Gentransfersystemen in Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates, (2) die *in vitro* Untersuchungen von Alginat-Sphäroiden mit transfizierten NIH 3T3 Fibroblasten und (3) die *in vivo* Experimente nach Implantation von *lacZ*-, IGF-I- oder IGF-I/FGF-2-Sphäroiden in lapine Kniegelenke dargestellt.

6.1 Evaluation von Gentransfersystemen

6.1.1 Lapine Gelenkchondrozyten

Die Transfektionssysteme Gene Jammer, JetPEI und Calciumphosphat Co-Präzipitate erzielten die höchsten Werte der Luciferase-Expression (22.806 ± 8.373 , 22.347 ± 4.865 und 21.047 ± 8.653 RLU; $P > 0,05$). Nanofectin 2 hingegen zeigte mit 1.296 ± 1.214 RLU die niedrigste Effizienz (Abb. 4). Unter optimierten Bedingungen lag die Transfektionseffizienz von Gene Jammer bei $38,9 \pm 5,9\%$ (Abb. 11). Diese wurde 48 h nach Transfektion von $1 \mu\text{g}$ DNS bei einer Lipid/DNS-Ratio von 3:1 beobachtet. Andere Mischungsverhältnisse (6:1, 9:1 oder 12:1) resultierten in einer verminderten Effizienz. Die IGF-I-Sekretion von Gene Jammer-transfizierten Chondrozyten betrug $61,3 \pm 12,0$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h, 77-fach höher als in nicht-transfizierten Zellen ($0,6 \pm 0,2$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h).

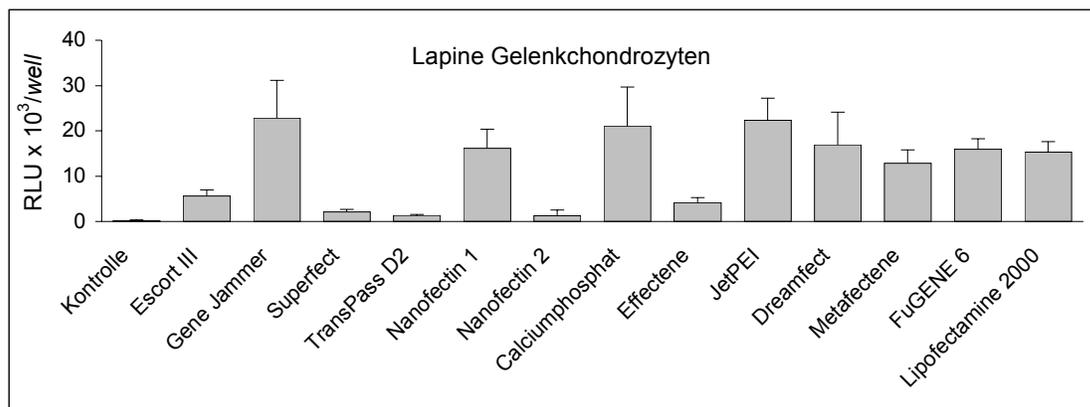


Abb. 4: Analyse der Transgenexpression von Gelenkchondrozyten mittels Chemilumineszenz ($n = 12$ wells pro Transfektionsreagenz).

6.1.2 Lapine Muskelzellen

Von den dreizehn untersuchten Transfektionsreagenzien produzierten Dreamfect und Metafectene die höchsten Chemilumineszenz-Werte (13.013 ± 593 und 12.519 ± 1.428 RLU; $P > 0,05$). Escort III erzielte die niedrigsten Werte (435 ± 21 RLU), 30-fach geringer als mit Dreamfect (Abb. 5). Per X-gal-Färbung ermittelten wir eine maximale Transfektionseffizienz $60,8 \pm 21,2\%$ (Abb. 11). Diese wurde durch Komplexierung von $0,5 \mu\text{g}$ DNS bei einer Dreamfect/DNS-Ratio von 4:1 erreicht. Höhere Lipid/DNS-Verhältnisse (8:1 oder 12:1) führten zu niedrigeren Transfektionseffizienzen. Die Transgenexpression lag bei $142,3 \pm 7,0$ ng IGF-I/ 10^6 transfizierte Zellen/24 h. Im Vergleich dazu sezernierten nicht-transfizierte Zellen lediglich $0,5 \pm 0,1$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h.

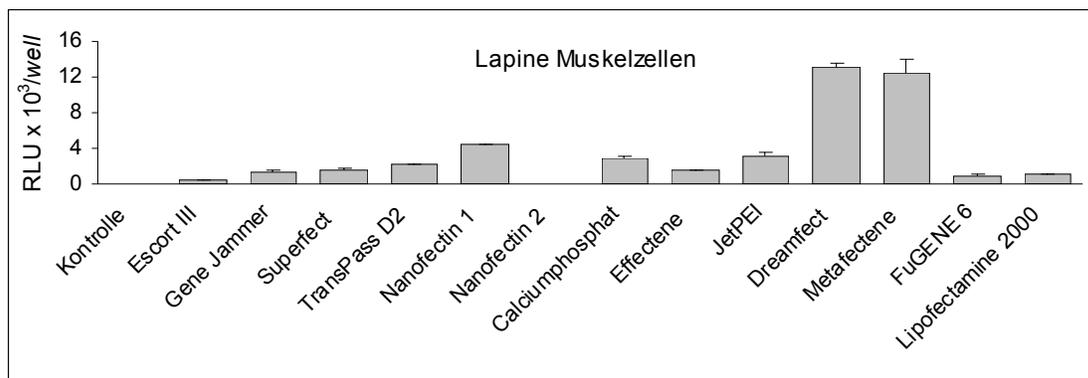


Abb. 5: Analyse der Transgenexpression von Muskelzellen mittels Chemilumineszenz ($n = 12$ wells pro Transfektionsreagenz).

6.1.3 Humane fibröse Dysplasie

Lipofectamine 2000, JetPEI, Nanofectin 1 und TransPass D2 erzielten die höchste Transfektionseffizienz in diesem Zelltyp (109 ± 111 , 98 ± 111 , 81 ± 63 und 60 ± 71 RLU; $P > 0,05$; Abb. 6). Dies entsprach einer Effizienz von $5,2 \pm 8,0\%$, erreicht durch Lipofectamine 2000 (Lipid/DNS-Ratio 2,5:1 bei $0,8 \mu\text{g}$ DNS; Abb. 11). Andere Mischungsverhältnisse (1,25:1 oder 3,75:1) führten nicht zu einer gesteigerten Effizienz. Lipofectamine 2000-transfizierte Zellen zeigten eine 2,5-fach höhere IGF-I Produktion ($0,9 \pm 0,2$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h) als nicht-transfizierte Zellen ($0,4 \pm 0,1$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h). Dennoch war die Menge des sezernierten Wachstumsfaktors gegenüber allen anderen untersuchten Zelltypen am niedrigsten ($P < 0,05$).

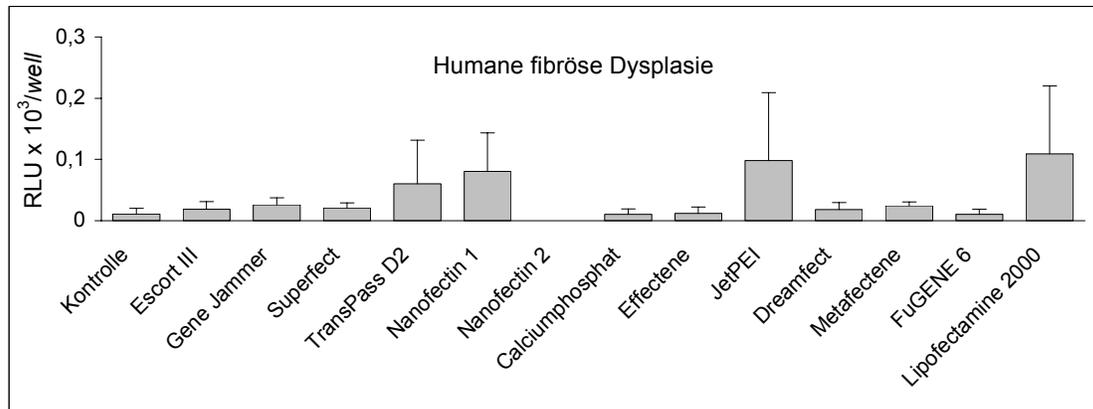


Abb. 6: Analyse der Transgenexpression von Zellen einer fibrösen Dysplasie mittels Chemilumineszenz ($n = 12$ wells pro Transfektionsreagenz).

6.1.4 Humane Osteosarkomzellen (SAOS-2)

Maximale Effizienz erreichten FuGENE 6, JetPEI, Gene Jammer, Metafectene, Dreamfect und Calciumphosphat Co-Präzipitate (11.430 ± 9.480 , 9.426 ± 7.887 , 9.156 ± 6.606 , 8.165 ± 4.692 , 6.159 ± 4.360 und 5.924 ± 3.466 RLU; $P > 0,05$). 28-fach geringere Werte hingegen erzielte das Reagenz Escort III (415 ± 275 RLU; Abb. 7). Mittels X-gal-Färbung bestimmten wir eine maximale Transfektionseffizienz von $12,7 \pm 16,2\%$ nach Komplexierung von $1 \mu\text{g}$ DNS mit $2 \mu\text{l}$ FuGENE 6 (Abb. 11). Andere Lipid/DNS-Ratios (1:1, 3:1 und 4:1) lieferten keine höheren Effizienzen. Die IGF-I Produktion FuGENE 6-transfizierter Osteosarkomzellen betrug $27,3 \pm 7,1$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h (nicht-transfizierte Zellen: $1,2 \pm 0,2$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h).

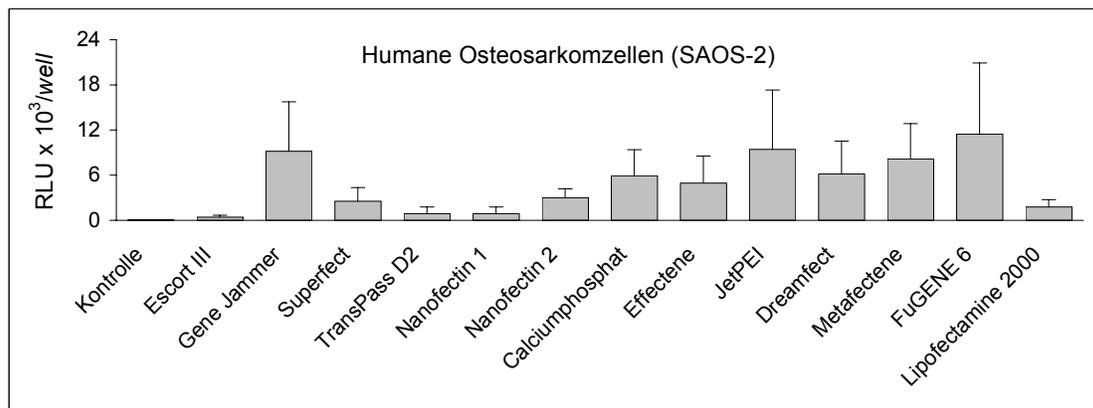


Abb. 7: Analyse der Transgenexpression von Osteosarkomzellen mittels Chemilumineszenz ($n = 12$ wells pro Transfektionsreagenz).

6.1.5 Humane Chondrosarkomzellen (CS-1)

Für diese Zelllinie stellten Lipofectamine 2000, Gene Jammer, Nanofectin 1 und FuGENE 6 die effizientesten Transfektionssysteme dar (8.470 ± 6.204 , 7.482 ± 4.575 , 5.354 ± 1.188 und 5.197 ± 2.647 RLU; $P > 0,05$). Im Gegensatz dazu lieferte TransPass D2 mit 375 ± 205 RLU die niedrigsten Werte (Abb. 8). Die maximale Transfektionseffizienz von $30,0 \pm 3,5\%$ (Abb. 11)

erreichte Lipofectamine 2000 bei einer Lipid/DNS-Ratio von 2,5:1 zur Komplexierung von 0,8 μg DNS. In IGF-I-transfizierten Zellen lagen die IGF-I Sekretionswerte bei $37,9 \pm 8,8$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h und in nicht-transfizierten Zellen bei $1,3 \pm 0,3$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h.

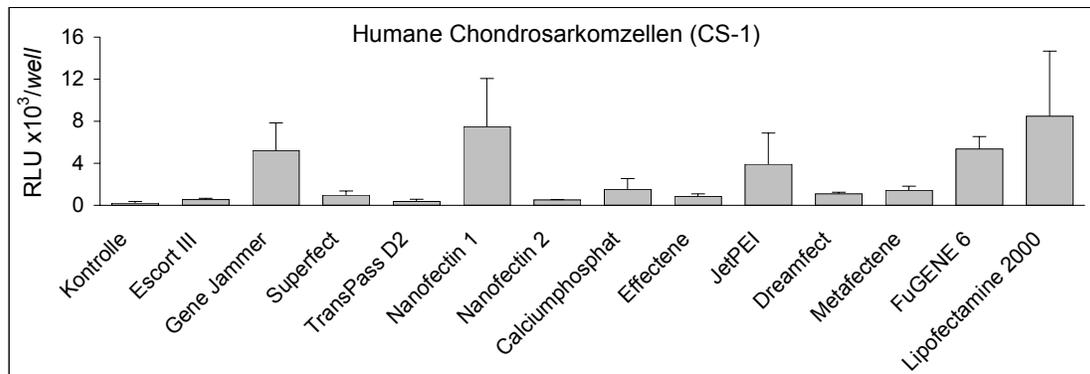


Abb. 8: Analyse der Transgenexpression von Chondrosarkomzellen mittels Chemilumineszenz ($n = 12$ wells pro Transfektionsreagenz).

6.1.6 Humane embryonale Nierenzellen (293)

Für 293 Zellen lieferte FuGENE 6 die höchsten Transfektionseffizienzen (41.076 ± 26.526 RLU), jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit der Calciumphosphat-Methode (35.523 ± 24.929 RLU), Lipofectamine 2000 (29.338 ± 23.970 RLU) und Metafectene (26.338 ± 21.275 RLU; $P > 0,05$). Die niedrigste Effizienz erzielten wir mit TransPass D2 (1.193 ± 857 RLU; Abb. 9). Die maximal erreichbare Transfektionseffizienz lag bei $70,3 \pm 26,9\%$ und wurde durch Komplexierung von 1 μg DNS mit 2 μl FuGENE 6 erreicht (Abb. 11). Andere Lipid/DNS-Ratios (1:1, 3:1 oder 4:1) reduzierten die Effizienz. Die Expression von IGF-I nach FuGENE 6-vermittelter Transfektion ($240,6 \pm 11,7$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h) war signifikant höher als sowohl in nicht-transfizierten 293 Zellen ($1,0 \pm 0,2$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h) als auch in allen anderen untersuchten Zelltypen ($P < 0,05$).

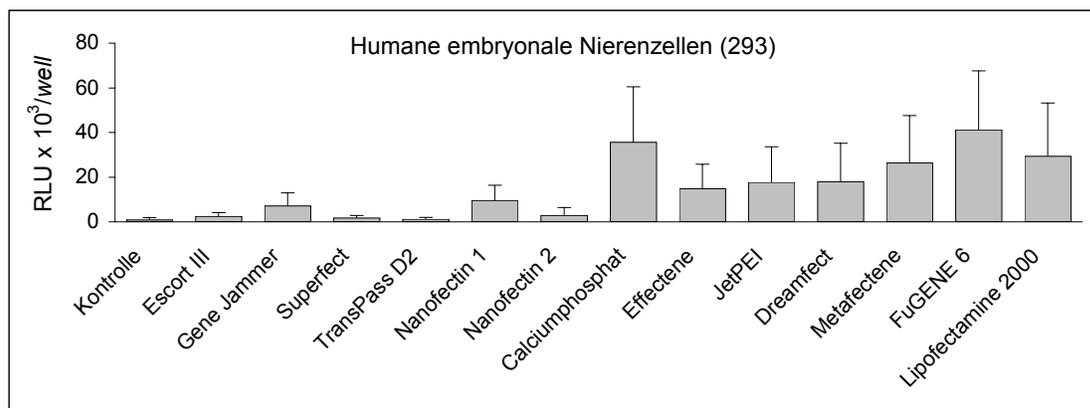


Abb. 9: Analyse der Transgenexpression von embryonalen Nierenzellen mittels Chemilumineszenz ($n = 9$ wells pro Transfektionsreagenz).

6.1.7 Murine dermale Fibroblasten (NIH 3T3)

Metafectene und Nanofectin 1 erzielten die höchsten Transfektionseffizienzen (45.370 ± 25.958 und 44.065 ± 17.745 RLU; $P > 0,05$). Die durch FuGENE 6 erreichten Werte (26.076 ± 11.474 RLU) waren signifikant niedriger ($P < 0,05$; Abb. 10). Durch Komplexierung von $0,5 \mu\text{g}$ DNS in einer Metafectene/DNS-Ratio von 5:1 transfizierten wir maximal $48,9 \pm 13,0\%$ der Fibroblasten (Abb. 11). In nicht-modifizierten NIH 3T3 Zellen betrug die IGF-I-Produktion $1,2 \pm 0,1$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h. In Metafectene-transfizierten Zellen war diese hingegen 70-fach erhöht ($84,2 \pm 16,9$ ng IGF-I/ 10^6 Zellen/24 h).

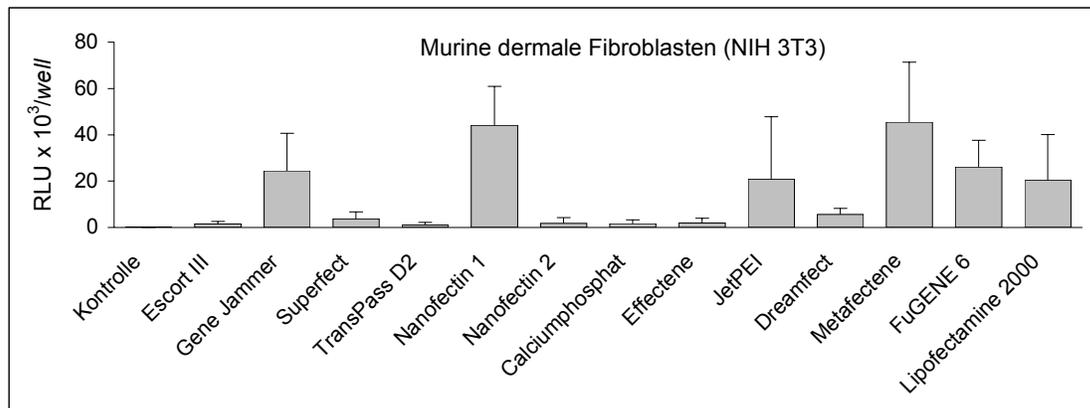


Abb. 10: Analyse der Transgenexpression von dermalen Fibroblasten mittels Chemilumineszenz ($n = 12$ wells pro Transfektionsreagenz).

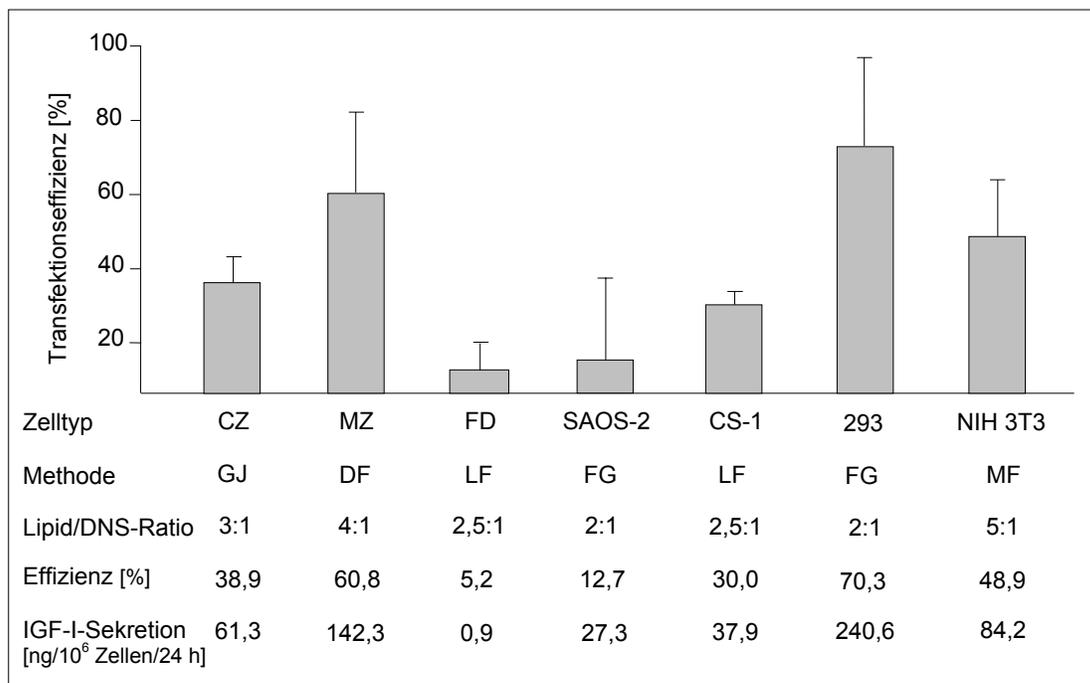


Abb. 11: Zusammenfassung der Effizienz verschiedener Transfektionssysteme. CZ: Lapine Gelenkchondrozyten, MZ: Lapine Muskelzellen, FD: Humane fibröse Dysplasie, SAOS-2: Humane Osteosarkomzellen, CS-1: Humane Chondrosarkomzellen, 293: Humane embryonale Nierenzellen, NIH 3T3: Murine dermale Fibroblasten. GJ: Gene Jammer, DF: Dreamfect, LF: Lipofectamine 2000, FG: FuGENE 6, MF: Metafectene.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass vergleichsweise hohe Transfektionseffizienzen sowohl in Primärkulturen von Chondrozyten oder Muskelzellen als auch in etablierten Zelllinien wie CS-1, 293 oder NIH 3T3 erreichbar sind. In Osteosarkomzellen und Zellen der fibrösen Dysplasie wurden hingegen niedrigere Effizienzen erzielt. Wir konnten nachweisen, dass nach nicht-viralem Gentransfer hohe Mengen IGF-I von modifizierten primären Chondrozyten und Muskelzellen sowie von 293 und NIH 3T3 Zellen sezerniert werden (Abb. 11). Diese Daten belegen, dass die Auswahl einer geeigneten Kombination aus Transfektionssystem und Zielzelle den Erfolg nachfolgender *in vivo* Experimente maßgeblich beeinflusst.

Für die *in vitro* Experimente in einem dreidimensionalen Kultursystem und für *in vivo* Ansätze wählten wir NIH 3T3 Fibroblasten, da sie sich mit hinreichender Effizienz transfizieren ließen und signifikante Mengen IGF-I sezernierten. Als etablierte Zelllinie wurden sie primären Chondrozyten und Muskelzellen vorgezogen, um als Beispiel für eine leichter zugängliche Zellpopulation zu dienen. Als Transfektionssystem kam FuGENE 6 zum Einsatz, dessen Eignung für nachfolgende *in vivo* Ansätze bereits früher belegt werden konnte (siehe 7.1.4).

6.2 *In vitro* Experimente

6.2.1 Zeitverlauf-Studie

Wir untersuchten die unterschiedlichen Sphäroide zu festgelegten Zeitpunkten auf die Parameter Zellzahl und Vitalität. Außerdem wurde mittels ELISA die Sekretion der Wachstumsfaktoren IGF-I und FGF-2 bestimmt (vgl. 5.6.1 und Abb. 2).

6.2.1.1 Nicht-transfizierte Sphäroide

Die Anzahl der in Alginate verkapselten Zellen nahm über 21 Tage um 74% zu ($P < 0,05$). Die Anzahl der vitalen Zellen nahm hingegen um über 2×10^4 Zellen ab, was einer Minderung der Vitalität um 53% entsprach. Die Werte der IGF-I- und FGF-2-Sekretion der nicht-transfizierten Zellen waren vergleichsweise niedrig (Tab. 12).

6.2.1.2 IGF-I-Sphäroide

Über 21 Tage nahm die Gesamtzahl der Zellen um 32% zu ($P = 0,12$), wohingegen die Anzahl vitaler Zellen um 41% abnahm ($P < 0,05$). Die maximale Menge an sezerniertem IGF-I fand sich an Tag 2 nach Transfektion, diese war jedoch nicht signifikant höher als an Tag 4 ($P = 0,2$). An Tag 7 lag die IGF-I Produktion noch über derer nicht-transfizierter Zellen ($P < 0,05$), doch an Tag 14 nach Transfektion war bereits kein Unterschied mehr zur Kontrollgruppe feststellbar ($P = 0,15$).

6.2.1.3 IGF-I/FGF-2-Sphäroide

Die mit beiden Plasmiden transfizierten NIH 3T3 Zellen zeigten über 21 Tage eine Verdopplung ihrer Gesamtzahl im Alginate ($P < 0,05$), aber die Anzahl vitaler Zellen nahm um 64% ab. Die signifikant höchsten Werte der IGF-I-Sekretion beobachteten wir an Tag 2 nach Transfektion ($P = 0,01$ gegenüber Tag 4). Diese IGF-I-Sekretion zeigte bereits an Tag 14 keine signifikante Erhöhung mehr gegenüber der Kontrolle ($P > 0,05$). Im Vergleich zwischen IGF-I- und IGF-I/FGF-2-Sphäroiden bestand an Tag 2 kein Unterschied der IGF-I-Sekretionswerte ($P = 0,5$).

Die Maxima der FGF-2-Sekretion aus IGF-I/FGF-2-Sphäroiden fanden sich an Tag 2 und an Tag 4 nach Transfektion ($P = 0,68$). Bereits nach sieben Tagen konnten wir in der FGF-2-Produktion keinen Unterschied mehr gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen ($P = 0,1$).

Tage nach Transfektion	1	2	4	7	14	21
Nicht-transfizierte Sphäroide						
<i>Gesamtzahl</i>	8,4 ± 2,0	8,7 ± 1,4	10,1 ± 1,1	15,0 ± 1,6	9,4 ± 1,0	14,6 ± 0
<i>Vitale Zellen</i>	7,5 ± 1,8	6,2 ± 1,0	7,6 ± 0,9	12,6 ± 0,9	4,9 ± 0,9	5,4 ± 0,3
<i>Vitalität (%)</i>	90,0 ± 0,9	71,6 ± 1,8	75,0 ± 2,7	84,2 ± 2,9	51,9 ± 9,5	37,0 ± 1,9
<i>IGF-I (ng/10⁷ vitale Zellen/24 h)</i>	n.b.	1,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,4	3,9 ± 0,7	7,7 ± 0,5
<i>IGF-I (pg/Sphäroid/24 h)</i>	n.b.	11,1 ± 1,0	6,8 ± 0,2	10,7 ± 0,9	19,0 ± 0,9	41,7 ± 8,2
<i>FGF-2 (ng/10⁷ vitale Zellen/24 h)</i>	n.b.	0 ± 0	6,8 ± 0,5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>FGF-2 (pg/Sphäroid/24 h)</i>	n.b.	0 ± 0	6,9 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
IGF-I-Sphäroide						
<i>Gesamtzahl</i>	5,0 ± 0,2	5,4 ± 0,8	5,2 ± 1,3	7,6 ± 1,2	7,0 ± 1,0	6,6 ± 1,2
<i>Vitale Zellen</i>	4,6 ± 0,3	4,6 ± 0,8	3,8 ± 0,9	4,3 ± 0,5	3,6 ± 1,1	2,7 ± 0,9
<i>Vitalität (%)</i>	91,1 ± 1,5	84,2 ± 1,5	74,4 ± 3,1	55,9 ± 15,7	49,9 ± 10,0	40,5 ± 7,9
<i>IGF-I (ng /10⁷ vitale Zellen/24 h)</i>	n.b.	272,0 ± 103,5	156,4 ± 81,5	16,1 ± 12,4	10,3 ± 7,1	10,3 ± 4,1
<i>IGF-I (pg/Sphäroid/24 h)</i>	n.b.	1205,2 ± 304,0	548,2 ± 203,0	65,3 ± 43,9	31,8 ± 11,3	24,8 ± 1,2
IGF-I/FGF-2-Sphäroide						
<i>Gesamtzahl</i>	7,2 ± 2,7	7,8 ± 0,7	11,7 ± 1,3	11,0 ± 2,5	9,0 ± 1,2	14,7 ± 1,2
<i>Vitale Zellen</i>	6,8 ± 3,0	7,0 ± 0,5	9,1 ± 1,2	7,3 ± 1,2	5,0 ± 0,9	4,9 ± 1,3
<i>Vitalität (%)</i>	92,3 ± 7,3	89,8 ± 1,5	78,2 ± 4,3	67,2 ± 5,6	55,6 ± 8,6	32,8 ± 6,5
<i>IGF-I (ng/10⁷ vitale Zellen/24 h)</i>	n.b.	314,3 ± 44,1	151,7 ± 45,8	17,2 ± 4,6	5,9 ± 0,3	7,2 ± 1,8
<i>IGF-I (pg/Sphäroid/24 h)</i>	n.b.	2186,7 ± 187,0	1348,8 ± 230,5	122,3 ± 10,9	29,2 ± 5,8	35,7 ± 16,9
<i>FGF-2 (ng/10⁷ vitale Zellen/24 h)</i>	n.b.	32,0 ± 5,1	29,7 ± 8,0	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6	0,3 ± 0,5
<i>FGF-2 (pg/Sphäroid/24 h)</i>	n.b.	223,2 ± 30,9	276,0 ± 100,2	4,5 ± 3,0	3,6 ± 3,2	2,0 ± 3,4

Tab. 12: Proliferation und Vitalität verkapselter Zellen sowie Sekretion der Wachstumsfaktoren im Zeitverlauf. Gesamtzahl und Anzahl vitaler Zellen: x10⁴/Sphäroid.

6.2.2 Verschiedene Sphäroide *in vitro*

Wir erhoben *in vitro* Daten über Zellproliferation und Zellvitalität und fertigten von den Sphäroiden histologische Schnitte an (vgl. 5.6.2 und Abb. 2). Analog zu diesem *in vitro* Versuch waren die gleichen Sphäroide *in vivo* verwendet worden.

6.2.2.1 *lacZ*-Sphäroide

Die Zellzahl nahm um den Faktor 1,6 zu, doch der Anteil vitaler Zellen sank um das 2,2-fache. Nach 21 Tagen unterschieden sich in den drei Gruppen weder die Gesamtzahl ($P = 0,2$), noch die Anzahl vitaler Zellen ($P = 0,3$) bzw. deren Vitalität ($P = 0,7$).

6.2.2.2 *IGF-I*-Sphäroide

Die Gesamtzahl der Zellen im Alginat war nach 21 Tagen um 134% angestiegen. Die absolute Anzahl vitaler Zellen unterschied sich zu beiden Zeitpunkten nicht voneinander ($P = 0,7$), woraus sich eine prozentuale Abnahme der Vitalität um 54% ergab.

6.2.2.3 *IGF-I/FGF-2*-Sphäroide

Auch in dieser Gruppe fiel die Vitalität der Zellen über 21 Tage um 49% ab. Dies resultierte aus einer signifikanten Abnahme der Anzahl vitaler Zellen ($P < 0,05$) bei Zunahme der Gesamtzahl verkapselter Zellen um 47%.

Tage nach Transfektion	1			21		
	Gesamtzahl	Vitale Zellen	Vitalität (%)	Gesamtzahl	Vitale Zellen	Vitalität (%)
<i>lacZ</i>-Sphäroide	7,3 ± 1,9	6,7 ± 1,8	91,4 ± 1,2	11,6 ± 2,9	5,1 ± 2,6	41,4 ± 11,8
<i>IGF-I</i>-Sphäroide	5,0 ± 0,2	4,6 ± 0,3	91,1 ± 1,5	11,7 ± 4,2	4,3 ± 1,5	37,6 ± 4,5
<i>IGF-I/FGF-2</i>-Sphäroide	7,2 ± 2,7	6,8 ± 3,0	92,3 ± 7,3	10,6 ± 1,3	4,6 ± 0,4	43,1 ± 3,5

Tab. 13: Zellproliferation und Vitalität in verschiedenen Sphäroiden über 21 Tage *in vitro*. Gesamtzahl und Anzahl vitaler Zellen: $\times 10^4$ /Sphäroid.

6.2.2.4 Histologie der Alginat-Sphäroide

Zu den Zeitpunkten 1 und 21 Tage nach Transfektion waren von den HE-gefärbten Sphäroiden histologische Schnitte angefertigt worden, dies ermöglichte ihre Darstellung in Abbildung 12:

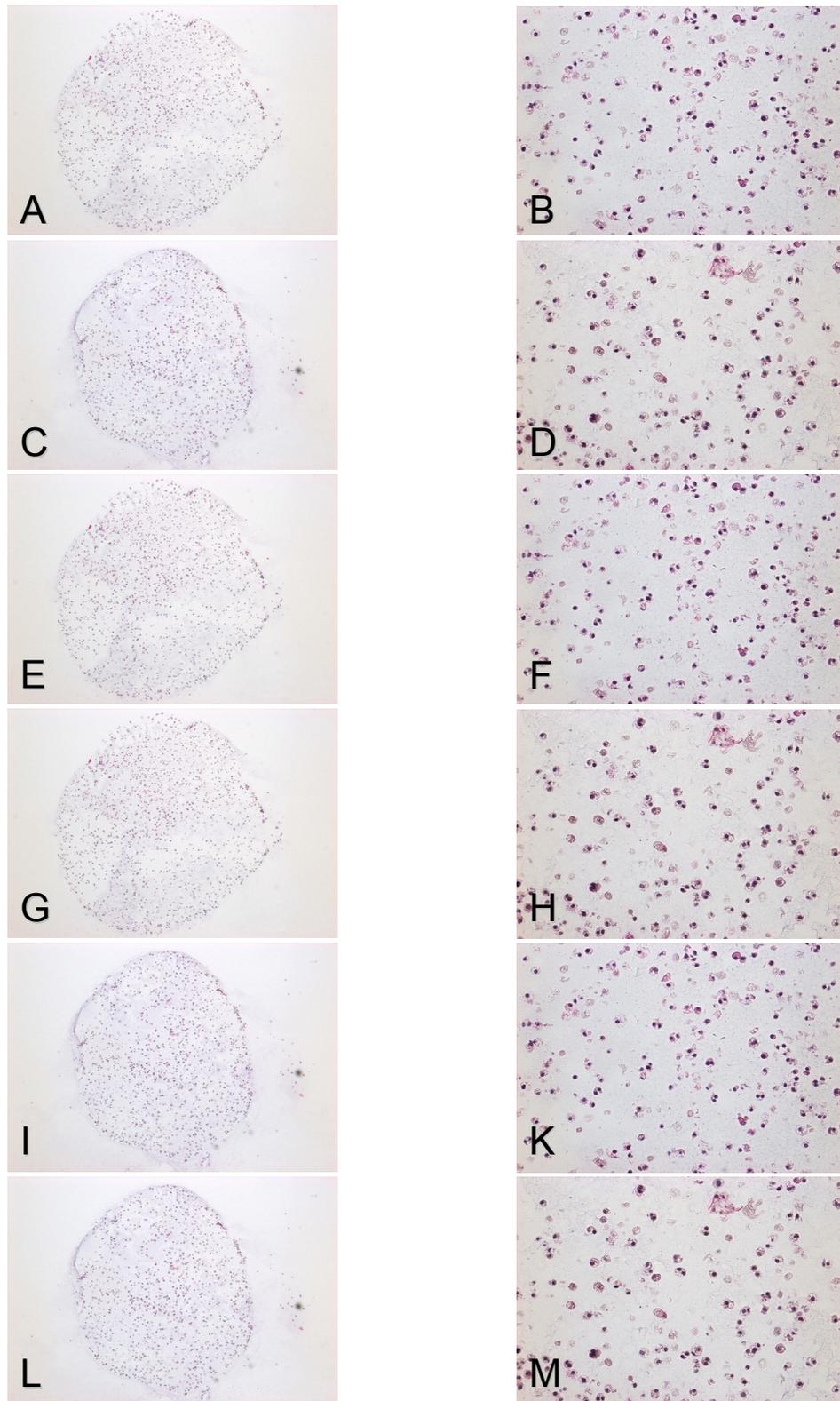


Abb. 12: Histologische Darstellung der Alginate-Sphäroide (HE-Färbung). A,B: IGF-I-Sphäroide an Tag 1 (Vergrößerung: 40x und 200x); C,D: IGF-I-Sphäroide an Tag 21 (40x und 200x); E,F: IGF-I/FGF-2-Sphäroide an Tag 1 (40x und 200x); G,H: IGF-I/FGF-2-Sphäroide an Tag 21 (40x und 200x); I,K: *lacZ*-Sphäroide an Tag 1 (40x und 200x); L,M: *lacZ*-Sphäroide an Tag 21 (40x und 200x).

Diese Daten zeigen zusammenfassend, dass in den verschiedenen Sphäroiden (IGF-I-, IGF-I/FGF-2-, *lacZ*- und nicht-transfizierte Sphäroide) die Gesamtzahl verkapselter Zellen über 21 Tage zunimmt. Bei gleichzeitiger Abnahme der absoluten Zahl vitaler Zellen resultierte in allen Sphäroiden eine Verringerung der prozentualen Vitalität. In Bezug auf Gesamtzahl der Zellen, Anzahl vitaler Zellen und resultierende Vitalität fanden sich nach 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sphäroiden. Maximale Wachstumsfaktor-Sekretion wurde an Tag 2 und an Tag 4 nach Transfektion detektiert. Wenngleich die Sekretionsniveaus initial vergleichsweise hoch waren, fand sich bereits nach 14 (IGF-I) bzw. 7 Tagen (FGF-2) kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrollgruppe.

6.3 In vivo Experimente

6.3.1 Evaluation der Synovialflüssigkeit

Insgesamt fanden sich in allen Gelenken deutlich höhere Konzentrationen an IGF-I verglichen mit FGF-2: In der *lacZ*-Kontrollgruppe war die IGF-I-Konzentration mehr als 30-fach erhöht gegenüber der FGF-2-Konzentration ($P < 0,05$). Auch in Gelenken, die mit IGF-I/FGF-2-Sphäroiden behandelt worden waren, lag die IGF-I-Konzentration um den Faktor 41 höher als die FGF-2-Konzentration ($P < 0,05$).

6.3.1.1 IGF-I

In der *lacZ*-Kontrollgruppe wurden im Mittel $207,32 \pm 78,42$ pg IGF-I/ml, in der IGF-I-Gruppe $154,57 \pm 64,15$ pg IGF-I/ml und in der Gruppe der IGF-I/FGF-2-Implantate $254,75 \pm 107,90$ pg IGF-I/ml Synovia nachgewiesen. Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die IGF-I-Konzentration ($P > 0,05$).

6.3.1.2 FGF-2

In der *lacZ*-Kontrollgruppe fanden wir $6,37 \pm 9,74$ pg FGF-2/ml Synovialflüssigkeit, vergleichbar mit der IGF-I/FGF-2-Gruppe ($6,12 \pm 14,99$ pg/ml; $P = 0,3$). In Gelenken, die mit IGF-I-Implantaten behandelt worden waren, lag die FGF-2-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze.

6.3.2 Biochemische Evaluation des Reparaturgewebes

6.3.2.1 Masse und Wassergehalt

Die Nass- und Trockenmassen der Reparaturgewebe in den Defekten der einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tab. 14; $P > 0,05$). Der Wassergehalt der Reparaturgewebe war in der IGF-I/FGF-2-Gruppe geringer als in der *lacZ*-Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

6.3.2.2 DNS-Bestimmung

In Bezug auf den DNS-Gehalt als Indikator für die Zellzahl bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Reparaturgeweben der *lacZ*- und der IGF-I-Gruppe ($P = 0,5$). Hingegen wiesen wir in der IGF-I/FGF-2-Gruppe gegenüber den anderen Gruppen eine signifikante Erhöhung von DNS-Gehalt und Zellzahl nach ($P < 0,05$).

6.3.2.3 Proteoglykan-Bestimmung

Der Proteoglykan-Gehalt in der IGF-I/FGF-2-Gruppe war signifikant erhöht gegenüber der *lacZ*-Gruppe ($P = 0,03$), jedoch nicht gegenüber der IGF-I-Gruppe ($P = 0,08$). Es bestanden keine Unterschiede im Proteoglykan-Gehalt zwischen der IGF-I- und der *lacZ*-Gruppe ($P > 0,05$). Das Verhältnis Proteoglykan-Gehalt/Zellzahl war in allen Gruppen vergleichbar ($P > 0,05$).

	<i>lacZ</i> -Sphäroide	IGF-I-Sphäroide	IGF-I/FGF-2-Sphäroide
Nassmasse (mg)	12,3 ± 3,4	10,3 ± 0,4	10,0 ± 3,3
Trockenmasse (mg)	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Wassergehalt (%)	74,9 ± 4,0	64,3 ± 12,5	63,1 ± 8,4 *
DNS-Gehalt (ng/mg Trockenmasse)	2762,3 ± 542,3	2244,3 ± 101,5	2860,0 ± 95,5 * **
Zellzahl ($\times 10^4$ /mg Trockenmasse)	36,4 ± 7,2	29,5 ± 1,3	37,6 ± 1,1 * **
Proteoglykan-Gehalt (μ g/mg Trockenmasse)	3,0 ± 1,4	3,2 ± 1,1	4,9 ± 1,8 **
Proteoglykan-Gehalt/Zellzahl (μ g/ 10^4 Zellen)	0,09 ± 0,07	0,12 ± 0,08	0,09 ± 0,06

Tab. 14: Biochemische Evaluation der Reparaturgewebe. Statistische Signifikanz: * $P < 0,05$ gegenüber der *lacZ*-Kontrolle; ** $P < 0,05$ IGF-I gegenüber IGF-I/FGF-2.

6.3.3 Histologische Evaluation der Gelenke

6.3.3.1 Makroskopische Evaluation

In keinem Gelenk fand sich eine Synovialitis. Das Reparaturgewebe hatte immer eine weißlich-gräuliche Farbe, war gut vom umgebenden Knorpel abgrenzbar und nicht erhaben. Makroskopisch lag kein Unterschied zwischen den mit IGF-I-, IGF-I/FGF-2- und mit *lacZ*-Sphäroiden behandelten Defekten vor.

6.3.3.2 Evaluation der HE-Färbungen

Abbildung 13 zeigt exemplarisch HE-gefärbte histologische Schnitte der distalen Femora. In den Tabellen 15 und 16 sind die Ergebnisse für IGF-I- bzw. IGF-I/FGF-2-Sphäroide dargestellt.

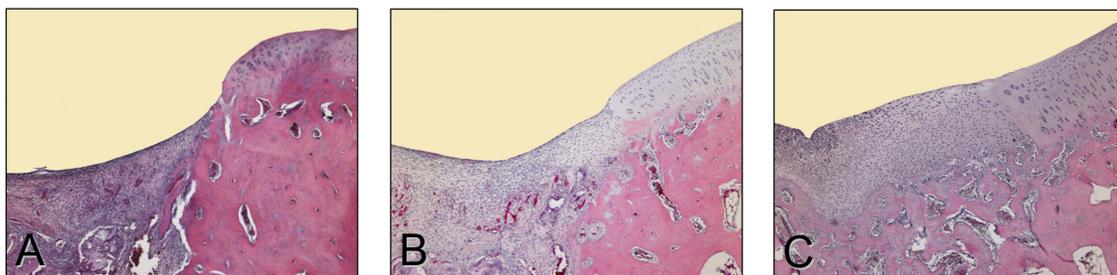


Abb. 13: HE-gefärbte histologische Schnitte der Defekte (Vergrößerung: 40x). A: *lacZ*-, B: IGF-I-, C: IGF-I/FGF-2-Gruppe.

In Bezug auf Fibrosierung und Architektur der synovialen Villi sowie im Gesamtpunktwert fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den entsprechenden Behandlungsgruppen (IGF-I bzw. IGF-I/FGF-2) und den *lacZ*-Kontrollgruppen. Ein entzündliches Zellinfiltrat war in keinem der untersuchten Gelenke nachweisbar. Damit zeigen die Daten, dass die Implantation von Alginat-Sphäroiden nicht zu einer Synovialitis der operierten Gelenke führte.

Kategorie	<i>lacZ</i>	IGF-I	P-Wert
Villus-Fibrosierung	0,53 ± 0,52	0,07 ± 0,16	0,06
Villus-Architektur	0,8 ± 0,31	0,67 ± 0,52	0,6
Entzündliches Zellinfiltrat	0 ± 0	0 ± 0	n. d.
Gesamtpunktwert	1,33 ± 0,41	0,73 ± 0,37	0,56

Tab. 15: Entzündungszeichen der Synovialmembran nach 21 Tagen in der IGF-I-Gruppe.

Kategorie	lacZ	IGF-I/FGF-2	P-Wert
Villus-Fibrosierung	0,7 ± 0,47	0,8 ± 0,67	0,77
Villus-Architektur	0,83 ± 0,23	0,93 ± 0,16	0,41
Entzündliches Zellinfiltrat	0 ± 0	0 ± 0	n. d.
Gesamtpunktwert	1,53 ± 0,45	1,73 ± 0,5	0,87

Tab. 16: Entzündungszeichen der Synovialmembran nach 21 Tagen in der IGF-I/FGF-2-Gruppe.

6.3.3.3 Evaluation der immunhistochemischen Typ-I/II-Kollagen-Färbungen

Immunhistochemisch angefärbte Paraffinschnitte sind exemplarisch in Abbildung 14 dargestellt. Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung sind den Tabellen 17 und 18 zu entnehmen.

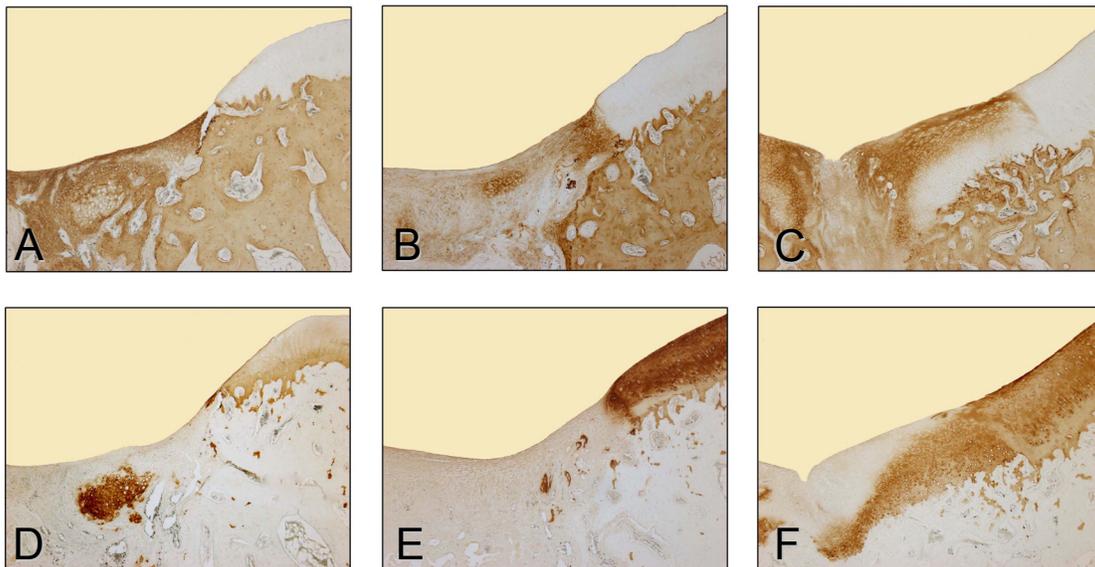


Abb. 14: Immunhistochemisch gefärbte histologische Schnitte der Defekte (Vergrößerung: 40x). A-C: Typ-I-Kollagen-Färbung, D-F: Typ-II-Kollagen-Färbung. A,D: lacZ-; B,E: IGF-I-; C,F: IGF-I/FGF-2-Gruppe.

Typ-I-Kollagen

In den lacZ-Kontrollgruppen war die Immunreaktion auf Typ-I-Kollagen schwächer als in Defekten, die IGF-I- oder IGF-I/FGF-2-Sphäroide erhalten hatten. In der IGF-I- und in der IGF-I/FGF-2-Gruppe beobachteten wir in keinem Defekt fehlende Immunreaktion. Aufgrund der geringen Differenz zwischen allen Gruppen ist jedoch nicht von einem signifikanten Unterschied auszugehen.

3 Wochen			3 Wochen		
	<i>lacZ</i>	IGF-I		<i>lacZ</i>	IGF-I/FGF-2
Tier 1	++	++	Tier 7	++	+
Tier 2	-	+	Tier 8	-	+
Tier 3	++	+	Tier 9	+	+
Tier 4	++	++	Tier 10	+	+
Tier 5	-	+	Tier 11	+	++
Tier 6	+	+	Tier 12	+	+
	- bis ++	+ bis++		- bis ++	+ bis ++

Tab. 17: Semiquantitative Auswertung der Typ-I-Kollagen-Immunreaktivität im Reparaturgewebe jeweils eines Tieres nach 3 Wochen *in vivo*.

Typ-II-Kollagen

In der *lacZ*-Gruppe wiesen wir eine schwächere Immunreaktion auf Typ-II-Kollagen nach als in der IGF-I- oder IGF-I/FGF-2-Gruppe. In der IGF-I/FGF-2-Gruppe war in der Hälfte der Fälle kein Unterschied zwischen gesundem Knorpel und Reparaturgewebe in Bezug auf den Typ-II-Kollagengehalt feststellbar.

3 Wochen			3 Wochen		
	<i>lacZ</i>	IGF-I		<i>lacZ</i>	IGF-I/FGF-2
Tier 1	+	+	Tier 7	+	+
Tier 2	+	+	Tier 8	+	++
Tier 3	+	++	Tier 9	-	++
Tier 4	-	+	Tier 10	++	++
Tier 5	+	-	Tier 11	+	-
Tier 6	-	+	Tier 12	-	-
	- bis +	- bis++		- bis ++	- bis ++

Tab. 18: Semiquantitative Auswertung der Typ-II-Kollagen-Immunreaktivität im Reparaturgewebe jeweils eines Tieres nach 3 Wochen *in vivo*.

6.3.3.4 Evaluation der Safranin-O-Färbungen

Die quantitative Bewertung der Defektreparatur erfolgte an Safranin-O-gefärbten Paraffinschnitten, die in Abbildung 15 exemplarisch dargestellt sind. Nachfolgend werden die Ergebnisse per Kategorie des in Tabelle 11 abgebildeten Bewertungssystems zusammengefasst.

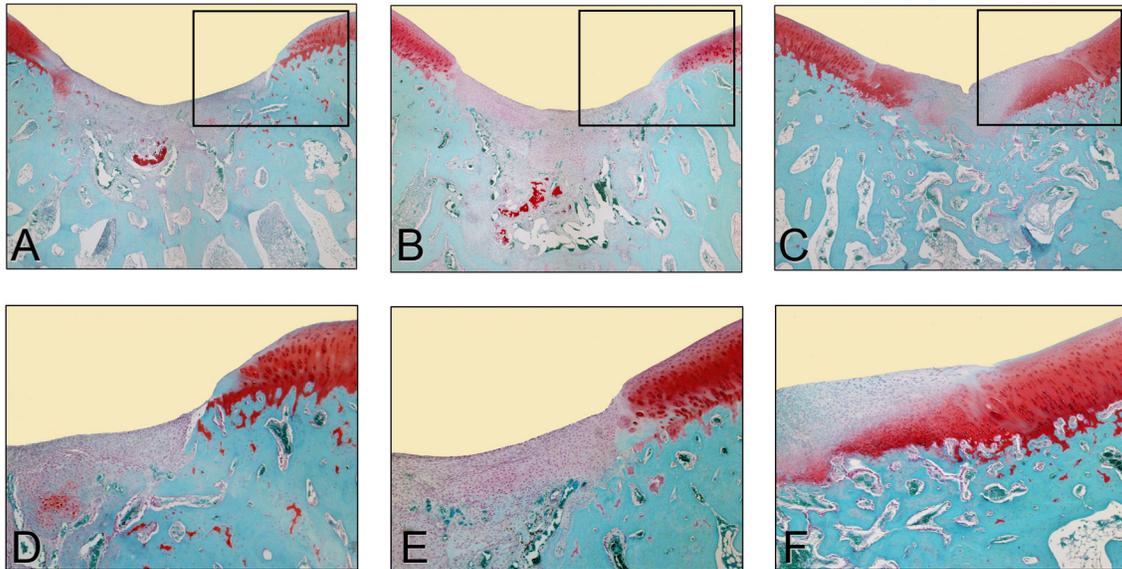


Abb. 15: Safranin-O-gefärbte histologische Schnitte der Defekte. A,D: *lacZ*-Gruppe (Vergrößerung: 20x und 40x); B,E: IGF-I-Gruppe (20x und 40x); C,F: IGF-I/FGF-2-Gruppe (20x und 40x).

Die Defektfüllung war in der IGF-I/FGF-2-Gruppe fast vollständig ausgebildet, jedoch ohne Signifikanz im Vergleich mit den anderen Gruppen zu erreichen ($P > 0,05$). IGF-I/FGF-2-Sphäroide bewirkten jedoch eine signifikant verbesserte Integration des Reparaturgewebes im Vergleich zur *lacZ*- und IGF-I-Gruppe ($P = 0,04$ und $P < 0,05$). Der verbesserte Mittelwert in der IGF-I/FGF-2-Gruppe entspricht hier morphologisch einer verminderten Zellularität am Übergang zum Defektareal. In Bezug auf die Matrix-Anfärbbarkeit mittels Safranin-O wiesen wir in der IGF-I/FGF-2-Gruppe die besten Resultate nach, doch gegenüber der *lacZ*-Gruppe wie auch der IGF-I-Gruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede ($P = 0,1$ und $P = 0,15$). Zellmorphologie und Zellanordnung im Reparaturgewebe waren wiederum in der IGF-I/FGF-2-Gruppe gegenüber der *lacZ*-Gruppe signifikant verbessert ($P = 0,003$), kein Unterschied bestand zwischen der IGF-I- und IGF-I/FGF-2-Gruppe ($P > 0,05$). Der Mittelwert der IGF-I/FGF-2-Gruppe entspricht dabei dem Nachweis von Chondrozytenmorphologie bei etwa 50% aller Zellen. Die Defekt- und Oberflächenarchitektur betreffend wies das Reparaturgewebe aller Gruppen kleine Defekte und leichte Fibrillationen auf der Oberfläche auf, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen lagen nicht vor ($P > 0,05$). Tendenziell zeigten die Gewebe der Behandlungsgruppen gegenüber den *lacZ*-Kontrollgruppen aber eine verbesserte Architektur. IGF-I/FGF-2-Sphäroide steigern den Umfang der Neubildung von subchondralem Knochen signifikant im Vergleich mit der *lacZ*-Kontrollgruppe ($P = 0,001$), jedoch nicht signifikant im Vergleich zur IGF-I-Gruppe ($P = 0,36$). Zudem resultierte die Implantation von IGF-I/FGF-2-Sphäroiden in einer stärkeren Ausbildung der *tidemark* als die Implantation von *lacZ*- oder IGF-I-Sphäroiden ($P = 0,03$ und $P < 0,05$).

Gesamtpunktwert der Reparatur

Die Implantation von IGF-I-Sphäroiden in osteochondrale Defekte in den Kniegelenken von Kaninchen führte zwar zu einer 1,2-fachen Verbesserung des Gesamtpunktwertes gegenüber der *lacZ*-Kontrolle nach 21 Tagen, das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht ($P = 0,18$).

Hingegen verbesserte die Implantation von IGF-I/FGF-2-Sphäroiden signifikant die Defektreparatur nicht nur im Vergleich mit der *lacZ*-Kontrollgruppe ($P = 0,02$), sondern auch gegenüber der IGF-I-Gruppe ($P < 0,05$), wie die 1,5-fach bzw. 1,4-fach verbesserten Gesamtpunktwerte belegen.

	lacZ	IGF-I
Kategorie	Mittelwert (95%-KI)	Mittelwert (95%-KI)
<i>Defektfüllung</i>	0,46 (0,12 – 0,81)	0,32 (0,01 – 0,66)
<i>Integration</i>	2,03 (1,66 – 2,39)	1,72 (1,35 – 2,08)
<i>Matrix-Anfärbbarkeit</i>	2,65 (1,92 – 3,38)	2,43 (1,69 – 3,16)
<i>Zellmorphologie</i>	3,80 (2,88 – 4,71)	3,42 (2,50 – 4,33)
<i>Defektarchitektur</i>	1,50 (1,04 – 1,96)	1,04 (0,58 – 1,50)
<i>Oberflächenarchitektur</i>	1,23 (0,59 – 1,87)	0,87 (0,23 – 1,52)
<i>Subchondraler Knochen tidemark</i>	2,42 (1,56 – 3,27)	1,99 (1,14 – 2,84)
	3,80 (3,05 – 4,55)	3,68 (2,92 – 4,43)
Mittlerer Gesamtpunktwert	17,9 (15,1 – 20,7)	15,5 (12,7 – 18,2)

Tab. 19: Effekte der IGF-I-Sphäroide auf die histologische Beurteilung der Knorpelreparatur nach 3 Wochen *in vivo*. Statistische Signifikanz: * $P < 0,05$ gegenüber der *lacZ*-Kontrolle; ** $P < 0,05$ IGF-I gegenüber IGF-I/FGF-2.

	lacZ	IGF-I/FGF-2
Kategorie	Mittelwert (95%-KI)	Mittelwert (95%-KI)
<i>Defektfüllung</i>	0,26 (0,02 – 0,60)	0,01 (0,00 – 0,35)
<i>Integration</i>	1,58 (1,11 – 1,94)	0,97 (0,61 – 1,34) * **
<i>Matrix-Anfärbbarkeit</i>	2,41 (1,67 – 3,14)	1,68 (0,94 – 2,41)
<i>Zellmorphologie</i>	3,78 (2,87 – 4,70)	2,41 (1,49 – 3,32) *
<i>Defektarchitektur</i>	1,25 (0,79 – 1,71)	0,93 (0,47 – 1,39)
<i>Oberflächenarchitektur</i>	1,36 (0,71 – 2,00)	1,08 (0,43 – 1,72)
<i>Subchondraler Knochen tidemark</i>	2,83 (1,98 – 3,69)	1,25 (0,40 – 2,12) *
	3,91 (3,15 – 4,65)	2,69 (1,94 – 3,45) * **
Mittlerer Gesamtpunktwert	17,1 (14,4 – 19,9)	11,2 (8,30 – 13,8) * **

Tab. 20: Effekte der IGF-I/FGF-2-Sphäroide auf die histologische Beurteilung der Knorpelreparatur nach 3 Wochen *in vivo*. Statistische Signifikanz: * $P < 0,05$ gegenüber der *lacZ*-Kontrolle; ** $P < 0,05$ IGF-I/FGF-2 gegenüber IGF-I.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der *in vivo* Experimente, dass zwischen den Gruppen keine Unterschiede in Bezug auf die IGF-I- oder FGF-2-Konzentration der Synovia bestanden. Unabhängig von implantiertem Sphäroid lagen die IGF-I-Spiegel immer deutlich über den FGF-2-Spiegeln. In den isolierten Reparaturgeweben der IGF-I/FGF-2-Gruppe war der Wassergehalt signifikant erniedrigt, der DNS-Gehalt als Indikator der Zellzahl und der Proteoglykan-Gehalt als ein Indikator der Synthese extrazellulärer Matrix waren hingegen signifikant erhöht. Makroskopisch stellten sich alle operierten Gelenke unauffällig dar. Wir fanden in keinem der behandelten Gelenke Hinweise auf eine Synovialitis. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wies auf einen tendenziell erhöhten Typ-II-Kollagengehalt in der IGF-I- und der IGF-I/FGF-2-Gruppe hin. Die histologische Auswertung der Safranin-O-gefärbten Schnitte ergab eine signifikante Verbesserung der Parameter Integration, Zellmorphologie, subchondraler Knochen und *tidemark* in der IGF-I/FGF-2-Gruppe. Wie der Gesamtpunktwert belegt, verbessert die Implantation von IGF-I/FGF-2-Sphäroiden die Knorpelreparatur signifikant gegenüber der Implantation von IGF-I- oder *lacZ*-Sphäroiden.

7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir, welche Zelltypen sich in Kombination mit welchen nicht-viralen Transfektionsmethoden für gentherapeutische Ansätze zur Behandlung fokaler Knorpeldefekte eignen. Wir evaluierten dreizehn Transfektionssysteme in sieben Zelltypen des Stütz- und Bewegungsapparates und erzielten hohe Effizienzen in Primärkulturen und etablierten Zelllinien. Anschließend transfizierten wir NIH 3T3 Fibroblasten mit den Plasmiden für IGF-I, FGF-2 und *lacZ* und verkapselten die modifizierten Zellen in Alginat-Sphäroiden. *In vitro* fanden wir über 21 Tage eine Zunahme der Gesamtzahl verkapselter Zellen bei Abnahme ihrer Vitalität und eine hohe initiale IGF-I- und FGF-2-Sekretion. *In vivo* untersuchten wir die Synovia, das Reparaturgewebe und Paraffinschnitte drei Wochen nach Implantation der Sphäroide in osteochondrale Defekte in den Kniegelenken von Kaninchen. Die Implantation von IGF-I/FGF-2-Sphäroiden resultierte in einem erhöhten DNS- und Proteoglykan-Gehalt sowie einer signifikanten Verbesserung der histologischen Parameter des Reparaturgewebes.

7.1. Evaluation von Gentransfersystemen

Eine vergleichsweise hohe Transfektionseffizienz und Transgenexpression konnte in primären Gelenkchondrozyten und Muskelzellen, aber auch in etablierten Zelllinien wie NIH 3T3, 293 oder CS-1 erzielt werden. SAOS-2 und Zellen einer fibrösen Dysplasie waren mit niedrigerer Effizienz transfizierbar.

7.1.1 Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Zelltyp

In der nach unserem Kenntnisstand bislang umfangreichsten Untersuchung von Transfektionseffizienzen in Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates zeigten wir, dass der Zelltyp die Transfektionseffizienz entscheidend beeinflusst. Bereits 1987 bestätigten Felgner und Kollegen, dass abhängig von verwendetem Zelltyp die Effizienz des Gentransfers um den Faktor 100 variieren kann. Außerdem konnten wir belegen, dass die maximal erreichbare Transfektionseffizienz in einer Zellpopulation von dem verwendeten Transfektionssystem abhängig ist. Daher erscheint es sinnvoll, vor jeder Transfektion für die entsprechende Zielzelle ein geeignetes Transfektionsreagenz zu ermitteln.

7.1.1.1 Lapine Gelenkchondrozyten

Primäre Chondrozyten können mit dem kationischen Liposom Gene Jammer mit einer Effizienz von 39% transfiziert werden. Dieser Wert korreliert gut mit den Transfektionseffizienzen um 40%, die zuvor mit FuGENE 6 erreicht worden waren (Madry und Trippel, 2000; Dinser et al., 2001; Stöve et al., 2002). Bei diesen Studien wurden die Knorpelzellen zusätzlich mit Hyaluronidase behandelt (Madry und Trippel, 2000); eine Maßnahme, mit der die hier erzielte Effizienz möglicherweise noch steigerbar wäre.

Interessanterweise fand sich bei primären Chondrozyten -wie auch bei SAOS-2 und 293 Zellen- kein signifikanter Unterschied in der maximalen Transfektionseffizienz zwischen kommerziellen Reagenzien und der Calciumphosphat Co-Präzipitations-Methode. In Anbetracht geringer Kosten, einfacher und reproduzierbarer Produktion der Präzipitate sowie den Verbesserungen, die noch immer für dieses System entwickelt werden (Fasbender et al., 1998; Chowdhury et al., 2004), stellt die Calciumphosphat Transfektionsmethode hier eine attraktive Alternative dar.

7.1.1.2 Lapine Muskelzellen

Primäre Muskelzellen sind schwerer zu transfizieren als etablierte Zellen (Pampinella et al., 2002). Bisher beschriebene Transfektionseffizienzen lagen zwischen 0 und 15% bei Verwendung von Lipofectamine und DOSPER (Albert und Tremblay, 1992), Lipofectamine und DOTAP (Trivedi und Dickson, 1994) oder Komplexen aus Adenoviren und Lipiden (Dodds et al., 1998). Endesfelder et al. (2003) haben gezeigt, dass mittels Effectene und DAC-40 Effizienzen von bis zu 70% erreichbar sind. Der von uns mit dem kationischen Liposom Dreamfect ermittelte Wert von 61% korreliert gut mit dieser Effizienz und ist vergleichbar mit Daten nach hochdosierter Applikation retroviraler Vektoren (el Oakley et al., 1998).

7.1.1.3 Humane Tumorzellen (fibröse Dysplasie, SAOS-2, CS-1)

Die Transfektion von Zellen der fibrösen Dysplasie stellte sich als vergleichsweise schwierig dar. Die maximale Transfektionseffizienz von 5,2% verzeichneten wir bei Verwendung von Lipofectamine 2000. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Synthese einer Transfektionsprotektiven Matrix durch diesen Zelltyp (Maki und Athanasou, 2004). Nichtsdestotrotz können auch niedrige Transfektionseffizienzen (< 1%) biologische Effekte *in vivo* vermitteln, wie Studien mit Wachstumsfaktoren in der Arterienwand gezeigt haben (Nabel et al., 1993).

Nicht-virale Transfektion von Osteosarkomzellen wurde bis dato nur selten beschrieben (Marcellus et al., 1996; Palmer et al., 2001; Dass und Choong, 2007). Die von uns mit FuGENE 6 erzielte Transfektionseffizienz von 13% ist mit den Daten von Uzvolgyi und Kollegen (1991) vergleichbar (11% bei Verwendung von Lipofectin).

Für humane Chondrosarkomzellen lieferte das kationische Liposom Lipofectamine 2000 die beste Transfektionseffizienz (30%). Vergleichbar hohe Effizienzen wurden bei nicht-viralem Gentransfer in CS-1 Zellen bislang nicht publiziert.

Der Nutzen der Gentherapie bei der Behandlung von Osteosarkomen oder Chondrosarkomen konnte in Tierstudien bereits belegt werden (Bramwell, 2000; Dass und Choong, 2008). Die aktuelle klinische Forschung konzentriert sich auf den Einsatz des nicht-viralen Gentransfers zur Behandlung ihrer Metastasen (Benjamin et al., 2001; Jia et al., 2002). Die beschriebenen hohen Transfektionseffizienzen, beispielsweise für CS-1 Zellen, sind eine Grundlage für diesen therapeutischen Ansatz.

7.1.1.4 Humane embryonale Nierenzellen (293)

Die für Vergleichszwecke herangezogenen 293 Zellen waren durch FuGENE 6 mit Effizienzen von über 70% modifizierbar. Diese Werte liegen höher als die von Cheng et al. (2004) erreichten 61% mit Lipofectamine oder die von Li und Kollegen (2005) beschriebenen 33% bei Verwendung eines Adeno-assoziierten viralen Vektors. Diese Effizienzen sind ausreichend für eine Vielzahl von Fragestellungen in der Grundlagenforschung.

7.1.1.5 Murine dermale Fibroblasten (NIH 3T3)

NIH 3T3 Zellen wurden bereits mit zahlreichen Systemen modifiziert, darunter Inkorporation eines Adenovirus in Calciumphosphat Co-Präzipitate (Fasbender et al., 1998), Lipofectamine und DOSPER (Marit et al., 2000), Effectene oder Superfect (Griffiths et al., 1997; Weiskirchen et al., 2000), Aminoester (Akinc et al., 2003), Lipofectamine Plus (Akita et al., 2004) oder FuGENE 6 (Hellgren et al., 2000; Arulanandam et al., 2004). Während in diesen Studien Transfektionseffizienzen von maximal 30% erreicht wurden, konnten wir durch das kationische Liposom Metafectene 50% der Zellen transfizieren.

7.1.2 Transfektionsbedingungen

Neben Zelltyp und Transfektionssystem wird die Transfektionseffizienz auch durch die mitotische Aktivität der Zellen (Mortimer et al., 1999), die Produktion einer extrazellulären Matrix, zellspezifische endosomale und lysosomale Aktivität oder den intrazellulären Transport der Fremd-DNS sowie ihre Stabilität im Nukleus beeinflusst (Coonrod et al., 1997; Lou und Saltzman, 1999; Akita et al., 2004). Auch die Anwesenheit von Serum während des Transfektionsprozesses kann die Effizienz verringern (Jacobsen et al., 2004; Konopka et al., 2005). Durch Optimierung sowohl der Expositionszeit der Zellen gegenüber den DNS-Vektor-Komplexen als auch der Lipid/DNS-Ratio erzielten wir eine Verbesserung des Transfektionsergebnisses.

7.1.3 IGF-I Sekretion

Die Höhe der Sekretion eines therapeutischen Faktors beeinflusst das Ausmaß der Knorpelreparatur nach Transplantation *ex vivo* modifizierter Zellen maßgeblich. Die höchsten IGF-I-Sekretionsniveaus wurden von 293 Zellen erreicht (241 ng IGF-I/10⁶ Zellen/24 h), gefolgt von primären Muskelzellen (142 ng IGF-I/10⁶ Zellen/24 h) und NIH 3T3 Zellen (84 ng IGF-I/10⁶ Zellen/24 h).

IGF-I ist ein etablierter therapeutischer Faktor bei der Behandlung von Erkrankungen des Stütz- und Bewegungsapparates; Muskelatrophie wird verhindert (Schakman et al., 2005), Wundheilung (Jeschke et al., 2001) und Knorpelreparatur gefördert (Gelse et al., 2003; Madry et al., 2005; Goodrich et al., 2007; vgl. 2.5.3 und 7.3.1.1). Dennoch existieren nur wenige Daten über IGF-I-Sekretionsniveaus transfizierter Zellen. Romagnolo et al. (1992) beschrieben für eine bovine epitheliale Zelllinie nach Selektion transfizierter Zellen eine Sekretion von 9,2 ng IGF-I/10⁶ Zellen/24 h. Retroviraler Gentransfer und anschließende Selektion transfizierter Keratinozyten resultierte in einer Sekretion von 56 ng IGF-I/10⁶ Zellen/24 h (Eming et al., 1996). Wir konnten auch ohne Selektion und nach nicht-viralem Gentransfer IGF-I-Sekretionsniveaus von 27 bis 241 ng IGF-I/10⁶ Zellen/24 h erreichen, abhängig von der Zielzelle. Transfizierte Gelenkchondrozyten sezernierten hier 61 ng IGF-I/10⁶ Zellen/24 h; dies bedeutet eine Steigerung um den Faktor 7 im Vergleich zu früheren Ergebnissen (8,3 ng IGF-I/10⁶ Zellen/24 h; Madry et al., 2001).

7.1.4 Auswahl von NIH 3T3 Fibroblasten und FuGENE 6 für Tierstudien

Für die nachfolgenden Studien zur Knorpelreparatur wählten wir das Transfektionsreagenz FuGENE 6 in Kombination mit murinen Fibroblasten. NIH 3T3 Zellen werden seit 1969 (Jainchill et al., 1969) in einer Vielzahl von *in vivo* Studien eingesetzt. Bei der Gentransfer-basierten Behandlung orthopädischer Erkrankungen, speziell im Kniegelenk, ist der erfolgreiche Einsatz dieses Zelltyps belegt: Durch Überexpression eines IL-1-Rezeptorantagonisten durch modifizierte NIH 3T3 Zellen kann der Verlauf einer Arthritis gemildert werden (Bakker et al., 1997). Zudem verbessert die intraartikuläre Injektion TGF- β 2-sezernierender NIH 3T3 Zellen die Reparatur von Knorpeldefekten (Lee et al. 2001). Auch die Verkapselung von NIH 3T3 Fibroblasten in Alginate stellt bereits eine etablierte Methode *in vivo* dar (vgl. 7.3.3). Verschiedene Autoren postulieren schließlich eine generell bessere Eignung etablierter Zelllinien für Transfektionszwecke im Vergleich zu Primärkulturen (Trivedi und Dickson, 1995; Ourlin et al., 1997; Kofler et al., 1998; Vitiello et al., 1998). Außerdem werden *in vivo* durch den Einsatz einer etablierten und leicht zugänglichen Zelllinie wie NIH 3T3 operative Eingriffe zur Gewinnung der Zielzellen und damit assoziierte Risiken vermieden.

Die Anwendung der für Vergleichszwecke herangezogenen 293 Zellen verbietet sich im Tierversuch aufgrund des Sicherheitsrisikos durch die adenovirale Transformation dieser Zelllinie (Graham et al., 1977). Auch primäre lapine Muskelzellen zeigten eine hohe Transgenexpression, doch bestanden weder in Bezug auf Transfektionseffizienz ($P = 0,4$), noch auf IGF-I-Sekretion ($P > 0,05$) signifikante Unterschiede gegenüber NIH 3T3 Zellen. Aufgrund potentieller maligner Entartung von CS-1, SAOS-2 und Zellen der fibrösen Dysplasie sind diese nicht für *in vivo* Studien mit dem Ziel einer späteren therapeutischen Anwendung geeignet.

Aufgrund der umfassenden Studienlage, die zu FuGENE 6-vermitteltem Gentransfer in Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates besteht, gaben wir diesem Reagenz den Vorzug gegenüber Metafectene oder Nanofectin 1: FuGENE 6 bewährte sich bei Transfektionen von Myoblasten (Arnold et al., 2006), primären Muskelzellen (Neuhuber et al., 2002) oder Chondrozyten (Madry und Trippel, 2000; Dinser et al., 2001; Stöve et al., 2002). Speziell die Kombination von NIH 3T3 Zellen mit FuGENE 6 (Song und Chen, 2003; Guo et al., 2006) erwies sich als effizient: Arulanandam et al. (2004) transfizierten 20%, Hellgren und Kollegen (2000) sogar 50% dieser Fibroblasten erfolgreich mittels FuGENE 6. Ferner weist das Transfektionsreagenz *in vitro* keine Zytotoxizität auf, induziert *in vivo* keine Entzündungsreaktion (Hellgren et al., 2000) und erfährt keine Beeinträchtigung durch die Anwesenheit von Serum (Jacobsen et al., 2004). Dies erleichtert den *ex vivo* Gentransfer und ist für *in vivo* Ansätze von Relevanz. Für Metafectene oder Nanofectin 1 hingegen existieren nach unserer Kenntnis keine Berichte über die Anwendung im Tiermodell.

7.2. *In vitro* Experimente

Aufgrund der unter 7.1.4 dargestellten Überlegungen wählten wir für diesen Teil der Arbeit NIH 3T3 Fibroblasten, verkapselten sie nach FuGENE 6-vermittelter Transfektion in Alginat und analysierten die resultierenden Sphäroide *in vitro*.

Nach drei Wochen sank in allen Sphäroiden trotz Zunahme der Zellzahl die Vitalität auf 33-43% ab. Wenngleich Proliferation und Überleben der Zellen in einer Alginatsuspension von Zelltyp zu Zelltyp variieren (Orive et al., 2003), wurde speziell für Alginat-verkapselte NIH 3T3 Fibroblasten noch nach 9 Wochen eine hohe Vitalität beschrieben (Thorsen et al., 2000). Read und Kollegen

(1999) wiesen sogar vier Monate nach Verkapselung von NIH 3T3 Zellen in Alginat noch eine Vitalität von 70% nach.

In der vorliegenden Arbeit beobachteten wir eine Verringerung der Vitalität auch bei nicht-transfizierten Sphäroiden sowie *lacZ*-Sphäroiden. Daher ist nicht davon auszugehen, dass diese Veränderungen auf das eingebrachte Fremdgen oder das Transfektionsreagenz zurückzuführen sind. Vielmehr ist als Effekt von IGF-I und FGF-2 eine Steigerung von Proliferation und Vitalität Alginat-verkapselter NIH 3T3 Zellen beschrieben (Yayon und Klagsbrun, 1990; Ewton et al., 2002; Loeser et al., 2003; Jin et al., 2006). Die fehlende Zytotoxizität des Transfektionsreagenzes FuGENE 6 ist außerdem mehrfach belegt worden (Nguyen et al., 2002; Kiefer et al., 2004; Madry et al., 2005; Tinsley et al., 2006; Kaul et al., 2006).

An den Tagen 2 und 4 nach Transfektion war die Sekretion von IGF-I aus IGF-I- und IGF-I/FGF-2-Sphäroiden maximal. Bereits an Tag 14 bestand kein signifikanter Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht-transfizierter Zellen. Interessanterweise lieferten transfizierte NIH 3T3 Zellen in Alginat initial 2,5-fach höhere Sekretionswerte für IGF-I als transfizierte Chondrozyten (123 ng IGF-I/10⁷ Zellen/24 h an Tag 4 nach Transfektion; Madry et al., 2005).

Die FGF-2-Sekretion aus IGF-I/FGF-2-Sphäroiden war etwa um den Faktor 10 geringer als deren IGF-I-Sekretion und bereits an Tag 7 nach Transfektion nicht mehr signifikant erhöht. Die von IGF-I/FGF-2-Sphäroiden sezernierten 30 ng FGF-2/10⁷ Zellen/24 h korrelieren gut mit den Resultaten von Kaul et al. (2006): Chondrozyten in Alginat setzten an Tag 2 nach Transfektion 48 ng FGF-2/10⁷ Zellen/24 h frei. Von Uteza et al. (1999) wurden NIH 3T3 Fibroblasten stabil mit dem Gen für FGF-2 transfiziert und in Alginat verkapselt. Dies resultierte in einer Sekretion von 0,69 ng FGF-2/10⁷ Zellen/24 h, 47-fach geringer als die von uns erzielten Werte.

Im Vergleich unserer Ergebnisse mit den Arbeiten von Madry et al. (2005) und Kaul et al. (2006) werden drei Erkenntnisse deutlich: Erstens liegen die IGF-I-Sekretionsniveaus transfizierter Zellen allgemein über denen von FGF-2. Zweitens ist mit Fibroblasten eine höhere initiale Sekretion von IGF-I erreichbar als mit Chondrozyten. Drittens nahm die Transgenexpression in NIH 3T3 Zellen rascher ab als in transfizierten Chondrozyten: Eine Sekretion von IGF-I über sieben Tage und von FGF-2 über vier Tage mag für klinische Anwendungen zu kurz sein, wenngleich wir *in vivo* zeigen konnten, dass in dieser Zeitdauer hinreichende Effekte auf die Knorpelreparatur erzielbar sind. Dem gegenüber steht *in vitro* eine IGF-I-Produktion durch Chondrozyten von 36 Tagen (Madry et al., 2003) oder sogar sechs Wochen (Dinser et al., 2001) bzw. eine FGF-2-Produktion über 28 Tage (Kaul et al., 2006).

In anderen Studien konnte auch für verkapselte Fibroblasten in Alginat eine prolongierte Transgenexpression belegt werden: Maysinger et al. (1993) zeigten, dass genetisch modifizierte Fibroblasten der Ratte einen Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) über 60 Tage freisetzen. Für

humane dermale Fibroblasten konnte eine signifikante Transgenexpression über zwei Wochen nachgewiesen werden (Lim et al., 2006).

Ein Grund für den raschen Rückgang der Wachstumsfaktor-Sekretion durch verkapselte Fibroblasten könnte auch in der Abnahme ihrer Vitalität begründet sein. Die Ursachen hierfür, möglicherweise eine antagonistische Wirkung von FGF-2 auf IGF-I (Russo et al., 2004; Loeser et al., 2005) oder ein möglicher Einfluß des zur Verkapselung verwendeten Materials, sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

7.3. *In vivo* Experimente

Transplantation genetisch modifizierter Zellen, eingebettet in einer Trägersubstanz, ist eine effiziente Methode zur Applikation therapeutischer Faktoren in einen Knorpeldefekt (Cucchiari und Madry, 2005). Nach Auswahl eines geeigneten Zelltyps (NIH 3T3) und Transfektionssystems (FuGENE 6) sowie Untersuchung der *in vitro* Eigenschaften von Alginat-Sphäroiden, implantierten wir diese in osteochondrale Defekte lapiner Kniegelenke. Nach 21 Tagen wurde die Defektreparatur evaluiert.

7.3.1 Wachstumsfaktoren IGF-I und FGF-2

Durch die Einwirkung von IGF-I können die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von *ex vivo* synthetisiertem Knorpelgewebe verbessert werden (Madry et al., 2002; Madry et al., 2007). Die IGF-I-basierte Therapie führt *in vivo* zu einer global verbesserten Knorpelreparatur, wie Rogachefsky et al. (1993) nach intraartikulärer Injektion des Proteins zeigen konnten. Auch die Verabreichung des IGF-I-Proteins in einem Fibrin-Thrombus (Hunziker und Rosenberg, 1996; Nixon et al., 1999) oder einem Kollagen-Gel (Tuncel et al., 2005) optimierte das Reparaturgewebe. Von verschiedenen Arbeitsgruppen (Gelse et al., 2003; Madry et al., 2005; Goodrich et al., 2007) wurde schließlich der Ansatz der Implantation *ex vivo* modifizierter Zellen in Knorpeldefekte verfolgt: Nach lokaler Überexpression von IGF-I wies das Reparaturgewebe verbesserte histologische Eigenschaften auf. Nichtsdestotrotz zeigen biomechanische Studien, dass die Defektgewebe auch nach Behandlung mit IGF-I degenerativen Prozessen unterliegen und mechanischer Belastung auf Dauer nicht gewachsen sind (Kaplan et al., 2003; Gratz et al., 2006). Von Strauss und Mitarbeitern (2005) wurden genetisch modifizierte, IGF-I-sezernierende

Chondrozyten in osteochondrale Defekte implantiert. Acht Monate postoperativ fand sich keine signifikante Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften des Reparaturgewebes.

In verschiedenen tierexperimentellen Arbeiten ließ sich nach intraartikulärer Applikation des FGF-2-Proteins ein positiver Effekt auf die Reparatur von Knorpeldefekten nachweisen (Jentzsch et al., 1980; Shida et al., 1996; Fujimoto et al., 1999; Chuma et al., 2004; Mizuta et al., 2004; Yamamoto et al., 2004). Auch die Anwendung Adeno-assoziiierter Viren zur direkten Applikation von FGF-2 in Defektareale resultierte in einer verbesserten Knorpelreparatur (Cucchiari et al., 2005; Hiraide et al., 2005). In den Untersuchungen von Yokoo et al. (2005) und Kaul et al. (2006) an osteochondralen Defekten wurde der therapeutische Nutzen einer Überexpression von FGF-2 durch *ex vivo* genetisch modifizierte Zellen deutlich.

7.3.2 Kombination von Wachstumsfaktoren

Die synergistische Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates ist belegt: Durch kombinierte Applikation von Wachstumsfaktoren wird beispielsweise die Neubildung von Knochen (Lan et al., 2006) oder die chondrogene Differenzierung von Stammzellen (Steinert et al., 2008) verstärkt angeregt. Bei Muskelzellen führt speziell die Kombination von IGF-I mit FGF-2 zu gesteigerter Myogenese (Pirkanen et al., 2000) und Proliferation von Myoblasten (Layne und Farmer, 1999). Brimah et al. (2004) konnten zeigen, dass die Vorbehandlung von fetalen Spender-Muskelzellen mit IGF-I und FGF-2 zu gesteigerter Muskelbildung im Empfänger-Organismus führt. Auch zur Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften von Sehnen und Bändern durch Einflussnahme auf Zellproliferation, Angiogenese und Kollagensynthese hat sich eine Wachstumsfaktor-Kombination aus IGF-I und FGF-2 als wirksam erwiesen (Letson und Dahners, 1994; Molloy et al., 2003). Schließlich konnten Loot und Kollegen (2002) zeigen, dass in der Behandlung chronischer Wunden durch kombinierte Applikation von IGF-I und FGF-2 ein therapeutisch nutzbarer Proliferations-Stimulus auf Fibroblasten erzeugt wird.

Auch in Bezug auf Knorpelzellen wurde der synergistische Effekt von IGF-I und FGF-2 belegt: Die Anwesenheit dieser Wachstumsfaktoren im Kulturmedium bedingte eine Proliferationsteigerung von Chondrozyten in einem Typ-I-Kollagen-Gel (Chaipinyo et al., 2002). Fukumoto et al. (2003) und Takahashi et al. (2005) bestätigten, dass IGF-I synergistisch mit FGF-2 proliferationsfördernd auf Chondrozyten wirkt. Reape und Kollegen (1996) erklären diese Beobachtung dadurch, dass IGF-I zeit- und dosisabhängig die Expression eines FGF-2-Rezeptors anregt. Dies führt zu einem erhöhten Ansprechen der Zellen auf FGF-2 und unterstützt unsere Hypothese einer verbesserten Knorpelreparatur durch Kombination beider Wachstumsfaktoren.

Wenngleich ein Synergismus von IGF-I und FGF-2 in den meisten Studien hierzu nachgewiesen werden konnte, beschrieb die Gruppe um Russo (2004) eine gegenseitige Hemmung der anabolen Eigenschaften beider Faktoren. Zudem zeigten Loeser et al. (2005), dass FGF-2 das Überleben verkapselter Chondrozyten nicht verbessert und signifikant die Wirkung von IGF-I hemmt. Diese Erkenntnisse könnten als mögliche Erklärung für die abnehmenden Vitalitäten verkapselter NIH 3T3 Zellen *in vitro* herangezogen werden.

7.3.3 Technik der Applikation von *ex vivo* transfizierten Zellen

Durch die Applikation therapeutischer Faktoren via *ex vivo* transfizierter Zellen können initiale Konzentrationsspitzen im Gelenk umgangen werden, wie sie nach intraartikulärer Injektion des Peptids beobachtet werden (Sellers et al., 2000). Vielmehr wird durch die kontinuierliche Transgenexpression ein signifikanter Wirkspiegel innerhalb des Reparaturgewebes aufrechterhalten. Dabei ist anscheinend die Lokalisation der transfizierten Zellen direkt im Defekt essentiell: Nach freier intraartikulärer Injektion adenoviral IGF-I-transduzierter Zellen fand sich keine Verbesserung der Morphologie des Gelenkknorpels (Gelse et al., 2001). Hingegen war nach Transplantation dieser Zellen in Knorpeldefekte mit Hilfe eines Fibrinklebers die Knorpelreparatur signifikant verbessert (Gelse et al., 2003). Folglich scheint die gezielte Implantation modifizierter Zellen in die Defekte der intraartikulären Injektion therapeutischer Faktoren bei der Behandlung fokaler Knorpeldefekte überlegen zu sein (Cucchiariini und Madry, 2005).

7.3.4 Alginat als Trägersubstanz

Alginat-Sphäroide können therapeutische Faktoren über einen längeren Zeitraum freisetzen (Edelmann et al., 1991; Downs et al., 1992; Davies et al., 1997). Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt (vgl. 6.2.1). Die Eignung von Alginat als Trägersubstanz für eine Vielzahl endokrin aktiver oder genetisch modifizierter Zellen ist belegt (Lim und Moss., 1981; Chang et al., 1997; Gutowska et al., 2001). Alginat-Sphäroide finden unter anderem Anwendung in der Inselzell-Therapie des Diabetes mellitus (Lim und Sun, 1980; Sambanis, 2003; de Vos et al., 2006) oder bei der Genterapie von Tumoren (Visted et al., 2001).

Ferner hat sich Alginat als Trägersubstanz zur Implantation modifizierter Zellen in Knorpeldefekte etabliert (Diduch et al., 2000; Mierisch et al., 2003; Madry et al., 2003 und 2005; Kaul et al., 2006). Der differenzierte Phänotyp verkapselter Zellen wird dadurch nicht beeinflusst (von der Mark et al., 1977; Benya et al., 1978; van Susante et al., 1995; Aydelotte et al., 1998; Domm et al., 2000). Durch Verkapselung in Alginat wird die chondrogene Differenzierung mesenchymaler

Zellen oder entdifferenzierter Chondrozyten sogar stimuliert (Shakibaei und De Souza, 1997; Lemare et al., 1998).

Alginate scheint sich auch als Trägersubstanz für NIH 3T3 Fibroblasten zu eignen. So beschrieben Read et al. (1999), dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach vier Monaten 70% dieser Zellen überlebten. Verkapselte NIH 3T3 Fibroblasten sezernierten *in vitro* signifikante Mengen TGF- β 1 über mindestens 7 Tage (Paek et al., 2006). Song und Kollegen bestätigten 2005, dass verkapselte und mittels FuGENE 6 transfizierte NIH 3T3 Zellen einen Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) sogar über 3 Monate *in vitro* freisetzen. Zudem weisen Fibroblasten die besten Wachstumsparameter nach Verkapselung in klassischen Calcium-verbundenen Alginate-Sphäroiden auf (Peirone et al., 1998). Dieser Methode gaben auch wir den Vorzug gegenüber anderen Techniken wie beispielsweise der Barium-Quervernetzung (Smidsrod und Skjak-Braek, 1990; Draget et al., 1997; Koch et al., 2003).

Weitere Vorteile der Alginate-Substanz sind ihre physiologische, negative Ladung (You et al., 2001) und ihre Stabilität nur über kurze Zeiträume (Bonaventure et al., 1994). Wir fanden die Alginate-Sphäroide bereits nach 21 Tagen *in vivo* fast vollständig resorbiert. Auch in anderen Arbeiten waren die Sphäroide nach relativ kurzer Zeit größtenteils nicht mehr nachweisbar (Rokstad et al., 2001; Madry et al., 2005; Kaul et al., 2006). Mierisch et al. (2003) begründen den Verlust der strukturellen Integrität des Alginats mit einem Efflux divalenter, quervernetzender Kationen. Auch Fremdkörperreaktionen gegen Alginate, Fibroblasten oder das Transgen sind denkbar, wenngleich wir in behandelten Gelenken keine Anzeichen für eine Entzündungs- oder Unverträglichkeitsreaktion fanden. Die Arbeiten von Grande et al. (1989) und Hidaka et al. (2003) zeigen, dass neben der Alginate-Substanz auch die transplantierten Zellen nach kurzer Zeit in den Läsionen nicht mehr nachweisbar sind. Wir vermuten daher, dass die verkapselten Zellen vorwiegend als Sekretionsorgane für das transgene Produkt fungieren, anstatt direkt an der Besiedelung der Defektareale teilzunehmen. Schließlich spricht die Anwendung von Alginate in Studien am Menschen für seinen Einsatz als Trägersubstanz in der vorliegenden Arbeit (Soon-Shiong et al., 1994).

7.3.5 Tiermodell

In Studien zur Knorpelreparatur werden als Versuchstiere meist Ratten (Ikeda et al., 2000; Madry et al., 2003), Kaninchen (Sellers et al., 1997; Mierisch et al., 2003, Madry et al., 2005) Schweine (Hunziker und Rosenberg, 1996; Gelse et al., 2008) oder das Pferd (Fortier et al., 2002; Hidaka et al., 2003; Strauss et al., 2005; Goodrich et al., 2007) verwendet. Wir wählten Chinchilla Bastard Kaninchen aufgrund ihres umfassend dokumentierten Einsatzes bei der Untersuchung

von Knorpelreparaturmechanismen (Bentley und Greer, 1971; Furukawa et al., 1980; Shapiro et al., 1993; Hunziker, 1999). Die fehlende spontane Regeneration von Defekten des Gelenkknorpels ist bei Kaninchen sicher etabliert (Sellers et al., 1997 und 2000; Madry et al., 2005; Kaul et al., 2006). Dies ermöglicht die valide Beurteilung entsprechender Therapiekonzepte.

Osteochondrale Defekte spiegeln gut die klinische Situation nach traumatisch bedingter Schädigung des Gelenkknorpels wieder. Das Defektareal gewinnt dabei Anschluss an die Markhöhle und Zellen des Knochenmarks migrieren in die Läsion. Von den Wachstumsfaktoren IGF-I und FGF-2 ist bekannt, dass sie die chondrogene Differenzierung von Zellen aus dem Knochenmark stimulieren (Frenz et al., 1994; Nixon et al., 1999; Fujimoto et al., 1999). Die von uns beobachtete Verbesserung der Knorpelreparatur kann folglich auf den Einfluss der therapeutischen Faktoren sowohl auf Zellen aus der Markhöhle als auch auf ortsständige Chondrozyten zurückgeführt werden.

7.3.6 Bewertungssystem

Für die Evaluation der histologischen Schnitte der distalen Femora verwendeten wir das von Sellers und Kollegen (1997) beschriebene Bewertungssystem für die Reparatur fokaler Knorpeldefekte. Dieses kam in vorangegangenen Studien unseres Labors (Madry et al., 2005; Cucchiari et al., 2005; Kaul et al., 2006) zum Einsatz und ermöglicht somit den direkten Vergleich der Resultate. Das Bewertungssystem nach Sellers stellt eine Weiterentwicklung etablierter Bewertungssysteme (Pineda et al., 1992; Wakitani et al., 1994) dar und erlaubt die detaillierte Analyse der Knorpelreparatur. Verdeutlicht wird dies durch die hohe Gesamtpunktzahl von 31; im Vergleich liegt dieser Wert im Bewertungssystem nach O'Driscoll et al. (1986) bei 24 (modifiziert von van Susante et al., 1999 und Mason et al., 2000) und bei Fortier et al. (2002) bei 20 Punkten.

7.3.7 Wachstumsfaktor-Konzentration der Synovialflüssigkeit

In vivo war die IGF-I-Konzentration in der Synovia behandelter Gelenke höher als deren FGF-2-Konzentration. Dies stimmt mit den Daten der *in vitro* Versuche überein: Die IGF-I-Sekretion transfizierter und verkapselter NIH 3T3 Fibroblasten war hier etwa um den Faktor 10 erhöht gegenüber der Sekretion von FGF-2.

Es bestand ferner kein signifikanter Unterschied in IGF-I- oder FGF-2-Konzentration zwischen den Behandlungsgruppen und der *lacZ*-Kontrolle. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen von Nixon et al. (1999) und Fortier et al. (2002). Bei einer gleichzeitig verbesserten Knorpelreparatur

mag dies bedeuten, dass die Wachstumsfaktoren ihre therapeutische Wirkung nur lokal im Defektareal entfalten, da für eine Diffusion aus den Läsionen keine Anzeichen gefunden werden konnten. Dadurch werden bei klinischer Anwendung unerwünschte Effekte der therapeutischen Faktoren, beispielsweise eine Hyperplasie der Synovialmembran, verhindert (Qu et al., 1995; Manabe et al., 1999).

Eine reaktiv erhöhte Wachstumsfaktor-Konzentration in der Synovia findet sich generell in erkrankten Gelenken (Massicotte et al., 2006): Die Resultate der Arbeiten von Matsumoto et al. (1996) und Neidel und Kollegen (1994) zeigen einen Anstieg der IGF-I-Konzentration um mehr als das Dreifache auf 64×10^3 pg IGF-I/ml Synovia bei rheumatoider Arthritis. Für FGF-2 ist eine Erhöhung der Konzentration von 3 auf 24 pg FGF-2/ml Synovialflüssigkeit in erkrankten Kniegelenken beschrieben (Sato et al., 2003). Diese Literaturangaben bestätigen zum einen, dass die IGF-I-Konzentration in gesunden und erkrankten Gelenken generell höher ist als die FGF-2-Konzentration. Zum anderen liegen die von uns ermittelten Werte (durchschnittlich 200 pg IGF-I und 6 pg FGF-2/ml Synovia) nach Transplantation modifizierter Fibroblasten im Bereich gesunder Gelenke. Die Implantation transfizierter Zellen in osteochondrale Defekte scheint also keine lokale oder systemische Reaktion hervorzurufen. Um dies zu verifizieren, sollte in Folgestudien präoperativ die IGF-I- und FGF-2-Konzentration in unbehandelten Gelenken bestimmt werden.

7.3.8 Biochemische Evaluation des Reparaturgewebes

In jedem Gelenk wurde das Reparaturgewebe eines Defektes *in toto* gewonnen und drei Wochen nach Implantation der Sphäroide biochemischen Analysen unterzogen.

7.3.8.1 Wassergehalt

Ein erhöhter Wasseranteil kann für die biomechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes von Nachteil sein und auf eine Insuffizienz des Kollagen-Netzwerkes hinweisen (Strauss et al., 2005). Wir fanden den Wassergehalt der Reparaturgewebe in der IGF-I/FGF-2-Gruppe signifikant ($P < 0,05$) und in der IGF-I-Gruppe deutlich ($P > 0,05$) erniedrigt gegenüber der *lacZ*-Kontrollgruppe. Diese Daten lassen vermuten, dass die Transplantation von IGF-I/FGF-2-Sphäroiden zur Ausbildung eines biochemisch verbesserten Knorpelgewebes führen kann.

7.3.8.2 DNS-Gehalt

DNS-Gehalt und Zellzahl der Reparaturgewebe waren nach dreiwöchiger Behandlung mit IGF-I/FGF-2-Sphäroiden signifikant höher als nach Implantation von IGF-I- oder *lacZ*-Sphäroiden ($P < 0,05$). Diese Steigerung der Zellproliferation nach kombinierter Applikation von IGF-I und FGF-2

korreliert gut mit den Resultaten anderer Studien (Doumit et al., 1993; Reape et al., 1996; Zheng et al., 1997; Layne und Farmer, 1999; Edmondson et al., 1999).

7.3.8.3 Proteoglykan-Gehalt

Ein niedriger Proteoglykan-Gehalt innerhalb des Knorpelgewebes findet sich unter anderem im frühen Stadium einer Arthrose (Hunziker, 2002; Huser und Davies, 2006), beispielsweise nach Traumata (Mankin, 1982), und ist für die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels von Nachteil (Strauss et al., 2005).

In den Reparaturgeweben fanden wir einen signifikant erhöhten Proteoglykan-Gehalt nach kombinierter Überexpression von IGF-I und FGF-2, nicht jedoch nach Sekretion von IGF-I alleine. Interessanterweise ist jedoch für IGF-I *in vitro* eine initiale Steigerung der Produktion von Proteoglykanen (Jenniskens et al., 2006) und extrazellulärer Matrix (Trippel et al., 1983; Sah et al., 1994) beschrieben. Nixon und Mitarbeiter (1999) sahen diesen Effekt allerdings *in vivo* nicht bestätigt: Nach Applikation des IGF-I-Proteins in einem Fibrin-Thrombus wiesen die Reparaturgewebe keinen erhöhte Proteoglykan-Gehalt auf. In Bezug auf FGF-2 verwiesen Kaul et al. (2006) und Cucchiarini et al. (2008) *in vitro* darauf, dass dessen Sekretion durch Chondrozyten in Alginat nicht zu einer Zunahme ihrer Proteoglykan-Produktion führt. Wir konnten nun zeigen, dass FGF-2 eine IGF-I-vermittelte Stimulation der Proteoglykan-Produktion auch *in vivo* unterstützen kann. Dabei beobachteten wir einen balancierten Effekt der Wachstumsfaktoren auf das Reparaturgewebe: Das in allen Gruppen vergleichbare Verhältnis Proteoglykan-Gehalt/Zellzahl zeigt, dass eine Steigerung der Zellproliferation mit einem proportionalen Anstieg der Proteoglykan-Produktion einhergeht. Diese gleichzeitige Erhöhung von Zellzahl und Proteoglykan-Konzentration unterstreicht die gute biochemische Qualität des Reparaturgewebes nach kombiniertem Gentransfer. Weiterführende Studien an Großtiermodellen werden zeigen müssen, ob dieses Gewebe auch biomechanisch ausdauernd und belastbar ist.

7.3.9 Histologische Evaluation der Gelenke

Von den behandelten Gelenken fertigten wir Paraffinschnitte an und führten zur Beurteilung von Entzündungszeichen und Knorpelreparatur HE-Färbungen, immunhistochemische Färbungen sowie Safranin-O-Färbungen durch.

7.3.9.1 Entzündungszeichen der Synovialmembran

Mit dem Bewertungssystem nach Fortier et al. (2002) wurde nach HE-Färbung in keinem der operierten Gelenke eine ausgeprägte Synovialitis nachgewiesen. Dies steht in Einklang mit vergleichbaren Studien (Madry et al., 2005; Kaul et al., 2006) und unterstreicht die

Biokompatibilität der beschriebenen Methode. Speziell Alginate (Diduch et al., 2000) und darin verkapselte FuGENE 6-transfizierte NIH 3T3 Zellen (Song et al., 2005) induzieren *in vivo* keine Entzündungsreaktion.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der IGF-I- und IGF-I/FGF-2-Gruppe einerseits und der *lacZ*-Kontrollgruppe andererseits. Dennoch ist sowohl für FGF-2 (Hu und Wu, 2001) als auch für IGF-I (Fortier et al., 2002) eine anti-inflammatorische Wirkung *in vivo* nachgewiesen; die IGF-I-induzierte Protektion der Synovialmembran vor einer postoperativen Inflammation wird diskutiert. Wir erklären die fehlenden Auswirkungen von IGF-I oder FGF-2 auf Entzündungszeichen der Synovialmembran dadurch, dass die Wachstumsfaktoren in der Synovia nicht in erhöhter Konzentration vorlagen und daher keinen Einfluss auf generalisierte Entzündungsparameter des Gelenks nehmen konnten.

7.3.9.2 Typ-I/II-Kollagengehalt der Reparaturgewebe

Typ-I-Kollagen findet sich in subchondralem Knochen und dem fibrösem Reparaturgewebe un behandelter Knorpeldefekte. Typ-II-Kollagen stellt hingegen einen wesentlichen Bestandteil des gesunden Gelenkknorpels dar. Drei Wochen postoperativ fanden wir eine tendenzielle Zunahme von Typ-I-Kollagen in der IGF-I/FGF-2-Gruppe. Kaul et al. (2006) beschrieben hingegen eine FGF-2-vermittelte Abnahme der Immunreaktivität des Reparaturgewebes auf Typ-I-Kollagen. Durch Anwendung objektiver Messverfahren wie der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (Green und Reagan, 1992) könnte dieser Widerspruch aufgeklärt werden. Ferner ist der Einsatz von Software zur standardisierten Evaluation immunhistochemisch gefärbter Präparate beschrieben (Sellers et al., 2000; Cucchiariini et al., 2005).

Nach semiquantitativer Auswertung ermittelten wir in der IGF-I/FGF-2-Gruppe die stärkste Typ-II-Kollagen-Immunreaktivität. Die FGF-2-induzierte Stimulation der Typ-II-Kollagensynthese wurde auch *in vitro* von Veilleux und Spector (2005) sowie *in vivo* von Kaul und Kollegen (2006) bestätigt. Ein derartiger Effekt wird für IGF-I hingegen konträr diskutiert: Fortier et al. (2002) oder Capito und Spector (2007) beschrieben für diesen Wachstumsfaktor eine Steigerung der Typ-II-Kollagensynthese *in vitro*. Dies konnte zwar von Goodrich und Kollegen (2007), nicht aber von Madry et al. (2005) *in vivo* verifiziert werden.

Den Publikationen von Kaul et al. (2006) oder Madry et al. (2005) ist zu entnehmen, dass es spontan in behandelten wie un behandelten Defektarealen über 14 Wochen zu einer Zunahme von Typ-II-Kollagen kommt. Sellers und Kollegen (2000) fanden allerdings im Reparaturgewebe ein Jahr nach BMP-2-Applikation keine erhöhte Typ-II-Kollagenkonzentration mehr. Ob und über

welchen Zeitraum daher die Einwirkung von IGF-I und FGF-2 zu einer immunhistochemisch nachweisbaren Steigerung der Knorpelqualität führt, sollte Gegenstand zukünftiger quantitativer Analysen sein.

7.3.9.3 Histologische Beurteilung der Defektreparatur

Die IGF-I-Gruppe wies keine signifikante Verbesserung der Knorpelreparatur gegenüber der *lacZ*-Kontrollgruppe auf. Zwar waren die Werte aller Einzelkategorien verbessert, das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Diese Resultate korrelieren mit Daten nach Implantation eines mit IGF-I-Protein angereicherten Fibrin-Chondrozyten-Gemisches (Fortier et al., 2002). Auch hier konnten zwar biochemische Parameter der Chondrogenese verbessert, die histologischen Merkmale des Reparaturgewebes aber nicht signifikant beeinflusst werden. Madry und Kollegen (2005) hingegen transfizierten Chondrozyten FuGENE 6-vermittelt mit dem Gen für IGF-I, verkapselten die Zellen in Alginate und implantierten sie in osteochondrale Defekte in den Kniegelenken von Kaninchen. Nach Auswertung anhand des Bewertungssystems nach Sellers et al. (1997) wurde nach drei und vierzehn Wochen eine signifikante Verbesserung der Knorpelreparatur gegenüber der *lacZ*-Kontrollgruppe beobachtet. Bei sonst identischem Versuchsaufbau muss die Diskrepanz der Ergebnisse dieser Studie mit unserer Arbeit auf den verwendeten Zelltyp zurückgeführt werden. Wir sehen vor allem die niedrige Überlebensrate verkapselter Fibroblasten hierfür verantwortlich: 21 Tage nach Transfektion lag die Vitalität der Fibroblasten bei 40%, die der Chondrozyten bei mindestens 80% (Madry et al., 2005; Kaul et al., 2006). Wenngleich sich NIH 3T3 Zellen gegenüber Knorpelzellen durch eine höhere initiale Sekretion von IGF-I auszeichneten, nahm ihre Transgenexpression infolge der verminderten Vitalität jedoch rasch ab. Bereits an Tag 7 nach Transfektion war daher die IGF-I-Sekretion durch Chondrozyten höher als durch NIH 3T3 Zellen (Madry et al., 2005). Chondrozyten hingegen konnten relativ hohe Sekretionsniveaus über 36 Tage aufrechterhalten.

Im Vergleich der IGF-I/FGF-2-Gruppe mit der *lacZ*-Kontrolle waren die Einzelkategorien Integration, Zellmorphologie, subchondraler Knochen und *tidemark* sowie der Gesamtpunktwert der Knorpelreparatur signifikant verbessert. Die Arbeit von Kaul et al. (2006) unterschied sich nur in der Wahl des Wachstumsfaktors von der Studie von Madry et al. (2005) und unterstreicht die Eignung von FGF-2 als therapeutischer Faktor bei der Behandlung von Knorpeldefekten. Nach drei und vierzehn Wochen war der Gesamtpunktwert in der FGF-2-Behandlungsgruppe gegenüber der *lacZ*-Kontrolle signifikant verbessert. Ähnliche Effekte konnten auch Yokoo et al. (2005) nach Transplantation AAV-transduzierter Chondrozyten in einem Typ-I-Kollagen-Gel belegen: Nach histologischer Evaluation mittels dem von Wakitani et al. (1994) entwickelten

Bewertungssystem wurden in der FGF-2-Gruppe bessere Resultate erzielt als in der Kontrollgruppe.

Die wichtigste Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist die signifikant verbesserte Knorpelreparatur nach Implantation von IGF-I/FGF-2-Sphäroiden im Vergleich zu Gelenken, die nur mit IGF-I behandelt wurden. Der therapeutische Nutzen von Wachstumsfaktoren in Kombination konnte *in vivo* bereits gezeigt werden (siehe 7.3.2). In Bezug auf fokale Knorpeldefekte bestätigte die Gruppe um Gelse (2003), dass die kombinierte Applikation von IGF-I und BMP-2 die Reparatur günstiger beeinflusst als die Behandlung mit einem Faktor alleine. Wir konnten nun beweisen, dass auch der kombinierte Gentransfer von IGF-I und FGF-2 der Applikation eines einzelnen Faktors überlegen ist.

Der von uns in der IGF-I/FGF-2-Gruppe erzielte Gesamtpunktwert von 11,2 erweist sich nicht nur im Rahmen dieser Arbeit, sondern auch im Vergleich zu bereits angesprochenen Studien als deutlich verbessert: Von Madry et al. (2005) wurde nach 3 Wochen ein mittlerer Gesamtpunktwert in der IGF-I-Behandlungsgruppe von 12,0 erzielt. Ebenfalls drei Wochen nach Implantation von FGF-2-Sphäroiden ist von Kaul et al. (2006) ein Gesamtpunktwert von 15,2 beschrieben. Und selbst vier Monate nach AAV-vermittelter direkter Applikation von FGF-2 in osteochondrale Defekte wurde nur ein Punktwert von 11,0 erzielt (Cucchiari et al., 2005). Wir konnten zeigen, dass die Reparaturmechanismen nach Transplantation IGF-I-transfizierter Fibroblasten (15,5) zwar weniger ausgeprägt sind als nach Implantation IGF-I-transfizierter Chondrozyten (12,0). Aber der Punktwert von 11,2 nach Implantation von IGF-I/FGF-2-Sphäroiden zeigt andererseits die Überlegenheit des kombinierten Gentransfers von IGF-I und FGF-2 gegenüber einer Monotherapie und bestätigt die Daten der biochemischen Analysen.

In Folgestudien sollte konsequenterweise die Knorpelreparatur durch IGF-I/FGF-2-transfizierte Chondrozyten analysiert werden. Vor dem Hintergrund einer prolongierten Transgenexpression transfizierter Chondrozyten sind bei diesem Zelltyp längere Beobachtungszeiträume von Interesse.

7.4. Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Effizienz nicht-viraler Transfektionsmethoden optimiert werden kann. Diese Methoden ermöglichen einen erfolgreichen Gentransfer in Zellen des Stütz- und Bewegungsapparates, die einen hohen Stellenwert in der orthopädischen Forschung besitzen (Nixon et al., 2007). Diese genetisch modifizierten Zellen, speziell primäre Chondrozyten und Muskelzellen sowie NIH 3T3 Zellen, zeichnen sich durch eine hohe Transgenexpression aus. Dies ist entscheidend für die Anwendbarkeit dieser Zellen bei der Gentransfer-basierten Therapie von Knorpeldefekten. *In vitro* zeigten die von uns gewählten NIH 3T3 Zellen nach Verkapselung in Alginate eine hohe initiale Transgenexpression und gesteigerte Zellproliferation bei im Verlauf abnehmender Vitalität. Zudem wiesen wir die Verbesserung der biochemischen und histologischen Parameter eines osteochondralen Defektes nach Implantation IGF-I- und FGF-2-sezernierender Fibroblasten *in vivo* nach. Dabei war die Kombination beider Wachstumsfaktoren der alleinigen Applikation von IGF-I überlegen.

Die beschriebenen Methoden des optimierten Gentransfers mittels nicht-viraler Systeme besitzen nicht nur Anwendungsmöglichkeiten in der Gentransfer-basierten Behandlung von Knorpeldefekten (Oberholzer et al., 2006), sondern können auch in der onkologischen Forschung mit der Möglichkeit des Transfers von Tumorsuppressorgenen einen weiteren potentiellen Indikationsbereich finden. Unter Berücksichtigung der aktuellen Fortschritte, die im Bereich nicht-viraler Transfektionsmethoden gemacht werden, wird deren Effizienz noch steigerbar sein. Dabei könnte in zukünftigen Studien besonderes Augenmerk darauf gelegt werden, optimale *in vivo* Konditionen für die Übertragung von genetischem Material zu etablieren.

Bei *in vivo* Versuchen zur Behandlung von Defekten des Gelenkknorpels wird ein Ziel darin bestehen, die Situation im menschlichen Organismus experimentell möglichst exakt zu imitieren. Dabei werden Untersuchungen an Großtier-Modellen und über längere Zeiträume notwendig sein, um die Knorpelreparatur im klinischen Kontext beurteilen zu können: Der Erfolg einer chirurgischen Intervention wird in Jahren oder sogar Jahrzehnten gemessen, besonders im Hinblick auf die Entwicklung einer sekundären Arthrose.

Schließlich stellt die Wahl der therapeutischen Faktoren in dem hier beschriebenen Ansatz eine Stellschraube zur Optimierung des Reparaturprozesses dar. So wird Grundlagenforschung die molekularen Mechanismen weiter klären müssen, die der Knorpelreparatur zugrunde liegen. Dadurch werden auch momentan noch wenig etablierte therapeutische Faktoren künftig in den Vordergrund treten oder bestimmte Matrixproteine einen neuen Stellenwert erlangen können.

Auch die Kombination verschiedener Faktoren, ein von uns verfolgter Ansatz, wird möglicherweise experimentellen Verfahren neue Impulse verleihen. Ferner ist für die Erschließung neuer Therapiekonzepte, beispielsweise mit Angriffspunkt in der Chondrogenese, ein tieferes Verständnis der embryologischen Entwicklung des hyalinen Gelenkknorpels unabdingbar. Letztlich stellt die Anwendung in Studien am Menschen das langfristige Ziel aller experimentellen Ansätze dar.

Es ist nicht davon auszugehen, dass die Gentherapie einmal als alleiniges Therapiekonzept die chirurgischen Verfahren bei der Behandlung von Knorpeldefekten verdrängen wird. Vielmehr wird sie ihren vollen Nutzen dann entfalten, wenn sie als Ergänzung zu bestehenden operativen Maßnahmen eingesetzt wird. Wir sind der Ansicht, dass unsere Resultate dazu beitragen können, Gentransfer-basierter Konzepte als ein Standbein der Behandlung fokaler Knorpeldefekte weiter zu etablieren.

8. Literaturverzeichnis

Adachi N, Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han CW, Niyibizi C, Huard J (2002) Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J Rheumatol.* 29:1920-30

Akinc A, Anderson DG, Lynn DM, Langer R (2003) Synthesis of poly(beta-amino ester)s optimized for highly effective gene delivery. *Bioconjug Chem.* 14:979-88

Akita H, Ito R, Khalil IA, Futaki S, Harashima H (2004) Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy. *Mol Ther.* 9:443-51

Albert N, Tremblay JP (1992) Evaluation of various gene transfection methods into human myoblast clones. *Transplant Proc.* 24:2784-6

Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, Goltzman TD, Karaplis AC (1994) Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol.* 126:1611-23

Anderson WF (1992) Human gene therapy. *Science* 256:808-13

Arnold AS, Laporte V, Dumont S, Appert-Collin A, Erbacher P, Coupin G, Levy R, Poindron P, Gies JP (2006) Comparing reagents for efficient transfection of human primary myoblasts: FuGENE 6, Effectene and ExGen 500. *Fundam Clin Pharmacol.* 20:81-9

Arulanandam R, Vultur A, Raptis L (2005) Transfection techniques affecting Stat3 activity levels. *Anal Biochem.* 338:83-9

Asahina I, Sampath TK, Hauschka PV (1996) Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res.* 222:38-47

Aydelotte MB, Thonar EJ, Mollenhauer J, Flechtenmacher J (1998) Culture of chondrocytes in alginate gel: variations in conditions of gelation influence the structure of the alginate gel, and the arrangement and morphology of proliferating chondrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 34:123-30

Bakker AC, Joosten LA, Arntz OJ, Helsen MM, Bendele AM, van de Loo FA, van den Berg WB (1997) Prevention of murine collagen-induced arthritis in the knee and ipsilateral paw by local expression of human interleukin-1 receptor antagonist protein in the knee. *Arthritis Rheum.* 40:893-900

Baragi VM, Renkiewicz RR, Qiu L, Brammer D, Riley JM, Sigler RE, Frenkel SR, Amin A, Abramson SB, Roessler BJ (1997) Transplantation of adenovirally transduced allogeneic chondrocytes into articular cartilage defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage.* 5:275-82

Benjamin R, Helman L, Meyers P, Reaman G (2001) A phase I/II dose escalation and activity study of intravenous injections of OCaP1 for subjects with refractory osteosarcoma metastatic to lung. *Hum Gene Ther.* 10:1591-3

Bentley G, Greer RB 3rd (1971) Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature* 230:385-8

Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC (2004) Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* 11:10-7

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 22:85-9

- Blanton JR, Bidwell CA, Sanders DA, Sharkey CM, McFarland DC, Gerrard DE, Grant AL (2000) Plasmid transfection and retroviral transduction of porcine muscle cells for cell-mediated gene transfer. *J Anim Sci.* 78:909-18
- Bonavaud S, Thibert P, Gherardi RK, Barlovatz-Meimon G (1997) Primary human muscle satellite cell culture: Variations of cell yield, Proliferation and differentiation rates according to age and sex of donors, site of muscle biopsy, and delay before processing. *Biol Cell.* 89:233-40
- Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P (1994) Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res.* 212:97-104
- Bora FW Jr, Miller G (1987) Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis. *Hand Clin.* 3:325-36
- Bramwell VH (2000) Osteosarcomas and other cancers of bone. *Curr Opin Oncol.* 12:330-6
- Braun S, Vogt S, Imhoff AB (2007) Stage oriented surgical cartilage therapy. Current situation. *Orthopäde* 36:589-99
- Brimah K, Ehrhardt J, Mouly V, Butler-Browne GS, Partridge TA, Morgan JE (2004) Human muscle precursor cell regeneration in the mouse host is enhanced by growth factors. *Hum Gene Ther.* 15:1109-24
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med.* 331:889-95
- Brittberg M, Winalski CS (2003) Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A:58-69
- Brunk CF, Jones KC, James TW (1979) Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal Biochem.* 92:497-500
- Buckwalter JA (1983) Articular cartilage. *Instr Course Lect.* 32:349-70
- Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegama TR, Eyre DR (1993) Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am.* 75:1533-48
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum.* 41:1331-42
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 47:477-86
- Bulstra SK, Homminga GN, Buurman, WA, Terwindt-Rouwenhorst E, van der Linden AJ (1990) The potential of adult human perichondrium to form hyaline cartilage in vitro. *J Orthp Res.* 8:328-35
- Cao B, Huard J (2004) Gene transfer to skeletal muscle using herpes simplex virus-based vectors. *Methods Mol Biol.* 246:301-8
- Capito RM, Spector M (2007) Collagen scaffolds for nonviral IGF-1 gene delivery in articular cartilage tissue engineering. *Gene Ther.* 14:721-32
- Chaipinyo K, Oakes BW, van Damme MP (2002) Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultures in collagen I gels. *J Orthop Res.* 20:1070-8
- Chang PL (1997) Microcapsules as bio-organs for somatic gene therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 831:461-73
- Chemin I, Moradpour D, Wieland S, Offensperger WB, Walter E, Behr JP, Blum HE (1998) Liver-directed gene transfer: a linear polyethylenimine derivative mediates highly efficient DNA delivery to primary hepatocytes in vitro and in vivo. *J Viral Hepat.* 5:369-75
- Cheng T, Xu C-Y, Wang Y-B, Chen M, Wu T, Zhang J, Xia N-S (2004) A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. *World J Gastroenterol.* 10:1612-8

- Chowdhury EH, Kunou M, Nagoaka M, Kundu AK, Hoshiba T, Akaike T (2004) High-efficiency gene delivery for expression in mammalian cells by nanoprecipitates of Ca-Mg phosphate. *Gene* 341:77-82
- Chuma H, Mizuta H, Kudo S, Takagi K, Hiraki Y (2004) One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cart.* 12:834-42
- Coonrod A, Li FQ, Horwitz M (1997) On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther* 4:1313-21
- Crystal RG (1995) The gene as the drug. *Nature Med.* 1:15-7
- Crystal RG (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270:404-10
- Cucchiari M, Madry H (2005) Gene therapy for cartilage defects *J Gene Med.* 7:1495-509
- Cucchiari M, Madry H, Ma C, Thurn T, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Terwilliger EF (2005) Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther.* 12:229-38
- Cucchiari M, Terwilliger EF, Kohn D, Madry H (2008) Remodeling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J Cell Mol Med.* Epub ahead of print
- Dai J, Rabie AB (2007) The use of recombinant adeno-associated virus for skeletal gene therapy. *Orthod Craniofac Res.* 10:1-14
- Dass CR, Choong PF (2007) Non-viral methods for gene transfer towards osteosarcoma therapy. *J Drug Target.* 15:184-9
- Dass CR, Choong PF (2008) Gene therapy for osteosarcoma: steps towards clinical studies. *J Pharm Pharmacol.* 60:405-13
- Davies MJ, Mitchell CA, Maley MA, Grounds MD, Harvey AR, Plant GW, Wood DJ, Hong Y, Chirila TV (1997) In vitro assessment of the biological activity of basic fibroblast growth factor released from various polymers and biomatrices. *J Biomater Appl.* 12:31-56
- de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R (2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 27:5603-17
- Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G (2000) Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 16:571-7
- Dinser R, Kreppel F, Zaucke F, Blank C, Paulsson M, Kochanek S, Maurer P (2001) Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem Cell Bull.* 116:69-77
- Dodds E, Dunckley MG, Naujoks K, Michaelis U, Dickson G (1998) Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. *Gene Ther.* 5:542-51
- Dom C, Fay J, Schunke M, Kurz B (2000) Redifferentiation of dedifferentiated joint cartilage cells in alginate culture. Effect of intermittent hydrostatic pressure and low oxygen partial pressure. *Orthopäde* 29:91-9
- Doumit ME, Cook DR, Merkel RA (1993) Fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin-like growth factors, and platelet-derived growth factor-BB stimulate proliferation of clonally derived porcine myogenic satellite cells. *J Cell Physiol.* 157:326-32
- Downs EC, Robertson NE, Riss TL, Plunkett ML (1992) Calcium alginate beads as a slow-release system for delivering angiogenic molecules in vivo and in vitro. *J Cell Physiol.* 152:422-9
- Dragnet KI, Skjåk-Braek G, Smidsrød O (1997) Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol.* 21:47-55

- Driesang IM, Hunziker EB (2000) Delamination rates of tissue flaps used in articular cartilage repair. *J Orthop Res.* 18:909-11
- Edelman ER, Mathiowitz E, Langer R, Klagsbrun M (1991) Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 12:619-26
- Edmondson SR, Russo VC, McFarlane AC, Wraight CJ, Werther GA (1999) Interactions between growth hormone, insulin-like growth factor I, and basic fibroblast growth factor in melanocyte growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:1638-44
- el Oakley RM, Brand NJ, Burton PB, Cullen MC, Adams GB, Poznansky MC, Barton PJ, Yacoub MH (1998) Efficiency of a high-titer retroviral vector for gene transfer into skeletal myoblasts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 115:1-8
- Eming SA, Snow RG, Yarmush ML, Morgan JR (1996) Targeted expression of insulin-like growth factor to human keratinocytes: modification of the autocrine control of keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol.* 107:113-20
- Endesfelder S, Bucher S, Kliche A, Reszka R, Speer A (2003) Transfection of normal primary human skeletal myoblasts with p21 and p57 antisense oligonucleotides to improve their proliferation: a first step towards an alternative molecular therapy approach of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Med.* 81:355-62
- Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, Shuler FD, Mi Z, Robbins PD (2000) Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 379:214-9
- Ewton DZ, Kansra S, Lim S, Friedman E (2002) Insulin-like growth factor-I has a biphasic effect on colon carcinoma cells through transient inactivation of forkhead1, initially mitogenic, then mediating growth arrest and differentiation. *Int J Cancer.* 98:665-73
- Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ (1986) Improved quantification of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta.* 883:173-7
- Fasbender A, Lee JH, Walters RW, Moninger TO, Zabner J, Welsh MJ (1998) Incorporation of adenovirus in calcium phosphate precipitates enhances gene transfer to airway epithelia in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 102:184-93
- Felgner PL (1990) Particulate systems and polymers for in vitro and in vivo delivery of polynucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.* 5:163-87
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:7413-7
- Fogh J (ed) (1975) Human tumor cells in vitro. Plenum Press, New York, pp 115-59
- Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ (2002) Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br.* 84:276-88
- Fortier LA, Deak MM, Semevolos SA, Cerione RA (2004) Insulin-like growth factor-I diminishes the activation status and expression of the small GTPase Cdc42 in articular chondrocytes. *J Orthop Res.* 22:436-45
- Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, Vittur F (2000) Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 21:795-801
- Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R (1994) Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 28:891-9
- Frenz DA, Liu W, Williams JD, Hatcher V, Galinovic-Schwartz V, Flanders KC, Van de Water TR (1994) Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Development* 120:415-24

- Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K (2006) Cartilage repair in the knee joint. *Unfallchirurg* 109:563-74
- Fujimoto E, Ochi M, Kato Y, Mochizuki Y, Sumen Y, Ikuta Y (1999) Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage. *Arch Orthop Trauma Surg*. 119:139-45
- Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW (2003) Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cart*. 11:55-64
- Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ (1980) Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am*. 62:79-89
- Gao X, Kim KS, Liu D (2007) Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J*. 9:92-104
- Gebhart CL, Kabanov AV (2001) Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release*. 73:401-16
- Gelse K, Jiang QJ, Aigner T, Ritter T, Wagner K, Poschl E, von der Mark K, Schneider H (2001) Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum*. 44:1943-53
- Gelse K, von der Mark K, Aigner T, Park J, Schneider H (2003) Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum*. 48:430-41
- Gelse K, Schneider H (2006) Ex vivo gene therapy approaches to cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev*. 58:259-84
- Gelse K, Mühle C, Franke O, Park J, Jehle M, Durst K, Göken M, Hennig F, von der Mark K, Schneider H (2008) Cell-based resurfacing of large cartilage defects: long-term evaluation of grafts from autologous transgene-activated periosteal cells in a porcine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 58:475-88
- Goater J, Muller R, Kollias G, Firestein GS, Sanz I, O'Keefe RJ, Schwarz EM (2000) Empirical advantages of adeno-associated viral vectors in vivo gene therapy for arthritis. *J Rheumatol*. 27:983-9
- Goldberg A (2001) Effects of growth factors on articular cartilage. *Ortop Traumatol Rehabil*. 3:209-12
- Golding MB, Fukuo K, Birkhead JR, Dudek R, Sandell LJ (1994) Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem*. 54:85-99
- Goodbey W, Wu K, Hirasaki G, Mikos A (1999) Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene Ther*. 6:1380-8
- Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ (2007) Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br*. 89:672-85
- Goomer RS, Deftos LJ, Terkeltaub R, Maris T, Lee MC, Harwood FL, Amiel D (2001) High-efficiency non-viral transfection of primary chondrocytes and perichondrial cells for ex-vivo gene therapy to repair articular cartilage defects. *Osteoarthr Cartilage*. 9:248-56
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 36:59-72
- Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M (1989) The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res*. 7:208-18
- Gratz KR, Wong VW, Chen AC, Fortier LA, Nixon AJ, Sah RL (2006) Biomechanical assessment of tissue retrieved after in vivo cartilage defect repair: tensile modulus of repair tissue and integration with host cartilage. *J Biomech*. 39:138-46

- Green GD, Reagan K (1992) Determination of hydroxyproline by high pressure liquid chromatography. *Anal Biochem.* 201:265-9
- Griffiths T, Russell M, Froning K, Brown BD, Scanlon SM, Almazan M, Marcil R, Hoeffler JP (1997) The PerFect lipid optimizer kit for maximizing lipid-mediated transfection of eukaryotic cells. *Biotechniques* 22:982-7
- Guo X, Zheng Q, Yang S, Shao Z, Yuan Q, Pan Z, Tang S, Liu K, Quan D (2006) Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene. *Biomed Mater.* 1:206-15
- Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Goldberg VM, Yoo JU, Johnstone B (2001) BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem* 81:284-94
- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M (1998) Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics* 21:751-6
- Hardingham TE, Fosang AJ (1992) Proteoglycans: many forms and functions. *FASEB J.* 6:861-70
- Hellgren I, Drvota V, Pieper R, Enoksson S, Blomberg P, Islam KB, Sylvén C (2000) Highly efficient cell-mediated gene transfer using non-viral vectors and FuGene6: in vitro and in vivo studies. *Cell Mol Life Sci.* 57:1326-33
- Hernandez-Sanchez C, Werner H, Roberts CT Jr, Woo EJ, Hum DW, Rosenthal SM, LeRoith D (1997) Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene expression by IGF-I and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem.* 272:4663-70
- Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ (2003) Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res.* 21:573-83
- Hiraide A, Yokoo N, Xin KQ, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Saito T (2005) Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther.* 16:1413-21
- Hirao K, Sugita T, Kubo T, Igarashi K, Tanimoto K, Muratami T, Yasunaga Y, Ochi M (2003) Targeted gene delivery to human osteosarcoma cells with magnetic cationic liposomes under a magnetic field. *Int J Oncol.* 22:1065-71
- Hirschmann F, Verhoeven E, Wirth D, Bauwens S, Hauser H, Rudert M (2002) Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein. *Osteoarthritis Cartilage.* 10:109-18
- Hotten GC, Matsumoto T, Kimura M, Bechtold RF, Kron R, Ohara T, Tanaka H, Satoh Y, Okazaki M, Shirai T, Pan H, Kawai S, Pohl JS, Kudo A (1996) Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors* 13:65-74
- Hu YF, Wu YJ (2001) Effect of recombinant human basic fibroblast growth factor on acute inflammation in mice and rats. *Acta Pharmacol Sin.* 22:375-9
- Hudde T, Rayner SA, Comer RM, Weber M, Isaacs JD, Waldmann H, Larkin DF, George AJ (1999) Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium. *Gene Ther.* 6:939-43
- Hunter CJ, Levenston ME (2004) Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model. *Tissue Eng.* 10:736-46
- Hunziker EB, Rosenberg LC (1996) Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am.* 78:721-33
- Hunziker EB (1999) Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Relat Res.* 367:135-46

- Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 10:432-63
- Huser CA, Davies ME (2006) Validation of an in vitro single-impact load model of the initiation of osteoarthritis-like changes in articular cartilage. *J Orthop Res*. 24:725-32
- Ikeda T, Kubo T, Nakanishi T, Arai Y, Kobayashi K, Mazda O, Ohashi S, Takahashi K, Imanishi J, Takigawa M, Hirasawa Y (2000) Ex vivo gene delivery using an adenovirus vector in treatment for cartilage defects. *J Rheumatol*. 27:990-6
- Imhoff AB, Ottl GM, Burkart A, Traub S (1999) Autologous osteochondral transplantation on various joints. *Orthopäde* 28:33-44
- Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T (1999) Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn*. 214:279-90
- Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM (2001) Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am*. 83-A:53-64
- Jacobsen L, Calvin SA, Colvin KE, Wright M (2004) FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* 33:104-12
- Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*. 4:549-53
- Jenniskens YM, Koevoet W, de Bart AC, Weinans H, Jahr H, Verhaar JA, Degroot J, van Osch GJ (2006) Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGFbeta2 and FGF-2. *Osteoarthritis Cartilage*. 14:1136-46
- Jentsch KD, Wellmitz G, Heder G, Petzold E, Buntrock P, Oehme P (1980) A bovine brain fraction with fibroblast growth factor activity inducing articular cartilage regeneration in vivo. *Acta Biol Med Ger*. 39:967-71
- Jeschke MG, Herndon DN, Baer W, Barrow RE, Jauch KW (2001) Possibilities of non-viral gene transfer to improve cutaneous wound healing. *Curr Gene Ther*. 1:267-78
- Jia SF, Worth LL, Densmore CL, Xu B, Zhou Z, Kleinerman ES (2002) Eradication of osteosarcoma lung metastases following intranasal interleukin-12 gene therapy using a nonviral polyethylenimine vector. *Cancer Gene Ther*. 9:260-6
- Jin DM, Chen LL, Yan J (2006) Effects of IGF-I and BMP-2 combined application on promoting proliferation, differentiation and calcification of MC 3T3-E1 and NIH 3T3 cells. *Zhejiang Da Xue Bao Yi Xue Ban*. 35:55-63
- Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2:54-69
- Jones DG, Peterson L (2006) Autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Am*. 88:2502-20
- Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990) Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol*. 110:2195-207
- Kang R, Marui T, Ghivizzani SC, Nita IM, Georgescu HI, Suh JK, Robbins PD, Evans CH (1997) Ex vivo gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular cartilage defects: a feasibility study. *Osteoarthritis Cartilage*. 5:139-43
- Kaplan BA, Gorman CR, Gupta AK, Taylor SR, Iezzoni JC, Park SS (2003) Effects of transforming growth factor Beta and insulinlike growth factor 1 on the biomechanical and histologic properties of tissue-engineered cartilage. *Arch Facial Plast Surg*. 5:96-101

- Kato Y (1992) Roles of fibroblast growth factor and transforming growth factor- β families in cartilage formation. In: Adolphe M (ed) *Biological Regulation of the Chondrocytes*. CRC Press, Boca Raton, pp 141-60
- Kaul G, Cucchiari M, Arntzen D, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Madry H (2006) Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med*. 8:100-11
- Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, Maeda A, Caplan AI, Shino K, Ochi T (1998) Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand*. 69:56-62
- Kawashima H, Ogoe A, Yoshizawa T, Kuwano R, Hotta Y, Hotta T, Hatano H, Kawashima H, Endo N (2003) Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in musculoskeletal tumors and mesenchymal tissues: efficacy of adenoviral gene therapy for osteosarcoma. *Cancer Sci*. 4:70-5
- Ketola A, Maatta AM, Pasanen T, Tulimaki K, Wahlfors J (2004) Osteosarcoma and chondrosarcoma as targets for virus vectors and herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy. *Int J Mol Med*. 13:705-10
- Kiefer K, Clement J, Garidel P, Peschka-Süss R (2004) Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells. *Pharm Res*. 21:1009-17
- Kim HT, Zaffagnini S, Mizuno S, Abelow S, Safran MR (2006) A peek into the possible future of management of articular cartilage injuries: gene therapy and scaffolds for cartilage repair. *J Orthop Sports Phys Ther*. 36:765-73
- Klein-Nulend J, Louwse RT, Heyligers IC, Wuisman PI, Semeins CM, Goei SW, Burger EH (1998) Osteogenic protein (OP-1, BMP-7) stimulates cartilage differentiation of human and goat perichondrium tissue in vitro. *J Biomed Mater Res*. 40:614-20
- Kobayashi N, Koshino T, Uesugi M, Yokoo N, Xin KQ, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Saito T (2002) Gene marking in adeno-associated virus vector infected periosteum derived cells for cartilage repair. *J Rheumatol*. 29:2176-80
- Koch S, Schwinger C, Kressler J, Heinzen Ch, Rainov NG (2003) Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells: comparison of production devices, methods and microcapsule characteristics. *J Microencapsul*. 20:303-16
- Kofler P, Wiesenhofer B, Rehl C, Baier G, Stockhammer G, Humpel C (1998) Liposome-mediated gene transfer into established CNS cell lines, primary glial cells, and in vivo. *Cell Transplant*. 7:175-85
- Konopka K, Fallah B, Monzon-Duller J, Overlid N, Düzgünes N (2005) Serum-resistant gene transfer to oral cancer cells by Metafectene and GeneJammer: application to HSV-tk/ganciclovir-mediated cytotoxicity. *Cell Mol Biol Lett*. 10:455-70
- Kukowska-Latallo JF, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomalia DA, Baker JR Jr. (1996) Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:4897-902
- Lan J, Wang Z, Wang Y, Wang J, Cheng X (2006) The effect of combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor or insulin-like growth factor-I on dental implant osseointegration by confocal laser scanning microscopy. *J Periodontol*. 77:357-63
- Layne MD, Farmer SR (1999) Tumor necrosis factor-alpha and basic fibroblast growth factor differentially inhibit the insulin-like growth factor-I induced expression of myogenin in C2C12 myoblasts. *Exp Cell Res*. 249:177-87
- Lazo AP, Yunta M (2000) Gene therapy using viral vectors: Strategy and design issues. In: Cid-Arregui A, García-Carrancá A (eds) *Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy*. Eaton Publishing, Natick, pp 597-607

- Ledley FD (1994) Non-viral gene therapy. *Curr Op Biotechnol.* 5:626-36
- Lee KH, Song SU, Hwang TS, Yi Y, Oh IS, Lee JY, Choi KB, Choi MS, Kim SJ (2001) Regeneration of hyaline cartilage by cell-mediated gene therapy using transforming growth factor beta 1-producing fibroblasts. *Hum Gene Ther.* 12:1805-13
- Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M (1998) Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic response to interleukin-beta. *J Cell Physiol.* 176:303-13
- Letson AK, Dahner LE (1994) The effect of combinations of growth factors on ligament healing. *Clin Orhtop Relat Res.* 308:207-12
- Li LB, Feng R, Zhou SY (2005) Transfection of human 293 and CD34+ cells with recombinant green fluorescent protein adeno-associated virus. *Di Yi Jun Yi Da Xue Bao* 25:26-9 (Abstract)
- Lim F, Sun AM (1980) Microencapsulated islets as an artificial endocrine pancreas. *Science* 210:908-10
- Lim F, Moss RD (1981) Microencapsulation of living cells and tissues. *J Pharm Sci.* 70:351-4
- Lim SH, Liao IC, Leong KW (2006) Nonviral gene delivery from nonwoven fibrous scaffolds fabricated by interfacial complexation of polyelectrolytes. *Mol Ther.* 13:1163-72
- Lindl T, Bauer J (1993) *Zell- und Gewebekultur.* 3rd ed. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- Liu F, Song Y, Liu D (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 6:1258-66
- Li Z, Düllmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kühlcke K, Eckert HG, Fehse B, Baum C (2002) Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296:497
- Loeser RF, Todd MD, Seely BL (2003) Prolonged treatment of human osteoarthritic chondrocytes with insulin-like growth factor-I stimulates proteoglycan synthesis but not proteoglycan matrix accumulation in alginate cultures. *J Rheumatol.* 30:1565-70
- Loeser RF, Chubinskaya S, Pacione C, Im HJ (2005) Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 52:3910-7
- Loot MA, Kenter SB, Au FL, van Galen WJ, Middelkoop E, Bos JD, Mekkes JR (2002) Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol.* 81:153-60
- Lo YY, Cruz TF (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem.* 270:11727-30
- Luo D, Saltzman M (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol.* 18:33-7
- Mackie EJ, Thesleff I, Chiquet-Ehrismann R (1987) Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol.* 105:2569-79
- Madry H, Trippel B (2000) Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther.* 7:286-91
- Madry H, Zurakowski D, Trippel SB (2001) Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther* 8:1443-9
- Madry H, Padera R, Seidel J, Langer R, Freed LE, Trippel SB, Vunjak-Novakovic G (2002) Gene transfer of a human insulin-like growth factor I cDNA enhances tissue engineering of cartilage. *Hum Gene Ther.* 13:1621-30

- Madry H, Cucchiari M, Stein U, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB (2003) Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system. *J Gene Med.* 5:502-9.
- Madry H, Cucchiari M, Terwilliger EF, Trippel SB (2003) Efficient and persistent gene transfer into articular cartilage using recombinant adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther.* 14:393-402
- Madry H (2004) Operative und rekonstruktive Behandlung. In: Wirth CJ, Zichner L, Kohn D (eds) Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. Knie. Thieme, Stuttgart, pp 367-79
- Madry H, Emkey G, Zurakowski D, Trippel SB (2004) Overexpression of human fibroblast growth factor 2 stimulates cell proliferation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *J Gene Med* 6:238-45
- Madry H, Kaul G, Cucchiari M, Stein U, Zurakowski D, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB (2005) Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther.* 12:1171-9
- Madry H, Weimer A, Kohn D, Cucchiari M (2007) Tissue engineering for articular cartilage repair improved by gene transfer. *Current concepts. Orthopäde* 36:236-47
- Madry H, Pape D (2008) Autologous chondrocyte transplantation. *Orthopäde* 36:756-63
- Maki M, Athanasou N (2004) Osteofibrous dysplasia and adamantinoma: correlation of proto-oncogene product and matrix protein expression. *Hum Pathol.* 35:69-74
- Malone RW, Felgner PL, Verma IM (1989) Lipofectin mediated RNS transfection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:6077-81
- Manabe N, Oda H, Nakamura K, Kuga Y, Uchida S, Kawaguchi H (1999) Involvement of fibroblast growth factor-2 in joint destruction of rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 38:714-20
- Mankin HJ (1982) The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am.* 64:460-6
- Mann MJ, Gibbons GH, Hutchinson H, Poston RS, Hoyt EG, Robbins RC, Dzau VJ (1999) Pressure mediated oligonucleotide transfection of rat and human cardiovascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:6411-16
- Marcellus RC, Teodoro JG, Charbonneau R, Shore GC, Branton PE (1996) Expression of p53 in Saos-2 osteosarcoma cells induces apoptosis which can be inhibited by Bcl-2 or the adenovirus E1B-55 kDa protein. *Cell Growth Differ.* 7:1643-50
- Marit G, Cao Y, Froussard P, Ripoche J, Dupouy M, Elandaloussie A, Lacombe F, Mahon FX, Keller H, Pla M, Reiffers J, Theze J (2000) Increased liposome-mediated gene transfer into haematopoietic cells grown in adhesion to stromal or fibroblast cell line monolayers. *Eur J Haematol.* 64:22-31
- Martin JA, Buckwalter JA (2003) The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A:106-10
- Mason JM, Grande DA, Barcia M, Grant R, Pergolizzi RG, Breitbart AS (1998) Expression of human bone morphogenic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Ther.* 5:1098-104
- Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA (2000) Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res.* 379:171-8
- Massicotte F, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Lajeunesse D (2006) Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone* 38:333-41
- Matsumoto T, Gargosky SE, Iwasaki K, Rosenfeld RG (1996) Identification and characterization of insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP proteases in human synovial fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:150-5

- Maysinger D, Piccardo P, Filipovic-Grcic J, Cuello AC (1993) Microencapsulation of genetically engineered fibroblasts secreting nerve growth factor. *Neurochem Int.* 23:123-9
- Mierisch CM, Anderson PC, Balian G, Diduch DR (2002) Treatment with insulin-like growth factor-1 increases chondrogenesis by periosteum in vitro. *Connect Tissue Res.* 43:559-68
- Mierisch CM, Cohen SB, Jordan LC, Robertson PG, Balian G, Diduch DR (2002) Transforming growth factor-beta in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit. *Arthroscopy* 18:892-900
- Mierisch CM, Wilson HA, Turner MA, Milbrandt TA, Berthoux L, Hammarskjöld ML, Rekosh D, Balian G, Diduch DR (2003) Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A:1757-67
- Mizuta H, Kudo S, Nakamura E, Otsuka Y, Takagi K, Hiraki Y (2004) Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 12:586-96
- Molloy T, Wang Y, Murrell G (2003) The role of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 33:381-94
- Mortimer I, Tam P, MacLachlan I, Graham RW, Saravolac EG, Joshi PB (1999) Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther* 6:403-11
- Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrughe B (2000) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:1113-8
- Nabel EG, Yang Z, Liptay S, San H, Gordon D, Haudenschild CC, Nabel GJ (1993) Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo. *J Clin Invest.* 91:1822-9
- Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC, Maciag T, Nabel GJ (1993) Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 362:844-6
- Nakajima H, Goto T, Horikawa O, Kikuchi T, Shinmei M (1998) Characterization of the cells in the repair tissue of full-thickness articular cartilage defects. *Histochem Cell Biol.* 109:331-8
- Neidel J, Schulze M, Sova L (1994) Insulin-like growth factor I accelerates recovery of articular cartilage proteoglycan synthesis in culture after inhibition by interleukin 1. *Arch Orthop Trauma Surg.* 114:43-8
- Neidel J, Schulze M (2000) Value of synovial analysis for prognosis of matrix synthesis of transplanted chondrocytes. *Orthopäde* 29:158-63
- Neuhuber B, Huang DI, Daniels MP, Torgan CE (2002) High efficiency transfection of primary skeletal muscle cells with lipid-based reagents. *Muscle Nerve.* 26:136-40
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1:841-5
- Nguyen TH, Murakami A, Fujiki K, Kanai A (2002) Transferrin-polyethylenimine conjugate, FuGENE6 and TransIT-LT as nonviral vectors for gene transfer to the corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol.* 46:140-6
- Nixon AJ, Fortier LA, Williams J, Mohammed H (1999) Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res.* 17:475-87
- Nixon AJ, Goodrich LR, Scimeca MS, Witte TH, Schnabel LV, Watts AE, Robbins PD (2007) Gene therapy in musculoskeletal repair. *Ann N Y Acad Sci.* 1117:310-27

- Noyes FR, Stabler CL (1989) A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med.* 17:505-13
- Oberholzer A, Stahel P, Tschöke SK, Ertel W (2006) Role of gene therapy in trauma and orthopedic surgery. *Unfallchirurg* 109:521-7
- O'Driscoll SW, Salter RB (1984) The induction of neochondrogenesis in free intra-articular periosteal autografts under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 66:1248-57
- O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB (1986) The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 68:1017-35
- O'Driscoll SW (1998) The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 80:1795-812
- Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J (2002) Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 84:571-8
- Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL (2003) Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. *Eur J Pharm Sci.* 18:23-30
- Orth P, Weimer A, Kaul G, Kohn D, Cucchiariini M, Madry H (2008) Analysis of novel nonviral gene transfer systems for gene delivery to cells of the musculoskeletal system. *Mol Biotechnol.* 38:137-44
- Otsuka Y, Mizuta H, Takagi K, Iyama K, Yoshitake Y, Nishikawa K, Suzuki F, Hiraki Y (1997) Requirement of fibroblast growth factor signaling for regeneration of epiphyseal morphology in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Dev Growth Differ.* 39:143-56
- Ourlin JC, Vilarem MJ, Daujat M, Harricane MC, Domergue J, Joyeux H, Baulieux J, Maurel P (1997) Lipid-mediated transfection of normal adult human hepatocytes in primary culture. *Anal Biochem.* 247:34-44
- Outerbridge, RE (1961) The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br.* 43-B:752-7
- Paek HJ, Campaner AB, Kim JL, Golden L, Aaron RK, Ciombor DM, Morgan JR, Lysaght MJ (2006) Microencapsulated cells genetically modified to overexpress human transforming growth factor-beta1: viability and functionality in allogeneic and xenogeneic implant models. *Tissue Eng.* 12:1733-9
- Palmer G, Manen D, Bonjour JP, Caverzasio J (2001) Species-specific mechanisms control the activity of the Pit1/PIT1 phosphate transporter gene promoter in mouse and human. *Gene* 279:49-62
- Pampinella F, Lechardeur D, Zanetti E, MacLachlan I, Benharouga M, Lukacs GL, Vitiello L (2002) Analysis of differential lipofection efficiency in primary and established myoblasts. *Mol Ther.* 5:161-9
- Park MR, Han KO, Han IK, Cho MH, Nah JW, Choi YJ, Cho CS (2005) Degradable polyethylenimine-alt-poly(ethylene glycol) copolymers as novel gene carriers. *J Control Release.* 105:367-80
- Pascher A, Palmer GD, Steinert A, Oligino T, Gouze E, Gouze JN, Betz O, Spector M, Robbins PD, Evans CH, Ghivizzani SC (2004) Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther.* 11:133-41
- Peirone M, Ross CJ, Hortelano G, Brash JL, Chang PL (1998) Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. *J Biomed Mater Res.* 42:587-96
- Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, McCollum R, Martel-Pelletier J (1993) Cytokines and inflammation in cartilage degeneration. *Rheum Dis Clin North Am.* 19:545-68
- Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K (2000) The influence of transforming growth factor beta1 on mesenchymal cell repair of full-thickness cartilage defects. *J Biomed Mater Res.* 52:543-52

- Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A (1992) A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat (Basel)*. 143:335-40
- Pirkanen A, Kiefer JC, Hauschka SD (2000) IGFs, insulin, Shh, bFGF, and TGF-beta1 interact synergistically to promote somite myogenesis in vitro. *Dev Biol*. 224:189-203
- Pridie KH (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *Proceedings of the British Orthopaedic Association. J Bone Joint Surg Br*. 41:618
- Qu Z, Huang XN, Ahmadi P, Andresevic J, Planck SR, Hart CE, Rosenbaum JT (1995) Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Lab Invest*. 73:339-46
- Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Brauer R (1998) Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 6:50-65
- Ravi Kumar M, Hellermann G, Lockey RF, Mohapatra SS (2004) Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art. *Expert Opin Biol Ther*. 4:1213-24
- Read TA, Stensvaag V, Vindenes H, Ulvestad E, Bjerkvig R, Thorsen F (1999) Cells encapsulated in alginate: a potential system for delivery of recombinant proteins to malignant brain tumours. *Int J Dev Neurosci*. 17:653-63
- Reape TJ, Kanczler JM, Ward JP, Thomas CR (1996) IGF-I increases bFGF-induced mitogenesis and upregulates FGFR-1 in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 270:1141-8
- Rogachefsky RA, Dean DD, Howell DS, Altman RD (1993) Treatment of canine osteoarthritis with insulin-like growth factor-1 (IGF- 1) and sodium pentosan polysulfate. *Osteoarthritis Cartilage*. 1:105-14
- Rokstad AM, Kulseng B, Strand BL, Skjak-Braek G, Espevik T (2001) Transplantation of alginate microcapsules with proliferating cells in mice: capsular overgrowth and survival of encapsulated cells of mice and human origin. *Ann N Y Acad Sci*. 944:216-25
- Romagnolo D, Akers RM, Wong EA, Boyle PL, McFadden TB, Turner JD (1992) Overexpression of ovine insulin-like growth factor-I stimulates autonomous autocrine or paracrine growth in bovine mammary-derived epithelial cells. *Mol Endocrinol*. 6:1774-80
- Russo VC, Andaloro E, Fornaro SA, Najdovska S, Newgreen DF, Bach LA, Werther GA (2004) Fibroblast growth factor-2 over-rides insulin-like growth factor-I induced proliferation and cell survival in human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol*. 199:371-80
- Sah RL, Chen AC, Grodzinsky AJ, Trippel SB (1994) Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*. 308:137-47
- Salentey V, Claus S, Bougault C, Paumier A, Aubert-Foucher E, Perrier-Groult E, Ronzière MC, Freyria AM, Galéra P, Beauchef G, Duterque-Coquillaud M, Piperno M, Damour O, Herbage B, Mallein-Gerin F (2008) Human chondrocyte responsiveness to bone morphogenetic protein-2 after their in vitro dedifferentiation: Potential use of bone morphogenetic protein-2 for cartilage cell therapy. *Pathol Biol (Paris)*. Epub ahead of print
- Sambanis A (2003) Encapsulated islets in diabetes treatment. *Diabetes Technol Ther*. 5:665-8
- Sato J, Segami N, Kaneyama K, Konishi H, Yoshitake Y, Nishikawa K (2003) Levels of fibroblast growth factor 2 in synovial fluids in human patients with internal derangement of the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 96:673-9
- Schaefer D, Martin I, Jundt G, Seidel J, Heberer M, Grodzinsky A, Bergin I, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (2002) Tissue-engineered composites for the repair of large osteochondral defects. *Arthritis Rheum*. 46:2524-34

- Schakman O, Gilson H, de Coninck V, Lause P, Verniers J, Havaux X, Ketelslegers JM, Thissen JP (2005) Insulinlike growth factor-I gene transfer by electroporation prevents skeletal muscle atrophy in glucocorticoid-treated rats. *Endocrinology* 146:1789-97
- Schnettler R, Horas U, Meyer C (2008) Autologous osteochondral transplants. *Orthopäde* 37:734-42
- Schofield JN, Wolpert L (1990) Effect of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. *Exp Cell Res.* 191:144-8
- Schwendener RA (2007) Liposomes in biology and medicine. *Adv Exp Med Biol.* 620:117-28
- Sellers RS, Peluso D, Morris EA (1997) The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 79:1452-63
- Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, Beckwith K, Morris EA (2000) Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am.* 82:151-60
- Shakibaei M, De Souza P (1997) Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int.* 21 (2):75-86
- Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M (1998) Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated activation of mitogen-activated protein-kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem.* 273:27467-73
- Shao L, Kasanov J, Hornicek FJ, Morii T, Fondren G, Weissbach L (2003) Ecteinascidin-743 drug resistance in sarcoma cells: transcriptional and cellular alterations. *Biochem Pharmacol.* 66:2381-95
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ (1993) Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 75:532-53
- Shida J, Jingushi S, Izumi T, Iwaki A, Sugioka Y (1996) Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats in vivo. *J Orthop Res.* 14:265-72
- Smidsrod O, Skjak-Braek G (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 8:71-8
- Sohier J, Hamann D, Koenders M, Cucchiari M, Madry H, van Blitterswijk C, de Groot K, Bezemer JM (2007) Tailored release of TGF-beta1 from porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *Int J Pharm.* 332:80-9
- Song M, Chen SZ (2003) Construction of the eukaryotic expression vector of mouse beta-NGF and its expression in NIH 3T3 fibroblast cell lines. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 19:124-6 (Abstract)
- Song M, Chen SZ, Han H, Xiong Y (2005) An experimental study on repair of peripheral nerve injury by transplantation of microcapsulated NGF-expressing NIH 3T3 cells. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 21:53-7 (Abstract)
- Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T, Murphy M, Moloney MK, Schmehl M, Harris M et al. (1994) Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 343:950-1
- Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, Evans CH (1991) Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol.* 147:3915-20
- Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999) The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopäde* 28:26-32
- Steinert AF, Palmer GD, Pilapil C, Ulrich N, Evans CH, Ghivizzani SC (2008) Enhanced In Vitro Chondrogenesis of Primary Mesenchymal Stem Cells by Combined Gene Transfer. *Tissue Eng Part A.* Epub ahead of print

- Stöve J, Fiedler J, Huch K, Günther KP, Puhl W, Brenner R (2002) Lipofection of rabbit chondrocytes and long lasting expression of a lacZ reporter system in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage*. 10:212-7
- Strauss EJ, Goodrich LR, Chen CT, Hidaka C, Nixon AJ (2005) Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular cartilage after chondral defect repair in an equine model. *Am J Sports Med*. 33:1647-53
- Sumarsono SH, Wilson TJ, Tymms MJ, Venter DJ, Corrick CM, Kola R, Lahoud MH, Papas TS, Seth A, Kola I (1996) Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 transgenic mice. *Nature* 379:534-7
- Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K (2005) Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant*. 14:683-93
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 4:346-58
- Thorsen F, Read TA, Lund-Johansen M, Tysnes BB, Bjerkvig R (2000) Alginate-encapsulated producer cells: a potential new approach for the treatment of malignant brain tumors. *Cell Transplant*. 9:773-83
- Tinsley RB, Faijerson J, Eriksson PS (2006) Efficient non-viral transfection of adult neural stem/progenitor cells, without affecting viability, proliferation or differentiation. *J Gene Med*. 8:72-81
- Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM (1996) Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med*. 2:545-50
- Trippel SB, Van Wyk JJ, Foster MB, Svoboda ME (1983) Characterization of a specific somatomedin-c receptor on isolated bovine growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 112:2128-36
- Trippel SB, Corvol MT, Dumontier MF, Rappaport R, Hung HH, Mankin HJ (1989) Effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and growth hormone on cultured growth plate and articular chondrocytes. *Pediatr Res*. 25:76-82
- Trippel SB (1995) Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl*. 43:129-32
- Trippel SB (1997) Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect*. 46:473-6
- Trippel S, Cucchiari M, Madry H, Shi S, Wang C (2007) Gene therapy for articular cartilage repair. *Proc Inst Mech Eng*. 221:451-9
- Trivedi RA, Dickson G (1995) Liposome-mediated gene transfer into normal and dystrophin-deficient mouse myoblasts. *J Neurochem*. 64:2230-8
- Tuncel M, Halici M, Canoz O, Yildirim Turk C, Oner M, Ozturk F, Kabak S (2005) Role of insulin like growth factor-I in repair response in immature cartilage. *Knee* 12:113-9
- Uchida E, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Hayakawa T (2002) Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. *Biol Pharm Bull*. 25:891-7
- Ueblacker P, Wagner B, Kruger A, Vogt S, DeSantis G, Kennerknecht E, Brill T, Hillemanns M, Salzmann GM, Imhoff AB, Plank C, Gansbacher B, Martinek V (2004) Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects. *Osteoarthritis Cartilage*. 12:711-9
- Ulrich-Vinther M, Duch MR, Soballe K, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Pedersen FS (2004) In vivo gene delivery to articular chondrocytes mediated by an adenoassociated virus vector. *J Orthop Res*. 22:726-34
- Uteza Y, Rouillot JS, Kobetz A, Marchant D, Pecqueur S, Arnaud E, Prats H, Honiger J, Dufier JL, Abitbol M, Neuner-Jehle M (1999) Intravitreal transplantation of encapsulated fibroblasts secreting the human fibroblast growth factor 2 delays photoreceptor cell degeneration in Royal College of Surgeons rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:3126-31

- Uzvolgyi E, Classon M, Henriksson M, Huang H, JS, Szekely L, Lee W-H, Klein G, Sumegi J (1991) Reintroduction of a normal retinoblastoma gene into retinoblastoma and osteosarcoma cells inhibits the replication associated function of SV40 large T antigen. *Cell Growth Differ.* 2:297-303
- Vaheri A, Pagano JS (1965) Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* 277:434-6
- van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB (1998) Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage.* 6:306-17
- Vandenberghe LH, Wilson JM (2007) AAV as an immunogen. *Curr Gene Ther.* 7:325-33
- van Susante JL, Buma P, van Osch GJ, Versleyen D, van der Kraan PM, van der Berg WB, Homminga GN (1995) Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand.* 66:549-56
- van Susante JL, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP (1999) Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 20:1167-75
- Veilleux N, Spector M (2005) Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 13:278-86
- Visted T, Bjerkvig R, Enger PO (2001) Cell encapsulation technology as a therapeutic strategy for CNS malignancies. *Neuro Oncol.* 3:201-10
- Vitiello L, Bockhold K, Joshi PB, Worton RG (1998) Transfection of cultured myoblasts in high serum concentration with DODAC:DOPE liposomes. *Gene Ther.* 5:1306-10
- von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P (1977) Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267:531-2
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273:613-22
- Wagner E, Oris M, Zauner W (1998) Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 30:97-113
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 76:579-592
- Watanabe S, Kim KN, Imagawa T, Thornton S, Grom A, Hirsch R (2000) On the mechanism of protection of distal joints after local gene transfer in collagen-induced arthritis. *Hum Gene Ther.* 11:751-8
- Weiskirchen R, Kneifel J, Weiskirchen S, van de Leur E, Kunz D, Gressner AM (2000) Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts. *BMC Cell Biol.* 1:4. Epub 2000 Dec 19
- Welter JF, Solchaga LA, Stewart MC (2004) High-efficiency nonviral transfection of primary chondrocytes. *Methods Mol Med.* 100:129-46
- Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, Hattori T, Nakaya H, Saito M, Yonenobu K (2004) Fibroblast growth factor-2 promotes the repair of partial thickness defects of articular cartilage in immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage.* 12:636-41
- Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:9568-72
- Yayon A, Klagsbrun M (1990) Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev.* 9:191-202
- Yei S, Mittereder N, Tank K, O'Sullivan C, Trapnell BC (1994) Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated in vivo vector administration to the lung. *Gene Ther.* 1:192-200

Yokoo N, Saito T, Uesugi M, Kobayashi N, Xin KQ, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Koshino T (2005) Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum.* 52:164-70

You JO, Park SB, Park HY, Haam S, Chung CH, Kim WS (2001) Preparation of regular sized Ca-alginate microspheres using membrane emulsification method. *J Microencapsul.* 18:521-32

Zhao GQ, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B (1994) The gene for the homeodomain-containing protein Cart-1 is expressed in cells that have a chondrogenic potential during embryonic development. *Mech Dev.* 48:245-54

Zheng JL, Helbig C, Gao WQ (1997) Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *J Neurosci.* 17:216-26

Zhou X, Huang L (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.* 1189:195-203

9. Publikationen

Publikationen:

1. **Orth P**, Weimer A, Kaul G, Kohn D, Cucchiarini M, Madry H (2008) Analysis of Nonviral Gene Transfer Systems for Gene Delivery to Cells of the Musculoskeletal System. *Molecular Biotechnology* 38:137-44
2. Madry H, Cucchiarini M, **Orth P**, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Kaul G (2008) Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* (zur Publikation akzeptiert)

Preisverleihung:

Forschungspreis AGA DONJOY Award 2008 für die Arbeit:

Madry H, Cucchiarini M, **Orth P**, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Kaul G.
Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo.

Deutschsprachige Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie (Interlaken, Schweiz), 25. Kongress, 09/2008

Vorträge:

1. **Orth P**, Kaul G, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Cucchiarini M, Madry H. Kombinierte Überexpression von humanem IGF-I und FGF-2 durch transplantierte Chondrozyten stimuliert die Knorpelreparatur in vivo. *Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie* (Berlin), 92. Tagung, 10/2007
2. Madry H, Kaul G, **Orth P**, Zurakowski D, Kohn D, Cucchiarini M. Kombiniertes Gentransfer von IGF-I und FGF-2 verbessert die Chondrogenese und Reparatur von osteochondralen Defekten in vivo. *Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie* (Berlin), 92. Tagung, 10/2006
3. **Orth P**, Kaul G, Kohn D, Cucchiarini M, Madry H. Novel nonviral gene transfer systems allow for an efficient gene delivery into cells of musculoskeletal origin. *European Orthopaedic Research Society* (Bologna, Italien), 16th Annual Meeting, 09/2006
4. Madry H, Kaul G, **Orth P**, Zurakowski D, Kohn D, Cucchiarini M. Combined human IGF-I and FGF-2 gene transfer stimulates the repair of focal cartilage defects in vivo. *European Orthopaedic Research Society* (Bologna, Italien), 16th Annual Meeting, 09/2006
5. **Orth P**, Weimer A, Kaul G, Kohn D, Cucchiarini M, Madry H. Efficient gene delivery into cells of musculoskeletal origin using nonviral gene transfer systems. *Strategies in Tissue Engineering* (Würzburg), 2nd International Conference, 06/2006

6. **Orth P**, Kaul G, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Cucchiarini M, Madry H. Enhanced repair of osteochondral cartilage defects using combined gene transfer of human insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor-2. *Strategies in Tissue Engineering* (Würzburg), 2nd International Conference, 06/2006

Posterpräsentationen:

1. **Orth P**, Kaul G, Zurakowski D, Menger MD, Trippel SB, Kohn D, Cucchiarini M, Madry H. Kombinierte Überexpression von humanem insulinartigen Wachstumsfaktor I und Fibroblastenwachstumsfaktor 2 durch transfizierte Chondrozyten stimuliert die Knorpelreparatur in vivo. *Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Sektion Chirurgische Forschung e.V.* (Saarbrücken), 11. Chirurgische Forschungstage, 11/2007
2. Madry H, Kaul G, **Orth P**, Zurakowski D, Kohn D, Cucchiarini M. Transplanted allogenic chondrocytes simultaneously overexpressing human insulin-like growth factor-I (IGF-I) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) stimulate articular cartilage repair in vivo. *International Cartilage Repair Society* (Warschau, Polen), 7th World Congress, 10/2007
3. Kaul G, Zurakowski D, **Orth P**, Trippel SB, Menger MD, Kohn D, Cucchiarini M, Madry H. Combined overexpression of human insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor-2 by transplanted chondrocytes stimulates cartilage repair in vivo. *Orthopaedic Research Society* (San Diego, USA), 53rd Annual Meeting, 02/2007
4. Kaul G, **Orth P**, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Cucchiarini M, Madry H. Combined gene transfer of human insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor-2 stimulates the repair of cartilage defects in vivo. *Orthopaedic Research Society* (Chicago, USA), 52nd Annual Meeting, 03/2006

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für Experimentelle Orthopädie der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, erstellt. Mein herzlicher Dank gilt:

PD Dr. med. H. Madry. Seine intensive und freundschaftliche fachliche wie persönliche Betreuung, seine kritischen Anmerkungen und sein Interesse am Fortgang meiner wissenschaftlichen Tätigkeit waren für mich von unschätzbarem Wert.

PD Dr. rer. nat. M. Cucchiaroni für Ihre freundliche Hilfestellung und fundierten Ratschläge, die für mich wertvolle Anregungen darstellten.

Prof. Dr. med. D. Kohn. Seine großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen und ärztlichen Tätigkeit war mir eine große Hilfe.

Dr. rer. nat. G. Kaul für seine Betreuung und stete Hilfsbereitschaft bei der Arbeit im Labor.

D. Zurakowski, Ph.D., für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

T. Thurn und *E. Kabiljagic* für ihre technische Unterstützung.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am 19. Dezember 1980 in Groß-Gerau

Nationalität: deutsch

Berufliche Tätigkeit

- seit 11/2008 **Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie**
 Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
 Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohlemann
- 04-10/2008 **Zentrum für operative Intensivmedizin**
 Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
 Direktoren: Prof. Dr. med. R. Larsen
 Prof. Dr. med. T. Pohlemann
 Prof. Dr. med. M. Schilling
- 02-03/2008 **Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie**
 Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
 Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohlemann
- 02/2008 **Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie**
 Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
 Direktor: Prof. Dr. med. D. Kohn

Ausbildung

- 11/2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2004-2007 Studium der Humanmedizin, Klinischer Abschnitt, Universität des Saarlandes
- 2003-2004 Studium der Humanmedizin, Klinischer Abschnitt, Université Libre de Bruxelles, Belgien
- 09/2003 Ärztliche Vorprüfung
- 2001-2003 Studium der Humanmedizin, Vorklinischer Abschnitt, Universität des Saarlandes, Homburg
- 1998-2000 Gymnasium Prälat-Diehl-Schule, Groß-Gerau
- 1997-1998 Colegio Selecto, Portoviejo, Ecuador
- 1991-1997 Gymnasium Prälat-Diehl-Schule, Groß-Gerau
- 1989-1991 Grundschule, Geinsheim
- 1987-1989 Grundschule, Athen, Griechenland

PraktikaPraktisches Jahr

- 05-07/2007 **Klinik für Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin**
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
- 03-05/2007 **Klinik für Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin**
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
- 01-03/2007 **Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie**
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
- 12/2006-01/2007 **Department of Orthopaedic Surgery**
Toronto East General and Orthopaedic Hospital, Toronto, Kanada
- 08-12/2006 **Klinik für Chirurgie**
Kantonsspital Winterthur, Winterthur, Schweiz

Famulaturen

- 03-04/2006 **Klinik für Innere Medizin**
Evangelisches Krankenhaus Zweibrücken, Zweibrücken
- 06-07/2005 **Orthopädische Praxis**
Dr. med. M. Hohmann, Heidelberg
- 09-10/2004 **Klinik für Neurologie**
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
- 03-04/2004 **Klinik für Orthopädie**
Klinikum Saarbrücken, Saarbrücken