

## Gentherapeutische Möglichkeiten in der Knorpeltherapie

Stephan Vogt, P. Ueblacker, V. Martinek, B. Gänsbacher, A. B. Imhoff

### Angaben zur Veröffentlichung / Publication details:

Vogt, Stephan, P. Ueblacker, V. Martinek, B. Gänsbacher, and A. B. Imhoff. 2005. "Gentherapeutische Möglichkeiten in der Knorpeltherapie." *Arthroskopie* 18 (3): 239-44. <https://doi.org/10.1007/s00142-005-0321-3>.

### Nutzungsbedingungen / Terms of use:

licgercopyright

Dieses Dokument wird unter folgenden Bedingungen zur Verfügung gestellt: / This document is made available under these conditions:

**Deutsches Urheberrecht**

Weitere Informationen finden Sie unter: / For more information see:

<https://www.uni-augsburg.de/de/organisation/bibliothek/publizieren-zitieren-archivieren/publiz/>



# Gentherapeutische Möglichkeiten in der Knorpeltherapie

**L**äsionen des Gelenkknorpels, d. h. chondrale bzw. osteochondrale Schädigungen, sind typische Verletzungsmuster in der Orthopädie und Traumatologie [8]. Adulter hyaliner Knorpel enthält jedoch weder Blut-/Lymphgefäße noch eine nervale Versorgung. Die Ernährung der Knorpelzellen erfolgt über Diffusion aus der Synovia und aus subchondralen Gefäßen. Die extrazelluläre Matrix, die die Knorpelzellen umscheidet, ist dabei eine natürliche Barriere. Daher regeneriert adulter Knorpel meist nur sehr unvollständig auf Verletzung und wenn durch Bindegewebe- bzw. Faserknorpelbildung mit vorwiegender Produktion von Kollagen-Typ-I-Fasern. Nur in Fällen von besonders kleinen Läsionen der Matrixkomponenten sind die Chondrozyten in der Lage, über eine Neusynthese von Proteoglykanen den Knorpeldefekt wieder vollständig zu regenerieren [5]. Bei der Reparatur des größeren Knorpeldefekts spielt die subchondrale Zone eine wichtige Rolle. Diese Reparatur kann eingeleitet werden durch das Einwandern adulter Stammzellen des Knochenmarks oder des Blutes in den Defekt. Das Regenerationsgewebe ist in der Regel jedoch Binde- bzw. faserknorpelartiges Gewebe mit der Neigung zur schnellen Degeneration. Dieses Gewebe ist im Vergleich zum ursprünglichen Gewebe mechanisch minderwertig und besitzt nicht die Eigenschaften des hyalinen Knorpels [27]. Eine adäquate Therapie der chondralen und osteochondralen Läsion ist daher ein wichtiges Ziel [33].

## Heutige Verfahren in der Knorpeltherapie

Gerade die Reparatur über einwandern- de adulte Stammzellen des Knochenmarks bzw. des Blutes machen sich viele

operative Verfahren bei der Behandlung des Knorpelschadens zu Nutze. Hierzu gehören die

- Defektanbohrung [29],
- Abrasionsarthroplastik [11] und
- Mikrofrakturierung des subchondralen Knochens [35].

Die einwandernden Zellen sollen über Differenzierung, Proliferation und Matrixsynthese das Reparatonsgewebe bilden. Das dabei entstehende Gewebe ist in der Regel aber auch faserknorpelartig und daher ebenso funktionell zum ursprünglichen hyalinen Knorpel minderwertig. Klinisch können durch diese Techniken Funktion und Schmerzsymptomatik über einen limitierten Zeitraum verbessert werden, jedoch sind Langzeitergebnisse in aller Regel ernüchternd [30]. Diese Verfahren dienen daher heute hauptsächlich dem Zeitgewinn vor der Implantation eines prothetischen Ersatzes.

Die Defektdeckung kleinerer chondraler und osteochondraler Läsionen mit autologen und allogenen osteochondralen Transplantationen (OATS®, MEGA-OATS®, Mosaikplastik) sind weitere, mittlerweile zahlreich angewendete Verfahren [4, 14, 18]. Im Vergleich zu den den subchondralen Knochen penetrierenden Verfahren zeigen diese eine Defektreparatur mit der typischen Morphologie des hyalinen Knorpels. Klinische Studien zeigen ermutigende Resultate dieser Verfahren, jedoch sind Entnahmemorbidität und begrenzte Verfügbarkeit ein Problem. Auch ist bisher nicht geklärt, wie lange diese osteochondralen Zylinder „überleben“ und in wie weit die Chondrozyten nach Transplantation in der Lage sind, einen „normalen“ Stoffwechsel zu erhalten, um die charakteristische Mor-

phologie des hyalinen Knorpels auf Dauer zu gewährleisten. So wurde in einer Studie an Schafen gezeigt, dass schon 3 Monate nach Implantation erste degenerative Veränderungen in der Histologie zu erkennen waren; außerdem blieb die Integration in den umgebenen Knorpel aus, wohingegen die ossäre Einheilung erfolgte [36].

Transplantate vom Periost oder Perichondrium können ebenfalls als Lieferanten adulter Stammzellen benutzt werden [9, 15]. Diese mesenchymalen Zellen sind in der Lage, knorpelartiges Gewebe zu induzieren. Klinische Studien lassen den Schluss zu, dass diese Verfahren für eine kurze Zeit die klinische Symptomatik bessern. Der Langzeitnutzen ist jedoch aufgrund früher Degeneration des Reparatonsgewebes und schlechter Integration zum umgebenen Gewebe fraglich [28].

Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) wurde Mitte des letzten Jahrzehnts in die Therapie des Gelenkknorpelschadens eingeführt [3]. Diese Technik benutzt aus einer Knorpelbiopsie durch enzymatischen Verdau gelöste Chondrozyten und lässt sie unter Zellkulturbedingungen proliferieren. Die proliferierten Zellen wurden zunächst unter einen Periostlappen, der auf den Defekt genäht wurde, implantiert. Neuere Verfahren benutzen mittlerweile bestimmte Matrizen, mit denen die Chondrozyten assoziiert sind [1]. Die klinischen Ergebnisse dieser Verfahren sind z. T. ermutigend, jedoch gibt es bisher keinen histologischen Nachweis der Defektheilung durch hyalinen Knorpel [1, 16].

## Wachstumsfaktoren in der Knorpeltherapie

Der Gebrauch von Wachstumsfaktoren in Verbindung mit „Tissue Engineering“

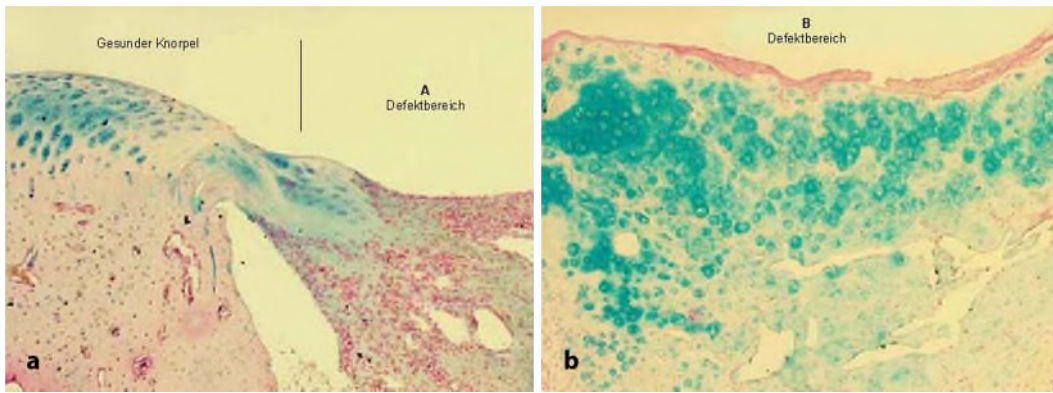


Abb. 1a, b ◀ Einfluss von retroviralem BMP-2 auf die Knorpelregeneration/ Proteoglykansynthese in vivo. a Zellreiches unorganisiertes fibröses Bindegewebe ohne Alcian-Blau-Färbung, b hyalinartiges Gewebe mit starker Alcian-Blau-Färbung (Proteoglykansynthese ↑)

scheint zurzeit die vielversprechendste Methode für die Behandlung chondraler und osteochondraler Läsionen zu sein [2]. Diese Wachstumsfaktoren gehören zur großen Gruppe der Zytokine und können von den in den Defekt einwandernden adulten Stammzellen, von Chondrozyten und inflammatorischen Zellen gebildet werden. Sie stimulieren das Zellwachstum, die Zellproliferation, die Differenzierung und die Matrixsynthese [16]. In Studien konnte gezeigt werden, dass diese Faktoren den Stoffwechsel der Chondrozyten steigerten und die Heilung von Knorpeldefekten förderten [16, 40].

Eine wichtige Gruppe dieser Zytokine ist in diesem Zusammenhang die „Transforming-growth-factor-beta- (TGF- $\beta$ )-Familie“. Hierzu gehören die TGF- $\beta$ s selbst, Aktivine, Inhibine, die „bone morphogenetic proteins“ (BMPs) und die „Müllerian-inhibiting substance“. Gemeinsam haben diese Faktoren die Eigenschaft, dass sie ihre Wirkung über membranständige Rezeptoren (Serin/Threonin-Kinasen) vermitteln und gleiche intrazelluläre Signalkaskaden benutzen (SMAD-Proteine). Weitere wichtige Wachstumsfaktoren sind die „insulin-like growth factors“ (IGFs) und der „basic fibroblast growth factor“ (bFGF). So haben das IGF-1, BMP-2, bFGF und das TGF- $\beta$ 1 ihre positiven Eigenschaften auf die Knorpelregeneration in In-vivo-Studien bereits gezeigt (■ Abb. 1a, b; [7, 26, 31, 39, 40]). Es konnte gezeigt werden, dass in Tierstudien durch diese Wachstumsfaktoren die Histomorphologie der Charakteristik von hyalinem Knorpel ähnelte. Dabei haben diese Faktoren unterschiedliche Haupteffekte. So modulieren IGF-1 und TGF- $\beta$ 1 bevorzugt die Knorpelmatrix [10, 39], wogegen bFGF besonders die Differenzierung von Chondrozyten fördert [7]. BMP-2 führt besonders zu einer Prolifera-

tion und Differenzierung von einwandernden Zellen zu Chondroblasten und Osteoblasten [31, 39, 40].

Zu Beginn wurden diese Faktoren als rekombinantes Protein direkt appliziert. So wurde gezeigt, dass rekombinantes humanes BMP-2 die Heilung tief greifender artifizierender Knorpeldefekte bis in den subchondralen Bereich im Kaninchenmodell bzgl. einer Beschleunigung der subchondralen Knochenregeneration und des histomorphologischen Befundes des reparierten Knorpeldefekts positiv beeinflusste [31].

Obwohl nach dieser Studie die direkte Applikation eines Wachstumsfaktors einen fördernden Effekt auf die Knorpelheilung besitzt, konnte bisher mit diesen Methoden keine *Restitutio ad integrum* erzielt werden [31]. Dieses kann zum einen an der Applikationsform des jeweiligen Faktors liegen. Die biologische Halbwertszeit dieser Faktoren ist relativ kurz und damit auch deren Wirkung auf das Gewebe. Die einmalige Applikation kann daher nur zu einem initialen Effekt führen, und es bedarf daher der erneuten Gabe. Repetitive Applikationen beinhalten jedoch ein erhöhtes Infektionsrisiko. Es wurden daher bestimmte Trägermaterialien und osmotische Pumpen entwickelt, die dieses Problem beheben sollten [1, 19].

Des Weiteren erzielt man durch direkte Gelenkapplikation dieser Substanzen auch einen ungewollten Effekt im benachbarten Gewebe. Ein Ziel muss es daher sein, neue Applikationsformen zu etablieren.

### Gentherapeutische Methoden und Tissue Engineering

Hierbei erfolgt ein Transfer „therapeutischer Gene“ in Zellen im Defektbereich, um so die kontinuierliche lokale Expres-

sion des entsprechenden Gens zu bewerkstelligen. Dabei unterscheidet man zunächst die In-vivo- und Ex-vivo-Methode. Bei der 1. Methode erfolgt der Transfer des „therapeutischen Gens“ z. B. über Adenoviren direkt in den Organismus [20]. Bei der 2. Methode werden Zellen entnommen, genetisch manipuliert und wieder in den Organismus implantiert [38].

Eine weitere wichtige Unterscheidung spielt die Form des Transfersystems. Die DNA des „therapeutischen Gens“ muss über die Zellmembran in das Zytoplasma bzw. in den Zellkern gelangen (Zelltransduktion). Trägermoleküle, die das „therapeutische Gen“ beinhalten und bei der Aufnahme in die Zielzelle beteiligt sind, sind so genannte Vektoren. Prinzipiell unterscheidet man 2 Hauptgruppen: die nichtviralen und die viralen Vektoren. Zu den nichtviralen Vektoren gehören die Plasmide. Ohne Hilfsmittel sind diese nur schwer in der Lage, in Zellen zu gelangen. Hilfsmittel sind beispielsweise bestimmte Liposomenanordnungen (LIPOFECTAMIE®, FuGENE®), die über eine Mizellenbildung diesen Transfer in die Zelle fördern. Man spricht in diesem Fall der Zelltransduktion von einer Zelltransfektion. Die Vorteile dieser Methode bestehen in der geringen Toxizität, der Einfachheit der Durchführung, der beliebigen DNA-Größe und der geringen onkogenen Potenz, der Nachteil in der geringeren Transduktionsrate und der geringen Stabilität des Transfers im Vergleich zu viralen Vektoren.

Virale Transfersysteme sind beispielsweise retrovirale, adenovirale und lentivirale Vektoren mit unterschiedlichen Wirkweisen und Effizienzen. Zusammengefasst haben sie den Vorteil gegenüber nichtviralen Systemen wie den Plasmiden, dass Effizienz und Stabilität der Zelltransdukti-

## Gentherapeutische Möglichkeiten in der Knorpeltherapie

### Zusammenfassung

Chondrale bzw. osteochondrale Läsionen des Gelenkknorpels sind typische Verletzungsmuster in der Orthopädie und Traumatologie. Da eine *Restitutio ad integrum* des verletzten Gelenkknorpels in der Regel nicht stattfindet, kann die initiale Läsion zur vorzeitigen Arthrose führen, die wiederum mit langfristigen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden ist. Eine adäquate Therapie der chondralen und osteochondralen Läsion ist daher ein wichtiges Ziel dieser Fachgebiete.

Obgleich gegenwärtige Konzepte in der Behandlung dieser Verletzungen viel versprechend sind, führt zurzeit keine Behandlung zu einer kompletten Wiederher-

stellung des hyalinen Knorpels und des subchondralen Knochens. Gentherapeutische Methoden gerade in Kombination mit *Tissue Engineering* bieten neue Therapieoptionen für die Behandlung dieser Verletzungen. Jedoch ist die Transduktion von *therapeutischen Genen* in das Zielgewebe bzw. die Zielzelle und die Genexpression bisher mit großen Problemen behaftet. Auch ist nicht klar, wie lange und in welcher Menge, bezogen auf die Defektgröße, das *therapeutische Gen* gebildet werden muss, um die vollständige Regeneration des Defekts zu bewerkstelligen. Ein weiteres ungelöstes Problem ist die Sicherheit eines solchen gentherapeutischen Ansatzes. Gerade die

effektiven retroviralen Systeme beinhalten auch ein onkogenes Potenzial. Deswegen wurden in letzter Zeit gentherapeutische Verfahren in Zusammenhang mit osteochondralen Läsionen entwickelt, die die Expression des therapeutischen Gens pharmakologisch steuern können.

Dieser Übersichtsartikel beschreibt die grundlegenden Voraussetzungen und den jetzigen Stand der Forschung in der Gentherapie für Läsionen des Gelenkknorpels.

### Schlüsselwörter

Chondrale/osteochondrale Läsion · Arthrose · Tissue Engineering · Transduktion · Gentherapie

## Gene therapeutic options in the treatment of cartilage lesions

### Abstract

Chondral and osteochondral lesions of the articular cartilage are typical injuries in orthopedics. Since a *restitutio ad integrum* of the articular cartilage does not take place, the initial lesion can lead to premature arthrosis, which is connected with long-term costs for the health system. Adequate therapy of the chondral and osteochondral lesion is therefore an important goal. Although present concepts are promising in the treatment of these injuries, until now these therapeutic options do not lead to a complete regeneration of the hyaline cartilage and the subchondral bone. Gene therapeutic meth-

ods especially in combination with tissue engineering offer new therapeutic options in the treatment of these injuries. However, the transduction of therapeutic genes into the tissue and cells is so far afflicted with large problems. Also it is not clear for which time period and in which quantity, related to the defect size, the therapeutic gene must be produced by gene expression to manage the complete regeneration of the defect. A further unresolved problem is still at this time the safety of such a therapeutic approach. In particular, effective retroviral systems contain also an oncogenic potential.

Therefore, new gene therapeutic procedures were recently developed for osteochondral lesions, which are assessable pharmacologically. This review describes the fundamental conditions and the current state of research in the field of gene therapy for lesions of the articular cartilage.

### Keywords

Chondral/osteochondral lesion · Arthrosis · Tissue engineering · Transduction · Gene therapy

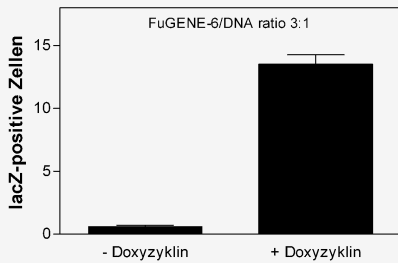


Abb. 2 ▲ Steuerbare Genexpression in Chondrozyten *in vitro*. LacZ-Expression von pN2A-tetOn-lacZ-transfizierten Chondrozyten (-/+ Doxyzyklin) in der FACS-Messung

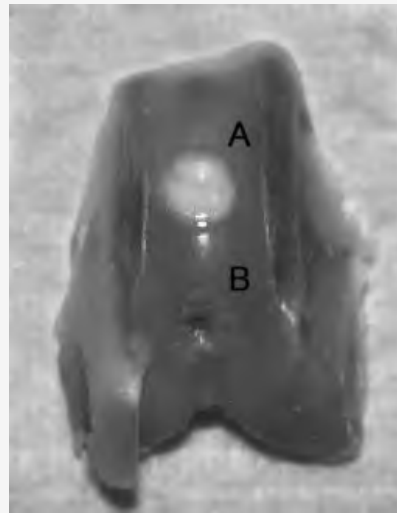


Abb. 3a, b ▲ Steuerbare Genexpression im Gelenkknorpel *in vivo*. a Nichttransfizierte Chondrozyten, b pN2A-tetOn-lacZ-transfizierte Chondrozyten nach X-Gal-Färbung

on deutlich höher liegen. Die Nachteile sind besonders bei retroviralen Vektoren das onkogene Potenzial durch das Vorhandensein bestimmter Genabschnitte der Vektoren (Promotoren, „Enhancerelemente“) mit der Möglichkeit der zufälligen Integration in das Wirtsgenom (insertionelle Mutagenese) und durch die permanente nicht steuerbare Produktion des „therapeutischen Gens“. Daher wurden in neuerer Zeit steuerbare Transfersysteme entwickelt, die eine Regulation der Genexpression ermöglichen [38].

### Gentherapeutische Methoden in der Knorpelregeneration

Viele Studien haben nachgewiesen, dass Chondrozyten *In vitro* transduziert werden können. Dazu wurden spezielle Markergene sowohl mittels viraler als auch nichtviraler Vektoren transduziert [23, 38, 40]. Zusätzlich wurde auch der biologische Effekt bestimmter Wachstumsfaktoren untersucht. Die Transduktion von IGF-1 und TGF- $\beta$ 1 führte in der Monolayerzellkultur zu einem Anstieg der Matrixsynthese und verhinderte die Dedifferenzierung zu Fibroblasten. Es konnte auch ein Anstieg des Kollagen-Typ-II, ein typischer Marker für hyalinen Knorpel, nachgewiesen werden [34].

Der 1. erfolgreiche Transfer von Fremdgene in Gelenkknorpel *in vivo* wurde

zuerst von Tomita et al. [37] beschrieben. Hierzu wurde ein modifizierter Sendai-Virus (HVJ), der das SVT-Gen enthielt, in Kombination mit einem liposomalem Transfersystem benutzt. Diese Suspension wurde direkt in Rattenknien injiziert. Der Nachweis der SVT-Genexpression erfolgte mittels Immunhistochemie in Chondrozyten bis zu 3 Wochen nach der Gabe. Die Möglichkeit des Transfers von Reportergenen (z. B. lacZ-Gen) in Gelenkknorpel und osteochondrale Defekte wurde anschließend in mehreren Studien gezeigt (z. B. [25]). Der 1. Versuch mit einem „therapeutischen Gen“ wurde von Ikeda et al. [17] beschrieben. In dieser Studie erfolgte der Transfer des TGF- $\beta$ 1-Gens direkt in die Gelenke von Hartley-Guinea-Schweinen mittels eines adenoviralen Vektors. Dieser Transfer zeigte eine Stabilität für 2 Wochen. Jedoch erfolgte keine Beschreibung der Auswirkung auf die Morphologie und den Stoffwechsel des Regenerationsgewebes.

Mason et al. [24] waren die ersten, die einen biologischen Effekt eines Wachstumsfaktors in der Gentherapie von Knorpeldefekten zeigten. Dafür benutzten sie ein Kaninchenmodell, in das sie mesenchymale Stammzellen, die mittels eines retroviralen Vektors mit „bone morphogenetic protein 7“ (BMP-7) transduziert wurden, in artifizelle osteochondrale Defekte des Kaninchenknies ansiedelten. Die Defekte,

die BMP-7 erhielten, zeigten nach 8 und 12 Wochen eine nahezu komplette Regeneration des osteochondralen Defekts, wogegen Kontrolldefekte lediglich eine mäßige Regeneration zeigten (Histologie, Immunhistologie). Ähnliche Ergebnisse zeigte die Arbeit von Lee et al. [21], die Fibroblasten in Knorpeldefekte des Kaninchenknies implantierten, welche den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 exprimierten. Jedoch zeigten die histologischen Analysen aller bisherigen Arbeiten keine komplette Regeneration im Sinne des ursprünglichen hyalinen Knorpels.

### Sicherheitsaspekte des Gentransfers und neue Ansätze

Die Hauptprobleme in der Anwendung der Gentherapie sind die Kontrolle der Genexpression und das onkogene Potenzial des Transfers [6, 22, 41]. Für die Regeneration des chondralen/osteochondralen Schadens würde die mehrwöchige Expression des „therapeutischen Gens“ sehr wahrscheinlich reichen. Nichtvirale Transfersysteme, bei denen eine Tumorneogenese eher unwahrscheinlich ist, haben jedoch das Problem, das schon in der Zellkultur die Genexpression meist nach 2–3 Wochen oder sogar früher nicht mehr nachzuweisen ist. Fremdgene, die mittels viraler Systeme stabiler bzw. stabil transduziert werden, sind aber auch Wochen und je nach Virusart sogar Monate und länger nach der Transduktion aktiv, und das exprimierte Protein ist nachweisbar [40]. Gerade in Kombination mit Wachstumsfaktoren ist dadurch das Risiko einer Tumorneogenese deutlich erhöht. Zusätzlich können bestimmte Elemente eines retroviralen Vektors, wie Promotoren und Enhancerelemente, durch eine ungünstige Integration in den Bereich von Protoonkogenen des Wirtsgenoms (insertionelle Mutagenese), maligne Tumoren induzieren [41].

Das Problem der Dauerexpression kann über steuerbare Systeme gelöst werden. Das bekannteste System ist dabei das *tet-on/off*-System von Gossen u. Bujard [12]. In diesem System wird die Genexpression pharmakologisch durch Tetracyclin/Doxyzyklin gesteuert und ist sowohl hochspezifisch als auch nichttoxisch. Hierbei bindet ein chimärer *tet*-kontrollierter Transaktivator (tTA), der von einem Plasmid expri-

Tabelle 1

Experimentelle Studien im Rahmen der Therapie chondraler/osteocondraler Defekte: Einfluss von Wachstumsfaktoren, gentherapeutische Modelle						
Autor	Applikationsform	Zellen	Vektoren	Fremdgen	Spezies	Ergebnis
Cuevas et al. [7]	i.a.-Pumpe	–	–	bFGF	Kaninchen	Reparation ↑
Van Beuningen et al. [39]	i.a.-Injektion	–	–	TGF-β1, BMP-2	Maus	Biosynthese ↑
Sellers et al. [31]	Kollagenschwamm/in vivo	–	–	BMP-2	Kaninchen	Reparation ↑
Fortier et al. [10]	Fibrin/Zellen	Chondrozyten	–	IGF-1	Pferd	Reparation ↑
Smith et al. [34]	Zellkultur.2D	Chondrozyten	Adenovirus	IGF-1, TGF-β1, BMP-2	Kaninchen	Matrixsynthese ↑
Madry et al. [23]	Zellkultur/Explanate	Chondrozyten	Plasmid	laoZ	Mensch, Kalb	Machbarkeit bestätigt
Ikeda et al. [17]	i.a.-Injektion	–	Adenovirus	laoZ, TGF-β1	Schwein	Machbarkeit bestätigt
Mason et al. [25]	PGA-Skaffold	Periostzellen	Retrovirus	BMP-7	Kaninchen	Reparation ↑
Ueblacker et al. [38]	Kollagenschwamm/in vivo	Chondrozyten	tet-on/System	laoZ	Kaninchen	Machbarkeit bestätigt
Vogt et al. [40]	Fibrin/Zellen	Chondrozyten	Retrovirus	BMP-2	Kaninchen	Reparation ↑

miert wird, an die *tet*-Operator-Sequenz eines 2. Plasmids. Dieses 2. Plasmid steht unter der Kontrolle eines *minimal*-CMV-Promoters. Die Bindung kann im *tet-on*-System nur in Anwesenheit von Tetrazyklin/Doxyzyklin erfolgen, im *tet-off*-System nur in Abwesenheit dieser Substanzen. Die erfolgreiche Genexpression durch das *tet*-System wurde mittlerweile in verschiedenen Zellen (z. B. [13]) und in transgenen Mäusen (z. B. [32]) gezeigt. Ueblacker et al. [38] zeigten 2004 erstmalig das Funktionieren dieses Systems in Chondrozyten *in vitro* und im Gelenkknorpel *in vivo* mittels des Markergens *lacZ*. In dieser Studie wurde eine Modifikation des ursprünglichen Systems durchgeführt. Um eine Doppeltransfektion zu vermeiden, wurden alle *tet*-regulatorischen Elemente und das Reportergen *lacZ* in ein Konstrukt kloniert (*pN2A-tetOn-lacZ*). Mehr als 13% der Chondrozyten, die *in vitro* über Lipofektion transfiziert wurden, exprimierten das Reportergen und damit das Protein β-Galaktosidase nach Doxyzyklingabe. In der Kontrollgruppe waren weniger als 1% der Zellen positiv für β-Galaktosidase (■ Abb. 2). Der Nachweis dieses Proteins erfolgte mittels *X-Gal*-Färbung. Ex-vivo-transduzierte Chondrozyten wurden in der Zellkultur auf Kollagen-I-Schwämmchen angezüchtet und dann in osteochondrale Defekte der Trochlea von New-Zealand-White-Ka-

ninchen implantiert. Sowohl mikro- als auch makroskopisch zeigte sich nur in den Defekten der Kaninchen, die Doxyzyklin mit der Nahrung erhielten, ein Nachweis von β-Galaktosidase (■ Abb. 3). Da es sich aber um einen nichtviralen Transfer handelt, ist die initiale Effizienz noch gering. In Zukunft wird es interessant sein, ob dieses steuerbare System mit einem viralen Transfersystem etabliert werden kann, um die Effizienz und die Stabilität des Transfers zu erhöhen. Des Weiteren wird dann auch die Kombination dieses Systems in Verbindung mit „therapeutischen Genen“ in den Vordergrund rücken.

Die Problematik der insertionellen Mutagenese muss durch Modifikationen der retroviralen Vektoren beseitigt werden, die dafür sorgen, dass die retrovirale Insertion nur noch in vorher definierten Bereichen des Wirtsgenoms stattfindet. Diese Entwicklung wird jedoch noch Jahre andauern. Heute verfügbare Alternativen zur Verbesserung der Sicherheit der retroviralen Gentherapie wären zum einen die Verwendung von Chromatininsulatoren, die die unspezifische Expression von Protoonkogenen hemmen, und zum anderen die Kotransduktion von sog. „Suicidegenen“, die bei abnormalem Wachstum des Gewebes die Zerstörung der transduzierten Zellen nach pharmakologischer Induktion veranlassen können [41].

## Fazit für die Praxis

Gentherapeutische Methoden gerade in Kombination mit dem *Tissue Engineering* zeigen vielversprechende Ansätze bei der Behandlung der chondralen/osteocondralen Läsion (■ Tabelle 1). Ein großes Problem ist, das ideale Transfersystem für das „therapeutische Gen“ zu finden. Die Anforderung ist klar: dieses System sollte völlig kontrollierbar hinsichtlich Dauer und Ausmaß der Genexpression sein und keine unerwünschten „Nebenwirkungen“ besitzen, wie z. B. eine mögliche insertionelle Mutagenese bei der Integration in das Wirtsgenom. Interessante Ansätze bzgl. dieses Problems gibt es, und erste Ergebnisse sind ermutigend.

Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Identifikation des optimalen „therapeutischen Gens“ bzw. der optimalen Kombination mehrerer solcher Gene. Studien zeigen, dass besonders Wachstumsfaktoren aus der TGF-β-Familie (TGF-β1, BMP-2) Schlüsselproteine bei der Regeneration des Gelenkknorpelschadens sein könnten. Dabei sind optimale Dauer und Ausmaß der Genexpression für diese Faktoren noch nicht bekannt.

Auch muss die optimale Trägersubstanz gefunden werden, die einerseits die manipulierten Zellen an dem Ort des Defekts hält und andererseits die Regenerati-

on der Knorpel/Knochenläsion nicht stört, sondern ggf. sogar fördert. Daher sind weitere Arbeiten notwendig, um eine optimale Kombination aus Träger-substanz, Zellen, „therapeutischem Gen/ Genen“ und dem entsprechenden Transfersystem zu finden. Die Risiken, die mit einem gentherapeutischem Ansatz auftreten, müssen hingegen beseitigt, zumindest jedoch minimiert werden. Aus diesen Gründen ist der klinische Einsatz der Gentherapie in diesem Umfeld noch nicht absehbar.

## Korrespondierender Autor

Dr. S. Vogt

Abteilung Sportorthopädie,  
Technische Universität,  
Connollystr. 32, 80809 München  
E-Mail: stephan-vogt@web.de

**Interessenkonflikt:** Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen.

## Literatur

- Bartlett W, Flanagan AM, Gooding CR, Skinner JA, Carrington RW, Briggs TW, Bentley G (2005) Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomized study. *J Bone Joint Surg [Br]* 87(5):640–645
- Blunk T, Sieminski AL, Gooch KJ, Courter DL, Hollander AP, Nahir AM, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (2002) Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 8(1):73–84
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331(14):889–895
- Brucker P, Agneskirchner JD, Burkart A, Imhoff AB (2002) Mega-OATS. Technique and outcome. *Unfallchirurg* 105(5):443–449
- Buckwalter JA (2002) Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res* 402:21–37
- Crystal RG (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270(5235):404–410
- Cuevas P, Burgos J, Baird A (1988) Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 156(2):611–618
- Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG (1997) Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 13(4):456–460
- Emans PJ, Surtel DA, Frings EJ, Bulstra SK, Kuijjer R (2005) In vivo generation of cartilage from periosteum. *Tissue Eng* 11(3–4):369–377
- 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(2):276–288
- Friedman MJ, Berasi CC, Fox JM, Del Pizzo W, Snyder SJ, Ferkel RD (1984) Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clin Orthop Relat Res* 182:200–205
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12):5547–5551
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268(5218):1766–1769
- Hangody L, Fules P (2003) Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg [Am]* 85-A [Suppl 2]:25–32
- Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van der Linden AJ (1990) Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg [Br]* 72(6):1003–1007
- Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartil* 10(6):432–463
- Ikeda T, Kubo T, Arai Y, Nakanishi T, Kobayashi K, Takahashi K, Imanishi J, Takigawa M, Hirasawa Y (1998) Adenovirus mediated gene delivery to the joints of guinea pigs. *J Rheumatol* 25(9):1666–1673
- Imhoff AB, Ottl GM, Burkart A, Traub S (1999) Autologous osteochondral transplantation on various joints. *Orthopade* 28(1):33–44
- Jelic M, Pecina M, Haspl M, Kos J, Taylor K, Maticic D, McCartney J, Yin S, Rueger D, Vukicevic S (2001) Regeneration of articular cartilage chondral defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep. *Growth Factors* 19(2):101–113
- Kochanek S (1999) High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 10(15):2451–2459
- 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(14):1805–1813
- Lieberman JR, Ghivizzani SC, Evans CH (2002) Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage. *Mol Ther* 6(2):141–147
- Madry H, Trippel SB (2000) Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther* 7(4):286–291
- 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 [Suppl]:S171–178
- Mason JM, Grande DA, Barcia M, Grant R, Pergolizzi RG, Breitbart AS (1998) Expression of human bone morphogenetic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Ther* 5(8):1098–1104
- Nixon AJ, Brower-Toland BD, Bent SJ, Saxer RA, Wilke MJ, Robbins PD, Evans CH (2000) Insulinlike growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 379 [Suppl]:S201–213
- O'Driscoll SW (1998) The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg [Am]* 80(12):1795–1812
- O'Driscoll SW (2001) Preclinical cartilage repair: current status and future perspectives. *Clin Orthop Relat Res* 391 [Suppl]:S397–401
- Pridie KH (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg [Br]* 41:618–619
- Redman SN, Oldfield SF, Archer CW (2005) Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 9:23–32; discussion 23–32
- 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(2):151–160
- Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N, Schatz DG (1995) A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14):6522–6526
- Smith GD, Knutsen G, Richardson JB (2005) A clinical review of cartilage repair techniques. *J Bone Joint Surg [Br]* 87(4):445–449
- Smith P, Shuler FD, Georgescu HI, Ghivizzani SC, Johnstone B, Niyibizi C, Robbins PD, Evans CH (2000) Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1. *Arthritis Rheum* 43(5):1156–1164
- Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ (1999) The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade* 28(1):26–32
- Tibesku CO, Szwart T, Kleffner TO, Schlegel PM, Jahn UR, van Aken H, Fuchs S (2004) Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. *J Orthop Res* 22(6):1210–1214
- Tomita T, Hashimoto H, Tomita N, Morishita R, Lee SB, Hayashida K, Nakamura N, Yonenobu K, Kaneda Y, Ochi T (1997) In vivo direct gene transfer into articular cartilage by intraarticular injection mediated by HVJ (Sendai virus) and liposomes. *Arthritis Rheum* 40(5):901–906
- 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 Cartil* 12(9):711–719
- 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 Cartil* 6(5):306–317
- Vogt S, Ueblacker P, Salzmann GM, Wagner B, Wechsel G, Imhoff AB, Gansbacher B, Martinek V (2004) Development of a retrovirus vector for efficient growth factor transfer in chondrocytes. A new vector for tissue-engineering. *Book of abstracts: Annual DGOOC meeting 2004, Berlin, Germany*
- Yi Y, Hahm SH, Lee KH (2005) Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr Gene Ther* 5(1):25–35