

Aus der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus

Lehrstuhl für Orthopädie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

**Adenoviraler Gentransfer von SOX9 zur chondrogenen Differenzierung
von humanen mesenchymalen Stammzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Manuela-Hermina Weißenberger, geb. Kunz

aus Würzburg

Würzburg, Februar 2022



Referent: Prof. Dr. med. Andre Steinert

Korreferent: Prof. Dr. med. Lars Dölken

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

„Manchmal muss man riskieren an etwas zu glauben, das Vertrauen kommt dann später.“

Für Emma

1	EINLEITUNG	1
1.1	Hyaliner Gelenknorpel – Aufbau und Pathophysiologie	1
1.1.1	Anatomischer Aufbau des Gelenknorpels	1
1.1.2	Pathophysiologie	5
1.2	Arthrose und knorpelrekonstruktive Verfahren	6
1.2.1	Probleme knorpelrekonstruktiver Verfahren	6
1.2.2	Knorpelchirurgische Standardverfahren	8
1.2.3	Therapeutische Perspektiven	10
1.3	Gentherapie zur Knorpelregeneration	13
1.3.1	Zellen	13
1.3.2	Signalmoleküle und Differenzierungsfaktoren	16
1.3.3	Vektoren	17
1.4	SOX9 Rolle in der Chondrogenese	22
1.4.1.	Der Transkriptionsfaktor SOX9	23
1.4.2	SOX9 in der Embryogenese	24
1.4.3	SOX9/GFP Masterregulator der Chondrogenese	25
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Material	28
2.1.1	Chemikalien	28
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.3	Zellkulturmedien und -zusätze	30
2.1.4	Zelltypen	31

2.1.5 Antikörper	31
2.1.6 Enzyme	31
2.1.7 Transgene der Adenovirusvektoren	32
2.1.8 Primer	32
2.1.9 Lösungen, Puffer und Reagenzien	33
2.1.10 Assays und Kits	36
2.1.11 Geräte, Laborbedarf und Labormaterial	36
2.1.12 Quellen der Onlinedatenbanken und Software	38
2.2 Methoden	38
2.2.1 Kultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen	38
2.2.1.1 Adenoviren als Gene Delivery-System	38
2.2.1.2 Fragestellung der Arbeit, SOX9 als chondrogener Modulator	40
2.2.1.3 Adenovirale Herstellung mittels Cre/loxP- Rekombination zur Vektorengenerierung	40
2.2.1.4 Produktion der adenoviralen Vektoren	41
2.2.1.5 Bestimmung der Konzentration der adenoviralen Vektoren	43
2.2.1.6 Gewinnung von humanen mesenchymalen Stammzellen	43
2.2.1.7 Adenovirale Stammzellinfektion	45
2.2.1.8 Pelletherstellung und Kultur	47
2.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen	48
2.2.2.1 ELISA (IGF-1, TGF- β 1)	48
2.2.2.2 Western Blot (SOX9/GFP)	50
2.2.2.3 Quantitative DNA-Bestimmung	52
2.2.2.4 Quantitative Glykosaminoglykan-Bestimmung	53
2.2.2.5 Quantitative Bestimmung des Adenosintriphosphats	54
2.2.2.6 Quantitative Bestimmung der Alkalische Phosphatase-Aktivität	55

2.2.3 Histologie	56
2.2.3.1 Fixierung und Paraffineinbettung	56
2.2.3.2 Entparaffinierung und Herstellung von histologischen Schnitten	57
2.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	57
2.2.3.4 Alcian Blau-Färbung	58
2.2.3.5 Alkalische Phosphatase-Färbung	59
2.2.3.6 Immunhistochemische Färbungen	60
2.2.3.7 Annexin V-Cy3/6-CFDA Fluoreszenzdoppelfärbung	62
2.2.4 Genexpressionsanalyse	63
2.2.4.1 RNA-Isolation	63
2.2.4.2 cDNA-Synthese	65
2.2.4.3 Semiquantitative RT-PCR	66
2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese	67
2.2.4.5 Quantitative RT-PCR	68
2.2.5 Statistikanalysen	70
3. ERGEBNISSE	71
3.1 Monolayer- und Pelletkultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen	71
3.2 Transgenexpressionsbestimmung	72
3.2.1 Quantitative ELISA-Transgenexpressionsbestimmung von TGF- β 1 und IGF-1	72
3.2.2 SOX9 fluoreszenzmikroskopische, qualitative Transgenexpressionsbestimmung	74
3.2.3 Qualitative Bestimmung der SOX9 Genexpression mittels Western Blot	75
3.3 Adenosintriphosphat-Assay zur quantitativen Zellproliferationsratenbestimmung	76
3.4 DNA-Assay zur quantitativen Zellvitalitätsbestimmung	77

3.5D MMB zur quantitativen Glykosaminoglykan-Gehaltsbestimmung	78
3.6 Chondrogene Differenzierung	80
3.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	81
3.6.2 Alcian Blau-Färbung	82
3.6.3 Kollagen Typ II-Immunhistologie	84
3.6.4 Chondroitin-4-Sulfat-Färbung	86
3.7 Chondrogene Hypertrophie	88
3.7.1 Alkalische Phosphatase-Assay	88
3.7.2 Alkalische Phosphatase-Färbung	89
3.7.3 Kollagen Typ X-Färbung	91
3.8 Semiquantitative RT-PCR	93
3.9 Quantitative RT-PCR	96
3.10 Zellvitalität und Apoptose	99
4 DISKUSSION	101
4.1 Material und Methodendiskussion	101
4.1.1 Primäre versus andere Zellen	101
4.1.2 Pellet-Zellkultursystem versus andere Kulturverfahren	102
4.1.3 Gentherapie versus proteinhaltige Differenzierungsmedien	102
4.2 Ergebnisdiskussion	103
4.2.1 Transgenexpression	103
4.2.2 Numerische Daten: GAG-, DNA-, ATP-, ALP-Assay	103
4.2.3 Chondrogene Differenzierung der MSCs	105
4.2.4 Hypertrophe Differenzierung der MSCs	106

4.3 Vergleich mit Studien aus der Entwicklungsbiologie	107
4.4 <i>In vitro</i>-Studienvergleich zur Behandlung chondraler Defekte	109
4.5 <i>In vivo</i>-Studienvergleich zur Behandlung chondraler Defekte	110
5 ZUSAMMENFASSUNG	112
6 LITERATURVERZEICHNIS	114
APPENDIX	129

1 Einleitung

1.1 Hyaliner Gelenkknorpel – Aufbau und Pathophysiologie

1.1.1 Anatomischer Aufbau des Gelenkknorpels

Hyaliner Knorpel kommt als häufigste Knorpelart im menschlichen Körper vor. Er ist makroskopisch leicht durchsichtig bis milchig-bläulich trüb und dient schon in der Embryonalzeit als Gerüst für den entstehenden Knochen.

Im diarthrotischen Gelenk, wie zum Beispiel dem Kniegelenk, sind beide artikulierenden Gelenkflächen von einer besonderen Knorpelart überzogen, dem hyalinen Gelenkknorpel. Mit nur einigen Millimetern Dicke, aber von höchster Effizienz, überzieht er den darunterliegenden Knochen, fungiert hier durch seine hohe Druckelastizität als Stoßdämpfer und sorgt für eine gleichmäßige Verteilung der Druckbelastung auf beide Gelenkflächen.¹ Im dazwischenliegenden Gelenkspalt der beiden artikulierenden Gelenkflächen befindet sich die Synovialflüssigkeit, die aufgrund ihrer viskösen Konsistenz ein reibungsfreies Gleiten der Artikulationsflächen ermöglicht. Der Nährstofftransport erfolgt durch Diffusion aus der umgebenden Synovia und dem angrenzenden vaskularisierten Knochen, denn der hyaline Knorpel ist bradytroph und besitzt weder Lymph- noch Blutgefäße.² Die Avaskularisation des hyalinen Knorpels gepaart mit der hohen mechanischen Belastung über sehr lange Zeit begünstigen degenerative Prozesse mit fortschreitendem Alter. Eine Regeneration von Knorpeldefekten ist

daher beim Erwachsenen nur sehr eingeschränkt bis nicht möglich. Histologisch besteht der hyaline Knorpel zum größten Teil aus zwei wesentlichen Bestandteilen, der Extrazellulärmatrix und den Chondrozyten.¹ Die Chondrozyten (1 – 10 %) sind einzeln oder in kleinen Chondronen in die Extrazellulärmatrix (90 – 99 %) eingelagert.¹ Die extrazelluläre Matrix wiederum besteht zu 70 – 80 % aus Wasser, welches ausschlaggebend als Pufferung des Gelenks bei Belastung fungiert.¹ Des Weiteren setzt sich die Extrazellulärmatrix aus Proteoglykanen (PG) und Kollagenfibrillen zusammen. Die PG des hyalinen Knorpels bestehen vorwiegend aus Aggrecan.

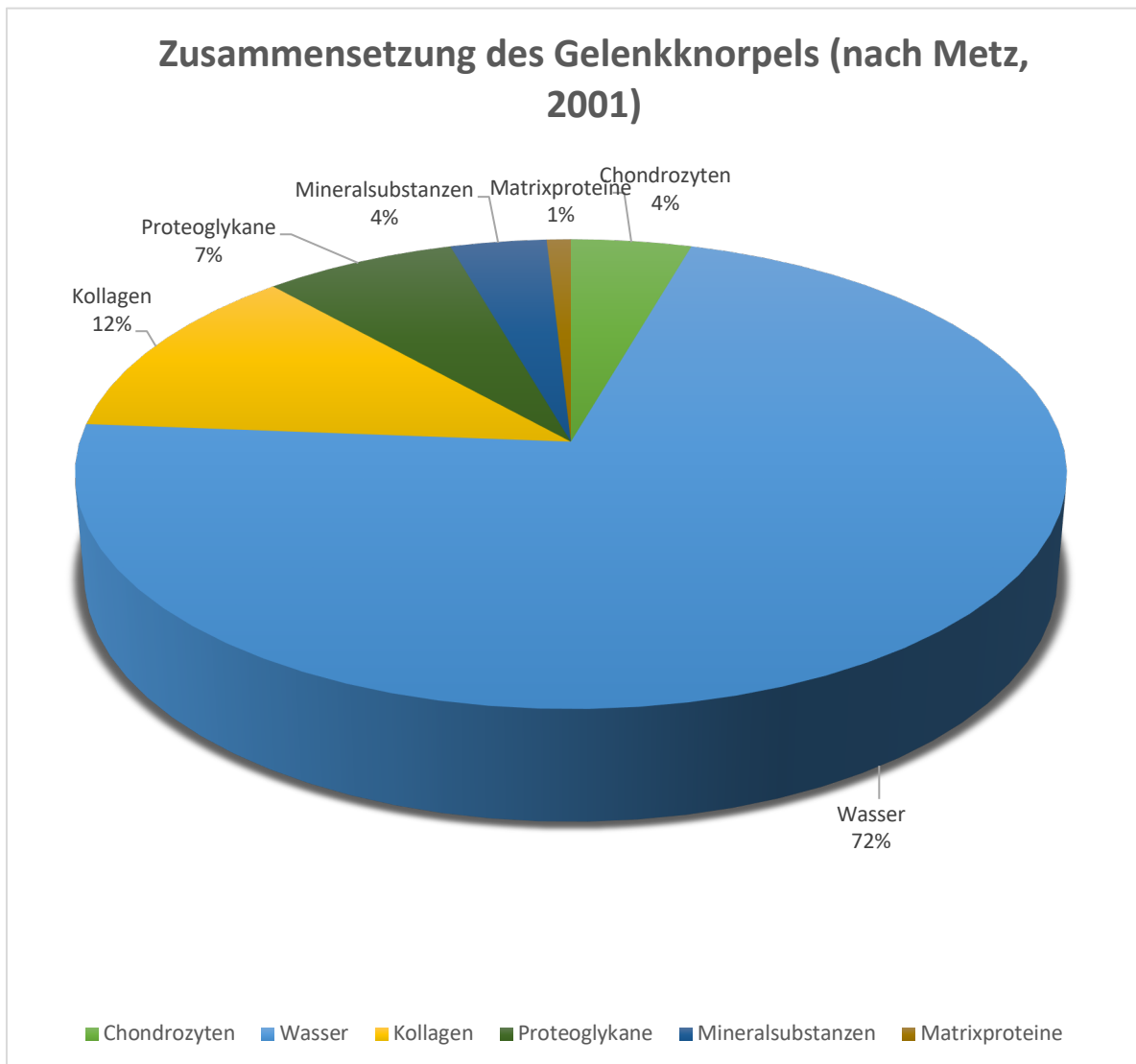


Abb. 1: Gelenkknorpelzusammensetzung (nach Metz, 2001)

Die Kollagenfibrillen sind hauptsächlich Typ II Kollagenfibrillen (10 – 12 %), zum Teil aber auch geringe Mengen an Typ IX und Typ XI Kollagen.² Sie steigen radiär aus der tiefsten Zone auf und sind arkadenartig angeordnet, als sogenannte Benninghoff'sche Arkaden, biegen oberflächlich in eine tangentielle Verlaufsrichtung ab, bevor sie erneut in die unteren Schichten absteigen, wodurch die Fasern in Richtung der stärksten Zugspannung ausgerichtet sind.² Folgende Zonen lassen sich unterscheiden:

1. Tangentialzone
2. Transitionszone
3. Radiärzone
Tide-Mark
4. Kalzifizierte Zone
5. Subchondraler Knochen

Die sogenannte Tide-Mark dient dabei der Trennung von kalzifiziertem Knorpel und nicht-kalzifiziertem Knorpel.³ Diese Zonen leiten sich aus der Anordnung der Kollagenfibrillen bzw. der Chondrozyten ab, was lichtmikroskopisch erkennbar wird. Die oberflächliche, tangentielle Anordnung hat den Vorteil, dass die Kollagenfaserbündelanordnung parallel zur Oberfläche ist und dadurch Stoß abpuffernd wirkt. Die Chondrozyten erscheinen hier spindelförmig.² Die Kollagenfaserbündel ziehen als Benninghoff'sche Arkaden von der Oberfläche bis in die Tiefe zur kalzifizierten Zone und ändern dabei ihre Orientierung.² Aus der Transitionszone ziehen sie in die Radiärzone, die durch chondrozytäre radiäre Säulen gekennzeichnet ist und im Wesentlichen die Dicke des Knorpels bestimmt.² Im Anschluss an die Radiärzone folgt die Tide-Mark, ein verzweigtes Netzwerk aus Kollagenfasern, welches die Kräfteverteilung auf die subchondrale Grenzlamelle übernimmt und so möglicherweise ein Ausreißen der Fasern aus der knöchernen Verankerung zu verhindern vermag.^{2 4} Unterhalb der schmalen Kompakta befindet sich der vaskularisierte, spongiöse Knochen, welcher den avaskulären, darüber liegenden Gelenkknorpel zum Teil mit Nährstoffen mitversorgt.

1.1.2 Pathophysiologie

Der Gelenkknorpel ist zwar anatomisch und histologisch auf eine ausdauernde hohe Belastung ausgerichtet, aber aufgrund zahlreicher weiterer Einflussfaktoren und Lebensumstände bzw. steigendem Bevölkerungsdurchschnittsalter auch dem natürlichen Verschleißprozess ausgesetzt. Hinzu kommen alle möglichen Arten von Schädigung sowie akuten Gelenkverletzungen, die im Zeitverlauf auftreten können. Ebenso können bestimmte Erkrankungen, wie die Osteochondrosis dissecans, den Knorpel schädigen. Da der hyaline Knorpel nur sehr begrenzte Ressourcen zur Eigenregeneration aufweist, münden die Schäden meist früher oder später in eine Osteoarthrose.^{5 6}

Wie bereits erörtert besitzt der hyaline Knorpel keine Blutgefäßversorgung. Dies ist für Defekte, die den subchondralen Knochen nicht erreichen, problematisch, da sie keine zur Reparatur benötigten Chondroprogenitorzellen aus dem Blutgefäßsystem erhalten können, denn diese wandern bei osteochondralen Defekten aus dem Knochenmark über das Gefäßsystem in den Knorpeldefekt ein und induzieren am Ort des Defektareales Reparaturvorgänge.^{7 8} So bleibt ein knochenfernes Defektareal in der Folgezeit erstmal bestehen und wird nicht mit Kollagen I-reichem Faserknorpel aufgefüllt.^{5 9} Knochennahe Defektareale füllen sich mit einem initialen Rupturhämatom, welches über das versorgende Gefäßsystem des Knochenmarks initiiert wird. Darin befinden sich auch die für die Defektheilung wichtigen mesenchymalen Stammzellen (MSCs), welche über verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z.B. den *Platelet-derived growth factor* (PDGF) oder den *Transforming growth factor* (TGF)- β 1 am Defektort zu Chondrozyten differenzieren und dort eine Kollagen Typ I (Col I) faserreiche,

defektausfüllende Knorpelmatrix synthetisieren, allerdings von mechanisch minderwertiger Qualität als eine primär hyaline Matrix.^{9 10 11}

Da der reife Gelenkknorpel von sich aus ein bradytrophes, metabolisch inaktives und kaum zur eigenen Regeneration befähigtes Gewebe ist und die adulten Chondrozyten fest in ihrer extrazellulären Matrix eingebettet sind, besteht die einzige Chance zur Reparatur der Defekte darin, dass der Defekt entweder von selbst den subchondralen Knochen erreicht oder im Rahmen eines operativen Eingriffs der Knochen durch verschiedene Methoden eröffnet wird.

Operative Methoden zur Eröffnung des subchondralen Knochens umfassen die Mikrofrakturierung, die Abrasionsplastik oder die Pridie-Bohrung. Sie erzeugen alle keinen hyalinen Gelenkknorpel, sondern ein biomechanisch und biochemisch minderwertiges Regenerat aus Faserknorpel, welches nicht den hohen Beanspruchungen über die Jahre standhält und im Zeitverlauf zugrunde geht. Somit führen Knorpeldefekte im Verlauf oftmals unweigerlich im betroffenen Gelenk zu einer Arthrose.^{9 12 13} Deshalb wird weiterhin mit Hochdruck in der orthopädischen Grundlagenforschung daran gearbeitet, ein möglichst hochwertiges, Kollagen II-reiches Knorpelregenerat herzustellen, welches den hohen Ansprüchen an die Leistungsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels gerecht wird.

1.2 Arthrose und knorpelrekonstruktive Verfahren

1.2.1 Probleme knorpelrekonstruktiver Verfahren

Knorpelläsionen stellen oftmals den Beginn der Arthrose dar. Sie treten z. B. nach Trauma auf, ebenso wie nach bestimmten Erkrankungen wie der

Osteochondrosis dissecans. Man kann Knorpeldefekte folglich in zwei große Kategorien einteilen: traumatische und degenerative Knorpelläsionen. Letztendlich münden unbehandelte Knorpeldefekte oftmals in einer klinisch manifesten Arthrose. Hat der Patient einen hohen Leidensdruck und haben konservative Therapiemaßnahmen versagt und sind operative gelenkerhaltende Maßnahmen nicht mehr indiziert, besteht als einzige operative Therapiemöglichkeit der endoprothetische Gelenkersatz. Vor dem Gelenkersatz stehen jedoch zahlreiche operative Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Knorpeldefekten zur Verfügung. Bei der Behandlung von Knorpeldefekten besteht, wie bei anderen Organen auch, grundsätzlich immer die Möglichkeit, der Zell- und Gewebetransplantation in das Defektareal. Allerdings kann weder Periost noch Perichondrium transplantiert werden, da dies weder zu guten klinischen Ergebnissen noch zu Beschwerdefreiheit führt.^{9 10 11} Zudem sind die Effekte dieser zellbasierten Therapieverfahren in einigen Fällen auch nicht von langer Dauer. Außerdem wird durch diese Methoden oftmals kein hochwertiges hyalines Knorpelregenerat am Defektort generiert. Darüber hinaus können nur Defekte bis zu einer gewissen Größe behandelt werden.^{9 11 14 15} Ende der 1980er Jahre wurde das Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) kombiniert mit einer Periostabdeckung zur Behandlung von großflächigen Knorpeldefekten am Knie mit guten klinischen Ergebnissen eingeführt.^{16 17 18 19}

^{20 21 22 23} Neuere Generationen der ursprünglichen ACT arbeiten mit dreidimensionalen Matrices, in welche Chondrozyten eingebettet sind.^{23 24 25 26} Zusätzlich existieren auch zellfreie Matrices, die in einen Knorpeldefekt implantiert werden können. Alle diese bereits in klinischer Anwendung

befindlichen knorpelrekonstruktiven Verfahren führen zwar zu einer subjektiven Verbesserung der Beschwerden des Patienten, jedoch induzieren sie kein langlebiges, hyalines Regenerationsgewebe.¹⁶ Dafür sind verschiedene Faktoren verantwortlich. Zum einen gelingt es bei der Knorpelregeneration teilweise nicht, die Zellen ausreichend chondrogen zu differenzieren, zum anderen können chondrogen differenzierte Zellen *in vivo* auch wieder ihren chondrogenen Phänotyp verlieren.^{27 28} Dies liegt zum großen Teil an verschiedenen Mechanismen wie der Inflammation der transplantierten Zellen, der Hypertrophie, der Seneszenz sowie der Apoptose und Nekrose.²⁹ Zum anderen fehlen auch vor Ort im Defektareal die entsprechenden Wachstumsfaktoren in ausreichender Konzentration.^{27 28 30}

1.2.2 Knorpelchirurgische Standardverfahren

Die moderne Knorpelchirurgie hat sich in den letzten Jahrzehnten enorm weiterentwickelt und bietet aktuell eine Vielzahl an operativen gelenkerhaltenden Behandlungsmöglichkeiten dem Patienten an. Zur Einteilung von Knorpeldefekten stehen die ältere Outerbridge-Klassifikation zur Verfügung sowie die neuere International Cartilage Repair Society (ICRS)-Klassifikation von 1988, entwickelt von Bauer et al. Die ICRS-Klassifikation beruht auf dem intraoperativen Befund einer diagnostischen Arthroskopie und teilt Knorpeldefekte dementsprechend nach der Tiefe der Läsion ein.^{31 32} Daraus ergeben sich auch für die einzelnen Therapieverfahren entsprechende Konsequenzen, je nach arthroskopischem Befund. Weiterhin fließen auch andere Faktoren in die Indikationsstellung bei der Behandlung symptomatischer

Knorpeldefekte mit ein, um möglichst differenzierte und individualisierte Therapieentscheidungen für den Patienten treffen zu können. Dabei sind die Lokalisation, Größe, Tiefe und Morphologie des Defektes sowie der Zustand des angrenzenden Knorpels wichtig, ebenso wie mögliche Begleitpathologien. Die Hauptindikation für eine operative Therapiemaßnahme nach Versagen konservativer Therapiemaßnahmen ist dabei eine schmerzhafte Funktionseinschränkung des Kniegelenkes sowie ein damit korrelierender radiologischer und arthroskopischer Befund. Nach aktueller wissenschaftlicher Datenlage ist noch nicht klar, ob durch knorpelrekonstruktive Verfahren das Voranschreiten einer Arthrose verhindert werden kann.^{33 12 14}

Erstgradige Knorpeldefekte nach der ICRS-Klassifikation werden nach der aktuellen Lehrmeinung konservativ mittels Physiotherapie und einer analgetisch-antiphlogistischen Therapie behandelt. Monofokale, kleine ICRS Grad II-Defekte mit bis zu 50 % Läsionstiefe gemessen am intakten Knorpel können durch ein arthroskopisches Débridement operativ versorgt werden. Bei größeren und multifokalen Defekten ist die Knorpelglättung allerdings nicht mehr indiziert, da durch dieses operative Verfahren keine wesentliche Verbesserung der Beschwerden erwartet werden kann. Zudem induziert das Débridement auch kein hyalines Regeneratgewebe. Ab einer Knorpelläsionstiefe von über 50 % (ICRS Grad III-Defekten) kann bei weniger als 2 cm²-Knorpeldefektfläche eine Mikrofrakturierung durchgeführt werden. Dieses einzeitige Therapieverfahren führt zu einer Rekrutierung von MSCs aus dem Knochenmark und induziert dadurch nach Durchbrechung der Grenzlamelle ein fibrocartilaginäres Reparaturgewebe.^{18 19 20} Das Knorpelregenerat besteht überwiegend aus

Kollagen Typ I, weist eine geringe biomechanische Belastbarkeit auf und degeneriert zunehmend nach ca. 24 Monaten.²¹ Ab einer Defektgröße von 2 – 4 cm² (ICRS Grad III) empfiehlt sich als eine gelenkerhaltende Therapieoption nach derzeitigem Wissensstand eine ACT. Die ACT erzeugt ein Regeneratgewebe ähnlich dem des hyalinen Gelenkknorpels, dadurch zeigten sich bei Läsionen über 2 cm² bessere Ergebnisse in klinischen Studien nach dem zweiten Jahr postoperativ im Vergleich zur Mikrofrakturierung.³⁴ Allerdings ist die ACT ein kosten- und zeitintensives zweizeitiges Therapierverfahren. Ab ICRS Grad IV-Defekten mit Beteiligung des Knochens kann die osteochondrale Transplantation (OCT) als Therapieverfahren angewendet werden. Dabei wird ein Knochen-Knorpel-Zylinder mithilfe verschiedener Verfahren aus einem weniger beanspruchten Bereich des Kniegelenkes entnommen und in den Defekt eingesetzt. Dieses osteochondrale Transplantat hat eine hohe Primärstabilität durch die ossäre Einheilung in das Defektareal und somit kann der postoperative Rehabilitationsprozess früh beginnen. Klinische Studien zeigen nach einem Zeitraum von einem Jahr vergleichbare klinische und arthroskopische Ergebnisse in der ACT, der OCT und der Mikrofrakturierung.²⁸ Vergleicht man allerdings das histologische Bild nach zwei Jahren postoperativ zeigt sich hier ein deutlicher Unterschied. Während lichtmikroskopisch bei der ACT ausschließlich ein Faserknorpelregenerat nachweisbar war, zeigte die OCT das histologische Bild eines hyalin-artigen Knorpelgewebes.³⁰

1.2.3 Therapeutische Perspektiven

Neben den eingangs erwähnten knorpelrekonstruktiven Verfahren wie der ACT oder OCT treten zunehmend alternative Stammzell-basierte Therapieverfahren bei der Behandlung von Knorpeldefekten ins Blickfeld. Pelletkulturen, die in dieser Arbeit für die Untersuchung der chondrogenen Differenzierung von MSCs eingesetzt wurden, eignen sich aufgrund ihrer geringen Größe nicht unbedingt für die klinische Anwendung einer *in vivo*-Knorpeldefekttherapie. Es wird daher im Rahmen des Tissue Engineering sowohl an der Entwicklung neuer Biomaterialien als zelluläre Träger als auch an neuen Zellarten wie den MSCs geforscht. Auch Wachstumsfaktoren, die das Potential haben, eine chondrogene Differenzierung zu induzieren, sind Gegenstand der aktuellen Grundlagenforschung.

Die drei großen Forschungsbereiche zur Knorpelgeweberegeneration werden unter der sog. „Tissue Engineering-Triade“ zusammengefasst.^{35 36}

1. Biomaterialien bzw. Scaffolds als Trägersubstanz der Zellen
2. Multipotente, mesenchymale Stammzellen (MSCs) mit chondrogenem Differenzierungspotential
3. Biochemische Mediatoren und Induktoren der Chondrogenese

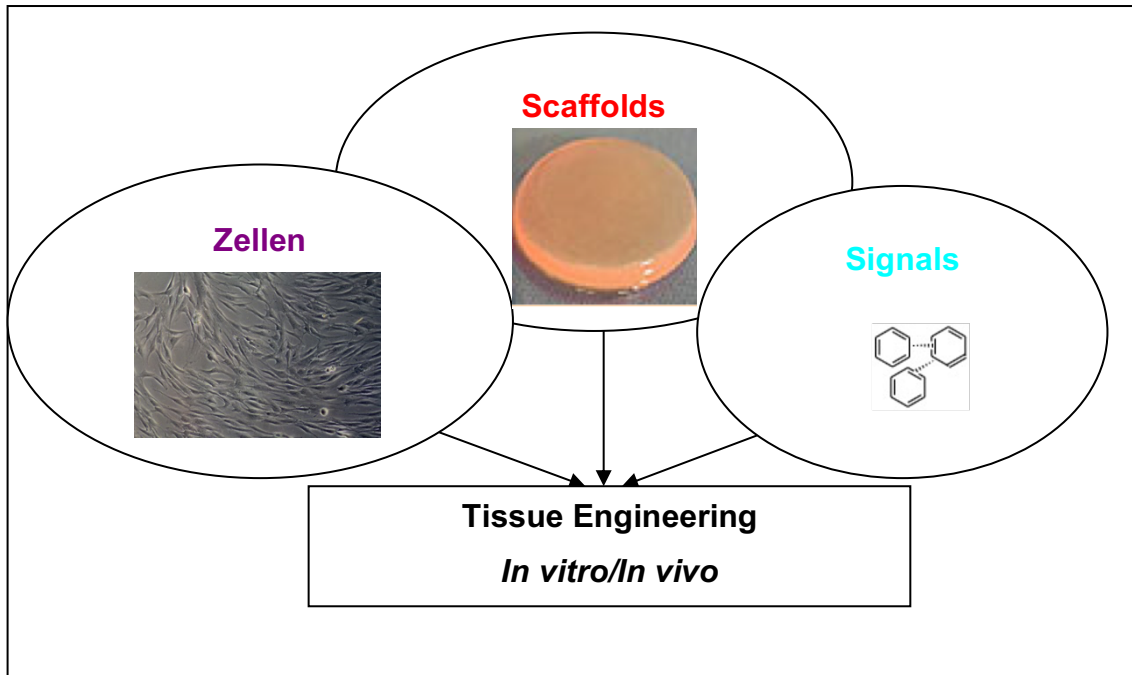


Abb. 2: Die klassische Triade des Tissue Engineering besteht aus Zellen, Extrazellulärmatrix und Signalkaskaden.

Um eine klinische Anwendung von MSCs-basierten Ansätzen zur Knorpelregeneration zu entwickeln, ist eine Kombination von MSCs mit einer vorteilhaften 3D-Mikroumgebung erforderlich, die eine geeignete Kombination von Biomaterialien mit spezifischen Differenzierungsfaktoren enthält.⁷ Verschiedene zu diesem Zweck untersuchte Biomaterialien umfassen synthetische oder natürliche Polymere, die den Verlust transplanteder Zellen verhindern und die natürliche Struktur des Gelenkknorpels simulieren, um die Chondrogenese zu fördern.⁷ Unter diesen halten Hydrogele große Mengen Wasser zurück und ahmen so die hochhydratisierte, extrazelluläre Matrix (ECM) im hyalinen Knorpel nach.^{8 11} Obwohl natürliche Hydrogele, wie die von Kollagenfasern gebildeten, nicht stabil genug sind, bieten sie die Vorteile einer hohen Biokompatibilität und biologischen Abbaubarkeit.^{8 31 32} Insbesondere Kollagen Typ-I-Hydrogele sind aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit und sicheren

Anwendung *in vivo* als Gerüst bei der Knorpelreparatur auf Zellbasis immer beliebter.^{12 13 33}

Das Tissue Engineering zusammen mit der Knorpelzelltherapie besitzen das größte therapeutische Entwicklungspotential für die Behandlung von Knorpelläsionen und eröffnen in Zukunft neue Therapieoptionen für den Patienten.

1.3 Gentherapie zur Knorpelregeneration

1.3.1 Zellen

Nach aktueller Studienlage ist langfristig durch die derzeit angewendeten Knorpeltherapieverfahren keine gesicherte Prävention der Osteoarthrose möglich. Aktuell schon gewinnen das Tissue Engineering zusammen mit zelltherapeutischen Ansätzen eine zunehmende Bedeutung bei der Behandlung symptomatischer Knorpelläsionen. MSCs aus dem Knochenmark und anderen Quellen stellen eine attraktive Alternative zu Chondrozyten für zellbasierte Knorpeltherapieansätze dar.³⁷ Dabei können adulte MSCs *ex vivo* unter Laborbedingungen kultiviert und in ein dreidimensionales Gelkonstrukt (Trägermaterial) eingebracht werden.^{38 39 40}

MSCs gehören zu den multipotenten Vorläuferzellen, aus denen Knorpel-, Knochen-, Sehnen-, Muskel-, Fett- und Nervengewebe entsteht.^{41 42 43 44 45 46}

MSCs können einfach aus dem Knochenmark gewonnen und unkompliziert kultiviert werden.^{29 41 47 48 49 50} *In vivo* wird ihre Differenzierung durch Signale aus dem angrenzenden Milieu gesteuert, *in vitro* wird dies durch spezifische

Kulturbedingungen getriggert. Die International Society for Cellular Therapy (ISCT) hat zur besseren Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Studien für die aus dem Knochenmark isolierten MSCs bestimmte Kriterien festgelegt.^{52 53} Dazu zählen die folgenden drei wichtigen Kriterien: Plastikadhärenz, Multipotenz sowie die Expression bestimmter spezifischer Oberflächenantigene. Konkret bedeutet dies, dass die isolierten Zellen plastikadhärent unter Standardkulturbedingungen in Zellkulturflaschen kultivierbar und multipotent adipogen, chondrogen und osteogen differenzierbar sein müssen.^{52 53 54} 95 % der adhärennten Zellpopulation sollten zudem die stammzellspezifischen Oberflächenmarker CD105, CD73 sowie CD90 exprimieren, die Prozentzahl der CD45 und CD34 positiven Zellen, welche hämatopoetische Marker darstellen, sollten weniger als 2 % betragen.⁵²

53

Für die zellbasierten Verfahren des Tissue Engineerings eignen sich MSCs deshalb besonders gut, weil sie einerseits ein ausgeprägtes Differenzierungspotential besitzen und andererseits gut zugänglich und sehr einfach zu isolieren und kultivieren sind.⁵⁵ Bereits 1998 ist es Johnstone et al. gelungen, Kaninchen-MSCs *in vitro* mithilfe von TGF- β 1 chondrogen zu differenzieren.^{50 56} Besonders die aus dem Knochenmark isolierten Stammzellen lassen sich hervorragend chondrogen differenzieren.^{57 58 59} Um langzeitstabilen, therapeutisch nutzbaren, hyalinen Gelenkknorpel zu generieren, ist es von zentraler Bedeutung, am Defektort entsprechende Milieuvoraussetzungen zu erzeugen, welche die Chondrogeneseinduktion bewirken sowie für den Erhalt des hyalinen Phänotyps sorgen und die hypertrophe Enddifferenzierung verhindern.^{29 60 61} Zum besseren Verständnis dieser komplexen Vorgänge ist es

sinnvoll, die verschiedenen Stadien der Skelettentwicklung mit genau aufeinander folgenden und abgestimmten Phasen während der enchondralen Ossifikation genauer zu beleuchten, um einen besseren Überblick der Chondrogenese auch in Bezug auf die *in vivo*-Kultivierung zu bekommen.^{51 56} Hier bietet das häufig verwendete Pelletkultursystem die Möglichkeit, den Vorgang der Chondrogenese während der Differenzierung von MSCs anschaulicher darzustellen.⁶²

Zusätzlich zu der Auswahl adäquater Wachstumsfaktoren sowie eines geeigneten Bereitstellungssystems der Faktoren gibt es ein weiteres zentrales Hindernis, die chondrogene Hypertrophie. In zahlreichen Vorversuchen, auch aus unserer eigenen Arbeitsgruppe, wurde bereits gezeigt, dass durch die Verwendung der BMPs (*Bone morphogenetic proteins*), wie z. B. BMP-2, BMP-4, oder auch durch die Verwendung von TGF- β 1, dem wohl bekanntesten Mitglied der *Transforming Growth Superfamilie*, MSCs nicht nur chondrogen differenziert werden können, sondern im Knorpeldefekt auch unerwünschte Erscheinungen, wie hypertropher Blasenknorpel, apoptotische und zugrunde gegangene Chondrozyten sowie Ossifikationen der Matrix und Lakunenbildung, toleriert werden müssen.^{29 63 64 65 66 67} Während diese Phänomene normalerweise in der Epiphysenfuge im Laufe der fetalen Entwicklung als physiologisch angesehen werden, so sind sie *in vivo* in einem Knorpeldefekt nicht erwünscht, so dass hier zunehmend Faktoren an Bedeutung gewinnen, die diese Effekte unterdrücken und ausschließlich hyalines Knorpelgewebe generieren sollen.^{29 68 69 70 71}

1.3.2 Signalmoleküle und Differenzierungsfaktoren

Während der enchondralen Ossifikation sind in der Epiphysenfuge verschiedene Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren an der Differenzierung und Proliferation der Chondrozyten beteiligt.^{72 73} Diese bestimmten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren scheinen entscheidend in den chondrogenen Differenzierungsprozess der MSCs einzugreifen.^{74 75 76 77} Entsprechende Faktoren wurden sehr ausführlich und in zahlreichen Vorarbeiten unserer sowie auch anderer Arbeitsgruppen untersucht, allen voran TGF- β 1, das bedeutendste Mitglied der TGF-Superfamilie. Andere in diesem Zusammenhang vielversprechende Kandidaten sind z. B. der *Insulin-like growth factor* (IGF-1), Mitglieder der BMP-Familie, der *Platelet derived growth factor* (PDGF), der *Fibroblast growth factor* (FGF)-Familie sowie Hypertrophie-Modulatoren wie den in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktor SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9) oder auch Indian Hedgehog (IHH) und Parathyroid hormone-related protein (PTHrP).^{63 72 73 78 79 80} Die Differenzierung von MSCs in Richtung eines chondrogenen Phänotyps erfordert nicht nur die Abgabe von chondrogenen Wachstumsfaktoren, sondern auch eine spezifische Stimulation, die eine Vielzahl von Variablen wie Hypoxie und mechanische Belastung umfassen kann.⁸¹ In diesem Zusammenhang wurde der zonalen Organisation von Neoknorpelgewebe in Abhängigkeit von dem verwendeten spezifischen Differenzierungsfaktor relativ wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Obwohl bei Verwendung dieser Faktoren unter bestimmten Bedingungen *in vitro* eine chondrogene Induktion erreicht werden konnte, gibt es trotzdem einige Hindernisse wie z. B. *in vivo* ausreichend hohe und über einen längeren Zeitraum

anhaltend stabile Konzentrationen der Faktoren zu erreichen. Zusätzlich stellen hypertrophe Chondrozyten ein weiteres Problem dar, denn sie bilden zwar eine Matrix, die jedoch Typ X-kollagenreich ist und osteogene Markergene exprimiert.⁸² Um Probleme im Zusammenhang mit der Abgabe und Auswahl chondrogener Faktoren anzugehen, haben wir und andere Arbeitsgruppen neue Ansätze für die Abgabe von Wachstumsfaktoren an MSCs entwickelt, um eine chondrogene Differenzierung zu induzieren.^{63 83 84 85} Insbesondere die Kombination aus adenoviralem Gentransfer mit geeigneten Faktoren stellt einen vielversprechenden Ansatz dar. Das Problem der chondrogenen Hypertrophie *in vitro* und der anschließenden osteogenen Differenzierung innerhalb von Knorpeldefekten *in vivo* bleibt jedoch bei Faktoren wie TGF- β 1, BMP-2, BMP-4 und IHH ein Problem. Da SOX9 ein Transkriptionsfaktor ist und nur über gentherapeutische Ansätze abgegeben werden kann, bestand das Ziel dieser Studie darin, die Auswirkungen der adenoviralen Abgabe von SOX9 auf die Chondrogenese von MSCs im Vergleich zu TGF- β 1 oder IGF-1 allein oder im Vergleich zu Kombinationen der obengenannten Faktoren zu untersuchen. Zusätzlich war es unser Ziel das Ausmaß der Hypertrophie durch die Wahl des Transgens oder durch das Ausmaß der Transgenspiegel in einer etablierten *in vitro*-Aggregatkultur zu untersuchen.

1.3.3 Vektoren

Bei der chondrogenen Differenzierung von MSCs innerhalb des Knorpeldefektes stellt die mangelnde Bereitstellung der Wachstumsfaktoren ein großes Problem dar. Auf der Oberfläche von somatischen Zellen gibt es überwiegend keinen

Rezeptor oder Transportersysteme für DNA, somit kann zellfremdes Genmaterial nicht spontan von einer Zelle aufgenommen und exprimiert werden. Nur wenige Zellarten, wie z. B. Myoblasten oder Hepatozyten, besitzen die sehr begrenzte Fähigkeit, pure DNA mit gewisser Effizienz aufzunehmen. Daher müssen zur Einführung eines ablesbaren Gens Vektoren verwendet werden. MSCs können dabei als Träger chondroinduktiver Gene in der zellbasierten Gentherapie fungieren. Die benötigte cDNA wird mittels spezieller Vektoren auf die MSCs übertragen und somit sind diese Zellen *in vivo*, also direkt vor Ort, in der Lage, ihre eigenen benötigten Wachstumsfaktoren zu synthetisieren.⁸⁶ Evans et al. haben die Gentherapie erstmals zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis klinisch eingesetzt.^{87 83 88} Darüber hinaus wurden gentherapeutische Methoden auch in zahlreichen tierexperimentellen Studien näher untersucht.^{63 89}

⁹⁰ Ganz grundsätzlich kann man zwei Arten des Gentransfers unterscheiden, den viralen und den nicht-viralen Gentransfer. Nicht-virale Vektoren haben den großen Vorteil, dass sie kostengünstig und relativ einfach anzuwenden sind, außerdem grundsätzlich mit weniger Sicherheitsbedenken assoziiert sind, jedoch *in vivo* immunogen wirken können und grundsätzlich weniger effizient sind, bezogen auf die Transduktionsquote.⁶³ Der nicht-virale Gentransfer kann grob in physikalische und chemische Verfahren unterteilt werden. Zu den physikalischen Methoden werden die Elektroporation, Sonoinkorporation, die DNA-Mikroinjektion, *magnet assisted Transfection* oder die *particle gun* gezählt. Zu den chemischen Methoden werden vor allem Vektoren auf Liposombasis sowie Vektoren auf Polymerbasis, Nanopartikel sowie Calciumphosphat-Präzipitationen gezählt. Vektoren auf Liposombasis weisen jedoch auch

zytotoxische Merkmale auf und die Transduktionsrate ist geringer. Es existieren jedoch auch *in vivo*-Studien, welche eine ausreichende Proteinexpression in einer liposomtransfizierten Zelle belegen.^{63 91 92} Trotz deutlich geringerer Transduktionsraten der physikalischen und chemischen Methoden, wirken sie sich somit weniger negativ auf die Zellvitalität und die Multipotenz der transfizierten Zellen aus. Zudem weisen sie im Gegensatz zu den verschiedenen viralen Vektoren auch eine fehlende Infektiosität auf.^{63 91}

Der bislang wirkungsvollste Weg zur Einführung genetischer Information in die Zielzellen ist der Gentransfer mit Hilfe eines viralen Vektors. Zu der natürlichen Verbreitungsstrategie von Viren gehört die Fähigkeit, ihr Erbgut in das der Wirtszelle zu integrieren. Um Viren für die Gentherapie verwenden zu können, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Sie müssen in der Lage sein, die Zellen weiterhin zu infizieren, ohne sich aber in diesen selbständig zu vermehren. Sonst könnten sie für den Wirtsorganismus zur Gefahr werden. Um ein Virus in einen Vektor umzufunktionieren, ersetzt man jenen Teil des Erbguts, der für die Vermehrung und die Pathogenität zuständig ist mit dem Gen, das man in die Zielzellen einschleusen möchte. Erreicht der Vektor die Zielzelle, schleust er das therapeutische Gen in den Zellkern der Wirtszelle ein, in der die genetische Information abgelesen werden kann. Eine Vielzahl von Viren wurde auf ihren potenziellen Nutzen für die Gentherapie hin untersucht. Beim viralen Gentransfer kann man auf verschiedene Virusfamilien zurückgreifen. Die Vektoren stammen z. B. von *Adeno-assoziierte-Viren* (AAV), *Herpes Simplex Viren*, *Moloney murine Leukemia Viren* (MoMLV) und *Retroviridae* ab. Aus der Familie der *Retroviridae* werden oft Lentiviren oder Foamyviren als Vektoren

herangezogen, diese unterliegen jedoch höheren Sicherheitsbeschränkungen und sind somit in der Handhabung wesentlich umständlicher.

Man unterscheidet zwei Klassen von Virusvektoren, solche, die ihr genetisches Material in das Chromosom der Zelle integrieren (integrierende Vektoren) und sogenannte nicht-integrierende Vektoren. Im Gegensatz zu den integrierenden Vektorsystemen, stellen nicht-integrierende Vektorsysteme ihre virale DNA als Episom im Zellkern der Wirtszellen ab, die eingebrachte Information wird abgelesen und das Genprodukt synthetisiert. Teilt sich allerdings die infizierte Zelle, so wird beim Kopiervorgang der Erbinformation das zusätzliche Gen nicht mitberücksichtigt. Die eingeschleuste Information geht mit zunehmenden Zellteilungen verloren, was den langfristigen Therapieeffekt bei nicht-integrierenden Vektoren einschränkt. Lentiviren beispielsweise, zu denen auch das HIV-1 und HIV-2 gehören, sind potentiell durch Integration in das Wirtsgenom mutagen und eignen sich nur bedingt zur klinischen Anwendung.⁹³

Adeno-assoziierte-Viren (AAV) sind nicht-integrierend, können hochtitrig kultiviert werden und werden klinisch bereits erfolgreich angewendet, da sie sowohl mit einer hohen Transduktionseffizienz verschiedenste sich teilende und nicht-teilende Zellarten *in vitro* und *in vivo* infizieren als auch langzeitstabile, hohe Transgenexpressionsraten erzeugen, was sie zu einem hervorragenden Kandidaten für die klinische Anwendung macht.⁶³

Für unsere *in vitro*-Arbeit haben wir Adenoviren verwendet. Sie sind 60-90 nm große, nicht-behüllte, doppelsträngige DNA-Viren der Gattung Mastoadenovirus, mit ca. 50 serologisch unterscheidbaren Subtypen. Sie besitzen ein ikosaedrisches Kapsid aus Penton- und Hexonkapsomeren, welche aus vielen

verschiedenen Proteinen aufgebaut sind. Im Inneren des Kapsids liegt das 32-36 Kilobasenpaare (kbp) lange, virale Genom in linearer Form vor.⁹⁴ Die humanpathogenen Adenoviren verursachen beim Menschen die Keratoconjunctivitis epidemica, eine hochansteckende Bindehautentzündung des Auges, oder Infektionskrankheiten der Luft- und Atemwege, wie z. B. Rhinitis, Pharyngitis oder Bronchitis bis zur Pneumonie oder das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) bei immunsupprimierten Patienten. Auch eine Zystitis sowie Gastroenteritis mit Durchfällen kann durch Adenoviren verursacht werden.⁹⁵ Vektoren, die auf dieser Virusart basieren, können teilungsfähige und nicht-teilungsfähige Zellen gleichermaßen gut infizieren. Die Transgenexpression ist aufgrund der Tatsache, dass es sich hier um ein nicht-integrierendes Vektorsystem handelt, transient. Adenoviren können in hohen Titern, von bis zu 10^{14} infektiösen Partikeln/ml, relativ einfach hergestellt werden. Bei der Infektion der Wirtszelle schleusen sie das virale Genom in Form eines Plasmids in den Zellkern ein und lagern es dort als Episom ab, ohne dabei in das Wirtsgenom zu integrieren und es durch die sog. Insertionsmutagenese zu verändern.⁶³ Während der Mitose einer infizierten Zelle wird die im Episom eingelagerte virale DNA nicht mitabgelesen, so dass die Transgenexpression im Zeitverlauf abnimmt. Diese Gegebenheit des nicht-integrierenden Vektorsystems beeinflusst und schränkt somit den langfristigen Therapieeffekt ein.⁹⁶

Es gibt drei verschiedene Generationen, abhängig von der Anzahl der viralen Gene, die inaktiviert wurden. Die erste Generation ist defizient für 1 bis 2 virale Gene und wurde bereits in verschiedenen klinischen Studien angewendet. Ein großer Nachteil ist allerdings ihre starke Immunogenität sowie bei hohen Dosen eine

Zytotoxizität in *in vivo*-Versuchen.⁹⁶ Wenn hohe therapeutische Viruskonzentrationen verabreicht werden, kann es zur systemischen Immunreaktion des Wirtsorganismus mit Multiorganversagen kommen. Eine weitere Ausschaltung von viralen Genen in Vektoren der zweiten Generation, reduzierte zwar die Immunogenität, eliminierte sie aber nicht. Dies gelang erst bei der dritten Generation durch vollständige Elimination der kodierenden viralen Sequenzen aus dem Virusgenom. Diese Vektoren weisen bis zu 35 Kilobasenpaare (kb) Speicherkapazität auf, ihre Herstellung ist jedoch im Vergleich zu den früheren Generationen aufwendiger. Rekombinante Adenovektoren können mit verschiedenen Verfahren hergestellt werden. Die von uns verwendeten Vektoren wurden in Cre8-Zellen mittels Cre/loxP-Rekombination kloniert. Die viralen Replikationsfunktionen bleiben erhalten, ihre „Packing“-Eigenschaft wird jedoch hierbei ausgeschaltet, d. h. sie verfügen nicht mehr über die Eigenschaft des Wildtyps, ihre, in der infizierten Wirtszelle replizierte, DNA auszuschleusen, um wiederum neue Zellen mit den Partikeln zu infizieren. Unsere „Gutless“- oder „High capacity“-Vektoren enthalten zudem keine kodierenden viralen Sequenzen und benötigen ein Rekombinationsplasmid und eine Helferzelllinie. Diese liefert die notwendigen Proteine für die virale Replikation.

1.4 SOX9 Rolle in der Chondrogenese

1.4.1. Der Transkriptionsfaktor SOX9

20 verschiedene humane SOX-Gene sind derzeit bekannt, unterteilt in 9 Untergruppen. Auf dem langen Arm (q) des Chromosom 17 befindet sich das SOX9 Gen, welches 5,4 Kilobasen (kb) groß ist und für einen Transkriptionsfaktor aus 509 Aminosäuren kodiert. SOX9 gehört in die Untergruppe E der *SRY-related high-mobility group* [HMG] box (SOX) Transkriptionsfaktorenfamilie.⁹⁷ Alle Familienmitglieder besitzen eine aus 79 Aminosäuren aufgebaute, für die Interaktion mit der DNA nötige Bindungs- und Biegungsdomäne, die als HMG (*high mobility group*)-Box bezeichnet wird.^{98 99 100} Diese stimmt größtenteils mit der HMG-Box des Transkriptionsfaktors SRY überein. Da diese auf dem Y-Chromosom kodierte Box zuerst entdeckt wurde, diente sie der Namensgebung.^{97 101 102} Die Box transportiert SOX9 auch in den Zellkern und exportiert diesen wieder ins Zytoplasma.¹⁰³ Zusätzlich beeinflussen noch viele weitere Faktoren, Enzyme und andere Komponenten die SOX9-Transkriptionsaktivität. SOX9 bindet gemeinsam mit weiteren Faktoren im Intronbereich des Kollagen II-Gens. Dort gibt es gleichzeitig mehrere Bindungsstellen für die HMG-Box, so kann z. B. die Transkriptionsaktivität deutlich gesteigert werden.^{98 104 105 106} Die Aktivität von SOX9 wird zudem von posttranslationaler Modifikation, z. B. durch Phosphorylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung reguliert, aber auch die Bindeaffinität und Expression selbst wird zusätzlich durch verschiedene Wachstums- und Transkriptionsfaktoren gesteuert.^{107 108} Ferner haben auch bestimmte MAPK-Aktivierungsprozesse Einfluss auf die mRNA-Stabilität von SOX9 nach Transkription.¹⁰⁹ Anhand dieser diversen Co-faktoren und (post-)transkriptioneller bzw. (post-)translationaler

Regulationsmechanismen von SOX9 kann man auf dessen bedeutende Rolle in der Differenzierung und Entwicklung verschiedenster Gewebearten schließen.

1.4.2 SOX9 in der Embryogenese

SOX9 Expression findet während der Embryonalentwicklung in verschiedenen Gewebetypen und Zellen, ganz allgemein findet man SOX9-Expression in Anlagen, die am Skelettaufbau beteiligt sind, also Sklerotomen, im Kopfmesenchym, im lateralen Plattenmesoderm und in auswandernden Neuralleisten-Zellen^{110 111 112} Auf zellulärer Ebene betrachtet ist die Expression speziell in Chondrozyten und deren Vorläuferzellen hoch. Auch in den Epithelien der Genitalleiste, die später zu den männlichen Gonaden differenzieren, in Herz Pankreas und Nieren, den Ohrenanlagen, im Verdauungstrakt und in der Neuralleiste konnte eine Expression gezeigt werden.^{110 111 112 113} 1971 beschrieben ein deutscher und ein französischer Kinderarzt und Genetiker erstmalig eine gebogene Fehlbildung des Skelettsystems Neugeborener, die als Kampomelie bezeichnet wurde.^{114 115 116} Als Ursache für diese Fehlbildung wurden Mutationen im kodierenden Gen für den Transkriptionsfaktor SOX9 gefunden.¹¹⁷ Diese autosomal-dominante oder de novo-Mutation tritt mit einer Häufigkeit von 0,5 bis 20 pro 100.000 Geburten auf. Nahezu alle aus Knorpelvorstufen entstehenden Skelettanteile sind zum Teil stark deformiert. Als Leitsymptom gelten die verkürzten und gebogenen Röhrenknochen von Unter- und Oberschenkel mit nachfolgendem Zwergwuchs. Zusätzlich treten Deformitäten von Händen und Füßen, Scapulae, Wirbelkörper, ein Glockenthorax mit nur 11 Rippenpaaren und Beckengürteldeformationen auf.

Typisch sind auch faziale Dysmorphien in Form von Gaumenspalten, Mikrognathien und ein überproportional großes Neurokranium.^{114 118} Kardiale Fehlbildungen sowie Fehlbildungen der Nieren, des zentralen Nervensystems und der Gonaden finden sich häufig begleitend. Der Nasen-, Larynx-, Trachea- und Bronchienknorpel ist funktionsdefizient, folglich sterben über 90 % der Neugeborenen mit Kampomelie am akuten respiratorischen Versagen bereits kurz nach der Geburt. Die Gonaden sind bei dreiviertel aller männlichen Patienten mit XY-Genotyp nicht entsprechend diesem ausgebildet, sondern weisen einen weiblichen Phänotyp auf.^{112 117 118} Beachtet man den komplexen Vorgang der Geschlechtsdifferenzierung, fällt ein Zusammenhang bei der Regulation der Genexpression zwischen SOX9 und dem Anti-Müller-Hormon auf. Die Expression beider Faktoren findet in den Sertoli-Zellen des Hodens statt, wobei ein SOX9-/Steroid-Faktor-1 (SF-1) Proteinkomplex die Expression des Anti-Müller-Hormons reguliert.¹¹⁹

1.4.3 SOX9/GFP Masterregulator der Chondrogenese

Die Chondrogenese beschreibt den Prozess der mehrstufigen Entstehung von Knorpel während der Embryogenese und dient beispielsweise der Entstehung von langen Röhrenknochen und der Skelettentwicklung. Wie bereits erwähnt, wird SOX9 in den verschiedensten Zelltypen und Strukturen exprimiert, insbesondere z. B. in Chondrozyten und ist hierzu maßgeblich bei der Differenzierung von MSCs aus dem Kondensationsstadium zu Chondrozyten beteiligt.⁷²

Die Unterteilung erfolgt in drei Hauptschritte:

1. MSC-Aggregation und Kondensation.
2. Chondrozytendifferenzierung und Reifung.
3. Entstehung von hypertrophen Chondrozyten und Ersatz durch Knochen.

Diese Hauptdifferenzierungsschritte werden von SOX9 maßgeblich gesteuert und sind unverzichtbar bei der Entstehung von funktionsfähigem Knorpel- und Knochengewebe.¹²⁰ Dazu zählen zum Beispiel die Knorpelanlagen des Beckens, Wirbelkörpern, Rippen, Scapulae, von langen Röhrenknochen, wie z. B. Femur und Tibia, aber auch in Nasopharynx- und Bronchialknorpel. Vor allem MSCs im Kondensationsstadium sowie proliferierende Chondrozyten exprimieren SOX9.⁷² Zudem steigert SOX9 selbst die Synthese essentieller, knorpelspezifischer Matrixproteine, wie bereits in zahlreichen Publikationen gezeigt wurde.^{70 72 121} Beispielsweise konnte die Coexpression von SOX9 und Kollagen II sowohl während der Embryogenese in unreifen, mesenchymalen Kondensaten, welche als Knorpelvorstufe dienen, als auch in reifen Knorpel-elementen nachgewiesen werden.^{110 111} Auch *in vivo* in transgenen Mäusen konnte dieses Ergebnis reproduziert werden.^{104 106 122} Zudem reguliert SOX9 die Expression weiterer wichtiger Bestandteile der Knorpelmatrix wie Aggrecan, Kollagen XI und Noggin und ist für die Kondensation, Differenzierung und Reifung zu Chondroblasten unerlässlich.^{62 123 124 125 126} Zudem ist SOX9 ein entscheidender Inhibitor der hypertrophen Umwandlung der proliferierenden Chondrozyten.^{127 128} So bleibt z. B. die SOX9-Expression in proliferierenden Chondrozyten der Epiphysenfuge bestehen und ebenso in Chondrozyten der persistenten Knorpel-elemente, welche auch für die die Balance zwischen Auf- und Abbau der Knorpelmatrix verantwortlich sind.¹²⁹ Schlussendlich wird die SOX9-Expression in der

Hypertrophiezone der Epiphysenfuge eingestellt.^{112 110 111} SOX9 gilt daher aus den oben genannten Gründen als ein Hauptregulator der Chondrogenese.¹²⁸

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
4', 6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Invitrogen, Deutschland
Aceton	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Aquatex®	Merck KGaA, Deutschland
Agar	Merck KGaA, Deutschland
Agarose	Bioline GmbH, Deutschland
Alcian Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Amylacetat	Merck KGaA, Deutschland
Antikörper-Verdünnungspufferlösung	DCS, Deutschland
Benzonase	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Cäsiumchlorid	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
dNTP-Mix	Bioline GmbH, Deutschland
Dulbecco's Phosphat-gepuffertes Pulversalz (PBS)	Biochrom AG, Deutschland
Entellan	Merck KGaA, Deutschland
Eosin	Merck KGaA, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Deutschland
Ethanol	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Ethanol (denaturiert)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Tetranatriumsalzhydrat	Calbiochem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Fluoromount-G™	SouthernBiotech, durch Biozol, Deutschland
Formaldehyd	Merck KGaA, Deutschland
HPLC-Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Hydrochloridsäure	Merck KGaA, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

ITS-plus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Kernechtrot	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Ascorbatsäure-2-Phosphat Sesquimagnesiumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
LE-Agarose	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Levamisol	DakoCytomation GmbH, Deutschland
Maus Serum	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Methanol	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Natriumhydroxidlösung	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Natriumiodid	Merck KgaA, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Paranitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
PBS Dulbecco mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Pferdeserum	PAA Laboratories GmbH,
Prolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Rainbow Marker	GE Healthcare, Deutschland
Random Hexamere	GE Healthcare, Deutschland
Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Roti-Quand für Proteinbestimmung nach Bradford	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Salpetersäure 65% (ultrarein)	Merck KGaA, Deutschland
SDS	Merck KGaA, Deutschland
TEMED	Merck KGaA, Deutschland
Tris-HCL	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trisbase)	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Tween 20	Merck KgaA, Deutschland
Zitronensäure	Merck KGaA, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland

Tab. 1: Hersteller Chemikalien.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

20-Gauge-Nadel	Fa. B. Braun, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
96-well Assay-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Deckglässchen	Marienfeld Laboratory Glasware durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Dialyseschlauch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Glass Objektträger	Marienfeld Laboratory Glasware, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Glass Pasteurpipetten	A. Hartenstein GmbH, Deutschland
PCR-Gefäße	Biozym, Deutschland
Pipettenspitzen	Brandt, durch Laug & Scheller GmbH, Deutschland
Plastikpipetten (serologisch)	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Skalpell	Bayha, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Sterile Filter (0,2 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
UV-Küvetten Uvette	Eppendorf AG, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 150 cm ²)	TPP, durch Biochrom AG, Deutschland
Zellkulturflaschen (175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 96-well)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellsiebe (70 µm)	BD Falcon, durch A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 2: Hersteller Verbrauchsmaterialien.

2.1.3 Zellkulturmedien und -zusätze

DMEM/Ham's F-12 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
DMEM/High Glucose mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Dexamethason (1 mM)	In Ethanol, in Teilproben bei -80°C gelagert
ITS+1 Liquid Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
L-Ascorbatsäure-2-Phosphat Sesquimagnesiumsalz (50 mg/ml)	In A. dest., steril gefiltert, in Teilproben bei -20°C gelagert
Natriumpyruvat (100 mg/ml)	In A. dest., steril gefiltert, in Teilproben bei -20°C gelagert
Prolin (40 mg/ml)	In destilliertem Wasser, steril gefiltert, in Teilproben bei -20°C gelagert

Chondrogenes Differenzierungsmedium	DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 50 µg/ml L-Ascorbinsäure-2-Phosphat 1 mM Dexamethason 100 mg/ml Natriumpyruvat 40 ng/ml Prolin ITS+1 Liquid Media Supplement (100x)
Stammzellmedium (SCM)	DMEM/Ham's F-12 mit L-Glutamin 10% fetales Rinderserum (FBS) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 50 µg/ml L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

Tab. 3: Zellkulturmedien und deren Zusätze mit Herstellerangabe.

2.1.4 Zelltypen

Zelltyp	Hersteller
Cre8-Zellen	S. Hardy et. al.
Escherichia coli C600	ATCC No. 23724 (American Type Culture Collection); Manassas, VA, USA
HEK-293-Zellen	DSMZ, ATCC No. 305, Deutschland

Tab. 4: Wirtszellen mit Herstellerangabe.

2.1.5 Antikörper

Antigen	Vorverdau	Hersteller
Chondroitin-4-Sulfat	Chondroitinase ABC (5 U/ml), Sigma	Millipore GmbH, Deutschland
Kollagen Typ II	Pepsin (1 mg/ml), Sigma	Acris, Deutschland
Kollagen Typ X	0,25% Trypsin, Sigma	Calbiochem, Deutschland

Tab. 5: Antikörper Immunhistologie.

Antigen	Art	Hersteller
SOX9	SOX9 monoclonal mouse antibody	Acris, Deutschland

Tab. 6: Antikörper Westernblot.

2.1.6 Enzyme

2,5% Trypsin (10x konzentriert)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
BioScript Reverse Transkriptase	Bioline GmbH, Deutschland
Collagenase NB4	Serva Electrophoresis, Deutschland
MangoTaq DNA-Polymerase	Bioline GmbH, Deutschland

Tab. 7: Enzyme mit Herstellerangabe.

2.1.7 Transgene der Adenovirusvektoren

Gen	Sequenz ID der Gen-Bank	Hersteller/Bezugsquelle
IGF-1	NM_000618.5	C. Evans, Boston RA, USA
Jellyfish-GFP	LN515608.1	C. Evans, Boston RA, USA
SOX9	NM_000346.4	C. Evans, Boston RA, USA
TGF-β1	NM_000660.7	C. Evans, Boston RA, USA

Tab. 8: Vektor-cDNA mit Herstellerangabe.

2.1.8 Primer

Die Primer dieser Doktorarbeit wurden im Wissenschaftlichen Labor der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus etabliert. Um falsch positive Ergebnisse durch DNA- Kontamination auszuschließen, wurden diese so designt, dass sie mehrfache Exons umfassen.

Gen	Primersequenz (5'-3')	Anneal. Temp. (°C)	Produkt -größe (bp)	Zykluszahl
Chondrogene Marker				
AGN	Sense: TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC Antisense: GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA	54.0	392	30
Col II	Sense: TTTCCCAGGTCAAGATGGTC Antisense: CTTCAGCACCTGTCCACCA	58.0	374	35
Col II (rt)	Sense: AGGGAGAGCCTGGAGATGAC Antisense: ATCCTCTCTCACCCAGTTGC	60.3	20	
COMP	Sense: CAGGACGACTTTGATGCAGA Antisense: AAGCTGGAGCTGTCTGGTA	54.0	312	32
FMD	Sense: CTTACCCCTATGGGGTGGAT Antisense: GTACATGGCCGTGAGGAAGT	54.0	389	35
SOX9	Sense: ATCTGAAGAAGGAGAGCGAG Antisense: TCAGAAGTCTCCAGAGCTTG	58.0	263	35
SOX9 (rt)	Sense: AGTACCCGCACTTGCACAAC Antisense: CGTTCTTCACCGACTTCCTC	55.0	20	
Hypertrophe und osteogene Marker				
ALP	Sense: TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA Antisense: TCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC	51.0	454	35

ALP (rt)	Sense: GGA ^{ACT} CTGACCCTTGACC Antisense: CCACCATCTCGGAGAGTGAC	60.9	20	
Col I	Sense: GGACACAATGGATTGCAAGG Antisense: TAACCACTGCTCCACTCTGG	54.0	461	32
Col X	Sense: CCCTTTTGTCTGCTAGTATCC Antisense: CTGTTGTCCAGGTTTTCTGGCAC	54.0	468	25
Col X (rt)	Sense: CCAACACCAAGACACAGTTC Antisense: GACTTCCGTAGCCTGGTTTTTC	60.5	21	
OC	Sense: ATGAGAGCCCTCACACTCCTC Antisense: GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	59.0	387	35
OP	Sense: ACGCCGACCAAGGAAAATC Antisense: GTCCATAAACCACTATCACCTCG	51.0	483	35
Interne Kontrolle				
EF1 α	Sense: AGGTGATTATCCTGAACCATCC Antisense: AAAGGTGGATAGTCTGAGAAGC	54.0	234	25

Tab. 9: Primersequenzen, Annealing Temperatur, Produktgröße (bp) und Zyklenzahl, (rt): Primerpaare für die quantitative Real Time-PCR

AGN = Aggrecan core protein (Aggrecan); ALP = Alkalische Phosphatase; Col = Kollagen; COMP = Cartilage oligomeric matrix protein; EF1 α = Elongation factor 1 α ; FMD = Fibromodulin; OC = Osteocalcin; OP = Osteopontin; SOX9 = SRY (sex determining region y) -box-9.

2.1.9 Lösungen, Puffer und Reagenzien

0,25% Trypsin	50 ml 1x PBS 5 ml 2,5% Trypsin (steril)
1 M Tris-HCl (pH 2,0)	121,14 g Trisbase 1000 ml A. dest., pH 2,0 einstellen
1,25 U/ml Collagenase	in PBS, steril gefiltert bei -20°C aliquotiert gelagert
1% Eosinlösung	1 g Eosin 1 Tropfen Essigsäure 100 ml A. dest.
100 bp DNA-Ladder	400 μ l EDTA 50nM pH 8,0 100 μ l 100 bp bzw. 1kb DNA- Leiter Plus 100 μ l Ladepuffer 6x (im Kit enthalten) nach Herstellung bei -20°C lagern
10x Loading Dye	3 ml Glycerol (absolut) 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 1 ml 10% SDS 5 mg Bromphenolblau SIGMA B 5525 5 mg Xylen Cyanol SIGMA X 4126 4 ml A. dest
10x Lower Puffer	30,2 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 142,8 g Glycin 1000 ml A. dest

10x TBE	108 g Trisbase 55 g Borsäure 9,05 g EDTA-Tetranatriumsalzhydrat 1000 ml A. dest., pH 8,3 autoklavieren
10x Transferpuffer	30 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 144 g Glycin 1000 ml A. dest., pH 10 einstellen
1x PBS	9,55 g PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 1000 ml A. dest. pH auf 7,4 eingestellt und autoklaviert
1x PBS/EDTA	9,55 g PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 0,2 g EDTA-Tetranatriumsalzhydrat 1000 ml A. dest. pH auf 7,4 eingestellt und autoklaviert
1x SDS Puffer	0,5 g Tris-HCL 1 g SDS 1 ml Glycerol 0,39 g DTT 0,005 g Bromphenolblau 50 ml A. dest.
4% Phosphat-gepuffertes Paraformaldehyd	4 g Paraformaldehyd 75 ml 1x PBS 5 min bei 55°C ca. 100 µL Zugabe von Natriumhydroxid bis Lösung aufklart Bei Zimmertemperatur pH auf 7,4 und Zugabe von 100 ml 1x PBS
4x Upper puffer	142,8 g Glycin 30,2 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 4 g SDS 1000 ml A. dest
Alkalischer Lysispuffer 1	7,507 g 0,1 M Glycin 203 mg 1 mM MgCl ₂ 138 mg 1 mM ZnCl ₂ 1 ml 1% Triton X-100 1000 ml A. dest., pH 9,6
Alkalischer Lysispuffer 2	7,507 g 0,1 M Glycin 203 mg 1 mM MgCl ₂ 138 mg 1 mM ZnCl ₂ 1000 ml A. dest., pH 9,6
Antikörperlösung	1 g BSA 1 g Magermilchpulver 1 ml Pferdeserum 100 ml PBS- Tween 20 (0,1%)
Blockierungslösung	50 ml 1x TBS 2,5 ml Pferdeserum 1 g BSA
Blocklösung	2,5 g BSA 3,5 g Magermilchpulver 100 ml PBS-Tween 20 (0,1%)

Dialysepuffer	4% (w/v) Sucrose 200 mmol NaCl 10 mmol Tris-HCL, pH 7,5 1 mmol EDTA
Hämalaunlösung	6 g Hämatoxylin 250 g Aluminiumkaliumsulfat 250 g Chlorhydrat 5 g Zitronensäure 1 g Natriumiodid 5000 ml A. dest.
Kernechtrotlösung	5 g Aluminiumsulfat 0,1 g Kernechtrot in 100 ml kochendem A. dest. auflösen, abkühlen und filtrieren
Lower-Puffer	100 ml 10x Lower Puffer 1000 ml A. dest
Paranitrophenylphosphat (PNPP)	20 mg PNPP 1 ml A. dest. Bei -20°C in Teilproben gelagert
Probenpuffer Lämmli (4x)	4,4 ml Tris-HCl (0,5M), pH=6,8 2,2 ml SDS (20%) 0,5 ml β-Mercaptoethanol (1%) 1 mg Bromphenolblau 1000 ml A. dest. Lagerung der Aliquots bei -20°C
Sammergelpuffer	6,057 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 100 ml A. dest. pH 6,8 einstellen
Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer 200 ml Methanol 1000 ml A. dest
Trenngelpuffer	366,42 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 1000 ml A. dest. pH 8,4 einstellen
Upper-Puffer	250 ml 4 x Upper-Puffer (Stocklösung) 210 µl β-Mercaptoethanol 1000 ml A. dest. pH 8,8 einstellen
Waschlösung	1,5 g BSA 1,5 g Magermilchpulver 100 ml PBS- Tween 20 (0,1%)
10x TBS Waschpuffer (0,5 M Stocklösung)	60,6 g Trisbase 87,66 g NaCl 1000 ml A. dest. pH-Einstellung auf 7,6, Autoklavieren
1x TBS Arbeitslösung (0,05 M)	10x TBS 1:10 verdünnt mit A. dest. pH 7,6 0,5% Tween 20

Tab. 10: Herstellung Puffer und Lösungen.

Bestandteile	5% Sammelgel	10% Trenngel	12% Trenngel
--------------	--------------	--------------	--------------

A. Dest	2,4 ml	6,05 ml	5,55 ml
Rotiphorese®Gel 40 (Acrylamid-Mix 40%)	500 µl	2,5 ml	3 ml
Sammelgelpuffer (pH=6,8)	1 ml	-	-
Trenngelpuffer (pH=8,8)	-	1,25 ml	1,25 ml
APS (10%)	40 µl	100 µl	100 µl
SDS (10%)	40 µl	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl

Tab. 11: Zusammensetzung der 5%, 10% und 12%igen verwendeter Polyacrylamidgele mit Angabe der Reagenzienvolumina

2.1.10 Assays und Kits

Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit No. 86C	Sigma, Deutschland
Annexin V-CY3 Apoptosis Detection Kit;	Sigma, USA
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Deutschland
DNA Detection Kit Quant-iT™	Invitrogen GmbH, Deutschland
GAG-Assay-Kit	Biocolor, UK
KAPA SYBR® FAST qPCR Kit	Kapa Biosystems, USA
Link-Label iHC Detection System BioGenex Super Sensitive™	DCS, Deutschland
Live/Dead Viability stain	Mobitec, Deutschland
RNA II isolation kit Nucleospin®	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland

Tab. 12: Assays und Kits mit Herstellerangabe.

2.1.11 Geräte, Laborbedarf und Labormaterial

Accu-jet Pipettierer	Brand, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Autoclave H+P Varioclave Dampfsterilisator	Thermo Elektron GmbH, Deutschland
AxioCam MRc Digitalkamera	Carl Zeiss Jena GmbH, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Deutschland
Heraeus B5060CO ₂ Inkubator	Thermo Electron GmbH, Deutschland
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland

Gele-Gießvorrichtung, Gießschlitten, Kämme für Agarose Gelektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Glasgefäße	Schott, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Heraeus Heißluftsterilisator	Thermo Electron GmbH, Deutschland
Heizblock	Boekel Scientific, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Kühlschrank	Bosch GmbH, Deutschland
Laborspülmaschine	Miele & Co. KG, Deutschland
Luminometer	Berthold Detection Systems,
Magnetrührer und -heizer	A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Micropipetten	Abimed Analysentechnik GmbH, Deutschland
RM2125RT Microtom	Leica, Deutschland
Mikroskope (Axioskop, Axioskop 2 MOT, Axiovert 25)	Carl Zeiss Jena GmbH, Deutschland
Mikrowelle	Panasonic, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Laboratory Glasware, durch bei A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Inolab pH Level 1 pH-Meter	WTW, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
SLT Spectra Classic Photometer	Tecan Deutschland GmbH, Deutschland
Qubit™ Fluorometer	Invitrogen GmbH, Deutschland
Super RX Röntgenfilm	Fujifilm, Deutschland
SDS- Page Gelkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
HeraSafe Sterilbank	Heraeus Deutschland
PTC-200Thermocycpler	MJ Research, durch Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Thermodrucker	Seico, durch LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Deutschland
Thermopapier für Biophotometer Drucker	Seico, durch LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Deutschland
Tiefkühltruhe -20°C	Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Tiefkühltruhe -80°C	Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland
UV-Kammer	Ltf Labortechnik, Deutschland
Vibro Shaker	Hartenstein GmbH, Deutschland
Vortex-Genie 2 Vortexer	Scientific Industries, durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Waage	Scaltec, Deutschland
WB7 Wasserbad	Memmert, Schwabach durch A. Hartenstein GmbH, Deutschland
Whatman-Papier, Gel-Blotting-Papier	Hartenstein GmbH, Deutschland
Heraeus Biofuge pico Zentrifuge	Thermo Electron GmbH, Deutschland
Heraeus Laborfuge 400 Zentrifuge	Thermo Electron GmbH, Deutschland

Tab. 13: Hersteller Geräte.

2.1.12 Quellen der Onlinedatenbanken und Software

AxioVision 4.4.1.0	Carl Zeiss Jena GmbH, Deutschland
Bio ID/Capt MW Software	LTF, Deutschland
Bio Profile Software	LTF, Deutschland
e! Ensembl Human	http://www.ensembl.org/Homo_sapiens
Magellan 3.00	Tecan Deutschland GmbH, Deutschland
NCBI Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed
Photoshop Elements 4.0	Universität Würzburg

Tab.14: Onlinedatenquellen und Software

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen

2.2.1.1 Adenoviren als Gene Delivery-System

Insgesamt sind 19 verschiedene Gattungen der Adenoviren bekannt, sechs davon sind humanpathogen. 51 Serotypen gibt es, für diese Arbeit wurden Adenoviren der ersten Generation vom Serotyp 5 verwendet. Sie gehören zur Gattung der Mastadenoviren, sind nicht-behüllte, doppelsträngige DNA-Viren, mit linearem Genom von 32-36 Kilobasenpaare (kbp) Länge in einem ikosaedrischen Kapsid.⁹⁴

Humanpathogene Adenoviren sind sie vor allem für Erkrankungen des Respirationstraktes bekannt, daher stammt wohl auch ihr Name, weil sie aus Adenoiden, also aus der Rachenmandel, isoliert wurden.⁹⁵ Adenoviren sind aber auch insbesondere bei Kindern mit einer Reihe von insgesamt eher harmlosen Erkrankungen in Verbindung zu bringen, so z. B. Gastroenteritiden durch die

Serotypen 40 und 41 oder der Keratoconjunctivitis epidemica, einer hochansteckenden Bindehautentzündung, die durch die Serotypen 8, 19 und 37 ausgelöst wird. Im Gegensatz zu anderen viralen Systemen integriert das Adenovirus nicht ins Wirtsgenom, sondern schleust die zu amplifizierende DNA in Form eines Plasmids in die Wirtszelle.⁶³ Dadurch haben sie keine mutagene Potenz. Allerdings haben die Vektoren der ersten und zweiten Generation einen großen Nachteil, nämlich ihre hohe Immunogenität, die zu systemischen Immunreaktionen beim Wirt führen kann, vor allem bei hohen Viruskonzentrationen. Diese Immunogenität kam bereits bei *in vivo*-Versuchen zum Tragen und hat sogar zu einem tragischen Todesfall, den Fall „Jesse Gelsinger“ geführt.⁹⁶ Dieser starb im September 1999 an Multiorganversagen infolge eines starken allergischen Schocks einer gentherapeutischen Behandlung mit adenoviralen Vektoren.

Die Vektoren wurden weiterentwickelt, die dritte Generation enthält keinerlei kodierende virale Sequenzen im Genom. Durch Cre/loxP-Rekombination wurden rekombinante Adenoviren entwickelt, die zwar alle anderen viralen Replikationsfunktionen besitzen, jedoch keine „Packing“-Fähigkeit mehr und somit nun nicht mehr fähig sind, die in der infizierten Wirtszelle replizierte DNA auszuschleusen, wie das beim Wildtyp der Fall ist, um wiederum neue Zellen mit den Partikeln zu infizieren. Da die hier verwendeten Vektoren keine kodierenden viralen Sequenzen mehr besitzen und sich infolgedessen auch nicht mehr selbständig vermehren können, brauchen diese „Gutless“- oder „High capacity“-Vektoren für Ihre Replikation ein Rekombinationsplasmid und eine Zelllinie zur Proteinbereitstellung.

2.2.1.2 Fragestellung der Arbeit, SOX9 als chondrogener Modulator

Hauptfragestellung dieser Arbeit ist es, die Funktion und Wirkung von SOX9 auf hMSCs zu erforschen, vor allem im Hinblick auf das chondrogene Differenzierungspotenzial, was in der Literatur noch nicht hinreichend geklärt ist. Unser Ziel war es eine Aussage darüber treffen zu können, inwiefern SOX9 alleine oder in Kombination mit den Faktoren *insulin like growth factor (IGF)-1* und *transforming growth factor (TGF)- β 1* in der Lage ist, Chondrogenese in hMSC zu induzieren und gleichzeitig die chondrogene Hypertrophie zu modulieren und supprimieren.^{64 67} Wir entschieden uns hierfür für das Pelletkultursystem, welches sehr gut durch Zell-Zell-Interaktionen die *in vivo*-Bedingungen von hyalinem Gelenkknorpel nachahmen kann. Für eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors SOX9 entscheiden wir uns für das in unserem Labor etablierte adenovirale Transduktionssystem. Unsere Vektoren enthielten die kodierende Sequenz des humanen SOX9-Gens gekoppelt an die *green fluorescent protein (GFP)*-Sequenz (SOX9/GFP). Die Co-Transduktionsgruppen enthielten zusätzlich die Transgene TGFB1 bzw. IGF-1.

2.2.1.3 Adenovirale Herstellung mittels Cre/loxP- Rekombination zur Vektorengenerierung

Die Vektoren für die Transgene SOX9, TGFB1 und IGF1 wurden dankenswerterweise von Prof. C. H. Evans (Harvard Medical School, Boston, USA) für die Experimente in dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten adenoviralen Vektoren, mit eliminiertem Genomabschnitt E1 und E3, tragen humane SOX9/GFP-Gen-cDNA (Tab. 7). Die Herstellung erfolgte

mittels Cre/loxP-Rekombination, ein Herstellungssystem von Hardy et al.¹³⁰ Die vollständige kodierende Sequenz für das humane SOX9-Gen wurde mit Hilfe eines Klonierungsschrittes, in erworbene λ gt 10-Bakteriophagenvektoren eingefügt und diese in Escherichia coli-Wirtszellen auf LB (Luria Broth) Agarkulturplatten vermehrt. Die Plaques wurden in SM-Pufferlösung chloroformiert und resuspendiert. Nach Standardprotokoll erfolgte dann durch EcoRI-Verdau, die Gewinnung der cDNA für SOX9, die dann anschließend in die Xba/Xho-Schnittstelle des pAdlox-Vektors kloniert wurde.¹³¹ Zusätzlich enthält der pAdlox-Vektor ein Neomycin-Resistenzgen und ein „early promoter“ des Zytomegalievirus (CMV), welcher von loxP-DNA-Abschnitten umgeben ist.¹³⁰ In den 293/Cre8-Zellen wurden die Vektoren-DNA und der pAdlox-Vektor gemeinsam transfiziert, vermehrt und mit Hilfe des CMV-Promotors hergestellt.¹³⁰ Die viralen Vektoren wurden in HEK-293-Zellen vermehrt, mit anschließender Aufreinigung eventueller Kontaminationen über eine Cäsium-Chlorid (CsCl)-Gradienten.

2.2.1.4 Produktion der adenoviralen Vektoren

Die adenoviralen Vektoren wurden in HEK-293-Zellen vermehrt. Diese wurden zuerst expandiert auf 5 bis 10 175 cm²-Kulturflaschen. Als alle Flaschen die Konfluenz erreicht hatten, wurde das Standardmedium entfernt und mit einer Mischung aus 10 μ l Virus und 10 ml DMEM/High Glucose Medium behandelt. Nach 2 h Inkubation im 37°C Brutschrank bei 5 % CO₂ sowie vorsichtigen Schwenkens wurde das High Glucose/Virusgemisch mit einer Plastikpipette

vorsichtig abgenommen und die HEK-293-Zellen mit 20 ml DMEM/High Glucose plus FCS bedeckt.

Nach 3-4 Tagen wurden die infizierten Zellen durch leichtes Schütteln vom Flaschenboden gelöst, die Zell-Suspension 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Um die Zellmembran zu zerstören und die viralen Partikel freizusetzen, wurde die Suspension dreimalig in Trockeneis schockgefrostet und danach im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Dem Lysat wurde nach dem letzten Auftauzyklus 3 µl Benzonase® zugefügt, danach 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert und für 10 min bei 4°C 1200 U/min zentrifugiert, um den entstandenen Zelldetritus vom viralen Überstand zu trennen. Zum Aufreinigen nutzten wir einen unterschiedlich dichten 1,2 bzw. 1,4 g/ml schweren CsCl-Gradienten, auf den 3 ml Zelllysate in Polystyrolröhrchen pipettiert wurden. Die Röhrchen wurden durch Ultrazentrifugation mit Ausschwingrotor im Virologischen Institut der Universität Würzburg nach gewichtsgenauer Austarierung bis auf 2 Nachkommastellen 1 h bei 20000 u/min und 4 °c zentrifugiert. Die milchig-durchschimmernde, fast transparente, von Zelldetritus aufgereinigte Virusbande, bildete sich durch Zentrifugation zwischen den beiden unterschiedlich dichten Gradientenschichten und wurde mit einer Spritze, durch Einstechen in das Polystyrolröhrchen auf Höhe der Virusbande, flächig abgesaugt. Das Prozedere wurde insgesamt drei Mal wiederholt, wobei die Virusbande zusätzlich nach dem Absaugen mit 10 mM Tris-HCL mit einem pH von 8 gemischt wurde. Die abschließend gewonnene, hoch aufgereinigte Virusbande wurde anschließend im Kühlschrank über Nacht dialysiert in einer Dialysemembran (MW 50000) umgeben von 4°C kühlem

Dialysepuffer (Tab. 9). Der Puffer wurde dreimal während des Prozederes gewechselt. Am nächsten Tag wurde das Virusdialysat in sterile Tubes portioniert und bei -80°C gelagert.

2.2.1.5 Bestimmung der Konzentration der adenoviralen Vektoren

Die Bestimmung der Konzentration wurde bei 260 nm Wellenlänge im Photometer anhand der optischen Dichte (OD) gemessen. 95 µl HPLC-Wasser und 5 µl des präparierten Virus wurden in einer Photometerküvette gemischt, als Leerwert diente 100 µl HPLC-Wasser. Als Virusmengenäquivalent einer OD bei 260 nm Wellenlänge wurde 1×10^{12} Viruspartikeln/ml angenommen. Nach Messung der Extinktion erfolgte daraus die Berechnung der Konzentration:

$$\text{OD1} = 1 \times 10^{12} \text{ Viruspartikel/ml}$$

Unter Annahme einer 1%tigen Infektiösität ergibt sich zusätzlich eine Formel zur Bestimmung der Anzahl der infektiösen viralen Partikel (IVP):

$$\text{IVP} = 20 \times E_{260\text{nm}} / 100$$

2.2.1.6 Gewinnung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Die humanen, mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) für diese Arbeit wurden aus Knochenmark isoliert, speziell aus dem Hüftkopf und dem Femurschaft, selbstverständlich nach Einwilligung der Patienten und der Ethikkommission der Universität Würzburg. Das gewonnene Knochenmark fällt standardmäßig bei der Implantation von Hüftprothesen an. Die acht verwendeten Femurköpfe stammen

von verschiedenen Spendern zwischen 35 und 65 Jahren (Durchschnittsalter: 53 Jahre). Das modifizierte Haynesworth-Protokoll nach Nöth kam bei der Gewinnung von MSCs aus dem Knochenmark zur Anwendung.^{132 133} Zum einem wurde das rote Knochenmark durch Auskratzen mittels einer scharfen Kürette aus dem Hüftkopf gewonnen, zum anderen fällt durch das Ausraspeln des proximalen Femurs während der Operation Spongiosa an, die ebenfalls zum Gewinnen von mesenchymalen Stammzellen genutzt werden kann. Das so gewonnene Spongiosamaterial wurde in einem 50 ml-Tube mit 15 ml Stammzellmedium (SCM) gemischt, manuell geschüttelt bzw. gevortext, um die Zellen herauszulösen und anschließend durch ein Zellsieb mit einer Größe von 100 µm in ein sauberes Gefäß filtriert, um die Knochenstücke herauszuwaschen. Dieses Prozedere wurde mindestens dreimal wiederholt, bis der Überstand nicht mehr blutig war, um möglichst alle Zellen aus der Spongiosa herauszulösen. Die Zellsiebe wurden am Schluss auch nochmals mit Medium durchgespült, um den Zellverlust zu minimieren. Das Volumen der Röhren wurde auf 50 ml aufgefüllt und 10 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde erst vom gelben Fettmark befreit und anschließend mit 20 ml SCM vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Für die darauffolgende Aussaat wurden die vitalen Zellen ausgezählt, und zwar in einer Neubauer Zählkammer mithilfe von Trypanblaufärbelösung. Ausgesät wurde eine Zellzahl von 4×10^6 vitalen Zellen/cm² Kulturfläche in 175 cm² Zellkulturflaschen, zusammen mit 20-25 ml SCM. Kultiviert wurden die Zellkulturflaschen bei 37°C unter konstanten Bedingungen (feuchte Atmosphäre, 95% Luft, 5% CO₂) im Heraeus-Brutschrank. Frühestens nach drei Tagen wurde der erste Mediumswechsel durchgeführt, um

den Stammzellen die Möglichkeit zu geben, sich an den Boden der Zellkulturflasche zu adhären. Mit dem ersten Mediumswechsel wurden somit auch die nicht-adhärenen Blutzellen, wie z. B. Erythrozyten entfernt. Die adhärenen Stammzellen wurden mit PBS gespült und mit frischem SCM versorgt. Der Mediumswechsel mit SCM wurde alle 2-3 Tage durchgeführt, solange bis eine 80 % Zellkonfluenz erreicht wurde. Danach erfolgte die Infektion der hMSCs mit adenoviralen Vektoren und die Herstellung der Pellets.

2.2.1.7 Adenovirale Stammzellinfektion

Um die Infektion der hMSCs vorzubereiten, benötigte man exemplarisch die Zellzahl pro Zellkulturflasche. Dazu wurde in 3-5 der kultivierten 175 cm²-Flaschen das SCM-Medium abgesaugt, die Zellen zuerst mit PBS gewaschen, danach langsam mit 5 ml 0,25 % Trypsin bedeckt und anschließend für 10 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 5 min wurden die Zellen, die sich bis dahin nicht gelöst hatten, leicht abgeklopft und das Trypsin mit 15 ml SCM inaktiviert. Die gesamte Zellsuspension der 3-5 abtrypsinisierten Flaschen gemischt mit Trypsin und Medium wurde bei 1200 U/min 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit einer geringen Menge chondrogenem Medium (3-5 ml) durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und nach vollständiger Auflösung wurden alle resuspendierten Pellets zusammen gemischt und nochmals vermengt. Aus dieser Suspension wurden dann 50 µl entnommen und 1:1 mit 50 µl Trypanblau-Färbelösung in einem Eppendorf-Tube gemischt. Das Trypanblau dient dazu, lebendige und tote Zellen besser unterscheiden zu

können, denn avitale Zellen nehmen aufgrund ihrer veränderten Membranpermeabilität den Farbstoff auf, während vitale Zellen ungefärbt bleiben und hell leuchten. Die Neubauer-Zählkammer wurde anschließend vorbereitet, das Deckgläschen über die Mitte der Kammer gespannt und pro Feld 10 µl der durchgemischten Zellsuspension durch Kapillarkraft unter das Deckgläschen aufgetragen. Mit einem Zellzähler wurden anschließend die nicht-blau angefärbten Zellen in den 4 äußeren Quadranten gezählt, daraus ein Mittelwert gebildet, nochmals die obere und untere Kammer gemittelt und die Anzahl der Zellen nach folgender Formel berechnet:

$$N = 2 \times 10000 \times P \times Z$$

N = absolute Zellzahl/Flasche, P = Probenmenge zum Resuspendieren in ml, Z = gezählte Zellen

Die für die Infektion der hMSCs benötigte Virusmenge bei dem von uns standardmäßig verwendetem MOI Wert von 50 pro Zellzahl gilt:

$$VM = F \times N \times 50 / IVP$$

VM = Virusmenge, F = Flaschenanzahl, N = absolute Zellzahl/Flasche, IVP = infektiöse Viruspartikel/µl

Pro zu infizierender Zellkulturflasche wurden 4 ml DMEM/High Glucose Medium, das als Zusatz nur 1 % Pen-Strep enthielt, mit der entsprechenden Virusmenge in einem 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen gemischt und über den gesamten frisch mit PBS gespülten Zellrasen verteilt. Zusätzlich wurden die Zellkulturflaschen vorsichtig ca. 1 min lang geschwenkt, damit sich die Infektionslösung besser und gleichmäßiger auf dem Zellrasen verteilen konnte und 2 h bei 37°C mit 5 % CO₂ inkubiert. Die Infektionslösung wurde im Anschluss abpipettiert und die Zellen über Nacht wie gewohnt mit 20 ml SCM inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Pelletherstellung. Das Zellpellet der bereits abtrypsinierten Flaschen wurde

hingegen gleich zu Pellets verarbeitet und diente als nicht-transduzierte Negativkontrolle.

2.2.1.8 Pelletherstellung und Kultur

Nachdem die infizierten Zellen über Nacht im Brutschrank inkubierten, wurden sie am nächsten Tag zu Pelletkulturen verarbeitet. Die SOX9 transduzierten und co-transduzierten Zellen wurden in einem verdunkelten Raum unter dem Fluoreszenzmikroskop angesehen, um den Transduktionserfolg zu überprüfen. Es leuchteten ca. 60-70 % der Zellen grün. Danach wurden die Zellen mit 5 ml 0,25 % Trypsin 5 min im Inkubator gelöst. Nach Ablauf von 5 min wurden die Flaschen aus dem Brutschrank entnommen und makroskopisch und wenn notwendig auch mikroskopisch überprüft, ob die Zellen sich lösten, zum Teil die Flaschen leicht geschüttelt. Nach erfolgreichem Lösen der Zellen wurde das Trypsin mit 15 ml SCM-Medium inaktiviert, um Schäden an den Zellen zu verhindern und dann mit Überstand für 5 min bei 1200 U/min in 50 ml-Röhrchen zentrifugiert. Das Trypsin-SCM-Gemisch wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem, mit chondrogenen Zusätzen präpariertem MediumJ resuspendiert und daraus die Zellzahl bestimmt (siehe oben). Gleichzeitig konnte mit dem Tryphanblau auch kontrolliert werden, ob die Zellen nach Abtrypsinierung noch vital waren. In Abhängigkeit von der gezählten Zellzahl wurde die ursprüngliche Suspension mit soviel Medium aufgefüllt, dass 3×10^6 Zellen in 500 μ l Medium pro Pellet in ein 15 ml-Tube verteilt werden konnten und die so bestückten Tubes bei 1200 U/min 10 min zentrifugiert, um eine scheibenförmige Zellformation zu erhalten. Für den erforderlichen Gasaustausch im 37°C Inkubator wurde

abschließend noch der Röhrchendeckel leicht aufgedreht. Alle 2-3 Tage in Abhängigkeit von den jeweiligen Untersuchungen erfolgte ein Mediumswechsel. Am Tag nach der Pelletherstellung, bis maximal 3 Tage danach, war zu beobachten, dass das anfänglich nach dem Zentrifugieren eher flache und scheibenförmige Zellpellet sich zunehmend zu einer kugeligen Form verwandelte und mit entsprechend über 21 Tage fortschreitender Differenzierung auch an Masse zunahm. Die Pellets wurden für maximal 21 Tage kultiviert, wobei an den Tagen 3, 7 und 14 zusätzlich Untersuchungen durchgeführt wurden.

2.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.2.1 ELISA (IGF-1, TGF- β 1)

Um den SOX9-Transduktionserfolg qualitativ zu überprüfen, wurde wie bereits beschrieben die Fluoreszenzmikroskopie angewandt. Bei den anderen Gruppen hingegen ein „Enzyme-linked-immunosorbent-assay“ (ELISA) durchgeführt. Das Medium der Pellets wurde am Tag davor gewechselt, es erfolgte eine 24 h-Proteinakkumulation im Überstand, welcher am nächsten Tag entnommen und eingefroren wurde, bis alle 21 Tage gesammelt wurden.

Dann führten wir mit den aufgetauten Überständen einen spezifischen, im Handel erworbenen ELISA durch. Die Vertiefungen der Microtiter-ELISA Platte sind mit immobilisierten, spezifischen, monoklonalen Antikörpern beschichtet, die sich entweder gegen TGF- β 1 oder IGF-1 richten und mit dem Protein aus dem gesammelten Überstand einen Antigen-Antikörper-Komplex bilden.

Die jeweilige Probe wurde auf die ELISA Platte aufgebracht und inkubiert. Die Bildung von spezifischen AG-AK-Komplexen sowie die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte, damit Interferenzen ausgeschlossen werden konnten. Als nächstes erfolgte die Zugabe eines sekundären Antikörpers, welcher gegen das entsprechende Antigen der Plattenbeschichtung gerichtet war. Dieser ist in der Regel an ein Enzym gebunden, getreu dem „Sandwich“-Prinzip. Die nicht gebundenen Antikörper werden wieder entfernt und ein spezifisches Substrat hinzugefügt, welches nur durch das an den zweiten Antikörper konjugierte Enzym, in einen Farbstoff umgesetzt werden kann. Die Menge an umgesetzten Farbstoff ist natürlich proportional zur Menge der spezifisch gebundenen, enzymgekoppelten Antikörper im zweiten Schritt und somit proportional zur Menge an vorhandenem Antigen, in unserem Fall also zur TGF- β 1 bzw. IGF-1 Menge im Überstand. Es wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen, d. h. 100 μ l Verdünnungsreagenz mit 50 μ l der Standardverdünnungsreihe oder jeweiliger Probenüberstand 2 h bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplatte inkubiert. Etwaige Probenreste wurden im Anschluss durch Waschschrte entfernt, danach ein Enzym-Konjugat hinzu pipettiert und weitere 2 h auf dem Shaker inkubiert, zur Bindung des Antigens mit dem enzymgekoppelten Antikörper. Nach mehreren Waschschrten folgte die Zugabe von 200 μ l Substratlösung, die Platte wurde bei 30 min in einer Dunkelkammer inkubiert und die Reaktion anschließend mit einer Stopplösung beendet. Bei 450 nm Wellenlänge wurde im Photometer die Menge des Farbumschlages der Proben gemessen.

2.2.2.2 Western Blot (SOX9/GFP)

Um einen Western Blot für SOX9/GFP durchzuführen, benötigt man als ersten Schritt eine SDS-PAGE, um in einer Gelmatrix anhand der Größe ein Proteingemisch aufzutrennen. Zelllysate der SOX9/GFP-transduzierten Pellets wurden an Tag 3, 7, 14 und 21 nach dreimaligem Spülen mit sterilem PBS und Zugabe eines β -Mercaptoethanol- und SDS-haltigen Probenpuffer hergestellt. Die Pellets wurden mechanisch mit einem sterilen Stößel lysiert, gevortext und danach im Wasserbad erwärmt. β -Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücken der Proteine, das Erwärmen löst Sekundär- und Tertiärstrukturen. Proteine an sich besitzen eine Eigenladung, SDS fungiert in der SDS-Page als Ladungsüberträger, er überdeckt die Eigenladung der enthaltenen Proteine, d. h. nach der Behandlung mit SDS sind alle negativ geladen und man kann sie in der Gelmatrix aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe auftrennen. Das SDS-Gel ist aus zwei verschiedenen Gelabschnitten zusammengesetzt (siehe Tab.10). Das Sammelgel sammelt und konzentriert Proben, das Trenngel trennt entsprechend ihrer Größe. Trenn- bzw. Sammelgelpuffer, destilliertes Wasser, Rotiphorese®Gel 40 wurden mit SDS gemischt (siehe Tab. 11). Unmittelbar bevor das Gel ausgegossen wurde, wird APS und TEMED hinzugegeben. Beide sind für die Polymerisation zuständig, indem sie Quervernetzungen und Radikale bilden. Nach Ethanolreinigung wurden die für das Gel notwendigen Glasplatten zusammengebaut und in eine Halterung eingespannt, die ein Auslaufen des Gels nach unten verhindert. Zuerst wurde die Glaskammer zu 2/3 mit der Trenngellösung gefüllt, darauf Isopropanol gegen die Luftblasenbildung pipettiert.

Nach vollständiger Auspolymerisation wurde das Isopropanol wieder entfernt, die Kammer vollständig mit Sammelgel aufgefüllt und mit Kämmen als Platzhalter bestückt, um die Proben in die sich bildenden Taschen aufzutragen. Nachdem die Gele komplett in den Glaskammern auspolymerisierten, spannt man je zwei zusammen in eine Gelelektrophoresekammer und befüllt diese bis zum unteren Gelrand mit Lower-Puffer und mit Upper-Puffer zwischen den Glasplatten bis zum oberen Rand. Nach Kammentfernung gibt man 20 µl der Probe in die Tasche, welche zuvor mit 5 µl 4x Lämmli-Puffer und mit A. dest. auf ein Volumen von 15 µl aufgefüllt, bei 95°C 5 min denaturiert und kurz eiskühlt. In jedes Gel wurde zusätzlich, zur Kontrolle der Proteingrößen, 5 µl Rainbowmarker aufgetragen. Anschließend wurde die Kammer mit Deckel verschlossen und eine konstante Spannung von 150 V für 45-60 min angelegt, damit die Proben nach Größe aufgetrennt werden. Im nächsten Schritt werden die aufgetrennten Proben auf eine Membran aus Nitrocellulose geblottet. Dazu wird das Gel mit den aufgetrennten Proben aus den Glaskammern herausgelöst und auf eine mit 1x Transferpuffer angefeuchte Nitrocellulosemembran gelegt und dann 5 min mit 100%igem Methanol, 5 min mit A. dest. und 10 min mit 1x Transferpuffer benetzt. Anschließend legt man unterschiedlich dicke befeuchtete Whatman-Papiere auf die Anode der Blottkammer, darauf dann das Polyacrylamidgel zusammen mit der Nitrocellulosemembran sowie zwei weitere unterschiedlich dicke Whatman-Papiere darüber. Die Blotapparatur wird mit der Kathode verschlossen und mit einer Spannung von 150 mA der Blottvorgang gestartet. Nach 2 h wurde der Vorgang beendet und die Nitrocellulosemembran entnommen und je 2 h in Blocklösung I geschwenkt, um alle freien Bindungsstellen auf der

Nitrocellulosemembran abzusättigen. So wird verhindert, dass der im nachfolgenden Schritt eingesetzte primäre Antikörper falsch positiv an die Membran bindet. Nach über Nacht-Inkubation der Membran mit der primären Antikörperlösung im Kühlschrank wurden die überschüssigen Reste durch die Waschlösung (4 x 15 min) entfernt. Im zweiten Schritt erfolgt die 1-stündige Inkubation mit einem sekundären, Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltem, Antikörper, anschließend erneut viermal für je 15 min in der Waschlösung geschwenkt, um überschüssige Antikörperreste zu entfernen. Die Membran wird danach mit dem ECL Plus Westernblot Detection Reagent 2 min bedeckt, in Fischhaltefolie gewickelt und in eine Röntgenkassette gegeben. Der Röntgenfilm wird abschließend in der Dunkelkammer auf die Membran aufgelegt und der Film entwickelt.

Der Farbstoff enthalten in der ECL-Lösung, wird durch die Meerrettichperoxidase oxidiert, es entstehen Produkte die das Licht einer bestimmten Wellenlänge (430 nm) aussenden und der Röntgenfilm macht dieses im letzten Schritt nun sichtbar.

2.2.2.3 Quantitative DNA-Bestimmung

Die in den Pellets vorhandene DNA-Mengen wurde durch den Invitrogen-Assay bestimmt. Die Pellets wurde einzeln in ein Eppendorftube überführt, dreimalig mit 1 ml PBS gewaschen und über Nacht im Heizblock bei 60°C mit 200 µl Papainlösung verdaut. Diese wurde aus 2 µl Papain und 200 µl Papainpuffer hergestellt. Am nächsten Tag wurde aus dem Pelletverdau die DNA-Menge bestimmt, sowie auch einen Teil der Probe für den weiteren Assay der quantitativen Glykosaminoglykan-Bestimmung verwendet.

Die DNA wurde im Qubit™-Fluorometer gemessen. Zuerst wurde eine Arbeitslösung aus 199 µl der Quant-iT™-Pufferlösung und 1 µL des Quant-iT™-Reagenz hergestellt. In ein steriles Spezialtube wurden aus dieser Arbeitslösung die Standard- und Probenlösungen pipettiert (10 µl Standard oder Probe und 190 µl Arbeitslösung) und bei Raumtemperatur 2 min inkubiert. Nach Kalibrierung durch zwei Standardlösungen, die einen bestimmten, vorgegebenen und bekannten DNA-Wert hatten, wurden als nächstes die Proben einzeln gemessen und die DNA-Menge pro Pellet gleichzeitig anhand der Standards durch das zuvor kalibrierte Fluorometer automatisch berechnet.

2.2.2.4 Quantitative Glykosaminoglykan-Bestimmung

Glykosaminoglykane (GAGs) sind ein wichtiger Bestandteil der Extrazellulärmatrix von Binde- und Stützgewebe, wozu letztendlich auch der hyaline Knorpel zählt. Sie sind aus Disaccharid-Einheiten aufgebaute, saure Polysaccharide. Bekannteste Vertreter wären z. B. Hyaluronan, Chondroitin-4-sulfat sowie Chondroitin-6-sulfat. Sie können als Maß für die chondrogene Differenzierung dienen und wurden durch den GAG-Assay von Blyscan an Tag 3, 7, 14 und 21 bestimmt. Wie bereits unter 2.2.2.3 beschrieben erfolgte nach dreimaligem Waschen der Pellets mit sterilem PBS ein Verdau über Nacht im Heizblock bei 60°C mit 200 µl Papainsuspension. Papain ist eine Cystein-Endopeptidase und wird für viele verschiedene Proteinspaltungen verwendet. Am nächsten Tag wurden nach nochmaligem Mischen 10 µl der vollständig verdauten Pelletsuspension entnommen und mit 90 µl Papain-Verdauungspuffer aufgefüllt. Gleichzeitig wurde eine Konzentrationsreihe aus GAG-

Standardverdünnungslösungen, die im Kit vorhanden waren, hergestellt. Sowohl die Proben als auch die Standardreihe werden mit *Blyscan Dye Reagent* (1 ml) in Reaktionstubes gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert, damit alle GAG- Peptide mit dem Farbstoff reagieren und ausfallen. Die Tubes wurden nach der Inkubationszeit zentrifugiert, um das ausgefällte GAG-Produkt vom Überstand, der verworfen wird, zu trennen. Das entstandene GAG-Zentrifugat wurde durch kräftiges Mischen mit *Blyscan Dissociation Reagent* (1 ml) aufgelöst. Die Bestimmung der GAG-Mengen pro Pellet erfolgte bei 655 nm im Spektrometer, die Auswertung der Extinktionswerte erfolgte, anhand des durch Standardkalibrierungsproben erstellten Diagramms. So konnten die den Extinktionen korrespondierenden Konzentrationen der Proben anhand des Diagramms abgelesen werden.

2.2.2.5 Quantitative Bestimmung des Adenosintriphosphats

Adenosintriphosphat (ATP) ist als der universelle Energieträger in Zellen ein Maß für die Präsenz metabolisch aktiver Zellen, die infolgedessen vital sind und proliferieren. In dieser Arbeit wurde hierfür der von Promega hergestellte CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay verwendet. Das Prinzip des Tests beruht auf einer Luziferasereaktion, der gemessene ATP-Gehalt die Pellets verhält sich direkt proportional zur vorhandenen vitalen Zellzahl.

Die Pellets wurden zu den vorgegebenen Zeiten entnommen und in dampfsterilisierte, 1,5 ml-Reaktionscaps zusammen mit CellTiter-Glo® Reagenz (200 µl) pipettiert. Da die Lysepotenz des Reagenzes nicht dazu ausreichte, die Pellets vollständig zu lysieren, wurde hierzu zusätzlich mechanisch ein

sterilisierten Stößel benutzt und der Mix für mindestens 2 min gevortext, bis sich das gesamte Pellet aufgelöst hatte. Der Mix wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach in eine 96-well Platte überführt, um das stabile Lumineszenzsignal in den Luminometern bei einer definierten Wellenlänge in einem vorinstallierten Programm zu messen. Um Messfehler zu vermeiden, wurde die Platte auch mindestens dreimal gemessen und ein Mittelwert der Werte gebildet.

2.2.2.6 Quantitative Bestimmung der Alkalische Phosphatase-Aktivität

Um das Maß an chondrogener Hypertrophie zu bestimmen, wurde unter anderem die Alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität in den Pelletkulturen herangezogen. Hierfür wurde das Kit der Firma Sigma-Aldrich verwendet, das auf dem Prinzip der p-Nitrophenolphosphat-Umwandlung in p-Nitrophenol und organisches Phosphat basiert und diese Umwandlung als Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 405 nm im Densitometer misst.

Die Pelletkulturen wurden an den entsprechenden Tagen geerntet und mit PBS gespült, anschließend in ein sterilisiertes, neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, zusammen mit 200 µl des alkalischen Lysispuffer 1 und mit einem ebenfalls sterilisierten Stößel soweit zerkleinert, dass makroskopisch keine Probenmengen mehr sichtbar waren. Um das Gewebe vollständig zu lysieren, wurde es zusätzlich noch 1 h bei Raumtemperatur auf einem Shaker geschüttelt. Zu diesem Lysat wurden 200 µl eines weiteren Gemisches pipettiert, das aus Lysispuffer 2 und dem ALP-Substrat Paranitrophenylphosphat in einem Verhältnis von 10:1 bestand. Das Probengemisch wurde sofort in eine 96-well

Platte überführt, um alle Proben gleichzeitig im Photometer zu messen. Nach wenigen Minuten tritt ein unterschiedlich intensiver Farbumschlag auf, korrespondierend zur ALP-Aktivität, dieser wurde in der 96-well Platte im Photometer bei 405 nm Wellenlänge gemessen.

Die ALP-Aktivitätsberechnung wurde anhand einer mitgemessenen Verdünnungsreihe quantifiziert sowie auf den DNA-Gehalt der korrespondierenden Pellets normiert.

2.2.3 Histologie

2.2.3.1 Fixierung und Paraffineinbettung

An Tag 10 und Tag 21 wurde das Zellkulturmedium entfernt, danach 2 x mit PBS (3 ml) gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur paraformaldehydfixiert (3 ml). Nach 2 h wurde die Fixierlösung abgenommen, das Pellet mit Wasser aus der Leitung gespült und über Nacht in 50% Ethanol (EtOH) aufbewahrt.

Protokoll Paraffineinbettung:

1 h	70% EtOH Dehydratation
1 h	80% EtOH Dehydratation
1 h	90% EtOH Dehydratation
1 h	100% EtOH Dehydratation
30 min	Inkubation EtOH/Amylacetat (1:1) RT
30 min	Inkubation EtOH/Amylacetat (1:1) 60°C
2 x 30 min	Inkubation Amylacetat bei ca. 60°C
Über Nacht	Paraffin I Wärmeschrank ca. 60°C
Über Nacht	Paraffin II Wärmeschrank ca. 60°C

Die Pellets wurden nach Paraffinierung über Nacht in der Gießstation bei 50 bis 60°C in warme Edeltstahlgießformen zusammen mit frischem Paraffin und einer beschrifteten Einbettkassette in Blöcke passend für Paraffinschneidemikrotome gegossen und erst bei Raumtemperatur, danach im Kühlschrank ausgehärtet. Die Edeltstahlgießform wurde entfernt als das Paraffin fest war und der Block über Nacht bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Entparaffinierung und Herstellung von histologischen Schnitten

Der -20°C tiefgefrorene Paraffinblock wird zum Schneiden im Mikrotom fixiert und erst grob (Schnittdicke ca. 30 µm) angeschnitten. Nach vollständiger Erfassung des Pelletquerschnitts wurden Schnitte von 3 µm Dicke hergestellt und zuerst vorsichtig in raumtemperiertem Aqua dest. und danach im 45°C warmen Wasserbad geglättet, auf einen Glasobjektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Die Entparaffinierung wurde durchgeführt wie folgt:

60 min	60° C Wärmeschrank Schmelzen Paraffin
8 min	Xylol I Entparaffinieren
8 min	Xylol II Entparaffinieren
2 x 2 min	95% EtOH
5 min	70% EtOH
5 min	50% EtOH
	H ₂ O dest.

2.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt eine allgemeine Übersichtsfärbung, zur Abbildung von Gewebe sowie darin enthaltener Zellen, dar. Alle basophilen Gewebe- und Zellstrukturen werden dabei durch Hämatoxylin blau angefärbt, wie z. B. das Chromatin in den Zellkernen. Azidophile Bestandteile des Zytoplasmas hingegen werden beispielsweise durch Eosin rot angefärbt.

Die Färbung wurde durchgeführt wie folgt:

9 min	Hämatoxylinlösung
	H ₂ O dest. Spülen
13 s	0,25% HCl/50% EtOH Differenzieren
	H ₂ O dest. Spülen
10 min	Leitungswasser Bläuen
1-2 min	Eosinlösung Färben 1%
	H ₂ O dest Spülen.
3 s	70% EtOH Differenzieren
3 s	Entwässern in 95% EtOH
2 x 5 min	100% Isopropanol
2 x 5 min	Xylol
	Eindecken (organisch)

2.2.3.4 Alcian Blau-Färbung

Alcian Blau wird sehr gern eingesetzt zur selektiven Anfärbung von sauren Mucopolysacchariden bzw. negativ geladener, sulfonierter Proteoglycane. Dadurch lässt sich schon vorab das Maß der chondrogenen Differenzierung einschätzen. Die Färbung wurde durchgeführt wie folgt:

3 min	3% Essigsäure Vorbehandlung
30 min	1% Alcian Blau 8 GX (pH 1,0) Lösung
	H ₂ O dest. Spülen
2 min	Kernechtrot Gegenfärbung

	H ₂ O dest. Spülen
3 s	70% EtOH Differenzierung
3 s	95% EtOH Entwässerung
2 x 5 min	100% Isopropanol
2 x 5 min	Xylol
	Eindecken (organisch)

2.2.3.5 Alkalische Phosphatase-Färbung

Als Maß zur Beurteilung der Hypertrophie der Pelletkulturen wurde die Alkalische Phosphatase (ALP)-Färbung durchgeführt.

Nach Entparaffinierung und dreimaligem Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser wurde das von Sigma® bezogene *Alkaline Phosphatase Detection Kit* [Tab. 13] verwendet und nach Herstellerangaben wie folgt vorgegangen:

- Herstellung der Diazoniumsalzlösung (100 µl FBB-Alkalinelösung und 100 µl Natrium-Nitrit-Lösung)
- Zugabe von 4,5 ml destilliertes Wasser zur Diazoniumsalzlösung
- Zugabe von 100 µL Naphthol AS-BI Alkali-Lösung zur Diazoniumsalz-Lösung
- 15-minütige Inkubation der Schnitte mit hergestellter Lösung bei Raumtemperatur
- Abspülen der Färbelösung mit destilliertem Wasser
- Lufttrocknung gefärbter Pelletschnitte und Eindeckung in wässrigem Mittel (Aquatex®)

Bei Vorhandensein Alkalischer Phosphatase färbten sich die ALP-positiven Areale im Zellpellet blau.

2.2.3.6 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen beruhen alle auf dem Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen und sind deshalb ein wertvolles Instrument, um einen Nachweis bezüglich chondrogener bzw. osteogener Differenzierung zu erbringen, da gerade manche oberflächentypisch exprimierten Antigene in differenzierten Zellen, wie z. B. Collagen II, nur immunhistochemisch spezifisch anfärbbar und damit nachweisbar sind. Die angefertigten Parafinschnitte der Pelletkulturen wurden nach Rehydratation und Demaskierung der spezifischen Antikörperbindungsstellen mit verdünnten Antikörperlösungen inkubiert. In der Tab. 5 werden die verwendeten Antigene und Antikörper mit entsprechender Konzentration zusammenfassend beschrieben.

Die immunhistochemische Färbung wurde durchgeführt wie folgt:

15 min	Waschpuffer Rehydratation der Zellen
	DakoPen zum Markieren der Schnitte
15 min	1 mg/ml Pepsin in 1 M Tris-HCl, pH 2,0, bei RT, Verdau
	Waschpuffer, 3 x Waschen
10 min	Spezifische Vorbehandlung (Antikörperbindungsoptimierung)
	Waschpuffer, 3 x Waschen
20 min	100 µL Blockierungslösung, RT (Blockieren unspezifischer Bindungsstellen)
ü. Nacht	100 µL primär AK (1:300)

Nachdem Auftragen des Primärantikörpers auf die Schnitte inkubierte dieser im Kühlschrank bei 4°C über Nacht in einer Feuchtkammer. Nach 12 Stunden bzw. am nächsten Morgen erfolgte die Darstellung der AG-AK-Bindung mithilfe des Detectionssystems von *Dako REAL, Alkaline Phosphatase/RED*. Das Prinzip des Färbekits beruht auf der Link and Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode, der

biotinylierte Link-Antikörper dient als sekundärer Antikörper und reagiert mit einem ALP-Enzym-Konjugat, bestehend aus ALP mit gekoppeltem Streptavidin. Der rote Farbumschlag wird anschließend durch das chromogene Substrat der ALP, *Fast Red*, sichtbar gemacht und mikroskopiert. Es wurde wie folgt vorgegangen:

	3x Waschen, Waschpuffer
20 min	3 Tropfen Link bei RT in Feuchtkammer
	Waschpuffer, 3x Waschen
20 min	3 Tropfen Label bei RT in Feuchtkammer
	Waschpuffer, 3x Waschen
5-30 min	Chromogen Fast Red
	Waschpuffer, 3x Waschen
1 min	H ₂ O dest.
9 min	Hämatoxylin Gegenfärbung
	H ₂ O dest. 3x Waschen
	Leitungswasser Bläuen
	Eindecken, wässrig (Aquatex®)

2.2.3.6.1 Kollagen Typ II-Färbung

Zur Darstellung von Kollagen Typ II wurde *Dako REAL Detection System* (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) benutzt [2.2.3.6]. Der hierbei verwendete monoklonale Antikörper ist spezifisch gegen die α 1- und α 3-Kette des im hyalinen Knorpelgewebe vorhandenen Kollagen Typ II gerichtet, folglich auch in erfolgreich differenzierten Stammzellen.

2.2.3.6.2 Kollagen Typ X-Färbung

Zur Darstellung von Kollagen Typ X wurde *Dako REAL Detection System* (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) [2.2.3.6].

2.2.3.6.3 Chondroitin-4-Sulfat-Färbung

Benutzt wurde das *Dako REAL Detection System* (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) zur Darstellung von Chondroitin-4-Sulfat. [2.2.3.6].

2.2.3.7 Annexin V-Cy3/6-CFDA Fluoreszenzdoppelfärbung

Dafür vorgesehene Pellets wurden wie folgt gefärbt:

	1 ml PBS, 3x Waschen
	3 x 200 µl Bindungspuffer
30 min	300 µl Färbelösung in einem mit Aluminiumfolie lichtgeschütztem Eppendorftube bei RT
	3 x 200 µl Bindungspuffer
	4% Paraformaldehydfixierung

Die Färbelösung bestand aus einem Gemisch von Annexin V-Cy3 und 6-CFDA (AnnCy3, 6-CFDA), 10x-Bindungspuffer und entsalztem, sterilem Wasser. Die Weiterbearbeitung erfolgte anhand des Fixierungs- und Einbettungsprotokolls, wie die restlichen histologischen Untersuchungen. Die angefertigten Paraffinschnitte wurden gleich im Anschluss an das Schneiden im Fluoreszenzmikroskop angesehen und gleich fotodokumentiert, da beide Farbstoffe lichtempfindlich sind. Zur Aufbewahrung wurden die Mappen mit den

Schnitten ebenfalls in Alufolie eingewickelt. Annexine werden eine Familie von Proteinen genannt, insgesamt sind ca. 100 verschiedene in 45 Arten bekannt, 12 davon im Menschen. Deren Gemeinsamkeit ist die calciumabhängige Bindung an sauren Phospholipiden der Zellmembran, die eine oder mehrere negative Ladungen aufweisen. Im Anschluss lagern sie sich zusammen zu Transportproteinen für Ionenkanäle. Um in der Fluoreszenzdoppelfärbung zwischen apoptotischen und vitalen Zellen zu entscheiden, macht man sich folgenden Mechanismus zunutze: Phosphatidylserin, ein Phosphoglycerid, wird im Zuge des Apoptosevorgangs unter anderem auch an die äußere Zellmembran transportiert. Annexin-Cy3 kann dort nun unter Vorhandensein von Ca^{2+} -Ionen an das herausgetretene Phosphatidylserin-Molekül binden. Da Annexin-Cy3 im Fluoreszenzmikroskop rot erscheint, stellen sich die apoptotischen Zellen rot dar. In den vitalen Zellen sind hingegen Esterasen vorhanden, diese sind in der Lage nicht-fluoreszierendes 6-Carboxyfluorescein-Diacetat (6-CFDA) umzuwandeln in 6-Carboxyfluorescein (6-CF), das fluoresziert. Daher erscheinen lebendige Zellen grün unter dem Fluoreszenzmikroskop. Vereinfacht bedeutet es, dass Zellen im apoptotischen Stadium im Fluoreszenzmikroskop rot erscheinen, vitale Zellen dagegen leuchten grün und präapoptische Zellen beides, sowohl rot als auch grün.

2.2.4 Genexpressionsanalyse

2.2.4.1 RNA-Isolation

Um auf molekularbiologischer Ebene die Expression spezifischer chondrogener und osteogener Marker zu überprüfen, wurde RNA aus den jeweiligen Gruppen gewonnen. An Tag 3, 7, 14 und 21 wurden jeweils fünf Pellets aus jeder Transduktionsgruppe dafür herangezogen. Die fünf jeweils zugehörigen Pellets wurden alle zusammen in ein steriles Eppendorf-Tube pipettiert, dreimal das Kulturmedium mit sterilem PBS herausgewaschen und anschließend in 350 µl Lysispuffer durch eine sterile Mikropistille zerkleinert. Dieser besteht aus 1 ml RA1-Lösung mit 10 µl β-Mercaptoethanol. Das Gemisch wurde mehrmalig gevortext und mit einer Pipette durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurde das Pelletlysate auf ein mit einem Filter ausgestattetes Eppendorftube pipettiert und 1 min bei 11000 x g abzentrifugiert. Die Filtereinheit wird anschließend verworfen und 350 µl 70%-er Ethanol mit der aufgefangenen Lösung vermischt bzw. kurz gevortext. Das Gemisch wurde in eine Silicamembran überführt und 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. Die RNA-Bindung an die Silicamembran wird unterstützt durch den Lysispuffer. Um eventuell vorhandene und unerwünschte DNA zu eliminieren, schließt sich nun ein DNase-Verdau an mit *membrane desalting buffer* (MDB) (350 µl) und 1-minütiger Zentrifugation bei 11000 x g. Danach wird DNase hinzu pipettiert, kurz inkubiert, und die DNA-Verunreinigungen, Salze und makromolekulare Zellbestandteile im Anschluss mit verschiedenen Pufferlösungen ausgewaschen. Die Silicamembran wird dann getrocknet. Um die RNA, die sich nun in der Filtereinheit der Silicamembran befindet, zu extrahieren, wurde sie auf ein frisches, autoklaviertes Nuklease-freies Eppendorf-Tube gesetzt, RNase-freies Wasser darauf pipettiert und 1 min bei 11000 x g zentrifugiert.

Als letzten Schritt zur Qualitätsüberprüfung nach dem Aufreinigungsprotokoll wurde im Spektrometer bei 260 nm die RNA-Konzentration gemessen. Da Proteinkontaminationen bei 280 nm und Kohlenhydrat- oder Peptidkontaminationen bei 230 nm Wellenlänge absorbieren, erfolgte die Reinheits- und Qualitätskontrolle der DNA über die Quotienten $E_{260/280}$ bzw. $E_{260/230}$. Zielwerte für $E_{260/280}$ bei der Messung der RNA-Konzentration liegen idealerweise in einer Range von 1,8 bis 2,0, und für $E_{260/230}$ größer als 2,0. Werte deutlich kleiner als 1,8 für $E_{260/280}$ zeigen eine mögliche Proteinkontamination an und Werte deutlich größerer als 2,0, die Anwesenheit von degradiertes RNA, beides natürlich ein unerwünschtes Ergebnis bei der RNA-Isolierung. Die so isolierte, aufgereinigte RNA wurde entweder gleich zur cDNA umgeschrieben oder für die spätere Weiterverarbeitung bei -80°C tiefgekühlt gelagert.

2.2.4.2 cDNA-Synthese

Um weiterführende molekulargenetische RNA-Analysen durchzuführen, muss diese zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurden Proben zuerst auf Eis aufgetaut. Die Konzentration der Probe wurde, falls nicht schon erfolgt, nochmals bestimmt und das Probenvolumen errechnet, das einer RNA-Konzentration von 1000 μg entsprach. Dieses Probenvolumen wurde der jeweiligen RNA-Probe entnommen und mit autoklaviertem HPLC- H_2O auf 11 μl Endvolumen aufgefüllt. Pro Probe wurde je 1 μl Random Hexamere zur DNA hinzugefügt und im Heizblock (70°C) zur Anlagerung erhitzt. Diese bewirken eine Denaturierung der mitenthaltenen DNA. Zu jeder Probe wurde anschließend ein Master Mix (je 8 μl) pipettiert:

5x-Reaction buffer	4 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l
HPLC-H ₂ O	2,75 μ l
200 U/ μ L Reverse Transkriptase	0,25 μ l

cDNA Synthese:

Schritt 1: 10 min bei Raumtemperatur

Schritt 2: 60 min Elongation bei 42°C (Heizblock, cDNA-Einzelstrangbildung)

Schritt 3: Erhitzen auf 70°C (Heizblock, Elongationsende)

Um am Ende der Synthese ein 50 μ l Gesamtprobenvolumen zu erhalten, wurde anschließend 30 μ l autoklaviertes HPLC-H₂O hinzugefügt. Die Lagerung bis zur Verwendung der cDNA erfolgte tiefgekühlt bei -20°C.

2.2.4.3 Semiquantitative RT-PCR

Zur Vervielfältigung der aus umgeschriebener RNA entstandenen cDNA, setzten wir die klassische RT- Polymerase-Kettenreaktion (Reverse Transkriptase-PCR) ein. Hierzu wurden ein für jedes Gen jeweils spezifisches Primerpaar (5 pmol/ μ l) und die MangoTaq-Polymerase (Tab. 8) benutzt. Um das Handling zu vereinfachen und die Proben möglichst gleich zu behandeln, wurde ein Master-Mix hergestellt, der für jede Probe aus folgenden Inhaltsstoffen bestand:

HPLC-H ₂ O, autoklaviert	21,9 μ L
MangoTaq-Polymerase (5000 U/ml)	0,1 μ L
10x-Puffer	3 μ L
dNTPs (10 mM)	1 μ L
<i>forward</i> Primer	1 μ L
<i>reverse</i> Primer	1 μ L
MgCl ₂ (50 Mm)	1 μ L

cDNA Probe

1 µl

Der Master-Mix sowie die cDNA wurden in PCR-Stripes zusammen pipettiert, kurz gevortext und in der Mini-PCR-Stripes-Zentrifuge anzentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit zu homogenisieren. Die Amplifikation der cDNA der verschiedenen Proben erfolgte im Thermocycler, jeweils mit der nach speziellen Programmen für die jeweiligen Primer:

Schritt 1: initiale Denaturierung:	94°C	3 min
Schritt 2: Denaturierung:	94°C	30 s
Schritt 3: Bindung:	51-58°C	45 s (je nach Primer)
Schritt 4: Elongation:	72°C	1 min
Schritt 5: letzte Elongation:	72°C	5 min
Schritt 6: Kühlen:	12°C	durchgehend

Die Angabe der verwendeten für jedes Primerpaar spezifischen Annealing Temperatur (siehe Schritt 3) ist der Tab. 8 zu entnehmen. In Abhängigkeit der Intensität der Banden erfolgten bis zu 35 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4.

2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das entstandene PCR-Produkt wurde mithilfe eines 2%-Agarosegels in der Gelelektrophoresekammer aufgetrennt und anschließend densitometrisch anhand der Bio Profile Software abgebildet. Das Agarose-Gel wurde aus 1,5 g Pulver und 100 ml TBE (0,5x) Puffer durch kurzes Aufkochen hergestellt. Nach kurzem Abkühlen wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzu pipettiert und nach ca. 5 bis 10 min in eine Gelgießvorrichtung gegossen. Lediglich die Vertiefungen wurden mithilfe von Kämmen im Gel ausgespart, um das PCR-Produkt später

aufzutragen. Nach Aushärtung wurden die Kämme in der mit 0,5x-TBE-Laufpuffer bedeckten Elektrophoresekammer entfernt und die entstandenen Vertiefungen mit je 10 µl PCR-Produkt gefüllt, welches bereits im Vorfeld mit 10x DNA-Loading-Dye versetzt wurde, im Verhältnis 1:10. In jedem Gel wurde zusätzlich in die erste Kammvertiefung eine DNA-Leiter von 100 bp pipettiert, zur Überprüfung der PCR-Produktgröße. Anschließend wanderten die PCR-Produkte ungefähr 45 Minuten in einem elektrischen Feld von 145 V. Im *Azure c400* wurden Bildaufnahmen unter UV-Licht gemacht und die entstandenen Banden durch die Bio ID/Capt MW Software densitometrisch ausgewertet.

2.2.4.5 Quantitative RT-PCR

Um eine quantitative Aussage über das amplifizierte Genprodukt zu erhalten, führten wir für die wichtigsten chondrogenen und osteogenen humangenomspezifischen Primer sowie für das Housekeeping-Gen mit Hilfe des von Biosystems hergestellten *KAPA SYBR® FAST qPCR Kit* eine quantitative RT-PCR durch. Das Kit beinhaltet einen vorgefertigten KAPA Mastermix, der wiederum den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green enthält, welcher mit der DNA interkaliert und somit über Messung der Extinktion im Opticon™ System nach jedem Vervielfältigungszyklus eine genaue Erfassung der entstandenen PCR-Produktmenge ermöglicht. Es wurde wieder ein Master-Mix hergestellt, der für jede Probe aus folgenden Zutaten bestand:

Mastermix (SYBR-Green I mit enthaltener DNA-Polymerase)	10 µl
autoklaviertes HPLC-H ₂ O	7 µl
forward Primer	1 µL
reverse Primer	1 µL

Proben cDNA

1 μ l

Master-Mix sowie cDNA wurden in speziellen PCR Stripes zusammen pipettiert, die einen lichtdurchlässigen Deckel haben, kurz gevortext und anzentrifugiert um die gesamte Flüssigkeit zu homogenisieren und im DNA Engine Opticon™ nach einem bestimmten Programmschema vervielfältigt:

Schritt 1: 95°C	initiale Denaturierung:	3 min
Schritt 2: 95°C	Denaturierung:	30 s
Schritt 3: 51-58°C	Bindung:	20 s (je nach Primer)
Schritt 4: 72°C	Elongation:	30 s
Schritt 5: 72°C	letzte Elongation:	7 min
Schritt 6: 55°C bis 95,1°C, 1 s Ablesen alle 0,3°C, Schmelzkurvenerstellung		

Im Anschluss an die erste Elongationsphase (Schritt 4), erfolgte die Fluoreszenzmessung in jedem Zyklus. Wie schon auch bei der semiquantitativen PCR waren auch hier die Annealing Temperaturen für jeden Primer spezifisch etabliert (Tab. 8). Die Wiederholung der Zyklen erfolgte jedoch im Gegensatz zur semiquantitativen PCR für jeden Primer gleich häufig, da die Darstellung des Produktes wie oben beschrieben nach jedem 4. Schritt erfolgt und dadurch der Schwellenzyklus (C_T -Wert), gleichbedeutend mit dem Beginn der exponentiellen Genproduktvervielfältigung bestimmt werden.

Bei der statistischen Auswertung normierten wir die gemessenen cDNA-Menge auf die interne Kontrolle EF1 α und zusätzlich im Vergleich zu nicht-infizierten hMSCs. Für jedes Gen führten wir eine Dreifachbestimmung mit cDNA dreier Stammzellspendern durch.

2.2.5 Statistikanalysen

Die numerischen Ergebnisse der durchgeführten Tests und Assays, (ALP, ATP, DNA, ELISA, GAG, PCR) wurden statistisch ausgewertet, alle mit dreimaliger Wiederholung (n=3), mit Material von jeweils drei verschiedenen Knochenmarksspendern, im Alter zwischen 35 und 65 Jahren (Durchschnittsalter 53). Daraus wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet und angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Monolayer- und Pelletkultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Nach dem Aussähen der aus dem Knochenmark von Hüftköpfen bzw. dem Femurschaft gewonnenen Zellen wurden diese in Stammzellmedium auf Zellkultur-Polystyrene kultiviert.

Nach drei bis vier Tagen waren unter dem Mikroskop einzelne oder in kleinen Gruppen zusammengelagerte, spindelförmige Zellen erkennbar, mit für MSCs typischer, Fibroblasten-ähnlicher Morphologie. Daneben waren auch nicht adhärenente, runde Blutzellen erkennbar, welche mit dem regelmäßigen zwei- bis dreitägigem Mediumswechsel entfernt wurden. Nach zehn bis zwölf Tagen war eine deutliche Vermehrung und Entstehung eines dichten, konfluenten Zellrasens aus den adhärenenten hMSCs zu beobachten.

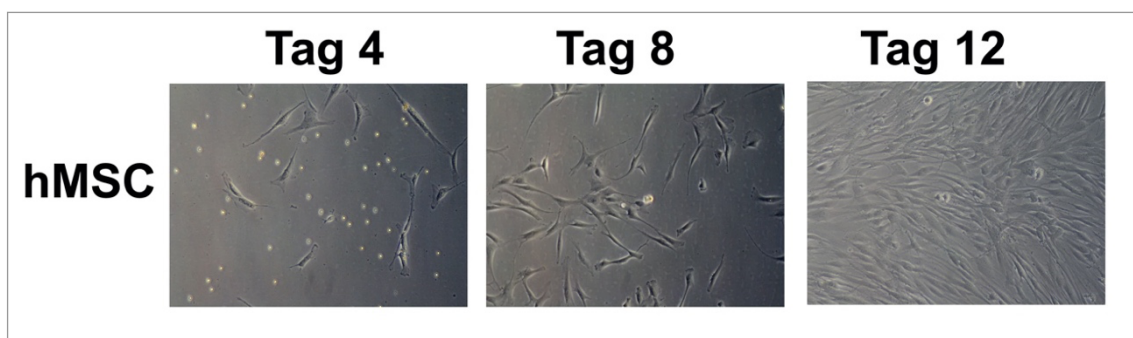


Abb. 3: Aufnahmen von hMSC- Primärkulturen im Phasenkontrast.

Proliferation der Fibroblasten-ähnlichen Stammzellen an Tag 4, Tag 8 und Tag 14, 50-fache Vergrößerung.

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurden die kultivierten Zellen bereits auf Wachstumsrate und Differenzierungspotenzial getestet und es zeigte sich, dass

bei steigender Anzahl an Passagen sowohl die Wachstumsrate als auch das Differenzierungspotential abnahmen, so dass wir uns entschlossen für diese Arbeit nur Zellen aus Primärkulturen zu verwenden

Kultiviert wurden die Zellen bis sie ca. 80 % Dichterate erreicht hatten. Danach erfolgte nach Abtrypsinierung und Zählung die zweistündige Infektion (MOI 50) entsprechend der vorher bestimmten Zellzahl. Die Negativkontrolle wurde nicht infiziert und gleich zu Zellpellets verarbeitet. Pro Pellet wurden 3×10^6 Zellen verarbeitet. Es erfolgte alle zwei bis drei Tage ein regelmäßiger Mediumswechsel und nach bestimmten Zeitpunkten wurden die Pellets geerntet und zu Zwecken der weitergehenden Analyse verarbeitet.

3.2 Transgenexpressionsbestimmung

3.2.1 Quantitative ELISA-Transgenexpressionsbestimmung von TGF- β 1 und IGF-1

Zur Expressionsbestimmung des Transgens im Falle der mit TGF- β 1 und IGF-1 transduzierten Gruppen, wendeten wir den bereits etablierten, entsprechenden ELISA-Test an. Jeweils an dem Vortag der Tage 3, 7, 14, und 21 erfolgte ein Mediumswechsel. Das Medium blieb für 24 h auf dem Zellpellet. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewonnen und für den Elisa verwendet, um daraus die TGF- β 1- bzw. IGF-1-Konzentration zu bestimmen. So wurde der Transduktionserfolg sichergestellt und der 21 Tage-Transgenexpressionsverlauf gemessen.

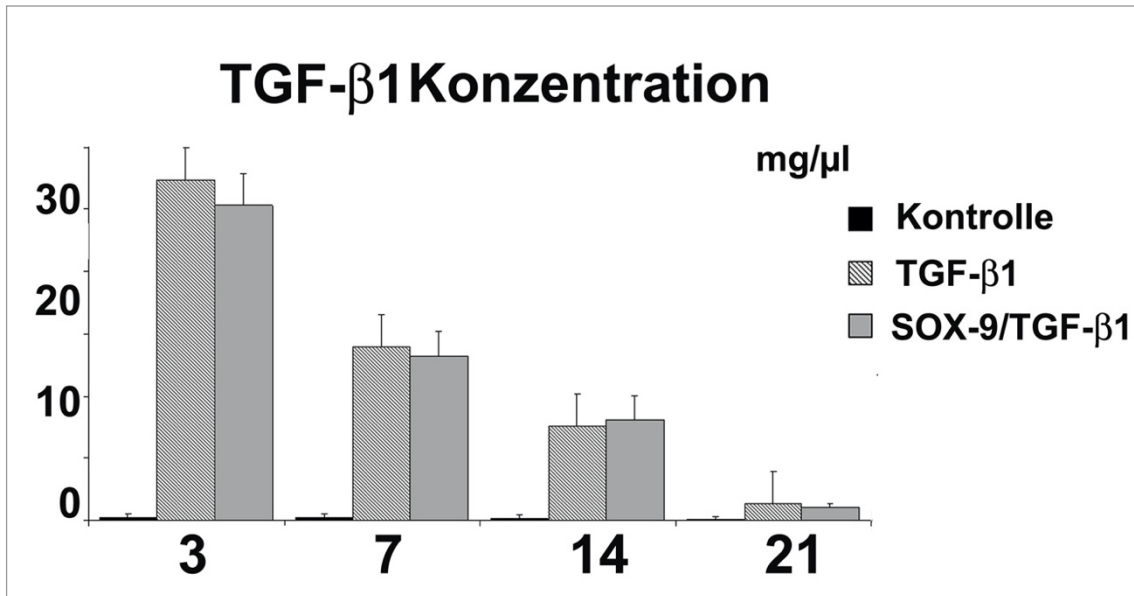


Abb. 4: TGF- β 1-Transgenexpressionsverlauf über 21 Tage nach adenoviraler hMSC-Pelletkulturentransduktion.

Bestimmung der Ad. TGF- β 1-Transgenexpression in den transduzierten Pelletkulturen und in der Kontrollgruppe 24 h-Sammelüberstand via ELISA.

Im Zeitverlauf wurde der höchste Wert an Tag 3 in der TGF- β 1- und in der SOX9/TGF β 1-Kultur gemessen, über 21 Tage abnehmend.

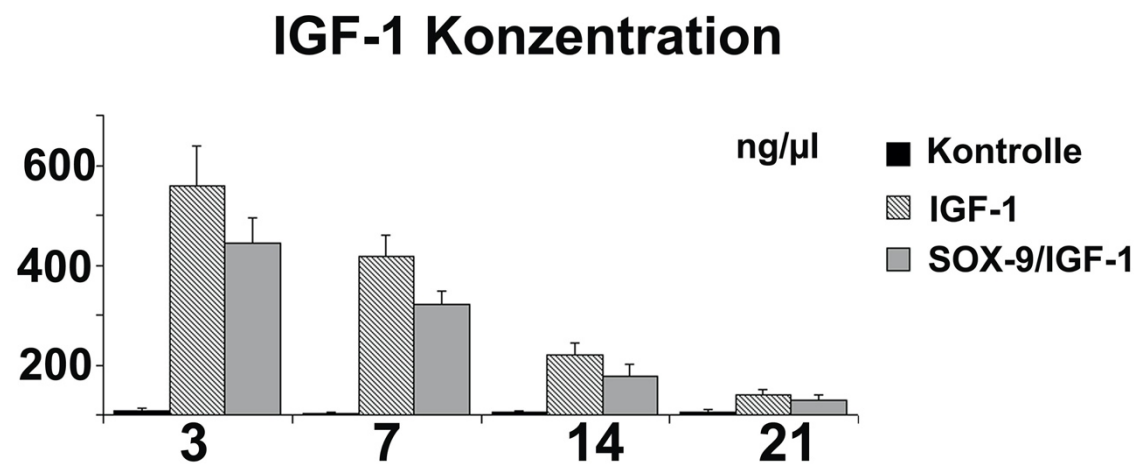


Abb. 5: IGF-1- Transgenexpressionsverlauf über 21 Tage nach adenoviraler hMSC-Pelletkulturentransduktion.

Bestimmung der Ad. IGF-1 -Transgenexpression in den transduzierten Pelletkulturen und in der Kontrollgruppe 24 h-Sammelüberstand via ELISA.

Im Zeitverlauf wurde der höchste Wert an Tag 3 in der IGF-1 und in der SOX9/IGF-1 -Kultur gemessen, über 21 Tage abnehmend.

TGF- β 1 und IGF-1 konnten in den jeweiligen Transduktionsgruppen nachgewiesen werden. Dabei zeigten die mit TGF- β 1 und IGF-1 allein oder in Kombination mit SOX9 transduzierten Pelletkulturen an Tag 3 die höchsten Transgenexpressionswerte im Bereich von 30-35 mg/ μ L für rekombinantes TGF- β 1 Protein sowie im Bereich für 500-600 ng/ μ L für rekombinantes IGF-1 Protein. Im Zeitverlauf über 21 Tage nahmen die Werte der rekombinanten Proteine ab.

3.2.2 SOX9 fluoreszenzmikroskopische, qualitative

Transgenexpressionsbestimmung

Der adenovirale Vektor, der für diese Arbeit verwendet wurde, beinhaltete ein SOX9 Fusionsgen gekoppelt an grün fluoreszierendes Protein (GFP) aus dem *Aequorea victoria* Jellyfish, dass durch Einfall von ultraviolettem bzw. blauem Licht grün fluoresziert. So konnte die Expression des SOX9/GFP/GFP-Genprodukts in den transduzierten Zellen räumlich und zeitlich im Fluoreszenzmikroskop kontrolliert und verfolgt werden.

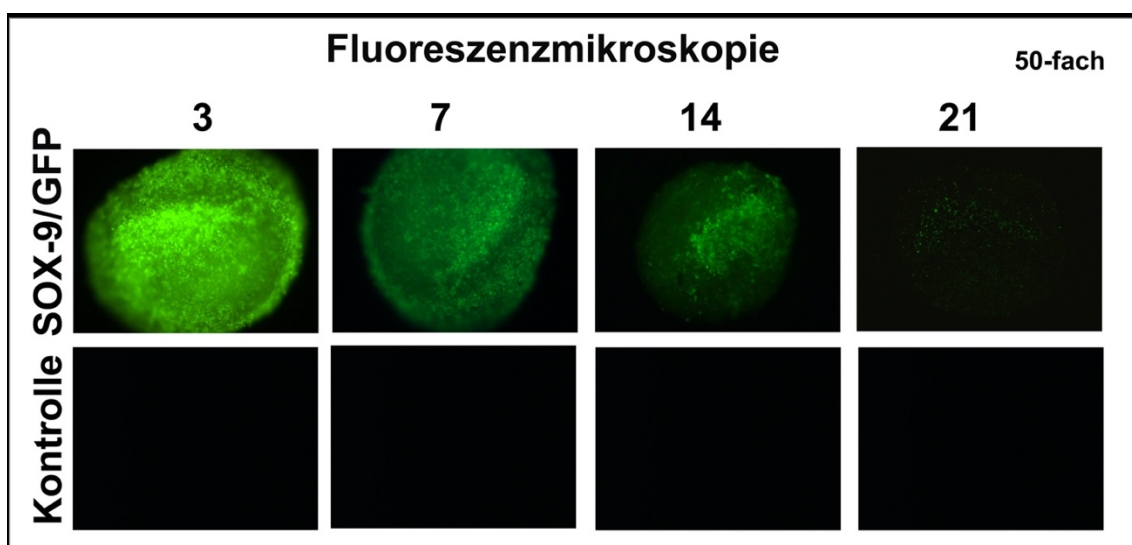


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Pelletkultur nach adenoviraler SOX9/GFP Transduktion, in 50-facher Vergrößerung.

Es zeigten sich viele SOX9/GFP-positive Zellen an Tag 3 nach SOX9/GFP-Transduktion der hMSCs mit einer Konzentration von 100 MOI. Über den zeitlichen Verlauf von 3 Wochen nahm die Zahl an grün fluoreszierenden Zellen deutlich ab. Originalvergrößerung 50-fach.

An Tag 3 erkennt man die typisch kräftige, grün leuchtende adenovirale Transgenexpression, welche im Zeitverlauf über 3 Wochen deutlich abnimmt.⁶³

64 86

3.2.3 Qualitative Bestimmung der SOX9 Genexpression mittels Western Blot

Um zusätzlich zur qualitativen Transgenexpressionsbestimmung von SOX9 mittels Fluoreszenzmikroskopie eine quantitative Aussage zur SOX9/GFP Expression über 21 Tage zu bekommen, führten wir einen SOX9/GFP-Westernblot durch. Hierzu wurde ein Antikörper spezifisch gegen SOX9 von der Firma Acris in der Verdünnung 1:100 benutzt.

SOX-9 Westernblot

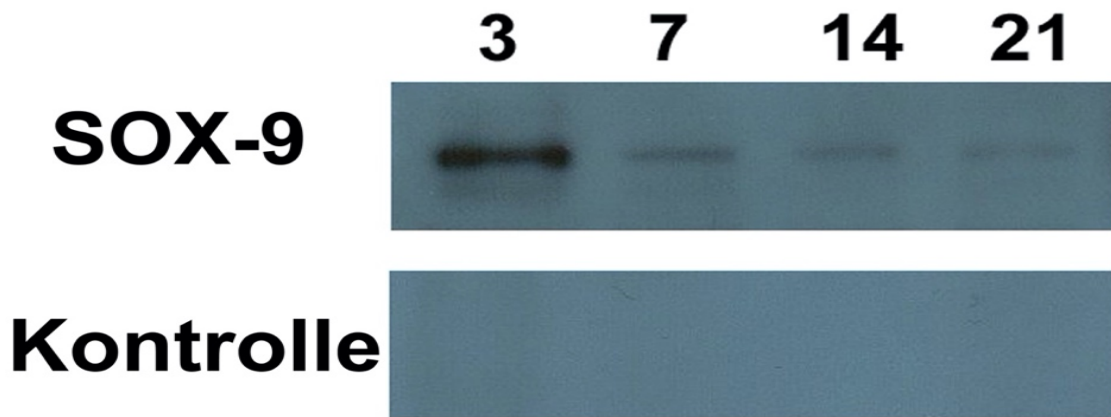


Abb. 7: Nachweis von SOX9/GFP Transgenexpression im Westernblot.

Die Ad. SOX9/GFP Transgenexpression in den transduzierten Pelletkulturen und in der Kontrollgruppe wurde mittels Westernblot aus Zelllysaten im Zeitverlauf bestimmt.

Die SOX9/GFP transduzierten Pelletkulturen zeigten im Zeitverlauf an Tag 3 die höchste Transgenexpression, an Tag 7 bereits abnehmend ebenso wie im Verlauf über 21 Tage.

An Tag 3 zeigte sich eine starke Bande, die für eine deutliche Transgenexpression spricht. An Tag 7 zeigte sich bereits eine schwächere Bande, die im Zeitverlauf über 3 Wochen noch einmal abnahm.

3.3 Adenosintriphosphat-Assay zur quantitativen

Zellproliferationsratenbestimmung

Zur Bestimmung der Zellviabilität und der Proliferationsraten wurde der Adenosintriphosphat-(ATP)-Assay verwendet. Anhand der produzierten Mengen an ATP konnten Rückschlüsse über die Stoffwechselaktivität der verschiedenen Transgengruppen sowie der Kontrollgruppe getroffen werden.

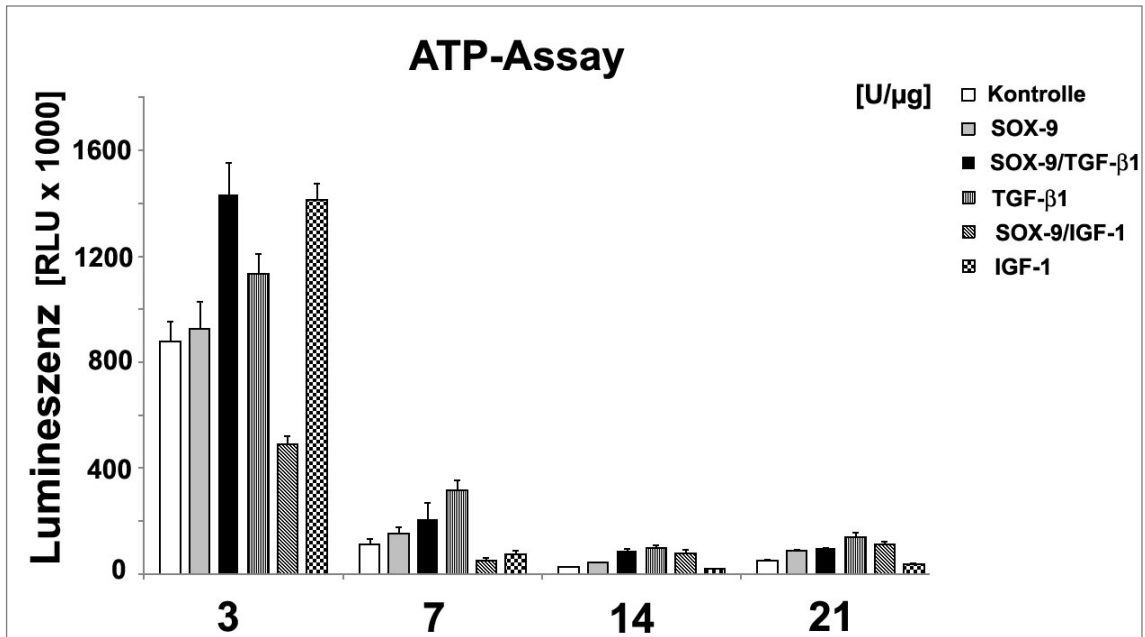


Abb. 8: Adenosintriphosphat-Assay nach adenoviralem Gentransfer von SOX9/GFP.

Die Zellviabilität und Proliferation der unterschiedlichen Gruppen wurde über 3 Wochen im Zeitverlauf in einem biochemischen Adenosintriphosphat-Assay gemessen.

An Tag 3 zeigten sich im ATP-Test die höchsten Werte für die Zellviabilität und Proliferation, besonders in der SOX9/TGFβ1 und TGFβ1-Gruppe, entsprechend einer hohen metabolischen Aktivität. Im weiteren Verlauf ließ sich dies jedoch nicht bestätigen, da man kaum Unterschiede zwischen den einzelnen transduzierten Gruppen an Tag 7, 14 und 21 sah.

3.4 DNA-Assay zur quantitativen Zellvitalitätsbestimmung

Mit dem DNA-Assay lassen sich Rückschlüsse über die Proliferationsrate, die Zellvitalität sowie der Anzahl der hMSCs in den transduzierten bzw. der Kontrollgruppe durch Bestimmung des Pellet DNA-Gehaltes ziehen.

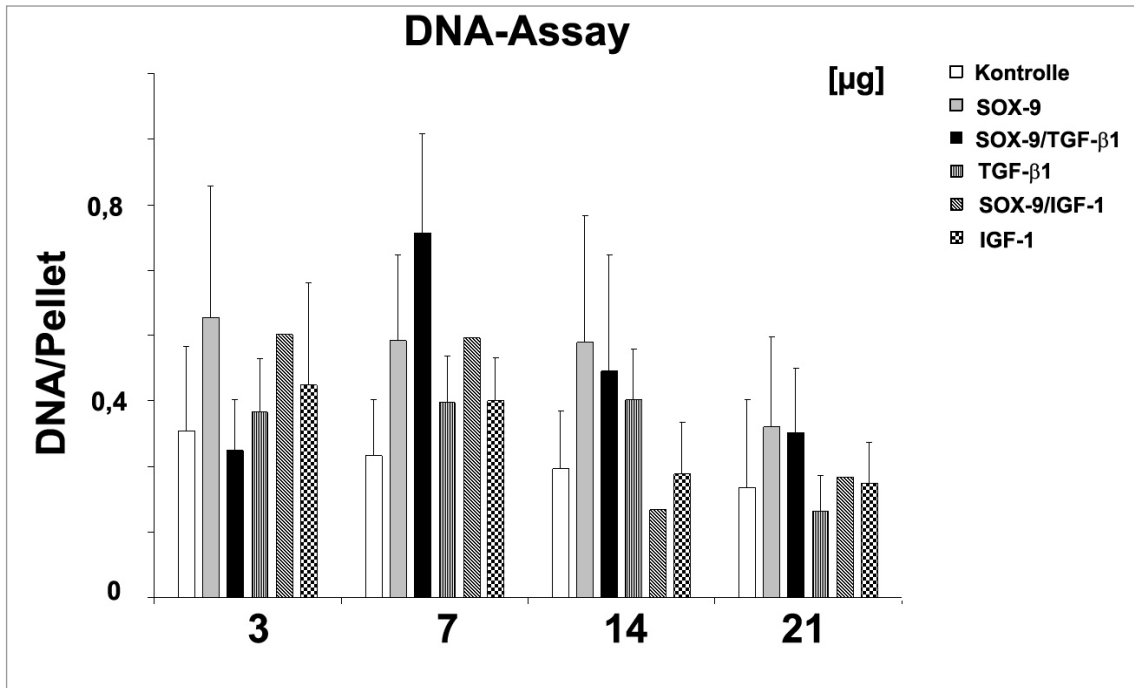


Abb. 9: DNA-Gehalt der Pelletkulturen.

Die DNA-Menge pro Pellet, gemessen über 21 Tage, ist im Zeitverlauf in der Kontrollgruppe vergleichbar mit den transduzierten Gruppen.

An Tag 3 und Tag 7 zeigten sich die höchsten DNA-Werte im Vergleich, mit abnehmender Tendenz zu Tag 14 und Tag 21. Zwischen den einzelnen transduzierten Gruppen sowie der Kontrolle zeigten sich zwar leichte Schwankungen, jedoch keine signifikanten Unterschiede.

3.5D MMB zur quantitativen Glykosaminoglykan-Gehaltsbestimmung

Glykosaminoglykane (GAGs) liegen in der extrazellulären Matrix kovalent gebunden an Proteoglykanen vor und beeinflussen dadurch deren physiochemische Eigenschaften enorm. Neben den Kollagenfibrillen sind sie ein Hauptbestandteil des hyalinen Knorpelgewebes. So tragen die GAGs zusammen mit den Proteoglykanen entscheidend zur Elastizität und Stoßfestigkeit des

hyalinen Knorpelgewebes bei. Die quantitative GAG-Gehaltsbestimmung der Pellets lässt Rückschlüsse auf die chondrogene Differenzierung und die Zellproliferation zu.

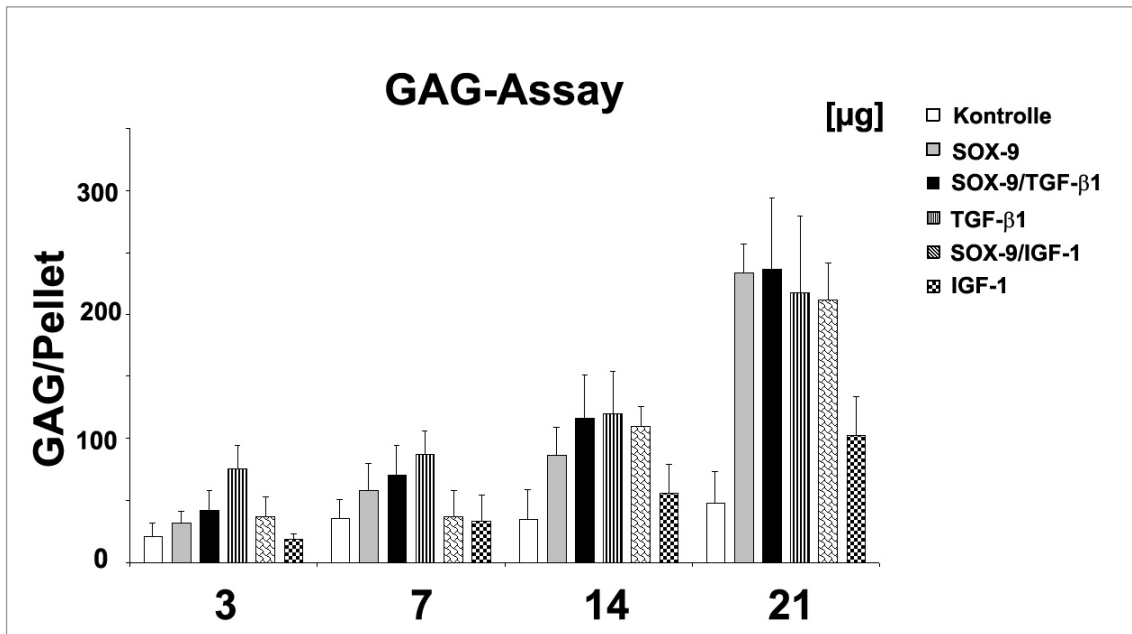


Abb. 10: Glykosaminoglykananteil der Pelletkulturen.

Der Glykosaminoglykananteil pro Pellet wurde jeweils an Tag 3, 7, 14 und 21 bestimmt. Dabei zeigten sich über 21 Tage ansteigende Werte besonders in den SOX9/GFP-modifizierten Gruppen, im Vergleich zur Kontrollgruppe.

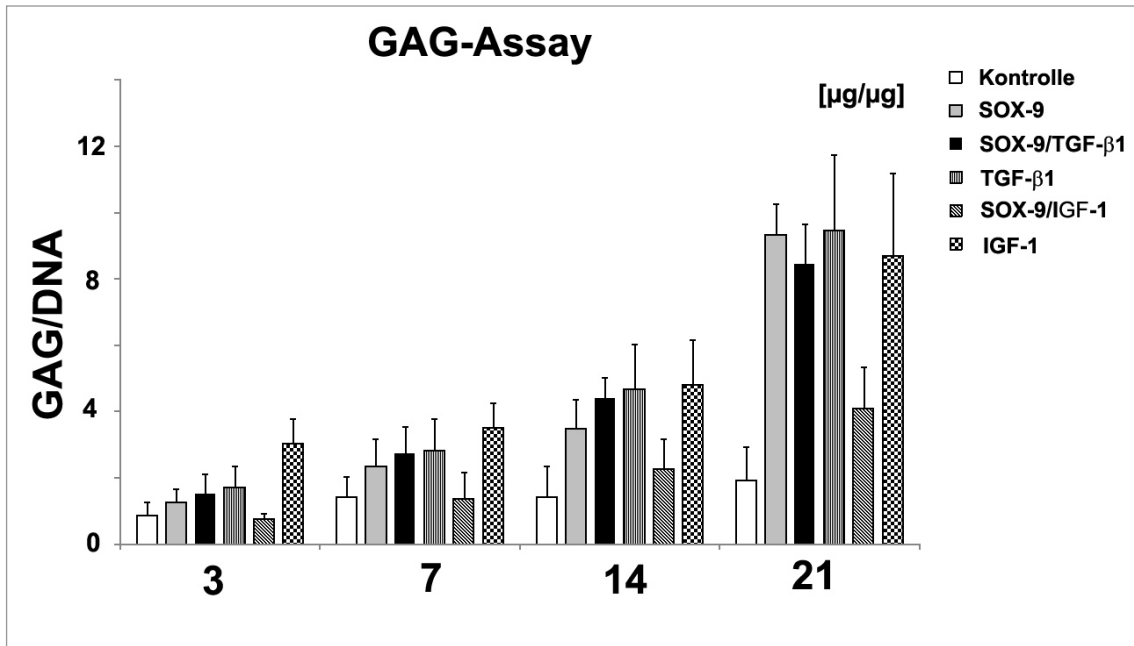


Abb. 11: Glykosaminoglykan- pro DNA-Gehalt.

Der Glykosaminoglykananteil bezogen auf DNA-Anteil pro Pellets wurde jeweils an Tage 3, 7, 14 und 21 bestimmt. Dabei zeigten sich über 21 Tage ansteigende Werte besonders in den SOX9/GFP-modifizierten Gruppen, im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der GAG-Gehalt der verschiedenen Transsgengruppen wurde sowohl als absoluter Wert pro Pellet ermittelt sowie auf den dazugehörigen DNA-Wert normiert (siehe Abb. 10), den das betreffende Pellet aufwies. Dargestellt in der Abb. 10 wurde der auf den DNA-Wert normierte GAG-Gehalt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten und evtl. Zelldichteschwankungen zu minimieren. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme des GAG-Gehaltes besonders an Tag 21 im Vergleich zur Negativkontrolle, und vor allem in der SOX9/GFP und der TGF1-Gruppe, aber auch in den Co-Transduktionsgruppen.

3.6 Chondrogene Differenzierung

3.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die allgemeine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung dient der Übersicht in Bezug auf Größe des Pellets, der Chondronengröße sowie Menge der gebildeten interzellulären Substanz sowohl im Vergleich der Pelletgruppen als auch zur Ersteinschätzung der chondrogenen Differenzierung.

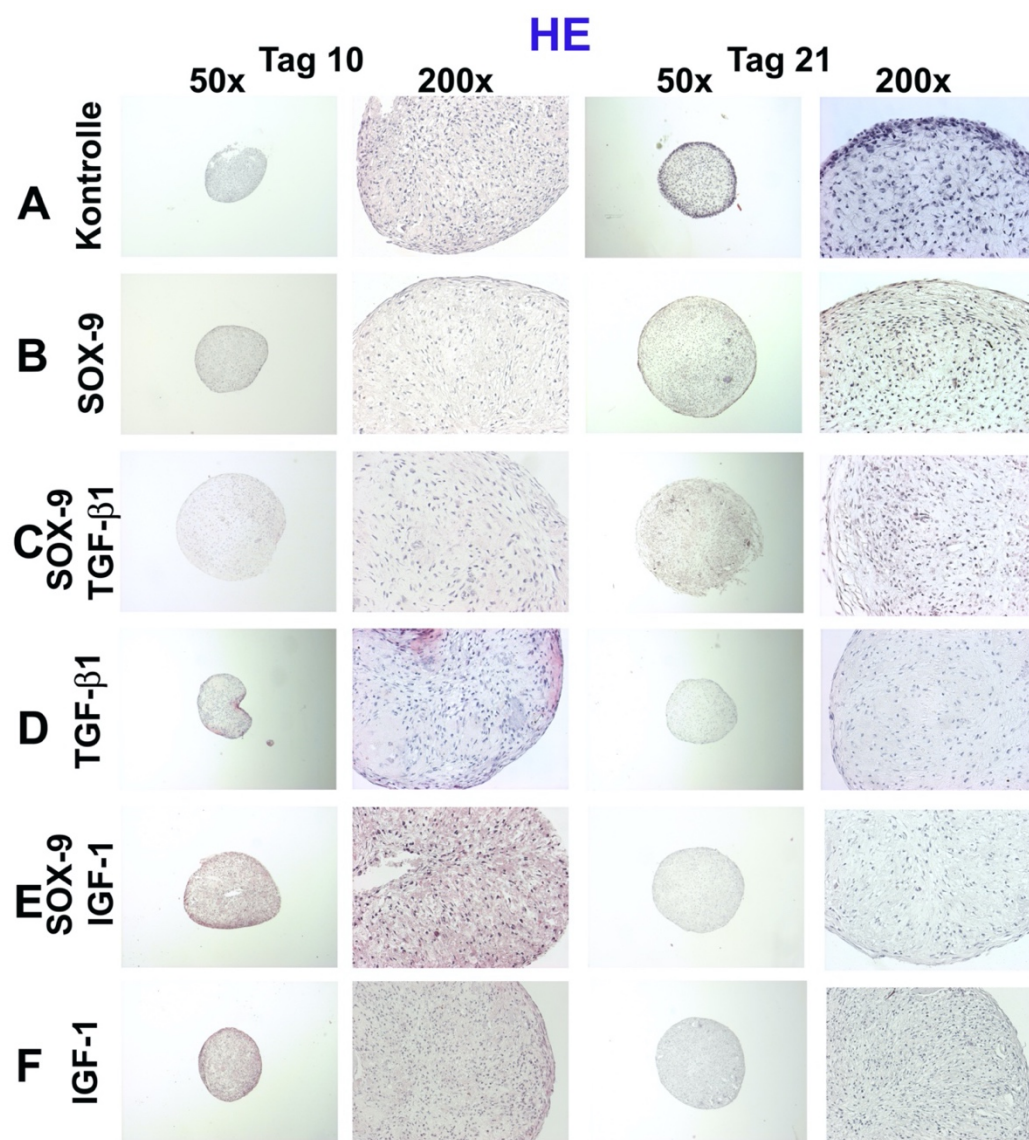


Abb. 12: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Hämatoxylin Eosin Färbung in 50- und 200-facher Vergrößerung.

Nach 10 und nach 21 Tagen Pelletkultivierung, sowohl der Kontrollgruppe als auch der adenoviral transduzierten Gruppe wurden diese histologisch bearbeitet und Hämatoxylin-Eosin-gefärbt um die Zellmorphologie und Zellzahl der Pellets beurteilt.

Die Negativkontrollen wiesen verglichen mit der SOX9/GFP, TGF- β 1-, SOX9/GFP/TGF- β 1- und SOX9/GFP/IGF-1- sowie BMP-2 transduzierten Gruppe einen deutlich größeren Pelletdurchmesser auf. Zudem zeigten die Chondrone eine gesteigerte Menge an Interzellulärsubstanz.

3.6.2 Alcian Blau-Färbung

Als Nachweis für das Ausmaß der chondrogenen Differenzierung diente die Alcian Blau-Färbung, welche negativ geladene Proteoglykane in der Extrazellulärmatrix blau anfärbt und somit schon vor der spezifischen Immunhistochemie einen Überblick über die chondrogene Differenzierung der Negativkontrolle und aller Transduktionsgruppen liefert.

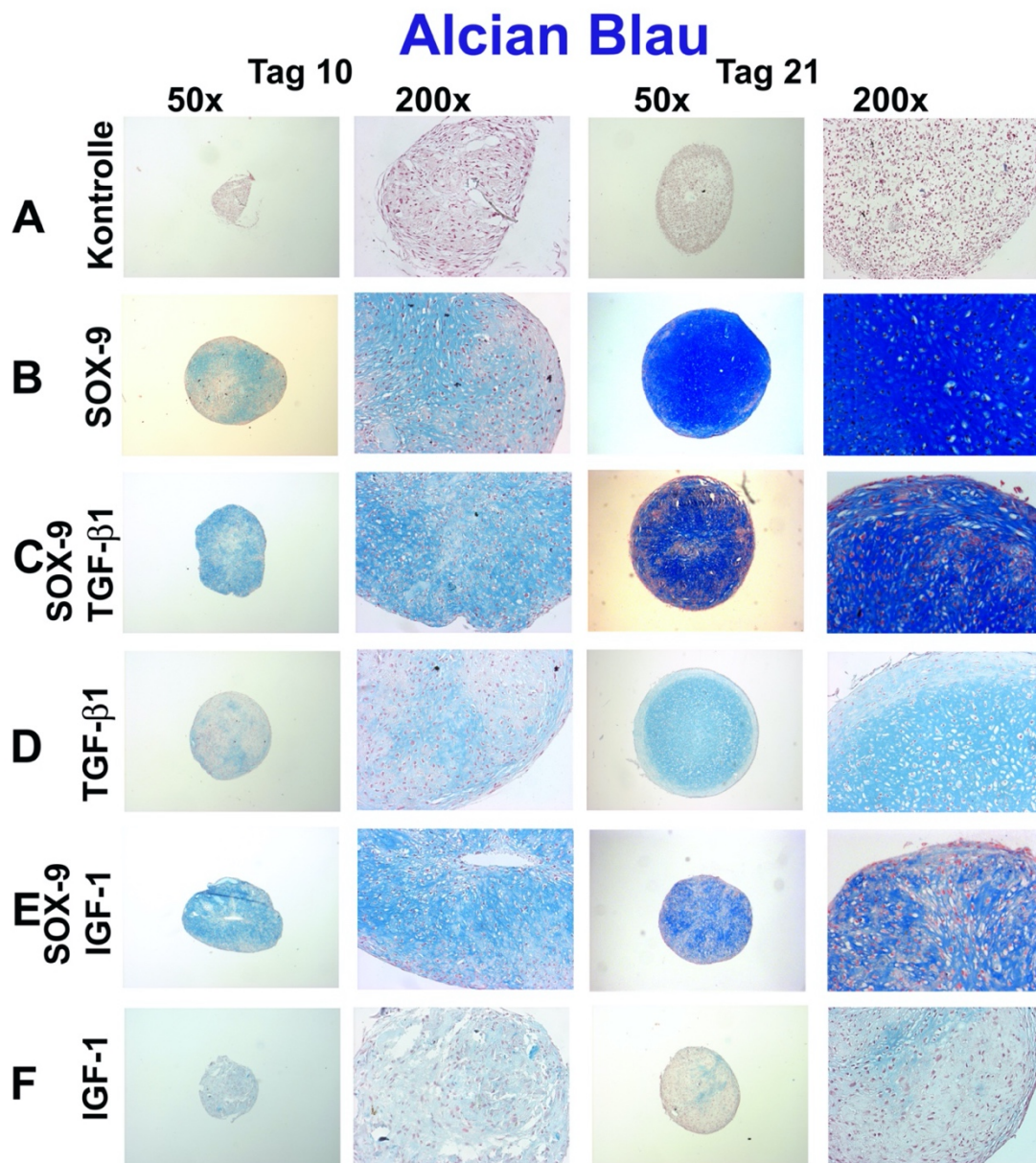


Abb. 13: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Alcian Blau Färbung in 50- und 200-facher Vergrößerung.

Nach 10 und nach 21 Tagen Pelletkultivierung, sowohl der Kontrollgruppe als auch der adenoviral transduzierten Gruppe wurden diese histologisch bearbeitet und gefärbt um die Zellmorphologie und Zellzahl der Pellets beurteilt. Die Alcian Blau-Färbung zeigte sowohl an Tag 10 als auch besonders an Tag 21 eine deutliche Anfärbbarkeit von Proteoglykanen in der Matrix der Zellpellets.

Genetisch modifizierte SOX9/GFP-Pellets zeigten eine signifikant höhere Produktion von Proteoglykanen im Vergleich zur Negativkontrolle besonders an Tag 21, wobei schon der frühe Zeitpunkt an Tag 10 eine im Vergleich deutlich sichtbare Blaufärbung in der Alcian Blau-Färbung anzeigt. Ebenfalls zeigt sich

eine deutlich Größenzunahme der Pellets an Tag 21 im Vergleich zur Kontrolle und ein dem hyalinen Knorpel ähnliches phänotypisches Erscheinungsbild mit Chondronen und Proteoglycanakkumulation in der Extrazellulärmatrix besonders in der SOX9-, TGF- β 1- bzw. SOX9/GFP/TGF- β 1-Gruppe. Auch die Kombination von SOX9/GFP und IGF-1 zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine gewisse chondrogene Differenzierung, wenngleich nicht so stark wie die obengenannten Gruppen. Das Färberesultat erscheint hier zusätzlich etwas ungleichmäßiger und fleckförmig, ebenso lässt die Größe, Form und Konfiguration der Chondrone morphologisch an hypertrophe Differenzierung denken.

3.6.3 Kollagen Typ II-Immunhistologie

Das Matrixprotein Kollagen Typ II, eines der wichtigsten Chondrogenesemarker überhaupt, zählt zu dem Haupttyp von Knorpelkollagen. Rot angefärbte Areale zeigen dabei eine hohe Kollagen II-Expression.

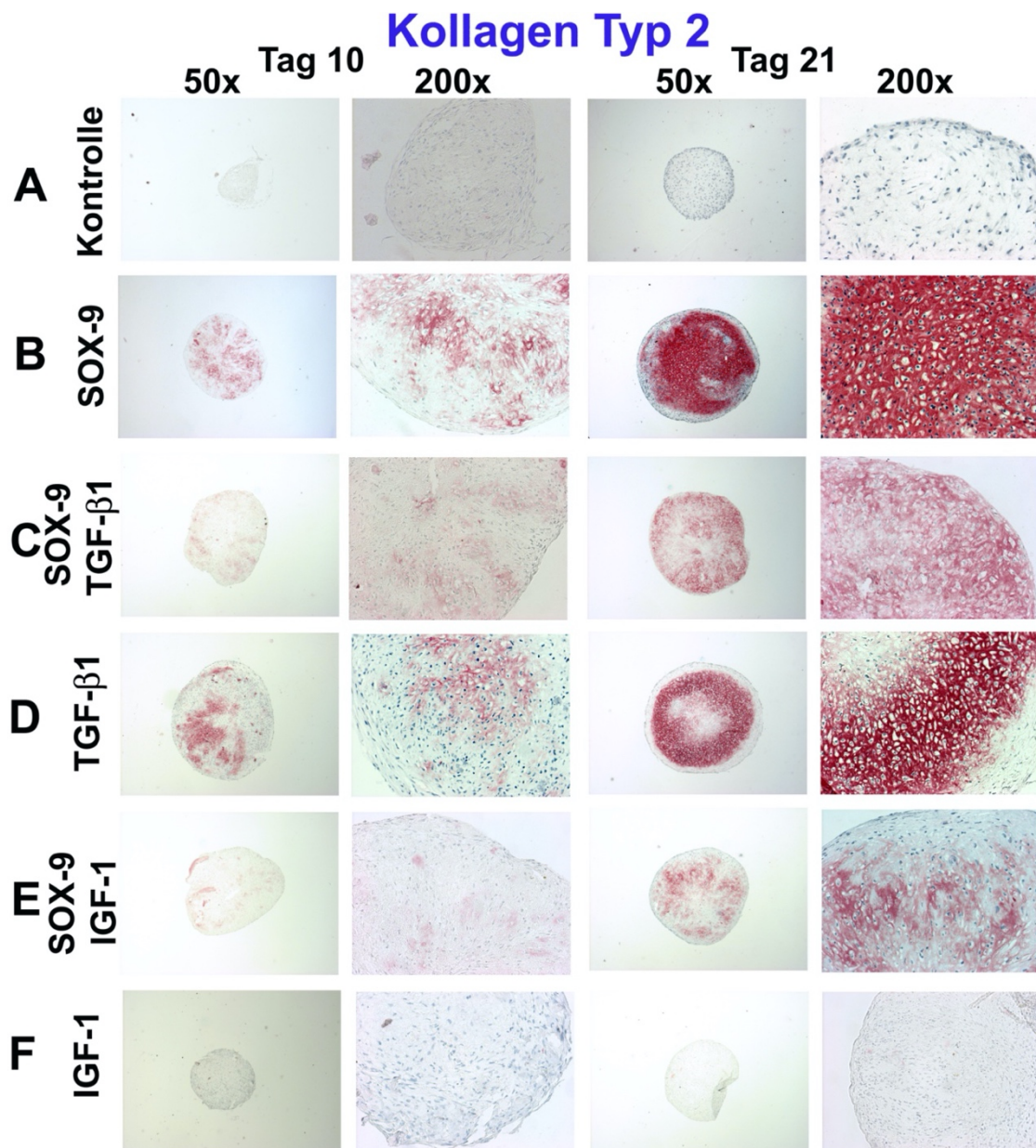


Abb. 14: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Kollagen II-Immunhistochemie in 50- und 200-facher Vergrößerung.

Nach 10 und nach 21 Tagen Pelletkultivierung, sowohl der Kontrollgruppe als auch der adenoviral transduzierten Gruppe wurden diese immunhistochemisch bearbeitet. Die Kollagen II-positiven Areale zeigten eine deutliche Rotfärbung bereits an Tag 10 und besonders an Tag 21 in der SOX9 und TGF-β1-Gruppe.

In der Abb. 14 ist an der Rotfärbung deutlich erkennbar, dass eine Synthese von Kollagen II bereits an Tag 10 in geringem Maße und ausgeprägter an Tag 21 stattfindet, analog zur Proteoglykansynthese in der Alcian Blau-Färbung, vor allem in den SOX9/GFP-, TGF-β1-, SOX9/GFP/TGF-β1- und SOX9/GFP/IGF-1-

Gruppen. Korrespondierend zu der Alcian Blau-Färbung zeigt sich auch hier eine Größenzunahme der Pellets an Tag 21, besonders im Vergleich zur Negativkontrolle bzw. IGF-1 alleine sowie ein morphologisch typisches Erscheinungsbild des hyalinen Knorpels, mit Chondronenbildung und einem deutlich roten Färberesultat. Kollagen Typ II konnte somit in der immunhistochemischen Färbung eindeutig insbesondere an Tag 21 nachgewiesen werden. Die stärkste Expression zeigte sich hierbei wie erwartet an Tag 21 in der SOX9-Gruppe, alle anderen Gruppen lassen keine großen Unterschiede untereinander erkennen.

3.6.4 Chondroitin-4-Sulfat-Färbung

In der heterogenen Gruppe der Chondroitinsulfate stellt das kleine Proteoglykan Chondroitin-4-Sulfat (CS-4) zusammen mit den Kollagenen einen wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix von hyalinem Gelenkknorpel dar. Die endgültigen Funktionen von CS-4 sind noch nicht hinreichend geklärt, allerdings hängt zum Teil die strukturelle Integrität des Gewebes von CS-4 ab.

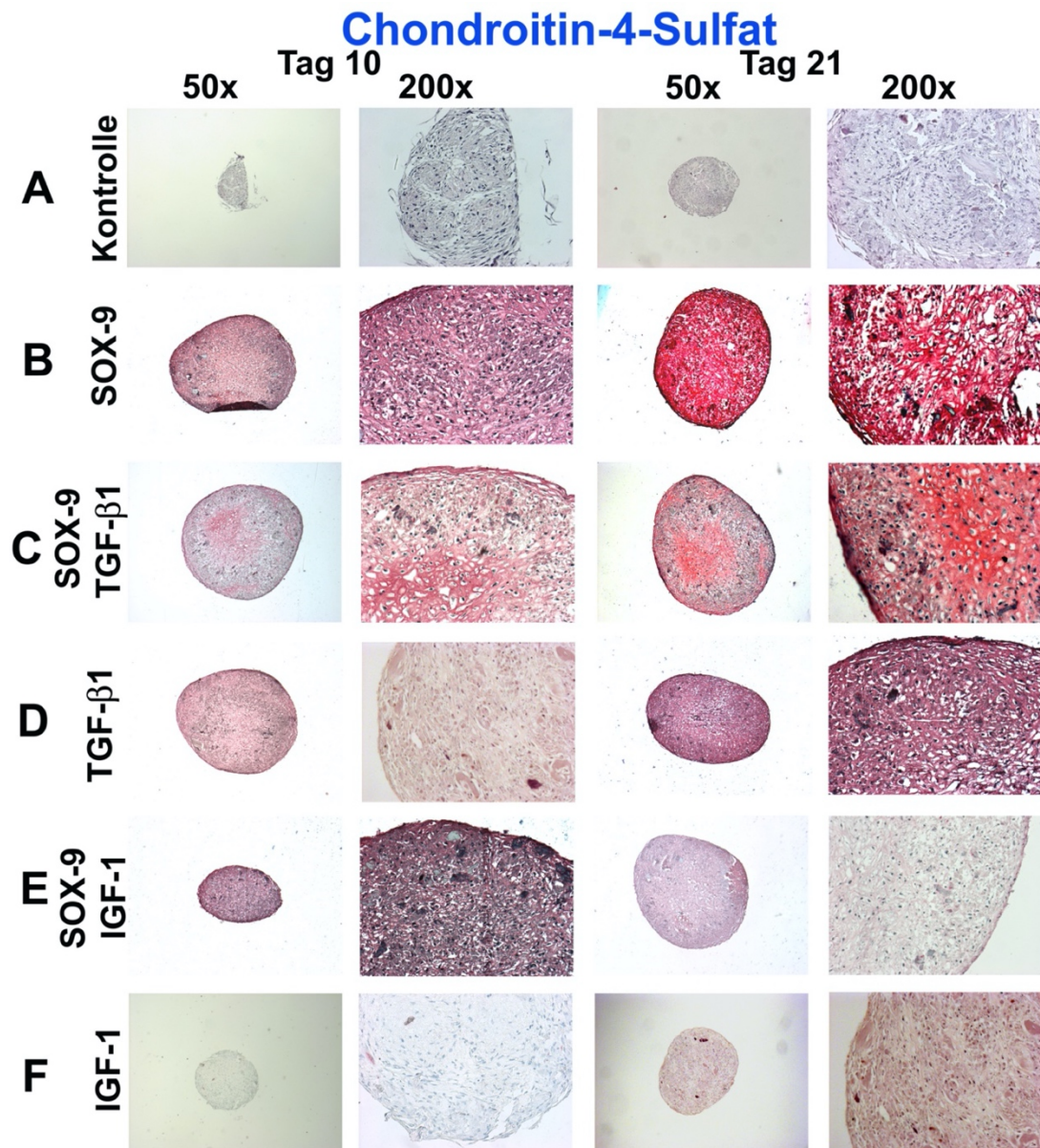


Abb. 15: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Chondroitin-4-Sulfat-Immunhistochemie in 50- und 200-facher Vergrößerung.

Nach 10 und nach 21 Tagen Pelletkultivierung, sowohl der Kontrollgruppe als auch der adenoviral transduzierten Gruppe wurden diese immunhistochemisch bearbeitet. Die Chondroitin-4-Sulfat-positiven Areale zeigten eine deutliche Rotfärbung bereits an Tag 10 und besonders an Tag 21 in der SOX9 und TGF-β1-Gruppe.

Die CS-4-Färbung zeigte auch bereits an Tag 10 in den SOX9/GFP-, SOX9/GFP/TGF-β1- und in den TGF-β1 allein transduzierten Gruppen deutliche positive Ergebnisse im Vergleich zur Negativkontrolle. Am stärksten positiv erwies sich das SOX9/GFP transduzierte Pellet an Tag 21, was auf ein deutliches

chondrogenes Differenzierungspotential von SOX9 schließen lässt, ähnlich wie bereits die Alcian Blau-Färbung und Kollagen II-Färbung gezeigt hatten. Ebenfalls in der oben abgebildeten CS-4-Färbung deutlich erkennbar sind die in Extrazellulärmatrix eingebetteten Chondrone sowie die Pelletgrößenzunahme über den Zeitraum von 21 Tagen.

3.7 Chondrogene Hypertrophie

3.7.1 Alkalische Phosphatase-Assay

Phosphatasen, besonders alkalische, sind im menschlichen Körper weit verbreitete Enzyme und spielen in vielen Organen eine große Rolle. Mit einer der höchsten ALP-Aktivitäten des menschlichen Körpers finden sich im Knochen. Deshalb spielt die ALP-Bestimmung in dieser Arbeit auch eine bedeutende Rolle als Marker für die osteogene Aktivität in den Zellpellets und im Hinblick auf die hypertrophe Entdifferenzierung der kultivierten MCSs. In dem hier verwendeten ALP-Assay wurde die relative ALP-Aktivität pro DNA-Gehalt der mit unterschiedlichen Faktoren transduzierten MSC-Pellets untersucht.

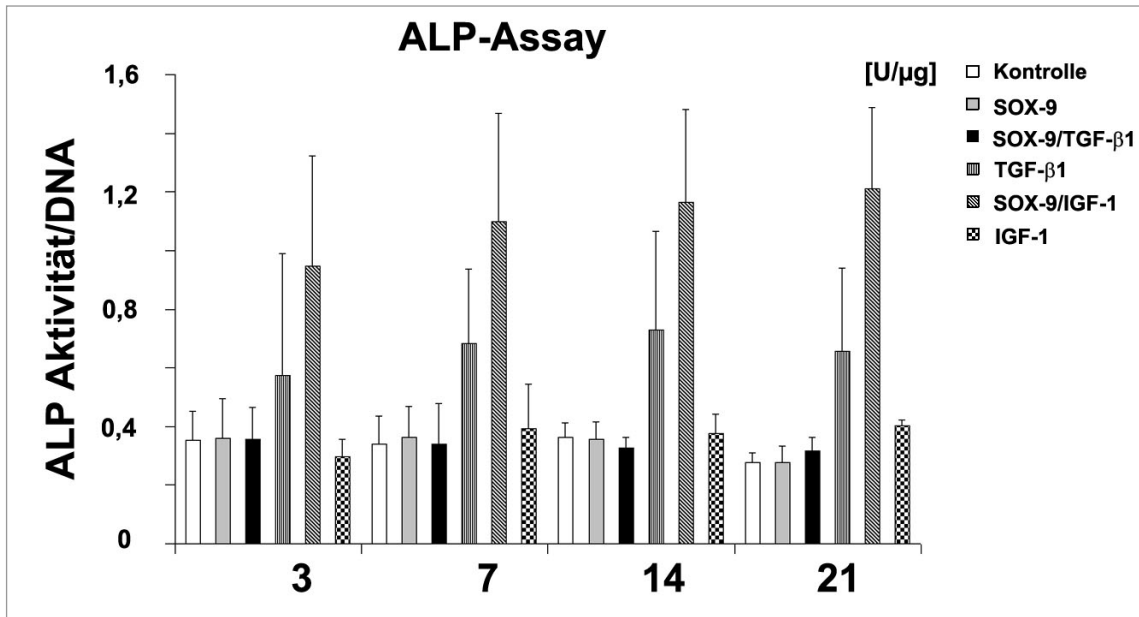


Abb. 16: Alkalische Phosphatase-Assay von hMSC-Pellets.

Die Alkalische Phosphatase-Aktivität wurde an den Kultivierungstagen 3, 7, 14 und 21 densitometrisch im Alkaline Phosphatase-Assay bestimmt und entsprechend des DNA-Gehalts der Gruppen genormt.

Über den gesamten Zeitverlauf war insbesondere in zwei der sechs Gruppen eine erhöhte ALP-Aktivität verglichen mit der Negativkontrolle zu erkennen: zum einen in der TGF-β1-Gruppe und zum anderen in der SOX9/GFP/IGF-1-Co-Transfunktionsgruppe. In der SOX9/GFP- und in der SOX9/GFP/TGF-β1-Co-transduzierten Gruppe ließ sich keine Erhöhung im Vergleich zur Negativkontrolle verzeichnen.

3.7.2 Alkalische Phosphatase-Färbung

Da ALP als wichtiger chondrozytärer Hypertrophiemarker gilt, wurden zusätzlich zur quantitativen Messung der Alkalischen Phosphatase in den Zellpellets diese auch wie in [2.2.3.5] beschrieben histologisch an Tag 10 und 21 mit Hilfe des *ALP Detection Kit* von SIGMA®, gefärbt.

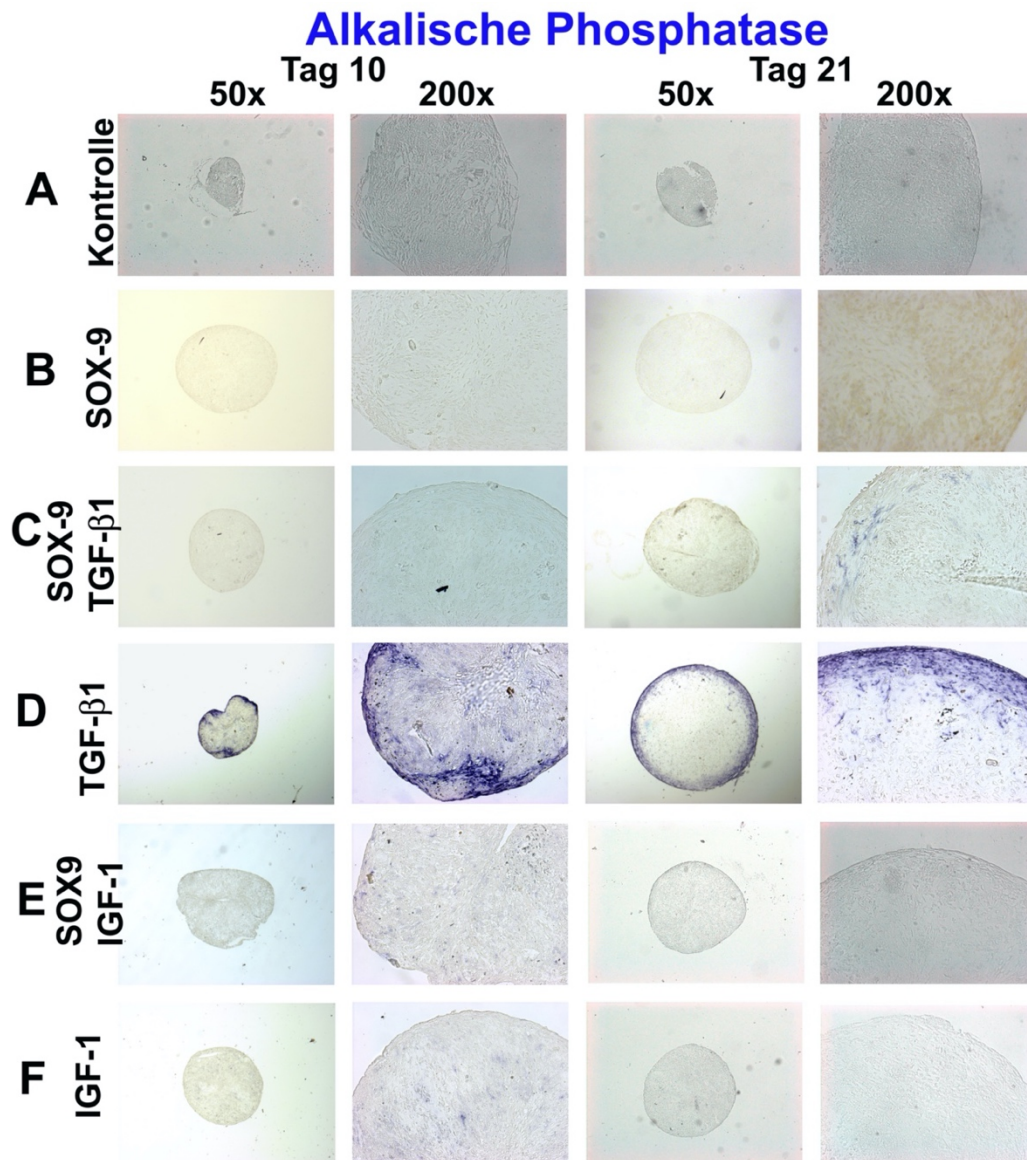


Abb. 17: Histologische Übersicht von hMSC-Zellpelletquerschnitten nach Alkalische Phosphatase-Färbung von in 50- und 200-facher Vergrößerung.

Nach 10 und nach 21 Tagen Pelletkultivierung, sowohl der Kontrollgruppe als auch der adenoviral transduzierten Gruppe wurden diese immunhistochemisch bearbeitet. Die Alkalische Phosphatase-positiven Areale zeigten eine deutliche Blaufärbung.

SOX9/GFP alleine zeigte keine Anfärbbarkeit der ALP weder an Tag 10 noch an Tag 21. Die Negativkontrolle, SOX9/IGF-1 und IGF-1 alleine ebenfalls nicht. In der TGF-β1-Gruppe zeigte sich bereits an Tag 10 in einigen Arealen eine positive Reaktion in der ALP-Färbung, die gegen Tag 21 leicht zunahm. Ebenfalls eine leicht positive Reaktion zeigte sich an Tag 21 in der SOX9/GFP/TGF-β1-Gruppe.

Hier ist in einem kleinen Randbereich ein bläuliches ALP positives Areal zu erkennen. Das Vorhandensein der ALP wird im allgemeinen als Zeichen der hypertrophen Dedifferenzierung im Zeitverlauf gewertet werden.

3.7.3 Kollagen Typ X-Färbung

Zusätzlich zur Alkalischen Phosphatase gilt die Kollagen Typ X-Immunhistochemie als zusätzlicher Marker der chondrogenen Hypertrophie. Die Kollagen Typ X-positiven Areale stellen sich in der immunhistochemischen Färbung rotbraun dar.

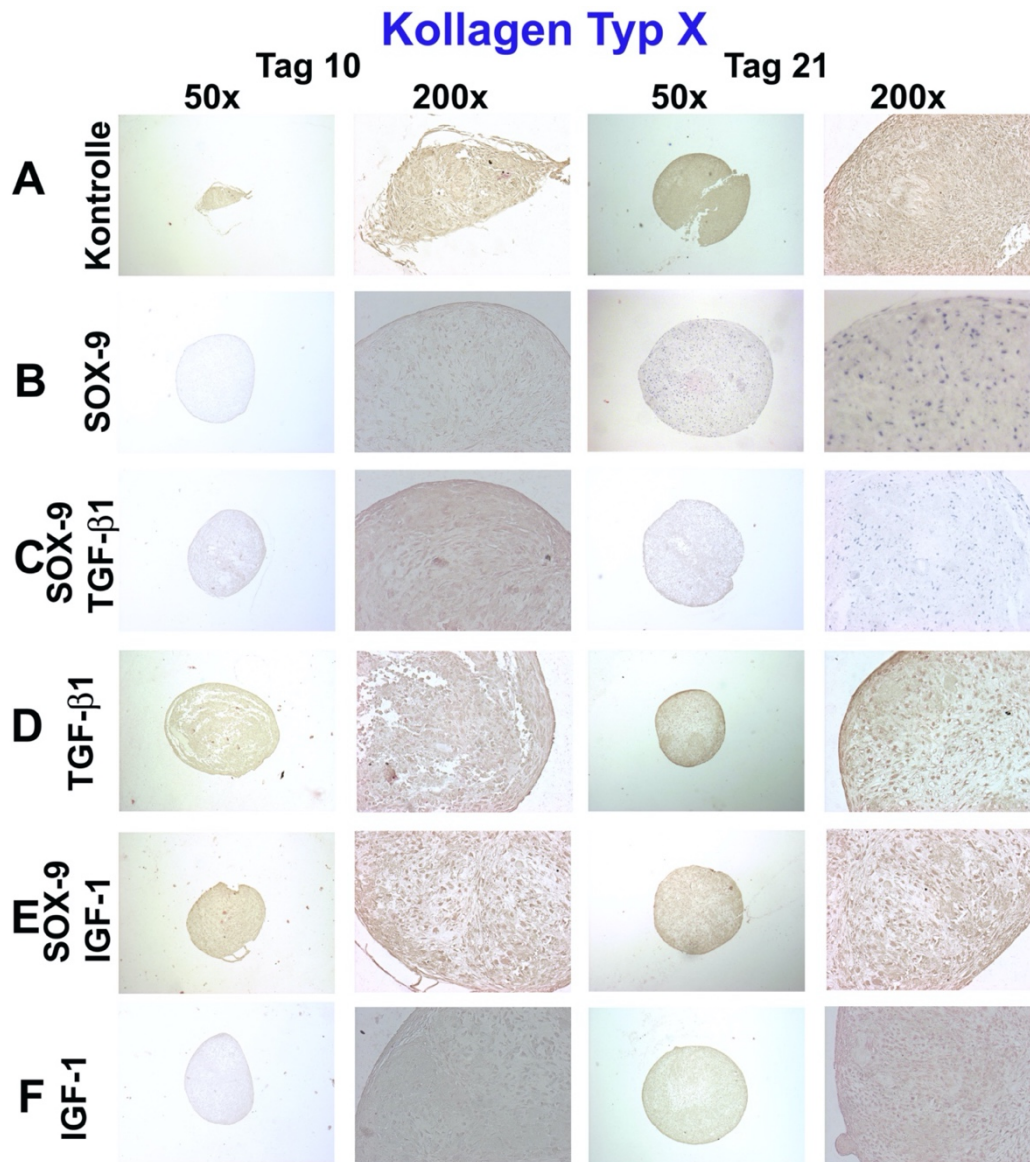


Abb. 18: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Kollagen X-Immunhistochemie in 50- und 200-facher Vergrößerung.

Nach 10 und nach 21 Tagen Pelletkultivierung, sowohl der Kontrollgruppe als auch der adenoviral transduzierten Gruppe wurden diese immunhistochemisch bearbeitet. Die Kollagen X positiven Areale erschienen rotbraun.

In der immunhistochemischen Kollagen X-Färbung waren die chondrozytären Hyperthrophiezeichen somit insgesamt am deutlichsten sichtbar in der TGF-β1 transduzierten Gruppe. In der Negativkontrolle ließen sich auch geringe Mengen an Kollagen X nachweisen.

3.8 Semiquantitative RT-PCR

Auf molekularbiologischer Ebene wurden zusätzlich chondrogene und hypertrophe Marker untersucht. Die isolierte in cDNA umgeschriebene RNA wurde in der semiquantitativen RT-PCR vervielfältigt und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet wurde. Als Marker für die Chondrogenese wurden Kollagen II, SOX9, Fibromodullin (FMD), Aggrecan (AGN) sowie COMP herangezogen, als Marker für die Hypertrophie Alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen I, X, RUNX2 und Osteocalcin (OC).

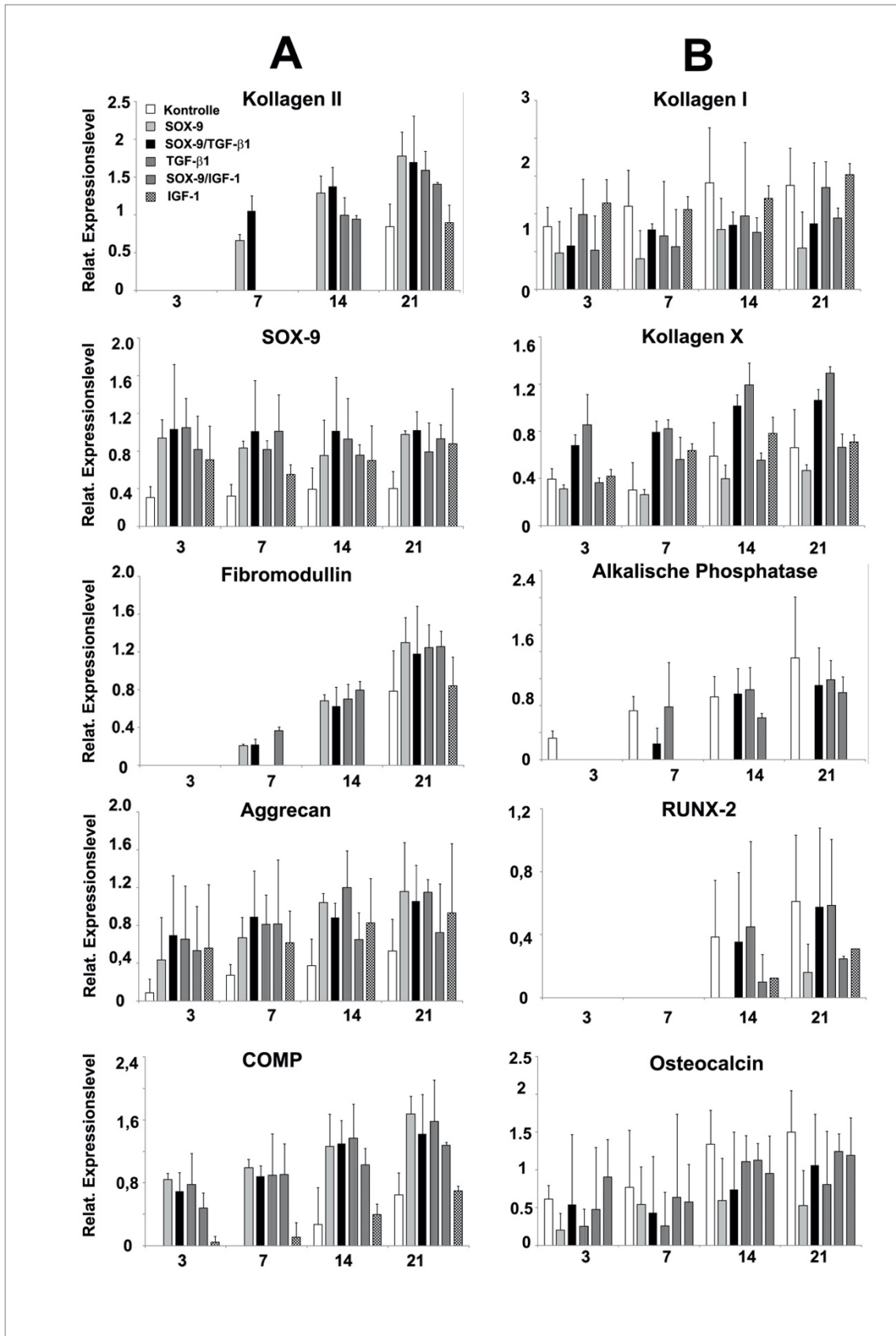


Abb. 19: Genexpression von hMSC-Pelletkulturen knorpelspezifischer und Hypertrophie spezifischer mRNA im Zeitverlauf über 21 Tagen in der semiquantitativen RT-PCR.

Nach 10 und nach 21 Tagen Pelletkultivierung, sowohl der Kontrollgruppe als auch der adenoviral transduzierten Gruppe wurden diese weiterbearbeitet um semiquantitative Ergebnisse Chondrogenese spezifischer Gene, wie Aggrecan, COMP, Fibromodulin, Kollagen II und SOX9 sowie Hypertrophie spezifischer Gene, wie Alkalische Phosphatase, Kollagen I, Kollagen X, Osteocalcin und Osteopontin, zu erhalten.

TGF- β 1 und Kombinationen mit TGF- β 1, wie SOX9/GFP/TGF- β 1, sowie SOX9/GFP/IGF-1 zeigten eine deutliche Hochregulation chondrogener Marker wie AGC, COMP, COL II, SOX9 und FMD im Vergleich zur Negativkontrolle. Dies wurde insbesondere bei der Expression von Kollagen II deutlich, einem der wichtigsten Marker für Chondrogenese. Die entsprechende mRNA zeigte bereits an Tag 7 in der SOX9/GFP- und TGF- β 1-Gruppe eine Hochregulierung, während alle anderen Gruppen und die Kontrolle vorerst negativ blieben. Im Verlauf jedoch über 21 Tage zeigte sich auch zusätzlich in den anderen Gruppen eine deutlich Hochregulierung des Gens in den transduzierten SOX9/GFP-, TGF- β 1-, SOX9/GFP/TGF- β 1- und SOX9/GFP/IGF-1-Gruppen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die IGF-1 transduzierte Gruppe blieb ungefähr auf dem Level der Negativkontrolle, was im Einklang mit den histologischen Daten steht. Analog zu der Expression von Kollagen II verhielt sich die Fibromodulin-Hochregulierung, die ebenfalls an Tag 7 in den chondrogen differenzierten Gruppen bereits leicht erkennbar war und über 21 Tage in den TGF- β 1, SOX9/GFP/TGF- β 1 und SOX9/GFP/IGF-1 transduzierten Gruppen hochreguliert war. SOX9 wie auch Aggrecan waren bereits an Tag 3 in allen adenoviral transduzierten Gruppen signifikant hochreguliert im Vergleich zur Negativkontrolle, die zwar auch eine geringgradige Expression zeigte, jedoch nicht so hoch wie die transduzierten Gruppen. Zwischen den einzelnen Transduktionsgruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede darstellen,

was die Expression von Aggrecan und SOX9 betraf. Ähnlich verhielt es sich bei der mRNA-Synthese des oligomeren Knorpelmatrixproteins COMP, die ebenfalls an Tag 3 hochreguliert war, allerdings nur in den SOX9/GFP, TGF- β 1, SOX9/GF/TGF- β 1 und SOX9/GFP/IGF-1 transduzierten Gruppen. Wie bereits in den histologischen Untersuchungen ersichtlich, führte insbesondere der TGF- β 1-Gentransfer allein oder in Kombination mit SOX9 zur Hochregulierung Hypertrophie-spezifischer Gene. Die einzelnen Gruppen inklusive der Negativkontrolle zeigten über den gesamten Kultivierungszeitraum gesteigerte Expressionswerte der Collagen I-, Collagen X-, und Osteocalcin-mRNA mit deutlicher Zunahme zu Tag 21. Dabei zeigte die SOX9-Gruppe geringe Expressionswerte für Collagen I, Collagen X und Osteocalcin im Vergleich zu den anderen Gruppen. Unter den anderen Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede finden. Die alkalische Phosphatase zeigte, ähnlich auch wie in der Histologie, nur eine Hochregulierung in den TGF- β 1-, SOX9/GFP/TGF- β 1- und SOX9/GFP/IGF-1-Gruppen und in der Negativkontrolle.

3.9 Quantitative RT-PCR

Um eine genauere Quantifizierung der mRNA zu erhalten, untersuchten wir zusätzlich mit Hilfe der Real-Time-PCR einige knorpelspezifische und Hypertrophie-spezifischen Gene.

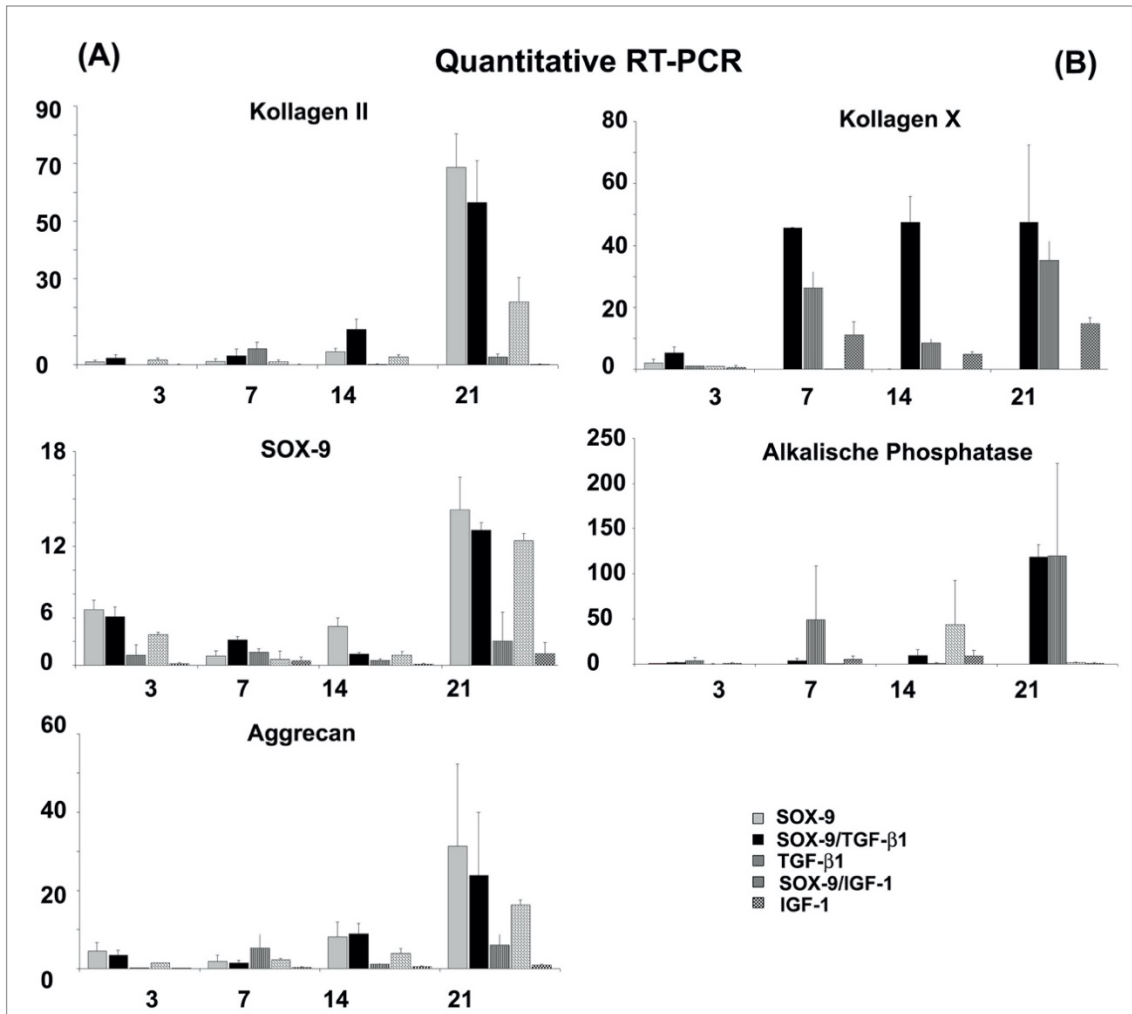


Abb. 20: Quantitative RT-PCR Genexpression von hMSC-Pelletkulturen knorpelspezifischer und Hypertrophie-spezifischer mRNA im Zeitverlauf über 21 Tage. Nach 10 und nach 21 Tagen Pelletkultivierung, sowohl der Kontrollgruppe als auch der adenoviral transduzierten Gruppe wurden diese weiterbearbeitet um die wichtigsten quantitative Ergebnisse Chondrogenese spezifischer Gene, wie Aggrecan, Kollagen II und SOX9 sowie Hypertrophie spezifischer Gene, wie Alkalische Phosphatase, Kollagen I, Kollagen X zu erhalten.

Um Chondrogenese spezifische Markergene wie Col II, SOX9 und Aggrecan genauer auf ihre Expressionsmenge zu untersuchen, führten wir quantitative RT-PCR-Analysen durch und analysierten die Daten mithilfe der $\Delta\Delta$ -CT-Methode. Besonders an Tag 21 konnten wir zeigen, dass Kollagen II, SOX9 und Aggrecan ganz besonders in den SOX9-, SOX9/TGF-β1 und SOX9/IGF-1 Gruppen hochreguliert waren im Vergleich zu IGF-1 oder TGF-β1 Gruppe. An Tag 14 war dieser Effekt nur sehr dezent zu erkennen, an den Tagen 3 und 7 hingegen noch

gar nicht. Betrachtet man hingegen das Markergen SOX9 in den Gruppen die damit transduziert oder co-transduziert wurden, so wird ersichtlich, dass die Expression hier schon an Tag 3 vorhanden ist. Die Werte der SOX9-spezifischen mRNA fallen etwas an Tag 7 und 14, steigen aber zum Ende an Tag 21 wieder deutlich an und zeigen die höchste Expression in den SOX9/TGF- β 1- und SOX9/IGF-1-Gruppen. IGF-1 oder TGF- β 1 alleine fallen deutlich niedriger in der Expression von SOX9 aus. Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Analysen zeigen ebenso wie die Ergebnisse der semiquantitativen PCR eindrucksvoll, dass die Chondrogenese durch den adenoviralen SOX9-Gentransfer in MSCs induziert werden kann.

Für die Untersuchung der Hypertrophie-assoziierten Markergene wurden Col X und ALP herangezogen. In der quantitativen Real-Time PCR für Col X zeigte sich bereits an Tag 3 eine geringe und an Tag 7 eine deutlich sichtbare Hochregulierung der mRNA in der SOX9/TGF- β 1- sowie in der TGF- β 1-Gruppe. Auch IGF-1 war an Tag 21 im Vergleich zur SOX9- bzw. SOX9/IGF-1-Gruppe erhöht. Die ALP zeigte eine leichte Erhöhung in der TGF- β 1 Gruppe an Tag 7, an Tag 21 hingegen war die ALP-Expression vor allem in der SOX9/TGF- β 1-, und TGF- β 1 Gruppe hochreguliert. Im Wesentlichen spiegelt sich dieses Ergebnis auch in den histologischen Untersuchungen wider.

Im Hypertrophiebereich zeigen also die molekularbiologischen RT-PCR-Ergebnisse vor allem, dass die Synthese der Marker Col X und ALP an Tag 21 in der SOX9/TGF- β 1-Transduktionsgruppe erhöht war, während die SOX9 - Gruppe dagegen herunterreguliert. Allerdings erfolgte in den SOX9/TGF- β 1-co-

transduzierten MSCs keine Supprimierung der hypertrophen Differenzierung durch das Vorhandensein von SOX9.

3.10 Zellvitalität und Apoptose

Um die Vitalitäts- und Apoptoserate der adenoviral transduzierten MSCs zu untersuchen, eignet sich die Doppel-Fluoreszenzfärbung Annexin V-Cy3/6-CFDA [2.2.3.7].

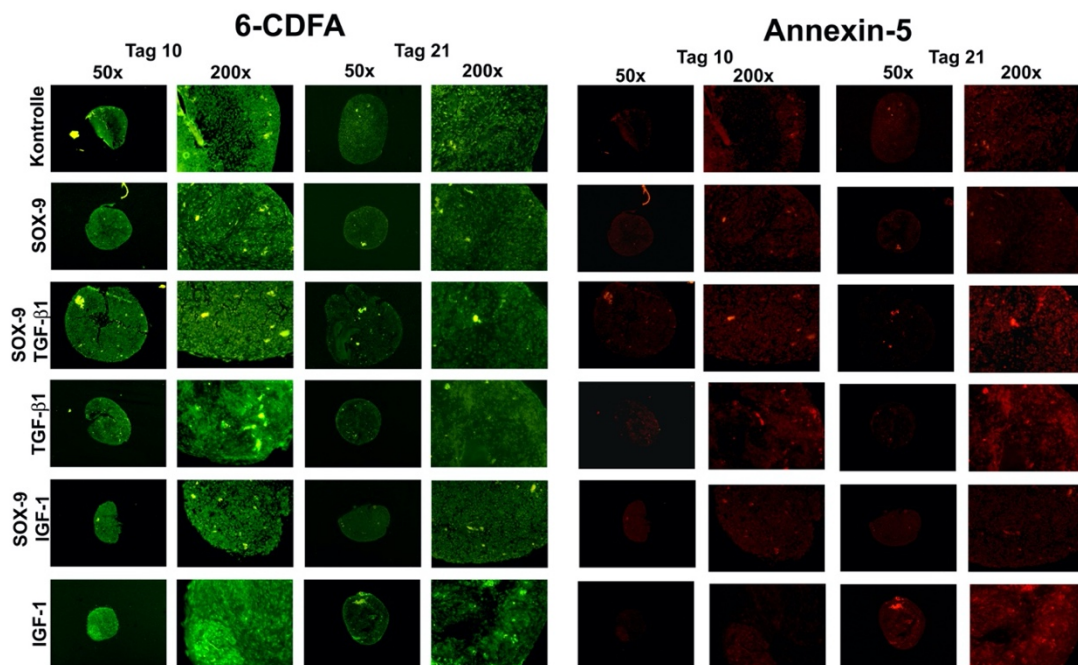


Abb. 21: Zellvitalitäts- und Apoptoseassay von hMSC-Pelletkulturen nach 10 und 21 Tagen in 50- und 200-facher Vergrößerung.

Nach 10 und nach 21 Tagen Pelletkultivierung, sowohl der Kontrollgruppe als auch der adenoviral transduzierten Gruppe wurden diese weiterbearbeitet und mit 6-CFDA und Annexin-5 doppelt gefärbt wurden. Grün leuchtenden Zellen stellen den Vitalitätsanteil unter den Zellen dar, während die rot leuchtenden Areale auf Apoptose schließen lassen.

Es zeigten sich zu den zwei untersuchten Zeitpunkten in allen Gruppen, sowohl in der Negativkontrolle als auch in den transduzierten Gruppen, ein ungefähr äquivalentes Niveau an grün fluoreszierenden, 6-CFDA-Farbstoff aufnehmenden somit lebenden Zellen. Diese Aussage war für die Vergleichbarkeit der Gruppen

untereinander sehr wichtig, da man natürlich nur validierte Ergebnisse erwarten kann, wenn in allen Gruppen ein ungefähr gleich hohes Level an lebenden Zellen in dem Pellet vorhanden ist.

Was die Rate der in Apoptose bzw. in Prä-Apoptose befindlichen Zellen angeht, konnte man ebenfalls anhand des Annexin V-Cy3 Farbstoffes eine Aussage darüber treffen. Im direkten Vergleich fiel als Erstes auf, dass die rot leuchtenden Zellen nicht in dem Maß vorhanden waren wie die grün fluoreszierendem 6-CFDA-Farbstoff-bindenden Zellen. Somit ist die Apoptoserate deutlich geringer als die vitalen Zellen, was vor allem in der Übersichtsvergrößerung sichtbar ist. Rot fluoreszierende Zellen kommen eher in der 200-fach Vergrößerung zum Vorschein, zum Teil etwas verstärkt in den SOX9/TGF- β 1, TGF- β 1 und IGF-1 transduzierten Gruppen an Tag 21. Die Negativkontrolle wies keine Erhöhung der rot fluoreszierenden Zellen und somit keine erhöhte Apoptoserate auf. Insgesamt liefern die Ergebnisse der Zweifach-Fluoreszenzfärbung Annexin V-Cy3/6-CFDA vergleichbare Zellvitalitäts- und Apoptoseraten zwischen den einzelnen Gruppen ohne signifikanten Unterschiede, so dass die chondrogene Differenzierung nicht negativ von einer erhöhten Apoptoserate in dem betreffenden Pellet beeinflusst wurde.

4 Diskussion

4.1 Material und Methodendiskussion

4.1.1 Primäre versus andere Zellen

Obwohl MSCs für verschiedenste klinische Ansätze zur Knorpelreparatur bereits auch *in vivo* erfolgreich eingesetzt werden, ist noch nicht hinreichend bekannt, in welcher Form am besten eine Induktion von langzeitstabilem Neoknorpel möglich ist.^{29 36 134} In dieser Arbeit wurden humane MSCs aufgrund vieler Vorteile zur Erforschung des Phänomens der Chondrogenese verwendet.

Der Vorteil der primären Zellen im Vergleich zu einer Zelllinie, wie z. B. den aus Mäuseembryos gewonnenen C3H10T1/2-Zellen, liegt in der größeren Zellvariabilität und dem größeren Differenzierungspotential. Die C3H10T1/2-Zellen der mesenchymalen Stammzelllinie lassen sich zwar auch chondrogen, osteogen und adipogen differenzieren, allerdings erfolgt die chondrogene Differenzierung hier z. B. durch den Wachstumsfaktor BMP-2, der in den humanen primären Zellen eher zur hypertrophen Dedifferenzierung anregt. Somit lässt eine nicht-humane Zelllinie nur sehr bedingt Rückschlüsse auf die klinische Anwendbarkeit am Menschen zu.

Ebenso bieten primäre Zellen im Gegensatz zu einer nicht-humanen Zelllinie die Möglichkeit der patienteneigenen *in vivo*-Applikation. Somit wäre hier kein biologisches Hindernis im Hinblick auf Abstoßungsreaktionen zu erwarten. Zudem sind primäre Zellen eine eher heterogene Zellpopulation, während eine Zelllinie eine eher multipotente, homogene Population darstellt.

4.1.2 Pellet-Zellkultursystem versus andere Kulturverfahren

Das vielfach verwendete und verbreitete 3D-Pelletkultursystem zeichnet sich besonders dadurch aus, dass es einfach zu handhaben und dadurch schnell zu erlernen ist und keinerlei zusätzliche Trägermaterialien benötigt. Die so in chondrogenem Medium kultivierten MCSs können anhand besonders hoher Zelldichte die Interaktionen in der Kondensationsphase der enchondralen Ossifikation gut simulieren. Als Nachteil, besonders im Hinblick auf die *in vivo*-Verwendung, ist die mangelnde klinische Anwendbarkeit bei der Behandlung eines chondralen Defektes vor allem auch aufgrund der geringen Größe der Pellets zu erwähnen.

4.1.3 Gentherapie versus proteinhaltige Differenzierungsmedien

Um eine anhaltende, langzeitstabile Abgabe von chondrogenen Faktoren an der Defektstelle zu generieren, wählten wir den Ansatz des adenoviralen Gentransfers von verschiedenen Faktoren und Mitgliedern der TGF- β 1-Familie, welcher schon in zahlreichen Vorstudien untersucht wurde.^{67 135 136} Während die Applikation von rekombinanten Proteinen *in vitro* und *in vivo* sehr schwierig ist, bietet die Gentherapie den entscheidenden Vorteil, dass die Zellen ihren eigenen Wachstumsfaktor über einen Zeitraum von ca. 3 Wochen exprimieren, was für die Knorpelregeneration von Vorteil ist.

Der Nachteil der Gentherapie ist das potentielle Infektionsrisiko, außerdem bieten die Viren ein nicht zu unterschätzendes immunogenes Potential, welches besonders bei der *in vivo*-Anwendung problematisch sein kann. Gegebenenfalls wäre ein Kompromiss in Form einer intraartikulären Injektion möglich, in dem die

Vektoren nur lokal in das betreffende Gelenk injiziert werden. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wirkte sich eine hohe Konzentration der Adenoviren negativ auf das Chondrogenesepotential der MSCs aus, so dass diese mit 500 infektiösen Viruspartikel pro Zelle transduziert wurden, eine Dosis die bereits in mehrfachen Vorversuchen etabliert wurde.⁶⁴

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Transgenexpression

Der durchgeführte TGF- β 1-ELISA ergab eine Transgenexpression von 15-20 ng/ml an Tag 3 sowie abnehmende Werte im Zeitverlauf. An Tag 7 lag die Konzentration noch zwischen 6 und 17 ng/ml, an Tag 14 bereits zwischen 4 und 11 ng/ml und an Tag 21 war immerhin noch eine TGF- β 1 Konzentration von bis zu 1,7 ng/ml nachweisbar. Die IGF-1 Transgenexpressionsbestimmung erfolgte ebenfalls mittels ELISA analog zum TGF- β 1-ELISA. Die Transgenexpression für SOX9 bestimmten wir durch das Fluoreszenzmikroskop, hier erkennt man an Tag 3 eine typische, hohe Transgenexpression, die im zeitlichen Verlauf über 21 Tage abnimmt. Insgesamt stehen damit unsere Ergebnisse in Einklang mit anderen Daten zum adenoviralen Gentransfer, die eine über ca. drei Wochen abnehmende Transgenexpression zeigen.^{63 64 66}

4.2.2 Numerische Daten: GAG-, DNA-, ATP-, ALP-Assay

Bei der Erhebung des ATP-Gehaltes der Zellpellets zeigte sich die höchste metabolische Aktivität der verschiedenen Gruppen an Tag 3, jeweils abnehmend über 21 Tage. Dabei zeigten alle Gruppen mehr oder weniger vergleichbare

Werte und damit hohe Proliferationsraten und eine gesteigerte metabolische Aktivität.

An Tag 3 und Tag 7 zeigten sich die höchsten DNA-Werte im Vergleich, mit abnehmender Tendenz gegen Tag 14 und Tag 21. Zwischen den einzelnen transduzierten Gruppen, sowie der Kontrolle, zeigten sich zwar leichte Schwankungen, jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Der GAG-Gehalt der verschiedenen Transgengruppen wurde sowohl als absoluter Wert pro Pellet ermittelt, sowie auf den dazugehörigen DNA-Wert normiert, den das betreffende Pellet aufwies, um eine bessere Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten und evtl. Zelldichteschwankungen zu minimieren. Es zeigte sich, vor allem in der SOX9/GFP und der TGF- β 1 Gruppe, eine deutliche Zunahme des GAG-Gehaltes besonders an Tag 21 im Vergleich zur Negativkontrolle und dies aber auch in den co-transduzierten Gruppen. Dieses Ergebnis unterstreicht das ausgeprägte Differenzierungspotential von SOX9/GFP.

Über den gesamten Zeitverlauf war insbesondere in zwei der sechs Gruppen eine erhöhte ALP-Aktivität, verglichen mit der Negativkontrolle, zu erkennen. Zum einen in der TGF- β 1-transduzierten Gruppe und zum anderen in der SOX9/GFP/IGF-1-co-transduzierten Gruppe. In der SOX9/GFP- und in der SOX9/GFP/TGF- β 1-co-transduzierten Gruppe ließ sich keine Erhöhung im Vergleich zur Negativkontrolle verzeichnen, was für SOX9/GFP als Inhibitor der chondrogenen Hypertrophie spricht. ^{64 137 138 139 102}

4.2.3 Chondrogene Differenzierung der MSCs

In der vorliegenden Studie haben wir das MSC-Aggregatkultursystem entsprechend angepasst, um herauszufinden, ob die adenovirale *in vitro*-Abgabe von SOX9 zur Chondrogenese von primären MSCs führen kann. Zudem sollte das chondrogene Potential von SOX9 im Vergleich zu TGF- β 1 als „Standard“-Faktor für die chondrogene Differenzierung bewertet werden.

Zusätzlich haben wir auch einen Vergleich zu dem Faktor IGF-1 angestrebt, welcher sich in früheren Studien bislang als nicht eindeutig chondrogen erwies, weder allein noch als in Kombinationen mit verschiedenen anderen Faktoren.⁸⁴

Über das Potenzial von SOX9 zur Förderung der Chondrogenese durch Genabgabe wurde bereits unter Verwendung retroviraler Vektoren in osteoarthritischen Chondrozyten oder adenoassoziierten viralen Vektoren (AAV) berichtet.^{140 139 141} In dieser Studie untersuchten wir die Möglichkeit eines adenoviralen SOX9-Gentransfers auf humane MSCs, um die Chondrogenese in einem biomaterialfreien Zellkultursystem zu fördern und zu erforschen, ob das Ausmaß der chondrogenen Hypertrophie im Endstadium im Vergleich zu TGF- β 1, IGF-1 oder in Kombinationen dieser Faktoren moduliert werden kann.

In den vorliegenden Ergebnissen führte der adenovirale Gentransfer von SOX9 zu einer zuverlässigen Chondrogenese, die Ergebnisse sind vergleichbar mit der Kultivierung in chondrogenem Standarddifferenzierungsmedium mit Zugabe von rekombinantem TGF- β 1. Dies wurde durch Nachweis von Aggregatbildung angereichert mit chondrogener Matrix bestehend aus Proteoglykanen und GAGs sowie knorpelspezifischem Kollagen Typ II sowohl histologisch bestätigt als auch durch immunhistochemische und biochemische Assays (Abb. 10, 11, 13, 14, 15)

und durch Expression von chondrogenen mRNAs in RT-PCR-Analysen (Abb. 19, 20), während GFP-Kontrollen oder IGF-1-Kulturen nicht chondrogen differenzierten. Kombinationen von SOX9 mit TGF- β 1 oder IGF-1 hatten keine additiven oder synergistischen Wirkungen auf die Chondrogenese (Abb. 10, 11, 13, 14, 15, 20).

4.2.4 Hypertrophe Differenzierung der MSCs

Im Gegensatz zur chondrogenen Differenzierung waren die Hypertrophie Parameter der im Endstadium wie Kollagen Typ X (Abb. 18) oder Annexin 5 (Abb. 21) in SOX9-modifizierten Kulturen im Vergleich zu TGF- β 1 deutlich reduziert. Dies wurde quantitativ mit verringerten Werten des Hypertrophiemarkers ALP (6d) und semi-quantitativ mit verringerten Expressionsniveaus von Hypertrophie-assoziierten mRNAs (Abb. 16) bei SOX9 im Vergleich zu TGF- β 1 modifizierten Aggregaten bestätigt. Die Kombination von SOX9 mit TGF- β 1 zeigte verringerte Hypertrophie-Spiegel im Vergleich zur TGF- β 1 Gruppe, jedoch mit noch höheren Werten, im Vergleich zur SOX9 Gruppe auf Proteinebene, histologisch (Abb. 13, 14, 15), biochemisch (Abb. 9, 10, 11) oder auf mRNA-Ebene (Abb. 19, 20). Daher stimmen die RT-PCR-Daten im Allgemeinen mit den biochemischen und histologischen Beobachtungen überein, wobei der Grad der chondrogenen Hypertrophie nacheinander mit TGF- β 1 > TGF- β 1 /SOX9 > SOX9 bestimmt werden kann (Abb. 16, 17, 18). Unsere Daten stimmen auch mit verschiedenen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls das chondrogene Potential von SOX9 in *in vitro*-Studien nachweisen konnten, sowie die herabgesetzten Hypertrophiespiegel im Vergleich zu TGF- β 1.

4.3 Vergleich mit Studien aus der Entwicklungsbiologie

Der Transkriptionsfaktor SOX9 ist ein Schlüsselregulator in der frühen Chondrogenese, gehört zur SRY-Familie (geschlechtsbestimmende Region auf dem Y-Chromosom) und enthält die DNA-Bindungsdomäne der HMG-Box (High Mobility Group). SOX9 wurde erstmals bei Patienten mit Kampomele-Dysplasie entdeckt, einer Haploinsuffizienzstörung mit verschiedenen Skelettdeformitäten, die durch eine Fehlregulation der SOX9-Expression während der Chondrogenese verursacht werden.^{142 143} Während der Embryogenese ist die SOX9-Expression für die ordnungsgemäße Bildung der Knorpelanlagen des Skeletts erforderlich und eine Haploinsuffizienz von SOX9 führt zu einer fehlerhaften Knorpelprimordie und einer vorzeitigen Skelettmineralisierung.^{144 145} Es wird vermutet, dass sich bei der mesenchymalen Kondensation osteogene Zellpopulationen von Osteochondroprogenitoren trennen, was dann zu Chondroblasten führt, die durch SOX9-Expression gekennzeichnet sind, sowie zu Osteoblasten, die RUNX2 exprimieren, ein Gen, das für die Osteogenese erforderlich ist.^{142 143} Innerhalb des chondrogenen Signalwegs ist SOX9 für die direkte Regulation von SOX5, SOX6 und die Aktivierung der Expression von COL Typ II, VI, IX und XI, mehrerer Proteoglycane und Bindungsproteine wie COMP verantwortlich.^{146 147 148} In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass SOX9 das COL Typ II direkt transaktiviert und die Expression von COL Typ X a1 in proliferierenden Chondrozyten der Wachstumsplatte unterdrückt, so dass die COL Typ X a1 Expression auf hypertrophe Chondrozyten beschränkt ist.¹⁴⁹ In Bezug auf die Hypertrophie-Regulation wurden mehrere positive und negative Mechanismen der Transkriptionskontrolle durch SOX9 identifiziert, die eine

differenzierungsphasenspezifische Genexpression in Chondrozyten gewährleisten. Beispielsweise wird die COL-Typ-X-Repression durch SOX9 direkt in unreifen/proliferierenden Chondrozyten der Wachstumsplatte durch GLI-Faktoren vermittelt, die Effektoren des Indian Hedgehog (IHH) -Signals sind.¹⁵⁰ Durch die Bindung an SRY-Stellen des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) A-Gens hemmt SOX9 die vaskuläre Invasion in Chondroblasten, was die Rolle von SOX9 bei der Aufrechterhaltung des chondrogenen Phänotyps unterstreicht.¹⁵¹ Umgekehrt dient das osteogene Wnt-Signal dazu, die SOX9-Expression auf der posttranslationalen Ebene über den kanonischen und den nichtkanonischen Weg negativ zu regulieren.^{143 152 153} Dies impliziert, dass verschiedene Arten von Osteochondroprogenitorzellen in der ruhenden, proliferierenden und hypertrophen Knorpelzone vorhanden sind, wobei eine stadienabhängige, orchestrierte Anfälligkeit für diese Mechanismen besteht.¹⁵⁴ Zusätzlich wird die Expression von SOX9 durch Mitglieder der FGFs, TGF- β 1 und BMPs, die alle weit verbreitete Chondroinduktoren sind, hochreguliert.^{143 155} Interessanterweise können diese Mechanismen in unserem *in vitro*-Modell der Chondrogenese unter Verwendung von Aggregatkulturen menschlicher, adulter MSCs, die chondrogene Faktoren überexprimieren, zusammengefasst werden. Da die hypertrophe Chondrogenese unter Verwendung der Faktoren BMP-2, BMP-4, TGF- β 1 oder IHH unter Verwendung dieses Systems nachgewiesen wurde, konnte der Gentransfer von SOX9 die Hypertrophie im Vergleich zu TGF- β 1 erheblich senken.^{84 64 137} (Abb. 16, 17 und 20). Dies weist daraufhin, dass die Mechanismen der Hypertrophiesuppression bei Erwachsenen, von Knochenmark abgeleiteten MSCs immer noch

funktionieren.

4.4 *In vitro*-Studienvergleich zur Behandlung chondraler Defekte

Unsere Studie stimmt mit mehreren *in vitro*-Studien überein, bei denen der SOX9-Gentransfer auch über verschiedene Verabreichungswege eingesetzt wurde. Die Lipofektion des SOX9-Gens der Maus führte zur chondrogenen Induktion von MSCs aus dem Mausmark in Mikromassenkulturen.¹⁵⁶ Die Reexpression des chondrogenen Phänotyps wurde von Tew et al. nachgewiesen, wenn passagierte humane osteoarthritische Chondrozyten mit SOX9 retroviral transduziert wurden.¹⁴⁰ Ähnliche Effekte wurden beobachtet, wenn adenovirale oder lentivirale Vektoren alternativ in demselben Kultursystem verwendet wurden.¹⁵⁷ In einer weiteren Studie der Gruppe von Cucchiari und Madry konnte die Wiederherstellung der extrazellulären Matrix von hyalinem Knorpel nach alleiniger SOX9-Genabgabe mit rekombinanten AAV-Vektoren an humanen osteoarthritischen Chondrozyten erreicht werden.¹⁵⁸ Zusätzlich konnte eine signifikante Verringerung der COL-Typ-X-Expression erreicht werden, wenn eine kombinierte Abgabe von SOX9 zusammen mit FGF-2 unter Verwendung des gleichen Versuchsaufbaus eingesetzt wurde.¹³⁹ Bei der Transduktion von humanen Knochenmark-abgeleiteten MSCs mit solchen rekombinanten AAV-Vektoren, die SOX9 überexprimieren, konnte eine Induktion der Chondrogenese beobachtet werden, während osteogene und Hypertrophiemarker wie z. B. ALP und COL X unterdrückt wurden, was unseren Ergebnissen unter Verwendung von rekombinantem Adenovirus entspricht.¹⁵⁹

Unsere Ergebnisse unterscheiden sich von der Kupcsik et al. *in vitro*-Studie, in welcher eine erhöhte Synthese von sulfatierten GAGs in Knorpelkonstrukten nur

nachgewiesen werden konnte, wenn die mit SOX9-Vektoren modifizierten MSCs nach Transduktion einer mechanischen Stimulation über einen Bioreaktor ausgesetzt wurden.¹⁶⁰

Von unseren Daten unterscheiden sich auch mehrere *in vitro*-Studien, die nur dann über eine chondrogene Induktion und Hypertrophiehemmung berichten, wenn SOX9 zusammen mit SOX5 und SOX6 (SOX-Trio) in verschiedene embryonale und adulte Zellkultursysteme transfiziert wurde, jedoch nicht, wenn SOX9 allein verabreicht wird.^{161 162 163 164 165} Unsere Ergebnisse stimmen mit einer bereits durchgeführten Studie überein, die das Potential von SOX9 bei der Umkehr terminaler Differenzierungsstufen untersuchte.¹⁶⁶ Gegenstand der Studie war die kombinierte Abgabe zusammen mit induzierten Pluripotenzstammzellen (iPS) über lentivirale Vektoren, wobei die zusätzliche Verabreichung der iPS-Faktoren die Expression von Hypertrophie markern wie COL Typ X zusätzlich verringerte.

4.5 *In vivo*-Studienvergleich zur Behandlung chondraler Defekte

Unsere Daten stimmen mit mehreren *in vivo*-Studien überein, in denen das chondrogene Potenzial der SOX9-Genabgabe untersucht wurde. Die Bildung von ektopem Knorpel im Vergleich zu den Kontrollen wurde unter Verwendung eines Tetracyclin (Tet-on)-abhängigen SOX9-Expressionssystems nachgewiesen, bei dem Biopolymergerüste mit SOX9-transfizierten Chondrozyten besät und subkutan in Ratten transplantiert wurden.¹⁶⁷ Der retrovirale Gentransfer von Fettstammzellen (ASCs) mit SOX9, SOX5 und 6 (SOX-Trio) ergab *in vitro* eine Chondrogenese in Fibringelen und verzögerte auch *in vivo* das Fortschreiten von Osteoarthritis in Rattenknien nach Transplantation in osteochondrale Defekte

der Trochlea. [56] Auch in einem *ex vivo*-Ansatz haben Cao et al. gezeigt, dass der adenovirale SOX9-Gentransfer von Kaninchen-Knochenmark-MSCs, ausgesät in Gerüste auf Polyglykolsäurebasis und orthotop transplantiert, eine bessere Knorpelreparatur hervorriefen als bei Kontrollen ohne adenovirale Transduktion.¹⁶⁸

In einem direkten *in vivo*-Ansatz wurden rekombinante AAV-Vektoren, die SOX9/GFP exprimierten, unmittelbar in osteochondrale Defekte bei Kaninchen verabreicht, bei denen die Bildung von hyalinem Neoknorpel verzögert war und Stadien der Hypertrophie und terminalen Differenzierung nachgewiesen wurden.¹⁶⁹ Die kombinierte Abgabe von SOX9/GFP zusammen mit BMP-2 an dedifferenzierte Chondrozyten unter Verwendung eines Transfektionssystems mit einem bicistronischen Vektor konnte eine verstärkte chondrogene Reaktion in ausgesäten Fibringelkonstrukten *in vitro* induzieren, und ebenso *in vivo* nach subkutaner Transplantation in Nacktmäusen. Ob die Abgabe nur eines dieser Faktoren allein Auswirkungen auf die Hypertrophie und die terminale Differenzierung hat, wurde in dieser Studie jedoch nicht berücksichtigt.¹⁷⁰

5 Zusammenfassung

Eines der Hauptziele dieser Dissertation war es zu untersuchen, ob SOX9 alleine nicht nur die Chondrogenese in MSCs induzieren kann, sondern auch die hypertrophe Enddifferenzierung reduzieren und modulieren kann. SOX9 gilt als ein Masterregulator der Chondrogenese und ist entscheidend während der endochondralen Ossifikation an der Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten beteiligt. SOX9 zählt daher als vielversprechender Kandidat, um hyalinartiges Knorpelgewebe in der stammzellbasierten Gentherapie zu induzieren.^{125 102 121}

⁷² Nach Isolation der hMSCs wurden diese kultiviert und mit Ausnahme der Negativkontrolle mit SOX9/GFP, TGF- β 1, SOX9/TGF- β 1, IGF-1 und SOX9/IGF-1 transduziert, um daraus Pellets herzustellen. Die histologischen, molekularbiologischen und biochemischen Daten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten erhoben und zur Evaluierung des chondrogenen Differenzierungs- bzw. hypertrophen Dedifferenzierungspotentials verwendet. Sowohl die molekularbiologischen Untersuchungen als auch die biochemischen Analysen auf Proteinebene konnten zeigen, dass sich primäre hMSCs im Pelletkultursystem mit SOX9, SOX9/TGF- β 1 und SOX9/IGF-1 chondrogen differenzieren lassen. Besonders die SOX9-Gruppen zeigten eine ausgeprägte positive COL II- und CS-4-Immunhistochemie, erhöhte Glykosaminoglykansynthese sowie eine Hochregulation Chondrogenese spezifischer Gene vor. Das Auftreten hypertropher Merkmale wurde während 21 Tagen *in vitro*-Kultivierung durch SOX9 signifikant supprimiert, besonders im Vergleich zu den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen TGF- β 1 und BMP-2 verwendet wurden. Dabei zeigte die SOX9-Gruppe in dem ALP-Assay- und der

ALP-Färbung sowie der quantitativen RT-PCR den geringsten Anstieg des hypertrophiespezifischen Markers.

Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass der adenovirale SOX9/GFP-Gentransfer effizient die Chondrogenese von humanen primären Stammzellen in der 3D-Pelletkultur genauso effektiv induziert wie der TGF- β 1-Gentransfer. Gleichzeitig konnte durch den SOX9-Gentransfer effektiv die chondrogene Hypertrophie moduliert werden. Es bleibt abzuwarten, ob diese Technologie in Zukunft *in vivo* genutzt werden kann, um eine anhaltende Chondrogenese in MCSs zu ermöglichen und gleichzeitig eine hypertrophe Differenzierung von MSCs unter Verwendung verschiedener Transgene zu verhindern.

6 Literaturverzeichnis

1. Metz J. Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels. In: Erggelet C, Steinwachs M, eds. Gelenkknorpeldefekte. Darmstadt: Steinkopff Verlag; 2001. in.
2. Benninghof. *Benninghoff A. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte. 1925;76:43–63. doi:10.1007/BF02134417.*
3. Knorpelläsionen im Kniegelenk – aktueller Stand in Diagnostik und Therapie M. Weißenberger¹, T. Stein¹, F. Welsch².
4. Redler, I., Mow, V. C., Zimny, M. L. & Mansell, J. The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. *Clin. Orthop.* 357–362 (1975).
5. Buckwalter, Mankin. Buckwalter, J.A. & Mankin, H.J. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instructional course lectures 47, 487-504 (1998).
6. Edmonds. A Review of Knowledge in Osteochondritis Dissecans: 123 Years of Minimal Evolution from König to the ROCK Study Group.
7. Johnson, D. L., Urban, W. P., Caborn, D. N., Vanarthos, W. J. & Carlson, C. S. Articular cartilage changes seen with magnetic resonance imaging-detected bone bruises associated with acute anterior cruciate ligament rupture. *Am. J. Sports Med.* **26**, 409–414 (1998).
8. Recht, M. P., Goodwin, D. W., Winalski, C. S. & White, L. M. MRI of articular cartilage: revisiting current status and future directions. *AJR Am. J. Roentgenol.* **185**, 899–914 (2005).
9. Curl, W. W. *et al.* Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.* **13**, 456–460 (1997).
10. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin. Orthop.* 3–6 (1995).
11. Marlovits, S. *et al.* Definition of pertinent parameters for the evaluation of articular cartilage repair tissue with high-resolution magnetic resonance imaging. *Eur. J.*

Radiol. **52**, 310–319 (2004).

12. Vasiliadis, H. S., Wasiak, J. & Salanti, G. Autologous chondrocyte implantation for the treatment of cartilage lesions of the knee: a systematic review of randomized studies. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* **18**, 1645–1655 (2010).
13. Harris, J. D., Siston, R. A., Pan, X. & Flanigan, D. C. Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *J. Bone Joint Surg. Am.* **92**, 2220–2233 (2010).
14. Kon, E., Filardo, G., Di Matteo, B., Perdisa, F. & Marcacci, M. Matrix assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage treatment: A systematic review. *Bone Jt. Res.* **2**, 18–25 (2013).
15. Kanneganti, P. *et al.* The effect of smoking on ligament and cartilage surgery in the knee: a systematic review. *Am. J. Sports Med.* **40**, 2872–2878 (2012).
16. Moseley, J. B. *et al.* A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N. Engl. J. Med.* **347**, 81–88 (2002).
17. Buckwalter, J. A. & Lohmander, S. Operative treatment of osteoarthritis. Current practice and future development. *J. Bone Joint Surg. Am.* **76**, 1405–1418 (1994).
18. Steadman, J. R. *et al.* Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Off. Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.* **19**, 477–484 (2003).
19. Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Briggs, K. K. & Rodrigo, J. J. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade* **28**, 26–32 (1999).
20. Mithoefer, K., McAdams, T., Williams, R. J., Kreuz, P. C. & Mandelbaum, B. R. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am. J. Sports Med.* **37**, 2053–2063 (2009).
21. Kreuz, P. C. *et al.* Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 1119–1125 (2006).
22. Nugent-Derfus, G. E. *et al.* Continuous passive motion applied to whole joints stimulates chondrocyte biosynthesis of PRG4. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 566–574 (2007).
23. Steinwachs, M. R., Gugli, T. & Kreuz, P. C. Marrow stimulation techniques. *Injury* **39 Suppl 1**, S26-31 (2008).
24. Gille, J. *et al.* Outcome of Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC)

- in cartilage knee surgery: data of the AMIC Registry. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **133**, 87–93 (2013).
25. Hangody, L., Kish, G., Kárpáti, Z., Szerb, I. & Udvarhelyi, I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* **5**, 262–267 (1997).
26. Kon, E., et al. Articular cartilage treatment in high-level male soccer players: a prospective comparative study of arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation versus microfracture. *The American journal of sports medicine* **39**, 2549–2557 (2011).
27. Bedi, A., Feeley, B. T. & Williams, R. J. Management of articular cartilage defects of the knee. *J. Bone Joint Surg. Am.* **92**, 994–1009 (2010).
28. Lim, H.-C., Bae, J.-H., Song, S.-H., Park, Y.-E. & Kim, S.-J. Current treatments of isolated articular cartilage lesions of the knee achieve similar outcomes. *Clin. Orthop.* **470**, 2261–2267 (2012).
29. Steinert, A. F. *et al.* Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 213 (2007).
30. Horas, U., Pelinkovic, D., Herr, G., Aigner, T. & Schnettler, R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* **85**, 185–192 (2003).
31. Outerbridge, R. E. The etiology of chondromalacia patellae. *J. Bone Joint Surg. Br.* **43-B**, 752–757 (1961).
32. Brittberg, M. & Winalski, C. S. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J. Bone Joint Surg. Am.* **85-A Suppl 2**, 58–69 (2003).
33. Proffen, B., von Keudell, A. & Vavken, P. [Evidence-based therapy for cartilage lesions in the knee - regenerative treatment options]. *Z. Orthopadie Unfallchirurgie* **150**, 280–289 (2012).
34. Kon, E. *et al.* Articular cartilage treatment in high-level male soccer players: a prospective comparative study of arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation versus microfracture. *Am. J. Sports Med.* **39**, 2549–2557 (2011).

35. Chiang, H. & Jiang, C.-C. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* **108**, 87–101 (2009).
36. Steinert, A. F., Rackwitz, L., Gilbert, F., Nöth, U. & Tuan, R. S. Concise review: the clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 237–247 (2012).
37. Kolf, C. M., Cho, E. & Tuan, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 204 (2007).
38. Wakitani, S. *et al.* Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant.* **13**, 595–600 (2004).
39. Nejadnik, H., Hui, J. H., Feng Choong, E. P., Tai, B.-C. & Lee, E. H. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am. J. Sports Med.* **38**, 1110–1116 (2010).
40. Kuroda, R. *et al.* Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 226–231 (2007).
41. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147 (1999).
42. Zhao, L.-R. *et al.* Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp. Neurol.* **174**, 11–20 (2002).
43. Tuan, R. S., Boland, G. & Tuli, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* **5**, 32–45 (2003).
44. Chen, F. H., Rousche, K. T. & Tuan, R. S. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2**, 373–382 (2006).
45. Caplan, A. I. & Bruder, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med.* **7**, 259–264 (2001).
46. Prockop, D. J., Gregory, C. A. & Spees, J. L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100 Suppl 1**, 11917–11923 (2003).

47. Prockop, D. J., Sekiya, I. & Colter, D. C. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* **3**, 393–396 (2001).
48. Alhadlaq, A. & Mao, J. J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* **13**, 436–448 (2004).
49. Nöth, U. *et al.* Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **20**, 1060–1069 (2002).
50. Xian, C. J. & Foster, B. K. Repair of injured articular and growth plate cartilage using mesenchymal stem cells and chondrogenic gene therapy. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **1**, 213–229 (2006).
51. Brochhausen, C. *et al.* Signalling molecules and growth factors for tissue engineering of cartilage-what can we learn from the growth plate? *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **3**, 416–429 (2009).
52. Horwitz, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393–395 (2005).
53. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
54. Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M. & Prockop, D. J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3213–3218 (2000).
55. Seo, S. & Na, K. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 806891 (2011).
56. Freyria, A.-M. & Mallein-Gerin, F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury* **43**, 259–265 (2012).
57. Muraglia, A., Cancedda, R. & Quarto, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 7)**, 1161–1166 (2000).
58. Huang, J. I. *et al.* Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **23**, 1383–1389 (2005).

59. Yoo, J. U. *et al.* The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J. Bone Joint Surg. Am.* **80**, 1745–1757 (1998).
60. Nöth, U., Steinert, A. F. & Tuan, R. S. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **4**, 371–380 (2008).
61. Majumdar, M. K., Banks, V., Peluso, D. P. & Morris, E. A. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J. Cell. Physiol.* **185**, 98–106 (2000).
62. Sekiya, I., Vuoristo, J. T., Larson, B. L. & Prockop, D. J. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 4397–4402 (2002).
63. Steinert, A. F., Nöth, U. & Tuan, R. S. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury* **39 Suppl 1**, S97-113 (2008).
64. Steinert, A. F. *et al.* Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R148 (2009).
65. Pelttari, K. *et al.* Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* **54**, 3254–3266 (2006).
66. Gelse, K., von der Mark, K., Aigner, T., Park, J. & Schneider, H. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum.* **48**, 430–441 (2003).
67. Palmer, G. D. *et al.* Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **12**, 219–228 (2005).
68. Vortkamp, A. *et al.* Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **273**, 613–622 (1996).
69. Mackie, E. J., Tatarczuch, L. & Mirams, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J. Endocrinol.* **211**, 109–121 (2011).
70. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* **97**, 33–44 (2006).

71. Karsenty, G. & Wagner, E. F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* **2**, 389–406 (2002).
72. Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332–336 (2003).
73. van der Eerden, B. C. J., Karperien, M. & Wit, J. M. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr. Rev.* **24**, 782–801 (2003).
74. Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. & Yoo, J. U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* **238**, 265–272 (1998).
75. Spagnoli, A., Longobardi, L. & O’Rear, L. Cartilage disorders: potential therapeutic use of mesenchymal stem cells. *Endocr. Dev.* **9**, 17–30 (2005).
76. Worster, A. A., Nixon, A. J., Brower-Toland, B. D. & Williams, J. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* **61**, 1003–1010 (2000).
77. Worster, A. A. *et al.* Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **19**, 738–749 (2001).
78. Fortier, L. A., Barker, J. U., Strauss, E. J., McCarrel, T. M. & Cole, B. J. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin. Orthop.* **469**, 2706–2715 (2011).
79. Nestic, D. *et al.* Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 300–322 (2006).
80. Blunk, T. *et al.* Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* **8**, 73–84 (2002).
81. Irawan, V., Sung, T.-C., Higuchi, A. & Ikoma, T. Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Eng. Regen. Med.* **15**, 673–697 (2018).
82. Nöth, U. *et al.* Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. A* **83**, 626–635 (2007).
83. Evans, C. H. *et al.* Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin. Orthop.* S214-219 (2000) doi:10.1097/00003086-200010001-00027.
84. Steinert, A. F. *et al.* Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal

- stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng. Part A* **15**, 1127–1139 (2009).
85. Trippel, S. B., Ghivizzani, S. C. & Nixon, A. J. Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Ther.* **11**, 351–359 (2004).
 86. Gelse, K., von der Mark, K. & Schneider, H. Cartilage regeneration by gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **3**, 305–317 (2003).
 87. Evans, C. H. *et al.* Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1261–1280 (1996).
 88. Madry, H. & Cucchiari, M. Clinical potential and challenges of using genetically modified cells for articular cartilage repair. *Croat. Med. J.* **52**, 245–261 (2011).
 89. Cucchiari, M. & Madry, H. Gene therapy for cartilage defects. *J. Gene Med.* **7**, 1495–1509 (2005).
 90. Gelse, K. & Schneider, H. Ex vivo gene therapy approaches to cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 259–284 (2006).
 91. Santos, J. L. *et al.* Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Curr. Gene Ther.* **11**, 46–57 (2011).
 92. Madry, H. *et al.* Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system. *J. Gene Med.* **5**, 502–509 (2003).
 93. Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–358 (2003).
 94. Empfehlungen des Robert Koch Institutes. Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe von rekombinantem Adenovirus Typ 5. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 2002; 45:655- 661.
 95. Giacca, M. & Zacchigna, S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **161**, 377–388 (2012).
 96. Benihoud, K., Yeh, P. & Perricaudet, M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 440–447 (1999).
 97. Bowles, J., Schepers, G. & Koopman, P. Phylogeny of the SOX family of

- developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* **227**, 239–255 (2000).
98. Lefebvre, V., Li, P. & de Crombrughe, B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* **17**, 5718–5733 (1998).
99. Mertin, S., McDowall, S. G. & Harley, V. R. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1359–1364 (1999).
100. Harley, V. R. *et al.* DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* **255**, 453–456 (1992).
101. Wegner, M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1409–1420 (1999).
102. Weissenberger, M. *et al.* Reduced hypertrophy in vitro after chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells following adenoviral SOX9 gene delivery. *BMC Musculoskelet. Disord.* **21**, 109 (2020).
103. Gasca, S. *et al.* A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11199–11204 (2002).
104. Zhou, G. *et al.* A 182 bp fragment of the mouse pro alpha 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 12)**, 3677–3684 (1995).
105. Zhou, G., Lefebvre, V., Zhang, Z., Eberspaecher, H. & de Crombrughe, B. Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 14989–14997 (1998).
106. Lefebvre, V. *et al.* An 18-base-pair sequence in the mouse proalpha1(II) collagen gene is sufficient for expression in cartilage and binds nuclear proteins that are selectively expressed in chondrocytes. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4512–4523 (1996).
107. Amarilio, R. *et al.* HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **134**, 3917–3928 (2007).
108. Piera-Velazquez, S. *et al.* Regulation of the human SOX9 promoter by Sp1 and CREB. *Exp. Cell Res.* **313**, 1069–1079 (2007).

109. Tew, S. R. & Hardingham, T. E. Regulation of SOX9 mRNA in human articular chondrocytes involving p38 MAPK activation and mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.* **281**, 39471–39479 (2006).
110. Ng, L. J. *et al.* SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* **183**, 108–121 (1997).
111. Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V. & De Crombrughe, B. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **209**, 377–386 (1997).
112. Wright, E. *et al.* The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* **9**, 15–20 (1995).
113. Rahkonen, O., Savontaus, M., Abdelwahid, E., Vuorio, E. & Jokinen, E. Expression patterns of cartilage collagens and Sox9 during mouse heart development. *Histochem. Cell Biol.* **120**, 103–110 (2003).
114. Houston, C. S. *et al.* The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux *et al* in 1971. *Am. J. Med. Genet.* **15**, 3–28 (1983).
115. Foster, J. W. *et al.* Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**, 525–530 (1994).
116. Wagner, T. *et al.* Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79**, 1111–1120 (1994).
117. Kwok, C. *et al.* Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 1028–1036 (1995).
118. Mansour, S., Hall, C. M., Pembrey, M. E. & Young, I. D. A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J. Med. Genet.* **32**, 415–420 (1995).
119. De Santa Barbara, P. *et al.* Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6653–6665 (1998).
120. Lefebvre, V. & Smits, P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **75**, 200–212 (2005).
121. Eames, B. F., de la Fuente, L. & Helms, J. A. Molecular ontogeny of the skeleton. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **69**, 93–101 (2003).
122. Bell, D. M. *et al.* SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.*

16, 174–178 (1997).

123. Bridgewater, L. C., Lefebvre, V. & de Crombrughe, B. Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J. Biol. Chem.* **273**, 14998–15006 (1998).

124. Liu, Y., Li, H., Tanaka, K., Tsumaki, N. & Yamada, Y. Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2(XI) collagen gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 12712–12718 (2000).

125. Xie, W. F., Zhang, X., Sakano, S., Lefebvre, V. & Sandell, L. J. Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **14**, 757–763 (1999).

126. Zehentner, B. K., Haussmann, A. & Burtscher, H. The bone morphogenetic protein antagonist Noggin is regulated by Sox9 during endochondral differentiation. *Dev. Growth Differ.* **44**, 1–9 (2002).

127. Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Méndez, A., Han, Y. & Pallavi, B. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 2195–2214 (2007).

128. Akiyama, H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod. Rheumatol.* **18**, 213–219 (2008).

129. Pearle, A. D., Warren, R. F. & Rodeo, S. A. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin. Sports Med.* **24**, 1–12 (2005).

130. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y. & Phipps, M. L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J. Virol.* **71**, 1842–1849 (1997).

131. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual: Vol. 2.* (Cold Spring Harbor, 1989).

132. Nöth, U., Tuli, R., Osyczka, A. M., Danielson, K. G. & Tuan, R. S. In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* **8**, 131–144 (2002).

133. Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M. & Caplan, A. I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* **13**, 81–88 (1992).

134. Filardo, G. *et al.* Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg. Sports*

Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA **21**, 1717–1729 (2013).

135. Park, J. *et al.* Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *J. Gene Med.* **8**, 112–125 (2006).

136. Kawamura, K. *et al.* Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp. Hematol.* **33**, 865–872 (2005).

137. Steinert, A. F. *et al.* Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R168 (2012).

138. Weißenberger, M. *et al.* Different types of cartilage neotissue fabricated from collagen hydrogels and mesenchymal stromal cells via SOX9, TGFB1 or BMP2 gene transfer. *PLoS One* **15**, e0237479 (2020).

139. Cucchiari, M., Terwilliger, E. F., Kohn, D. & Madry, H. Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 2476–2488 (2009).

140. Tew, S. R. *et al.* Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 80–89 (2005).

141. Tao, K. *et al.* Co-overexpression of TGF- β and SOX9 via rAAV gene transfer modulates the metabolic and chondrogenic activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 20 (2016).

142. Dy, P. *et al.* Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev. Cell* **22**, 597–609 (2012).

143. Jo, A. *et al.* The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes Dis.* **1**, 149–161 (2014).

144. Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. & de Crombrughe, B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* **22**, 85–89 (1999).

145. Bi, W. *et al.* Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6698–6703 (2001).

146. Henry, S. P., Liang, S., Akdemir, K. C. & de Crombrughe, B. The postnatal role of Sox9 in cartilage. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **27**, 2511–

2525 (2012).

147. Quintana, L., zur Nieden, N. I. & Semino, C. E. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **15**, 29–41 (2009).

148. Shi, S., Wang, C., Acton, A. J., Eckert, G. J. & Trippel, S. B. Role of sox9 in growth factor regulation of articular chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* **116**, 1391–1400 (2015).

149. Chung, M. I. S., Ma, A. C. H., Fung, T.-K. & Leung, A. Y. H. Characterization of Sry-related HMG box group F genes in zebrafish hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **39**, 986-998.e5 (2011).

150. Leung, V. Y. L. *et al.* SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS Genet.* **7**, e1002356 (2011).

151. Hattori, T. *et al.* SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Dev. Camb. Engl.* **137**, 901–911 (2010).

152. Bhattaram, P. *et al.* SOXC proteins amplify canonical WNT signaling to secure nonchondrocytic fates in skeletogenesis. *J. Cell Biol.* **207**, 657–671 (2014).

153. Kadaja, M. *et al.* SOX9: a stem cell transcriptional regulator of secreted niche signaling factors. *Genes Dev.* **28**, 328–341 (2014).

154. Park, J. *et al.* Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage. *Biol. Open* **4**, 608–621 (2015).

155. Hardingham, T. E., Oldershaw, R. A. & Tew, S. R. Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. *J. Anat.* **209**, 469–480 (2006).

156. Tsuchiya, H., Kitoh, H., Sugiura, F. & Ishiguro, N. Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 338–343 (2003).

157. Li, Y. *et al.* Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9. *Tissue Eng.* **10**, 575–584 (2004).

158. Cucchiaroni, M. *et al.* Restoration of the extracellular matrix in human

- osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis Rheum.* **56**, 158–167 (2007).
159. Venkatesan, J. K. *et al.* SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **3**, 22 (2012).
160. Kupcsik, L., Stoddart, M. J., Li, Z., Benneker, L. M. & Alini, M. Improving chondrogenesis: potential and limitations of SOX9 gene transfer and mechanical stimulation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **16**, 1845–1855 (2010).
161. Ikeda, T. *et al.* The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* **50**, 3561–3573 (2004).
162. Yang, H. N. *et al.* Chondrogenesis of mesenchymal stem cells and dedifferentiated chondrocytes by transfection with SOX Trio genes. *Biomaterials* **32**, 7695–7704 (2011).
163. Park, J. S. *et al.* Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells mediated by the combination of SOX trio SOX5, 6, and 9 genes complexed with PEI-modified PLGA nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3679–3688 (2011).
164. Im, G.-I., Kim, H.-J. & Lee, J. H. Chondrogenesis of adipose stem cells in a porous PLGA scaffold impregnated with plasmid DNA containing SOX trio (SOX-5,-6 and -9) genes. *Biomaterials* **32**, 4385–4392 (2011).
165. Kim, H.-J. & Im, G.-I. Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **20**, 2103–2114 (2011).
166. Gurusinge, S., Young, P., Michelsen, J. & Strappe, P. Suppression of dedifferentiation and hypertrophy in canine chondrocytes through lentiviral vector expression of Sox9 and induced pluripotency stem cell factors. *Biotechnol. Lett.* **37**, 1495–1504 (2015).
167. Yao, Y., He, Y., Guan, Q. & Wu, Q. A tetracycline expression system in combination with Sox9 for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **35**, 1898–1906 (2014).
168. Cao, L. *et al.* The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **32**,

3910–3920 (2011).

169. Cucchiarini, M., Orth, P. & Madry, H. Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **91**, 625–636 (2013).

170. Cha, B.-H. *et al.* Cartilage tissue formation from dedifferentiated chondrocytes by codelivery of BMP-2 and SOX-9 genes encoding bicistronic vector. *Cell Transplant.* **22**, 1519–1528 (2013).

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. Dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ACT	autologe Chondrozytentransplantation
AGN	Aggrecan
Ak	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
AnnCy3	Annexin-Cyan-3
ATP	Adenosintriphosphat
BMPs	Bone morphogenetic proteins
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	Carboxyfluorescein
CFDA	Carboxyfluorescein-Diacetat
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
Col II	Kollagen Typ II
Col X	Kollagen Typ X
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
CS-4	Chondroitin-4-Sulfat
CsCl	Cäsium-Chlorid
DMMB	Dimethylmethylenblau
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
E	Wellenlänge
ECM	Extrazellulärmatrix

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1 α	Elongation factor 1 α
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
et al.	et altera
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
FMD	Fibromodulin
g	Gramm
GAGs	Glykosaminoglykane
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEK	Human embryonic kidney
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IGF	Insulin-like growth factor
ISCT	International Society for Cellular Therapy
IVP	infektiöse Viruspartikel
kbp	Kilobasenpaare
L	Liter
MDB	Membrane desalting buffer
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity of infection

mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OC	Osteocalcin
OD	Optische Dichte
OP	Osteopontin
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Plateled-derived growth factor
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RLU	relative Lichteinheiten
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SCM	Stammzellmedium
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOX9	SRY-related high mobility group box-9
Steroid-Faktor-1	SF-1
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming growth factor- β
ü.	über
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Einheiten pro Milliliter
V	Volt
x g	mal Erdschwerebeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
Zfp521	Zinkfingerprotein 521
ZnCl ₂	Zink-Chlorid
μ l	Mikroliter

II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Gelenkknorpelzusammensetzung (nach Metz, 2001)
- Abbildung 2: Die klassische Triade des Tissue Engineering bestehend aus Zellen, Extrazellulärmatrix und Signalkaskaden.
- Abbildung 3: Aufnahmen von hMSC- Primärkulturen im Phasenkontrast.
- Abbildung 4: TGF- β 1-Transgenexpressionverlauf über 21 Tage nach adenoviraler Transduktion von hMSC-Pelletkulturen.
- Abbildung 5: IGF-1- Transgenexpressionverlauf über 21 Tage nach adenoviraler Transduktion von hMSC-Pelletkulturen.
- Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Pelletkultur nach adenoviraler SOX9/GFP Transduktion, in 50-facher Vergrößerung.
- Abbildung 7: Nachweis von SOX9/GFP Transgenexpression im Westernblot.
- Abbildung 8: Adenosintriphosphat-Assay nach adenoviralem Gentransfer von SOX9/GFP.
- Abbildung 9: DNA-Gehalt der Pelletkulturen.
- Abbildung 10: Glykosaminoglykan-Gehalt der Pelletkulturen.
- Abbildung 11: Glykosaminoglykan-Gehalt pro DNA-Gehalt.

- Abbildung 12: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Hämatoxylin Eosin Färbung in 50- und 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 13: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Alcian Blau Färbung Färbung in 50- und 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 14: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Kollagen II-Immunhistochemie in 50- und 200-facher Vergrößerung
- Abbildung 15: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Chondroitin-4-Sulfat-Immunhistochemie in 50- und 200-facher Vergrößerung
- Abbildung 16: Alkalische Phosphatase-Assay von hMSC-Pellets.
- Abbildung 17: Histologische Übersicht von hMSC-Zellpelletquerschnitten nach Alkalische Phosphatase-Färbung von in 50- und 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 18: Histologische Übersicht von Zellpelletquerschnitten nach Kollagen X-Immunhistochemie in 50- und 200-facher Vergrößerung.
- Abbildung 19: Genexpression von hMSC-Pelletkulturen knorpelspezifischer und hypertrophiespezifischer mRNA im Zeitverlauf über 21 Tagen in der semiquantitativen RT-PCR.
- Abbildung 20: Quantitative RT-PCR Genexpression von hMSC-

Pelletkulturen knorpelspezifischer und hypertrophiespezifischer mRNA im Zeitverlauf über 21 Tagen.

Abbildung 21: Zellvitalitäts und –apoptoseassay von von hMSC-Pelletkulturen nach 10 und 21 Tagen in 50- und 200-facher Vergrößerung.

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hersteller Chemikalien

Tabelle 2: Hersteller Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Zellkulturmedien und Zusätze mit Herstellerangabe

Tabelle 4: Herstellerangabe Wirtszellen

Tabelle 5: Antikörper Immunhistochemie

Tabelle 6: Antikörper Westernblot

Tabelle 7: Herstellerangabe Enzyme

Tabelle 8: Herstellerangabe Vektor-cDNA

Tabelle 9: Primersequenzen mit Annealing Temperatur, Produktgröße (bp, Basenpaare) und Zyklenzahl Lösungen mit Inhaltsstoffen

Tabelle 10: Herstellung Puffer und Lösungen.

Tabelle 11: Zusammensetzung der 5%, 10% und 12%igen verwendeter Polyacrylamidgele mit Angabe der Reagenzienvolumina

Tabelle 12: Assays und Kits mit Herstellerangabe

Tabelle 13: Hersteller Geräte

Tabelle 14: Software und Onlinedatenquellen

IV Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Professor Rudert für die Möglichkeit bedanken, wissenschaftlich am Lehrstuhl für Orthopädie der Universität Würzburg tätig gewesen sein zu können.

Ein herzlicher Dank gilt meinem wissenschaftlichen Mentor, Herrn Professor Steinert, für die Überlassung meines Dissertationsthemas und die lange und intensive Betreuung. Lieber Andre, vielen herzlichen Dank, dass Du mich in einem wichtigen Abschnitt meines Lebens begleitet und stets möglich gemacht hast, was in deiner Kraft stand.

Herrn Professor Dölken sowie Herrn Professor Scheller sei vielmals für die Übernahme des Korreferates und Betreuungskomitees gedankt. Lieber Carsten, vielen herzlichen Dank für deine überaus geschätzte Hilfestellung und Unterstützung bei virologischen Fragestellungen jeglicher Art und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Zudem möchte ich herzlich Andrea Heymer und Viola Zehe danken, dass sie mir im Labor stets beratend zur Seite standen.

Außerdem möchte ich mich bei dem Wiss-Lab-Team für die unvergessliche gemeinsame Zeit bedanken: Simone, Thommy, Rode, Katrin, Patrick und Alex.

Weiterhin möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Tante bedanken, die mich immer tatkräftig unterstützt und mir oft Mut gemacht hat, weiterzumachen. Ferner möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die immer alles für mich geben und mich stets in meinem Leben unterstützen.

Zuletzt möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben von ganzem Herzen bedanken, meinem Mann und unseren beiden großartigen Kindern Emma und August. Danke für Eure bedingungslose Liebe, den Rückhalt und Euer Verständnis. Ihr seid das Beste in meinem Leben.

VI Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

Gehaltene Vorträge:

Kunz M., Weißenberger M., Nöth U., Rudert M., Steinert A. Reduzierte Hypertrophie nach chondrogener Induktion humaner mesenchymaler Stammzellen via SOX9 Gentransfer. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU), 2010, Berlin, Deutschland, (gehalten).

Publikationen:

1. [Different types of cartilage neotissue fabricated from collagen hydrogels and mesenchymal stromal cells via SOX9, TGFB1 or BMP2 gene transfer.](#)
Weißenberger M, **Weißenberger MH**, Wagenbrenner M, Heinz T, Reboredo J, Holzapfel BM, Rudert M, Groll J, Evans CH, Steinert AF. PLoS One. 2020 Aug 13;15(8): e0237479. doi: 10.1371/journal.pone.0237479. eCollection 2020. PMID: 32790806
2. [Reduced hypertrophy *in vitro* after chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells following adenoviral SOX9 gene delivery.](#)
Weissenberger M, **Weissenberger MH**, Gilbert F, Groll J, Evans CH, Steinert AF. BMC Musculoskelet Disord. 2020 Feb 17;21(1):109. doi: 10.1186/s12891-020-3137-4. PMID: 32066427
3. [Proteolysis and cartilage development are activated in the synovium after surgical induction of post traumatic osteoarthritis.](#) Ayturk UM, Sieker JT, Haslauer CM, Proffen BL, **Weissenberger MH**, Warman ML, Fleming BC, Murray MM. PLoS One. 2020 Feb 27;15(2): e0229449. doi: 10.1371/journal.pone.0229449. eCollection 2020. PMID: 32107493
4. [Immediate Administration of Intraarticular Triamcinolone Acetonide After Joint Injury Modulates Molecular Outcomes Associated with Early Synovitis.](#)

Sieker JT, Ayturk UM, Proffen BL, **Weissenberger MH**, Kiapour AM, Murray MM. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Jul;68(7):1637-47. doi: 10.1002/art.39631. PMID: 26866935

5. [Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Anterior Cruciate Ligament: Characterization and Comparison of Cells from Young and Old Donors.](#) Prager P, **Kunz M**, Ebert R, Klein-Hitpass L, Sieker J, Barthel T, Jakob F, Konrads C, Steinert A. *Knee Surg Relat Res.* 2018 Sep 1;30(3):193-205. doi: 10.5792/ksrr.17.067. PMID: 29554721
6. [Characterization of bursa subacromialis-derived mesenchymal stem cells.](#) Steinert AF, **Kunz M**, Prager P, Göbel S, Klein-Hitpass L, Ebert R, Nöth U, Jakob F, Gohlke F. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Jun 3;6(1):114. doi: 10.1186/s13287-015-0104-3. PMID: 26036250
7. [Direct bone morphogenetic protein 2 and Indian hedgehog gene transfer for articular cartilage repair using bone marrow coagulates.](#) Sieker JT, **Kunz M**, Weißenberger M, Gilbert F, Frey S, Rudert M, Steinert AF. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015 Mar;23(3):433-42. doi: 10.1016/j.joca.2014.11.008. Epub 2014 Nov 13. PMID: 25463442
8. [Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells.](#) Steinert AF, Weissenberger M, **Kunz M**, Gilbert F, Ghivizzani SC, Göbel S, Jakob F, Nöth U, Rudert M. *Arthritis Res Ther.* 2012 Jul 20;14(4): R168. doi: 10.1186/ar3921. PMID: 22817660
9. [Mesenchymal stem cell characteristics of human anterior cruciate ligament outgrowth cells.](#) Steinert AF, **Kunz M**, Prager P, Barthel T, Jakob F, Nöth U, Murray MM, Evans CH, Porter RM. *Tissue Eng Part A.* 2011 May;17(9-10):1375-88. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0413. Epub 2011 Mar 8. PMID: 21247268

10. [BMP12 and BMP13 gene transfer induce ligamentogenic differentiation in mesenchymal progenitor and anterior cruciate ligament cells.](#) Haddad-Weber M, Prager P, **Kunz M**, Seefried L, Jakob F, Murray MM, Evans CH, Nöth U, Steinert AF. *Cytotherapy*. 2010 Jul;12(4):505-13. doi: 10.3109/14653241003709652.PMID: 20334610
11. [Hypertrophy is induced during the *in vitro* chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer.](#) Steinert AF, Proffen B, **Kunz M**, Hendrich C, Ghivizzani SC, Nöth U, Rethwilm A, Eulert J, Evans CH. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5): R148. doi: 10.1186/ar2822. Epub 2009 Oct 2. PMID: 19799789
12. [In situ IGF-1 gene delivery to cells emerging from the injured anterior cruciate ligament.](#) Steinert AF, Weber M, **Kunz M**, Palmer GD, Nöth U, Evans CH, Murray MM. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(7):904-16. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.10.054. Epub 2007 Nov 28. PMID: 18045683
13. [Adult multilineage mesenchymal progenitor cells isolated from the bursa subacromialis.](#) Steinert A, Heymer A, **Kunz M**, Jakob F, Noth U, Gohlke F.J *Stem Cells Regen Med*. 2007 May 16;2(1):188-9. eCollection 2007.PMID: 24692991 No abstract available.
14. [BMP-12 transduced MSCs in collagen hydrogel for ligament reconstruction.](#) Weber M, **Kunz M**, Stehle J, Noth U, Steinert A. *J Stem Cells Regen Med*. 2007 May 16;2(1):72-3. eCollection 2007.PMID: 24692913 No abstract available.

Preise:

Hans-Jürgen Bretschneider Preis, 2009, 13. Chirurgische Forschungstage der Sektion Chirurgische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH) in München

Steinert A., **Kunz M.**, Proffen B., Weißenberger M., Nöth U., Evans C., Rudert M.
"Gene-induced chondrogenesis for cartilage repair – Screening of different transgenes and potential of hypertrophy reduction "

Poster-Preis der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie (DGOU) 2009

Steinert A., Stehle J., **Kunz M.**, Jakob F., Nöth U., Gohlke F. "Bursa subacromialis: Stammzelldepot in der Schulter mit Relevanz für die Heilung von Rotatorenmanschettendefekten - eine molekulare Analyse"

Best-Paper-Preis, Bester Vortrag & Beste Studie 2009 der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie AGA

Steinert A., **Kunz M.**, Barthel T., Nöth U., Porter R., Murray M., Evans C. "Identification of Mesenchymal Stem Cells in the Anterior Cruciate Ligament "

Würzburg, 22.02.2022

Manuela Weißenberger