

T. G. Gerich · H. P. Lobenhoffer · Unfallchirurgische Klinik, Medizinische Hochschule Hannover ·
F. H. Fu · P. D. Robbins · C. H. Evans · University of Pittsburgh, Department of Orthopaedic Surgery,
Musculoskeletal Research Center

Virusvermittelter Gentransfer in die Patellarsehne

Eine experimentelle Studie am Kaninchen

Zusammenfassung

Wachstumsfaktoren sind für jeden Wundheilungsprozeß von essentieller Bedeutung. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß die lokale Anwendung dieser Substanzen den natürlichen Heilungsprozeß bei ligamentären Verletzungen beschleunigen kann. Die Methoden für eine effiziente klinische Anwendung sind jedoch nicht ausreichend entwickelt, um eine dauerhaft hohe Konzentration an der Verletzungsstelle zu erzielen. Eine mögliche Lösung für dieses Problem ist die Synthese von Wachstumsfaktoren durch ortsständige Zellen im Kniegelenk, die hierzu durch lokalen Gentransfer angeregt werden könnten. In einem neuen experimentellen Ansatz untersuchen wir die Möglichkeit des lokalen Gentransfers in die Patellarsehne mit dem Ziel, ortsständige Zellen zur Produktion von Wachstumsfaktoren anzuregen. In einer experimentellen Studie wurden zunächst verschiedene Vektoren untersucht, die für den Gentransfer in Fibroblasten in Frage kommen. Virale Vektoren bieten neben non-viralen Vektoren, wie z. B. Liposomen, die Möglichkeit, das Genom von Zellen zu modifizieren. Hierzu wurden Zellkulturen aus dem VKB und HKB des Kaninchens angelegt. Diesen Zellkulturen wurden dann verschiedene Vektoren zugesetzt, die ein Markergen transportieren. Transduzierte Zellen sezernierten anschließend die histochemisch nachweisbare Substanz β -Galaktosidase. Die quantitative Expression dieser Substanz wurde bestimmt. Bei diesen

In-vitro-Vorversuchen zeigte sich, daß Adenoviren sämtliche Wirtszellen transduzierten, wobei die Expression der Markersubstanz zeitlich begrenzt war. Retroviren hatten einen signifikant geringeren Effekt, der sich jedoch ebenso wie bei adenoassoziierten Viren durch weitere Selektionsschritte steigern ließ. Liposome zeigten generell die geringste Wirkung. In einem In-vivo-Versuch wurden Adenoviren in die Patellarsehnen von Kaninchen injiziert. Transduzierte Zellen wurden vorwiegend in der synovialen Schicht beobachtet. Die Expression ließ während des 6-wöchigen Untersuchungszeitraums nach. In einem Ex-vivo-Versuch wurden Fibroblasten zunächst mit Retroviren in vitro transduziert, anschließend selektiert und in die Patellarsehne injiziert. Dieses Verfahren resultierte in einer zahlenmäßig größeren Expression. Im Gegensatz zu der In-situ-Transduktion mit Adenoviren konnten transduzierte Zellen entfernt von der Injektionsstelle nachgewiesen werden, wo sich diese Zellen in das Crimp-Muster der Patellarsehne integrierten.

Schlüsselwörter

Gentransfer · Patellarsehne · Adenovirus · Retrovirus

- **Markergen:** Transgen, das zur Dokumentation einer stattgehabten Transduktion dient. Für den weiteren experimentellen oder therapeutischen somatischen Gentransfer können diese Markergene ausgetauscht werden.
- **lacZ:** Markergen, das β -Galaktosidase kodiert. Durch Zugabe des chromogenen Substrates können transduzierte Zellen in einfacher Färbetechnik blau dargestellt werden.
- **neo^r:** Ein Markergen, das Neomycinphosphotransferase kodiert. Wird diese Substanz von transduzierten Zellen produziert, besteht eine Resistenz gegenüber dem ansonsten zytotoxischen synthetischen Neomycinanalogon G-418.
- **TGF- β :** Zytokin; Transforming growth factor β
- **IGF-I, IGF-II:** Zytokin; Insulin like growth factor I und II (Zytokin)
- **IRAP:** Zytokin; Interleukin-1-Rezeptor Antagonist Protein; natürlich vorkommendes Zytokin, das in vivo und in vitro die Aktivität von Interleukin-1 blockieren kann.
- **Expression:** Vorgang der Umschreibung von DNA über RNA bis hin zum biologisch aktiven Protein
- **Transduktion:** Veränderung der Zelle durch Aufnahme exogener DNA. Derartig veränderte Zellen produzieren jetzt ein nichteigenes Protein.
- **Plasmid:** extrachromosomaler Nukleinsäurestrang
- **kb:** Kilobasen; Maßeinheit für die Größe eines Gens
- **pCMV lacZ, pCMV IRAP, pMFG IRAP:** Plasmide; in diesem Fall Promotor und Gen
- **Liposome:** mikroskopisch kleine Körperchen aus Lipiden. Liposome dienen als Trägersubstanz für Plasmide für den Gentransfer

Dr. T. G. Gerich

Unfallchirurgische Klinik, Medizinische Hochschule, Hannover, Carl-Neuberg-Straße 1, D-30625 Hannover

**Virally mediated gene transfer
to the patellar tendon.
An experimental study on rabbits**

Summary

Growth factors have the potential to enhance native repair responses in ligamentous and meniscal lesions. However, methods for applying these cytokines to sites of injury for extended periods are lacking. We suggest that local transfer of genes that encode the relevant healing factors merits investigation as a potential solution to this problem. In the present study, different viral vectors and liposomes are evaluated for their ability to deliver genes to cells of ligamentous and meniscal origin. The ACL, PCL, MCL, semitendinosus tendon, patellar tendon, and menisci were harvested from New Zealand white rabbits. Cells grown from these tissues were then investigated for their susceptibility to genetic alteration by these vectors. Based upon the ability of these vectors to convert cells in culture to a lacZ(+) phenotype, adenovirus was the most effective vector in short-term experiments. However, expression was transient. Although retrovirus gave lower initial transduction efficiencies, the percentage of transduced cells could be increased by the use of the selectable marker gene neo^r. Cells infected with adeno-associated virus containing the neo^r-gene could also be selected in this way. Liposomes showed low efficiency of gene transfer and expression. In an in vivo marker study, we injected adenovirus into the rabbit patellar tendon. Transduced cells could be observed preferentially in the subsynovial layer at a declining frequency over a 6-week period. The allogeneous transplantation of retrovirally transduced fibroblasts into the patellar tendon resulted in a greater number of transduced cells. Although the number of lacZ(+) cells declined with time, positive cells were still present 6 weeks after transplantation. Furthermore, the transplanted cells, unlike cells transduced in situ with adenovirus, migrated from the injection site and integrated into the crimp of the tendon.

Key words

Gene · Transfer · Patellar tendon · Adenovirus · Retrovirus

Die Forschung auf dem Gebiet der Biomechanik, Ultrastruktur und Biochemie der Ligamente und Menisken hat die therapeutischen Möglichkeiten bei Verletzung dieser Strukturen verbessert. Vor allem biomechanische Prinzipien haben in der Behandlung von Kreuzbandläsionen Anwendung gefunden und die mittelfristigen Resultate verbessert. Die Biologie der Heilungsvorgänge nach Ligament- und Meniskusverletzungen hingegen bleibt in den gegenwärtigen Behandlungskonzepten unterrepräsentiert. Ergebnisse der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Zytokine und erste experimentelle Ergebnisse legen nahe, daß diese Zytokine den Heilungsprozeß modifizieren und beschleunigen können [9, 25, 33].

Histologische und biomechanische Untersuchungen nach Ersatz der Kreuzbänder mit einem Patellarsehnentransplantat zeigen, daß das Transplantat nicht die Materialeigenschaften des Originalgewebes annimmt. Morphologisch unterscheidbare Phasen der Ligamentheilung werden durchlaufen, das Transplantat erreicht jedoch nicht ein Stadium der Ligamentreifung, sondern bildet ein biomechanisch und strukturell minderwertiges Ersatzgewebe [5, 24]. So wurde tierexperimentell nachgewiesen, daß nach einem autologen Patellarsehnenersatz typische Kollagenfasern Typ I durch dünnere und mechanisch schwächere Kollagenfasern Typ III ersetzt werden, die mehr als 90% der Fläche repräsentieren, die vom Kollagen eingenommen wird. Zudem belegen neuere klinische Studien, daß auch trotz suffizienter Gelenkstabilisierung eine erhebliche Arthroseinzidenz besteht [17]. Eine mögliche Erklärung für diese Entwicklung ist die nachhaltige Störung der Propriozeption. Obwohl in histologischen Studien nachgewiesen worden ist, daß es zu einer Regeneration von freien Nervenendigungen und spezifischen Rezeptoren kommt, konnten zahlreiche klinische Studien in der Langzeitbeobachtung zeigen, daß die propriozeptiven Fähigkeiten nicht in vollem Umfang wiederhergestellt werden.

Da offensichtlich diese Optimierung der chirurgischen Techniken nicht zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Langzeitergebnisse geführt hat, besteht die Notwendigkeit für alternative Lösungsansätze in der Therapie von Ligamentverletzungen. Biochemische Analysen der Heilungsvorgänge bei die-

sen Verletzungen eröffnen die Möglichkeit aus den Substanzen Nutzen zu ziehen, die am Heilungsvorgang beteiligt sind. Besonders Wachstumsfaktoren wie z. B. TGF- β und IGF-I sind vielversprechende Substanzen, die klinisch nutzbringend verwendet werden können. Von diesen Substanzen ist bekannt, daß sie den natürlichen Heilungsprozeß in den unterschiedlichen Phasen durch Beschleunigung der Zellteilung, Migration, Kollagensynthese und Gefäßneubildung unterstützen. So wurde für TGF- β und IGF-II in vitro gezeigt, daß diese Faktoren die metabolische Situation in Richtung „Anabolie“ durch vermehrte Synthese von Proteinaseinhibitoren verschieben. TGF- β ist hierbei in der Lage, das inverse Verhältnis von Kollagen Typ I und III zugunsten einer vermehrten Produktion von Typ I zu verschieben. Für die Heilung von Ligamenten kann dies bedeuten, daß die Anwendung dieser Faktoren zu einer physiologischen Zusammensetzung der Kollagene führt.

Diese Faktoren erfordern jedoch eine strikt lokale Applikation, um potentiell nachteilige Effekte einer mehr systemischen Anwendung zu vermeiden. Für TGF- β ist im Tierversuch gezeigt worden, daß eine repetitive intraartikuläre Injektion zur Arthrose führt. Darüber hinaus scheint dieser Wachstumsfaktor eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der postoperativen Arthrofibrose zu spielen.

Zur Zeit existiert jedoch kein praktikables System, mit dem eine prolongierte, lokale Applikation dieser Faktoren durchzuführen ist. Wachstumsfaktoren sind Proteine, die einem raschen Abbau unterliegen. Nach i. v.-Applikation beträgt die Halbwertszeit nur wenige Minuten. Die Inkorporation in „Slow-release-Systeme“, d. h. Systeme, die biologisch aktive Substanzen über einen längeren Zeitraum an das Gewebe abgeben, kann die Halbwertszeit erhöhen. Allerdings kommt es auch hier zu einem raschen Abbau, so daß an der Verletzungsstelle keine erhöhten Konzentrationen über einen längeren Zeitraum zu erwarten sind.

Eine mögliche Lösung für dieses Problem bietet der lokale Transfer von Genen für die Produktion eines gewünschten Wachstumsfaktors oder einer Kombination von Faktoren in einem Zielgewebe. Dieses Verfahren wurde ursprünglich entwickelt, um genetisch bedingte Er-

krankungen wie Osteogenesis imperfecta, Morbus Gaucher oder muskuläre Dystrophie zu therapieren. Erkenntnisse über den lokalen Gentransfer, die bei diesen genetisch bedingten Erkrankungen gewonnen worden sind, führten zu der Annahme, daß nicht nur der Ersatz von defekten oder fehlenden Proteinen möglich ist, sondern auch die Applikation von potentiell nützlichen Zytokinen bei erworbenen Erkrankungen realisierbar ist. In diesem Kontext könnte Gentransfer als ein lokales Applikationssystem für Pharmaka mit Proteinstruktur verwendet werden.

Anwendung hat diese Technologie bislang in der Behandlung der rheumatischen Arthritis gefunden. Die Möglichkeit IL-1ra (Interleukin-1-Rezeptorantagonistenprotein) mittels Gentransfer in Synoviozyten zu produzieren wird derzeit klinisch an der Universität Pittsburgh untersucht [15].

Gentransfer und Vektoren

Allgemein bedeutet Gentransfer, daß ein exogenes Gen in ein Zielgewebe eingebracht wird [2, 12–15]. Der therapeutische Nutzen entsteht durch das Transgenprodukt der genetisch modifizierten Zellen. Da nackte DNA jedoch von den meisten Zellen nicht aufgenommen und exprimiert wird, ist dieses Verfahren auf Vektoren angewiesen. Der Begriff Vektor umschreibt eine Substanzklasse, die Gentransfer und Expression ermöglicht. Besonders effiziente Vektoren sind Viren, die z. T. in der Mehrzahl der Gentransferstudien eingesetzt werden. Elemente des viralen Genoms werden entfernt, um die virale Replikation und damit eine Vermehrung von Viren zu verhindern. Gleichzeitig wird das erwünschte Gen integriert. Im folgenden beschreiben wir in Kürze die wesentlichen Charakteristika der häufig genutzten Vektoren.

- *Retroviren* sind z. T. die am weitesten entwickelten viralen Vektoren. Sie gehören zur Gruppe der RNA-Viren und enthalten eine reverse Transkriptase, die das virale RNA-Genom in DNA kopiert. Die DNA wird dann stabil in das Empfänger-genom an zufälliger Stelle integriert. Ein wesentlicher limitierender Faktor ist die Eigenschaft, daß Retroviren ausschließlich aktiv teilende Zellen infizieren [27]. Für die praktische Anwendung bedeutet dies, daß Gentransfer nur in Gewebe mit aktiv teilenden Zellen möglich ist oder

in einem In-vitro-System. Die Aufnahmekapazität für exogenes genetisches Material ist auf 8 kb (Kilobasen) limitiert. Für die Synthese von Wachstumsfaktoren stellt dies jedoch kein wesentliches Problem dar, da die meisten Wachstumsfaktoren kleine Moleküle sind.

- *Adenoviren* besitzen Eigenschaften, die diesen Vektor besonders geeignet erscheinen lassen, Gene für Wachstumsfaktoren in ein Wundgebiet zu transportieren. Dieses DNA-Virus kann mit einem hohen Titer produziert werden und infiziert sowohl teilende als auch ruhende Zellen mit hoher Effizienz. Ein potentiell Problem in der Anwendung sind jedoch Autoimmunreaktionen gegen transduzierte Zellen, da die gegenwärtige Virusgeneration weiterhin antigene virale Proteine produziert [38].

- *Adenoassoziiertes Virus* ist ein einsträngiges DNA-Virus, das ein Helfervirus wie Adenovirus zur Replikation benötigt. Wie Adenovirus infiziert auch dieses Virus ruhende und teilende Zellen. Die Wildform integriert spezifisch im Chromosom 19 und kann mit einem hohen Titer produziert werden. Das rekombinante Virus hingegen verliert diese Integrationspezifität, und es ist nicht vollständig geklärt, ob dieses Virus überhaupt integriert. Darüber hinaus kann dieses Virus nur mit einem niedrigen Titer und einer Aufnahmekapazität von 4 kb hergestellt werden.

- *Herpes-Viren* sind große nicht-integrierende DNA-Viren. Der Vorteil dieser Viren ist eine Aufnahmekapazität für exogene DNA von über 35 kb und die Möglichkeit, dieses Virus mit einem hohen Titer zu produzieren [20]. Die bislang entwickelten Viren zeigen jedoch eine ausgeprägte Zytotoxizität und eine nur transiente Genexpression.

Da die Anwendung viraler Vektoren erhebliche Sicherheitsbedenken hervorgerufen hat, werden unter diesem Aspekt nonvirale Vektoren entwickelt.

- Komplexe aus kationischen *Liposomen* und *Plasmid-DNA* haben sich für den Gentransfer als besonders geeignet erwiesen [23, 26], da sie eine Reihe von Zellen mit hoher Effektivität transfizieren [7, 16, 18, 28].

In der vorliegenden Studie haben wir Retrovirus, Adenovirus, adenoassoziiertes Virus und Herpes-Virus als virale Vektoren, sowie Liposome als einen nonviralen Vektor daraufhin evaluiert, bestimmte Markergene in vitro in Zel-

len zu transportieren; z. B. erlaubt das Markergen lacZ den Nachweis einer erfolgreichen Transduktion durch die Produktion von β -Galaktosidase. Diese Enzymproduktion kann mit einem einfachen histochemischen Färbeverfahren nachgewiesen werden. Hierzu wurden ligamentäre Fibroblasten und meniskale Fibrochondroblasten vom Kaninchen verwendet. Um zu bestätigen, daß mit dieser Technik auch ein Zytokinen exprimiert werden kann, wurde das humane IL-1ra in einzelnen Experimenten transferiert. In einem anschließenden In-vivo-Versuch wurde der erfolgreiche Transfer des lacZ-Markergens in die Patellarsehne von Kaninchen mit In-vivo- und Ex-vivo-Techniken demonstriert.

Material und Methodik

In-vitro-Studie

Zellkultur. Drei Monate alte weiße Neuseeland-Kaninchen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 2,5 kg wurden durch eine i. v.-Pentothal-Injektion getötet.

Das vordere Kreuzband (VKB), hintere Kreuzband (HKB), das mediale Seitenband, die Patellarsehne, die Semitendinosussehne und beide Menisken wurden unter aseptischen Bedingungen entfernt. Anhängendes Fett und Synovium wurden scharf von diesem Gewebe entfernt. Ligamente und Sehne wurden dann in kleine Gewebestücke von etwa 1 mm zerkleinert und in 100 ml Zellkulturschalen plaziert (Corning, N.Y.), zusammen mit „Ham's F12-Nährmedium“ (GIBCO, Grand Island, NY), supplementiert mit 10% fetalem Rinderserum (GIBCO), 100 U/ml Penicillin und 10 μ g/ml Streptomycin (GIBCO). Die Zellen wurden dann bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luft kultiviert. Das Nährmedium wurde alle 10 Tage ausgetauscht bis sich die Zellen von den Gewebefragmenten ausgebreitet und volle Konfluenz erreicht hatten. Die Zellkulturen wurden dann trypsinisiert (Trypsin 0,25 w/v %, GIBCO) und anschließend in 25 cm² Polystyren-Zellkulturflaschen (Corning) in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 weiterkultiviert.

Fibrochondroblasten wurden aus der umgebenden Meniskusmatrix durch sequentielle Digestion mit 4000 U Trypsin (0,2% wt/vol, Worthington Biochemical Corporation, NJ) in 10 ml „Gey's Balanced Salt Solution“ für 20 min, gefolgt von 4000 U Kollagenase (0,2% wt/vol) in 10 ml „Gey's Solution“ für 3 h isoliert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert, in „Ham's F12-Nährmedium“ resuspendiert und in 25-cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Kulturen erreichten nach 7–10 Tagen volle Konfluenz.

Virusvermittelter Gentransfer. Da sich gezeigt hat, daß Retroviren nur aktiv teilende Zellen

Tabelle 1

Retrovirale Vektoren, die in dieser Studie evaluiert sind, leiten sich von dem „Moloney Murine Leukemia Virus“ (MoMLV) ab. In den MFG Abkömmlingen ist das neue Gen an Stelle des „env“ Gens plaziert worden. Die Expression wird gesteuert durch den endogenen viralen Promoter mit dem 5'LTR. Der Herpes Vektor wurde von Huard et al. [22] beschrieben (Gene: lacZ β -Galaktosidase, neo^r Neomycin Resistenz, IRAP oder IL-ra Interleukin-1 Rezeptorantagonistprotein. Promotor: LTR long terminal repeat, SV40 Simian Virus 40, HCMV humanes Zytomegalievirus)

| Name | Vektor | Gen | Promotor | Integration in das Genom der Wirtszelle |
|---------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------|---|
| Ad lacZ | Adenovirus | lacZ | HCMV | Nein |
| AAV neo ^r | Adenoassoziiertes Virus | neo ^r | HCMV | Ja |
| d120, TK ⁻ : HCMV IEP-lacZ | Herpes-Virus | lacZ | HCMV | Nein |
| MFG lacZ | Retrovirus | lacZ | LTR | Ja |
| BAG lacZ neo ^r | Retrovirus | lacZ neo ^r | LTR SV 40 | Ja |
| MFG IRAP | Retrovirus | IL-ra | LTR | Ja |
| pIEP lacZ | Liposom/Plasmid | lacZ | HCMV | Nein |
| pCMV IRAP | Liposom/Plasmid | IL-ra | HCMV | Nein |
| pMFG IRAP | Liposom/Plasmid | IL-ra | LTR | Nein |

infizieren, waren die Kulturen zum Zeitpunkt der Infektion bei etwa 70% Konfluenz (relative Angabe der Zelldichte im Monolayer) für die Infektion mit den Retroviren BAG lacZ neo^r,³⁰ MFG-lacZ und MFG-IRAP³ (Tabelle 1). Da Adenovirus, adenoassoziiertes Virus und Herpes-Virus teilende und nicht teilende Zellen infizieren, waren diese Zellkulturen vollständig konfluent. Alle Virussuspensionen hatten einen Titer von 10⁶ Plus/ml Nährmedium und enthielten zusätzlich 8 μ g/ml Polybrene (SIGMA), einen polykationischen Faktor, der die Infektion unterstützt [6, 11, 35]. Ein ml Virussuspension wurde auf den Zellmonolayer in eine 25-cm²-Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 3 h wurden weitere 3 ml „Ham's F12-Nährmedium“ hinzugegeben und die Zellen in den Inkubator zurückgegeben.

Liposomvermittelter Gentransfer. Für die Lipofektion wurden Liposome bestehend aus

1,2 μ mol DC-Chol (Dimethylaminoethan-carbamoyl-cholesterol) und 0,8 μ mol DOPE (Dioleoyl-phosphatidyl-ethanolamin) (Verhältnis 3:2) verwendet, die sich für den Gentransfer in Vorversuchen als geeignet erwiesen hatten [28]; 3 unterschiedliche Plasmide wurden in dieser Versuchsreihe evaluiert. Die Liposome wurden an ein Plasmid komplexgebunden, das für β -Galaktosidase (pCMV lacZ) kodiert und 2 weitere Plasmide, die für das humane Interleukin-1-Rezeptorantagonistenprotein (pCMV IRAP und pMFG IRAP) kodieren (Tabelle 1). Da bislang weder eine Konzentration noch das Mischungsverhältnis für Liposome und Plasmide für Gentransfer zu Fibroblasten bestimmt worden waren, wurden verschiedene Kombinationen untersucht.

Assays für Genexpression. Das Markergen lacZ kodiert β -Galaktosidase, dessen Aktivität in lacZ(+)-Zellen mit einer histochemischen

Färbung bestimmt werden kann. Um die Effektivität des Gentransfers und die Expression des lacZ-Gens zu bestimmen, wurden die Zellen 3 Tage nach der Infektion durch Zugabe des Substrats für β -Galaktosidase gefärbt: X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) (SIGMA). Die Effektivität der Transduktion nach der X-gal-Färbung wurde semiquantitativ als der prozentuale Anteil der lacZ(+)-Zellen bestimmt (Tabelle 2).

Das Markergen neo^r kodiert Neomycinphosphotransferase. Infizierte Zellen, die das Transgen exprimieren, sind gegenüber den zytotoxischen Effekten von G-418, einem synthetischen Neomycinanalogon, resistent. Zellkulturen, die mit diesem Gen transduziert worden sind, wurden 3 Tage nach der Infektion mit Trypsin in einem Verhältnis von 1:2 aufgeteilt, und in ein Nährmedium gegeben, das 0,5 mg/ml G-418 enthielt. Das Medium wurde alle vier Tage ausgetauscht, um eine konstante G-418 Konzentration aufrecht zu erhalten (Tabelle 2).

Zellen, die das IRAP-Gen exprimieren, sezernieren dieses Zytokin in das Nährmedium. Die IL-1ra-Konzentration im Medium wurde 3 Tage nach der Infektion mit einem „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) (R & D Systems, Minneapolis) bestimmt. Die Resultate wurden in ng IL-1ra/10⁶ Zellen angegeben (Tabelle 2).

In-vivo-Studie

Es gibt 2 grundlegende Techniken für den Gentransfer in ein In-vivo-System. In der direkten Technik, der In-vivo-Methode, wird der Vektor direkt in das Gewebe in situ appliziert. In der indirekten Technik, Ex-vivo-Methode, werden Zellen in einem 1. Schritt aus dem Körper entfernt, Zellen werden dann genetisch in vitro verändert und anschließend wieder in den Körper zurückgeführt (Abb. 1).

In der In-vitro-Studie hat sich gezeigt, daß Adenovirus für eine In-vivo-Technik und BAG-lacZ-neo^r für die Ex-vivo-Technik am besten geeignet waren. Die Patellarsehne von Kaninchen wurde als optimales Zielgewebe ausgewählt, da sie palpabel und einer perkutanen Injektion zugänglich ist.

Neun 3 Monate alte weiße Neuseeland-Kaninchen wurden den 2 Techniken zugeteilt. Gruppe I bestand aus 4 Kaninchen und erhielt eine direkte Injektion von Adenovirus lacZ (5 \times 10⁶ Partikel/250 μ l „Gey's Balanced Salt Solution“) in die rechte Patellarsehne. Die linke Patellarsehne diente als Kontrolle und wurde mit 250 μ l „Gey's Balanced Salt Solution“ injiziert.

Gruppe II bestand aus 5 Kaninchen und erhielt eine allogene Zelltransplantation mit Fibroblasten aus der Patellarsehne, die in vitro mit dem BAG Virus infiziert und in G-418 selektiert worden waren. Eine Gesamtmenge von 5 \times 10⁶ neo^r, lacZ(+)-Fibroblasten, suspendiert in 250 μ l „Gey's Lösung“, wurde in die rechte Patellarsehne injiziert. Die linke Patellarsehne diente erneut als Kontrolle und erhielt eine Injektion von 5 \times 10⁶ nativen Fibroblasten. Nach der Injektion wurde freie Käfigaktivität gestattet.

Tabelle 2

Die Vektoren in dieser Studie trugen eines oder mehrerer dieser Gene. Aufgelistet sind die Genprodukte und die Assays für den Nachweis

| Gen | Genprodukt | Assay der Genexpression |
|------------------|---|---|
| lacZ | β -Galaktosidase | Färbung mit X-gal (chromogenes Substrat für β -Galaktosidase) |
| neo ^r | Neomycin Phosphotransferase | Selektion mit G-418 (synthetisches Neomycinanalogon) |
| IL-1ra | Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Protein | IL-1ra ELISA |

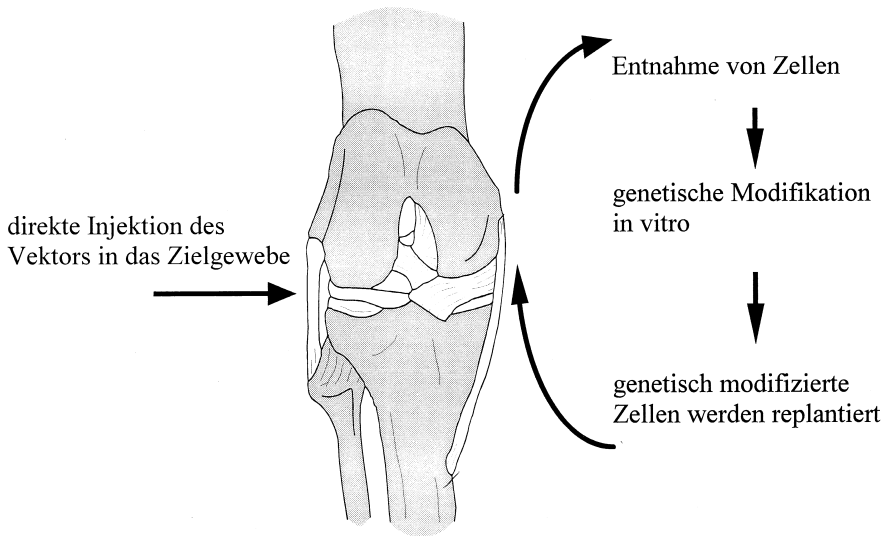


Abb. 1 ▲ Für den Gentransfer in ein In-vivo-System stehen 2 Verfahren zur Verfügung. In der In-vivo-Technik kann der Vektor direkt in das Zielgewebe eingebracht werden, wo ortsständige Zellen transduziert werden. Der Ex-vivo-Ansatz ist komplizierter und besteht aus 3 Arbeitsschritten. Zellen werden zunächst aus dem Zielgewebe entnommen, in vitro genetisch modifiziert und in einem letzten Schritt wieder in das Zielgewebe eingebracht

Die Kaninchen wurden nach 1, 2, 6 und 10 Wochen getötet. Die Patellarsehne wurde entfernt und von dem anhängenden Fettgewebe befreit, längs geschnitten, mit X-gal für 24 h gefärbt und in Paraffin eingebettet. Histologische Schnitte von 5 µm Stärke wurden dann für die lichtmikroskopische Beurteilung mit Eosin gefärbt.

Ergebnisse

In-vitro-Studie

Adenovirus. Zellkulturen, die mit Adenovirus lacZ bei einer MOI („multiplicity of infection“, d. h. das zahlenmäßige Verhältnis von Vektor zu Zelle) von ungefähr 10 infiziert worden sind, wurden für weitere 3 Tage kultiviert. Nach der X-gal-Färbung fand sich eine Effektivität der Transduktion zwischen 90 und 100% (Abb. 2 a, 3 a). Zytotoxische Effekte oder ein Verlust der Expression fanden sich nicht, wenn Zellen für 7 Tage kultiviert wurden.

Adenoassoziiertes Virus (AAV neo^r GC). Fibroblastenkulturen, die mit AAV neo^r GC infiziert worden waren, wurden nach 3 Tagen in einem Verhältnis von 1 : 2 trypsinisiert und in G-418-haltiges Medium gewechselt. Zellen, die das neo^r-Gen exprimierten, bildeten G-418-resistente Kolonien. Fibroblasten des VKB und HKB sowie des medialen Seitenbandes bildeten eine vergleichbare Anzahl Kolonien. Meniskale Fibrochondroblasten bildeten deutlich weniger Kolonien. Insgesamt war die Rate der stabilen Transduktion mit AAV nicht größer als die, die nach einer Plasmid DNA Transfektion erwartet werden kann.

Retrovirus. Zellen, die mit MFG-lacZ infiziert worden waren, wurden für weitere 3 Tage kultiviert. Wie in Abb. 2 b dargestellt, reichte der prozentuale Anteil der lacZ(+)-Zellen von 10% für Zellen der Semitendinosussehne bis zu 60% für Zellen von Meniskus und medialem Seitenband sowohl 3 als auch 7 Tage nach der Infektion. Die Infektion mit einem Retrovirus, der das lacZ- und das neo^r-Gen enthält (BAG lacZ neo^r), führte dazu, daß über 90% der Zellen nach G-418 Selektion das lacZ-Gen exprimierten (Abb. 3 b).

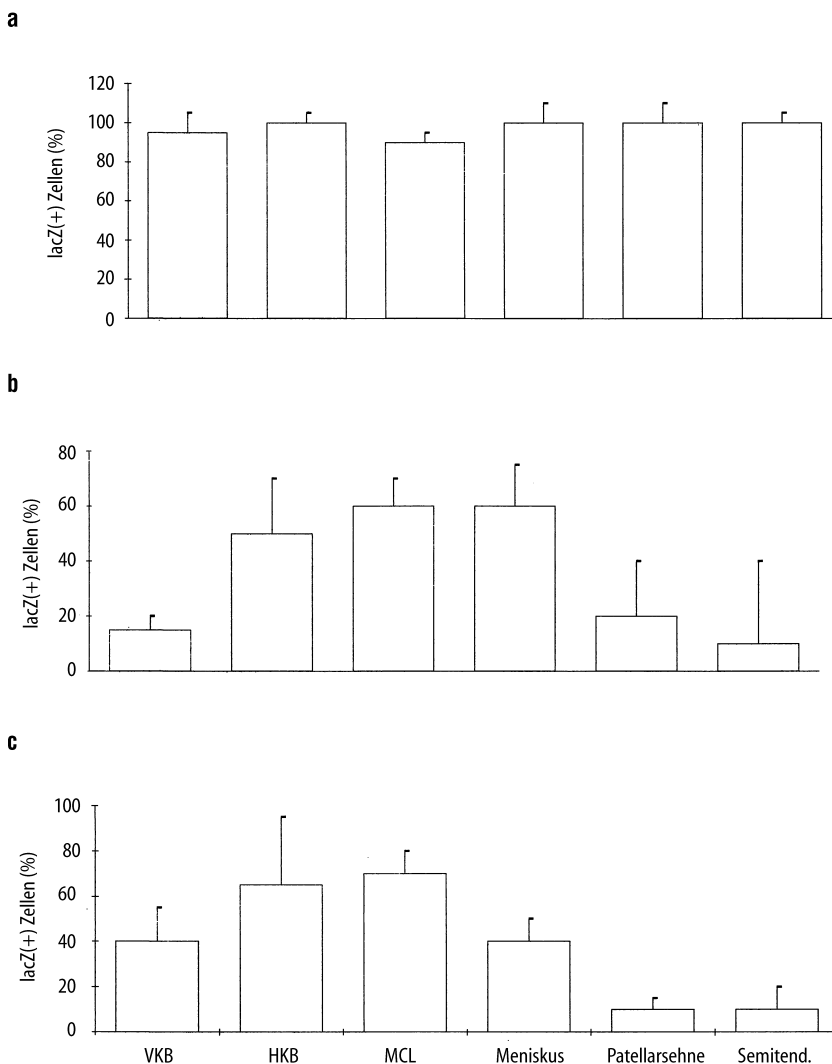


Abb. 2 a-c ◀ Infektion mit Adenovirus lacZ (a), MFG lacZ (b) und Herpes-Virus-lacZ (c); 3 Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit X-gal gefärbt (n = 2)

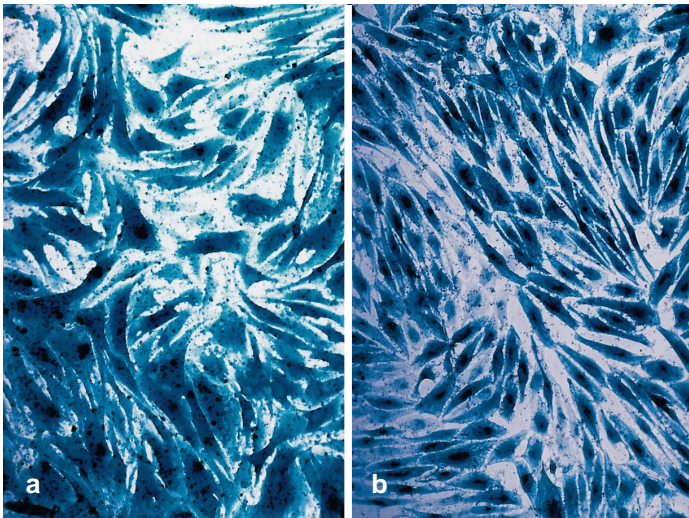


Abb. 3 a, b ◀ X-gal Färbung: Die Effektivität nach adenoviraler Transduktion liegt über 90% (a). Fibroblasten der Patellarsehne nach Infektion mit BAG lacZ neo^r und Selektion in G-418 mit anschließender X-gal-Färbung nach 2 Wochen (b)

Signifikante Unterschiede zwischen den Zelltypen in Bezug auf die Selektierbarkeit waren nicht vorhanden.

Drei Tage nach der Infektion mit MFG-IRAP variierte die Konzentration von IL-1ra zwischen 800 und 1800 ng/10⁶. Signifikante Unterschiede zwischen den

Zelltypen fanden sich nicht (Daten nicht gezeigt). Nicht transduzierte, native Zellen produzierten kein humanes IL-1ra.

Herpes lacZ. Wie in Abb. 2 c dargestellt konvertierte Herpes Virus bei einer MOI von 10 zwischen 10 und 70% der Zellen

in einen lacZ(+)-Phänotyp nach 3 Tagen in Kultur. Es zeigten sich jedoch verzögert zytotoxische Effekte, wenn Zellen für einen Zeitraum länger als 5 Tage kultiviert wurden. Nach 7 Tagen waren nur noch Zellfragmente vorhanden.

Liposome. Fibroblastenkulturen, die mit kationischen Liposomen (DC-Chol and DOPE) und einem lacZ-exprimierenden Vector (pIEP lacZ) transfiziert worden sind, zeigten eine Effektivität der Transfektion zwischen 1 und 15% (Daten nicht gezeigt). Die Transfektion von Kulturen mit einem für IL-1ra (pCMV IRAP or pMFG IRAP) kodierenden Plasmid und unterschiedlichen Konzentrationen von Liposom zu Plasmid führte zu inkonsistenten Resultaten, wobei die IL-1ra-Konzentration im konditionierten Medium zwischen 0 und 80 ng/ml in Abhängigkeit vom Experiment variierte.

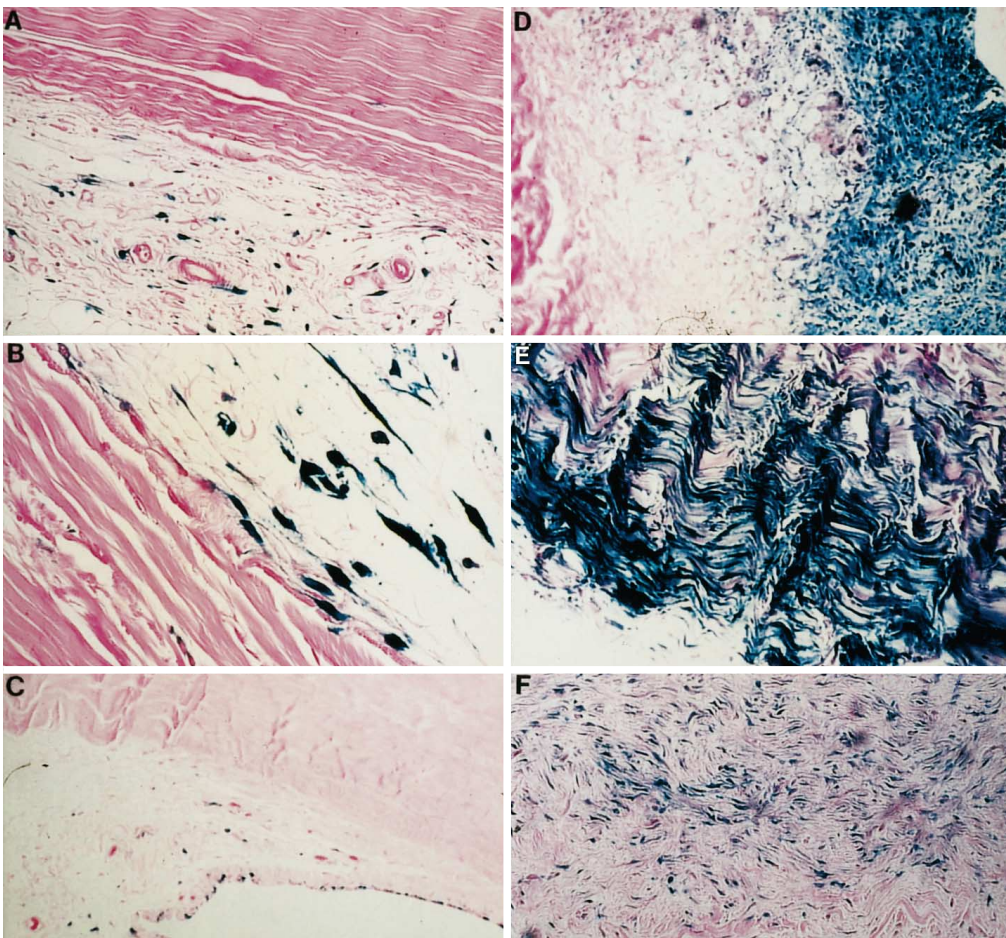


Abb. 4 A – F ◀ X-gal und Eosin-Färbung; transduzierte Zellen stellen sich blau dar. (A, B) Eine Woche nach der Injektion von Adenovirus lacZ in die Patellarsehne. Fibroblasten, die das Transgen β -Galaktosidase exprimieren, finden sich in der synovialen Schicht in der Peripherie der Gefäße; (C) 6 Wochen nach der Injektion von Adenovirus lacZ in die Patellarsehne finden sich lacZ(+)-Zellen in der synovialen Schicht, die Transgenexpression der Zellen ist jedoch rückläufig. Eine Woche nach allogener Transplantation von lacZ(+) und neo^r-selektierten Fibroblasten in die Patellarsehne. (D) Allogene Fibroblasten mit lacZ-Genexpression finden sich in hoher Anzahl in der synovialen Schicht. (E) Im Gegensatz zu dem in vivo Versuch finden sich Zellen auch in der Sehne. Die transduzierten Zellen in der Sehne passen sich dem mechanischen Streß der Umgebung an; lacZ(+)-Zellen richten sich parallel zu dem Crimp-Muster aus und nehmen eine fibroblastische Form an; (F) 6 Wochen nach der Transplantation hat die Zahl der transduzierten Zellen abgenommen, lacZ(+)-Zellen können jetzt entfernt von der Injektionsstelle gefunden werden

In-vivo-Studie

Makroskopische Evaluation. Zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere waren sämtliche Kniegelenke makroskopisch normal. Über einen medialen parapatellaren Zugang wurde das Kniegelenk eröffnet. Hierbei zeigte sich kein Kniegelenkserguß oder Synovitis; der artikuläre Knorpel, die Menisken und Ligamente erschienen unauffällig. Die Patellarsehne wurde entfernt und von dem angrenzenden Bindegewebe befreit.

Patellarsehnen der Gruppe I (Injektion von Adenovirus lacZ in der In-vivo-Technik) zeigten keine Gefäßinjektion als Zeichen einer möglichen inflammatorischen Reaktion 1, 2, 6 und 10 Wochen nach der Injektion. Sehnen der Gruppe II (BAG lacZ neo^r, Ex-vivo-Technik) waren 1 Woche nach allogener Zelltransplantation generell vergrößert. Die umgebenden Weichteilschichten und das retropatellare Fettgewebe waren an der Sehne adhären. Diese Veränderungen waren zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar.

Histologische Evaluation

In vivo Technik. Nachdem die Patellarsehne entfernt worden ist, wurde das Präparat für die X-gal und Eosin-Färbung weiter verarbeitet. Eine und 2 Wochen nach der Injektion von Adenovirus lacZ in die Sehne wurden lacZ(+)-Zellen in der synovialen Schicht nahe der Injektionsstelle beobachtet, hier vorwiegend in der Nähe von synovialen Gefäßen (Abb. 4). Nur wenige transduzierte Zellen fanden sich in der Sehne selbst. Diese Zellen verblieben in der Nähe der Injektionsstelle. Die zufällige Injektion von Adenovirus lacZ in die Insertionszone der Patellarsehne zeigte, daß diese Technik auch in der Lage ist, Knochenzellen zu transduzieren (Abb. 5); 6 Wochen nach der Injektion fanden sich Zellen in der synovialen Schicht; die Expression hat jedoch deutlich abgenommen (Abb. 4 c). Eine Hypervaskularität, zelluläre Infiltration oder andere Hinweise für inflammatorische Reaktionen wurden nicht beobachtet. Die kontrollinjizierte Seite war in der X-gal Färbung negativ. Nach 10 Wochen fanden sich keine lacZ(+)-Zellen.

Ex-vivo-Technik. Eine Woche nach der Injektion von lacZ(+)- und neo^r-selektierten allogenen Fibroblasten in die Pa-

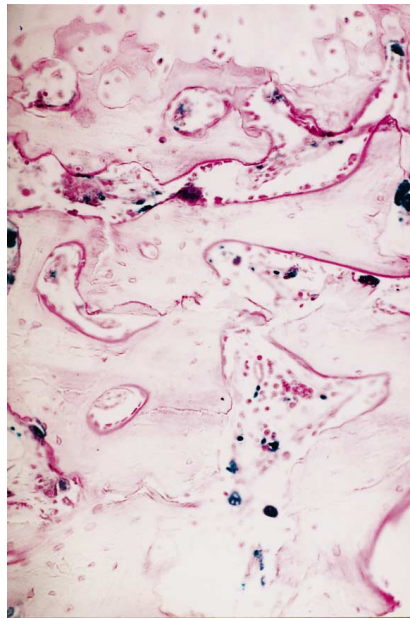


Abb. 5 ▲ X-gal und Eosin-Färbung, transduzierte Zellen stellen sich blau dar. Eine Woche nach der Injektion von Adenovirus lacZ in die Patellarsehne. Die zufällige Injektion in die Insertion der Patellarsehne transduzierte ortsständige Knochenzellen

tellarsehne fanden sich zahlreiche Zellen in der synovialen Schicht (Abb. 4 d) und in der gesamten Sehne. Formationen von allogenen Zellclustern fanden sich an der Injektionsstelle. Zellen, die in der Sehne das lacZ-Gen exprimierten, waren spindelförmig und parallel zum Crimp-Muster der kollagenen Fasern ausgerichtet (Abb. 4 e).

Obwohl eine quantitative Bestimmung der transduzierten Zellen mit einem lacZ(+)-positiven Phänotyp nicht möglich war, war die Anzahl der transduzierten Zellen signifikant höher als in der In-vivo-Technik. In mehreren histologischen Schnitten fanden sich transduzierte Zellen entfernt von der Injektionsstelle. Nach 2 Wochen zeigte sich bereits eine Reduktion der Expression, lacZ(+)-Zellen konnten jedoch noch immer in der synovialen Schicht und in der Sehne gefunden werden. Einige Gebiete zeigten desorganisiertes, fibröses Gewebe, umgeben von lacZ(+)-Zellen, das möglicherweise einer fibrotischen Reaktion entspricht. Die kontrollinjizierte Seite zeigte keine lacZ(+)-Zellen. Nach 6 Wochen hat die Anzahl der lacZ(+)-Zellen weiter abgenommen, transduzierte Zellen fanden sich jetzt vorwiegend in der Sehne (Abb. 4 f); 10 Wochen nach al-

logener Transplantation fanden sich keine transduzierten Zellen mehr.

Diskussion

Zahlreiche In-vitro- und In-vivo-Studien haben belegt, daß Wachstumsfaktoren den natürlichen Heilungsvorgang unterstützen. Diese Faktoren beschleunigen den Heilungsvorgang durch eine Steigerung der Zellteilung, Migration und Synthese von kollagenen und nicht-kollagenen Proteinen [4, 21, 29, 32, 36].

Die Anwendung dieser Zytokine in experimentellen Wundheilungsmodellen wirft die Frage nach einem zeitabhängigen Konzentrationsverlust an der Applikationsstelle auf. Die Bestimmung der Stabilität von Wachstumsfaktoren an der Verletzungsstelle zeigt einen raschen Verlust von aktiven Faktoren [z. B. 8]. Daher werden z. Zt. Verfahren entwickelt, die eine mehr kontinuierliche Applikation ermöglichen. Obwohl diese Systeme zeigen, daß eine prolongierte Applikation möglich ist, bleibt es unklar, ob diese Techniken klinisch erfolgversprechend sind.

Da die direkte Verabreichung von Wachstumsfaktoren entweder als freies Molekül oder inkorporiert in „Slow-release-Systeme“ keine anhaltende Konzentration für eine ausreichend lange Zeit erzielen kann, untersuchten wir eine neue Technik für die Verabreichung von Wachstumsfaktoren. Da sich der Gentransfer in Synoviozyten in der Vergangenheit bereits als ein gangbarer Weg herausgestellt hat, um ein Transgen in Gelenken zu exprimieren [2, 3], stellten wir die Hypothese auf, daß genetisch alterierte Zellen von Ligamenten und Menisken, prolongiert und streng lokal Zytokine produzieren können, die dann den Heilungsprozeß unterstützen.

In einer initialen Studie wurden verschiedene virale und nonvirale Vektoren daraufhin evaluiert, ob sie Markergene in vitro und in vivo in Zellen einbringen können. In diesen Experimenten zeigten wir, daß mit sämtlichen von uns untersuchten Zellen Gentransfer möglich ist. Hierbei zeigten sich zwischen den unterschiedlichen Zellen Differenzen. Darüber hinaus bestanden erhebliche Unterschiede in der Effektivität der Transduktion zwischen den viralen und nonviralen Vektoren.

Adenovirus und Herpes-simplex-Virus (HSV) waren effektiv bei allen von uns untersuchten Zelltypen, HSV war je-

doch zytotoxisch. Die Genexpression nach adenoviraler Transduktion war nach mehreren Passagen rückläufig. Der Gentransfer und die Expression nach retroviraler Infektion waren stabil. Die Infektion mit adenoassoziiertem Virus resultierte ebenfalls in einem stabilen Gentransfer. Resultate nach Lipofektion waren variabel mit einer generell niedrigen Genexpression.

Aufgrund dieser In-vitro-Studie war Adenovirus am besten für den In-vivo-Gentransfer und Retrovirus für den Ex-vivo-Gentransfer geeignet. Obwohl der in vivo Transfer technisch weniger aufwendig ist, hat diese Technik einen Nachteil. Um eine ausreichende Expression zu erzielen, muß eine genügende Dichte an Zielzellen vorhanden sein. Der Ex-vivo-Transfer ist komplizierter, bietet jedoch eine zusätzliche Sicherheit, da genetisch modifizierte Zellen in vitro allen notwendigen Tests unterzogen werden können und virale DNA nicht direkt in das Zielgewebe eingebracht wird. Zusätzlich können durch Verwendung eines selektierbaren Markergens wie neo^r gezielt solche Zellen transplantiert werden, die das Transgen bereits sicher exprimieren.

Bei Verwendung von Adenovirus lacZ in der In-vivo-Technik fanden sich lacZ(+)-Zellen vorwiegend in der synovialen Schicht in der Umgebung synovialer Gefäße. Nur wenige transduzierte Zellen waren in der Sehne selbst vorhanden. Die Expression des Transgens war während des sechswöchigen Untersuchungszeitraums rückläufig und nach 10 Wochen nicht mehr nachweisbar.

Obwohl die Genexpression auf die synoviale Schicht begrenzt war, vermuten wir, daß auch transduzierte Zellen in diesem Gebiet die übrige Sehne ausreichend mit Wachstumsfaktoren versorgen können, da die Ernährung von Ligamenten in einem hohen Maße von der synovialen Schicht und den synovialen Gefäßen ausgeht. Dies ist in einer Anzahl von Studien belegt worden. Skyhar et al. [34] wiesen nach, daß nach intraartikulärer Injektion von radioaktivem $Na_2^{35}SO_4$ in Kochsalzlösung dieser Marker im VKB nachgewiesen werden kann und belegten damit, daß die Versorgung des VKB von der Diffusion abhängt. Whiteside et al. [37] bestätigten diese Resultate. Mit der Wasserstoffauswaschmethode wies er nach, daß die Ernährung des HKB primär von einer intakten synovialen Schicht abhängt.

In der Ex-vivo-Technik transplantierten wir lacZ(+), neo^r -selektierte allogene Fibroblasten nach retroviraler Transduktion in die Patellarsehne, nachdem diese Zellen bereits 6 Wochen in Kultur waren. Lebensfähige Zellen, die das Transgen exprimierten, wurden in der synovialen Schicht und in der Sehne gefunden. Die Anzahl der transduzierten Zellen war wesentlich höher als in der In-vivo-Technik. Zellen in der Sehne nahmen eine spindelförmige Form an und richteten sich parallel zu dem Crimp-Muster aus. Diese Beobachtung wurde bei in vivo transduzierten Zellen nicht gemacht. Zusätzlich fanden sich Zellen, die sich in der Matrix integrierten, entfernt von der Injektionsstelle. Hieraus leiteten wir ab, daß in vitro transduzierte Zellen lebensfähig bleiben, sich in der Matrix ausbreiten und sich dem mechanischen Streß der Umgebung anpassen können; 2 Wochen nach der Transplantation fanden sich vereinzelt fibrotische Gebiete, bei denen es sich vermutlich um eine Reaktion auf die allogene Zelltransplantation handelt. Zu einem späteren Zeitpunkt waren diese Reaktionen nicht mehr vorhanden.

Mit einer In-vitro-Studie haben wir die Durchführbarkeit des Gentransfers in ligamentäre und meniskale Fibroblasten demonstriert. In einer anschließenden In-vivo-Studie zeigten wir, daß Gentransfer mit In-vivo- und Ex-vivo-Techniken zu einer In-situ-Genexpression von 6 Wochen führt. Ob sich diese ermutigenden Ergebnisse in einem realistischen Wundheilungsmodell bestätigen, muß in weiteren Experimenten bestätigt werden, da die zeitliche Genexpression durch Zellteilung und Nekrose begrenzt sein kann [1, 5].

Zum jetzigen Zeitpunkt können wir nur spekulieren, ob eine frühe Stimulation mit Wachstumsfaktoren über Gentransfertechniken einen modifizierten Reparaturprozeß initiieren kann und ob der Regenerationsvorgang in verletzten Ligamenten hierdurch beschleunigt werden kann. Weitere experimentelle Studien werden benötigt, um zu bestimmen, welcher Wachstumsfaktor oder Kombination von Faktoren erforderlich sind, um steuernd einzugreifen. Weiterhin muß das Überleben dieser Zellen und die Dauer der Transgenexpression in verletzten Ligamenten näher bestimmt werden.

Die z. Zt. vorliegenden Daten deuten jedoch auf vielversprechende Einsatzmöglichkeiten. Mit weiterer Verbesserung der viralen und nonviralen Vek-

toren und Ausräumung evtl. bestehender Sicherheitsbedenken kann der lokale Gentransfer eine praktikable und sichere Technik für eine Anzahl von chirurgischen Fragestellungen werden, die mit herkömmlichen Techniken z. Zt. nicht zufriedenstellend therapiert werden können.

Für Bandplastiken aller Gelenke betrachten wir den lokalen Gentransfer als einen vielversprechenden alternativen Therapieansatz, der die strukturellen Eigenschaften von Ligamenten deutlich verbessern kann. So kann durch geeignete Wachstumsfaktoren die kollagene Zusammensetzung von Ligamenten günstig beeinflusst werden. Auf diese Weise ließe sich die mechanische Stärke des Bandes steigern. Die nachhaltige Beeinträchtigung der Propriozeption ist eine weitere bekannte Folge nach rekonstruktiven Eingriffen. Die Verbesserung der Propriozeption durch frühzeitiges Einsprießen freier Nervenendigungen ist eine denkbare Anwendungsmöglichkeit. Prinzipiell ist ein Einsatz des Gentransfers überall dort denkbar, wo Wachstumsfaktoren einen entscheidenden Einfluß auf den Heilungsprozeß nehmen.

Neue Möglichkeiten eröffnen sich jedoch auch für Krankheitsbilder, bei denen Zytokine einen pathologischen Heilungsprozeß initiieren. Eine Antagonisierung dieser Zytokine durch Gentransfer in die Synovia [2] könnte z. B. neue Präventionsmöglichkeiten der Arthrofibrose eröffnen.

Wir hoffen, daß die Chirurgie sich den vektorvermittelten Gentransfer zu Nutzen machen und damit auf eine technisch einfache Weise die Qualität von Reparaturzonen und Transplantaten verbessern kann.

Wir danken den Kollegen, die die Vektoren für diese Studie zur Verfügung gestellt haben: Drs. J. C. Glorioso und W. Goins (HSV), L. Huang and X. Gao (Liposome), und Jion-Yon Dong (Adenovirus lacZ) und J. Barranger (AAV- $neoGC$).

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt durch das NIH (PO1 DK44935) und Orthogen GmbH. Helga Georgescu, Richard Kang, Ioana Nita, Keith Short, Alyce Emmert, Lorraine McKenzie und Warren Thompson wird für ihre Mitarbeit gedankt.

Literatur

1. Amiel D, Kleiner JB, Akeson WH (1986) **The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin.** *Am J Sports Med* 14: 449 – 462
2. Bandara G, Robbins PD, Georgescu HI et al. (1992) **Gene transfer to synoviocytes: prospects for gene treatment of arthritis.** *DNA Cell Biol* 11: 227 – 231
3. Bandara G, Mueller GM, Galea-Lauri J et al. (1993) **Intraarticular expression of biologically active interleukin-1 receptor antagonist protein by ex vivo gene transfer.** *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10764 – 10768
4. Bird JL, Tyler JA (1994) **Dexamethasone potentiates the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on collagen production in cultured human fibroblasts.** *J Endocrinol* 142: 571 – 579
5. Bosch U, Kasperczyk WJ (1992) **Healing of the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction – a process of ligamentization?** *Am J Sports Med* 20: 558 – 566
6. Brewer CB (1994) **Cytomegalovirus plasmid vectors for permanent lines of polarized epithelial cells.** *Meth Cell Biol* 43: 233 – 245
7. Bringham KL, Meyrick B, Christman B et al. (1989) **Expression of a prokaryotic gene in cultured lung endothelial cells after lipofection with a plasmid vector.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1: 95 – 100
8. Brown GL, Curtsinger LJ, White M et al. (1988) **Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- β .** *Ann Surg* 208: 788 – 794
9. Conti NA, Dahners LE (1993) **The effect of exogenous growth factors on the healing of ligaments.** *Trans Orthop Res Soc* 18: 60
10. Dandy DJ, Jackson RW (1975) **The diagnosis of problems after meniscectomy.** *J Bone Joint Surg [Br]* 57: 349 – 3352
11. Dollard SC, Broker TR, Chow CT (1993) **Regulation of the human papillomavirus type 11 E6 promoter by viral and host transcription factors in primary human keratinocytes.** *J Virology* 67: 1721 – 1726
12. Evans CH, Bandara G, Mueller G et al. (1992) **Synovial cell transplants for gene transfer to joints.** *Transplant Proc* 24: 2966
13. Evans CH, Bandara G, Robbins PD et al. (1993) **Gene therapy for ligament healing.** In: (Jackson) (ed) *The anterior cruciate ligament: current and future concepts.* Raven Press, New York, pp 419 – 422
14. Evans CH, Robbins PD (1994) **Gene therapy for arthritis.** In: Wolff JA (ed) *Gene therapeutics.* Birkhäuser, Boston, pp 320 – 343
15. Evans CH, Robbins PD (1995) **Current concepts review. Possible orthopaedic applications of gene therapy.** *J Bone Joint Surg [Am]* 77: 1103 – 1114
16. Felgner PL, Gadek TR, Holm M et al. (1987) **Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.** *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7413 – 7417
17. Ferretti A, Conteduca F, DeCarli A et al. (1991) **Osteoarthritis of the knee after ACL reconstruction.** *Int Orthop* 15: 367 – 371
18. Gao X, Huang L (1991) **A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 179: 280 – 285
19. Georgescu HI, Mendelow D, Evans CH (1988) **HIG-82 An established cell line from rabbit periarticular soft tissue, which retains the "activatable" phenotype.** *In Vitro* 24: 1015 – 1022
20. Glorioso JC, DeLuca NA, Goins WF et al. (1994) **Development of Herpes simplex virus for gene transfer to the central nervous system.** In: Wolff JA (ed) *Gene therapeutics.* Birkhäuser, Boston, pp 281 – 302
21. Grotendorst GR, Martin GR, Pencey D et al. (1985) **Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats.** *J Clin Invest* 76: 2323 – 2329
22. Huard J, Goins WF, Glorioso JC (1995) **Herpes simplex virus mediated gene transfer to muscle.** *Gene Ther* 2: 1 – 9
23. Hug P, Sleight RG (1991) **Liposomes for the transformation of eukaryotic cells.** *Biochim Biophys Acta* 1097: 1 – 17
24. Kasperczyk W, Bosch U, Oestern HJ et al. (1993) **Staging of patellar tendon autograft healing after posterior cruciate ligament reconstruction.** *Clin Orthop* 286: 271 – 282
25. Lee J, Green MH, Amiel D (1995) **Synergistic effects of growth factors on cell outgrowth from explants of rabbit anterior cruciate and medial collateral ligaments.** *J Orthop Res* 13: 435 – 441
26. Litzinger DC, Huang L (1993) **Phosphatidyl-ethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications.** *Biochim Biophys Acta* 1113: 201 – 227
27. Miller DG, Adam MA, Miller AD (1990) **Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection.** *Mol Cell Biol* 10: 4239 – 4242
28. Muller SR, Sullivan PD, Clegg DO et al. (1990) **Efficient transfection and expression of heterologous genes in PC 12 cells.** *DNA Cell Biol* 9: 221 – 229
29. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL et al. (1987) **Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β .** *J Exp Med* 165: 251 – 256
30. Price J, Turner D, Cepko C (1987) **Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer.** *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 156 – 160
31. Roessler BJ, Allen ED, Wilson JM et al. (1993) **Adenoviral-mediated gene transfer to rabbit synovium in vivo.** *J Clin Invest* 92: 1085 – 1092
32. Sah RL, Chen AC, Grodzinski AJ et al. (1994) **Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants.** *Arch Biochem Biophys* 308: 137 – 147
33. Schmidt CC, Georgescu HI, Kwok CK et al. (1995) **Effect of growth factors on the proliferation of fibroblasts from the medial collateral ligament and anterior cruciate ligament.** *J Orthop Res* 13: 184 – 190
34. Skyhar MJ, Danzig LA, Hargens AR et al. (1985) **Nutrition of the anterior cruciate ligament. Effects of continuous passive motion.** *Am J Sports Med* 13: 415 – 418
35. Staedel C, Remy JS, Hua Z et al. (1994) **High efficiency transfection of primary human keratinocytes with positively charged lipopolyamine DNA complexes.** *J Invest Dermatol* 102: 768 – 772
36. Thiebaud D, Guenther HL, Porret A et al. (1994) **Regulation of collagen type I and biglycan mRNA levels by hormones and growth factors in normal and immortalized osteoblastic cell lines.** *J Bone Min Res* 9: 1347 – 1354
37. Whiteside LA, Sweeney RE (1980) **Nutrient pathways of the cruciate ligaments. An experimental study using the hydrogen wash-out technique.** *J Bone Joint Surg [Am]* 62: 1176 – 1180
38. Yang Y, Berencsi K et al. (1994) **Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4407 – 4411