

Steuerbare Gentherapie an Knorpelzellen

Knorpelschäden sind trotz zahlreicher Therapieansätze immer noch schwer zu behandeln. In den letzten Jahren wurde durch intensive Forschung das Wissen über die Physiologie und Regeneration von Knorpelgewebe stark erweitert und zu neuen Ansätzen auf dem Gebiet des Tissue-Engineerings geführt. Auch in der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TUM (Direktor: Prof. Reiner Gradinger) beschäftigt man sich mit dem Thema Tissue-Engineering: In enger Kooperation bearbeiten die Abteilung für Sportorthopädie (Vorstand: Prof. Andreas B. Imhoff) und das Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TUM (Direktor: Prof. Bernd Gänsbacher) seit über zwei Jahren Projekte zu Tissue-Engineering und gentherapeutischen Methoden an Knorpel und Meniskus. Der Bund der Freunde der TU München unterstützt diese Projekte in Teilaspekten.

Tissue-Engineering bedeutet, im Labor aus Zellen und biologischen Gerüsten Ersatz für bestimmte Gewebe zu züchten, um damit krankhafte oder zerstörte Organe zu ersetzen. Dazu verwendet man unter anderem Wachstumsfaktoren - Substanzen, die an der Regulation der Zellphysiologie beteiligt sind und die Zellvermehrung, Zelldifferenzierung und Matrixsynthese etwa von Chondrozyten (Knorpelzellen) und ihren Vorläuferzellen stimulieren können. Die Anwendung von Wachstumsfaktoren zur Knorpeltherapie ist allerdings in zwei Punkten problematisch: zum einen, was die Produktion reiner, aktiver Wachstumsfaktoren betrifft, zum anderen hinsichtlich der biologischen Verfügbarkeit. Da Wachstumsfaktoren in vivo rasch enzymatisch abgebaut werden, ist eine einfache Applikation für eine dauerhafte Knorpelheilung nicht ausreichend. Um einen konstanten Wirkspiegel im Gewebe zu erreichen, müsste man entweder hohe Dosen oder mehrmalige Injektionen verabreichen, was wegen der Gefahr von Infektionen und unerwünschten immunologischen oder toxischen Reaktionen ungünstig ist. Deshalb wollen Wissenschaftler biologisch aktive Wachstumsfaktoren von manipulierten Zellen in situ produzieren lassen, also direkt im defekten Knorpel. Als elegante Methode bietet sich hier die Gentherapie an: Fremdgene werden in das Genom von Zielzellen eingeschleust und zusammen mit den eigenen Genen abgelesen, so dass sie später therapeutische Wirkung entfalten können. Ob die Fremdgene überhaupt in die Zellen gelangen und dort exprimieren, lässt sich mit Hilfe von »Marker- oder Reportergenen« nachweisen. Zellen, die diese Gene tragen, lassen sich nach Spezialbehandlung anfärben - im Falle des Reportergens β -Galactosidase (LacZ) beispielsweise blau.

Wegen des bislang ungelösten Problems der Steuerbarkeit (An-/Abschaltung) der Genexpression bleibt die Gentherapie am Menschen

für nicht lebensbedrohliche Erkrankungen jedoch vorerst unrealistisch. Die TUM-Wissenschaftler haben deshalb das in den letzten Jahren entwickelte »Tetrazyklin-induzierbare System« zur Steuerbarkeit der Genexpression in Chondrozyten in vitro und in vivo in Knorpel-Knochen-Defekten untersucht. Eine - zum Beispiel orale - Gabe des Antibiotikums Tetrazyklin schaltet das Ablesen der Gene an und startet damit die Proteinproduktion. Wird das Antibiotikum weggelassen, schaltet sich das Gen wieder ab. Somit hat man die Möglichkeit, die Genexpression über ein von außen zuzugebendes Mittel zu steuern. Da ein effizienter

TUM-Mediziner kooperieren mit chinesischen Kollegen

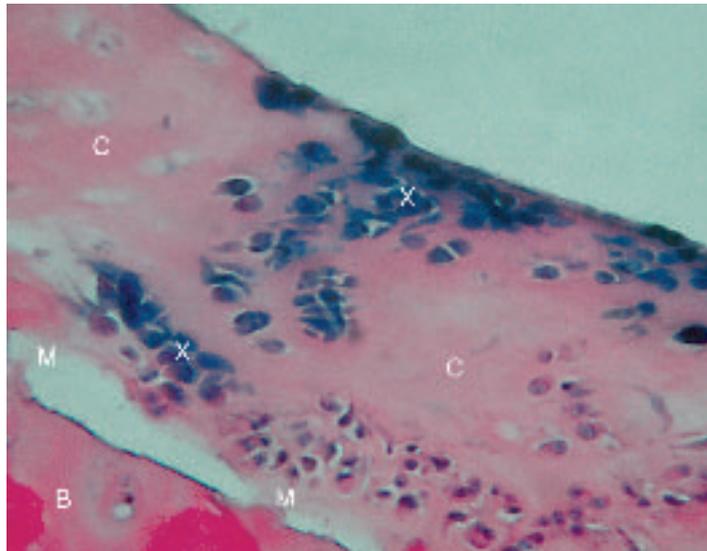


In allen humanmedizinischen Bereichen gemeinsamen Interesses zusammenarbeiten wollen in Zukunft das TUM-Klinikum rechts der Isar und das Xiehe-Klinikum der Tongji Medizinischen Fakultät der Huazhong Universität für Wissenschaft und Technologie in Wuhan, China. Im Februar 2003 unterzeichneten Prof. Jörg-Rüdiger Siewert (r.), Ärztlicher Direktor des TUM-Klinikums, und Prof. Wang Guobin (l.), Direktor des Xiehe-Klinikums, eine entsprechende Vereinbarung. Die partnerschaftliche Kooperation betrifft vor allem den Austausch von Wissenschaftlern, Ärzten, medizinisch-technischem und nicht-wissenschaftlichem Personal, den Austausch von Studierenden sowie von Literaturen und Informationen. Wer über die erforderlichen Fach- und Sprachkenntnisse verfügt, kann auch im jeweils anderen Land ein Doktorandenprogramm oder Vertiefungsstudien absolvieren.

Foto: Xiehe-Klinikum

Transfer von Fremdgenen in Chondrozyten immer noch problematisch ist, haben die Forscher außerdem nicht-virale und virale Gentransfer-Systeme unter Verwendung von Markergenen miteinander verglichen. In vitro wurden isolierte Chondrozyten von Kaninchen sowohl mit einem herkömmlich exprimierenden, als auch mit dem tetrazyklin-induzierbaren Markergen LacZ nicht-viral transduziert.

In einem zweiten Schritt infizierten die Forscher Chondrozyten mit einem neu konstruierten, LacZ-tragenden Retrovirus. Anschließend implantierten sie sowohl die nicht-viral als auch die viral transduzierten Zellen in Defekte in den Kniegelenken der Tiere. In der Gruppe der induzierbaren Markergene wurde eine Woche lang die Genexpression mit Tetrazyklin induziert, eine zweite Gruppe blieb als Kontrolle nicht induziert. Nach drei Wochen wurden die Kniegelenke entnommen und histologisch untersucht. In vitro zeigte sich der nicht-virale Gentransfer in etwa 10 Prozent der Zellen wirksam, während der retrovirale Transfer über 95 Prozent der infizierten Chondrozyten und eine Expressionsdauer von rund 10 Wochen erreichte. In vivo, also nach Implantation der Konstrukte in die Kniegelenke, zeigte sich bei den Tetrazyklin-behandelten Tieren eine positive Genexpression in rund 5 Prozent der Zellen, während bei den nicht-induzierten Kontrollen nur eine Hintergrund-Färbung nachweisbar war. In den retroviral infizierten Chondrozyten ließen sich auch unter In-vivo-Bedingungen deutlich mehr Zellen positiv



Knorpelregenerat in einem künstlichen Knorpel-Knochen-Defekt am Kaninchen. Innerhalb des neu gebildeten Gewebes zeigen sich blau gefärbte Zellen, die zuvor retroviral mit dem Markergen LacZ transduziert worden waren. B: Knochen, C: Knorpelmatrix, X: positive β -Galactosidase gefärbte Chondrozyten, M: Grenze zwischen Knorpel und Knochen.

Fotos: Peter Ueblacker

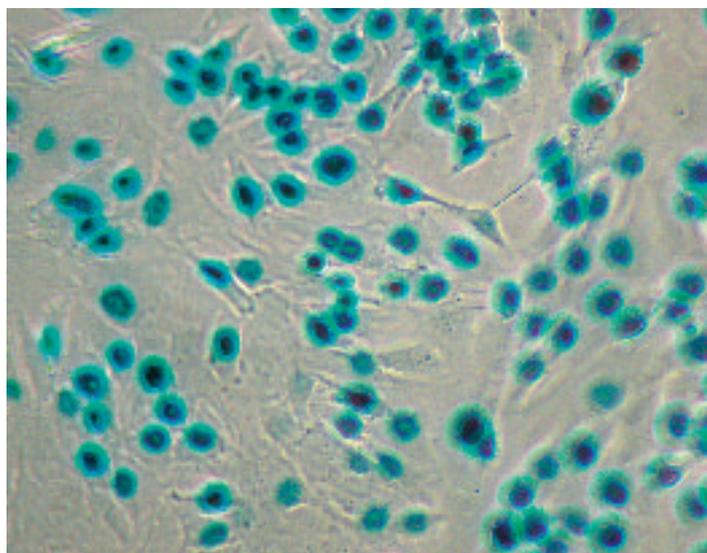
anfärben. In allen Gruppen heilten die implantierten Zellen gut in das umgebende Gewebe ein.

Diese Resultate belegen, dass das Tetrazyklin-induzierbare System eine externe Steuerung der Genexpression erlaubt. Somit konnten die TUM-Wissenschaft-

ler erstmals in der Orthopädie anhand von Markergenen den Ansatz einer steuerbaren Gentherapie an Chondrozyten in vitro und in vivo demonstrieren. Ferner zeigten sie, dass sich Retroviren sehr gut dazu eignen, Fremdgene, die unter In-vitro- und In-vivo-Bedingungen exprimieren sollen, in Chondro-

zyten einzuschleusen. Nicht-virale Systeme sind weniger effizient, dafür bezüglich der Gefahr einer möglichen bösartigen Veränderung gegenüber den viralen Vektoren für die Anwendung beim Menschen weniger risikoreich. In weiteren Experimenten muss untersucht werden, ob Wachstumsfaktoren, die von genmanipulierten Zellen in Knorpel-Knochen-Defekten gebildet werden, die Heilung verbessern können. Hier ist natürlich die An- und Wiederabschaltung der Genexpression und damit der Bildung der Wachstumsfaktoren von größtem Interesse. Wegen der noch bestehenden Probleme ist aber nicht abzusehen, wann gentherapeutische Methoden beim Menschen für orthopädische Erkrankungen einsetzbar sind.

Peter Ueblacker,
Vladimir Martinek



Retroviraler Gentransfer des Markergens LacZ in Chondrozyten. Nach Anfärbung findet sich in den Kernen von über 95 Prozent der transduzierten Zellen eine positive β -Galactosidase Färbung (blaue Zellen).