

H. Madry

Labor für Experimentelle Orthopädie, Orthopädische Universitäts- und Poliklinik,  
Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg

# Gentransfer in der Kreuzbandchirurgie

## Naturwissenschaftliche Grundlagen und klinische Anwendungsmöglichkeiten

### Zusammenfassung

Die Behandlung des gerissenen vorderen Kreuzbandes (VKB) ist eine wichtige Aufgabe der orthopädischen Chirurgie. Exogenes genetisches Material kann effizient in Zellen des muskuloskeletalen Systems eingeschleust werden. Wesentliche Ziele einer Anwendung des Gentransfers in der Kreuzbandchirurgie sind die Modulation des Remodelling und Verbesserung der ossären Integration von Weichteiltransplantaten. Eine entscheidende Voraussetzung dafür ist die Erreichbarkeit einer hinreichenden Anzahl von Zielzellen und die Expression des Transgens am Wirkort über einen therapeutisch ausreichenden Zeitraum. In den letzten beiden Jahrzehnten wurden hier signifikante Fortschritte gemacht. Gentransferbasierte Strategien müssen jedoch den Beweis noch erbringen, dass sie funktionelle Verbesserungen im Transplantat bewirken.

### Schlüsselwörter

Gentransfer · Vorderes Kreuzband · Transplantation

Die Behandlung des gerissenen vorderen Kreuzbandes (VKB) ist eine wichtige Aufgabe der orthopädischen Chirurgie. Unbehandelte Kreuzbandrupturen können zur Degeneration des hyalinen Gelenkknorpels [123] und zu Meniskus-schäden führen [95]. Die beiden derzeit meistverwendeten Transplantate zur Rekonstruktion des VKB sind das autologe mittlere Patellarsehnenmittel mit anhängenden Knochenblöcken und die autologen Hamstringsehnen [125, 127, 152]. Die in diesen Ersatzgeweben stattfindenden langandauernden zellulären Umbauvorgänge führen jedoch nicht zur Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur und Funktion des VKB [126]. Aktuell ungelöste Probleme sind sich verschlechternde biomechanische Parameter in der Zeit des Transplantremodelling sowie die initial geringe Festigkeit des Gewebes, welches Knochentunnel und Transplantat verbindet [1]. Eine Beschleunigung dieser Prozesse hätte eine Verkürzung des Heilungsverlaufs und damit eine frühere Rückkehr des Patienten zu seinem präoperativen Aktivitätsniveau zur Folge. Daher besteht ein dringender Bedarf an alternativen Ansätzen zur Verbesserung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Transplantats.

Wachstumsfaktoren sind chemische Boten, die wichtige Funktionen von Zellen des muskuloskeletalen Systems regulieren. So stimuliert der Epidermiswachstumsfaktor (EGF) die Chemotaxis von Fibroblasten des humanen VKB [54]. Der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) spielt eine Rolle in der Heilung von Sehnenläsionen [103], während das knochenmorphogenetische

Protein 2 (BMP-2), [67, 149] bzw. der insulinartige Wachstumsfaktor I (IGF-I), [83, 144] die Proliferation und Synthese extrazellulärer Matrix von Fibroblasten, Osteoblasten oder Chondrozyten reguliert. Damit stellen Wachstumsfaktoren wichtige Werkzeuge zur Verbesserung der Transplantateigenschaften dar. Das Potential von BMP-2 zur verbesserten knöchernen Einheilung eines Sehnen-transplantats in einen Knochentunnel wurde kürzlich von Scott Rodeo et al. [120] demonstriert. Jedoch begrenzt die kurze intraartikuläre Halbwertszeit dieser Polypeptide deren Anwendbarkeit [122, 133].

Die Möglichkeit des Einschleusens von exogenem genetischen Material in somatische Zellen hat die Anwendbarkeit dieser Botenstoffe deutlich verbessert. Durch diesen direkten Gentransfer bzw. die Transplantation von genetisch modifizierten Zellen, welche in der Lage sind, Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren überzuexprimieren, können therapeutisch wirksame Konzentrationen erreicht werden.

Gentransfer hat im Vergleich mit der Applikation von rekombinanten Proteinen den Vorteil einer potentiell längeren Bioverfügbarkeit. Weiterhin erreicht man physiologische Konzentrationen unter Umgehung von Fremdkörperreaktionen [14], da fremdartige Trägersubstanzen entfallen. Das Gentrans-

© Springer-Verlag 2002

Dr. Henning Madry

Labor für Experimentelle Orthopädie,  
Orthopädische Universitäts- und Poliklinik,  
Universitätskliniken des Saarlandes,  
66421 Homburg, E-Mail: hmad@hotmail.com

H. Madry

### Gene transfer for anterior cruciate ligament surgery. Basic science and clinical applications

#### Abstract

Current challenges in anterior cruciate ligament surgery include graft remodeling and tendon-to-bone healing. The development over the past few decades of methods for delivering genes to musculoskeletal tissues has stimulated interest in its application for orthopedic problems, including anterior cruciate ligament surgery. Despite substantial progress, a number of technical issues need to be addressed before gene transfer might be considered as an approach to improve the structural and functional properties of anterior cruciate ligament grafts. The aim of this review is to illustrate the principles of somatic gene transfer and to apply them to the cells that constitute the anterior cruciate ligament. Special characteristics that dictate the experimental strategies will be outlined.

#### Keywords

Gene transfer · Anterior cruciate ligament · Transplantation

ferinteresse beschränkte sich zunächst auf Fibroblasten [60, 90, 110]. Neuere Forschungen haben ergeben, dass fremde Gene auch in Synoviozyten [7, 92, 106], Chondrozyten [9, 61, 82] und anderen Zellen des muskuloskeletalen Systems [30, 89] exprimiert werden können. Tatsächlich ist ein Gentransfer in Band- und Sehnenstrukturen auch in vivo erzielbar [30, 47, 78, 79, 101, 102]. Dieser entscheidende Durchbruch hat das Interesse an der Anwendbarkeit dieser Methode zur Verbesserung von Transplantateigenschaften eines Kreuzbandersatzes geweckt [47].

Daher ist das Ziel dieses Artikels, Möglichkeiten des Gentransfers zur Verbesserung der biologischen Einheilung des Transplantats und des Transplantatremodelling aufzuzeigen. Wir werden in dieser Arbeit das Prinzip des somatischen Gentransfers diskutieren und die derzeit verfügbaren Vektorsysteme vorstellen. Anschließend werden die verfügbaren Methoden auf ihre Anwendbarkeit für Zellen des VKB evaluiert. Dabei wird auf spezielle Merkmale des VKB eingegangen, welche die experimentellen Strategien vorgeben.

### Prinzipien des Gentransfers

Unter Gentransfer versteht man das Einschleusen von fremden Genen oder Gensequenzen in somatische Zellen, während Getherapie die Behandlung von Krankheiten durch Gentransfer ist [93]. Als Voraussetzung dafür muss das gewünschte Gen isoliert, in eine cDNS umgeschrieben und in einen Expressionsvektor kloniert werden. Vektoren sind Nukleinsäuremoleküle, die meist von Plasmiden oder Viren abgeleitet sind. Ein typischer eukaryontischer Expressionsvektor enthält eine Promotor-Enhancerregion [124], die eigentlich interessierende Gensequenz und Terminationssignale. Zusätzlich können in den Vektor regulatorische Elemente eingebaut werden, wodurch das transferierte Gen nach Applikation eines Induktors an- und abgeschaltet werden kann [25]. Der Gentransfer mit nichtviralen Vektoren wird als Transfektion bezeichnet, Gentransfer mit viralen Vektoren wird Transduktion genannt.

Die einzelnen Schritte während des Gentransfers sind nicht vollständig aufgeklärt [35, 105, 132], (Abb. 1). Die Interaktion des Vektors mit der Zielzelle fin-

det entweder durch unspezifische Adsorption an die Lipiddoppelschicht der Zellmembran statt oder durch das Andocken an spezifische Rezeptoren [27]. Der Vorgang der Membranpenetration ist sehr schnell: für adenoassoziierte Viren dauert er 1 s [132]. Nachdem die DNS die Zellmembran durchquert hat, wird sie in Endosomen verkapselt. Das Destabilisieren der Endosomenmembran durch Viruspartikel [28] oder durch Helferlipide [38] verringert den anschließenden Abbau der DNS in Endolysosomen [29, 158]. Die so ins Zytoplasma freigesetzte DNS gelangt über einen unbekanntenen Mechanismus in einem zunächst ungerichteten, dann zielgerichteten Weg durch die Kernporen in den Zellkern [132].

Das auch als Transgen bezeichnete transferierte genetische Material wird nun entweder in das Wirtsgenom integriert oder verbleibt extrachromosomal im Zellkern als Episom. In diesem Fall ist die Genexpression nur vorübergehend bzw. transient. Die Vektorintegration ist ein mutagener Akt, welcher theoretisch zu einem Zerreißen und transkriptioneller Aktivierung von Onkogenen führen kann. Mit der Weiterentwicklung viraler Gentransfervektoren, die ein größeres Spektrum von Zellen transduzieren, muss dieses Risiko für menschliche Getherapiestudien neu bewertet werden [66].

Keine der bisher durchgeführten Studien hat jedoch Hinweise für eine Integration in Zellen der Keimbahn erbracht [97]. Das Transgen wird anschließend in mRNA transkribiert und in ein Protein translatiert. Dieses rekombinante Genprodukt verbleibt entweder in der Zelle oder entfaltet seine Wirkung nach der Sekretion. Ein Gentransfer ist nur dann erfolgreich, wenn eine biologisch aktive Menge an Protein produziert wird. Dies kann durch die Transfektion vieler Zielzellen oder durch eine große Menge an rekombinantem Protein pro Zelle erreicht werden.

Zum experimentellen Nachweis eines Gentransfers werden Gene verwendet, deren Produkte fluoreszieren (wie z. B. das rot fluoreszierende Protein RFP der Seeanemone *Discosoma sp.*) oder durch einfache biochemische (wie das Luziferasegen *luc* des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*) oder histochemische Reaktionen (wie das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen *lacZ* von *Escherichia coli*) detek-

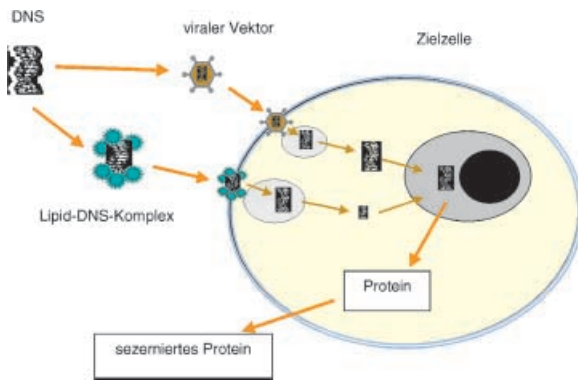


Abb. 1 ▲ Welche Schritte finden während eines Gentransfers statt? Zunächst wird das Transfervehikel entweder an die Lipiddoppelschicht der Zellmembran adsorbiert oder dockt an Membranrezeptoren an. Nachdem die DNS die Zellmembran durchquert hat, wird sie in Endosomen verpackelt. Nach Freisetzung ins Zytoplasma gelangt die DNA über einen unbekannten Mechanismus durch die Kerporen in den Zellkern. Dort wird das transferierte genetische Material entweder in das Wirtsgenom integriert oder verbleibt extrachromosomal als Episom. Anschließend wird die Information in RNS umgeschrieben, welche dann im Zellplasma als Vorlage zur Synthese des rekombinanten Proteins dient. Dieses Protein kann entweder in der Zelle verbleiben oder von der Zelle sezerniert werden und dadurch lokale und systemische Effekte bewirken

tierbar sind. Die Gentransfereffizienz wird als Prozentsatz der Zellen ausgedrückt, die das Transgen exprimieren. Sie ist vom Zelltyp und vom Transfersystem abhängig und kann durch Optimierung der Transfektionsbedingungen um ein Vielfaches gesteigert werden [15, 82].

Der Gentransfer in eine hinreichende Anzahl von Zielzellen ist die notwendige Voraussetzung und der erste kritische Schritt für alle potentiellen Therapien. Ein idealer Gentransfervektor sollte untoxisch und einfach anwendbar sein, eine genau definierte Zielzellpopulation transduzieren können und zu therapeutischen Wirkspiegeln der Genprodukte über einen vorgegebenen Zeitraum am Wirkort führen. Kein einziger derzeit verfügbarer Vektor besitzt diese Eigenschaften. Allerdings sind erfolgreiche Gentransferstrategien schon in naher Zukunft denkbar. Das gesamte Potential einer Gentherapie ist jedoch nur dann auszuschöpfen, wenn die derzeit verfügbaren Vektoren weiter perfektioniert oder neue Vektoren entwickelt werden [150].

## Techniken des Gentransfers

Die heterogene Gruppe der Gentransfermethoden setzt sich aus verschiedenen physikalischen, chemischen und viralen Transfersystemen zusammen. Eine bedeutende Rolle kommt dabei den viralen Vektoren zu. Während in der vergan-

genen Dekade rekombinante retrovirale und adenovirale Systeme aufgrund ihrer sehr hohen Transfereffizienz im Vordergrund des klinischen Genterapieinteresses standen, verschiebt sich diese Balance zunehmend zugunsten anderer Vektorsysteme, wie z. B. den rekombinanten adenoassoziierten viralen Vektoren (AAV).

Prominente Vertreter der nichtviralen Methoden sind Liposomen und nichtliposomale Lipidkompositionen, welche z. B. als kationische Liposomen die DNA adsorbieren oder sie als „konventionelle“ Liposomen in ihrem Inneren einschließen. Andere Methoden sind die Calciumphosphat-, die DEAE-Dextrantransfektion sowie die Transferrinfektion. In Tabelle 1 sind die Vor- und Nachteile der jeweiligen Gentransfersysteme dargestellt.

## Physikalische Methoden

Physikalische Methoden sind u. a. die Mikroinjektion, die Ultraschalltransfektion [68], der Partikelbeschuss [34, 145] und die Elektroporation [62, 104]. Da bei der Mikroinjektion jeweils nur eine Zelle pro Injektion erreicht wird, ist ihre klinische Anwendbarkeit begrenzt. Der Transfer genetischen Materials durch Elektroporation oder Ultraschall basiert auf einer zeitweiligen Permeabilität der Zellmembran, die durch den jeweiligen physikalischen Impuls hervorgerufen

wird. Auch in vivo können diese Techniken angewendet werden [34, 62, 145].

## Chemische Methoden

Bei den chemischen Methoden des Gentransfers wird die zu transferierende DNS mit verschiedenartigen Makromolekülen komplexiert. Einige dieser Methoden sind seit Anfang der 60er Jahre bekannt. So wird die DNS bei der Calciumphosphattransfektion [33, 140] in einem feinstoligen Niederschlag aus Calciumphosphat ausgefällt, den die Zellen anschließend phagozytieren [50]. Andere Methoden beinhalten die Komplexbildung der negativ geladenen DNS mit hochmolekularem, positiv geladenem DEAE-Dextran [87, 146] oder mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin [10].

Liposomen und andere Transfersysteme auf Lipidbasis sind jedoch die bei weitem wichtigste Vertreter dieser heterogene Gruppe. Diese Strukturen aus Lipiddoppelschichten können durch eine Vielzahl von Methoden hergestellt werden, wie z. B. durch Rehydratation [8] bzw. durch Ultraschallbehandlung eines getrockneten Lipidfilms [155], oder durch Verdampfen einer reversen Lipidphase [139]. Das in natürlichen Zellmembranen vorkommende Phospholipid Phosphatidylcholin und Cholesterol sind die Grundkomponenten vieler Liposomen. Während das Phosphatidylcholin die Lipiddoppelschicht bildet, ist das anisotrop in die Membran eingelagerte Cholesterol für deren Fluidität zuständig [64].

Liposomen haben aufgrund ihrer Zusammensetzung den Vorteil, dass sie nur sehr selten eine Immunantwort hervorrufen [42]. Man unterscheidet anionische und kationische Liposomen. An die sphärischen anionischen Liposomen können Liganden (wie z. B. Antikörper) angekoppelt werden. Sie erlauben ein Targeting einer Zielzelle. Derzeit stehen jedoch die kationischen Liposomen und andere Lipidmixturen aufgrund ihrer weitaus höheren Gentransfereffizienz im Vordergrund des Interesses.

## Kationische Liposomen

Kationische Liposomen bestehen aus einem amphiphilen kationischen Lipid und einem neutralen Phospholipid (oftmals Diolethylphosphatidylethanolamin, DOPE), dem Helferlipid [40, 41].

Tabelle 1

**Überblick über die gegenwärtig hauptsächlich verwendeten Gentransfersysteme**

	Nichtvirale Systeme	Virale Systeme		
	Liposomen	Retroviren	Adenoviren	AAV
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relativ hohe Effizienz</li> <li>• Niedrige Toxizität</li> <li>• Transfektion nicht zellzyklusabhängig</li> <li>• Nicht immunogen, wiederholt anwendbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relativ hohe Effizienz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sehr hohe Effizienz</li> <li>• Transduktion nicht zellzyklusabhängig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sehr hohe Effizienz</li> <li>• Keine Induktion einer Immunantwort</li> <li>• Transduktion nicht zellzyklusabhängig</li> </ul>
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effizienz ist zellspezifisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transduktion zellzyklusabhängig</li> <li>• Replikationsrisiko</li> <li>• Unspezifische Integration in das Genom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion einer Immunantwort, daher nur einmalig anwendbar</li> <li>• Replikationsrisiko</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Helfer-Virus wird zur Herstellung benötigt</li> </ul>
Integration in das Genom	Nein	Ja	Nein	Wirtsabhängig

Die in wäßriger Lösung als hexagonale Phasen [159] vorliegenden kationischen Liposomen bilden nach Hinzugabe von Plasmid-DNS spontan Liposom-DNS-Komplexe. Bekannte kationische Liposomen sind das monokationische Cholesterolderivat DC-Chol [45] oder polykationische Lipide wie DMRIE [129], DOTMA (Bestandteil von Lipofectin®), [39] bzw. DOSPA (Bestandteil von LipofectAmine®) [41]. Diese Liposomen werden in klinischen Gentransferstudien untersucht [19, 98, 99, 135].

**Fusogene Liposomen**

Fusogene Liposomen (auch Virosomen genannt) sind Chimären aus inaktivierten Viruspartikeln und liposomalen Komponenten. Damit nehmen sie eine Sonderstellung unter den Liposomen ein. Die von Yasufumi Kaneda beschriebenen Sendai-Liposomen werden durch Inkubation von Liposomen mit inaktivierten Partikeln des Sendai-Virus synthetisiert [65].

**Nichtliposomale Lipidmixturen**

Verschiedene nichtliposomale Lipidmixturen, deren Zusammensetzungen urheberrechtlich geschützt sind, ermöglichen einen sehr effizienten Gentransfer. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist FuGene6 (Roche Molecular Bio-

chemicals). Für Zellen des muskuloskeletalen Systems sind hohe Gentransfereffizienzen nach sorgfältiger Optimierung der Transferbedingungen beschrieben worden [82].

**Virale Methoden**

Virale Gentransfersysteme bedienen sich der natürlichen Eigenschaft von Viren, ihre eigene Nukleinsäuren in Zellen einzuschleusen. Der virale Lebenszyklus besteht aus den Phasen der Infektion und der Replikation. Ihr Genom setzt sich aus viralen Genen und *cis*-agierenden, genregulierenden Sequenzen zusammen. Um einen viralen Vektor herzustellen, müssen die kodierenden Gene von den *cis*-agierenden Sequenzen separiert werden. Diese Trennung ist eine wichtige Voraussetzung für die Sicherheit dieser Vektoren.

**Retrovirale Vektoren**

Retrovirale Vektoren sind RNS-Viren. Ihr Genom wird nach der Infektion der Zelle als Provirus an einer zufälligen Stelle in das Wirtsgenom integriert und dort exprimiert. Da die stabil eingebaute virale DNS zusammen mit dem Wirtszellgenom repliziert wird, kann eine langandauernde Expression erzielt werden. Für Gentransferexperimente werden replikationsdefekte Viren verwendet, die sich nicht vermehren können [93].

Die meisten für Genthapiezwecke entwickelten rekombinanten Retroviren basieren auf dem Moloney-Mäuse-Leukämievirus (moloney murine leukaemia virus, MMLV) [116]. Derartige Vektoren sind in der Lage, sich teilende Zellen mit einer hohen Effizienz und Persistenz zu transduzieren. Ein potentieller Nachteil der rekombinanten Retroviren sind die mit der Integration verbundenen Sicherheitsrisiken [2]. Ein weiteres Problem dieser Vektoren ist die Tatsache, dass nur in Zellteilung begriffene Zellen transduziert werden können. Um ruhende Zielzellen eines Organs zu transduzieren, müssen diese zunächst isoliert, in Zellkultur zur Teilung ange-regt, dann *in vitro* transduziert, selektioniert und schließlich wieder dem Organismus reappliziert werden. Dieser *Ex vivo*-Ansatz wurde bereits erfolgreich in einer Vielzahl von Genthapiestudien am Menschen angewendet [13, 44, 53].

**Adenovirale Vektoren**

Adenoviren sind hüllenlose Viren, deren Genom aus einer linearen dsDNS besteht. Sie erzeugen beim Menschen harmlose Infektionen des Respirationstraktes. Die virale Replikation findet ohne eine Integration in das Zielzellgenom statt, dadurch ist die Transgenexpression nur transient. Zum Gentransfers werden rekombinante, replikationsdefekte Viren verwendet [70].

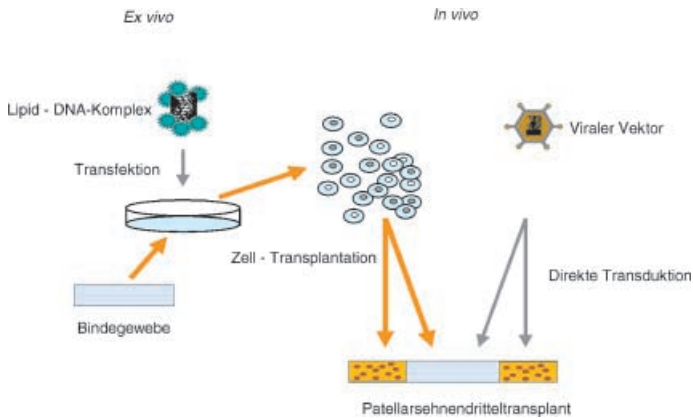


Abb. 2 ▲ Es gibt 2 Strategien, um das klonierte Gen von Interesse an den Wirkort zu transportieren. Bei der In-vivo-Strategie (rechts) findet der Gentransfer direkt in die anatomische Struktur (z. B. ein Patellarsehndritteltransplantat) statt. Bei der Ex-vivo-Strategie (links) werden zuvor isolierte Zielzellen in Zellkultur gebracht und anschließend genetisch modifiziert. Oft werden die modifizierten Zellen anschließend selektiert, sodass dieser Vorgang einige Wochen dauern kann. Anschließend werden die Zellen an den eigentlichen Wirkort transplantiert. Dieser Ex-vivo-Ansatz ist daher komplizierter und invasiver als der In-vivo-Ansatz. In nebenstehender Abbildung ist die Ex-vivo-Strategie für ein liposomales Transfersystem, die In-vivo-Strategie für ein virales Transfersystem dargestellt

Neben einer sehr hohen Transfereffizienz besitzen adenovirale Vektoren den Vorteil, dass sie auch nichtreplizierende Zellen infizieren können. Da das adenovirale Genom als ein Episom repliziert wird, ist die Genexpression zeitlich begrenzt und fällt nach einigen Wochen rapide ab. Der hauptsächlichste Nachteil dieser Vektoren liegt in seinen Sicherheitsrisiken. Nach viraler Erstinfektion folgt eine Immunantwort des Organismus mit dem Ziel, alle virustragenden Zellen zu vernichten [11, 148]. Bereits eine erneute Vektorapplikation ruft daher aufgrund des T-Zell-Gedächtnisses eine fulminante Immunreaktion gegen Eiweiße auf der Oberfläche der Adenoviren hervor. Die große klinische Bedeutung dieses Aspektes verdeutlicht der Tod des 18-jährigen Jesse Gelsinger im Rahmen einer adenoviralen Gentransferstudie [84]. Seitdem werden in Deutschland keine Adenoviren mehr direkt in den Blutkreislauf von Patienten gegeben. Derzeit wird versucht, die immunogenen Eigenschaften dieser viralen Kapsidproteine zu modifizieren.

### Adenoassoziierte virale Vektoren

Das apathogene AAV aus der Familie der Parvoviridae vereint wesentliche Vorteile der Retroviren und der Adenoviren und stellt ein vielversprechendes Vehikel dar [91, 128]. AAV ist ein einzelsträngiges DNS-Parvovirus, welches sich während seiner Replikation in das

Wirtsgenom integriert, z. B. im Chromosom 19q des menschlichen Genoms. Es wurde bis jetzt mit keiner menschlichen Krankheit in Verbindung gebracht.

Das AAV ist in der Lage, sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen mit einer sehr hohen Transduktionseffizienz zu infizieren. Rekombinante Vektoren für Gentransferexperimente stammen von dem humanen AAV Typ 2 (AAV-2) ab [32] und besitzen keine eigenständige Infektiosität. Obwohl das AAV noch nicht in dem Maße wie Retroviren oder Adenoviren untersucht wurde, sind die derzeit bekannten Sicherheitsrisiken weitaus niedriger als bei anderen viralen Vektoren.

### Strategien zum Gentransfer

Zwei Probleme der Kreuzbandchirurgie sind die Dauer des Transplantatremodelling und des Einwachsens des Transplantats in den Knochentunnel, welche zu einer initial niedrigen Festigkeit des Transplantats und seiner Verankerung führen [138]. Die Verkürzung dieser Prozesse durch eine Beschleunigung des Remodelling oder der ossären Integration würde für den Patienten eine Verkürzung des Heilungsverlaufs bedeuten. Die 2 wesentlichen Ziele eines Gentransfers sind daher:

- die Modulation des Remodelling und
- die Verbesserung der ossären Integration von Weichteiltransplantaten.

Die erste Aufgabe zielt auf eine nachhaltige Verbesserung der strukturellen Eigenschaften des Transplantats ab. Als sinnvoll erscheinen hier Strategien zur Verbesserung der Matrixproduktion und der Angiogenese im Transplantat. Die anatomischen Strukturen, auf die beide Strategien fokussieren, sind identisch:

- die im Knochenkanal zu fixierenden Anteile der Transplantate,
- der knöchernen Verankerungskanal,
- die im Remodelling begriffenen Transplantatanteile,
- die angrenzende Synovia bzw. die verbliebenen Sehnenstümpfe.

Um das klonierte Gen bzw. die cDNS an den Wirkort zu transportieren, sind 2 Strategien denkbar: bei einem direkten Verfahren (auch In-vivo-Strategie genannt) findet der Gentransfer in die interessierende anatomische Struktur statt (Abb. 2). Andererseits können isolierte Zielzellen außerhalb des Organismus genetisch modifiziert und anschließend an den Wirkort transplantiert werden. Dieser Ex-vivo-Ansatz ist komplizierter und invasiver als der In-vivo-Ansatz, da er die Verwendung autologer Zellen erfordert, welche vom Patienten isoliert und anschließend wieder an ihren Wirkort retransplantiert werden müssen. Die Verfügbarkeit von Stamm- oder anderen Progenitorzellen mag zukünftige Anwendungen vereinfachen [5].

Wie können diese Überlegungen realisiert werden? Eine entscheidende Voraussetzung dafür ist die Erreichbarkeit einer hinreichenden Anzahl von Zielzellen und die Expression des Transgens am Wirkort über einen therapeutisch ausreichenden Zeitraum. In den letzten beiden Jahrzehnten wurden hier signifikante Fortschritte gemacht.

### Markergentransfer in Sehnen und Bänder

Fibroblasten sind ideale Zielzellen, da sie den größten zellulären Bestandteil von Sehnen und Bändern ausmachen. Bereits Anfang der 70er Jahre bewiesen Merrill [90] bzw. Horst et al. [60], dass Gene in Fibroblasten eingeschleust werden können. Ihre Fähigkeit zum Expressieren von rekombinanten Genen wurde eindrucksvoll in verschiedenen Studien unterstrichen.

Tabelle 2  
**Markergentransferstudien in Bänder und Sehnen**

Vektor	Tiermodell	Markergen	Strategie	Zielgewebe	Zelltyp	Dauer der Transgenexpression	Referenz
Sendai-Liposomen	Ratte	lacZ	In vivo	Patellarsehne	Fibroblasten Monozyten/Makrophagen	8 Wochen	[101]
Sendai-Liposomen	Ratte	lacZ	In vivo	Patellarsehne	Fibroblasten	8 Wochen	[109]
Retroviral	Kaninchen	lacZ	Ex vivo	vorderes Kreuzband	Fibroblasten des vorderen Kreuzbandes	10 Tage	[59]
Retroviral	Kaninchen	lacZ	Ex vivo	Patellarsehne	Fibroblasten	6 Wochen	[47]
Adenoviral	Kaninchen	lacZ	Ex vivo	Semitendinosusehne	Zellen der synovialen Schicht Fibroblasten	6 Wochen	[85]
Adenoviral	Kaninchen	lacZ	In vivo	vorderes Kreuzband	Fibroblasten	6 Wochen	[59]
Adenoviral	Kaninchen	lacZ	In vivo	Patellarsehne	Zellen der synovialen Schicht Fibroblasten	6 Wochen	[47]
Adenoviral	Huhn	lacZ	In vivo	Sehne des M. flexor hallucis longus	Fibroblasten Synoviozyten	11 Wochen	[79]
Adenoviral	Kaninchen	lacZ	In vivo	vorderes Kreuzband	Fibroblasten	6 Wochen	[89]
Adenoviral	Kaninchen	lacZ	Ex vivo	vorderes Kreuzband	Fibroblasten Myoblasten	3 Wochen	[89]
Herpesvirus	Kaninchen	lacZ	In vivo	Patellarsehne	Fibroblasten	12 Wochen	[154]

chen. So modulierte die Implantation von genetisch modifizierten, L-Dopa-sezierenden Fibroblasten in das Corpus striatum den Verlauf des Morbus Parkinson im Rattenmodell [22], und in einer klinischen Genterapiestudie wurde die Überexpression des menschlichen LDL-Rezeptors erreicht [53].

Zum Transfer von Genen in isolierte Fibroblasten können rekombinante retrovirale [16, 18, 37, 44, 47, 100, 110, 124, 147], adenovirale [46, 47, 89, 107], adenoassozierte virale [47, 55, 56] oder nichtvirale Systeme [47, 57, 134] verwendet werden. Weitere Kenntnisse lieferten Untersuchungen zum direkten In-vivo-Genstransfer in Sehnen und Bänder [18, 30, 47, 59, 78, 79, 89, 101, 102, 109].

Im Jahr 1996 zeigte Nakamura et al. [101], dass die Fibroblasten der Patellarsehne nach Injektion von Sendai-Liposomen das transferierte Gen für 8 Wochen exprimieren [109]. Nach Injektion von Adenoviren werden v. a. Fibroblasten [47, 59, 79] und Zellen der Sehnen-scheide [47, 79] im Bereich der Injektionsstelle transduziert. Wenn isolierte, in Zellkultur retroviral transduzierte und selektierte Fibroblasten in die Patellar-

sehne injiziert werden, so fügen sich die Zellen in den gewellten Verlauf der Kollagenfasern ein [47]. Hier trat ein zusätzliches interessantes Phänomen zu Tage: die genetisch modifizierten Fibroblasten entfernten sich zunehmend vom Injektionsort. Nach 1 Woche hatten sie 1/4 der Länge der Sehne zurückgelegt und nach 1 Monat waren sie in der gesamten Sehne nachweisbar [101]. Eine ähnliche Beobachtung machten Gerich et al. [47]. Diese Experimente demonstrieren, dass die genetisch modifizierten Zellen in der Lage sind, die Sehne zu besiedeln, aktiv zu wandern und so am Remodelling teilzunehmen [101].

Ein weiteres wichtiges Zielgewebe für Ex-vivo- und In-vivo-Genstransferstrategien ist die synoviale Schicht, welche das VKB überzieht [6, 7, 24, 48, 106, 121]. Synoviozyten sind in Zellkultur leicht zu transduzieren. Werden sie intraartikulär injiziert, so können biologisch aktive rekombinante Proteine exprimiert werden [6, 46]. Ähnliche Arbeiten mit Fibroblasten [46, 89] und Muskelzellen [30, 89] unterstreichen die Vielfalt der Zellwahl bei den Ex-vivo-Strategien. Es ist eine interessante Fra-

ge, ob durch diese Strategien auch morphologische und funktionelle Veränderungen im Transplantat erreicht werden können.

Eine hohe Transfereffizienz ist eine unabdingbare Voraussetzung für den Erfolg dieser Strategien. Nakamura et al. [101] ermittelten einen Tag nach Applikation von Sendai-Liposomen eine Transfereffizienz von 3%, welche nach 2 Monaten auf 0,2% abfiel. Werden Adenoviren verwendet, ist die Effizienz deutlich höher. Lou et al. [79] verzeichneten nach Injektion von Adenoviren in die Sehne des M. flexor hallucis longus von Hühnern einen Genstransfer in bis zu 40% aller Fibroblasten und bis zu 60% aller Zellen der Sehnen-scheide.

Neben einer hohen Transfereffizienz ist auch die Dauer der Transgenexpression von entscheidender Bedeutung für einen Erfolg dieser Strategien. Wie Tabelle 2 zeigt, ist sie variabel und abhängig vom verwendeten Transfersystem, der Applikationsart und dem jeweiligen Tiermodell. Für verschiedene In-vivo-Modelle liegt sie zwischen 8 Wochen [101, 109], 11 Wochen [79] oder 6 Wochen [59]. Werden ex vivo genetisch

modifizierte Zellen transplantiert, so scheint die Genexpression kürzer zu sein. Die Angaben in der Literatur schwanken zwischen 10 Tagen [59], 6 Wochen [47] oder 4–6 Wochen [48], je nach Modell und transplantiertem Zelltyp. Dieses Phänomen des Absinkens der Transgenexpression trotz Persistenz der Transgene im Organismus wurde bereits 1991 von Palmer et al. [111] beschrieben. Die Ursachen dafür sind unbekannt. Denkbar sind die Inaktivierung von regulatorischen Elementen, eine Immunreaktion gegen viral exprimierte Proteine oder das Absterben bzw. sein Verlust oder das Absterben der transplantierten Zellen [21, 72, 111, 147].

Die Dauer der Genexpression in diesen Experimenten könnte hinreichend sein, um physiologische Effekte zu erzielen. Wir haben kürzlich den Effekt der Transplantation von genetisch modifizierten, IGF-I-überexprimierenden Chondrozyten in einem Ex-vivo-Modell untersucht [83]. Diese Studie lässt vermuten, dass bereits der kurze Zeitraum von 5 Tagen ausreichend ist, um strukturelle und funktionelle Veränderungen im neu gebildeten Gewebe zu erzielen.

### **Gentransfer zur Verbesserung des Remodelling**

Wenn ein VKB durch ein autologes Sehnentransplantat ersetzt wird, so findet im Transplantat ein Remodelling statt. Dieser Prozess führt zwischenzeitlich zu einer Verringerung der Reißfestigkeit des Transplantats. Das Transplantat wird mit einem stark vaskularisierten und zellreichen synovialen Gewebe umhüllt. Dieser synoviale Überzug geht u. a. vom Stumpf des alten VKB, der Synovia des femoralen und tibialen Ansatzes sowie vom infrapatellaren Fettkörper aus [3]. Es wandern undifferenzierte mesenchymale Zellen aus dem Bindegewebe [112] oder aus dem Knochenmark [156] bzw. Zellen synovialen Ursprungs [142] in das Transplantat ein [69]. Die so begonnene Transformation des Transplantats in eine bandartige Struktur ist nach etwa 1 1/2 Jahren abgeschlossen. Als Ergebnis liegt eine polarisierte, kreuzbandartige Struktur mit niedriger Zellzahl und längs angeordneten Kollagenfasern vor. Trotz großer Fortschritte sind die biomechanischen Eigenschaften dieses Ge-

webes schlechter als die des originalen VKB.

Die oben beschriebenen Vorgänge werden durch die zeitlich und räumlich definierte Expression von Wachstumsfaktoren reguliert [136]. Die gezielte Überexpression von Wachstumsfaktoren zu einem bestimmten Zeitpunkt könnte hier einen wichtigen Ansatzpunkt darstellen.

### **Überexpression von Matrixproteinen**

Der einfachste Ansatz ist die direkte Überexpression von Matrixproteinen in Fibroblasten des Transplantats. Die parallel der Längsrichtung des VKB angeordneten Bündel extrazellulärer Matrix bestehen vorwiegend aus Typ-I-Kollagen [77]. Daher sollte der Transfer eines geeigneten Gens zur Stimulation der Typ-I-Kollagen-Produktion zur Verbesserung der strukturellen Eigenschaften des Transplantats führen. Experimentelle Daten liegen hierzu allerdings nicht vor. In anderen Organen wurde die Durchführbarkeit dieses Vorhabens bereits für Genkonstrukte des Typ-IV- [58] und des Typ-VII-Kollagens [23] unter Beweis gestellt.

Durch Perfusion der Niere im Tiermodell wurde Typ-IV-Kollagen in glomerulären Zellen überexprimiert, welches sich anschließend in der glomerulären Basalmembran abgelagerte [58]. Der Transfer eines Typ-VII-Kollagen-Genkonstrukts in Keratinozyten von Patienten mit Epidermolysis bullosa (in denen Typ-VII-Kollagen fehlt) führte zu einer erfolgreichen Korrektur dieses Phänotyps [23]. Ähnliche Studien in der Kreuzbandchirurgie müssen beweisen, ob durch die Überexpression von Typ-I-Kollagen ein biomechanisch relevanter Effekt zu erzielen ist.

### **Überexpression von Wachstumsfaktoren**

Da Polypeptidwachstumsfaktoren die synthetische Aktivität und das Migrationsverhalten von Fibroblasten regulieren [31, 73, 86, 103, 130, 131, 136], sind sie wichtige Helfer zur Verbesserung des Remodelling aufgrund einer Beschleunigung der Repopulation des Transplantats [69] auf der Basis von Gentransfer. Obwohl die Stimulierung der Chemotaxis von Fibroblasten aus dem VKB durch den EGF [54] und andere Polypeptide bekannt ist,

liegen keine quantitativen Daten zur Unterstützung dieser Hypothese vor. Denkbar ist auch der Transfer von Genen für Wachstumsfaktoren in Sehnenfibroblasten, deren Genprodukte die Typ-I-Kollagen-Synthese stimulieren. Der Plättchenwachstumsfaktor (PDGF), ein potenter Wachstumsstimulator für Fibroblasten, ist hierfür ein geeignetes Kandidatengen [20, 26, 74, 141, 143].

Tatsächlich berichteten Nakamura et al. [102] nach Transfer des PDGF-Gens in eine partiell durchtrennte Patellarsehne im Kaninchenmodell von einem gesteigerten Vorkommen an Typ-I-Kollagen nach 4 Wochen [102]. In dieser Studie konnte das rekombinante Protein durch immunhistochemische Färbung 28 Tage lang nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser Arbeit liegt in der erfolgreichen Demonstration des Potentials von Gentransfer, eine Modulation der Matrixsynthese in der Struktur von Interesse über einen hinreichend langen Zeitraum zu erreichen. Der kritische Punkt, an dem sich derartige Studien jedoch messen lassen müssen, ist die Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften des Transplantats. Es ist nicht bekannt, ob dies durch Gentransfer erreichbar ist. Zudem fehlen quantitative Daten bezüglich der lokalen Konzentration der durch Gentransfer erzeugten Proteine.

Wachstumsfaktoren stimulieren auch die Zellteilung und die Matrixsynthese. Von speziellem Interesse ist IGF-I [17, 83] und TGF- $\beta$  [151]. Besonders TGF- $\beta$  reguliert die Heilung von Sehnenläsionen [103] und stimuliert die Typ-I-Kollagenexpression [52]. Obwohl Studien für Sehnen und Bänder fehlen, ist die Produktion von Wachstumsfaktoren in transduzierten Sehnen ein attraktives Konzept, wie eine Studie zur Überexpression des Nervenwachstumsfaktors (NGF) durch viralen Gentransfer in die Patellarsehne unterstreicht [154].

Juereen Lou et al. [78] haben nach Transfer einer cDNS für die fokale Adhäsionskinase eine Steigerung der Adhäsion von Sehnen beobachtet. Die Bedeutung dieser Arbeit liegt in der erstmaligen Demonstration eines biomechanisch relevanten Effekts basierend auf dem Transfer eines therapeutisch wirksamen Gens. Nach Transfer eines BMP-12-Gens war die Sehnenheilung verbessert [80].

### Verbesserung der Angiogenese

Während das originale VKB von einem longitudinal orientierten intraligamentärem Gefäßnetzwerk mit Verbindungen zum periligamentären Netzwerk in der Synoviascheide [113] durchzogen wird, findet die Invasion von Blutgefäßen in das Transplantat sehr früh statt [3,142]. Bereits nach 2 Wochen wandern Kapillarknospen vom Knochentunnel in das Transplantat ein, und formen wenig später ein Netzwerk [142]. Damit ist die Angiogenese eine wichtige Voraussetzung für Zellproliferation und Matrixsynthese im neu besiedelten Transplantat. Ihre Stimulierung ist ein wichtiger Angriffspunkt zur Verbesserung des Remodellings und zielt auf die Ausbildung eines dem originalen VKB entsprechenden Gefäßnetzes.

Die Revaskularisierung kann durch chemotaktische Faktoren wie FGF-2 [4, 114], PDGF, TGF- $\beta$  [115] oder den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), [4, 114, 137] gefördert werden [77, 88]. Nach synergistischer Applikation von VEGF und FGF-2 in die A. iliaca interna waren im Tiermodell hämodynamische Verbesserungen von ischämischen Gefäßen der unteren Extremität nachweisbar [4]. In der bereits erwähnten Studie von Nakamura et al. [102] zum Transfer des PDGF-Gens [102] wurden ebenfalls Hinweise für eine gesteigerte Vaskularisierung 1 Woche nach dem Gentransfer gefunden. Nach 1 Monat war kein Unterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe mehr feststellbar. Diese Studie demonstriert, dass der Transfer des PDGF-Gens die Frühphase der Transplantatvaskularisierung stimuliert. Weitere, quantitative Daten müssen erhoben werden. Auf diesem Gebiet bedarf es noch eines Beweises von physiologisch relevanten Veränderungen durch Gentransfer.

### Gentransfer zur Stimulation der ossären Integration

Offene Fragen bestehen v. a. bei der Integration von Sehnentransplantaten. Das Ziel ist, die originale anatomische Insertion des VKB mit ihren 4 charakteristischen histologischen Zonen:

- Bindegewebe des Bandes,
- Faserknorpel,
- mineralisierter Faserknorpel,
- Knochen

wiederherzustellen. Auch hier ist die Beschleunigung der einzelnen Phasen von Interesse, wie z. B. eine frühere Ausbildung der fibrösen Zwischenschicht, in der die Transplantatsehne durch Sharpey-Fasern mit dem Knochen des Tunnels verbunden ist [51, 77, 119]. Die Anwendbarkeit des Gentransfers zur Stimulation der Transplantateinheilung wurde bereits postuliert [47]. Eine Reihe von Studien liegen hierzu vor. Der Transfer von knocheninduzierenden Genen ist eine geeignete Strategie zur Verbesserung der Transplantatverankerung. Ein wichtiges Kandidatengen ist das BMP-2. Die Stimulation der Knochenneubildung nach Überexpression von BMP-2 wurde bereits bewiesen [75, 81, 96, 108, 148]. Nach adenoviralem Ex-vivo-Transfer einer cDNS für BMP-2 war nach 8 Wochen eine biomechanisch relevante Verbesserung der Steifigkeit und ossären Integration von Semitendinustransplantaten zu beobachten [85].

Auch Parathormon [12] und FGF-2 [117, 118, 153] eignen sich zur Stimulierung der Knochenregeneration. Für die Kreuzbandchirurgie liegen hierzu jedoch noch keine experimentellen Daten vor.

### Zukünftige Richtungen

Die Transplantation von biologischen Ersatzgeweben ist eine potentielle Möglichkeit zur Behandlung von Defekten des muskuloskeletalen Systems [71]. Wenn z. B. Chondrozyten in polymere Gerüststrukturen ausgesät und im Bioreaktor kultiviert werden, entwickelt sich Knorpelgewebe [43], während Fibroblasten im Bioreaktor ein sehnartiges Gewebe entwickeln [76]. Humane Fibroblasten aus dem VKB wandern in vitro in Kollagen-Glykosaminoglykan-Gerüstwerke ein und erzielen dort Zelldichten, die denen eines normalen VKB entsprechen [94]. Eine mögliche Anwendung des Gentransfers liegt in der Optimierung dieses „Tissue engineering“. Dieser Ansatz wurde bereits für andere Gewebe vorgeschlagen [16, 36, 49, 156, 157]. Neu gebildete Organe aus transduzierten Fibroblasten sezernieren beispielsweise hämatokritwirksames Erythropoietin für 10 Monate [100]. Allerdings können strukturell und funktionell mit dem Original vergleichbare Ersatzsehnen zzt. noch nicht durch „Tissue engineering“ hergestellt werden.

### Fazit für die Praxis

Das Verständnis der molekularen und zellulären Mechanismen der Heilungsvorgänge beim Ersatz des VKB durch ein Transplantat ist die Basis für eine kontrollierte Anwendung von Gentransfer. Darauf aufbauend können naturwissenschaftlich fundierte Ansätze zur Verbesserung der Transplantateigenschaften formuliert werden, die in klinische relevante Therapien münden. Aktuell müssen gentransferbasierte Strategien den Beweis noch erbringen, dass sie funktionelle Verbesserungen im Transplantat bewirken. Ein effektiver Dialog zwischen orthopädischen Chirurgen und Molekularbiologen, Virologen, Zellbiologen und Chemikern ist die Grundlage für den Erfolg der in diesem Artikel vorgeschlagenen Strategien. Will der orthopädische Wissenschaftler eine leitende Rolle in diesem komplexen Gebiet übernehmen, müssen ihm zeitliche Freiräume für die Grundlagenforschung neben der klinischen Arbeit zur Verfügung stehen [63]. Der Konsens von klinischen Forschern und Naturwissenschaftlern wird sich unter anderem in Fortschritten auf dem Gebiet des Gentransfers in der Kreuzbandchirurgie zeigen.

### Literatur

1. Adam F, Pape D, Steimer O, Kohn D, Rupp S (2001) Biomechanische Eigenschaften der Interferenzverschraubung beim Ersatz des vorderen Kreuzbandes mit Patellar- und Hamstring-Transplantaten. Eine experimentelle Studie mittels Röntgenstereometrieanalyse (RSA). *Orthopäde* 30: 649–657
2. Anderson WF (1992) Human gene therapy. *Science* 256: 808–813
3. Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL (1982) Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg Am* 64: 217–224
4. Asahara T, Bauters C, Zheng LP et al. (1995) Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92: 365–371
5. Asahara T, Kalka C, Isner JM (2000) Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 7: 451–457
6. 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
7. Bandara G, Robbins PD, Georgescu HI, Mueller GM, Glorioso JC, Evans CH (1992) Gene transfer to synoviocytes: prospects for gene treatment of arthritis. *DNA Cell Biol* 11: 227–231
8. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13: 238–252



9. Baragi VM, Renkiewicz RR, Jordan H, Bonadio J, Hartman JW, Roessler BJ (1995) Transplantation of transduced chondrocytes protects articular cartilage from interleukin 1-induced extracellular matrix degradation. *J Clin Invest* 96: 2454–2460
10. Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J (1989) Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6982–6986
11. Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10: 440–447
12. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S (1999) Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 5: 753–759
13. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N et al. (1995) Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 270: 470–475
14. Bostman OM, Pihlajamaki HK (2000) Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. *Clin Orthop* 2000: 216–227
15. Boussif O, Zanta MA, Behr JP (1996) Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther* 3: 1074–1080
16. Breitbart AS, Mason JM, Urmacher C, Garcia M, Grant RT, Pergolizzi RG, Grande DA (1999) Gene-enhanced tissue engineering: applications for wound healing using cultured dermal fibroblasts transduced retrovirally with the PDGF-B gene. *Ann Plast Surg* 43: 632–639
17. Brower-Toland BD, Saxer RA, Goodrich LR et al. (2001) Direct adenovirus-mediated insulin-like growth factor I gene transfer enhances transplant chondrocyte function. *Hum Gene Ther* 12: 117–129
18. Byun J, Huh JE, Park SJ et al. (2000) Myocardial injury-induced fibroblast proliferation facilitates retroviral-mediated gene transfer to the rat heart in vivo. *J Gene Med* 2: 2–10
19. Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG et al. (1995) Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1: 39–46
20. Chandler LA, Doukas J, Gonzalez AM et al. (2000) FGF2-Targeted adenovirus encoding platelet-derived growth factor-B enhances de novo tissue formation. *Mol Ther* 2: 153–160
21. Chen L, Nelson DM, Zheng Z, Morgan RA (1998) Ex vivo fibroblast transduction in rabbits results in long-term (>600 days) factor IX expression in a small percentage of animals. *Hum Gene Ther* 9: 2341–2351
22. Chen LS, Ray J, Fisher LJ, Kawaja MD, Schinstine M, Kang U J, Gage FH (1991) Cellular replacement therapy for neurologic disorders: potential of genetically engineered cells. *J Cell Biochem* 45: 252–257
23. Chen M, O'Toole EA, Muellenhoff M, Medina E, Kasahara N, Woodley DT (2000) Development and characterization of a recombinant truncated type VII collagen „minigene“. Implication for gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Biol Chem* 275: 24429–24435
24. Chen SJ, Wilson JM, Vallance DK, Hartman JW, Davidson BL, Roessler BJ (1995) A recombinant adenoviral vector expressing a soluble form of VCAM-1 inhibits VCAM-1/VLA-4 adhesion in transduced synoviocytes. *Gene Ther* 2: 469–480
25. Clackson T (2000) Regulated gene expression systems. *Gene Ther* 7: 120–125
26. Clark JG, Madtes DK, Raghu G (1993) Effects of platelet-derived growth factor isoforms on human lung fibroblast proliferation and procollagen gene expression. *Exp Lung Res* 19: 327–344
27. Cotten M, Langle-Rouault F, Kirlappos H, Wagner E, Mechtler K, Zenke M, Beug H, Birnstiel ML (1990) Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4033–4037
28. Cotten M, Wagner E, Zatloukal K, Phillips S, Curiel DT, Birnstiel ML (1992) High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase) gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6094–6098
29. Crystal RG (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270: 404–410
30. Day CS, Kasemkijwattana C, Menetrey J et al. (1997) Myoblast-mediated gene transfer to the joint. *J Orthop Res* 15: 894–903
31. DesRosiers EA, Yahia L, Rivard CH (1996) Proliferative and matrix synthesis response of canine anterior cruciate ligament fibroblasts submitted to combined growth factors. *J Orthop Res* 14: 200–208
32. Du B, Wu P, Boldt-Houle DM, Terwilliger EF (1996) Efficient transduction of human neurons with an adeno-associated virus vector. *Gene Ther* 3: 254–261
33. Dubes GR, Klingler EA (1961) Facilitation of infection of monkey cells with poliovirus „ribonucleic acid“. *Science* 133: 99–133
34. Eming SA, Whitsitt JS, He L, Krieg T, Morgan JR, Davidson JM (1999) Particle-mediated gene transfer of PDGF isoforms promotes wound repair. *J Invest Dermatol* 112: 297–302
35. Escriou V, Carriere M, Bussone F, Wils P, Scherman D (2001) Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *J Gene Med* 3: 179–187
36. Evans CH, Robbins PD (1999) Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system. *Clin Orthop* 199: 410–418
37. Falqui L, Martinenghi S, Severini GM et al. (1999) Reversal of diabetes in mice by implantation of human fibroblasts genetically engineered to release mature human insulin. *Hum Gene Ther* 10: 1753–1762
38. Farhood H, Bottega R, Epand RM, Huang L (1992) Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochim Biophys Acta* 1111: 239–246
39. 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
40. Felgner PL, Ringold GM (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337: 387–388
41. Felgner PL, Tsai YJ, Sukhu L, Wheeler CJ, Manthorpe M, Marshall J, Cheng SH (1995) Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Ann NY Acad Sci* 772: 126–139
42. Fogler WE, Swartz GM Jr, Alving CR (1987) Antibodies to phospholipids and liposomes: binding of antibodies to cells. *Biochim Biophys Acta* 903: 265–272
43. Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G (1998) Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res* 240: 58–65
44. Galpin J, Casciato D, Richards S, Foundation SMR, Viagene I (1992) A double blind, controlled, dose escalating phase I clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT(TAF) (HIV1-IIIIB envelope-transduced, autologous fibroblasts) in asymptomatic HIV-1 infected subjects. *US IND*
45. Gao X, Huang L (1991) A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 280–285
46. Gelse K, Jiang QJ, Aigner T et al. (2001) Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum* 44: 1943–1953
47. Gerich TG, Kang R, Fu FH, Robbins PD, Evans CH (1996) Gene transfer to the rabbit patellar endon: potential for genetic enhancement of tendon and ligament healing. *Gene Ther* 3: 1089–1093
48. Ghivizzani SC, Lechman ER, Tio C et al. (1997) Direct retrovirus-mediated gene transfer to the synovium of the rabbit knee: implications for arthritis gene therapy. *Gene Ther* 4: 977–982
49. Goldstein SA, Patil PV, Moalli MR (1999) Perspectives on tissue engineering of bone. *Clin Orthop* 1999: 419–423
50. Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456–467
51. Grana WA, Egle DM, Mahnken R, Goodhart CW (1994) An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Am J Sports Med* 22: 344–351
52. Grande JP, Melder DC, Zinsmeister AR (1997) Modulation of collagen gene expression by cytokines: stimulatory effect of transforming growth factor-beta1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor-alpha on collagen type I and collagen type IV. *J Lab Clin Med* 130: 476–486
53. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K et al. (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6: 335–341
54. Hannafin JA, Attia ET, Warren RF, Bhargava MM (1999) Characterization of chemotactic migration and growth kinetics of canine knee ligament fibroblasts. *J Orthop Res* 17: 398–404
55. Hansen J, Qing K, Kwon HJ, Mah C, Srivastava A (2000) Impaired intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2 vectors limits efficient transduction of murine fibroblasts. *J Virol* 74: 992–996
56. Hansen J, Qing K, Srivastava A (2001) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol* 75: 4080–4090
57. Hata R (1995) Transfection of normal human skin fibroblasts with human alpha 1(I) and alpha 2(I) collagen gene constructs and evidence for their coordinate expression. *Cell Biol Int* 19: 735–741
58. Heikkila P, Tibell A, Morita T et al. (2001) Adenovirus-mediated transfer of type IV collagen alpha5 chain cDNA into swine kidney in vivo: deposition of the protein into the glomerular basement membrane. *Gene Ther* 8: 882–890
59. Hildebrand KA, Deie M, Allen CR et al. (1999) Early expression of marker genes in the rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments: the use of different viral vectors and the effects of injury. *J Orthop Res* 17: 37–42
60. Horst J, Kluge F, Beyreuther K, Gerok W (1975) Gene transfer to human cells: transducing phage lambda plac gene expression in GM1-gangliosidosis fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3531–3535
61. Ikeda T, Kubo T, Arai Y et al. (1998) Adenovirus mediated gene delivery to the joints of guinea pigs. *J Rheumatol* 25: 1666–1673
62. Inoue T, Krumlauf R (2001) An impulse to the brain—using in vivo electroporation. *Nat Neurosci* 4 [Suppl]: 1156–1158
63. Jackson DW (2001) The orthopaedic clinician-scientist. *J Bone Joint Surg Am* 83: 131–135

64. Jain MK, Ramirez F, McCaffrey TM, Ioannou PV, Marecek JF, Leunissen-Bijvelt J (1980) Phosphatidylcholine bilayers. A model for phospholipid-cholesterol interaction. *Biochim Biophys Acta* 600: 678–688
65. Kaneda Y, Uchida T, Kim J, Ishiura M, Okada Y (1987) The improved efficient method for introducing macromolecules into cells using HVJ (Sendai virus) liposomes with gangliosides. *Exp Cell Res* 173: 56–69
66. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7: 33–40
67. Kessler S, Kastler S, Mayr-Wohlfart U, Puhl W, Gunther KP (2000) Stimulation primärer Osteoblastenkulturen mit rh-TGF- $\beta$ , rh-bFGF, rh-BMP 2 und rh-BMP 4 in einem In-vitro-Modell. *Orthopäde* 29: 107–111
68. Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander ME (1996) Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther* 7: 1339–1346
69. Kleiner JB, Amiel D, Roux RD, Akeson WH (1986) Origin of replacement cells for the anterior cruciate ligament autograft. *J Orthop Res* 4: 466–474
70. Kochanek S (1999) High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 10: 2451–2459
71. Koski JA, Ibarra C, Rodeo SA (2000) Tissue-engineered ligament: cells, matrix, and growth factors. *Orthop Clin North Am* 31: 437–452
72. Krueger GG, Jorgensen CM, Petersen MJ, Mansbridge JN, Morgan JR (1997) Use of cloned genetically modified human fibroblasts to assess long-term survival in vivo. *Hum Gene Ther* 8: 523–532
73. Lee J, Green MH, Amiel D (1995) Synergistic effect of growth factors on cell outgrowth from explants of rabbit anterior cruciate and medial collateral ligaments. *J Orthop Res* 13: 435–441
74. Lepisto J, Peltonen J, Vaha-Kreula M, Niinikoski J, Laato M (1995) Platelet-derived growth factor isoforms PDGF-AA, -AB and -BB exert specific effects on collagen gene expression and mitotic activity of cultured human wound fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 393–399
75. Lieberman JR, Le LQ, Wu L, Finerman GA, Berk A, Witte ON, Stevenson S (1998) Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. *J Orthop Res* 16: 330–339
76. Lin VS, Lee MC, O'Neal S, McKean J, Sung KL (1999) Ligament tissue engineering using synthetic biodegradable fiber scaffolds. *Tissue Eng* 5: 443–452
77. Liu SH, Panossian V, al-Shaikh R, Tomin E, Shepherd E, Finerman GA, Lane JM (1997) Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing. *Clin Orthop* 1997: 253–260
78. Lou J, Kubota H, Hotokezaka S, Ludwig FJ, Manske PR (1997) In vivo gene transfer and overexpression of focal adhesion kinase (pp125 FAK) mediated by recombinant adenovirus-induced tendon adhesion formation and epitenon cell change. *J Orthop Res* 15: 911–918
79. Lou J, Manske PR, Aoki M, Joyce ME (1996) Adenovirus-mediated gene transfer into tendon and tendon sheath. *J Orthop Res* 14: 513–517
80. Lou J, Tu Y, Burns M, Silva MJ, Manske P (2001) BMP-12 gene transfer augmentation of lacerated tendon repair. *J Orthop Res* 19: 1199–1202
81. Lou J, Xu F, Merkel K, Manske P (1999) Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. *J Orthop Res* 17: 43–50
82. Madry H, Trippel SB (2000) Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther* 7: 286–291
83. Madry H, Zurakowski D, Trippel SB (2001) Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther* 8: 1443–1449
84. Marshall E (1999) Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286: 2244–2245
85. Martinek V, Lattermann C, Usas A et al. (2001) Ex-vivo transfer of the BMP-2 gene with adenoviral vectors improves the tendon-bone healing of the ACL hamstring grafts. *Trans ORS* 47: 139
86. Marui T, Niyibizi C, Georgescu HI et al. (1997) Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. *J Orthop Res* 15: 18–23
87. McCutchan JH, Pagano JS (1968) Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *J Natl Cancer Inst* 41: 351–357
88. McDougall JJ, Yeung G, Leonard CA, Sutherland C, Bray RC (2000) Adaptation of post-traumatic angiogenesis in the rabbit knee by apposition of torn ligament ends. *J Orthop Res* 18: 663–670
89. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Fu FH, Moreland MS, Huard J (1999) Direct-, fibroblast- and myoblast-mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament. *Tissue Eng* 5: 435–442
90. Merrill CR, Geier MR, Petricciani JC (1971) Bacterial virus gene expression in human cells. *Nature* 233: 398–400
91. Monahan PE, Samulski RJ (2000) AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* 7: 24–30
92. Muller-Ladner U, Evans CH, Franklin BN, Roberts CR, Gay RE, Robbins PD, Gay S (1999) Gene transfer of cytokine inhibitors into human synovial fibroblasts in the SCID mouse model. *Arthritis Rheum* 42: 490–497
93. Mulligan RC (1993) The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926–932
94. Murray MM, Martin SD, Spector M (2000) Migration of cells from human anterior cruciate ligament explants into collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Orthop Res* 18: 557–564
95. Murrell GA, Maddali S, Horovitz L, Oakley SP, Warren RF (2001) The effects of time course after anterior cruciate ligament injury in correlation with meniscal and cartilage loss. *Am J Sports Med* 29: 9–14
96. Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J (1999) Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 24: 541–547
97. Nabel EG, Gordon D, Yang ZY et al. (1992) Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther* 3: 649–656
98. Nabel EG, Yang Z, Muller D et al. (1994) Safety and toxicity of catheter gene delivery to the pulmonary vasculature in a patient with metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 5: 1089–1094
99. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY et al. (1993) Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11307–1111
100. Naffakh N, Henri A, Villeval JL et al. (1995) Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3194–3198
101. Nakamura N, Horibe S, Matsumoto N et al. (1996) Transient introduction of a foreign gene into healing rat patellar ligament. *J Clin Invest* 97: 226–231
102. Nakamura N, Shino K, Natsuume T, Horibe S, Matsumoto N, Kaneda Y, Ochi T (1998) Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene Ther* 5: 1165–1170
103. Natsuume T, Nakamura N, Shino K, Toritsuka Y, Horibe S, Ochi T (1997) Temporal and spatial expression of transforming growth factor-beta in the healing patellar ligament of the rat. *J Orthop Res* 15: 837–843
104. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1: 841–845
105. Neves C, Escriou V, Byk G, Scherman D, Wils P (1999) Intracellular fate and nuclear targeting of plasmid DNA. *Cell Biol Toxicol* 15: 193–202
106. Nita I, Ghivizzani SC, Galea-Lauri J, Bandara G, Georgescu HI, Robbins PD, Evans CH (1996) Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 39: 820–828
107. Ohara N, Koyama H, Miyata T, Hamada H, Miyatake SI, Akimoto M, Shigematsu H (2001) Adenovirus-mediated ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes collateral development in a rabbit model of hind limb ischemia. *Gene Ther* 8: 837–845
108. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Iizuka T, Miyatake SI (2001) In vitro and in vivo studies of a bone morphogenetic protein-2 expressing adenoviral vector. *J Bone Joint Surg Am* 83 [Suppl 1]: 99–104
109. Özkan I, Shino K, Nakamura N et al. (1999) Direct in vivo gene transfer to healing rat patellar ligament by intra-arterial delivery of haemagglutinating virus of Japan liposomes. *Eur J Clin Invest* 29: 63–67
110. Palmer TD, Hock RA, Osborne WR, Miller AD (1987) Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine deaminase-deficient human. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1055–1059
111. Palmer TD, Rosman GJ, Osborne WR, Miller AD (1991) Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1330–1334
112. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD et al. (1995) Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4857–4861
113. Petersen W, Tillmann B (1999) Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol (Berl)* 200: 325–334
114. Post MJ, Laham R, Sellke FW, Simons M (2001) Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res* 49: 522–531
115. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH (1987) Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Exp Med* 165: 251–256
116. 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
117. Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox WC, Spiro RC, Poser JW (1999) Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res* 17: 607–614
118. Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, Poser JW (1998) Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop* 1998: 283–293

119. Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF (1993) Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. *J Bone Joint Surg Am* 75: 1795–803
120. Rodeo SA, Suzuki K, Deng XH, Wozney J, Warren RF (1999) Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med* 27: 476–488
121. Roessler BJ, Allen ED, Wilson JM, Hartman JW, Davidson BL (1993) Adenoviral-mediated gene transfer to rabbit synovium in vivo. *J Clin Invest* 92: 1085–1092
122. Rogachefsky RA, Dean DD, Howell DS, Altman RD (1993) Treatment of canine osteoarthritis with insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and sodium pentosan polysulfate. *Osteoarthritis Cartil* 1: 105–114
123. Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander LS (1995) Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthritis Cartil* 3: 261–267
124. Rosenberg MB, Friedmann T, Robertson RC, Tuszyński M, Wolff JA, Breakefield XO, Gage FH (1988) Grafting genetically modified cells to the damaged brain: restorative effects of NGF expression. *Science* 242: 1575–1578
125. Rupp S, Hopf T, Hess T, Seil R, Kohn DM (1999) Resulting tensile forces in the human bone-patellar tendon-bone graft: direct force measurement in vitro. *Arthroscopy* 15: 179–184
126. Rupp S, Seil R, Kohn D, Müller B (2000) The influence of avascularity on the mechanical properties of human bone-patellar-tendon-bone grafts. *J Bone Joint Surg Br* 82: 1059–1064
127. Rupp S, Seil R, Krauss PW, Kohn DM (1998) Cortical versus cancellous interference fixation for bone-patellar tendon-bone grafts. *Arthroscopy* 14: 484–488
128. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T (1989) Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63: 3822–3828
129. San H, Yang ZY, Pompili VJ et al. (1993) Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy. *Hum Gene Ther* 4: 781–788
130. Scherping SC Jr, Schmidt CC, Georgescu HI, Kwok CK, Evans CH, Woo SL (1997) Effect of growth factors on the proliferation of ligament fibroblasts from skeletally mature rabbits. *Connect Tissue Res* 36: 1–8
131. Schmidt CC, Georgescu HI, Kwok CK et al. (1995) Effect of growth factors on the proliferation of fibroblasts from the medial collateral and anterior cruciate ligaments. *J Orthop Res* 13: 184–190
132. Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M, Brauchle C (2001) Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 294: 1929–1932
133. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS et al. (2000) Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am* 82: 151–160
134. Serikawa T, Suzuki N, Kikuchi H, Tanaka K, Kitagawa T (2000) A new cationic liposome for efficient gene delivery with serum into cultured human cells: a quantitative analysis using two independent fluorescent probes. *Biochim Biophys Acta* 1467: 419–430
135. Sorscher EJ, Logan JJ, Frizzell RA et al. (1994) Gene therapy for cystic fibrosis using cationic liposome mediated gene transfer: a phase I trial of safety and efficacy in the nasal airway. *Hum Gene Ther* 5: 1259–1277
136. Spindler KP, Imro AK, Mayes CE, Davidson JM (1996) Patellar tendon and anterior cruciate ligament have different mitogenic responses to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *J Orthop Res* 14: 542–546
137. Su H, Lu R, Kan YW (2000) Adeno-associated viral vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer induces neovascular formation in ischemic heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13801–13806
138. Südkamp NP, Haas NP (2000) Neue Wege in der Kreuzbandchirurgie. *Chirurg* 71: 1024–1033
139. Szoka F Jr, Papahadjopoulos D (1978) Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4194–4198
140. Szybalska EH, Szybalski W (1962) Genetics of human cell lines. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 2026–2034
141. Tan EM, Qin H, Kennedy SH, Rouda S, Fox JW, Moore JH Jr (1995) Platelet-derived growth factors-AA and -BB regulate collagen and collagenase gene expression differentially in human fibroblasts. *Biochem J* 310: 585–588
142. Tanaka N (1993) Early revascularization of the reconstructed anterior cruciate ligament using a patellar tendon autograft. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 67: 953–962
143. Tang WW, Ulich TR, Lacey DL et al. (1996) Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 148: 1169–1180
144. Trippel SB, Chernausk SD, Van Wyk JJ, Moses AC, Mankin HJ (1988) Demonstration of type I and type II somatomedin receptors on bovine growth plate chondrocytes. *J Orthop Res* 6: 817–826
145. Udvardi A, Kufferath I, Grutsch H, Zatloukal K, Volz-Platzter B (1999) Uptake of exogenous DNA via the skin. *J Mol Med* 77: 744–750
146. Vaheri A, Pagano JS (1965) Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Science* 175: 434–436
147. Valere T, Bohl D, Klatzmann D, Danos O, Sonigo P, Heard JM (1995) Continuous secretion of human soluble CD4 in mice transplanted with genetically modified cells. *Gene Ther* 2: 197–202
148. Varady P, Li JZ, Cunningham M et al. (2001) Morphologic analysis of BMP-9 gene therapy-induced osteogenesis. *Hum Gene Ther* 12: 697–710
149. Venezian R, Shenker BJ, Datar S, Leboy PS (1998) Modulation of chondrocyte proliferation by ascorbic acid and BMP-2. *J Cell Physiol* 174: 331–341
150. Verma IM (2000) Gene therapy: the need for basic science. *Mol Ther* 2: 531
151. Villarreal FJ, Lee AA, Dillmann WH, Giordano FJ (1996) Adenovirus-mediated overexpression of human transforming growth factor-beta 1 in rat cardiac fibroblasts, myocytes and smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 28: 735–742
152. Weiler A, Scheffler SU, Südkamp NP (2000) Aktuelle Aspekte in der Verankerung von Hamstringschichten-Transplantaten in der Kreuzbandchirurgie. *Chirurg* 71: 1034–1044
153. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW et al. (1998) Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res* 13: 1483–1490
154. Wolfe D, Goins WF, Kaplan TJ et al. (2001) Herpesvirus-mediated systemic delivery of nerve growth factor. *Mol Ther* 3: 61–69
155. Wong TK, Nicolau C, Hofschneider PH (1980) Appearance of beta-lactamase activity in animal cells upon liposome-mediated gene transfer. *Gene* 10: 87–94
156. Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papegeorgiou CD, Wang JH (1999) Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop* 1999: 312–323
157. Yoo JJ, Atala A (1997) A novel gene delivery system using urothelial tissue engineered neo-organs. *J Urol* 158: 1066–1070
158. Zhou F, Huang L (1994) Liposome-mediated cytoplasmic delivery of proteins: an effective means of accessing the MHC class I-restricted antigen presentation pathway. *Immunomethods* 4: 229–235
159. Zhou X, Huang L (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1189: 195–203