

## Redaktion

C. Krettek, Hannover

A. Oberholzer · P. Stahel · S. K. Tschöke · W. Ertel  
 Zentrum für Spezielle Chirurgie des Bewegungsapparates,  
 Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Charité-  
 Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin

# Stellenwert der Gentherapie in Unfallchirurgie und Orthopädie

**Die Anwendung hochspezifischer gentechnologischer Methoden ermöglicht den Transfer von spezifischen Genen in das Erbgut einer Zelle. Die gentechnisch veränderte Zelle synthetisiert Proteine, die normalerweise nicht oder nur in geringen Mengen von dieser Zelle produziert werden. Diese Proteine können intrazelluläre Steuerungsmechanismen beeinflussen, welche an der Zelloberfläche als Rezeptor exprimiert oder als biologisch aktive Mediatoren sezerniert werden.**

Insbesondere die direkte Beeinflussung intrazellulärer Steuerungsmechanismen ist von großer Bedeutung, da dies mit konventionell verabreichten Medikamenten schwierig oder nicht zu erreichen ist. Weiterhin ermöglicht die Gentherapie die langfristige Synthese und Freisetzung von Proteinen, die normalerweise eine kurze Halbwertszeit haben oder oral nicht applizierbar sind. Als Beispiel sei hier die lokale Applikation von rekombinanten Wachstumsfaktoren als ein neues therapeutisches Konzept in der Wundheilung genannt [41, 58]. Da rekombinante Wachstumsfaktoren oral nicht bioverfügbar sind und eine kurze Halbwertszeit besitzen, besteht zur Aufrechterhaltung einer lokal wirksamen Konzentration bisher nur die Möglichkeit der wiederholten lokalen Injektion. Die Transfektion von gewebeständigen Zellen mit spezifischen Genen, die den entsprechenden Wachstumsfaktor kodieren, kann hierzu eine alternative Behandlungsmethode darstellen.

## Vorteile der Gentherapie

Verglichen mit der „klassischen“ Medikamententherapie hat die Gentherapie zahlreiche Vorteile (■ Tab. 1). Der Organismus wird dazu benutzt, sich die Wirkstoffe für seine Heilung selbst herzustellen. Weiterhin entfallen bei der Gentherapie durch die lokale Manipulation von spezifischen Zellen die systemischen Nebenwirkungen, die viele klassische Medikamente aufweisen. Während bei der klassischen Arzneimitteltherapie pharmakologisch wirksame Konzentrationen oft nur durch die wiederholte Verabreichung erreicht werden, können transfizierte Zellen das gewünschte Protein in gleich bleibender Konzentration über einen bestimmten Zeitraum eigenständig synthetisieren. Durch den natürlichen Tropismus einzelner Viren und die Verwendung gewebespezifischer Promotoren kann zusätzlich die Effizienz der Gentherapie gesteigert werden. Werden z. B. gentherapeutisch genutzte Adenoviren zusätzlich mit einem spezifischen Leberpromotor wie Albumin oder Phenylalanin-Hydroxylase gekoppelt, wird das entsprechende Transgen ausschließlich in der Leber exprimiert [40]. Ein weiterer Vorteil der Gentherapie gegenüber der klassischen Medikamententherapie ist die konstante Genexpression über einen längeren Zeitraum. Die meisten konventionellen Arzneimittel haben eine Halbwertszeit von Minuten bis Stunden, während die Halbwertszeit implantierter Gene und die Transgenexpression in Abhängigkeit des Vektors Tage bis Monate beträgt [48, 108].

## Hilfsmittel der Gentherapie

Im Rahmen der Gentherapie werden Zellen mit genetischem Material „transfiziert“. Für diesen als Gentransfer bezeichneten Vorgang benötigt man ein Konstrukt, welches das spezifische Gen trägt, den sog. „Vektor“. Durch einen Promotor wird die durch den Gentransfer eingebrachte Fremd-DNA (Transgen) gelesen und ihre Expression initialisiert (■ Abb. 1), [39, 69].

Die Wahl des passenden Vektors ist für die Effizienz der Gentherapie entscheidend, da jeder Vektor eine andere Zielzelle bevorzugt. Innerhalb der Vektoren unterscheidet man zwischen viralen und nicht-viralen Vektoren (■ Abb. 1).

## Nicht-virale Vektoren

DNA-Plasmide können mittels direkter Injektion, oszillierenden Tattoo-Nadeln oder mit zusätzlichen Penetrationshilfen wie Goldplättchen oder kationischen Liposomen gekoppelt und in die Zielregion implantiert werden [31, 47, 55, 72, 76, 100]. Die direkte DNA-Applikation mittels Plasmide ist wegen ihrer leichten Handhabung technisch einfach durchzuführen. Allerdings ist die Effizienz des direkten DNA-Transfers mit nicht-viralen Vektoren im Vergleich zu viralen Vektoren deutlich geringer (■ Tab. 2).

## Virale Vektoren

Virale Vektoren sind ein sehr effektives Transportmittel für Gene, da das Ein-

**Tab. 1** Unterschiede zwischen der klassischen „Medikamententherapie“ und der Gentherapie

Parameter	Klassische Therapie	Gentherapie
Wirkstoff	Wird außerhalb des Körpers hergestellt	Wird von den körpereigenen Zellen synthetisiert
Gewebespezifität	Nein	Ja
Bioverfügbarkeit des Proteins	Kurze Halbwertszeit	Konstant, solange das Virus in der Zelle aktiv ist
Systemische Nebenwirkungen	Ja	Nein, da nur lokale Effekte
Direkte Beeinflussung der Zellfunktionen	Nein	Ja

**Tab. 2** Vor- und Nachteile der am häufigsten verwendeten Vektoren

Vektor	Vorteile	Nachteile
Nicht-viral	Direkte DNA-Applikation	Geringer technischer Aufwand DNA epichromosomal
	Liposomen	Einfach herzustellen Schlechte Transfektionseffizienz
Viral	Adenovirus	Hohe Effizienz bei nicht proliferierenden Zellen Transiente Expression DNA epichromosomal
	Adenoassoziierte Viren	Hohe Effizienz bei proliferierenden Zellen Längere transiente Expression Nicht pathogen oder toxisch Integration in das Wirtsgenom
	Retroviren	Nur proliferierende Zellen werden infiziert Stabile Genexpression Integration in das Wirtsgenom

schleusen von genetischem Material in die Ziel-(Wirts)zelle essentieller Bestandteil des viralen Lebenszyklus ist. Mit der Verwendung von Viren als Vektoren nutzt man ihre evolutionär erworbene Fähigkeit aus, Gene in Wirtszellen einzubringen. Es werden 2 Typen von Viren unterschieden:

1. Adenoviren integrieren ihr Genom nicht in die DNA der Wirtszelle, sondern platzieren es im Zellkern, damit die DNA dort abgelesen und vermehrt werden kann. Diese extrachromosomale DNA hat den Nachteil, dass sie im Verlauf der Zellteilungen verloren geht und ihr therapeutischer Effekt damit zeitlich begrenzt ist.
2. Retroviren bauen ihr Genom willkürlich in die Erbsubstanz des Wirtes ein. Die Erbinformation ist somit fester Bestandteil der DNA des Wirtes und wird bei jedem Teilungsvorgang der Zelle mitvererbt. Retroviren können für die Gentherapie von chronischen Krankheiten Vorteile aufweisen (■ Tab. 2).

Zur Vektorherstellung werden diejenigen Gene aus dem Genom entfernt, welche die Virusreplikation regulieren (■ Abb. 2). Somit verlieren die Viren ihre Teilungsfähigkeit. Zusätzlich werden für Vektoren der neuen Generation diejenigen Gene eliminiert, die für die virale Immunantwort verantwortlich sind (■ Abb. 2). Durch das Einsetzen eines „Therapiegens“ (Transgen) in die frei gewordenen Bereiche entsteht ein sog. „rekombinanter Virus“.

Alle viralen Vektoren haben in Abhängigkeit ihres natürlichen Tropismus (d. h. „rezeptorvermittelt“) eine definierte Spezifität für eine Zielzelle. So transfizieren Retroviren gemäß ihres natürlichen Tropismus Lymphozyten, wohingegen Adenoviren vorwiegend Endothelzellen transfizieren. Durch zusätzliche Modifikation der Virushülle kann diese „natürliche“ Spezifität beeinflusst werden. Dieses sog. „Re-Targeting“ von viralen Vektoren wurde bereits bei Retroviren, Adenoviren und adenoassoziierten Virusvektoren durchgeführt und ermöglicht die Transfektion jeder Zelle [12, 33, 62, 64, 85, 102].

## Promotoren

Promotoren sind die „Antriebsaggregate“ für die Genexpression, die die „Umschreibung“ des eingebauten Transgens in die RNA und die anschließende Proteinsynthese steuern (■ Abb. 1). Nur wenn der Promotor aktiv ist, kann das implantierte Transgen gelesen und aktiviert werden. Der Promotor beinhaltet eine spezifische DNA-Sequenz, die als Erkennungs- und Bindungsregion für die RNA-Polymerase dient. Dieses Enzym bewirkt die Umschreibung der DNA-kodierten genetischen Information in eine Messenger-RNA, wodurch die Synthese des entsprechenden Proteins ausgelöst wird.

In der Gentherapie werden unspezifische oder spezifische Promotoren verwendet. Unspezifische Promotoren bestehen aus einer DNA-Sequenz, die aus einem Virus isoliert wird (z. B. Zytomegalieviruspromotor [66, 75]). Durch den viralen Promotor kann das Transgen von jeder transfizierten Zelle gelesen werden. Im Gegensatz hierzu können auch spezifische endogene Promotoren verwendet werden, die entweder organspezifisch (z. B. hepatozytenspezifischer Promotor Phenylalanin-Hydroxylase) oder funktionsabhängig (z. B. endogener Promotor für Akutphasenproteine [97]) sind (■ Abb. 1). Die Spezifität und Sensitivität des Gentransfers kann durch Verwendung von Promotoren, die lediglich in bestimmten Zellen oder Geweben aktiv sind, verbessert werden.

## Applikation der Vektoren

Grundsätzlich bestehen 2 Techniken, die Vektoren in die gewünschte Zielzelle zu implantieren. In Abhängigkeit von der Lokalisation des Gentransfers unterscheidet man zwischen einem direkten „In-vivo-“ und dem indirekten „In-vitro-“ oder „Ex-vivo-Gentransfer“ (■ Abb. 3). Beim direkten In-vivo-Gentransfer werden die Vektoren an den gewünschten Ort im Organismus appliziert und dort von den Zielzellen aufgenommen. Beim indirekten In-vitro-Gentransfer werden die Zielzellen aus dem Organismus entfernt und das Transgen implantiert. Der Gentransfer findet ex vivo unter kontrollierten Bedingungen im gentechnolo-

gischen Labor statt (■ **Abb. 3**). Anschließend kann die Effizienz des Gentransfers ex vivo überprüft werden, bevor die genetisch veränderten Zellen dem Organismus wiederzugeführt werden. Der indirekte In-vitro-Gentransfer ist wesentlich aufwendiger, bietet aber den Vorteil einer höheren Spezifität und Sicherheit. Der Nachteil besteht in der Komorbidität für den Patienten durch die Prozedur der Zellgewinnung und dem Risiko einer Ex-vivo-Kontamination der kultivierten Zellen. Der direkte In-vivo-Gentransfer ist in der Regel weniger invasiv und technisch einfacher. Ein Nachteil besteht in der unspezifischen Transfektion von Zellen am Injektionsort. Die Wahl der entsprechenden Transfektionsmethode hängt von der Erkrankung, der Indikation, der Lokalisation und dem Typ der zu transfizierenden Zielzelle ab [27, 38, 80].

### Anwendungsmöglichkeiten in der Unfallchirurgie

Bis heute wurden gentherapeutische Konzepte in der Unfallchirurgie vorwiegend in tierexperimentellen Studien untersucht. Hauptanwendungsbereiche sind die gezielte Beschleunigung der Wund- und Knochenbruchheilung, die Regeneration zerstörter Knorpelflächen und die gezielte Neutralisation immunsuppressiver und hyperinflammatorischer Proteine, die im Rahmen einer lokalen und/oder systemischen Entzündung freigesetzt werden.

### Wundheilung

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Modelle entwickelt, um die Effekte der Gentherapie in vitro und in vivo zur Beschleunigung der Wundheilung und der Geweberegeneration zu untersuchen. Hierbei fanden v. a. Liposomen und adenovirale Vektoren Verwendung [22]. Da Übereinstimmung besteht, dass Wachstumsfaktoren für eine effiziente Wundheilung notwendig sind, wurden Gene, die Proteine wie „platelet derived growth factor“ (PDGF), „transforming growth factor“ (TGF), oder „fibroblast growth factor“ (FGF) kodieren, im Rahmen der Wundheilung untersucht. An einem Ischämiemodell der Ratte konnte durch den

## Zusammenfassung · Abstract

Unfallchirurg 2006 · 109:521–527 DOI 10.1007/s00113-006-1127-0  
© Springer Medizin Verlag 2006

A. Oberholzer · P. Stahel · S. K. Tschöke · W. Ertel

### Stellenwert der Gentherapie in Unfallchirurgie und Orthopädie

#### Zusammenfassung

Mit Hilfe molekularbiologischer und gentechnologischer Methoden kann durch den Transfer von spezifischen Genen das Erbgut einer Zelle verändert werden. Hierdurch werden die Zellfunktionen so moduliert, dass die Zelle, die durch das implantierte Gen verschlüsselte Funktionen erhält, Proteine synthetisiert, die sie normalerweise nicht oder nur in geringen Mengen produziert.

Wie erste tierexperimentelle Studien zeigen, kann die Gentherapie die Heilungs- und Regenerationsfähigkeit der Haut, von Sehnen, Knorpel und Knochen unterstützen und beschleunigen. In jüngster Zeit werden in

Tierversuchen neue Vektoren mit einer geringeren Immunogenität und verbesserten Steuerbarkeit sowie einer erhöhten Transfer-sicherheit getestet. Es ist zu erwarten, dass die Gentherapie in den nächsten Jahrzehnten bei der Frakturheilung, der Sanierung von Knorpelschäden und für die Behandlung von Infektionen einen bedeutenden Stellenwert einnehmen wird.

#### Schlüsselwörter

Gentherapie · Transfektion · Virus · Promotor · Tissue engineering

### Role of gene therapy in trauma and orthopedic surgery

#### Abstract

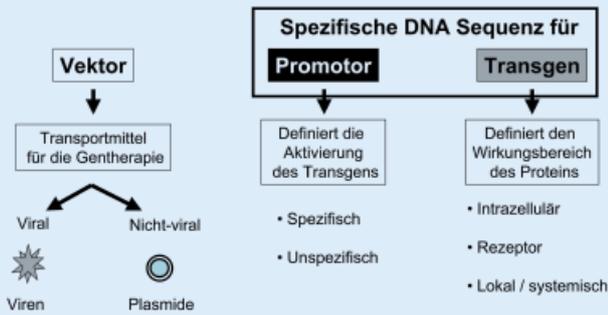
Modern molecular and genetic technologies enable the modification of a cellular genome through transfer of specific genes. The various procedures alter specific cell functions, which allow the transfected cell to produce any encoded transgene information. The transfected cell then synthesizes proteins that are normally not produced or only in very small amounts.

Numerous animal studies have demonstrated that gene therapy may support and accelerate the healing and regeneration of specific tissues such as skin, tendons, carti-

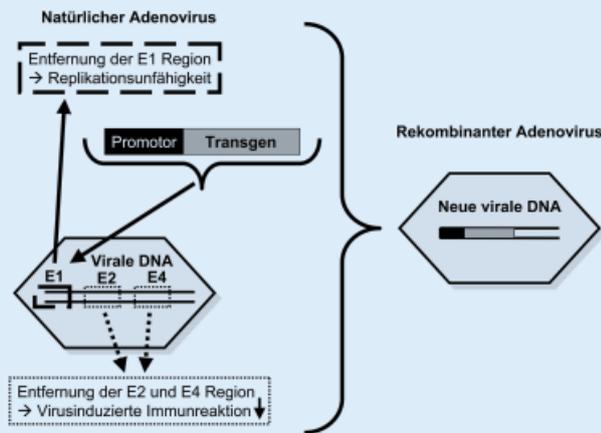
lage, and bones. Currently, further animal studies are evaluating new vectors with reduced immunogenicity in the continuous effort to improve the efficacy and safety of gene transfer. In the forthcoming decade we expect gene therapy to have an important influence on the treatment of fractures, cartilage lesions, and infection.

#### Keywords

Gene therapy · Transfection · Virus · Promoter · Tissue engineering



**Abb. 1** ▲ Für die Gentherapie werden das Transportvehikel (Vektor) und die DNA-Sequenzen von Promotor bzw. Transgen benötigt



**Abb. 2** ▲ Durch die Elimination der viralen E1-DNA-Region und das Einbringen des gewünschten Transgens mit einem entsprechenden Promotor entsteht ein rekombinantes, replikationsunfähiges Adenovirus („Adenoviren der 1. Generation“ [16]). Durch das zusätzliche Herausschneiden der viralen E2- und E4-DNA-Region wird die virusinduzierte Aktivierung des Immunsystems signifikant vermindert („Adenoviren der 2. Generation“ [17])

adenoviralen Transfer des PDGF-Gens die eingeschränkte Wundheilung regeneriert werden [53]. Keswani et al. [45] erzielten ähnliche Erfolge in einem murinen Diabetesmodell. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Wundheilung mit der direkten Applikation von TGF-haltigen Plasmiden signifikant verbesserte [16]. Ebenso beschleunigte die Applikation von Liposomen, die das FGF- oder auch das „Insulin-like growth factor“ (IGF)-1-Transgen beinhalteten, die Wundheilung sowohl im murinen Diabetesmodell [89], wie auch in einem Rattenmodell der akuten Brandwunde [43].

Eine neuartige Möglichkeit zur effizienten Vektorimplantation in eine Wunde wurde mit der Einführung der sog. „genaktivierten Matrix“ (GAM) geschaffen [18]. Dabei wird der entsprechende Vektor in eine biokompatible und biolo-

gisch abbaubare Matrix eingebettet und auf die Wundoberfläche aufgetragen. Die GAM ist so beschaffen, dass sie den Vektor in der Matrix zurückhält, aber gleichzeitig Zellen aus dem Wundgrund ermöglicht in die Matrix einzuwandern, wo schlussendlich der Gentransfer erfolgt. In einem Kaninchenmodell führten PDGF-Plasmide, die in lyophilisiertem Kollagen eingebettet und auf Ischämie induzierte Wunden aufgetragen wurden, zu einer signifikant beschleunigten Wundheilung im Vergleich zu unbehandelten Wunden [95]. Weiterhin konnte mit Adenoviren in „GAM“ die Angiogenese und somit die Bildung von Granulationsgewebe in unterschiedlichen Wundheilungsmodellen gesteigert werden [25].

Bei der plastischen Deckung von Hautdefekten wird die Gentherapie bereits klinisch angewendet. Ein organischer Haut-

ersatz aus genetisch modifizierten Zellen führte zu einer gesteigerten lokalen Synthese von wundheilungsstimulierenden Mediatoren [7, 35]. Weitere experimentelle Studien weisen darauf hin, dass bei lokaler Überexpression von Wachstumsfaktoren wie „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) oder PDGF in transfizierten Transplantaten eine beschleunigte Angiogenese [57, 90] bzw. ein schnelleres Einwachsen fibrovaskulärer Zellen erfolgt [26].

Ein anderes Tiermodell konnte zeigen, dass durch die direkte intramuskuläre Applikation von IGF-1-übermittelnden Adenoviren in eine Muskelverletzung zwar dessen Heilung verbessert wurde, jedoch die funktionelle Genesung unvollständig blieb [50].

### Frakturheilung

Die Frakturheilung ist in erster Linie von Faktoren wie der adäquaten Frakturstabilisierung und einer ausreichenden Durchblutung der Fragmente abhängig. Zusätzlich spielen bei der Frakturheilung auch Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Die wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Knochenbruchheilung sind „bone morphogenetic proteins“ (BMP), die sowohl für die Chemotaxis als auch für die Proliferation bzw. Differenzierung von Osteoblasten verantwortlich sind. In tierexperimentellen Defektmodellen wurden segmentale Knochenläsionen durch die lokale Applikation von ex vivo transfizierten Knochenmarkzellen, die den adenoviralen BMP-2-Vektor enthielten, schneller überbrückt als in der Kontrollgruppe [4, 52, 70]. Diese Tierstudien weisen darauf hin, dass die Gentherapie bei der Frakturheilung, insbesondere aber bei Problemfrakturen, eine wertvolle Ergänzung zur operativen Therapie darstellen könnte. Wachstumsfaktoren wie BMP-2, BMP-7 und „growth differentiation factor 5“ (GDF-5) werden derzeit in klinischen Studien erprobt [20, 34, 96].

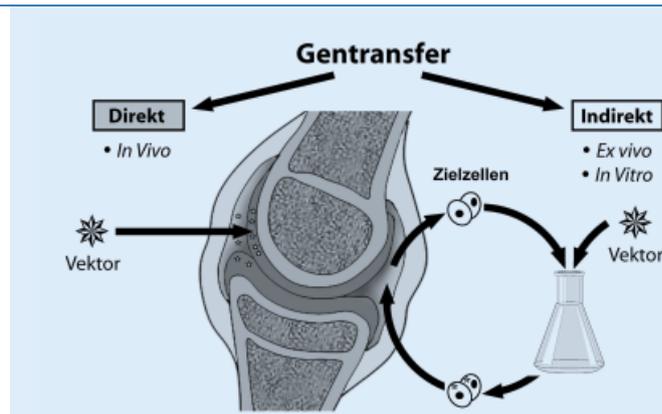
Auch in der Wirbelsäulenchirurgie könnte die neue Technologie zukünftig eine wichtige Rolle spielen. Die aktuellen therapeutischen Konzepte zur spinalen Fusion instabiler Wirbelsäulensegmente bei Frakturen, Tumoren, Infektionen und degenerativen Veränderungen bestehen in der Implantation von autogenen oder

allogenen Knochenspänen bzw. von Metallkörbchen („cages“). Dabei kommt es bei bis zu 40% dieser Patienten zu einer verzögerten oder ausbleibenden knöchernen Durchbauung. Diese unbefriedigenden klinischen Ergebnisse lassen eine lokale Applikation von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren auch in der Wirbelsäulenchirurgie als sinnvoll erscheinen. Hierbei stellen die BMP die wichtigste Klasse von Wachstumsfaktoren dar. Erste tierexperimentelle Untersuchungen an spinalen Fusionsmodellen weisen darauf hin, dass durch den lokalen adenoviralen Gentransfer von osteoinduktiven Proteinen wie BMP oder „LIM mineralization protein-1“ (LMP-1) die ossäre Konsolidation der Spondylodese beschleunigt wird [78, 98]. Es ist zu erwarten, dass die moderne Gentherapie in den nächsten Jahren auch für die knöcherne Konsolidierung der Spondylodese bei unterschiedlichen Wirbelsäulenerkrankungen einen bedeutenden Stellenwert einnehmen wird.

### Knorpelschäden, Arthritis und Arthrose

Eine besondere Herausforderung ist die Beeinflussung des chronischen Knorpelschadens. In den letzten Jahren sind für dessen Regeneration spezifische Zytokine identifiziert worden. Das inflammatorische Zytokin Interleukin-1 (IL-1) spielt bei der durch die Arthritis induzierten Zerstörung von hyalinem Knorpel eine wichtige Rolle. Der Transfer eines IL-1-Antagonisten wie IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) in die Synovia führte bei einem tierexperimentellen Arthritismodell zu einer protektiven Wirkung [6, 28, 68, 73, 74]. Gleiche Effekte wurden durch die intraartikuläre Injektion von ex vivo transfizierten Synovialzellen, die IL-1-RA synthetisieren, beobachtet [5, 28, 46]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass humane synoviale Fibroblasten, die mit 2 knorpelprotektiven Genen [IL-1RA, Interleukin-10 (IL-10)] transfiziert wurden, die Knorpelzerstörung in einem murinen Arthritismodell signifikant verminderten [73].

Aktuelle Techniken zur Behandlung des Knorpelschadens (Chondrozytentransplantation etc.) führen zur Ausbildung von wenig belastbarem Fasernknorpel. Eine neue Technik zur Behandlung



**Abb. 3 ▲** Der Gentransfer kann entweder direkt („in vivo“) oder indirekt („ex vivo und in vitro“) stattfinden. Beim direkten Gentransfer wird der Vektor an den gewünschten Ort im Organismus appliziert. Beim indirekten Gentransfer werden die Zielzellen außerhalb des Organismus transfiziert und diese Zellen an den gewünschten Ort im Organismus reappliziert

von Knorpelläsionen besteht aus der Kombination von „tissue engineering“ und Gentherapie. Hierbei werden autologe Zellen wie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark oder Chondrozyten aus nicht tragenden Gelenkzonen isoliert [24, 44], in Kulturen gezüchtet und mit dem gewünschten Wachstumsfaktor transfiziert. Die genetisch manipulierten Zellen werden auf eine biodegradable Matrix (z. B. ein Kollagenvlies) aufgebracht, um anschließend in die entsprechende Knorpelläsion implantiert zu werden. Im Idealfall wird hierbei die degradierte Matrix durch hyalinen Knorpel ersetzt. Mit dieser Technik konnten Knorpeldefekte in tierexperimentellen Studien vollständig beseitigt werden [32, 83, 105].

### Sehnenverletzungen

In der Behandlung von ligamentären, Sehnen-, Meniskus- und Knorpelläsionen stellen sich weitere Herausforderungen dar. Insgesamt verfügen diese Gewebe über eine schlechte Gefäßversorgung sowie eine verlangsamte oder stagnierende Zellteilung. Aus diesem Grunde ist die Heilung in diesem Gewebe verlängert und führt meistens zu Narbengewebe oder Defektheilung.

Für die Heilung einer Sehnenruptur spielen ähnlich der Wund- und Knochenbruchheilung verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine eine wichtige Rolle. In der experimentellen Anwendung bei Sehnen- und Bandrekonstruktionen, mit viralen Vektoren ein beliebiges Trans-

gen lokal zu applizieren, waren wiederum Tierversuche bereits erfolgreich [21, 49, 65]. So konnte schon in frühen Versuchen gezeigt werden, dass der Transfer des BMP-12-Gens in die Sehnenstümpfe eines Mausmodells eine beschleunigte Heilung der durchtrennten Sehne erzielte [59]. Ähnliche Erfolge verzeichneten Martinek et al. [64] in einem Kaninchenmodell der vorderen Kreuzbandplastik, indem sie den tendoossären Übergang der Semitendinosuspräparate mit BMP-2 enthaltendem Adenovirus transfizierten. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Integrationsfestigkeit des Implantats im ossären Kanal gegenüber unbehandelten Kontrolltransplantaten. Mit der lokalen Applikation von Liposomen, welche die Gensequenz von PDGF- $\beta$  enthielten, konnte in verschiedenen Experimenten zur Sehnenheilung eine gesteigerte und damit heilungsfördernde Kollagensynthese nachgewiesen werden [99]. Ebenso ließ sich eine vermehrte Angiogenese des betroffenen Sehnenabschnitts beobachten [71], die sich gleichermaßen in Experimenten zur Haut- [56] und Knochenheilung [91] als heilungsfördernd erwies. Ein negativer Einfluss auf das Migrationsverhalten der zur Heilung notwendigen Effektorzellen konnte bislang nicht nachgewiesen werden [77].

### Schädel-Hirn-Trauma und Rückenmarkverletzungen

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) stellt in den Industrieländern die Haupttodes-

ursache von jungen Patienten <45 Jahren dar [29]. Im Rahmen von Schädel-Hirn- und Rückenmarkverletzungen hat sich gezeigt, dass, ähnlich der Weichteil- und Knochengewebe, weitere Wachstumsfaktoren wie „nerve growth factor“ (NGF), „brain-derived neurotropic factor“ (BDNF), „Neurotrophin-3“ (NT-3), „glia cell line-derived neurotrophic factor“ (GDNF) und „leukemia inhibitor factor“ (LIF) eine wesentliche Rolle spielen. Durch die tierexperimentelle lokale Applikation von transfizierten NT-3-synthetisierenden Fibroblasten, konnten die sensomotorischen Funktionen bei Rückenmarkläsionen verbessert werden [37]. Ähnliche Resultate wurden auch mit BDNF, GDNF und LIF erzielt [8, 14, 60, 61].

Weitere klinische und experimentelle Studien konnten zeigen, dass die komplementvermittelte intrazerebrale Entzündungsreaktion eine ebenfalls wichtige pathophysiologische Rolle bei der Entwicklung der posttraumatischen Blut-Hirn-Schrankenstörung und des sekundären Hirnödems spielt [84]. Tierversuche zur genetischen Transfektion des Komplementinhibitor „complement receptor-related protein  $\gamma$ “ (Crry) über einen ZNS-spezifischen Promoter (GFAP) zeigten im murinen Modell des geschlossenen SHT eine signifikante Reduktion der Blut-Hirn-Schranken-Störung mit einem deutlich verbesserten neurologischen Outcome [79].

Im Gesamtkomplex der zerebralen Inflammationsreaktion nach Schädel-Hirn- und Rückenmarkverletzungen stellen Neurotrophine ebenfalls wichtige Mediatoren für die posttraumatische Reparatur und Regeneration von verletztem Nervengewebe dar [13, 23]. Die Gentherapie mit neurotrophen Faktoren wurde zwischenzeitlich erfolgreich an verschiedenen Rattenmodellen der akuten Rückenmarkverletzung angewandt und beschrieben [8, 9, 106]. Hierbei ermöglicht der Gebrauch neuer modifizierter viraler Vektoren die Transfektion von Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Als Beispiel sei die Verwendung von Amplicon-basierten Bipromotersystemen genannt, welche neben der gewünschten Überexpression des Transgens auch die Kontrolle der Effektivität der Expression über ein Reportergen ermöglichen [106]. Mit die-

ser Technik wurden erfolgversprechende Resultate durch Transfektion von Zellen des verletzten ZNS mit neurotrophen Faktoren erreicht [93, 106]. Die klinische Anwendung dieses Konzepts ermöglicht nach neuesten Erkenntnissen aus Studien an Primaten neue Innovationen, u. a. im Bereich der Neurotraumatologie [94].

### Lokale und systemische Inflammation und Multiorganversagen (MOF)

Die akute Inflammation ist meist mit einer systemischen Entzündungsreaktion („systemic inflammatory response syndrome“, SIRS) verbunden, auf die eine Immunsuppression („compensatory anti-inflammatory response syndrome“, CARS) folgt. Die meisten gentherapeutischen Konzepte zielen darauf ab, antiinflammatorische Zytokine zu produzieren, um die proinflammatorische Zytokinantwort zu neutralisieren [11, 81, 92]. In murinen Endotoxinmodellen konnte durch die intraperitoneale Injektion von Liposomen mit einem IL-10-Plasmid oder einem TNF-Rezeptor-p55-Plasmid die Überlebensrate signifikant erhöht werden [44]. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit einem intramuskulär applizierten IL-10-Adenovirus erzielt [67, 103].

Für die Behandlung des akuten Lungenversagens („adult respiratory distress syndrome“, ARDS) konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass die gentherapeutisch induzierte Überproduktion von  $\alpha$ -Antitrypsin [51], Prostaglandinen [17], Heat-shock-Protein 70 (HSP-70 [101]) oder „nuklear-faktor-kB inhibitor“ [10] die lokale Entzündung und die hieraus resultierenden Schäden an Alveolarzellen vermindert wurde. Neuere Untersuchungen zur Behandlung anderer akuter und chronisch-entzündlicher Krankheiten, wie z. B. Pankreatitis [15], Kolitis [54], Arthritis [87, 104] und sogar der Arteriosklerose [107] haben gleichermaßen positive Ergebnisse mit der Applikation von adenoviral vektorvermittelten Transgenen erzielen können.

### Gefahren der Gentherapie

Obwohl sich die einzelnen Verfahren zur Gentherapie in zahlreichen Tiermodel-

len und ersten klinischen Studien bereits etabliert und bewährt haben, bestehen trotz konstanter Weiterentwicklung der Produkte vereinzelt Sicherheitsbedenken, v. a. bei der Verwendung von Retroviren. Dabei bezieht sich die Hauptproblematik auf die sog. „Insertionsmutagenese“. Hierunter versteht man die Veränderung eines essentiellen Genproduktes durch stabile Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom, die theoretisch ein Malignom induzieren könnte [19]. Eine solche, für eine Leukämie ursächliche, Insertionsmutagenese wurde kürzlich in einer Studie zur Behandlung einer angeborenen schweren Immunschwäche („X-linked severe combined immunodeficiency“, X-SCID) im Rahmen des retroviralen Gentransfer von IL-2-Rezeptor in kindlichen Knochenmarkzellen beschrieben [1, 63].

Neben einer partikel-/dosisabhängigen, oft lokal begrenzten und schwachen Entzündungsreaktion, hängt die allgemeine Immunreaktion des transfizierten Organismus auf Adenoviren im Wesentlichen von der Expression der viralen Proteine ab und kann in seltenen Fällen schwerwiegende systemische Komplikationen hervorrufen [82]. So endete die adenovirusvermittelte Gentherapie bei der Behandlung eines Patienten, der einen angeborenen Mangel des Enzyms Ornithin-Transcarbamoylase (OTCD) aufwies, durch die überschießende Aktivierung des Immunsystems tödlich [3, 88]. Um die Immunogenität der Adenoviren zu reduzieren, wurden bei Adenoviren der 2. Generation die viralen DNA-Regionen E2 und E4 entfernt (■ **Abb. 3** [30]). Diese rekombinanten Adenoviren der 2. Generation weisen eine verminderte Expression von viralen Proteinen auf, wodurch eine geringere Aktivierung des Immunsystems erzielt werden soll [30]. Jüngste experimentelle Erkenntnisse aus neueren adenoviralen Vektoren, wie z. B. dem Cre-loxP-System, zeigen bereits eine verbesserte Transfektionseffizienz mit erhöhtem Tropismus bei insgesamt verminderter Immunreaktion [2].

Gewisse konzeptionelle und methodische Faktoren bleiben jedoch in der Zusammenstellung der Risiken viral vermittelter Gentransfers bestehen. Neben ihrer Eigenschaft als Agens ist die gene-

tische Modifikation durch virale Vektoren oft mit einer großen Latenz verbunden, die letztlich nur in aufwendigen Langzeitstudien ermittelt werden kann. Zusätzlich zum allgemeinen und beruflichen Gesundheitsrisiko durch Ausschleider ist die individuelle Abwehrreaktion des Patienten mit zu berücksichtigen. Ob alternative Gentransferverfahren nicht-viraler Art eine adäquate Alternative bieten, ist gegenwärtig Fokus zahlreicher experimenteller Studien. Erste Erfolge konnten mit alternativen Trägersystemen wie z. B. einem wasserlöslichen Lipopolymer [42], kationische Kortikosteroide [86] oder der sog. „nukleofaktor technology“ [36] mit verbesserter Effizienz gegenüber des viralen Gentransfer verzeichnet werden. Letzteres, zeichnet sich durch eine zellspezifische Kombination aus Elektroporation und chemischer Lösungen aus, die vor allem Primärzellen für einen nicht-viralen Gentransfer zugänglich macht.

## Fazit für die Praxis

**Die Gentherapie kann, wie zahlreiche tierexperimentelle und erste klinische Studien zeigen, die Heilung bzw. Regeneration von Haut, Knorpel und Knochen unterstützen und beschleunigen. Mit der Weiterentwicklung neuer Vektoren und den fortschreitenden Erkenntnissen aus Wissenschaft und Forschung werden eine bessere Steuerbarkeit und geringere Immunogenität der viral vermittelten Gentherapie kontinuierlich angestrebt. Gleichmaßen werden alternative Gentransfermethoden nicht-viraler Art in ihrer Effizienz verbessert, um bestehende therapeutische Ansätze zu erweitern. Es ist jedoch zu erwarten, dass die Gentherapie in den nächsten Jahren bei der Behandlung von Frakturen, Knorpelschäden, Wundheilungsstörungen und Infektionen einen bedeutenden Stellenwert einnehmen wird. Bei ausreichend klinischer Erprobung könnten dabei prä-, intra- oder postoperativ sowie im Rahmen einer konservativen Behandlung verabreichte Gewebeeinjektionen eine viel versprechende Adjuvant oder sogar Alternative zu bereits etablierten Therapien darstellen.**

## Korrespondierender Autor

### Dr. A. Oberholzer

Zentrum für Spezielle Chirurgie des Bewegungsapparates, Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin andreas.oberholzer@charite.de

**Interessenkonflikt.** Keine Angaben

## Literatur

1. Anonymus (2003) French gene therapy group reports on the adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position statement from the European Society of Gene Therapy. *J Gene Med* 5(1): 82–84
2. Alba R, Bosch A and Chillon M (2005) Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 12(Suppl 1): 18–27
3. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD et al. (2000) Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther* 7(9): 734–739
12. Buchholz CJ, Stitz J, Cichutek K (1999) Retroviral cell targeting vectors. *Curr Opin Mol Ther* 1(5): 613–624
19. Crystal RG (1995) Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270(5235): 404–410
22. Davidson JM, Eming SA, Dasgupta J (2003) Particle-mediated gene therapy of wounds. *Methods Mol Med* 78: 433–452
25. Doukas J, Chandler LA, Gonzalez AM et al. (2001) Matrix immobilization enhances the tissue repair activity of growth factor gene therapy vectors. *Hum Gene Ther* 12(7): 783–798
27. Evans CH and Robbins PD (1995) Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg Am* 77(7): 1103–1114
28. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC et al. (2005) Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(24): 8698–8703
33. Girod A, Ried M, Wobus C et al. (1999) Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adenovirus type 2. *Nat Med* 5(12): 1438
34. Govender S, Csimma C, Genant HK et al. (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84(12): 2123–2134
36. Gresch O, Engel FB, Nestic D et al. (2004) New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33(2): 151–163
45. Keswani SG, Katz AB, Lim FY et al. (2004) Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. *Wound Repair Regen* 12(5): 497–504
57. Liu PY, Wang XT, Badiavas E et al. (2005) Enhancement of ischemic flap survival by prefabrication with transfer of exogenous PDGF gene. *J Reconstr Microsurg* 21(4): 273–279
61. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH (2003) Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 181(2): 115–129
64. Martinek V, Latterman C, Usas A et al. (2002) Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 84(7): 1123–1131
65. Mehta V, Kang Q, Luo J et al. (2005) Characterization of adenovirus-mediated gene transfer in rabbit flexor tendons. *J Hand Surg Am* 30(1): 136–141
69. Mulligan RC (1993) The basic science of gene therapy. *Science* 260(5110): 926–932
73. Neumann E, Judex M, Kullmann F et al. (2002) Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway. *Gene Ther* 9(22): 1508–1519
75. Oberholzer C, Oberholzer A, Bahjat FR et al. (2001) Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20): 11503–11508
76. Palmer RR, Lewis AL, Kirkwood LC et al. (2004) Biological evaluation and drug delivery application of cationically modified phospholipid polymers. *Biomaterials* 25(19): 4785–4796
78. Peterson B, Iglesias R, Zhang J et al. (2005) Genetically modified human derived bone marrow cells for posterolateral lumbar spine fusion in athymic rats: beyond conventional autologous bone grafting. *Spine* 30(3): 283–290
81. Rogy MA, Auffenberg T, Espat NJ et al. (1995) Human tumor necrosis factor receptor (p55) and interleukin 10 gene transfer in the mouse reduces mortality to lethal endotoxemia and also attenuates local inflammatory responses. *J Exp Med* 181(6): 2289–2293
83. Schaefer DJ, Klemm C, Zhang XH, Stark GB (2000) Tissue engineering with mesenchymal stem cells for cartilage and bone regeneration. *Chirurg* 71(9): 1001–1018
88. Smith L, Byers JF (2002) Gene therapy in the post-Gelsinger era. *JONAS Healthc Law Ethics Regul* 4(4): 104–110
94. Tuszynski MH, Grill R, Jones LL, McKay HM, Blesch A (2002) Spontaneous and augmented growth of axons in the primate spinal cord: effects of local injury and nerve growth factor-secreting cell grafts. *J Comp Neurol* 449(1): 88–101
97. Varley AW, Geiszler SM, Gaynor RB, Munford RS (1997) A two-component expression system that responds to inflammatory stimuli in vivo. *Nat Biotechnol* 15(10): 1002–1006
99. Wang XT, Liu PY, and Tang JB (2004) Tendon healing in vitro: genetic modification of tenocytes with exogenous PDGF gene and promotion of collagen gene expression. *J Hand Surg Am* 29(5): 884–890
105. Yang M, Ma QJ, Dang GT et al. (2005) In vitro and in vivo induction of bone formation based on ex vivo gene therapy using rat adipose-derived adult stem cells expressing BMP-7. *Cytherapy* 7(3): 273–281
106. Yenari MA, Sapolsky RM (2005) Gene therapy in neurological disease. *Methods Mol Med* 104: 75–88

### Das komplette Literaturverzeichnis ...

... finden Sie in der elektronischen Version dieses Beitrags unter [www.DerUnfallchirurg.de](http://www.DerUnfallchirurg.de)