

Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation

Klinikum der Universität München, Campus Großhadern

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Die Entwicklung einer beschleunigten, klinisch anwendbaren  
Gentransfer-Technologie zur *in situ* Regeneration von Knochengewebe**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach

Experimentelle Orthopädie

vorgelegt von

Dr. biol. hum. Oliver Bernd Betz

aus Geislingen an der Steige

2021

## Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis .....	Seite 2
II. Zusammenfassung der kumulativen Habilitationsleistung .....	Seite 3
III. Eidesstattliche Erklärung.....	Seite 8
IV. Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation.....	Seite 9
V. Hauptteil	
1. Einleitung .....	Seite 11
1.1 Klinische Relevanz .....	Seite 11
1.2 Gentransfer Vektoren.....	Seite 12
1.3 Osteoinduktive Gene .....	Seite 13
1.4 <i>In vivo</i> Gentherapie.....	Seite 14
1.5 Traditionelle <i>ex vivo</i> Gentherapie .....	Seite 15
1.6 Beschleunigte <i>ex vivo</i> Gentherapie.....	Seite 17
2. Material und Methoden .....	Seite 19
3. Ergebnisse.....	Seite 22
3.1 Publikation 1 .....	Seite 22
3.2 Publikation 2.....	Seite 23
3.3 Publikation 3 .....	Seite 24
3.4 Publikation 4.....	Seite 25
3.5 Publikation 5 .....	Seite 26
3.6 Publikation 6.....	Seite 27
3.7 Publikation 7 .....	Seite 28
3.8 Publikation 8.....	Seite 30
4. Diskussion .....	Seite 31
5. Schlussfolgerung und Ausblick.....	Seite 34
VI. Literaturverzeichnis.....	Seite 36
VII. Publikationen des Autors (Originalarbeiten) .....	Seite 49
VIII. Danksagung .....	Seite 55
IX. Anhang – Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation.....	Seite 57

## I. Abkürzungsverzeichnis

AAV	=	adeno-assoziierte Vektoren
Ad	=	adenovirale Vektoren
Ad.BMP-2	=	adenoviraler BMP-2 Gentransfervektor
BMP	=	bone morphogenetic protein
DEXA	=	dual energy x-ray absorptiometry
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	=	Fluorescence-activated cell sorting
FDA	=	Food and Drug Administration
FGF	=	fibroblast growth factor
FOP	=	fibrodysplasia ossificans progressiva
GAM	=	gene activated matrix
GFP	=	green fluorescence protein
GMP	=	good manufacturing practice
IGF	=	insulin-like growth factor
LMP	=	LIM mineralization protein
LV	=	lentivirale Vektoren
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	polymerase chain reaction
pfu	=	plaque forming units
Runx2	=	runt-related transcription factor 2
RV	=	retrovirale Vektoren
TGF- $\beta$	=	transforming growth factor beta
VEGF	=	vascular endothelial growth factor
WST-1	=	water-soluble tetrazolium-1

## II. Zusammenfassung der kumulativen Habilitationsleistung

Der Aufbau von Knochengewebe ist ein zentrales Thema in verschiedenen Disziplinen der Medizin. Orthopäden und Unfallchirurgen, Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgen, sowie Kollegen der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie arbeiten weltweit an der Entwicklung effektiver Knochen-Tissue-Engineering Strategien. Der demografische Wandel, der mit einer Zunahme an Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Osteoporose einhergeht, prognostiziert einen deutlich steigenden Bedarf an wirksamen Methoden zur Knochenregeneration.

Die Verabreichung von osteoinduktiven Genen führte in Tierexperimenten zur schnellen Regeneration von großen Knochendefekten und zur Wirbelfusion. Die sogenannte *ex vivo* Gentherapie hat sich hierbei als vorteilhaft erwiesen, da der Gentransfer auf ausgewählte Zellen außerhalb des Körpers unter kontrollierten Bedingungen im Labor durchgeführt wird und dadurch die Sicherheit verbessert werden kann. Ein großes Problem besteht allerdings darin, dass herkömmliche *ex vivo* zellbasierte Gentransfer-Technologien aufwendig und teuer sind, da das Isolieren und Vermehren von Zellen erforderlich ist. Da translationale Forschung nicht nur wissenschaftlich interessant sein darf, sondern auch kosteneffektiv und in der Klinik praktisch umsetzbar sein muss, habe ich mir zum Ziel gesetzt, beschleunigte und klinisch anwendbare Gentransfer-Strategien zu entwickeln.

Zu Beginn meiner wissenschaftlichen Arbeit habe ich zunächst die osteogene Wirkung des rekombinanten Wachstumsfaktors Bone Morphogenetic Protein – 2 (rhBMP-2) mit der Verabreichung von hBMP-2 über einen adenoviralen Gentransfer (Ad.BMP-2) verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Bereitstellung des hBMP-2 durch die lokale Genexpression eine stärkere osteoinduktive Wirkung aufwies, als das rekombinante Protein. Daher wurde im nächsten Schritt ein direkter Gentransfer mittels Ad.BMP-2 in einem Knochendefektmodell kritischer Größe in Ratten untersucht. Das Ziel war die Entwicklung einer *in vivo* Gentherapie, der die Vision zugrunde lag, durch nur eine einzige perkutane Injektion von adenoviralem BMP-2 Gentransfervektor Knochen *in situ* zu generieren und somit einen kritischen Knochendefekt zu heilen. Dieser Ansatz zeigte vielversprechende Ergebnisse. Allerdings konnte eine komplette Heilung nicht in allen Versuchstieren herbeigeführt werden. Daher war das Ziel weiterführender Studien, die direkte Gentransferanwendung zu optimieren. Dies wurde, unter anderem, durch eine zeitverzögerte Verabreichung von Ad.BMP-2 um 5 bis 10 Tage erreicht. Der Effekt war

eine signifikant verbesserte Defektregeneration in den Femora, die erst 5 oder 10 Tage nach der Defektschaffung behandelt wurden, verglichen mit denen, die unmittelbar oder 24 Stunden nach der Defektschaffung mit Ad.BMP-2 behandelt wurden. Obwohl die verzögerte Anwendung eine signifikante Verbesserung darstellte, beinhaltet der direkte Genterapieansatz auch Nachteile und Risiken. Zum einen besteht eine, wenn auch geringe, Möglichkeit einer systemischen Verbreitung des adenoviralen Vektors und einer starken Immunreaktion, wobei wir dies in unseren Versuchen nicht beobachten konnten. Allerdings zeigte sich in mehreren Fällen, aufgrund von aus dem Defektbereich austretender Vektorsuspension, eine lokale, ektope Knochenbildung. Dies könnte im Patienten zu Funktionseinschränkungen und neurologischen Ausfällen führen. Daher war nun mein Ziel die Entwicklung einer Knochenregenerationsmethode, die, ähnlich wie der direkte Gentransfer, einfach anzuwenden ist, aber die Sicherheit eines *ex vivo* Gentransfers aufweist und die vorgenannten Nachteile eliminiert.

Da die zuvor durchgeführten Experimente auf eine besondere Rolle des umgebenden Muskelgewebes bei der Knochenregeneration hinwiesen und bekannt war, dass sich unter bestimmten Voraussetzungen Knochen in Muskelgewebe bilden kann (Fibrodysplasia ossificans progressiva), entstand die Idee, Muskelgewebestücke genetisch zu modifizieren und als osteo-regenerative Implantate zu verwenden. Dies stellt eine *ex vivo* Gentransfermethode dar, die auf der Implantation von gentransduzierten, autologen Gewebeimplantaten basiert, aber, im Gegensatz zu den meisten zellbasierten Methoden, auf eine Isolierung und längerfristige Kultivierung von Zellen verzichten kann. Stattdessen wurden komplette Muskelgewebestücke *ex vivo* mit Ad.BMP-2 gentransduziert. Um das osteoregenerative Potential zu evaluieren, wurden die so behandelten Implantate in unser etabliertes Versuchsmodell, d.h. in femorale Knochendefekte einer kritischen Größe in der Ratte implantiert. Die Ergebnisse dieser Studie ergaben eine deutlich schnellere Knochenregeneration im Vergleich zur direkten Gentransfermethode. Ausserdem führte die Implantation der genaktivierten Muskelfragmente zu einem robusteren, mechanisch belastbaren Regenerat, ohne ektope Knochenbildung.

Neben Muskelgewebe bietet sich auch subkutanes Fettgewebe als geeignetes Spendergewebe an, da es leicht zugänglich ist und in größeren Mengen, mit minimaler Spendermorbidity, zur Verfügung steht. Zudem war bereits bekannt, dass Fettstammzellen nach Isolation und nachfolgender osteogener Stimulation die Fähigkeit besitzen, osteogen

zu differenzieren und dadurch zur Regeneration von knöchernen Defekten beizutragen. Daher war das nächste Ziel meiner Arbeit zu untersuchen, ob auch genaktivierte Fettgewebefragmente zur Knochenregeneration verwendet werden können, ohne vorher die Zellen aus dem Gewebeverband zu isolieren und zu propagieren. Dazu wurden Ad.BMP-2 transduzierte Fettgewebestücke in unserem etablierten Rattendefektmodell evaluiert. Diese Studie zeigte, dass die subkutanen Fettgewebeimplantate nach Ad.BMP-2 Transduktion ebenfalls die Fähigkeit besitzen, Knochendefekte einer kritischen Größe in der Ratte zu regenerieren. Nun galt es herauszufinden, ob humanes subkutanes Fettgewebe in ähnlicher Weise die Fähigkeit besitzt, osteogen zu differenzieren und ob die Wachstumsfaktoren BMP-7 und BMP-9 eine noch effektivere osteogene Differenzierung herbeiführen. Dazu führten wir ein *in vitro* Experiment durch, bei dem humane subkutane Fettgewebefragmente entweder in nicht-osteogenem Medium, osteogenem Medium allein oder osteogenem Medium versetzt mit den Wachstumsfaktoren BMP-2, BMP-7 oder BMP-9 kultiviert wurden. Es zeigte sich, dass bereits das osteogene Medium allein zu einer signifikanten osteogenen Differenzierung des humanen Fettgewebes führte. Durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren (BMPs) konnte die osteogene Differenzierung der Fettgewebefragmente nochmals deutlich verbessert werden, wobei BMP-9 die effektivste osteogene Stimulation bewirkte.

Obwohl subkutanes Fettgewebe ein hervorragendes Spendergewebe darstellt und sich potentiell für die humane Knochenregeneration eignet, ist für Applikationen, die eine höhere mechanische Belastbarkeit der Implantate erfordern, Muskelgewebe zu bevorzugen. Daher interessierte ich mich dafür, ob wir das Regenerationspotential der Muskelimplantate optimieren können. Ein eigenes *in vitro* Experiment gab den Hinweis darauf, dass Muskelgewebe mit anliegendem Faszien Gewebe nach Ad.BMP-2 Transduktion zu einer höheren Expression von BMP-2 führt als Muskel ohne Faszie. Daher sollte in einer weiteren Studie die Fragen beantwortet werden, wie sich die Einbeziehung der Faszie auf die osteogene Differenzierung auswirkt und welche Ad.BMP-2 Dosierung als optimal erachtet werden kann. Dies erfolgte im Vergleich zu Muskel ohne Faszie und zu Fettgewebe. Dafür wurde das entsprechende Gewebe aus Spenderratten entnommen, *in vitro* mit verschiedenen Dosen von Ad.BMP-2 transduziert und für bis zu 90 Tage kultiviert. Es zeigte sich, dass die Ad.BMP-2 transduzierten Muskel/Faszie Gewebefragmente, im Vergleich zu den anderen Gruppen, eine höhere Proliferations- und

Transduktionsrate aufwiesen. Diese führte zu einer höheren Expression des Wachstumsfaktors BMP-2 im Vergleich zu den transduzierten Fettgewebebeziehungsweise Muskelfragmenten. Weiterhin zeigten sowohl die transduzierten Muskel/Faszie - Fragmente als auch die Muskelgewebefragmente einen höheren Grad der osteogenen Differenzierung als die Fettgewebefragmente. Eine Dosierung von  $4 \times 10^8$  pfu Ad.BMP-2 stellte sich als optimale Dosis bezüglich der osteogenen Differenzierung dar. Obwohl sich in dieser *in vitro* Studie hinsichtlich des Grades der osteogenen Differenzierung kein signifikanter Unterschied zwischen den Ad.BMP-2 transduzierten Muskel/Faszie – Fragmenten und den Muskelgewebefragmenten zeigte, könnte die höhere BMP-2 Expression *in vivo* durchaus zu einer optimierten Knochenregeneration führen, da *in vivo* auch lokale, osteogene Vorläuferzellen zur osteogenen Differenzierung angeregt werden und so zur Knochenregeneration signifikant beitragen. Dies schließe ich aus meinen früher durchgeführten Studien bei denen der Ad.BMP-2 Vektor direkt in die Knochendefekte injiziert wurde, ohne die Verwendung eines Gewebeimplantats, welches osteogen differenzierte Zellen zur Verfügung stellen kann. Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass die aus Muskelgewebe entnommenen Fragmente im Vergleich zu Fettgewebefragmenten einen höheren Grad an osteogener Differenzierung zeigten. Dies bestätigen unsere Ergebnisse aus den *in vivo* Studien, in denen ebenfalls die gentransduzierten Muskeltransplantate eine robustere Regeneration der Defekte erzielten. Daher traf ich die Entscheidung neben Fettgewebe auch weiterhin das regenerative Potential von Muskelgewebe zu untersuchen und zu optimieren. Aus diesem Grunde beschäftigte ich mich in der nächsten Studie mit dem Vergleich von Ad.BMP-2 transduzierten Muskel- bzw. Muskel/Faszie - Gewebefragmenten. Hierbei wurden die in der vorhergehenden Studie als optimale Dosis ermittelten  $4 \times 10^8$  pfu Ad.BMP-2 verwendet. Der Fokus war dabei auf die osteogene Differenzierung gerichtet. Daher wurden in dieser Studie unter anderem die Expression zusätzlicher Knochenmarker sowie die Kalzifizierung der Gewebefragmente untersucht. Das *in vitro* Experiment gab den Hinweis darauf, dass aufliegendes Faszienewebe zu einer stärkeren Genexpression führt und Muskel mit Faszie ein optimiertes osteo-regeneratives Implantat im Vergleich zu Muskel ohne Faszie darstellen könnte. In zukünftigen *in vivo* Experimenten soll daher die Knochenregeneration durch BMP-2 genaktiviertes Muskelgewebe mit aufliegender Faszie im Vergleich zu BMP-2 genaktiviertem Muskelgewebe ohne Faszie im etablierten

Knochendefektmodell in der Ratte untersucht werden. Das erfolgreichere osteo-regenerative Material soll dann im Großtiermodell Schaf erprobt werden.

Ein wichtiger Gegenstand meiner zukünftigen Arbeit wird zudem die Untersuchung möglicher unerwünschter Nebenwirkungen dieser beschleunigten *ex vivo* Gentherapie sein, weswegen ausführliche histopathologische und immunologische Studien durchgeführt werden sollen. Erst wenn die Unbedenklichkeit in präklinischen Tiermodellen nachgewiesen wurde, können Protokolle für klinische Studien erstellt werden, um das gentherapeutische Knochen-Tissue-Engineering klinische Realität werden zu lassen. Die in dieser Habilitationsschrift beschriebene und von mir mitentwickelte Methode der beschleunigten *ex vivo* Gentherapie unter Verwendung von genaktivierten Gewebefragmenten könnte zukünftig Chirurgen die Möglichkeit geben, intraoperativ ein autologes, osteo-regeneratives Implantat zu erzeugen, welches effektiv *in situ* Knochen generiert.

### **III. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass diese schriftliche Habilitationsleistung selbstständig verfasst und die Herkunft des verwendeten oder zitierten Materials ordnungsgemäß kenntlich gemacht ist.

München, den 10. Juni 2019

Dr. biol. hum. Oliver Bernd Betz

## IV. Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation

### Publikation 1

Meinel, L., Hofmann, S., **Betz, O.**, Fajardo, R., Merkle, H. P., Langer, R., Evans, C. H., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D. L. (2006). „Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2." Biomaterials **27**(28): 4993-5002. Impact-Factor: 8.8

### Publikation 2

**Betz, O. B.**, Betz, V. M., Nazarian, A., Pilapil, C. G., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T. A. and Evans, C. H. (2006). „Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects." J Bone Joint Surg Am **88**(2): 355-365. Impact Factor: 4.8

### Publikation 3

**Betz, O. B.**, Betz V. M., Nazarian, A., Egermann, M., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L. and Evans, C. H. (2007). „Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects." Gene Ther **14**(13): 1039-1044. Impact Factor: 3.2

### Publikation 4

**Betz, O.B.**, Betz, V.M., Abdulazim, A., Penzkofer, R., Schmitt, B., Schröder, C., Augat, P., Jansson, V. and Müller, P.E. (2009) „Healing of large segmental bone defects induced by expedited bone morphogenetic protein-2 gene-activated, syngeneic muscle grafts“. Hum Gene Ther **20**(12): 1589-96. Impact-Factor: 4,2

### Publikation 5

**Betz, O. B.**, Betz, V. M., Abdulazim, A., Penzkofer, R., Schmitt, B., Schroder, C., Mayer-Wagner, S., Augat, P., Jansson, V. and Müller, P. E. (2010). „The repair of critical-sized bone defects using expedited, autologous BMP-2 gene-activated fat implants." Tissue Eng Part A **16**(3): 1093-1101. Impact Factor: 4.8

### **Publikation 6**

Bondarava, M., Cattaneo, C., Ren, B., Thasler, W. E, Jansson, V., Müller, P. E. and **Betz, O. B.** (2017). „Osseous differentiation of human fat tissue grafts: From tissue engineering to tissue differentiation." Sci Rep **7**: 39712. Impact Factor: 4.1

### **Publikation 7**

Ren, B., Betz, V.M., Thirion, C., Salomon, M., Jansson, V., Müller, P.E. and **Betz, O.B.** „Gene-activated tissue grafts for sustained bone morphogenetic protein-2 delivery and bone engineering: Is muscle with fascia superior to muscle and fat?“ (2018). J Tissue Eng Regen Med **12**(4):1002-1011. Impact-Factor: 3,9

### **Publikation 8**

Ren, B., Betz, V. M., Thirion, C., Salomon, M., Jansson, V., Müller, P. E. and **Betz O.B.** (2018). „Osteoinduction within BMP-2 transduced muscle tissue fragments with and without a fascia layer: implications for bone tissue engineering." Gene Ther. **26**(1-2):16-28. Impact Factor: 3.2

## V. Hauptteil

### 1. Einleitung

#### 1.1 Klinische Relevanz

Als klinischer „Goldstandard“ für die Behandlung von Knochendefekten und Pseudarthrosen sowie für die Fusion von Wirbelkörpern und in der Revisionsendoprothetik gilt die Transplantation von autologem Knochen. Nachteile dieses Vorgehens sind jedoch die begrenzte Verfügbarkeit von autologem Knochen, Schmerzen und Empfindungsstörungen an der Entnahmestelle, ein erhöhtes Infektionsrisiko und ein begrenzter Erfolg [62, 16, 21]. Große segmentale Knochendefekte kombiniert mit schweren Weichteildefekten können durch die Masquelet-Technik behandelt werden [55]. Diese Methode erfordert zwei operative Eingriffe im Abstand von 6 bis 8 Wochen bis sich eine Pseudoperiostmembran um einen Zementspacer gebildet hat und ebenfalls die Transplantation von autologem Knochen [32]. Auch die Distractionsosteogenese nach Ilizarov kann zur Behandlung großer segmentaler Knochendefekte eingesetzt werden [52, 54]. Allerdings ist dieses Vorgehen sehr langwierig, schmerzhaft, mit dem Risiko einer Pininfektion und einer starken Beeinträchtigung der Patienten verbunden [64]. Daher wird weltweit an neuen molekularen Methoden zur Stimulation der Osteogenese gearbeitet. Knochenwachstumsfaktoren wurden entdeckt und die sogenannten Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) rückten in den Fokus von Wissenschaftlern. Die rekombinanten Proteine BMP-2 und BMP-7 wurden schließlich für den klinischen Einsatz für bestimmte Indikationen zugelassen, wobei sie bisher vor allem in den Bereichen der Wirbelsäulen- und Oralchirurgie (häufig im „off-label-use“) Anwendung fanden. 2008 warnte die „Food and Drug Administration“ (FDA) in den USA jedoch vor ernsthaften Komplikationen in Verbindung mit der Verwendung von BMPs im Bereich der Halswirbelsäulen Chirurgie [35], da bei Patienten Schluckstörungen, Schwellungen und ektope Knochenbildung aufgetreten waren [30, 84]. Mitverantwortlich für das Auftreten solcher unerwünschten Nebenwirkungen wurde die gegenwärtige Methode der Verabreichung solcher Wachstumsfaktoren gemacht. Als rekombinante Proteine müssen die BMPs in sehr großen, supraphysiologischen Mengen appliziert werden, da sie aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeit schnell im Körper abgebaut werden [86]. Diese großen Mengen an Protein können sich im Körper verteilen und verbleiben nicht genau am Ort der Applikation. Das

Ziel weiterer Entwicklungen ist daher, BMPs lokal begrenzt, in geringen Mengen über einen ausgedehnten Zeitraum freizusetzen. Dies ist mit Hilfe von Gentransfer-Technologien möglich, wobei es zusätzlich Hinweise darauf gibt, dass endogen synthetisierte Proteine eine bessere biologische Wirksamkeit als exogene rekombinante Proteine besitzen [26]. Es gibt nun verschiedene gentherapeutische Ansätze mit Hilfe derer in präklinischen Modellen ein erfolgreiches *in situ* Knochen-Tissue-Engineering erreicht wurde. Gentransfer-Vektoren, osteoinduktive Gene, sowie bisher erzielte Erfolge und Vor- und Nachteile von *in vivo* und *ex vivo* Gentransfer-Strategien werden nachfolgend vorgestellt.

## 1.2 Gentransfer-Vektoren

Als Vehikel für den Transport von genetischem Material in Zellen werden virale Vektoren oder nicht-virale Vektoren benutzt, wobei virale Vektoren momentan als die effektivsten Gen-Vehikel angesehen werden. Es wird die Eigenschaft von Viren genutzt, mit einer sehr hohen Effizienz in Zellen einzudringen und genetisches Material in den Zellkern einzubringen. Die für das gentherapeutische Knochen-Tissue-Engineering verwendeten viralen Vektoren enthalten dabei keine pathogenen Gensequenzen mehr, sondern tragen stattdessen osteoinduktive Gene in sich. Die am häufigsten verwendeten viralen Gentransfervektoren basieren auf Adenoviren (Ad), Adeno-assoziierten Viren (AAV), Retroviren (RV) und Lentiviren (LV). Adenovirale Vektoren zeichnen sich dadurch aus, dass hohe Konzentrationen in aufgereinigter Form relativ einfach und kostengünstig hergestellt werden können [92]. Zudem können adenovirale Vektoren eine große Bandbreite verschiedener Zellen infizieren und eine starke Genexpression über mehrere Wochen herbeiführen [20]. Die Eigenschaften von adenoviralen Vektoren erscheinen besonders vorteilhaft für das Knochen-Tissue-Engineering, da Adenoviren ihr genetisches Material nicht ins Genom der Wirtszelle integrieren und nur eine vorübergehende Genexpression bewirken [53, 20]. Aus diesen Gründen habe ich in meinen eigenen Experimenten adenovirale Gentransfervektoren eingesetzt. Die in verschiedenen Gentherapie-Studien ebenfalls häufig eingesetzten Adeno-assoziierten Viren gelten als besonders sicher, weil sie nicht pathogen und nur gering immunogen sind [19]. Allerdings ist die Transduktionseffizienz geringer als die von Adenoviren und die Herstellung von Adeno-assoziierten Viren ist im Moment noch aufwendig und teuer [85]. Retrovirale und lentivirale Vektoren hängen bezüglich ihrer Transduktionskapazität von der Zellteilung ab

und integrieren das genetische Material ins Genom der Wirtszelle. Dadurch wird eine langanhaltende, stabile Genexpression erreicht, was für die Regeneration sehr großer Knochendefekte hilfreich sein könnte. Die Sicherheit und Steuerbarkeit der Therapie mit Retro- und Lentiviren wurde durch neueste Entwicklungen deutlich verbessert [77]. Nicht-virale Gentransfervektoren werden generell als sicherer erachtet, haben jedoch den Nachteil, dass die Transfektion nicht sehr effizient ist und die Dauer der Genexpression relativ kurz ist [83]. Die Elektroporation [71], die Sonoporation [49] und die Magnetofektion [46] gelten hierbei als vielversprechende Methoden, um die Übertragung von genetischem Material auf Zellen zu verbessern.

### 1.3 Osteoinduktive Gene

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind die Knochenwachstumsfaktoren, die bisher am besten erforscht und auch am häufigsten in Genthapiestudien eingesetzt wurden [28, 34, 47, 76, 5]. BMPs binden an spezifische membranständige Rezeptoren und lösen dadurch eine Signalkaskade aus, durch die eine Knochenbildung sowohl an orthotoper als auch an heterotoper Stelle mittels autokriner und parakriner Signalwege eingeleitet werden kann. Eine starke Wirkung haben die BMPs hierbei vor allem auf die osteogene Differenzierung und Proliferation von Stammzellen [80]. Ein Vergleich der osteogenen Aktivität von 14 verschiedenen BMPs zeigte, dass BMP-2, -6, -7 und -9 die stärkste Wirkung haben [37]. Da BMP-2 und -7 als rekombinante Proteine bereits klinisch zugelassen wurden, habe ich in meinen genterapeutischen Studien diese Moleküle verwendet. Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ebenfalls ein sehr gut erforschter Wachstumsfaktor, der die Bildung von Knochengewebe fördert, indem die Angiogenese angeregt wird. In Experimenten wurde gezeigt, dass VEGF synergistisch zu BMP-2 und BMP-4 wirkt und die Knochenregeneration über die Stimulation der Gefäßeinsprossung und durch das Anlocken von Stammzellen verbessert wird [67]. Auch transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) ist beteiligt an der Entstehung von Knochen und spielt eine wichtige regulierende Rolle für die Zusammensetzung der Knochenmatrix und die daraus entstehenden biomechanischen Eigenschaften von Knochen [27]. Die experimentelle Gabe von TGF- $\beta$ 1 führte zu einer vermehrten Kallusbildung und zu einer erhöhten mechanischen Stabilität im Vergleich zu unbehandelten Frakturen [51]. Insulin-like growth factor (IGF) beeinflusst die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten und fördert die Kollagensynthese [40]. Sowohl systemisch [87] als auch lokal [57] verabreicht regte IGF-1 die

Kochenheilung an. Für die Kombination von IGF-1 / TGF- $\beta$ 1 wurden im Hinblick auf die Knochenbildung starke synergistische Effekte beschrieben [79]. Auch fibroblast growth factor (FGF) veranlasst die Proliferation und weitere Differenzierung von Knochenvorläuferzellen. FGF stimulierte in einer experimentellen Studie die Frakturheilung in Primaten [39] und verbesserte in einer klinischen Studie die Knochenheilung beim Menschen [38]. Runt-related transcription factor (Runx2) trägt zur enchondralen Knochenbildung bei [56] und ist unerlässlich für eine normale Knochenentwicklung, wie in knock-out Studien nachgewiesen wurde [41, 63]. Runx2 transduzierte Knochenmarkzellen trugen in einer tierexperimentellen Studie zu einer verbesserten Regeneration von Schädeldefekten bei [98]. LIM mineralization protein (LMP) ist ein intrazelluläres Protein, welches direkt an der Osteoblastendifferenzierung beteiligt ist. Im Gegensatz zu BMPs, deren Wirkung als extrazelluläre Proteine über Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt wird, kann eine Therapie mit LMP nur durch Gentransfer erfolgen und nicht in Form eines rekombinanten Proteins. In Experimenten regte der Gentransfer von LMP-1 Zellen zur Produktion von BMP-2, -4, -6 und -7 *in vitro* an [96] und *in vivo* führte solch ein Gentransfer zu einer erfolgreichen Wirbelkörperfusion [17].

#### **1.4 *In vivo* Getherapie**

Bei der *in vivo* Getherapie findet der Gentransfer im Körper statt. Die Gentransfervektoren können entweder injiziert oder in Verbindung mit einem Biomaterial verabreicht werden. Auf diese Weise kommt es erst im Bereich bestimmter anatomischer Strukturen zur Transduktion oder Transfektion von dort ansässigen Zellen. Die *in vivo* Methode ist weniger aufwendig als die *ex vivo* Getherapie, da eine Entnahme und anschließende Isolation und Expansion von autologen Zellen nicht notwendig ist. Eine einzige perkutane Injektion von adenoviralen BMP-2 Vektoren reichte in Tierexperimenten aus, um große segmentale Knochendefekte zu reparieren [4, 9]. Eine Studie an Kaninchen hat gezeigt, dass das Transgen nach einer solchen Vorgehensweise hauptsächlich im Bereich des Knochendefektes und nur in kaum zu detektierenden Mengen an anderen Orten des Körpers exprimiert wird [3]. Eigene Studien demonstrierten die Effektivität der Methode im Rattenmodell [9] und untersuchten den Effekt einer verzögerten Vektorapplikation. Dabei wurde der adenovirale BMP-2 Vektor am 1., 5., oder 10. postoperativen Tag in den femoralen Knochendefekt injiziert. Es zeigte sich hierbei,

dass eine verzögerte Injektion zu einer besseren Heilung des Defektes führt [8]. Eine weitere eigene Studie verglich die Wirkung unterschiedlicher Mengen an adenoviralen BMP-2 Vektoren auf die Regeneration segmentaler Knochendefekte [11]. Die ursprüngliche Hypothese war, dass geringere Mengen an adenoviralem Vektor weniger immunogen wirken und daher eine verbesserte Osteogenese erlauben würden. Jedoch zeigte sich, dass die höchste Dosis die effektivste war und 100% der Defekte regenerierte. Allerdings nahm mit der Erhöhung der Vektordosis auch das Risiko der heterotopen Knochenbildung zu. Die Effektivität der direkten Injektion von viralen Vektoren wurde auch in anderen Modellen bestätigt. So wurde durch die Verabreichung von adenoviralen BMP-2 oder BMP-9 Vektoren die Reparatur von Defekten einer kritischen Größe in der Mandibula von Ratten erreicht [1], und die Injektion von adenoviralen BMP-6 Vektoren führte zur Wirbelfusion in Kaninchen [45]. In Großtierversuchen an Schafen konnte jedoch durch adenovirale BMP-2 *in vivo* Gentherapie keine Anregung der Knochenheilung erreicht werden [25]. Da Antikörper und Entzündungszeichen nachgewiesen werden konnten, wurde eine Immunreaktion gegen den adenoviralen Vektor hierfür verantwortlich gemacht. Aktuell wird daher an der Entwicklung verbesserter viraler Gentransfervektoren gearbeitet. Besonders vielversprechend zeigt sich hier eine neue Generation von adenoassoziierten Vektoren, die eine geringere Immunogenität aufweist [44].

### **1.5 Traditionelle *ex vivo* Gentherapie**

Bei der *ex vivo* Gentherapie erfolgt der Gentransfer außerhalb des Körpers. Diese Methode erlaubt es, bestimmte Zellen auszuwählen, genetisch zu verändern und an einer gewünschten Stelle des Körpers zu implantieren. Da kein freier Gentransfervektor in den Körper eingebracht wird, ist die *ex vivo* Methode sicherer als die *in vivo* Gentherapie. Daneben wird auch eine verbesserte Transduktions- und Transfektionseffizienz erreicht, da der Gentransfer unter kontrollierten Bedingungen im Labor stattfindet. *Ex vivo* Gentransfer-Knochenheilungsstudien wurden erfolgreich mit verschiedenen Zelltypen durchgeführt. So konnten segmentale Knochendefekte im Rattenfemur mit adenoviral BMP-2 transduzierten Knochenmarkzellen innerhalb von 12 Wochen regeneriert werden. Dabei zeigte sich ein besseres Ergebnis durch die BMP-2 produzierenden Zellen als durch die Behandlung mit rekombinantem BMP-2 [50]. Erklärt wurde dies durch die langanhaltende und gleichmäßige Abgabe von physiologischen Mengen an BMP-2, welche durch die Gentherapie im Gegensatz zur Proteintherapie erreicht wird. Auch eine

Wirbelkörperperfusion konnte im Rattenmodell durch die Implantation von adenoviral BMP-2 transduzierten Knochenmarkzellen erreicht werden [68]. Knochenmarkzellen, welche nicht genetisch modifiziert waren, konnten im Gegensatz dazu in der Kontrollgruppe keine Wirbelkörperperfusion auslösen. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Transduktion von Knochenmarkzellen mit einem lentiviralen BMP-2 Vektor zu einer verlängerten BMP-2 Expression und einer verbesserten Knochenheilung im Vergleich zur adenoviralen Transduktion führt [90]. Auch der nicht-virale Gentransfer wurde angewendet, um Knochenmarkzellen mit einem osteo-induktiven Gen zu beladen. Hierbei konnten Knochenmarkzellen erfolgreich durch Elektroporation transfiziert werden und die Implantation dieser Zellen führte zur Knochenbildung *in vivo* [2]. Park et al. transfizierten Knochenmarkstammzellen erfolgreich mit Hilfe von Liposomen und reparierten durch Implantation dieser BMP-2 produzierenden Zellen Knochendefekte in der Mandibula von Ratten [65]. Auch mit Hilfe der Elektroporation konnten BMP-2 und BMP-9 produzierende Knochenmarkzellen hergestellt werden, die die Knochenbildung im Versuchstier anregten [2]. Fettgewebe enthält ebenfalls viele Stammzellen, die sich zur Therapie von Knochenläsionen eignen [29]. Es wurde demonstriert, dass humane Fettstammzellen *in vitro* unter Einfluss von BMPs in osteogene Zellen differenzieren können [24]. Femorale Knochendefekte in Ratten konnten durch die Implantation adenoviral BMP-2 transduzierter humaner Fettstammzellen repariert werden [69]. Auch die lentivirale Transduktion mit BMP-7 führte dazu, dass Fettstammzellen die Regeneration von Knochendefekten in Ratten verbesserten [72]. In einer weiteren Studie wurde die Elektroporation erfolgreich eingesetzt, um BMP-2 und BMP-6 exprimierende Fett- und Knochenmarkzellen herzustellen, welche eine *in vivo* Osteogenese hervorriefen [60]. In dieser Untersuchung waren die transfizierten Knochenmarkzellen den Fettzellen hinsichtlich der osteogenen Wirkung überlegen. Multipotente Fettstammzellen können nicht nur aus subkutanem Fettdepot, sondern auch aus dem infrapatellaren Fettkörper gewonnen werden [23]. Damit stellt dies insbesondere für Orthopäden und Unfallchirurgen eine sehr attraktive Quelle für Stammzellen dar. Multipotente Stammzellen für die *ex vivo* Gentherapie können jedoch auch aus Muskelgewebe gewonnen werden. Es wurde eindrucksvoll durch eine Reihe von Experimenten dargelegt, dass genetisch veränderte Muskelstammzellen in Knochenzellen differenzieren und in verschiedenen Tiermodellen zur Knochenbildung beitragen. Eine Knochenbildung konnte sowohl an orthotoper als auch an heterotoper Stelle durch die Implantation von retroviral BMP-4 transduzierten

Muskelstammzellen ausgelöst werden [95]. Interessanterweise konnte sogar ein sehr großer (7 mm) segmentaler Defekt im Rattenfemur durch BMP-4 transduzierte Muskelstammzellen so effektiv regeneriert werden, dass diese Femora nach 12 Wochen so stabil wie intakte, kontralaterale Femora waren [82]. Durch ein weiteres Experiment wurde demonstriert, dass humane BMP-2 transduzierte Muskelstammzellen dasselbe Potential zur Osteoinduktion besitzen wie humane Stammzellen aus dem Knochenmark [31]. Nicht-transduzierte Stammzellen konnten in diesem Experiment keine relevante Knochenregeneration auslösen. Dieselbe Arbeitsgruppe erforschte zudem den synergistischen Effekt von BMP-2 transduzierten Muskelzellen zusammen mit VEGF transduzierten Muskelzellen auf die Heilung eines Knochendefektes [66]. Hier zeigte sich eine weitere Verbesserung der Knochenheilung durch den Einfluss von VEGF im Sinne einer beschleunigten Knorpelresorption und verstärkten Mineralisierung.

### **1.6 Beschleunigte *ex vivo* Gentherapie**

Das Potential der konventionellen *ex vivo* Gentherapie für den Bereich des muskuloskelettalen Tissue-Engineering wurde in zahlreichen präklinischen Studien aufgezeigt. Jedoch hat diese Methode schwerwiegende Nachteile, die eine breite klinische Anwendung verhindern. Das Vorgehen erfordert zwei separate operative Eingriffe: einen ersten Eingriff für die Entnahme von Gewebe und einen zweiten für die Implantation der genetisch modifizierten Zellen. Die Zellen müssen in einem spezialisierten Labor unter „Good Manufacturing Practice“ (GMP) Bedingungen über Wochen extrahiert, kultiviert und vermehrt werden. Durch die Langzeitkultivierung kann es zu nachteiligen Zellveränderungen kommen und es besteht ein erhöhtes Risiko der Kontamination. Die traditionelle *ex vivo* Gentherapie ist also aufwendig, langwierig und dadurch mit signifikanten Kosten verbunden, die eine weite Verbreitung erschweren oder verhindern. Aus diesen Gründen konzentriert sich meine Arbeit darauf, Gentherapie-Strategien zu entwickeln, die als vereinfachte, beschleunigte Methoden auch für den klinischen Einsatz attraktiv sind. Wie erstmals 2009 durch Betz et al. [6] gezeigt, können osteoinduktive Gene – ohne vorherige Isolation und Expansion von Zellen - direkt auf oberflächlich liegende Zellen autologer Muskelgewebestücke erfolgreich übertragen werden. Der adenovirale BMP-2 Gentransfer führte dazu, dass die Muskelfragmente BMP-2 über mindestens 30 Tage *in vitro* produzierten. Die Implantation dieser BMP-2 genaktivierten Muskelgewebestücke in femorale Knochendefekte einer kritischen Größe führte in nur 6

Wochen zur strukturellen und funktionellen Heilung. In einer weiteren eigenen Studie in Ratten konnte gezeigt werden, dass diese Methode zur Behandlung großer Knochendefekte ähnlich effektiv ist wie die autologe Knochen transplantation [10]. BMP-2 transduzierte Muskelgewebeimplantate regenerierten 100% der behandelten femoralen Knochendefekte und führten somit zu besseren Ergebnissen als BMP-7 genaktiviertes Muskelgewebe [12]. Ähnliche Studien wurden von der eigenen Arbeitsgruppe mit genaktivierten Fettgewebeimplantaten durchgeführt. Auch mit BMP-2 genaktiviertem subkutanem Fettgewebe konnte eine Regeneration von segmentalen Knochendefekten im Rattenmodell erreicht werden [7]. Wie im Falle von Muskelgewebe führte die BMP-7 Transduktion von Fettgewebestücken im Vergleich zur Modifikation mit BMP-2 zu einer geringeren Heilungsrate im Knochendefektmodell [13]. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass Muskelgewebe im Vergleich zu Fettgewebe sowohl eine etwas stärkere Tendenz zur osteogenen Differenzierung aufweist als auch eine bessere Formstabilität besitzt und sich daher als osteo-regeneratives Implantat besonders gut eignet. Auf den folgenden Seiten werden die eigenen Studien, die zur Entwicklung einer beschleunigten *ex vivo* Gentherapie zur Knochenregeneration, unter Verwendung von Muskel- und Fettgewebe beigetragen haben, detailliert beschrieben.

## 2. Material und Methoden

### In vitro - Studien: (Publikationen 1 und 6 - 8)

Für die *in vitro* Untersuchungen in Publikation 1 wurden humane mesenchymale Stammzellen (MSCs) auf einem Seidenkonstrukt (5 mm Durchmesser, 2 mm Dicke) angesiedelt und über 4 Wochen in osteogenem Medium kultiviert. Die MSCs wurden zuvor mit Ad.BMP-2 oder dem Kontrollgen Ad.GFP transduziert. Eine weitere Gruppe wurde nicht gentransduziert. Stattdessen wurde dem Kulturmedium dieser Gruppe humanes, rekombinantes Bone Morphogenetic Protein 2 in einer Dosierung analog zur Ad.BMP-2 Proteinexpression zugefügt. Die Effektivität der Gentransduktion wurde mittels FACS - Analyse ermittelt. Für die Messung der Expression der Knochenmarker Osteopontin, Osteokalzin, Bonesialoprotein, sowie die Expression von Bone Morphogenetic Protein -2 wurde die RNA aus den Konstrukten isoliert und mittels PCR quantifiziert.

Für die Publikation 6 wurde humanes Fettgewebe von 5 Patienten über eine Gewebebank bezogen. Das Fettgewebe wurde dann mit PBS, welchem Penicillin, Streptomycin und Amphotericin zugesetzt wurde, gewaschen. Anschließend wurden, mit einer Hautbiopsiestanze, Fettgewebefragmente von ungefähr 2mm Durchmesser hergestellt. Die Fragmente wurden dann in 50 Mikrolitern eines Kollagen 1 Gels in einer 96 well plate eingebettet. Nach der Polymerisierung des Kollagen 1 Gels wurde den Gewebefragmenten entweder Kulturmedium (Ham's F12/DMEM) oder osteogenes Medium allein oder mit den rekombinanten Proteinen rhBMP-2, rhBMP-7 oder rhBMP-9 versetztes osteogenes Medium zugegeben und dann wurde das Gewebe für maximal 4 Wochen kultiviert. Die Zellproliferation wurde nach 24 Stunden, 1, 2 und 4 Wochen mittels des WST-1 Tests untersucht. Für die histologische Auswertung wurden die Fettgewebekulturen in Tissue-Tek eingebettet und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren, woraufhin histologische Schnitte mit einem Mikrotom hergestellt wurden. Die histologischen Schnitte wurden dann entweder mit Alizarin Rot oder der Von Kossa Methode angefärbt. Um die Expression von Alkalischer Phosphatase und Osteokalzin zu ermitteln wurde mRNA, nach 1, 2 oder 4 Wochen in Kultur, aus den Fettgewebefragmenten isoliert, und eine quantitative PCR-Analyse durchgeführt.

Für die Untersuchungen der Publikationen 7 und 8 wurde ein Gewebekultur-System verwendet, mit Hilfe dessen die osteogenen Effekte von Knochenwachstumsfaktoren auf

Gewebefragmente nach Transduktion untersucht werden kann. Hierfür wurde Muskelgewebe mit und ohne aufliegender Faszie (Publikation 8) und zusätzlich Fettgewebe (Publikation 7) von den Hinterläufen von Spenderratten entnommen. Das Gewebe wurde dann mit einem Skalpell zerteilt und mit Hilfe einer Hautbiopsiestanze wurden Gewebefragmente einer standardisierten Größe (4 mm Durchmesser und ca. 1 mm Dicke) hergestellt. Dann wurden die Gewebestücke mit verschiedenen Konzentrationen an adenoviralem BMP-2 Vektor in Kontakt gebracht und für 1 Stunde bei 37° Celsius in einem Brutschrank inkubiert. Zur Analyse der Transduktionseffizienz wurden einige Gewebefragmente auch mit einem GFP-Markergen transduziert. Jeweils 4 Gewebestücke wurden für bis zu 90 Tage in 24-well-plates in Kultur gehalten. Nach 48 Stunden wurde die Transduktionseffizienz nach adenoviraler GFP-Transduktion durch mikroskopische Aufnahmen visualisiert und durch Anwendung einer morphometrischen Auswertung auch quantifiziert. Nach 1, 2, 3 und 4 Wochen wurde der Effekt der Transduktion mit BMP-2 auf die Zellproliferation mittels eines WST-1 Tests untersucht. Über bis zu 90 Tage wurde die Produktion von BMP-2 durch die Gewebestücke unter Verwendung eines ELISA analysiert. PCR diente zur Untersuchung der osteogenen Differenzierung der Gewebe unter Einfluss des BMP-2 nach 2 und 4 Wochen. Zudem wurden histologische Schnitte angefertigt, die zur Detektion von Kalzium mit Alzarin Rot angefärbt wurden und zum Nachweis von knochenspezifischen Proteinen immunhistochemisch aufgearbeitet wurden. Als Kontrollen dienten Gewebestücke, die entweder in normalem Zellkulturmedium ohne osteogene Zusätze oder in osteogenem Medium ohne BMP-2 Transduktion kultiviert wurden.

#### *In vivo* - Studien: (Publikationen 2 bis 5)

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurde ein etabliertes Knochendefektmodell in der Ratte verwendet. In den rechten Femora männlicher Ratten wurden segmentale Knochendefekte einer kritischen Größe (5 mm) mit Hilfe einer Kugelfräße geschaffen. Die Knochendefekte wurden dann durch einen externen (Publikationen 2 und 3) oder internen Fixateur (Publikationen 4 und 5) stabilisiert. Die gentherapeutische Behandlung der Knochendefekte erfolgte entweder durch die perkutane Injektion adenoviraler BMP-2 Vektoren (Publikationen 2 und 3), oder durch die Implantation von BMP-2 genaktiviertem Muskelgewebe (Publikationen 4) oder BMP-2 genaktiviertem Fettgewebe (Publikation 5). Obwohl die Methode das Potential zur intraoperativen Anwendung mit

Verpflanzung von autologem Gewebe hat wurde das Muskelgewebe bzw. Fettgewebe in den Experimenten aus praktischen Gründen Spenderratten entnommen. Die Transplantation des Gewebes von einer Spenderratte in eine Empfängerratte war ohne Abwehrreaktionen möglich, da die verwendeten Fischer 344 Ratten genetisch identisch sind. Das Muskel- bzw. Fettgewebe wurde nach der Entnahme aus den Spenderratten mit einem Skalpell zerteilt. Durch eine Hautbiopsiestanze wurden dann Implantate einer standardisierten Größe mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Dicke von ca. 1 mm geschaffen. Die Transduktion der Gewebefragmente erfolgte durch Zugabe einer Vektorlösung und anschließender Inkubation im Brutschrank bei 37° Celsius für 1 Stunde. Kontrollgruppen erhielten entweder unbehandelte (nicht genaktivierte) Gewebeamplantate oder Gewebeamplantate, die mit einem nicht-osteoinduktiven Markergen (GFP) transduziert waren oder die Defekte blieben komplett unbehandelt (Leerdefekte). Vor der Implantation wurden die Muskel- und Fettimplantate mit isotonischer Kochsalzlösung mehrfach abgewaschen, um keinen freien Gentransfervektor in die Tiere einzubringen. 5 Gewebestücke wurden dann „press fit“ in den 5 mm großen Knochendefekt eingesetzt. Nach 8 Wochen (Publikation 2 und 3) beziehungsweise 6 Wochen (Publikationen 4 und 5) wurde die Regeneration der Knochendefekte untersucht. Zur Evaluation der Knochenheilung dienten Röntgenaufnahmen, Mikro-Computertomografie, Knochendichte- und Knochenvolumenmessungen, histologische Schnitte und biomechanische Torsionstests.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Publikation 1

Meinel, L., Hofmann, S., **Betz, O.**, Fajardo, R., Merkle, H. P., Langer, R., Evans, C. H., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D. L. (2006). „Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2." Biomaterials **27**(28): 4993-5002. Impact-Factor: 8.8

Nachdem ein Teil der Knochenforscher erkannten, dass die klinische Verabreichung von supraphysiologischen Dosen an rekombinanten BMP-2 als Protein zur Knochenregeneration mit signifikanten Nachteilen verbunden ist, begann ich die Mitarbeit in einem Projekt, welches, als ersten Schritt in der Entwicklung einer verbesserten Therapie zur Knochenregeneration, das osteogene Potential der adenoviralen Gentransduktion (Ad.BMP-2) und nachfolgender Genexpression von hBMP-2 mit dem osteogenen Potential von externer Zugabe des rekombinanten humanen BMP-2-Proteins (rhBMP-2) untersuchte. Hierfür wurden humane, mesenchymale Stammzellen (MSCs) adenoviral mit hBMP-2 transduziert, während eine zweite Untersuchungsgruppe mit einem rekombinanten hBMP-2, das in Mengen zugegeben wurde die dem Zeitprofil des genexprimierten BMP-2 der ersten Gruppe entsprach, auf ein Seidenkonstrukt angesiedelt und über vier Wochen in osteogenem Medium kultiviert. Es zeigte sich, dass sowohl die MSCs der mit exogenem Protein behandelten Gruppe, als auch die Gruppe die gentransduziert wurde, eine hohe Expression der Knochenmarker Osteopontin und Bone Sialoprotein aufwiesen. Die Untersuchung mit Hilfe der Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT) ergab, dass die Zellen eine Knochenmatrix auf dem Seidenkonstrukt ausbildeten, die nach einem Mineralisierungsprozess knöcherne „Cluster“ auf den Seidenfasern bildete. Die Untersuchung der Menge an mineralisiertem Knochengewebe zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen. Jedoch zeigte die Ad.BMP-2 Gruppe eine signifikant höhere Expression der osteogenen Marker sowie der Alkalischen Phosphatase, ohne sich negativ auf die Proliferationsrate oder die Kapazität der Zellen mineralisierte Knochenmatrix zu bilden, auszuwirken. Die Ergebnisse zeigen, dass adenovirale hBMP-2 Transduktion und Expression eine effektive Alternative zu exogen verabreichten Wachstumsfaktoren sein kann.

### 3.2. Publikation 2

**Betz, O. B.**, Betz, V. M., Nazarian, A., Pilapil, C. G., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T. A. and Evans, C. H. (2006). „Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects." J Bone Joint Surg Am **88**(2): 355-365. Impact Factor: 4.8

Nachdem wir zeigen konnten, dass adenoviraler Gentransfer von rhBMP-2 Genen eine vielversprechende Alternative zum Einsatz von rekombinanten Proteinen sein kann, wurde diese Methode *in vivo* in einem etablierten, segmentalen Knochendefektmodell kritischer Größe in Rattenfemora untersucht. Da der Einsatz von *ex vivo* transduzierten autologen Stammzellen zwei operative Eingriffe erfordert und mit hohem Aufwand und dadurch höheren Kosten verbunden ist, wurde hier ein direkter Gentransfer-Ansatz untersucht. Diese Methode beinhaltet die Möglichkeit einer beschleunigten und weniger kostspieligen Anwendung. Hierfür wurden Knochendefekte in den Femora von 48 ausgewachsenen Sprague-Dawley Ratten geschaffen. 24 Stunden nach der Defektschaffung erhielt jeder Defekt eine einmalige, intraläsionale, perkutane Injektion bestehend entweder aus einer Ad.BMP-2 Suspension oder einer adenoviralen Vektor – Suspension, die die cDNA für das Markergen Luciferase transportierte (Ad.luc). In einer weiteren Kontrollgruppe blieb der Defekt unbehandelt. Die Defektheilung wurde in wöchentlichem Abstand radiologisch dokumentiert. Nach jeweils 8 Wochen wurde das Experiment beendet und die Femora post mortem mit Hilfe von dual energy x-ray absorptiometry (DEXA), Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT), histologischer Analyse, Histomorphometrie und torsionaler mechanischer Testung untersucht. Im Röntgenbild erschienen 75 % der mit Ad.BMP-2 behandelten Defekte überbrückt. Der Knochenmineralgehalt in den Ad.BMP-2 ( $0,045 \pm 0,020$  g) behandelten Defekten war ähnlich dem der kontralateralen, intakten Femora ( $0,047 \pm 0,003$  g). Histologisch waren 50 % der Ad.BMP-2 behandelten Defekte mit lamellarem, trabekulärem Knochen überbrückt. Die anderen 50 % zeigten Inseln aus Knorpelgewebe. Die Kontrolldefekte in die Ad.luc injiziert wurde sowie die unbehandelten Defekte waren mit fibrösem Bindegewebe gefüllt. Die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung zeigten große Unterschiede in den gebildeten Knochenarealen im Defektbereich zwischen der Ad.BMP-2 Gruppe ( $3,25 \pm 0,67$  mm<sup>2</sup>) und der Kontrollgruppe ( $0,65 \pm 0,67$  mm<sup>2</sup>). Nach 8 Wochen hatten die mit Ad.BMP-2 behandelten Femora ungefähr ein Viertel der Festigkeit

( $0,07 \pm 0,04$ ) und der Steifigkeit ( $0,5 \pm 0,04$  Nm/rad) verglichen mit kontralateralen Femora ( $0,3 \pm 0,08$  Nm bzw.  $2,0 \pm 0,5$  Nm/rad).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass eine einmalige, perkutane, intraläsionale Injektion mit Ad.BMP-2 die Knochenregeneration in einem Rattenfemur initiieren kann. Nach 8 Wochen bestand das regenerierte Gewebe vorwiegend aus trabekulärem Knochen, welcher die Zunahme der mechanischen Festigkeit erklärt. Daher schlossen wir aus den Ergebnissen, dass die direkte Injektion von Ad.BMP-2 in einen knöchernen Defekt das Potential hat, größere Knochendefekte zu regenerieren, sofern ein ausreichender Weichteilmantel gegeben ist.

### 3.3 Publikation 3

**Betz, O. B.**, Betz V. M., Nazarian, A., Egermann, M., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L. and Evans, C. H. (2007). „Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects.“ Gene Ther **14**(13): 1039-1044. Impact Factor: 3.2

Nachdem meine Kollegen und ich zeigen konnten, dass eine direkte, lokale Verabreichung von Ad.BMP-2 femorale Knochendefekte einer kritischen Größe in Ratten regenerieren kann, jedoch das Heilungsergebnis teilweise suboptimal war, arbeiteten wir als nächstes an der Verbesserung der Qualität und der Verlässlichkeit des direkten Gentransfers. Da bekannt war, dass in den Tagen nach einer Knochenverletzung eine Einwanderung von Zellen in das verletzte Knochengewebe stattfindet, stellten wir die Frage, ob eine verzögerte Injektion der Ad.BMP-2 Vektoren daher zu der zuvor erwähnten Verbesserung der Knochenheilung führen kann, da diese Zellen, zusätzlich zum umgebenden Weichgewebe zur Erhöhung der BMP-2 Expression und zur Differenzierung in Knochenzellen beitragen können. Daher wurde nun eine zeitlich verzögerte Injektion und deren Einfluss auf die Formation mineralisierten Gewebes untersucht. Auch hier wurden Defekte kritischer Größe in unserem etablierten Rattenfemurdefektmodell geschaffen. Die verwendeten 28 Sprague-Dawley Ratten wurden in vier Gruppen aufgeteilt. Alle Gruppen bekamen eine einmalige, perkutane, intraläsionale Injektion von  $4 \times 10^8$  pfu Ad.BMP-2, entweder unmittelbar nach der Defektschaffung, nach 24 Stunden, 5 Tagen oder nach 10 Tagen. Am Endpunkt nach 8 Wochen wurden die Femora entnommen und anhand von

Röntgenbildern, Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT), dual energy x-ray absorptiometry (DEXA) sowie biomechanisch ausgewertet. Die Auswertung der Röntgenbilder zeigte eine deutliche höhere Anzahl an überbrückten Defekten (bis 86%) in Ratten bei denen die Ad.BMP-2 Injektion um 5 bzw. 10 Tage verzögert wurde. Innerhalb dieser Gruppen wurden außerdem ein höherer Knochenmineralgehalt und eine durchschnittlich höhere mechanische Festigkeit der geheilten Femora gemessen. Diese Studie zeigte, dass sich eine Verzögerung der Ad.BMP-2 Injektion um 5 bis 10 Tage nach der Defektsetzung positiv auf die Heilung der Femurdefekte kritischer Größe auswirkt und somit eine Optimierung des direkten Gentransfers darstellt.

### 3.4 Publikation 4

**Betz O.B.**, Betz, V.M., Abdulazim, A., Penzkofer, R., Schmitt, B., Schröder, C., Augat, P., Jansson, V. and Müller, P.E. (2009) „Healing of large segmental bone defects induced by expedited bone morphogenetic protein-2 gene-activated, syngeneic muscle grafts“. Hum Gene Ther **20**(12): 1589-96. Impact-Factor: 4,2

Die vorhergehenden Studien zeigten, dass die direkte *in vivo* Gentherapie durch perkutane Injektion von adenoviralen Vektoren geeignet ist, Knochendefekte kritischer Größe *in situ* zu regenerieren. Allerdings demonstrierten die Ergebnisse auch, dass dieser Ansatz mit Risiken einhergeht. Das direkte Injizieren des adenoviralen Vektors in einen Knochendefekt kann zum Austreten der Suspension in umgebendes Gewebe führen. Dies resultierte in einigen Fällen in einer ektopen Knochenbildung, einer ernststen Komplikation, die auch bei der klinischen Anwendung von rhBMP-2 und rhBMP-7 aufgetreten ist. Weiterhin bestehen bei der direkten Methode Bedenken hinsichtlich einer Immunreaktion auf den adenoviralen Vektor. Aus dieser Erkenntnis ergab sich ein neues Ziel: die Entwicklung einer beschleunigten *ex vivo* Gentherapie, welche die Einfachheit der *in vivo* Gentherapie und die Sicherheit der *ex vivo* Gentherapie vereint. Daher wurde in der vorliegenden Studie eine *ex vivo* Methode angewendet, die kein aufwendiges Isolieren und Vermehren von Zellen erfordert. Stattdessen wurde Muskelgewebe von Spenderratten entnommen und in Gewebefragmente einer standardisierten Größe zerteilt. Daraufhin wurde adenoviraler, hBMP-2 transportierender, Gentransfervektor (Ad.BMP-2) direkt in Kontakt mit den Muskelgewebestücken gebracht und so eine effektive Transduktion

oberflächlich liegender Zellen erreicht. Nicht implantierte Muskelgewebestücke produzierten nachfolgend BMP-2 über mehrere Tage *in vitro*. Die Implantation der *ex vivo* BMP-2 genaktivierten Muskelgewebefragmente in 5 mm große segmentale Knochendefekte im Rattenfemur erfolgte 24 Stunden nach der Transduktion. Ratten der Kontrollgruppen wurde entweder GFP transduziertes oder nicht-modifiziertes Muskelgewebe implantiert oder der Defekt blieb unbehandelt. Zur Evaluation des Heilungserfolges dienten Röntgenaufnahmen, Mikrocomputertomografie, histologische Schnitte und biomechanische Torsionstests. 6 Wochen postoperativ waren 100% der mit BMP-2 genaktivierten Muskelimplantaten behandelten Knochendefekte überbrückt. In den Kontrollgruppen kam es weder zu einer Überbrückung noch zu einer relevanten Neubildung von Knochen. Die histologischen Untersuchungen demonstrierten für die mit BMP-2 produzierendem Muskelgewebe behandelten Femora sogar ein fortgeschrittenes Remodeling mit Ausbildung einer Kortikalis und einer Markhöhle. Biomechanisch waren die Femora der gentherapeutisch behandelten Gruppe nach 6 Wochen so stabil wie die intakten, kontralateralen Knochen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten erstmals, dass BMP-2 genaktivierte Muskelgewebefragmente osteo-regenerative Strukturen darstellen, mit denen im Rattenmodell rasch und zuverlässig Knochendefekte einer kritischen Größe regeneriert werden können.

### 3.5 Publikation 5

**Betz, O. B.,** Betz, V. M., Abdulazim, A., Penzkofer, R., Schmitt, B., Schroder, C., Mayer-Wagner, S., Augat, P., Jansson, V. and Müller, P. E. (2010). „The repair of critical-sized bone defects using expedited, autologous BMP-2 gene-activated fat implants." Tissue Eng Part A **16(3)**: 1093-1101. Impact Factor: 4.8

In der vorhergehenden Studie konnten wir zeigen, dass Knochendefekte einer kritischen Größe mit Hilfe von BMP-2 genaktivierten Muskelgewebefragmenten regeneriert werden können. Neben Muskelgewebe stellt adipöses Gewebe ein äußerst attraktives, autologes Spendergewebe dar. Aus anderen Studien war bereits bekannt, dass BMP-2 produzierende adipöse Fettstammzellen Knochendefekte regenerieren können. Allerdings sind für diese *ex vivo* Zelltherapien die Isolation von Stammzellen und nachfolgend eine längere Zellkultur notwendig. Um dies zu umgehen und eine beschleunigte

Knochenregenerationsmethode mit Hilfe von adipösen Zellen zu entwickeln, haben wir in dieser Studie, ähnlich der vorhergehenden Studie mit Muskelgewebe, das Potential von subkutanen Fettgewebefragmenten zur Knochendefektregeneration untersucht. Hierfür wurde BMP-2 cDNA mit Hilfe von adenoviralen Vektoren *ex vivo* auf autologe Fettgewebefragmente gegeben, für 24 Stunden inkubiert und anschließend in unser etabliertes Rattendefektmodell implantiert. Zuvor wurde subkutanes Fettgewebe aus 2 von insgesamt 35 genetisch identischen Fischer 344 Ratten entnommen. Die Fettgewebefragmente wurden mit adenoviralen Vektoren, welche für die cDNA für entweder BMP-2 oder „Green Fluorescent Protein“ (GFP) kodieren, transduziert. Die Kontrollgruppe wurde ohne Vektoren kultiviert und blieb daher unmodifiziert. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden die Fettgewebefragmente in die Knochendefekte implantiert. Für eine weitere Kontrollgruppe wurden die Defekte leer gelassen. Die Femora wurden mit Hilfe von Röntgenbildern, Mikro-Computertomographie, biomechanischer Testung sowie Histologie ausgewertet. Die Röntgenaufnahmen sowie die Histologie ergaben nach 6 Wochen eine 100 prozentige Defektüberbrückung in der Gruppe die mit Ad.BMP-2 transduzierten Fettfragmenten behandelt wurde. Außerdem zeigte sich in dieser Gruppe ein höheres Knochenvolumen und eine höhere biomechanische Belastbarkeit verglichen mit den intakten, kontralateralen Femora. Im Gegensatz dazu war in allen Kontrollgruppen histologisch nur fibröses Bindegewebe bzw. Fettgewebe ohne mechanische Belastbarkeit zu sehen. Wir schlossen aus dieser Studie, dass auch BMP-2 genaktiviertes Fettgewebe eine beschleunigte und effektive Knochenregenerationsstrategie darstellt, welche weder eine Isolierung noch die Expansion der Zellen erfordert.

### 3.6 Publikation 6

Bondarava, M., Cattaneo, C., Ren, B., Thasler, W. E, Jansson, V., Müller, P. E. and **Betz, O. B.** (2017). „Osseous differentiation of human fat tissue grafts: From tissue engineering to tissue differentiation.“ Sci Rep 7: 39712. Impact Factor: 4.1

Nachdem wir zeigen konnten, dass BMP-2 genaktiviertes Fettgewebe segmentale Knochendefekte einer kritischen Größe in Ratten regenerieren kann, stellte sich die Frage, ob humanes Fettgewebe ebenfalls ein osteogenes Potential aufweist, wenn es durch BMP-2

osteogen stimuliert wird. Außerdem wurde, neben BMP-2, ebenfalls die osteogene Wirkung von BMP-7 und BMP-9 auf humanes Fettgewebe untersucht. In dieser Studie wurden hierfür humane, subkutane Fettfragmente in dreidimensionalen *in vitro* Kollagen-1 Kulturen entweder in nicht-osteogenem Medium oder in osteogenem Medium allein bzw. mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren BMP-2, BMP-7 oder BMP-9 kultiviert. Bereits nach zwei Wochen konnte eine Kalzifizierung der Fettgewebefragmente in den osteogenen Kulturen beobachtet werden. Die Kalzifizierung war in den Kulturen die Wachstumsfaktoren enthielten deutlich stärker ausgeprägt. Die mRNA Expression der Knochenmarker Alkalische Phosphatase und Osteokalzin war bereits in den Kulturen mit osteogenem Medium deutlich erhöht. In den Kulturen mit den Wachstumsfaktoren war die Expression noch einmal signifikant erhöht. Die Immunfluoreszenzfärbungen für die Knochenmarker Osteokalzin, Osteopontin und Sklerostin bestätigen die Ergebnisse der PCR-Untersuchung. Als effektivster osteogener Induktor in diesem Experiment konnte BMP-9 identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass humanes, subkutanes Fettgewebe, ähnlich dem Fettgewebe der Ratte, osteogen differenziert werden kann und daher potentiell in der Zukunft klinisch zur Knochenregeneration eingesetzt werden könnte.

### 3.7 Publikation 7

Ren, B., Betz, V.M., Thirion, C., Salomon, M., Jansson, V., Müller, P.E. and **Betz, O.B.** „Gene-activated tissue grafts for sustained bone morphogenetic protein-2 delivery and bone engineering: Is muscle with fascia superior to muscle and fat?“ (2018). J Tissue Eng Regen Med **12**(4):1002-1011. Impact-Factor: 3,9

Zuvor konnten wir zeigen, dass subkutanes Fettgewebe ein attraktives Spendergewebe für die Knochenregeneration darstellt. Allerdings weist Fettgewebe nur eine minimale mechanische Festigkeit auf. Muskelgewebe hingegen hat den Vorteil, dass es, insbesondere in Verbindung mit einer anliegenden Faszie, besser verarbeitet, geformt und in den Defekt eingebracht werden kann. Daher beschloss ich, dass neben Fettgewebe auch Muskelgewebe zur Knochenregeneration weiter untersucht und die Effizienz weiter optimiert werden soll. In den vorherigen Studien wurde Muskelgewebe erfolgreich

adenoviral transduziert, sodass es zu einer transienten Expression von osteogenen Molekülen kam und Knochendefekte in Ratten zuverlässig geheilt wurden. Um diese beschleunigte *ex vivo* Gentransfermethode weiter zu verbessern, wurde in der hier vorliegenden Arbeit untersucht, ob das osteogene Potential durch eine dem Muskelgewebe aufliegende Faszie verbessert werden kann, da die Muskelfaszie eine höhere Zelldichte aufweist als Muskelgewebe und durch eine Zunahme transduzierter Zellen auch die Expression von BMP-2 erhöht wird. Das Ziel dieser Studie war also, herauszufinden, ob die osteogene Differenzierungskapazität von BMP-2 aktivierten Muskelgewebefragmenten optimiert werden kann, wenn diesen eine Faszie anhaftet. Hierbei erfolgte ein Vergleich zwischen Muskelgewebe mit aufliegender Faszie, Muskelgewebe ohne Faszie und Fettgewebe, welches Fischer 344 Ratten entnommen worden war. Weiterhin sollte eine optimale Vektordosis ermittelt werden. Die Gewebe wurden auch hier in Fragmente einer standardisierten Größe zerkleinert und mit verschiedenen Konzentrationen an adenoviralen BMP-2 bzw. GFP Vektoren transduziert. Bis zu 90 Tage wurden die Gewebestücke in kultiviert und analysiert. Die Kultivierung aller Gruppen erfolgte in nicht-osteogenem Medium, sodass rein der Effekt des exprimierten BMP-2 untersucht werden konnte. Verglichen wurden die Zellproliferation, die Langzeitproduktion von BMP-2 und die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung. Muskel mit Faszie wies hierbei die höchste Proliferationsrate auf, wobei die Proliferationsrate mit steigender adenoviraler Vektordosis sank. Die aufliegende Faszie konnte sehr effizient transduziert werden, sodass Muskel mit Faszie die größte Menge an BMP-2 produzierte. Das exprimierte BMP-2 konnte über 90 Tage *in vitro* mittels ELISA gemessen werden. Auch die Transduktion mit GFP zeigte sich unter dem Mikroskop in der Gruppe der Muskelfragmente, die eine Faszie aufliegen hatte, besonders effizient. Im Vergleich zu Fettgewebe war die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung in Muskel mit Faszie stärker ausgeprägt. Gegenüber Muskelgewebe ohne Faszie zeigte sich diesbezüglich jedoch keine Verbesserung. Eine Dosis von  $4 \times 10^8$  pfu Ad.BMP-2 führte in dieser Studie zur maximalen BMP-2-Produktion. Aufgrund der deutlich verbesserten Transduktionseffizienz mit erhöhter BMP-2 Produktion könnte Muskel mit Faszie ein sehr geeignetes osteo-regeneratives Implantat darstellen.

### 3.8 Publikation 8

Ren, B., Betz, V. M., Thirion, C., Salomon, M., Jansson, V., Müller, P. E. and **Betz O.B.** (2018). „Osteoinduction within BMP-2 transduced muscle tissue fragments with and without a fascia layer: implications for bone tissue engineering." Gene Ther. **26**(1-2):16-28. Impact Factor: 3.2

In der vorhergehenden Studie konnten wir zeigen, dass BMP-2 transduziertes Muskelgewebe, insbesondere Muskelgewebe mit Faszie, größere Mengen an BMP-2 produziert und ein höheres osteogenes Potential aufweist als Fettgewebe. Als optimale Dosis wurden  $4 \times 10^8$  pfu Ad.BMP-2 ermittelt. Die vorherige Studie untersuchte rein den Effekt des exprimierten BMP-2, ohne Kultur in osteogenem Medium. Das Ziel dieser Folgestudie war nun eine intensivere Untersuchung der osteogenen Differenzierung des Muskelgewebes mit und ohne Faszie nach Transduktion mit  $4 \times 10^8$  pfu Ad.BMP-2 in osteogenem Medium. Dazu wurden wiederum Skelettmuskelstücke von Ratten mit bzw. ohne Faszie jeweils mit Ad.BMP-2 oder Ad.GFP transduziert. Die osteogene Differenzierung innerhalb der Gewebefragmente wurde nach zwei bzw. vier Wochen mit Hilfe von PCR, Histomorphometrie sowie immunhistologisch untersucht und verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine höhere Transduktionseffizienz und transgene Expression in den Muskelfragmenten mit Faszie. Die Transduktion mit dem BMP-2 Gen führte zu einer signifikant höheren Expression der Knochenmarkergene, des transduzierten BMP-2 Gens und der Kalziumeinlagerung, sowohl in der Gruppe mit als auch in der Gruppe ohne Faszie. Die Histologische Untersuchung ergab, dass in der Faszie selbst keine osteogene Differenzierung stattfindet. Die Hochregulierung der Expression von Knochenmarkergenen war in den BMP-2 transduzierten Gewebefragmenten mit Faszie signifikant niedriger, jedoch nach vier Wochen auf einem ähnlichen Niveau wie jene in Muskelfragmenten ohne Faszie. Das Fazit aus dieser Studie war, dass die Verwendung von BMP-2 transduzierten Muskelfragmenten mit anliegender Faszie zu einer höheren Transduktionseffizienz und damit einer höheren BMP-2 Expression führt. Dies könnte zu einer verbesserten Knochenregeneration *in vivo* führen und stellt damit eine wichtige Erkenntnis für die weitere Entwicklung einer verbesserten effektiven Knochenregenerationstechnologie dar.

#### 4. Diskussion

Die dieser Habilitationsschrift zugrunde liegenden eigenen Arbeiten haben zu der Entwicklung einer beschleunigten Gentransfer-Technologie zur *in situ* Generierung von Knochen beigetragen. Diese von mir mitentwickelte Methode erfordert kein aufwendiges und langwieriges Isolieren und Expandieren von Stammzellen über mehrere Wochen in einem spezialisierten GMP Labor, sondern soll dem Chirurgen zukünftig ermöglichen, ein osteo-regeneratives, autologes Implantat während eines einzigen operativen Eingriffes herzustellen. Die Transduktion und damit genetische Aktivierung des Gewebefragmentes dauert maximal eine Stunde [6, 12]. Eigene bisher unveröffentlichte *in vitro* Daten weisen darauf hin, dass bereits 20 Minuten für eine erfolgreiche Transduktion ausreichend sein könnten. Auch die Verwendung von artifiziellen Matrices und Biomaterialien ist hier nicht notwendig, da das genaktivierte Gewebe nicht nur eine Stammzellquelle und lokale Produktionsstätte von Wachstumsfaktoren ist, sondern zudem auch als natürliches dreidimensionales Füllmaterial dient. Ein Verfahren, das im Rahmen eines einzigen chirurgischen Eingriffs mit Hilfe von autologem Gewebe durchgeführt werden kann spart Zeit und Geld und hat damit größere Chancen auf eine klinische Anwendung.

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde ebenfalls eine beschleunigte *ex vivo* Gentherapie entwickelt, bei der die Entnahme, Isolation, lentivirale Transduktion und Re-Implantation von Knochenmarkzellen in einen Defekt im Rattenfemur während eines einzigen operativen Eingriffes erfolgte [91]. Obwohl dieses Vorgehen experimentell erfolgreich war und zur Reparatur der Knochendefekte führte, sind drei Nachteile dieser Methode zu diskutieren: 1) Die Zulassung dieser Methode könnte schwieriger werden, da die Isolation von Zellen aus dem Gewebeverband bereits als größerer Manipulationsschritt gesehen wird und strengere Zulassungsstudien erfordert; 2) Das Entfernen der freien Gentransfervektoren von isolierten Zellen gestaltet sich nicht so einfach wie bei Muskelgewebefragmenten und stellt ein Sicherheitsrisiko dar; 3) künstliche Biomaterialien sind als Füll- und Trägersubstanzen notwendig.

Im Gegensatz dazu kann für die Verwendung von genaktivierten Muskelfragmenten als Nachteil gesehen werden, dass die Entnahme von autologem Muskelgewebe zu einer Morbidität an der Entnahmestelle führen kann. Allerdings stellt die Entnahme von Muskelgewebe und Faszie alleine oder in Kombination einen Eingriff dar, der in der

plastischen und rekonstruktiven Chirurgie häufig zur Deckung und Rekonstruktion von Weichteildefekten durchgeführt wird [48, 61, 89].

Das Potential von humanen Muskelgewebefragmenten zur osteogenen Differenzierung wurde bereits durch eine *in vitro* Studie einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt [58]. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass genaktivierte Muskelimplantate auch im Menschen zu einem erfolgreichen Knochenaufbau beitragen könnten. Eine weitere experimentelle Arbeit wies nach, dass nach der Implantation von BMP-2 genaktiviertem Muskelgewebe in einen Knochendefekt die implantierten Muskelzellen im Knochendefekt verblieben, osteogen differenzierten und einen Großteil der Knochenzellen des neugebildeten Knochens darstellten [22]. Damit wurde erstmals gezeigt, dass das genaktivierte Muskelimplantate nicht nur vorübergehend Wachstumsfaktor an den Ort der Läsion bringt und dann abstirbt und ersetzt wird, sondern zur Knochenneubildung direkt durch osteogene Differenzierung beiträgt. Somit wird auch verdeutlicht, wie wichtig es ist, durch einen potenten osteogenen Wachstumsfaktor eine effektive Osteoinduktion im implantierten Muskelgewebe zu erreichen.

In Studien zur Differenzierung von Fettzellen bzw. Fettgewebe konnte von anderen Gruppen die Anwesenheit von mesenchymalen Stammzellen und deren osteogene Differenzierbarkeit gezeigt werden [33, 43, 81]. Weiterhin konnten gezeigt werden, dass auch subkutane, adipöse Vorläuferzellen zur Differenzierung in Osteoblasten fähig sind [36]. Weitere Studien zeigten, dass sich sogar reife, mit Lipiden gefüllte Adipocyten zurück in Vorläuferzellen entwickeln und dann in reife Osteoblasten differenzieren können [97, 70]. Unsere eigenen Studien konnten diesen Ergebnissen hinzufügen, dass eine robuste osteogene Differenzierung von Fettgewebzellen ohne vorherige Zellisolation mit Hilfe von BMPs induziert wird und genaktivierte Fettgewebefragmente Knochendefekte einer kritischen Größe regenerieren können [7, 18, 75].

Die in unseren Studien verwendeten Gewebekultursysteme eignen sich sehr gut für die Untersuchung der osteogenen Effekte von BMPs und anderen Wachstumsfaktoren auf Muskel- und Fettgewebe [18, 15, 74, 75]. Dadurch kann die Anzahl an tierexperimentellen Studien reduziert werden und eine *in vivo* Untersuchung erst unternommen werden nachdem sich ein osteoinduktives Molekül *in vitro* als wirksam erwiesen hat. Die Verabreichung solch osteogener Wachstumsfaktoren, wie z.B. der BMPs, durch Gentransfer erscheint dabei als logischer nächster Schritt nachdem man die Probleme der Proteintherapie erfahren hat. Anstelle von sehr großen, weitaus supraphysiologischen

Mengen an rekombinantem Protein, die nicht am beabsichtigten Ort verbleiben sondern sich im Körper verteilen, können durch Gentransfertechnologien geringe Mengen an Wachstumsfaktor präziser über einen ausgedehnten Zeitraum verabreicht werden.

Neben der beschleunigten *ex vivo* Gentherapie stellt auch die *in vivo* Gentherapie eine Technologie dar, die vereinfacht und kosteneffektiv ist, da keine patienteneigenen Zellen bearbeitet werden müssen. In den eigenen Studien zeigte sich zwar, dass die perkutane Injektion zuverlässig Knochendefekte in Ratten regenerieren kann, jedoch waren dazu große Mengen an adenoviralen Vektoren notwendig, welche zu heterotopen Ossifikationen führten [11]. Zudem wurde berichtet, dass die Immunreaktion auf die direkt applizierten adenoviralen Vektoren im Großtiermodell Schaf eine Osteogenese verhinderte [25].

Eine andere Art der *in vivo* Gentherapie wird daher momentan in zwei aktuellen klinischen Versuchen getestet. In beiden Untersuchungen kommen sogenannte genaktivierte Matrices (GAM) zum Einsatz, um Knochen im Kiefer aufzubauen. Dabei wurden für eine der Studien VEGF Plasmide an ein Biomaterial aus Kollagen und Hydroxyapatit gebunden (clinicaltrials.gov: NCT02293031). Das Implantat für den anderen Versuch besteht aus mit VEGF Plasmiden beladenem Octacalciumphosphat (clinicaltrials.gov: NCT03076138). Durch den Verzicht auf virale Vektoren ist die Effizienz des Gentransfers zwar reduziert, jedoch sinkt auch das Risiko einer Immunreaktion auf das Konstrukt.

Innovative Ansätze zur Stimulation des Knochenwachstums müssen dringend den Weg in die Klinik finden, da der Bedarf an wirksamen, kosten-effektiven und im klinischen Setting praktikablen Technologien in einer alternden Bevölkerung weiter steigen wird [78]. Bereits jetzt enden bis zu 9% der Knochenbrüche in einer Pseudarthrose [59], bei Risikopatienten können unter Umständen bis zu 40% Pseudarthrosen auftreten [88]. Die Behandlungskosten einer Pseudarthrose können dabei bis zu EUR 91 000 betragen [59]. Die Kosten für Revisionseingriffe nach Wirbelkörperfusionen belaufen sich auf \$ 91 000 pro Patient [73]. Neue wirksame und zugleich kosten-effektive Technologien zur Anregung der Knochenbildung werden positive sozioökonomische Effekte haben.

## 5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Habilitationsschrift beschriebene und von mir mitentwickelte beschleunigte *ex vivo* Gentherapie unter Verwendung von genaktivierten Muskel- und Fettgewebeimplantaten erwies sich in präklinischen Studien als wirksame Methode zur *in situ* Generierung von Knochen [6, 10, 12]. Die eigenen Studien zeigten dabei, dass vor allem BMP-2 ein sehr potenter Wachstumsfaktor ist, der stark osteoinduktiv auf die Gewebe wirkt [6, 15, 74]. Die Implantation von BMP-2 transduzierten Muskel- und Fettgewebefragmenten führte zur schnellen und zuverlässigen Regeneration von großen Knochendefekten in Ratten [6, 10]. Da der Gentransfervektor von den Implantaten abgewaschen werden kann und kein freier Vektor in den Körper eingebracht wird, ist diese Methode sicherer als die *in vivo* Gentherapie. Dadurch, dass kein aufwendiges Isolieren und Expandieren von Zellen erforderlich ist, bestehen Chancen, dass diese Methode den Weg in die Klinik finden wird. Um sich einer klinischen Anwendung mit dieser vielversprechenden Therapie zu nähern, muss jedoch vorab die Unbedenklichkeit in Tierversuchen mit langer Standzeit und mit Hilfe von immunologischen und histopathologischen Methoden nachgewiesen werden. Da sich in eigenen Untersuchungen zeigte, dass eine den Muskelgewebefragmenten aufliegende Faszie zu einer deutlich verbesserten Transduktionseffizienz und damit zu einer größeren Menge an produziertem BMP-2 führte [74], soll daher auch die Knochenregeneration durch BMP-2 genaktiviertes Muskelgewebe mit und ohne aufliegende Faszie sowie genaktiviertes Fettgewebe im Großtiermodell Schaf erprobt werden. Da erste eigene Experimente demonstrierten, dass die hier beschriebene beschleunigte *ex vivo* Gentherapie auch Potential für die Reparatur von osteochondralen Defekten hat [14], sollen auch in diesem Bereich weiterführende Untersuchungen folgen.

Um die Sicherheit bei der Anwendung der genaktivierten Gewebeimplantate weiter zu erhöhen, arbeite ich gegenwärtig im Labor von Robert Langer am MIT in Cambridge, USA an Methoden der effektiven mRNA-Transfektion mit Hilfe von ionisierbaren Polymeren [42]. Erste *in vitro* Ergebnisse ergaben eine deutlich höhere Transfektionsrate verglichen mit kommerziellen Transfektionsreagenzien. Nachdem das effektivste Polymer ermittelt wurde, soll im nächsten Schritt eine im Langer-Labor entwickelte, neue, zirkuläre mRNA eingesetzt werden, welche sowohl die Menge als auch die Dauer der Proteinexpression drastisch erhöht [93, 94]. Sollte diese Technologie zu einer ähnlich

robusten Osteoinduktion führen wie unsere bisher eingesetzten adenoviralen Vektoren, würde das einen signifikanten Fortschritt für die Sicherheit der Methode darstellen. Dadurch könnte ein klinischer Einsatz der genaktivierten Gewebeimplantate in greifbare Nähe rücken.

## VI. Literaturverzeichnis

1. Alden, T.D., E.J. Beres, J.S. Laurent, J.A. Engh, S. Das, S.D. London, J.A. Jane, Jr., S.B. Hudson, and G.A. Helm. *The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair*. J Craniofac Surg, 2000. **11**(1): p. 24-30.
2. Aslan, H., Y. Zilberman, V. Arbeli, D. Sheyn, Y. Matan, M. Liebergall, J.Z. Li, G.A. Helm, D. Gazit, and Z. Gazit. *Nucleofection-based ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration*. Tissue Eng, 2006. **12**(4): p. 877-89.
3. Baltzer, A.W., C. Lattermann, J.D. Whalen, S. Braunstein, P.D. Robbins, and C.H. Evans. *A gene therapy approach to accelerating bone healing. Evaluation of gene expression in a New Zealand white rabbit model*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 1999. **7**(3): p. 197-202.
4. Baltzer, A.W., C. Lattermann, J.D. Whalen, P. Wooley, K. Weiss, M. Grimm, S.C. Ghivizzani, P.D. Robbins, and C.H. Evans. *Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene*. Gene Ther, 2000. **7**(9): p. 734-9.
5. Bertone, A.L., D.D. Pittman, M.L. Bouxsein, J. Li, B. Clancy, and H.J. Seeherman. *Adenoviral-mediated transfer of human BMP-6 gene accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model*. J Orthop Res, 2004. **22**(6): p. 1261-70.
6. Betz, O.B., V.M. Betz, A. Abdulazim, R. Penzkofer, B. Schmitt, C. Schroder, P. Augat, V. Jansson, and P.E. Muller. *Healing of large segmental bone defects induced by expedited bone morphogenetic protein-2 gene-activated, syngeneic muscle grafts*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(12): p. 1589-96.
7. Betz, O.B., V.M. Betz, A. Abdulazim, R. Penzkofer, B. Schmitt, C. Schroder, S. Mayer-Wagner, P. Augat, V. Jansson, and P.E. Muller. *The repair of critical-sized bone defects using expedited, autologous BMP-2 gene-activated fat implants*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(3): p. 1093-101.

8. Betz, O.B., V.M. Betz, A. Nazarian, M. Egermann, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, M.S. Vrahas, M.L. Bouxsein, and C.H. Evans. *Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects*. Gene Ther, 2007. **14**(13): p. 1039-44.
9. Betz, O.B., V.M. Betz, A. Nazarian, C.G. Pilapil, M.S. Vrahas, M.L. Bouxsein, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, and C.H. Evans. *Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(2): p. 355-65.
10. Betz, O.B., V.M. Betz, C. Schroder, R. Penzkofer, M. Gottlinger, S. Mayer-Wagner, P. Augat, V. Jansson, and P.E. Muller. *Repair of large segmental bone defects: BMP-2 gene activated muscle grafts vs. autologous bone grafting*. BMC Biotechnol, 2013. **13**: p. 65.
11. Betz, V.M., O.B. Betz, V. Glatt, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, M.L. Bouxsein, M.S. Vrahas, and C.H. Evans. *Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose*. Hum Gene Ther, 2007. **18**(10): p. 907-15.
12. Betz, V.M., O.B. Betz, T. Rosin, A. Keller, C. Thirion, M. Salomon, S. Manthey, P. Augat, V. Jansson, P.E. Muller, S. Rammelt, and H. Zwipp. *The effect of BMP-7 gene activated muscle tissue implants on the repair of large segmental bone defects*. Injury, 2015. **46**(12): p. 2351-8.
13. Betz, V.M., O.B. Betz, T. Rosin, A. Keller, C. Thirion, M. Salomon, S. Manthey, P. Augat, V. Jansson, P.E. Muller, S. Rammelt, and H. Zwipp. *An expedited approach for sustained delivery of bone morphogenetic protein-7 to bone defects using gene activated fragments of subcutaneous fat*. J Gene Med, 2016. **18**(8): p. 199-207.
14. Betz, V.M., A. Keller, P. Foehr, C. Thirion, M. Salomon, S. Rammelt, H. Zwipp, R. Burgkart, V. Jansson, P.E. Muller, and O.B. Betz. *BMP-2 gene activated muscle tissue fragments for osteochondral defect regeneration in the rabbit knee*. J Gene Med, 2017. **19**(9-10).

15. Betz, V.M., B. Ren, C. Messmer, V. Jansson, O.B. Betz, and P.E. Muller. *Bone morphogenetic protein-2 is a stronger inducer of osteogenesis within muscle tissue than heterodimeric bone morphogenetic protein-2/6 and -2/7: Implications for expedited gene-enhanced bone repair.* J Gene Med, 2018: p. e3042.
16. Blokhuis, T.J., G.M. Calori, and G. Schmidmaier. *Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: what is the evidence?* Injury, 2013. **44 Suppl 1**: p. S40-2.
17. Boden, S.D., L. Titus, G. Hair, Y. Liu, M. Viggewarapu, M.S. Nanes, and C. Baranowski. *Lumbar spine fusion by local gene therapy with a cDNA encoding a novel osteoinductive protein (LMP-1).* Spine (Phila Pa 1976), 1998. **23**(23): p. 2486-92.
18. Bondarava, M., C. Cattaneo, B. Ren, W.E. Thasler, V. Jansson, P.E. Müller, and O.B. Betz. *Osseous differentiation of human fat tissue grafts: From tissue engineering to tissue differentiation.* Sci Rep, 2017. **7**: p. 39712.
19. Calcedo, R. and J.M. Wilson. *Humoral Immune Response to AAV.* Front Immunol, 2013. **4**: p. 341.
20. Cao, H., D.R. Koehler, and J. Hu. *Adenoviral vectors for gene replacement therapy.* Viral Immunol, 2004. **17**(3): p. 327-33.
21. Costa Mendes, L., T. Sauvigne, and J. Guiol. *[Morbidity of autologous bone harvesting in implantology: Literature review from 1990 to 2015].* Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale, 2016. **117**(6): p. 388-402.
22. De La Vega, R.E., C.L. De Padilla, M. Trujillo, N. Quirk, R.M. Porter, C.H. Evans, and E. Ferreira. *Contribution of Implanted, Genetically Modified Muscle Progenitor Cells Expressing BMP-2 to New Bone Formation in a Rat Osseous Defect.* Mol Ther, 2018. **26**(1): p. 208-218.
23. Dragoo, J.L. and W. Chang. *Arthroscopic Harvest of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells From the Infrapatellar Fat Pad.* Am J Sports Med, 2017: p. 363546517719454.

24. Dragoo, J.L., J.Y. Choi, J.R. Lieberman, J. Huang, P.A. Zuk, J. Zhang, M.H. Hedrick, and P. Benhaim. *Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat*. J Orthop Res, 2003. **21**(4): p. 622-9.
25. Egermann, M., C.A. Lill, K. Griesbeck, C.H. Evans, P.D. Robbins, E. Schneider, and A.W. Baltzer. *Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep*. Gene Ther, 2006. **13**(17): p. 1290-9.
26. Evans, C.H. and P.D. Robbins. *Possible orthopaedic applications of gene therapy*. J Bone Joint Surg Am, 1995. **77**(7): p. 1103-14.
27. Filvaroff, E., A. Erlebacher, J. Ye, S.E. Gitelman, J. Lotz, M. Heilman, and R. Derynck. *Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass*. Development, 1999. **126**(19): p. 4267-79.
28. Franceschi, R.T., D. Wang, P.H. Krebsbach, and R.B. Rutherford. *Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7*. J Cell Biochem, 2000. **78**(3): p. 476-86.
29. Fraser, J.K., I. Wulur, Z. Alfonso, and M.H. Hedrick. *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(4): p. 150-4.
30. Fu, R., S. Selph, M. McDonagh, K. Peterson, A. Tiwari, R. Chou, and M. Helfand. *Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis*. Ann Intern Med, 2013. **158**(12): p. 890-902.
31. Gao, X., A. Usas, Y. Tang, A. Lu, J. Tan, J. Schnependahl, A.M. Kozemchak, B. Wang, J.H. Cummins, R.S. Tuan, and J. Huard. *A comparison of bone regeneration with human mesenchymal stem cells and muscle-derived stem cells and the critical role of BMP*. Biomaterials, 2014. **35**(25): p. 6859-70.

32. Giannoudis, P.V., P.J. Harwood, T. Tosounidis, and N.K. Kanakaris. *Restoration of long bone defects treated with the induced membrane technique: protocol and outcomes*. *Injury*, 2016. **47 Suppl 6**: p. S53-S61.
33. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell. *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. *Circ Res*, 2007. **100(9)**: p. 1249-60.
34. Helm, G.A., T.D. Alden, E.J. Beres, S.B. Hudson, S. Das, J.A. Engh, D.D. Pittman, K.M. Kerns, and D.F. Kallmes. *Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent*. *J Neurosurg*, 2000. **92(2 Suppl)**: p. 191-6.
35. Hustedt, J.W. and D.J. Blizzard. *The controversy surrounding bone morphogenetic proteins in the spine: a review of current research*. *Yale J Biol Med*, 2014. **87(4)**: p. 549-61.
36. Justesen, J., S.B. Pedersen, K. Stenderup, and M. Kassem. *Subcutaneous adipocytes can differentiate into bone-forming cells in vitro and in vivo*. *Tissue Eng*, 2004. **10(3-4)**: p. 381-91.
37. Kang, Q., M.H. Sun, H. Cheng, Y. Peng, A.G. Montag, A.T. Deyrup, W. Jiang, H.H. Luu, J. Luo, J.P. Szatkowski, P. Vanichakarn, J.Y. Park, Y. Li, R.C. Haydon, and T.C. He. *Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery*. *Gene Ther*, 2004. **11(17)**: p. 1312-20.
38. Kawaguchi, H., S. Jingushi, T. Izumi, M. Fukunaga, T. Matsushita, T. Nakamura, K. Mizuno, and K. Nakamura. *Local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone repair: a dose-escalation prospective trial on patients with osteotomy*. *J Orthop Res*, 2007. **25(4)**: p. 480-7.
39. Kawaguchi, H., K. Nakamura, Y. Tabata, Y. Ikada, I. Aoyama, J. Anzai, T. Nakamura, Y. Hiyama, and M. Tamura. *Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86(2)**: p. 875-80.

40. Khan, S.N., M.P. Bostrom, and J.M. Lane. *Bone growth factors*. Orthop Clin North Am, 2000. **31**(3): p. 375-88.
41. Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R.T. Bronson, Y.H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, and T. Kishimoto. *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell, 1997. **89**(5): p. 755-64.
42. Kowalski, P.S., U. Capasso Palmiero, Y. Huang, A. Rudra, R. Langer, and D.G. Anderson. *Ionizable Amino-Polyesters Synthesized via Ring Opening Polymerization of Tertiary Amino-Alcohols for Tissue Selective mRNA Delivery*. Adv Mater, 2018: p. e1801151.
43. Kyllönen, L., S. Haimi, B. Mannerström, H. Huhtala, K.M. Rajala, H. Skottman, G.K. Sándor, and S. Miettinen. *Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(1): p. 17.
44. Lakhan, R., D.J. Baylink, K.H. Lau, X. Tang, M.H. Sheng, C.H. Rundle, and X. Qin. *Local administration of AAV-DJ pseudoserotype expressing COX2 provided early onset of transgene expression and promoted bone fracture healing in mice*. Gene Ther, 2015. **22**(9): p. 721-8.
45. Laurent, J.J., K.M. Webb, E.J. Beres, K. McGee, J. Li, B. van Rietbergen, and G.A. Helm. *The use of bone morphogenetic protein-6 gene therapy for percutaneous spinal fusion in rabbits*. J Neurosurg Spine, 2004. **1**(1): p. 90-4.
46. Lee, C.H., E.Y. Kim, K. Jeon, J.C. Tae, K.S. Lee, Y.O. Kim, M.Y. Jeong, C.W. Yun, D.K. Jeong, S.K. Cho, J.H. Kim, H.Y. Lee, K.Z. Riu, S.G. Cho, and S.P. Park. *Simple, efficient, and reproducible gene transfection of mouse embryonic stem cells by magnetofection*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(1): p. 133-41.
47. Lee, J.Y., D. Musgrave, D. Pelinkovic, K. Fukushima, J. Cummins, A. Usas, P. Robbins, F.H. Fu, and J. Huard. *Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing*

- muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice.* J Bone Joint Surg Am, 2001. **83-A**(7): p. 1032-9.
48. Lee, M.G., J.S. Kim, D.C. Lee, S.Y. Roh, K.J. Lee, and B.K. Choi. *Fascial Free Flap for Reconstruction of the Dorsolateral Hand and Digits: The Advantage of a Thin Contour.* Arch Plast Surg, 2016. **43**(6): p. 551-558.
49. Li, Y.S., E. Davidson, C.N. Reid, and A.P. McHale. *Optimising ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in vitro and prolonged expression of a transgene in vivo: potential applications for gene therapy of cancer.* Cancer Lett, 2009. **273**(1): p. 62-9.
50. Lieberman, J.R., A. Daluiski, S. Stevenson, L. Wu, P. McAllister, Y.P. Lee, J.M. Kabo, G.A. Finerman, A.J. Berk, and O.N. Witte. *The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats.* J Bone Joint Surg Am, 1999. **81**(7): p. 905-17.
51. Lind, M., B. Schumacker, K. Soballe, J. Keller, F. Melsen, and C. Bunger. *Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae.* Acta Orthop Scand, 1993. **64**(5): p. 553-6.
52. Lowenberg, D.W., R.J. Feibel, K.W. Louie, and I. Eshima. *Combined muscle flap and Ilizarov reconstruction for bone and soft tissue defects.* Clin Orthop Relat Res, 1996(332): p. 37-51.
53. Marini, F.C., D. Shayakhmetov, H. Gharwan, A. Lieber, and M. Andreeff. *Advances in gene transfer into haematopoietic stem cells by adenoviral vectors.* Expert Opin Biol Ther, 2002. **2**(8): p. 847-56.
54. Marsh, D.R., S. Shah, J. Elliott, and N. Kurdy. *The Ilizarov method in nonunion, malunion and infection of fractures.* J Bone Joint Surg Br, 1997. **79**(2): p. 273-9.
55. Masquelet, A.C., F. Fitoussi, T. Begue, and G.P. Muller. *[Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft].* Ann Chir Plast Esthet, 2000. **45**(3): p. 346-53.

56. McGee-Lawrence, M.E., L.R. Carpio, E.W. Bradley, A. Dudakovic, J.B. Lian, A.J. van Wijnen, S. Kakar, W. Hsu, and J.J. Westendorf. *Runx2 is required for early stages of endochondral bone formation but delays final stages of bone repair in Axin2-deficient mice*. Bone, 2014. **66**: p. 277-86.
57. Meinel, L., E. Zoidis, J. Zapf, P. Hassa, M.O. Hottiger, J.A. Auer, R. Schneider, B. Gander, V. Luginbuehl, R. Bettschart-Wolfisberger, O.E. Illi, H.P. Merkle, and B. von Rechenberg. *Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation*. Bone, 2003. **33**(4): p. 660-72.
58. Miao, C., L. Zhou, L. Tian, Y. Zhang, W. Zhang, F. Yang, T. Liu, S. Tang, and F. Liu. *Osteogenic Differentiation Capacity of In Vitro Cultured Human Skeletal Muscle for Expedited Bone Tissue Engineering*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 8619385.
59. Mills, L.A., S.A. Aitken, and A. Simpson. *The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults*. Acta Orthop, 2017. **88**(4): p. 434-439.
60. Mizrahi, O., D. Sheyn, W. Tawackoli, I. Kallai, A. Oh, S. Su, X. Da, P. Zarrini, G. Cook-Wiens, D. Gazit, and Z. Gazit. *BMP-6 is more efficient in bone formation than BMP-2 when overexpressed in mesenchymal stem cells*. Gene Ther, 2013. **20**(4): p. 370-7.
61. Nuri, T., K. Ueda, and A. Yamada. *Application of free serratus anterior fascial flap for reconstruction of ear deformity due to hemifacial microsomia: A report of two cases*. Microsurgery, 2016.
62. Ohtori, S., M. Suzuki, T. Koshi, M. Takaso, M. Yamashita, K. Yamauchi, G. Inoue, M. Suzuki, S. Orita, Y. Eguchi, N. Ochiai, S. Kishida, K. Kuniyoshi, J. Nakamura, Y. Aoki, T. Ishikawa, G. Arai, M. Miyagi, H. Kamoda, T. Toyone, and K. Takahashi. *Single-level instrumented posterolateral fusion of the lumbar spine with a local bone graft versus an iliac crest bone graft: a prospective, randomized study with a 2-year follow-up*. Eur Spine J, 2011. **20**(4): p. 635-9.

63. Otto, F., A.P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K.C. Gilmour, I.R. Rosewell, G.W. Stamp, R.S. Beddington, S. Mundlos, B.R. Olsen, P.B. Selby, and M.J. Owen. *Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. Cell, 1997. **89**(5): p. 765-71.
64. Papakostidis, C., M. Bhandari, and P.V. Giannoudis. *Distraction osteogenesis in the treatment of long bone defects of the lower limbs: effectiveness, complications and clinical results; a systematic review and meta-analysis*. Bone Joint J, 2013. **95-B**(12): p. 1673-80.
65. Park, J., J. Ries, K. Gelse, F. Kloss, K. von der Mark, J. Wiltfang, F.W. Neukam, and H. Schneider. *Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes*. Gene Ther, 2003. **10**(13): p. 1089-98.
66. Peng, H., A. Usas, A. Olshanski, A.M. Ho, B. Gearhart, G.M. Cooper, and J. Huard. *VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(11): p. 2017-27.
67. Peng, H., V. Wright, A. Usas, B. Gearhart, H.C. Shen, J. Cummins, and J. Huard. *Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 751-9.
68. Peterson, B., R. Iglesias, J. Zhang, J.C. Wang, and J.R. Lieberman. *Genetically modified human derived bone marrow cells for posterolateral lumbar spine fusion in athymic rats: beyond conventional autologous bone grafting*. Spine (Phila Pa 1976), 2005. **30**(3): p. 283-9; discussion 289-90.
69. Peterson, B., J. Zhang, R. Iglesias, M. Kabo, M. Hedrick, P. Benhaim, and J.R. Lieberman. *Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue*. Tissue Eng, 2005. **11**(1-2): p. 120-9.
70. Poloni, A., G. Maurizi, P. Leoni, F. Serrani, S. Mancini, A. Frontini, M.C. Zingaretti, W. Siquini, R. Sarzani, and S. Cinti. *Human dedifferentiated adipocytes*

- show similar properties to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells*, 2012. **30**(5): p. 965-74.
71. Potter, H. and R. Heller. *Transfection by Electroporation*. *Curr Protoc Immunol*, 2017. **117**: p. 10.15.1-10.15.9.
72. Qing, W., C. Guang-Xing, G. Lin, and Y. Liu. *The osteogenic study of tissue engineering bone with BMP2 and BMP7 gene-modified rat adipose-derived stem cell*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 410879.
73. Rajaei, S.S., L.E. Kanim, and H.W. Bae. *National trends in revision spinal fusion in the USA: patient characteristics and complications*. *Bone Joint J*, 2014. **96-B**(6): p. 807-16.
74. Ren, B., V.M. Betz, C. Thirion, M. Salomon, V. Jansson, P.E. Müller, and O.B. Betz. *Gene-activated tissue grafts for sustained bone morphogenetic protein-2 delivery and bone engineering: Is muscle with fascia superior to muscle and fat?* *J Tissue Eng Regen Med*, 2018. **12**(4): p. 1002-1011.
75. Ren, B., V.M. Betz, C. Thirion, M. Salomon, R.M. Klar, V. Jansson, P.E. Müller, and O.B. Betz. *Gene activated adipose tissue fragments as advanced autologous biomaterials for bone regeneration: osteogenic differentiation within the tissue and implications for clinical translation*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 224.
76. Rundle, C.H., N. Miyakoshi, Y. Kasukawa, S.T. Chen, M.H. Sheng, J.E. Wergedal, K.H. Lau, and D.J. Baylink. *In vivo bone formation in fracture repair induced by direct retroviral-based gene therapy with bone morphogenetic protein-4*. *Bone*, 2003. **32**(6): p. 591-601.
77. Sarkis, C., S. Philippe, J. Mallet, and C. Serguera. *Non-integrating lentiviral vectors*. *Curr Gene Ther*, 2008. **8**(6): p. 430-7.
78. Schacter, G.I. and W.D. Leslie. *Diabetes and Bone Disease*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2017. **46**(1): p. 63-85.
79. Schmidmaier, G., B. Wildemann, T. Gabelein, J. Heeger, F. Kandziora, N.P. Haas, and M. Raschke. *Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in*

- rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1.* Acta Orthop Scand, 2003. **74**(5): p. 604-10.
80. Seeherman, H., J. Wozney, and R. Li. *Bone morphogenetic protein delivery systems.* Spine (Phila Pa 1976), 2002. **27**(16 Suppl 1): p. S16-23.
81. Shen, F.H., B.C. Werner, H. Liang, H. Shang, N. Yang, X. Li, A.L. Shimer, G. Balian, and A.J. Katz. *Implications of adipose-derived stromal cells in a 3D culture system for osteogenic differentiation: an in vitro and in vivo investigation.* Spine J, 2013. **13**(1): p. 32-43.
82. Shen, H.C., H. Peng, A. Usas, B. Gearhart, F.H. Fu, and J. Huard. *Structural and functional healing of critical-size segmental bone defects by transduced muscle-derived cells expressing BMP4.* J Gene Med, 2004. **6**(9): p. 984-91.
83. Simcikova, M., K.L. Prather, D.M. Prazeres, and G.A. Monteiro. *Towards effective non-viral gene delivery vector.* Biotechnol Genet Eng Rev, 2015. **31**(1-2): p. 82-107.
84. Simmonds, M.C., J.V. Brown, M.K. Heirs, J.P. Higgins, R.J. Mannion, M.A. Rodgers, and L.A. Stewart. *Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion: a meta-analysis of individual-participant data.* Ann Intern Med, 2013. **158**(12): p. 877-89.
85. Tal, J. *Adeno-associated virus-based vectors in gene therapy.* J Biomed Sci, 2000. **7**(4): p. 279-91.
86. Talwar, R., L. Di Silvio, F.J. Hughes, and G.N. King. *Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo.* J Clin Periodontol, 2001. **28**(4): p. 340-7.
87. Thaller, S.R., A. Dart, and H. Tesluk. *The effects of insulin-like growth factor-1 on critical-size calvarial defects in Sprague-Dawley rats.* Ann Plast Surg, 1993. **31**(5): p. 429-33.
88. Tzioupis, C. and P.V. Giannoudis. *Prevalence of long-bone non-unions.* Injury, 2007. **38** Suppl 2: p. S3-9.

89. Veyrat, M., B. Verillaud, P. Herman, and D. Bresson. *How I do it. The pedicled temporoparietal fascia flap for skull base reconstruction after endonasal endoscopic approaches*. *Acta Neurochir (Wien)*, 2016. **158**(12): p. 2291-2294.
90. Virk, M.S., A. Conduah, S.H. Park, N. Liu, O. Sugiyama, A. Cuomo, C. Kang, and J.R. Lieberman. *Influence of short-term adenoviral vector and prolonged lentiviral vector mediated bone morphogenetic protein-2 expression on the quality of bone repair in a rat femoral defect model*. *Bone*, 2008. **42**(5): p. 921-31.
91. Virk, M.S., O. Sugiyama, S.H. Park, S.S. Gambhir, D.J. Adams, H. Drissi, and J.R. Lieberman. *"Same day" ex-vivo regional gene therapy: a novel strategy to enhance bone repair*. *Mol Ther*, 2011. **19**(5): p. 960-8.
92. Wei, Q., J. Fan, J. Liao, Y. Zou, D. Song, J. Liu, J. Cui, F. Liu, C. Ma, X. Hu, L. Li, Y. Yu, X. Qu, L. Chen, X. Yu, Z. Zhang, C. Zhao, Z. Zeng, R. Zhang, S. Yan, X. Wu, Y. Shu, R.R. Reid, M.J. Lee, J.M. Wolf, and T.C. He. *Engineering the Rapid Adenovirus Production and Amplification (RAPA) Cell Line to Expedite the Generation of Recombinant Adenoviruses*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **41**(6): p. 2383-2398.
93. Wesselhoeft, R.A., P.S. Kowalski, and D.G. Anderson. *Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 2629.
94. Wesselhoeft, R.A., P.S. Kowalski, F.C. Parker-Hale, Y. Huang, N. Bisaria, and D.G. Anderson. *RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo*. *Mol Cell*, 2019.
95. Wright, V., H. Peng, A. Usas, B. Young, B. Gearhart, J. Cummins, and J. Huard. *BMP4-expressing muscle-derived stem cells differentiate into osteogenic lineage and improve bone healing in immunocompetent mice*. *Mol Ther*, 2002. **6**(2): p. 169-78.
96. Yoon, S.T., J.S. Park, K.S. Kim, J. Li, E.S. Attallah-Wasif, W.C. Hutton, and S.D. Boden. *ISSLS prize winner: LMP-1 upregulates intervertebral disc cell production*

- of proteoglycans and BMPs in vitro and in vivo*. Spine (Phila Pa 1976), 2004. **29**(23): p. 2603-11.
97. Zhang, X., M. Yang, L. Lin, P. Chen, K.T. Ma, C.Y. Zhou, and Y.F. Ao. *Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose-derived stem cells in vitro and in vivo*. Calcif Tissue Int, 2006. **79**(3): p. 169-78.
98. Zhao, Z., Z. Wang, C. Ge, P. Krebsbach, and R.T. Franceschi. *Healing cranial defects with AdRunx2-transduced marrow stromal cells*. J Dent Res, 2007. **86**(12): p. 1207-11.

## VII. Publikationen des Autors (Originalarbeiten)

1. Ren, B., V.M. Betz, C. Thirion, M. Salomon, R.M. Klar, V. Jansson, P.E. Müller, and **O.B. Betz**. *Gene activated adipose tissue fragments as advanced autologous biomaterials for bone regeneration: osteogenic differentiation within the tissue and implications for clinical translation*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 224.
2. Betz, V.M., S. Kochanek, S. Rammelt, P.E. Müller, **O.B. Betz**, and C. Messmer. *Recent advances in gene-enhanced bone tissue engineering*. J Gene Med, 2018. **20**(6): p. e3018.
3. Betz, V.M., B. Ren, C. Messmer, V. Jansson, **O.B. Betz**, and P.E. Müller. *Bone morphogenetic protein-2 is a stronger inducer of osteogenesis within muscle tissue than heterodimeric bone morphogenetic protein-2/6 and -2/7: Implications for expedited gene-enhanced bone repair*. J Gene Med, 2018. **20**(9): p. e3042.
4. Ren, B., V.M. Betz, C. Thirion, M. Salomon, V. Jansson, P.E. Müller, and **O.B. Betz**. *Gene-activated tissue grafts for sustained bone morphogenetic protein-2 delivery and bone engineering: Is muscle with fascia superior to muscle and fat?* J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(4): p. 1002-1011.
5. Ren, B., V.M. Betz, C. Thirion, M. Salomon, V. Jansson, P.E. Müller, and **O.B. Betz**. *Osteoinduction within BMP-2 transduced muscle tissue fragments with and without a fascia layer: implications for bone tissue engineering*. Gene Ther, 2019. **26**(1-2): p. 16-28
6. Safi, E., A. Ficklscherer, M. Bondarava, **O. Betz**, A. Zhang, V. Jansson, and P.E. Müller. *Migration of Mesenchymal Stem Cells of Bursal Tissue after Rotator Cuff Repair in Rats*. Joints, 2018. **6**(1): p. 4-9.
7. Betz, V.M., A. Keller, P. Foehr, C. Thirion, M. Salomon, S. Rammelt, H. Zwipp, R. Burgkart, V. Jansson, P.E. Müller, and **O.B. Betz**. *BMP-2 gene activated muscle tissue fragments for osteochondral defect regeneration in the rabbit knee*. J Gene Med, 2017. **19**(9-10).

8. Bondarava, M., C. Cattaneo, B. Ren, W.E. Thasler, V. Jansson, P.E. Müller, and **O.B. Betz**. *Osseous differentiation of human fat tissue grafts: From tissue engineering to tissue differentiation*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 39712.
9. Kunkel, N., A. Wagner, R. Gehwolf, P. Heimel, H. Tempfer, S. Korntner, P. Augat, H. Resch, H. Redl, **O. Betz**, H.C. Bauer, and A. Traweger. *Comparing the osteogenic potential of bone marrow and tendon-derived stromal cells to repair a critical-sized defect in the rat femur*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017. **11**(7): p. 2014-2023.
10. Ren, B., V.M. Betz, C. Thirion, M. Salomon, V. Jansson, P.E. Müller, and **O.B. Betz**. *Gene-activated tissue grafts for sustained bone morphogenetic protein-2 delivery and bone engineering: Is muscle with fascia superior to muscle and fat?* *J Tissue Eng Regen Med*, 2018. **12**(4): p. 1002-1011
11. Betz, V.M., **O.B. Betz**, T. Rosin, A. Keller, C. Thirion, M. Salomon, S. Manthey, P. Augat, V. Jansson, P.E. Müller, S. Rammelt, and H. Zwipp. *An expedited approach for sustained delivery of bone morphogenetic protein-7 to bone defects using gene activated fragments of subcutaneous fat*. *J Gene Med*, 2016. **18**(8): p. 199-207.
12. Betz, V.M., K.H. Sitoci-Ficici, O. Uckermann, E. Leipnitz, A. Iltzsche, C. Thirion, M. Salomon, H. Zwipp, G. Schackert, **O.B. Betz**, and M. Kirsch. *Gene-activated fat grafts for the repair of spinal cord injury: a pilot study*. *Acta Neurochir (Wien)*, 2016. **158**(2): p. 367-78. (O.B. Betz and M. Kirsch contributed equally).
13. Niethammer, T.R., K. Limbrunner, **O.B. Betz**, M.F. Gülecüyüz, M.F. Pietschmann, M. Feist, and P.E. Müller. *Analysis of the autologous chondrocyte quality of matrix-based autologous chondrocyte implantation in the knee joint*. *Int Orthop*, 2016. **40**(1): p. 205-12.
14. Betz, V.M., **O.B. Betz**, T. Rosin, A. Keller, C. Thirion, M. Salomon, S. Manthey, P. Augat, V. Jansson, P.E. Müller, S. Rammelt, and H. Zwipp. *The effect of BMP-7 gene activated muscle tissue implants on the repair of large segmental bone defects*. *Injury*, 2015. **46**(12): p. 2351-8.

15. Högel, F., S. Hoffmann, S. Hungerer, E. Fleischacker, T. Ullmann, **O.B. Betz**, and P. Augat. *Bone healing of critical size defects of the rat femur after the application of bone marrow aspirate and two different rh-BMP7 concentrations*. Eur J Trauma Emerg Surg, 2015. **41**(5): p. 557-63.
16. Zhu, G., S. Mayer-Wagner, C. Schröder, M. Woiczinski, H. Blum, I. Lavagi, S. Krebs, J.I. Redeker, A. Hölzer, V. Jansson, **O. Betz**, and P.E. Müller. *Comparing effects of perfusion and hydrostatic pressure on gene profiles of human chondrocyte*. J Biotechnol, 2015. **210**: p. 59-65.
17. Mayer-Wagner, S., F. Hammerschmid, J.I. Redeker, B. Schmitt, B.M. Holzapfel, V. Jansson, **O.B. Betz**, and P.E. Müller. *Simulated microgravity affects chondrogenesis and hypertrophy of human mesenchymal stem cells*. Int Orthop, 2014. **38**(12): p. 2615-21.
18. **Betz, O.B.**, V.M. Betz, C. Schröder, R. Penzkofer, M. Göttlinger, S. Mayer-Wagner, P. Augat, V. Jansson, and P.E. Müller. *Repair of large segmental bone defects: BMP-2 gene activated muscle grafts vs. autologous bone grafting*. BMC Biotechnol, 2013. **13**: p. 65.
19. Hölzer, A., M.F. Pietschmann, C. Rösl, M. Hentschel, **O. Betz**, M. Matsuura, V. Jansson, and P.E. Müller. *The interrelation of trabecular microstructural parameters of the greater tubercle measured for different species*. J Orthop Res, 2012. **30**(3): p. 429-34.
20. Majewski, M., R.M. Porter, **O.B. Betz**, V.M. Betz, H. Clahsen, R. Flückiger, and C.H. Evans. *Improvement of tendon repair using muscle grafts transduced with TGF- $\beta$ 1 cDNA*. Eur Cell Mater, 2012. **23**: p. 94-101; discussion 101-2.
21. Sadoghi, P., C. Schröder, A. Fottner, A. Steinbrück, **O. Betz**, P.E. Müller, V. Jansson, and A. Hölzer. *Application and survival curve of total hip arthroplasties: a systematic comparative analysis using worldwide hip arthroplasty registers*. Int Orthop, 2012. **36**(11): p. 2197-203.
22. **Betz, O.B.**, V.M. Betz, A. Abdulazim, R. Penzkofer, B. Schmitt, C. Schröder, S. Mayer-Wagner, P. Augat, V. Jansson, and P.E. Müller. *The repair of critical-sized*

- bone defects using expedited, autologous BMP-2 gene-activated fat implants.* Tissue Eng Part A, 2010. **16**(3): p. 1093-101.
23. Mayer-Wagner, S., T.S. Schiergens, B. Sievers, D. Docheva, M. Schieker, **O.B. Betz**, V. Jansson, and P.E. Müller. *Membrane-based cultures generate scaffold-free neocartilage in vitro: influence of growth factors.* Tissue Eng Part A, 2010. **16**(2): p. 513-21.
24. **Betz, O.B.**, V.M. Betz, A. Abdulazim, R. Penzkofer, B. Schmitt, C. Schröder, P. Augat, V. Jansson, and P.E. Müller. *Healing of large segmental bone defects induced by expedited bone morphogenetic protein-2 gene-activated, syngeneic muscle grafts.* Hum Gene Ther, 2009. **20**(12): p. 1589-96.
25. Evans, C.H., F.J. Liu, V. Glatt, J.A. Hoyland, C. Kirker-Head, A. Walsh, **O. Betz**, J.W. Wells, V. Betz, R.M. Porter, F.A. Saad, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, M.B. Harris, and M.S. Vrahas. *Use of genetically modified muscle and fat grafts to repair defects in bone and cartilage.* Eur Cell Mater, 2009. **18**: p. 96-111.
26. Porter, R.M., F. Liu, C. Pilapil, **O.B. Betz**, M.S. Vrahas, M.B. Harris, and C.H. Evans. *Osteogenic potential of reamer irrigator aspirator (RIA) aspirate collected from patients undergoing hip arthroplasty.* J Orthop Res, 2009. **27**(1): p. 42-9.
27. Betz, V.M., **O.B. Betz**, M.B. Harris, M.S. Vrahas, and C.H. Evans. *Bone tissue engineering and repair by gene therapy.* Front Biosci, 2008. **13**: p. 833-41.
28. Majewski, M., **O. Betz**, P.E. Ochsner, F. Liu, R.M. Porter, and C.H. Evans. *Ex vivo adenoviral transfer of bone morphogenetic protein 12 (BMP-12) cDNA improves Achilles tendon healing in a rat model.* Gene Ther, 2008. **15**(16): p. 1139-46.
29. **Betz, O.B.**, V.M. Betz, A. Nazarian, M. Egermann, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, M.S. Vrahas, M.L. Bouxsein, and C.H. Evans. *Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects.* Gene Ther, 2007. **14**(13): p. 1039-44.
30. Betz, V.M., **O.B. Betz**, V. Glatt, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, M.L. Bouxsein, M.S. Vrahas, and C.H. Evans. *Healing of segmental bone defects by direct*

- percutaneous gene delivery: effect of vector dose*. Hum Gene Ther, 2007. **18**(10): p. 907-15.
31. Evans, C.H., G.D. Palmer, A. Pascher, R. Porter, F.N. Kwong, E. Gouze, J.N. Gouze, F. Liu, A. Steinert, **O. Betz**, V. Betz, M. Vrahas, and S.C. Ghivizzani. *Facilitated endogenous repair: making tissue engineering simple, practical, and economical*. Tissue Eng, 2007. **13**(8): p. 1987-93.
32. Kirker-Head, C., V. Karageorgiou, S. Hofmann, R. Fajardo, **O. Betz**, H.P. Merkle, M. Hilbe, B. von Rechenberg, J. McCool, L. Abrahamsen, A. Nazarian, E. Cory, M. Curtis, D. Kaplan, and L. Meinel. *BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects*. Bone, 2007. **41**(2): p. 247-55.
33. **Betz, O.B.**, V.M. Betz, A. Nazarian, C.G. Pilapil, M.S. Vrahas, M.L. Bouxsein, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, and C.H. Evans. *Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(2): p. 355-65.
34. Meinel, L., **O. Betz**, R. Fajardo, S. Hofmann, A. Nazarian, E. Cory, M. Hilbe, J. McCool, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, H.P. Merkle, B. Rechenberg, D.L. Kaplan, and C. Kirker-Head. *Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects*. Bone, 2006. **39**(4): p. 922-31.
35. Meinel, L., S. Hofmann, **O. Betz**, R. Fajardo, H.P. Merkle, R. Langer, C.H. Evans, G. Vunjak-Novakovic, and D.L. Kaplan. *Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2*. Biomaterials, 2006. **27**(28): p. 4993-5002.
36. Palmer, G.D., A. Steinert, A. Pascher, E. Gouze, J.N. Gouze, **O. Betz**, B. Johnstone, C.H. Evans, and S.C. Ghivizzani. *Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro*. Mol Ther, 2005. **12**(2): p. 219-28.
37. Pascher, A., G.D. Palmer, A. Steinert, T. Oligino, E. Gouze, J.N. Gouze, **O. Betz**, M. Spector, P.D. Robbins, C.H. Evans, and S.C. Ghivizzani. *Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate*. Gene Ther, 2004. **11**(2): p. 133-41.

38. Pascher, A., A.F. Steinert, G.D. Palmer, **O. Betz**, J.N. Gouze, E. Gouze, C. Pilapil, S.C. Ghivizzani, C.H. Evans, and M.M. Murray. *Enhanced repair of the anterior cruciate ligament by in situ gene transfer: evaluation in an in vitro model*. Mol Ther, 2004. **10**(2): p. 327-36.
39. Gouze, J.N., E. Gouze, G.D. Palmer, V.S. Liew, A. Pascher, **O.B. Betz**, T.S. Thornhill, C.H. Evans, A.J. Grodzinsky, and S.C. Ghivizzani. *A comparative study of the inhibitory effects of interleukin-1 receptor antagonist following administration as a recombinant protein or by gene transfer*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(5): p. R301-9.
40. Palmer, G.D., E. Gouze, J.N. Gouze, **O.B. Betz**, C.H. Evans, and S.C. Ghivizzani. *Gene transfer to articular chondrocytes with recombinant adenovirus*. Methods Mol Biol, 2003. **215**: p. 235-46.
41. Palmer, G., A. Pascher, E. Gouze, J.N. Gouze, **O. Betz**, M. Spector, P.D. Robbins, C.H. Evans, and S.C. Ghivizzani. *Development of gene-based therapies for cartilage repair*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2002. **12**(4): p. 259-73.
42. Gouze, J.N., S.C. Ghivizzani, E. Gouze, G.D. Palmer, **O.B. Betz**, P.D. Robbins, C.H. Evans, and J.H. Herndon. *Gene therapy for rheumatoid arthritis*. Hand Surg, 2001. **6**(2): p. 211-9.
43. Ignatius, A.A., **O. Betz**, P. Augat, and L.E. Claes. *In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes*. J Biomed Mater Res, 2001. **58**(6): p. 701-9.

## VIII. Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson bedanken. Als Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation am Klinikum der LMU München hat er mir die Forschungsarbeiten im Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie und das Erstellen dieser Habilitationsarbeit ermöglicht. Ich bedanke mich für das jahrelange Vertrauen und die vielfältige Unterstützung.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller. Als stellvertretender Klinikdirektor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation am Klinikum der LMU München und medizinischer Leiter der AG Regenerative Medizin hat er mir stets dabei geholfen, diese innovativen Tissue Engineering Projekte zu realisieren. Von seiner Erfahrung als Kliniker und Wissenschaftler konnte ich sehr profitieren. Ich danke auch ihm für sein Vertrauen und die wertvollen Diskussionen, die sich von der Projektplanung bis zur klinischen Anwendbarkeit erstreckten.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Helck bedanke ich mich sehr für die Bereitschaft, als Mitglied des Fachmentorats meine Habilitationsleistung zu bewerten und den Ablauf der Habilitation unterstützend zu begleiten.

Ich danke ganz herzlich allen Mitarbeitern der Klinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation und des Labors für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie. Besonders hervorheben möchte ich Herrn Dr. Bin Ren, Herrn Dr. Alexander Keller, Frau Dr. Tina Ullmann, Frau Dr. Evi Fleischhacker, Frau Dr. Marina Bondarava und Frau Bärbel Schmidt.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Augat bedanke ich mich für die erfolgreiche wissenschaftliche Kooperation mit dem von ihm geleiteten Institut für Biomechanik an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau.

Weiterhin danke ich meiner gesamten Familie für ihre Unterstützung, Geduld und Rückhalt. Ich danke auch ausdrücklich meinem Bruder und langjährigen Forschungspartner Dr. med. Volker Betz, ohne dessen signifikanten wissenschaftlichen Beitrag und persönliche Unterstützung diese Forschung nicht möglich gewesen wäre.

## IX. Anhang – Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation

- Aus copyright – Gründen sind anstatt des Anhangs in dieser publizierten Version nur die Titel mit Fundstellen und DOI der Originalarbeiten genannt. -

## Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation

### Publikation 1

Meinel, L., Hofmann, S., **Betz, O.**, Fajardo, R., Merkle, H. P., Langer, R., Evans, C. H., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D. L. (2006). „Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2." Biomaterials **27**(28): 4993-5002. Impact-Factor: 8.8  
doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.05.021

### Publikation 2

**Betz, O. B.**, Betz, V. M., Nazarian, A., Pilapil, C. G., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T. A. and Evans, C. H. (2006). „Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects." J Bone Joint Surg Am **88**(2): 355-365. Impact Factor: 4.8  
doi: 10.2106/JBJS.E.00464

### Publikation 3

**Betz, O. B.**, Betz V. M., Nazarian, A., Egermann, M., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A., Vrahas, M. S., Bouxsein, M. L. and Evans, C. H. (2007). „Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects." Gene Ther **14**(13): 1039-1044. Impact Factor: 3.2  
doi: 10.1038/sj.gt.3302956

### Publikation 4

**Betz, O.B.**, Betz, V.M., Abdulazim, A., Penzkofer, R., Schmitt, B., Schröder, C., Augat, P., Jansson, V. and Müller, P.E. (2009) „Healing of large segmental bone defects induced by expedited bone morphogenetic protein-2 gene-activated, syngeneic muscle grafts“. Hum Gene Ther **20**(12): 1589-96. Impact-Factor: 4,2  
doi: 10.1089/hum.2009.037

### **Publikation 5**

**Betz, O. B.**, Betz, V. M., Abdulazim, A., Penzkofer, R., Schmitt, B., Schroder, C., Mayer-Wagner, S., Augat, P., Jansson, V. and Müller, P. E. (2010). „The repair of critical-sized bone defects using expedited, autologous BMP-2 gene-activated fat implants." Tissue Eng Part A **16**(3): 1093-1101. Impact Factor: 4.8

doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0656

### **Publikation 6**

Bondarava, M., Cattaneo, C., Ren, B., Thasler, W. E, Jansson, V., Müller, P. E. and **Betz, O. B.** (2017). „Osseous differentiation of human fat tissue grafts: From tissue engineering to tissue differentiation." Sci Rep **7**: 39712. Impact Factor: 4.1

doi: 10.1038/srep39712

### **Publikation 7**

Ren, B., Betz, V.M., Thirion, C., Salomon, M., Jansson, V., Müller, P.E. and **Betz, O.B.** „Gene-activated tissue grafts for sustained bone morphogenetic protein-2 delivery and bone engineering: Is muscle with fascia superior to muscle and fat?“ (2018). J Tissue Eng Regen Med **12**(4):1002-1011. Impact-Factor: 3,9

doi: 10.1002/term.2575

### **Publikation 8**

Ren, B., Betz, V. M., Thirion, C., Salomon, M., Jansson, V., Müller, P. E. and **Betz O.B.** (2018). „Osteoinduction within BMP-2 transduced muscle tissue fragments with and without a fascia layer: implications for bone tissue engineering." Gene Ther. **26**(1-2):16-28. Impact Factor: 3.2

doi: 10.1038/s41434-018-0047-2