

## Chapter 9

### SUMMARY

Angiogenesis contributes essentially to bone development, bone healing, and the establishment and growth of bone tumors. Therefore, angiogenesis seems to be an important target for the therapy of impaired fracture healing and skeletal defects as well as bone tumors. Anti-angiogenic tumor therapy includes the inhibition of key angiogenic regulators such as VEGF, FGF-2, and cox-2. Targeting the tumor vasculature may have a significant impact on the growth behaviors of bone tumors by itself and may improve the therapeutic efficacy of conventional treatments such as chemotherapy and radiation. The promotion of angiogenesis via local delivery of angiogenic growth factors such as VEGF from implantable biomaterials is a promising approach to improve the healing of fracture non-unions and skeletal defects.

This thesis entitled "Angiogenesis in bone: Implications for bone tumor therapy and bone tissue engineering" examined angiogenesis in bone with an emphasis on anti-angiogenic therapy of primary and secondary bone tumors and on angiogenic therapy for bone healing. The following questions were addressed:

1. Is it possible to establish a suitable animal model to investigate angiogenesis and microcirculation of orthotopically growing primary and secondary bone tumors continuously in mice?
2. Does anti-angiogenic therapy of primary and secondary tumors of bone inhibit the vascularization of these tumors and what is the therapeutic efficacy of anti-angiogenic therapy regimes?
3. Does a combination of anti-angiogenic therapy and conventional radiotherapy synergistically enhance the therapeutic efficacy of radiotherapy?
4. How does angiogenesis contribute to the healing process following the implantation of bone substitute materials? Is it possible to ameliorate angiogenesis and osseointegration of bone substitute material by modifying the material properties of calcium phosphate based bone substitutes?
5. Is it possible to incorporate proteins into calcium phosphate based bone substitute materials in order to modify the protein release kinetics? How do resorbing bone marrow derived cells influence the protein release kinetics?

6. Can local delivery of the angiogenic growth factor VEGF help to improve the vascularization and the osseointegration of bone substitute materials *in vivo*? What is the impact of the release kinetics on the therapeutic efficacy of local VEGF delivery?

Although up to 85% of the most frequently occurring malignant solid tumors, such as lung and prostate carcinomas metastasize into the bone, and despite the knowledge that a tumor's course may be altered by its surrounding tissue there was no adequate experimental model available enabling the investigation of orthotopically grown bone tumors *in vivo*. Based on a cranial window preparation for the investigation of pial microcirculation described by Forbes in 1928 a new model for the investigation of bone tumors growing in the calvarias of severe combined immuno deficient (*SCID*) mice was developed (Chapter 2). The cranial window preparation enabled the continuous qualitative and quantitative investigation of bone tumors over several weeks by means of intravital microscopy. Intravital microscopy is a non-invasive experimental method used in various acute and chronic animal models to analyze angiogenesis, microcirculation, microvascular perfusion, leukocyte-endothelium interaction, growth behavior, changes of the micro milieu etc. of various benign and malignant tissues. The newly established animal model was shown to be reproducible for three types of bone tumors and mimicked tumor growth as it is observed in humans.

Subsequently, the animal model was applied to investigate the efficacy of anti-angiogenic therapy in chondrosarcomas and in secondary bone tumors of a non-small cell lung carcinoma (Chapter 3 and 4). The cyclooxygenase 2 (*cox-2*) inhibitor celecoxib was shown to inhibit the growth of lung carcinoma metastases by exhibiting anti-angiogenic and pro-apoptotic effects (Chapter 3). Celecoxib significantly reduced functional vessel density in tumors and tumor size by 25% and 53%, respectively, compared to untreated controls. The investigation of the time course of FVD and tumor growth indicated that one mechanism underlying the anti tumor effect of celecoxib was the anti-angiogenic action of celecoxib resulting in a reduction of feeding and draining tumor blood vessels. To investigate the direct effects of celecoxib on the tumors, tumor cell apoptosis was investigated histologically. TUNEL assays showed that celecoxib enhanced tumor cell apoptosis in secondary bone tumors of a non-small cell lung carcinoma. SU6668, a small molecule receptor tyrosine

kinase inhibitor, was investigated for its anti-angiogenic effects on SW1353 chondrosarcomas (Chapter 4). The substance significantly reduced tumor vascularization by 37% as compared to negative controls. The decrease of FVD was accompanied by an inhibition of the growth tumor growth. After 28 days the tumor size in animals treated with SU6668 was 53% smaller than in control animals. This effect appears to be induced by the anti-angiogenic effects of SU6668, which are mediated by the inhibition of the key angiogenic receptor tyrosine kinases Flk-1/KDR (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2), platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFRbeta), and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1).

The standard treatment of bone metastases consists in radiation of the affected skeletal region to prevent disease progression and fracture. As the response rate of tumors to radiation seems to be dependent on the delivered dose, strategies increasing the effective dose of radiation may be crucial to ameliorate the therapeutic efficacy of radiotherapy. Recent strategies to optimize the efficacy of radiation are focused on molecular targets enhancing the radiation sensitivity of malignant tumors. In this respect, the prostaglandin signaling pathway seems to be of particular importance as it has been shown that the modulation of prostaglandin synthesis can ameliorate the response of tumors to radiation. We therefore hypothesized that the selective cox-2 inhibitor celecoxib may enhance the radioresponse of secondary bone tumors of a non-small cell lung carcinoma *in vivo*. The study demonstrated that, in contrast to the monotherapies with either radiation or celecoxib, the combination of both regimes was capable to halt tumor progression effectively (Chapter 5). The profound inhibition of tumor progression was accompanied by a sustained regression of tumor feeding blood vessels. The simultaneous administration of celecoxib and radiation enhanced the radioresponse of secondary bone tumors and may be a rationale to improve the therapeutic potential of local radiotherapy of bone metastases.

Vascularization is crucial for the development and the repair of most tissues, and is a precondition for the healing of bone defects. Revascularization of the biomaterial implantation site ensures an adequate supply of nutrients, the prompt removal of metabolic by-products, and the delivery of cells and growth factors that support the formation of osseous tissue. The dynamics and the extent of bone ingrowth into porous calcium-phosphate ceramics are known to depend upon the pore size of the material. Furthermore, bone substitutes with an

interconnected system of pores can be invaded by blood vessels, enabling the development of a dense vascular meshwork. We therefore hypothesized that the pore size of bone substitutes influences the ingrowth not only of osseous tissue but also of capillary sprouts, and thus angiogenesis, thereby impacting the healing process after implantation. The cranium has been widely accepted as an implantation site to investigate the healing process following the implantation of bone substitutes in rodents. However, intravital microscopy has not been applied to investigate the angiogenesis and microcirculation of the implanted biomaterials. We adapted the cranial window preparation described in chapters 2-5 to the implantation of biomaterials into critical size cranium defects. The specific aim of the study described in chapter 6 was to evaluate the influence of the pore size of a particulate calcium-phosphate ceramic on vascularization and bone formation within critical-sized cranial defects in mice. By means of intravital microscopy and histomorphometry, we demonstrated the pore size of a biphasic calcium-phosphate ceramic to be a crucial structural parameter in the vascularization and osseointegration of this material *in vivo*. Vascularization was positively correlated with both the volume of newly formed bone deposited within the macropores and the bone-interface contact with the macropores. Downsizing of the macropores reduced the vascularization of the ceramics and the formation of bone therein, and impaired their integration into bone.

The local delivery of angiogenic growth factors is a promising option to promote the vascularization of ceramic biomaterials. Immobilizing growth factors to calcium phosphate ceramics has been attempted by direct adsorption and usually resulted in a rapid and passive release of the superficially adherent proteins. However, the insufficient retention of growth factors limited their bioavailability and their efficacy in the treatment of bone regeneration. Recently, a co-precipitation technique of proteins together with calcium phosphate has been used successfully to immobilize proteins on titanium implants by incorporating the proteins into a layer of crystalline calcium phosphate. The incorporation decreased the passive protein as compared to a superficial deposition. BMP-2 co-precipitated onto the titanium implants retained its biological activity *in vitro* and *in vivo*. It was hypothesized (*i*) that the burst release of proteins from ceramic biomaterials found with conventional protein adsorption can be minimized by applying the co-precipitation of proteins to calcium phosphate ceramics and (*ii*) that protein incorporation may accomplish a sustained release of proteins mediated by the resorption activity of

bone marrow cells differentiated to monocytes/macrophages and osteoclasts. To test our hypothesis, tritium labeled bovine serum albumin ( $[^3\text{H}]\text{BSA}$ ) was utilized as a model protein to analyze the co-precipitation efficacy and the release kinetics of the protein from the carrier material (Chapter 7). By incorporating  $[^3\text{H}]\text{BSA}$  into the three-dimensional structure of calcium phosphate ceramics we were able to sufficiently retain  $[^3\text{H}]\text{BSA}$  on the biomaterials, minimize the burst release of the protein, and achieve a sustained, cell-mediated release induced by resorbing osteoclasts.

We then aimed to investigate whether a long-term release of VEGF promotes biomaterial vascularization and osseointegration of calcium phosphate ceramics *in vivo* (Chapter 8). VEGF was co-precipitated onto calcium phosphate ceramics and the release kinetics of the protein from the carrier material was investigated *in vitro*. For *in vivo* investigations BCP ceramics were implanted into critical size cranial defects in *Balb/c* mice. *In vitro*, a sustained, cell-mediated release of low concentration of VEGF from BCP ceramics was mediated by resorbing osteoclasts. *In vivo*, the sustained delivery of VEGF achieved with protein co-precipitation resulted in a promotion of biomaterial vascularization, bone formation and osseointegration. In contrast, short-term release of VEGF resulting from superficial adsorption of the growth factor promoted neither angiogenesis nor bone formation. The release kinetics of VEGF appeared to be an important factor in the promotion of biomaterial vascularization and bone formation. The sustained release of VEGF achieved with the co-precipitation technique increased the efficacy of VEGF delivery demonstrating that a prolonged bioavailability of low concentrations of VEGF is beneficial for bone regeneration.

The present thesis demonstrated that anti-angiogenic therapy of primary and secondary bone tumors inhibited tumor progression effectively by decreasing the vascularization of the tumors. Furthermore, anti-angiogenic therapy of bone metastases by the cox-2 inhibition increased the response of the tumors to conventional radiation. Stimulation of angiogenesis using a long-term release system for the local delivery of VEGF promoted biomaterial vascularization and bone formation. These results demonstrate that the inhibition of angiogenesis as well as its stimulation is a promising strategy to improve the therapy of pathological conditions of the skeleton.

## SAMENVATTING

Angiogenesis levert niet alleen een wezenlijke bijdrage aan botgroei, maar ook aan het ontstaan en de groei van bottumoren. Daarom ligt het voor de hand dat de beïnvloeding van angiogenesis mogelijk een rol kan spelen in de therapie van patiënten met botdefecten en bottumoren. Angiogenetische tumor therapie beïnvloedt onder andere de inhibitie van sleutel angiogenetische regulatoren zoals VEGF, FGF-2 en Cox-2. Behandelingen gericht op tumorvascularisatie zouden mogelijk een significante impact hebben op de groei en het gedrag van bottumoren. Hierdoor zou de therapeutische effectiviteit van conventionele behandelingen, zoals chemotherapie en bestraling, verbeteren. Het stimuleren van angiogenese door de lokale toediening van angiogenetische groeifactoren, zoals VEGF uit implantaten en geïmplanteerde bio-materialen, kan worden gezien als een veelbelovende benadering om de genezing van “fracture non-unions” en kritische skeletale defecten te verbeteren.

Dit proefschrift, getiteld "Angiogenesis in bone: Implications for bone tumor therapy and bone tissue engineering", is gebaseerd op onderzoek naar de invloed van angiogenetische therapie op botgenezing in het algemeen en op de behandeling van primaire en secundaire bottumoren in het bijzonder. De volgende onderzoeksvragen werden gesteld:

- 1: Is het mogelijk om een bruikbaar diermodel (muis) te ontwerpen, waarbij de angiogenese en microcirculatie van orthopedisch groeiende primaire en secundaire bottumoren continu te monitoren is?
2. Beperkt anti-angiogenetische therapie van primaire en secundaire bottumoren de vascularisatie van deze tumoren en wat is het therapeutisch effect van deze behandeling?
3. Versterkt een combinatie van anti-angiogenetische therapie en conventionele radiotherapie het therapeutische effect van de radiotherapie?
4. Op welke wijze draagt angiogenese bij aan het genezingsproces na het implanteren van botsubstituutmaterialen? Is het mogelijk om angiogenese en osseointegratie van deze op calciumfosfaat gebaseerde botsubstituten te verbeteren door de materiaaleigenschappen te modificeren?
5. Is het mogelijk om proteïnen te incorporeren in op calciumfosfaat gebaseerde bot substituten om zo de “release kinetics” verbeteren?

6. Kunnen angiogenetische groeifactoren als VEGF helpen om de vascularisatie en osseointegratie van botsubstituutmaterialen *in vivo* te verbeteren? Wat is de invloed van de “release kinetics” op het therapeutisch effect van het lokaal toedienen van VEGF?

Hoewel 85% van de meest voorkomende maligne tumoren, zoals long- en prostaatkanker, in het bot metastaseren, was er, ondanks dat we weten dat de richting van bottumorontwikkeling kan worden veranderd door de omgevende weefsels, tot nu toe geen adequaat experimenteel model voorhanden waarmee orthotopische bottumoren *in vivo* konden worden onderzocht. Gebaseerd op een cranialeluik preparatie voor het onderzoek van pial microcirculatie, zoals beschreven door Forbes in 1928, werd voor onderzoek van tumorgroei in de schedel van immunodeficiente muizen (SCID) een nieuw model ontwikkeld (hoofdstuk 2). De schedelluikpreparatie maakt het mogelijk om een aantal weken achteren continu kwalitatief en kwantitatief onderzoek van bottumoren uit te voeren door middel van een intravitale microscoop. Intravitale microscopie is een non-invasief experimenteel model, dat gebruikt wordt in verschillende diermodellen, onder andere om angiogenese, microcirculatie, micro-vasculaire perfusie, leucocyt-endotheliuminteractie, groeigedrag en verandering in het micromilieu van verschillende benigne en maligne weefsels te onderzoeken. Dit nieuw ontwikkelde diermodel was reproduceerbaar voor drie verschillende typen bottumoren. De tumor groei ontwikkelde zich op een vergelijkbare wijze als bij mensen.

Vervolgens werd het diermodel toegepast om de efficiëntie van anti angiogenetische therapie van chondrosarcoma's en secundaire bottumoren van longcarcinomen (hoofdstuk 3 en 4) te onderzoeken. De cyclooxygenase 2 (cox-2) inhibitor celecoxib bleek vanwege een anti-angiogenetisch en pro-apoptotic effect de groei van longcarcinoommetastasen te remmen (hoofdstuk 3). Celecoxib reduceerde de functionele bloedvatdichtheid in tumoren, maar ook de tumoromvang, met respectievelijk 25% en 53% als die werd vergeleken met de niet behandelde controlegroep. Het onderzoek naar de tijdsverloop van FVD-tumorgroei liet zien dat de tumorremmende eigenschap van celecoxib te verklaren was door het anti-angiogenetisch effect. Dit resulteerde in een reductie van de voeding en drainage van bloedvaten in de tumoren. Om het directe effect van celecoxib op de tumor te onderzoeken, werd tumorcelapoptose histologisch onderzocht. TUNEL assays lieten zien dat celecoxib tumorcelapoptosis

versterkte in secundaire bottumoren die metastaseren vanuit een primaire longtumor. SU6668, een molocculreceptor thyrosinekinaseinhibitor, werd onderzocht op het anti-angiogenetisch effect op SW1353 chondrosarcoma's (hoofdstuk 4). Deze stof had een significant effect op de vermindering van tumorvascularisatie van 37% wanneer het werd vergeleken met een negatieve controlegroep. De afname van FVD ging gepaard met een beperking van de groei van de tumor. Na 28 dagen was het tumorvolume in de dieren, die behandeld werden met SU6668, 53 % kleiner dan die in de controledieren. Dit effect lijkt te worden veroorzaakt door het ant-angiogenetische effect van SU6668, dat mede gefaciliteerd wordt door de inhibitie van de sleutel angiogenetische receptor tyrosine kinases Flk-1/KDR (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2), platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFRbeta), en fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1).

De standaardbehandeling van botmetastasen bestaat uit bestraling van de aangedane botregio om zo progressie van de ziekte en botfracturen te voorkomen. Omdat het effect van de bestraling op de tumoren afhankelijk lijkt te zijn van de stralingsdosis, lijkt een strategie, waarmee de effectieve dosis van de bestraling wordt verhoogd noodzakelijk om het therapeutisch effect van de radiotherapie te verbeteren. Recente strategieën, gericht op het optimaliseren van de efficiëntie van radiotherapie, lijken gericht op moleculaire doelen, om zo de bestralingsgevoeligheid van maligne tumoren te verhogen. In dit opzicht lijkt de prostaglandine "signaling pathway" een belangrijke rol te spelen. Het is aangetoond dat de modulatie van prostaglandinesynthese invloed heeft op de reactie van tumoren op bestraling. Dit leidde tot de hypothese dat de selectieve cox-2 inhibitor celecoxib mogelijk de gevoeligheid voor bestraling van secundaire bottumoren, die metastaseren uit long carcinomen, in vivo verhoogd. In tegenstelling tot monotherapie bestaande uit of alleen bestraling of alleen celecoxib, blijkt dat de combinatie van beide regimes tumorprogressie kan stoppen (hoofdstuk5). Dit sterke afremmen van tumorgroei ging gepaard met een duidelijke afname van tumorvoedende bloedvaten. De combinatie van radiotherapie en celecoxib vergrootte de gevoeligheid van secundaire bottumoren op de bestraling. Deze benadering zal wellicht ook het therapeutisch effect van lokale radiotherapie op het botmetastasen kunnen verhogen.

Vascularisatie is cruciaal voor de ontwikkeling en instandhouding van de meeste weefsels en is een voorwaarde voor de genezing van botdefecten.



Revascularisatie van de bot defecten waarin biomaterialen zijn geïmplant, verzekert voldoende aanvoer van voeding, afvoer van metabole bijproducten en aanvoer van cellen en groeifactoren die de vorming van botweefsel ondersteunen. Het mag bekend verondersteld worden dat de mate van botingroei in poreuze calciumfosfaten afhankelijk is van de porositeit van het materiaal. Verder is het zo dat in botsubstituten, met een verbonden poreus systeem, bloedvaten in het implantaatmateriaal kunnen doordringen, waardoor een dicht vaatsysteem zich kan ontwikkelen. Daarom stellen we dat de mate van porositeit van de botsubstituten niet alleen van invloed is op de ingroei van vitaal bot, maar ook op die van bloedvaten (dus angiogenese). Op deze wijze wordt het genezingsproces beïnvloed na implantatie. Het schedeldak is geaccepteerd als een onderzoeksgebied waar men in ratten het genezingsproces van bot substituten kan onderzoeken. Aan de andere kant is het intravitaal bestuderen van de angiogenese en microcirculatie van implantaatmaterialen met behulp van een microscoop nog niet beschreven. De schedelluikpreparatie, zoals beschreven in de hoofdstukken 2-5, hebben wij vergroot tot de omvang van een "critical size defect". Het specifieke doel van het onderzoek, beschreven in hoofdstuk 6, was om de invloed van de mate van porositeit van calciumfosfaat op vascularisatie en botformatie in "critical size defects" in muizen te bestuderen. Door gebruik te maken van de intravitaalmicroscopie-techniek, gecombineerd met histomorfometrie, konden we aantonen dat de porositeitdiameter van bi-fasisch calciumfosfaatkeramiek een cruciale parameter is in de vascularisatie en botingroei van dit materiaal in vivo. Vascularisatie correleerde zowel met het volume van nieuw gevormde bot in de macroporositeiten als ook het botcontact met de micro porositeiten. Door de macroporositeiten te verkleinen, nam ook de vasculairisatie van het keramischmateriaal af, evenals de botformatie.

Het lokaal appliceren van bot groeifactoren is een veelbelovende behandeloptie om de vascularisatie van keramische biomaterialen te bevorderen. Het aanbrengen van botgroeifactoren op calciumfosfaatkeramiek is geprobeerd door directe adsorptie. Dit heeft geleid tot een snelle en passieve release van deze proteïne. Hierdoor waren de groeifactoren slechts beperkt beschikbaar en hadden een minimale werking op het effect van de behandeling van botregeneratie. Recentelijk is een techniek ontwikkeld, gebaseerd op coprecipitatie van proteïnen met calciumfosfaat, waardoor deze proteïnen op titanium implantaten konden worden aangebracht, geïncorporeerd in een laag

van calciumfosfaat. Deze incorporatie verminderde de passieve proteïne afgifte wanneer dit werd vergeleken met de directe adsorptietechniek. BMP-2 dat op deze wijze samen met calciumfosfaat geco-precipiteerd werd op titanium implantaten behield zijn bio-activiteit, zowel in vivo als in vitro. Dit leidde tot de hypothese (i) dat de "burst release" van proteïnen van het oppervlakte van keramische biomaterialen, die we vonden bij conventionele proteïne adsorptie, kon worden geminimaliseerd door de co-precipitatie van proteïnen in calciumfosfaat en (ii) dat proteïne incorporatie kan leiden tot een geleidelijke afgifte van proteïnen, gestuurd door de resorptieactiviteit van beenmergcellen die kunnen differentiëren in monocyte/macrophagen en osteoclasten. Om deze hypothese te testen werd dierlijk serumalbumine tritiumgelabeld ( $[^3\text{H}]\text{BSA}$ ) en gebruikt als een proteïne om het co-precipitatieeffect en de "release kinetics" van de proteïne uit het opgebrachte keramische materiaal (hoofdstuk 7) te onderzoeken. Door  $[^3\text{H}]\text{BSA}$  te incorporeren in de driedimensionale structuur van het calciumfosfaat was het mogelijk om voldoende  $[^3\text{H}]\text{BSA}$  vast te houden op het biomateriaal en kon de "burst release" van het proteïne tot een minimum worden beperkt. Zo konden we een continu, osteoclastgestuurde proteïne release realiseren.

De volgende stap was nu om te onderzoeken of een "long-term release" van VEGF aanzet tot biomateriaalvascularisatie en de osseointegratie van calciumfosfaatkeramiek in vivo (hoofdstuk 8). VEGF was geco-precipiteerd in het calciumfosfaatkeramiek en de "release kinetics" van de proteïnen van het dragermateriaal werden in vitro onderzocht. Voor in vitro-onderzoek werden BCP-keramiekimplantaten in "critical sized defects" in Balb/c muizen ingebracht. In vitro werd een continue celgestuurde release van een lage concentratie van VEGF uit het BCP-keramischimplantaatmateriaal door resorberende osteoclasten gerealiseerd. In vivo werd de continue afgifte van VEGF bereikt door proteïne-co-precipitatie in het keramisch materiaal en dit resulteerde in een toename van de vascularisatie van het botmateriaal, botformatie en osseointegratie. Daartegen werd bij "burst release" van VEGF, noch angiogenese noch botformatie gestimuleerd. De "release kinetics" van VEGF, die werden bereikt door de co-precipitatie techniek, verbeterden de effectiviteit van VEGF aanzienlijk en laten zien dat een langere lokale beschikbaarheid van lage concentraties van VEGF ondersteunend is voor botregeneratie.

Dit proefschrift laat zien dat anti-angiogentische therapie van primaire en secundaire bottumoren de progressie van de groei beperkt door vermindering van de vascularisatie van de tumoren. Tevens laat het zien dat het anti-angiogentisch effect van Cox-2 remmers het therapeutisch effect van conventionele bestraling van bottumoren verbeterde. Stimulatie van angiogenesis door het lokaal appliciëren van VEGF in een "long-term release systeem" leidde tot een toename van botvascularisatie en botformatie. Deze resultaten laten zien dat de beperking van angiogenese als ook het stimuleren ervan een veelbelovende strategie is om de therapeutische behandeling van verschillende afwijkingen van het skelet te verbeteren.

## **CURRICULUM VITAE**

Frank Michael Klenke, MD

Date of birth: 25.01.1974

Place of birth: Hannover, Germany

Marital status: married

Citizenship: German

### **School education**

1980 – 1987 Elementary school / high school, Hannover, Germany

1987 – 1993 High school, Bremen, Germany

27.05.1993 University-entrance diploma, Bremen, Germany

### **Basic military service**

1993 – 1994 German air force, Bremen, Germany

### **Medical Training**

1994 – 1996 Medical school, University of Hannover, Germany

1996 – 2001 Medical school, University of Heidelberg, Germany

2001 Degree of Medical Science, University of Heidelberg, Germany

2002 Medical Doctor, Thesis: “Long-term results after operative and non-operative treatment of anterior cruciate ligament rupture.”

### **Residency**

01.08.2001 – 28.02.2003 Department of Orthopedic Surgery, University of Heidelberg, Germany

01.03.2003 – 28.02.2005 Department of General, Visceral and Accident Surgery, University of Heidelberg, Germany

01.01.2007 – to date Department of Orthopedic Surgery, Inselspital, Berne University Hospital, Switzerland

### **Clinical Fellowships**

01.04.2008 – 30.06.2008 Mayo Clinic, Department of Orthopedics, Musculoskeletal Oncology, Franklin Sim, MD

### **Research Fellowships**

- 01.03.2005 – 31.12.2006      Group for Bone Biology and Orthopedic Research, Department Clinical Research, University of Berne, Switzerland, Prof. W. Hofstetter
- 01.07.2008 – 30.09.2008      Mayo Clinic, Rochester, USA, Tissue Engineering and Biomaterials Laboratory, Prof. M. Yaszemski

### **Research support**

University of Berne, Switzerland, Grant-in-Aid. “Analysis of angiogenesis and osseointegration of bone substitutes: An intravital microscopy study in mice.”

Novartis Foundation for Medical and Biological Research, Basel, Switzerland. “Growth factor delivering calcium phosphate ceramics as biomaterials for bone substitution.”

AO Research Foundation, Dübendorf Switzerland. “Development of biomaterial – growth factor constructs for the use as bone substitutes.”

Amgen Extramural Research Alliance, Amgen Inc., Thousand Oaks, USA. “Promoting the resorption of bone substitutes: A new biomaterial coating technique for the administration of the osteoclast growth factor RANKL.”

Robert Mathys Foundation, Bettlach, Switzerland. “RANKL delivering bone substitutes – a new approach to improve the resorption of CaP ceramics.”

University of Berne, Switzerland. Unterstützung zur Vorbereitung eines Forschungsgesuches beim SNF. “RANKL delivering bone substitutes – a new approach to improve the resorption of CaP ceramics.”

Swiss National Science Foundation, Berne, Switzerland. Individual Short Research Visit, Mayo Clinic, Rochester, USA. “Effect of injectable, degradable PPF/PCLF composite scaffolds loaded with BMP-2 on bone formation in a rabbit posterolateral spine fusion model.”

### **Language skills**

German (mother tongue), English (fluent), French (advanced)

## SCIENTIFIC PUBLICATIONS

A. ABDOLLAHI, K.E. LIPSON, A. SCKELL, H. ZIEHER, **F. KLENKE**, D. POERSCHKE, A. ROTH, X. HAN, M. KRIX, M. BISCHOF, P. HAHNFELDT, H.J. GRONE, J. DEBUS, L. HLATKY, P.E. HUBER: Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res*, **63** (24): 8890-8, 2003

E. BERTL, K. KLIMO, E. HEISS, **F. KLENKE**, P. PESCHKE, H. BECKER, T. EICHER, C. HERHAUS, G. KAPADIA, H. BARTSCH, C. GERHÄUSER: Identification of novel chemopreventive inhibitors of angiogenesis using a human *in vitro* antiangiogenic assay. *Int J Cancer Chemopre*, **1** (1): 47-61, 2004

**F.M. KLENKE**, T. MERKLE, M.M. GEBHARD, V. EWERBECK, A. SCKELL: A novel method for the investigation of angiogenesis, microcirculation, and growth of primary and secondary bone tumors: An experimental study in mice. *Lab Anim*, **39** (4): 377-383, 2005

**F.M. KLENKE**, T. MERKLE, M.M. GEBHARD, V. EWERBECK, A. SCKELL: The selective COX-2 inhibitor Celecoxib inhibits angiogenesis and growth of secondary bone tumors *in vivo*. *BMC Cancer*, **6**: 9, 2006

**F.M. KLENKE**, E. BERTL, A. ABDOLLAHI, M.M. GEBHARD, P.E. HUBER, A. SCKELL: Thyrosine kinase inhibitor SU6668 represses chondrosarcoma growth via antiangiogenesis *in vivo*. *BMC Cancer*. 2007 Mar 17;7:49

**F.M. KLENKE**, Y. LIU, H. YUAN, E.B. HUNZIKER, K.A. SIEBENROCK, W. HOFSTETTER: Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitute *in vivo*. *J Biomed Mater Res A* 2008 85(3):777-86

E. WERNIKE, Y. LIU, G. WU, H.J. SEBALD, D. WISMELJER, K.A. SIEBENROCK, E.B. HUNZIKER, W. HOFSTETTER, **F.M. KLENKE**. Long-term cell-mediated protein release from calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res A*. 2009 [Epub ahead of print]

A. SCKELL, **F.M. KLENKE**. The cranial bone window model: studying angiogenesis of primary and secondary bone tumors by intravital microscopy. *Methods Mol Biol*. 2009;467:343-55

**F.M. KLENKE**, M.M. GEBHARD, A. ABDOLLAHI, P.E. HUBER, A. SCKELL: Tumor radioresponse of secondary bone tumors of a human non-small cell lung cancer is enhanced by combination of radiation with the selective COX-2 inhibitor Celecoxib. *Submitted for publication*

E. WERNIKE, M.O. MONTJOVENT, Y. LIU, D. WISMELJER, K.A. SIEBENROCK, E.B. HUNZIKER, W. HOFSTETTER, **F.M. KLENKE**. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularization and bone formation *in vivo*. *Submitted for publication*

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The work constituting this thesis was performed at the University of Berne, Switzerland (Department of Clinical Research, Group for Biology and Orthopedic Research), the Academic Center for Dentistry Amsterdam, The Netherlands (ACTA, Department of Oral Implantology and Prosthodontics), and the University of Heidelberg, Germany (Department of Orthopedic Surgery). I acknowledge the courtesy of these institutions in allowing me to use their facilities for conducting my research.

In particular, I would like to thank Prof. Willy Hofstetter for his continuous support of my research at the University of Berne. I am very grateful for his encouraging and critical advice and his patience during inspiring and sometimes exhausting discussions. I am very thankful to Prof. Ernst Hunziker for his helpful professional advice especially on three-dimensional histomorphometry. Special thanks to Dr. Yuelian Liu for her supportive help with the immobilization techniques of proteins on biomaterials and for encouraging me to submit a doctorate thesis to the VU University Amsterdam. I am deeply grateful to Prof. Daniel Wismeijer for his professional advices and for promoting my thesis.

I would like to thank Dr. Ellen Wernike for her unfatiguing work and commitment towards our research projects at the University of Berne. Thanks to all the other members of the Group for Biology and Orthopedic Research in particular Silvia Dolder, Dr. Rainer Egli, Dr. Marc-Olivier Montjovent, Mark Siegrist, Dr. Hans-Jörg Sebald, and Dr. Antoinette Wetterwald for their sympathy and help.

My sincere acknowledgements also addressed to Prof. Klaus Siebenrock for his support on conducting my research whilst working as a clinician at the Department of Orthopedic Surgery of the Berne University Hospital.

Particular thanks go to Dr. Axel Sckell who believed in my scientific ambitions and introduced me into the world of research. He gave me the opportunity to join his research group after graduation from medical school.

Special thanks go to my entire family, in particular to my parents and my two brothers for their unlimited encouragement in any aspect of my life. I could not have wished for a better one.

And finally, I wish to thank my lovely wife Elisabeth for her emotional support and understanding during my time consuming scientific and clinical work and for always being there for me.