

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

**Experimentelle Untersuchungen neuer biologischer Behandlungsmethoden zur Regeneration von Knochen, Gelenkknorpel und Sehnen**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach

Orthopädie und Unfallchirurgie

vorgelegt von

Dr. med. Volker Michael Betz

aus Göppingen

2021

## Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis .....	Seite 2
II. Zusammenfassung der kumulativen Habilitationsleistung .....	Seite 3
III. Eidesstattliche Erklärung.....	Seite 7
IV. Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation.....	Seite 8
V. Hauptteil	
1. Einleitung .....	Seite 10
1.1 Problemstellungen und klinische Relevanz .....	Seite 10
1.2 Gentherapie als mögliche Problemlösung .....	Seite 12
1.3 <i>In vivo</i> Gentherapie.....	Seite 13
1.4 Traditionelle <i>ex vivo</i> Gentherapie .....	Seite 15
1.5 Beschleunigte <i>ex vivo</i> Gentherapie.....	Seite 18
2. Material und Methoden .....	Seite 20
3. Ergebnisse.....	Seite 23
3.1 Publikation 1 .....	Seite 23
3.2 Publikation 2.....	Seite 24
3.3 Publikation 3 .....	Seite 25
3.4 Publikation 4.....	Seite 26
3.5 Publikation 5 .....	Seite 27
3.6 Publikation 6.....	Seite 28
3.7 Publikation 7.....	Seite 29
3.8 Publikation 8.....	Seite 30
4. Diskussion .....	Seite 33
5. Schlussfolgerung und Ausblick .....	Seite 37
VI. Literaturverzeichnis.....	Seite 38
VII. Publikationen des Autors .....	Seite 50
VIII. Danksagung .....	Seite 54
IX. Anhang – Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation.....	Seite 55

## I. Abkürzungsverzeichnis

AAV	=	Adeno-assoziiertes Virus
Ad	=	Adenovirus
Ad.BMP-2	=	adenoviraler BMP-2 Gentransfervektor
ACT	=	Autologe Chondrozyten Transplantation
ALP	=	alkalische Phosphatase
bFGF	=	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	=	Bone Morphogenetic Protein
BSP	=	bone sialoprotein
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
Colla1	=	Kollagen Typ I, alpha 1
DEXA	=	dual energy x-ray absorptiometry
FOP	=	fibrodysplasia ossificans progressiva
GDF-5	=	Growth- and Differentiation-Factor -5
GFP	=	Green Fluorescence Protein
GMP	=	good manufacturing practice
IGF	=	Insulin-like Growth Factor
LacZ	=	LacZ gene encoding $\beta$ -galactosidase
LV	=	Lentivirus
$\mu$ CT	=	mikro-Computertomografie
OCN	=	Osteocalzin
OCT	=	Osteochondrale Transplantation
OPN	=	Osteopontin
pfu	=	plaque forming units
PLGA	=	poly lactic-co-glycolic acid
PP 1 – 6	=	preplate 1 - 6
qRT-PCR	=	quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Runx2	=	Runt-related Transcription Factor 2
RV	=	Retrovirus
SOX9	=	SRY-Box Transcription Factor 9
Scl	=	Sclerostin
Scx	=	Scleraxis
TGF- $\beta$ 1	=	Transforming Growth Factor beta 1

## II. Zusammenfassung der kumulativen Habilitationsleistung

Die Entwicklung neuer Methoden zur Reparatur von Knochen, Gelenkknorpel und Sehnen ist ein wichtiger Bestandteil moderner Forschung in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Es ist abzusehen, dass die Nachfrage nach wirksamen Therapien aufgrund der alternden Bevölkerung weiter deutlich zunehmen wird. In der gesamten Regenerativen Medizin gewinnen Gentransfer-Technologien zunehmend an Bedeutung. Ursprünglich zur Korrektur von Gendefekten entwickelt, hat sich die Gentherapie in experimentellen Studien auch als effektive Methode zur Behandlung von erworbenen Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems erwiesen. Der Vorteil der Gentherapie im Gegensatz zur Proteintherapie liegt darin, dass therapeutische Moleküle lokal, in niedriger Dosierung, über einen längeren Zeitraum wirken können.

Präklinische experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Regeneration von Knochen, Gelenkknorpel und Sehnen mit Hilfe verschiedener Gentransfer-Strategien erfolgreich angeregt werden kann. Die *in vivo* Gentherapie zeichnet sich dadurch aus, dass Genvektoren injiziert und somit minimal-invasiv im Bereich der Gewebeläsion appliziert werden können. Der Gentransfer auf Zellen im Bereich bestimmter anatomischer Strukturen durch Transduktion oder Transfektion findet hierbei im Körper statt. Bei der *ex vivo* Gentherapie hingegen werden Zellen im Labor unter kontrollierten Bedingungen genetisch verändert und dann in den Gewebedefekt implantiert. Dies erhöht die Sicherheit, jedoch ist das Extrahieren und Expandieren der Zellen zeitaufwendig und mit hohen Kosten verbunden. Die in dieser Habilitationsschrift beschriebenen wissenschaftlichen Experimente wurden durchgeführt, um eine sichere und praktikable Gentherapie-Technologie zur Geweberegeneration zu entwickeln.

Die ersten Versuche dienten der Evaluation der direkten, perkutanen Verabreichung eines adenoviralen Vektors, der cDNA überträgt, die für Bone Morphogenetic Protein – 2 kodiert (Ad.BMP-2). Diese *in vivo* Gentherapie wurde in einem Knochendefektmodell in Ratten untersucht. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die perkutane Injektion von Ad.BMP-2 die Regeneration von großen segmentalen Knochendefekten anregt, wurde in einem Dosisvergleich die effektivste Vektordosis ermittelt. Da für die direkte Injektion des Gentransfervektors in den Knochendefekt Nachteile hinsichtlich der Sicherheit gesehen wurden (ektope Knochenbildung, Immunreaktion) und nicht in allen Versuchstieren eine zuverlässige, robuste Knochenheilung erreicht wurde, sollte eine vereinfachte *ex vivo*

Gentherapie entwickelt werden. Die Idee war, komplette Gewebestücke genetisch zu aktivieren und als biologische osteo-regenerative Implantate zu verwenden. Ohne die Extraktion, Expansion und Langzeitkultivierung von Stammzellen sollte so eine beschleunigte Gentherapie entwickelt werden, welche die Sicherheit des herkömmlichen *ex vivo* Gentransfers bietet.

Anstelle von isolierten Zellen wurden komplette Muskelgewebestücke mit adenoviralem BMP-2 Gentransfervektor in Kontakt gebracht. Dies führte zur Transduktion von oberflächlich gelegenen Zellen und zur Produktion des Wachstumsfaktors. Die Implantation der genaktivierten Gewebeimplantate in Knochendefekte einer kritischen Größe im Rattenmodell führte zu einer schnellen Regeneration des Knochens. Initiale Studien belegten die Effektivität von BMP-2 transduzierten Gewebefragmenten. Ein Vergleich im Rattenmodell zeigte, dass diese Methode zur Reparatur großer segmentaler Knochendefekte so effektiv ist wie die Behandlung mit autologem Knochen. Danach folgten Experimente mit BMP-7 genaktiviertem Muskelgewebe, durch dessen Implantation ebenfalls eine schnelle Induktion der Knochenbildung im Defekt erreicht wurde. Eine Bildung von Ossifikationen an heterotoper Stelle wurde hierbei nicht gesehen.

Da bekannt wurde, dass subkutanes Fettgewebe ebenfalls eine große Anzahl potenter Stammzellen enthält und entnommen werden kann, ohne eine relevante Morbidität an der Entnahmestelle zu erzeugen, wurde auch das Potenzial genaktivierter Fettgewebefragmente untersucht. Die *in vivo* Experimente demonstrierten, dass auch subkutane Fettgewebeimplantate, nach Transduktion mit BMPs, Knochendefekte einer kritischen Größe in der Ratte zur Heilung anregen.

Da BMPs nicht nur osteogene Wirkung besitzen, sondern auch die Chondrogenese induzieren können, sollte die Möglichkeit getestet werden, diese beschleunigte *ex vivo* Gentherapie auch zur Regeneration osteochondraler Defekte einzusetzen. Mehrere Studien hatten bereits darauf hingewiesen, dass Stammzellen aus Muskelgewebe unter dem Einfluss von BMPs chondrogen differenzieren können. So wurden in einem präklinischen Experiment BMP-2 genaktivierte Muskelgewebefragmente in osteochondrale Defekte in Kaninchenknien implantiert und das Regenerat histologisch und biomechanisch untersucht. Die Implantation des transduzierten Muskelgewebes führte biomechanisch zu einer erhöhten Steifigkeit des Regenerats im Vergleich zur Kontrollgruppe mit unbehandeltem

Muskelgewebe und histologisch zu einer verbesserten Reparatur des subchondralen Knochens im Vergleich zu unbehandelten Defekten.

Durch eine weitere Studie sollte herausgefunden werden, ob durch die Implantation von genaktivierten Gewebefragmenten auch die Heilung von Sehnen verbessert werden kann. Für dieses Experiment im Rattenmodell wurde die durchtrennte und anschließend zusammengenähte Achillessehne mit einem Muskelgewebetransplantat behandelt, das durch adenoviralen Transfer von Transforming Growth Factor –  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) genetisch modifiziert wurde. Die Heilung wurde histologisch und biomechanisch evaluiert, wobei Kontrollgruppen entweder unbehandelte Muskelimplantate oder kein Muskelgewebe erhielten. Die Behandlung der verletzten Achillessehnen mit TGF- $\beta 1$  genaktiviertem Muskelgewebe führte zu einer beschleunigten Heilung.

Die bis dahin durchgeführten *in vivo* Studien demonstrierten das regenerative Potenzial der genaktivierten Gewebeamplantate. Durch weitere *in vitro* Experimente sollte nun erforscht werden, ob die Osteoinduktion in Muskel- und Fettgewebefragmenten noch stärker angeregt werden kann. Hierbei interessierte, ob die Heterodimere BMP-2/6 und BMP-2/7 stärker osteoinduktiv wirken als homodimeres BMP-2. In einem *in vitro* Kultursystem wurden diese Knochenwachstumsfaktoren als rekombinante Proteine in einer hohen und einer niedrigen Dosis in das osteogene Nährmedium hinzugegeben. Die Evaluation erfolgte durch PCR, Histologie, Histomorphometrie und Immunhistologie. Die BMPs führten zu osteogenen Differenzierungsprozessen innerhalb der Muskel- und Fettgewebefragmente. Interessanterweise zeigte sich, dass das homodimere BMP-2 deutlich stärker osteoinduktiv wirkte als die beiden Homodimere. Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen weisen auch darauf hin, dass implantierte BMP-aktivierte Muskel- und Fettgewebestücke nicht nur als Lieferanten von Wachstumsfaktoren dienen, die Stammzellen anlocken und Reparaturprozesse *in situ* anregen, sondern unter dem Einfluss der BMPs auch aktiv durch osteogene Differenzierung zur Neubildung von Knochen *in vivo* beitragen könnten.

Die Entwicklung der hier beschriebenen, beschleunigten *ex vivo* Gentherapie soll es ermöglichen, dass während einer Operation – ohne Extraktion und Vermehrung von Stammzellen – autologe zellbasierte Implantate hergestellt werden können, die Gewebe des muskuloskelettalen Apparates schnell und zuverlässig regenerieren. Die genaktivierten Muskel- oder Fettgewebefragmente dienen hierbei als 3-dimensionale biodegradierbare

Füllmaterialien, die Stammzellen beherbergen und im Defektbereich über einen ausgedehnten Zeitraum osteogene, chondrogene oder tenogene Wirkstoffe produzieren. Zukünftige *in vitro* Arbeiten mit Fett- und Muskelgewebe sollen zunächst die optimalen Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktorkombinationen identifizieren, die zur Regeneration von Knorpel und Sehnen geeignet sind, sodass anschließend die entsprechenden Gentransfervektoren für weitere Untersuchungen generiert werden können. Im Bereich der Knochenregeneration soll zukünftig die Effektivität von BMP-2 transduzierten Muskel- und Fettimplantaten im Großtiermodell untersucht werden. Hierbei sollen auch umfangreiche laborchemische und histologische Analysen durchgeführt werden, um mögliche schädliche Nebeneffekte der Technologie zu detektieren.

### **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 20. Januar 2021

Dr. med. Volker Michael Betz



## IV. Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation

### Publikation 1

**Betz V.M.**, Betz O.B., Glatt V., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A., Boussein M.L., Vrahas M.S., and Evans C.H. (2007). *Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose.* Hum Gene Ther, 18(10): p. 907-15. Impact Factor: 4,20

### Publikation 2

Betz O.B., **Betz V.M.**, Schroeder C., Penzkofer R., Gottlinger M., Mayer-Wagner S., Augat P., Jansson V., and Müller P.E. (2013). *Repair of large segmental bone defects: BMP-2 gene activated muscle grafts vs. autologous bone grafting.* BMC Biotechnol, 13: p. 65. Impact Factor: 2,59

### Publikation 3

**Betz V.M.**, Betz O.B., Rosin T., Keller A., Thirion C., Salomon M., Manthey S., Augat P., Jansson V., Müller P.E., Rammelt S., and Zwipp H. (2015). *The effect of BMP-7 gene activated muscle tissue implants on the repair of large segmental bone defects.* Injury, 46(12): p. 2351-8. Impact Factor: 1,91

### Publikation 4

**Betz V.M.**, Betz O.B., Rosin T., Keller A., Thirion C., Salomon M., Manthey S., Augat P., Jansson V., Müller P.E., Rammelt S., and Zwipp H. (2016). *An expedited approach for sustained delivery of BMP-7 to bone defects using gene activated fragments of subcutaneous fat.* J Gene Med, 18(8):199-207. Impact Factor: 3,25

### Publikation 5

**Betz V.M.**, Keller A., Foehr P., Thirion C., Salomon M., Rammelt S., Zwipp H., Burgkart R., Jansson V., Müller P.E., and Betz O.B. (2017). *BMP-2 gene activated muscle tissue fragments for osteochondral defect regeneration in the rabbit knee.* J Gene Med, 19: p. (9-10). Impact Factor: 1,65

### **Publikation 6**

Majewski M., Porter R.M., Betz O.B., **Betz V.M.**, Clahsen H., Fluckiger R., and Evans C.H. (2012). *Improvement of tendon repair using muscle grafts transduced with TGF-beta1 cDNA*. Eur Cell Mater, 23: p. 94-101; discussion 101-2. Impact Factor: 4,56

### **Publikation 7**

**Betz V.M.**, Ren B., Messmer C., Jansson V., Betz O.B., and Müller P.E. (2018). *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, 20(9): p. e3042. Impact Factor: 1,65

### **Publikation 8**

**Betz V.M.**, Ren B., Betz O.B., Jansson V., and Müller P.E. (2021). *Osteoinduction within adipose tissue fragments by heterodimeric Bone Morphogenetic Proteins-2/6 and -2/7 versus homodimeric Bone Morphogenetic Protein-2: therapeutic implications for bone regeneration*. J Gene Med, 2021: p. e3311. Impact Factor: 3,25

## V. Hauptteil

### 1. Einleitung

#### 1.1 Problemstellungen und klinische Relevanz

##### Knochenregeneration

In der Regel wird autologer Knochen vom Kliniker transplantiert, wenn es um die Versorgung knöcherner Defekte und Wirbelkörperfusionen geht. Die Morbidität an der Entnahmestelle und die limitierte Menge des zur Verfügung stehenden knöchernen Materials sind jedoch die Probleme, die mit diesem Verfahren einhergehen. Zudem ist die Effektivität der Methode vor allem bei großen Defekten, geringer Weichteildeckung und reduzierter Durchblutung begrenzt [1-3]. Bei solch schwierigen klinischen Fällen kann die Methode nach Masquelet zum Einsatz kommen, bei der im Abstand von mehreren Wochen zwei Operationen durchgeführt werden müssen [4]. Nachdem sich eine Pseudoperiostmembran um einen Platzhalter aus Zement gebildet hat, wird auch hier autologer Knochen implantiert [5]. Eine weitere Alternative stellen Kallusdistraction und Segmenttransport dar, wobei ungefähr 1 mm pro Tag distrahiert werden kann [6-8]. Da die zuvor genannten Methoden mit erhöhten Risiken einher gehen, aufwendig, zeitintensiv und mit Schmerzen verbunden sind [9, 10], wurde und wird intensiv an innovativen Methoden zur Knochenregeneration geforscht. Molekulare Methoden („Orthobiologics“) gerieten hierbei in den Vordergrund und es resultierte die Identifikation zahlreicher Knochenwachstumsfaktoren. Intensiv untersucht wurden die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), von denen die rekombinanten Proteine BMP-2 und BMP-7 eine klinische Zulassung erhielten [11, 12]. Diese konnten zwar bisher vielfach erfolgreich eingesetzt werden, jedoch besteht ein Nachteil der Anwendung rekombinanter Proteine darin, dass diese aufgrund ihrer kurzen biologischen Halbwertszeit rasch vom Körper abgebaut werden [13]. Dies macht die Verabreichung unphysiologisch hoher Proteinmengen notwendig. Die Tatsache, dass relevante Proteinmengen den Ort der Implantation verlassen können, sieht man als Grund für das Auftreten einiger Komplikationen, die durch den Einsatz der rekombinanten BMPs bei Operationen im Halswirbelsäulenbereich registriert wurden [14-17]. Durch innovative Technologien muss daher zukünftig erreicht werden, dass nur physiologisch kleine Mengen solcher Wachstumsfaktoren über längere Zeit direkt am Ort der Implantation wirken. Wie wichtig die Entwicklung verbesserter molekularer Therapien

auf dem muskuloskelettalen Gebiet ist verdeutlicht der Blick auf den demografischen Wandel. Es wird prognostiziert, dass effektive Methoden zur Regeneration von Knochen zukünftig zunehmend benötigt werden [18]. Bei Frakturen können in 9% der Fälle Pseudarthrosen auftreten [19], wobei bei Risikopatienten bis zu 40% Pseudarthrosen gesehen werden [20]. Sozioökonomische Probleme können durch die Neuentwicklung kosten-effektiver Behandlungsstrategien bewältigt werden. Die Behandlungskosten einer Pseudarthrose belaufen sich auf bis zu EUR 91 000 [19].

### Knorpelregeneration

Der avaskuläre Gelenkknorpel besitzt eine sehr begrenzte Fähigkeit zur Regeneration. Knorpelzellen sind nur sehr eingeschränkt teilungs- und migrationsfähig [21]. In bis zu 62% der Kniearthroskopien zeigen sich Knorpelschäden [22]. Selbst kleine Knorpelschäden können sich ausweiten und die Entwicklung einer Arthrose begünstigen [23]. Knorpelläsionen bis zu einer Größe von 3 cm<sup>2</sup> können durch die Mikrofrakturierung oder Pridie-Bohrung behandelt werden [24]. Hierbei wird die subchondrale Lamelle eröffnet, sodass es zu einem Einströmen von Blut und Stammzellen in den Defektbereich kommt [25]. Mit diesem Verfahren erzielt man allerdings nicht die Regeneration der hyalinen Gelenkknorpelschicht sondern lediglich die Bildung eines Ersatzfaserknorpels [25]. Zur Behandlung größerer Knorpeldefekte wurde die Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) als Tissue Engineering Methode klinisch etabliert [24]. Diese erzielt häufig gute Resultate, jedoch treten Komplikationen wie Transplantathypertrophie, partielle Transplantatinsuffizienzen und Knochenmarködeme auf [26-30]. Zudem erfordert die ACT zwei chirurgische Eingriffe bei denen zunächst Knochen-Knorpel-Zylinder aus weniger lasttragenden Bereichen des Gelenkes entnommen werden und später, nachdem die Knorpelzellen in einem GMP Labor extrahiert und über Wochen kultiviert wurden, die autologen Chondrozyten in den Knorpeldefekt implantiert werden. Die Methode ist dadurch aufwendig und relativ teuer und auch durch sie lässt sich lediglich hyalin-artiger Knorpel generieren [31, 32]. Die Kosten einer ACT belaufen sich in einem 5 Jahres Zeitraum auf über EUR 23000 [33]. Die Transplantation von Knochen-Knorpel-Zylindern (osteocondrale Transplantation, OCT), die, wie auch im Falle der ACT, von weniger belasteten Bereichen des Gelenkes entnommen werden, können in einen osteochondralen Defekt implantiert werden, sodass dort sofort hyaliner Knorpel vorherrscht. Ein Vorteil der OCT ist, dass nur eine Operation nötig ist und die Behandlung dadurch preiswerter ist als die ACT [34]. Ausserdem kann das Gelenk früher belastet werden, da ein stabiles

Konstrukt mit hyalinem Knorpelüberzug transplantiert wurde [35]. Allerdings besteht bei der OCT die Gefahr einer Morbidität an der Entnahmestelle und die Menge an zu entnehmenden Knochen-Knorpel-Zylindern ist begrenzt [36, 37]. Insgesamt werden die verfügbaren Knorpelreparaturmethoden für jüngere Patienten empfohlen, da die Heilungstendenz des Knorpels im höheren Alter deutlich abnimmt und degenerative Veränderungen eine Kontraindikation darstellen [38-40]. Eine Stimulation der Regeneration durch Wachstumsfaktoren erscheint somit auch beim geschädigten Knorpel sinnvoll. Die Gesamtausgaben über einen 5 Jahres Zeitraum für die im Jahr 2016 durchgeführten matrix-gestützten ACT wurden auf über EUR 70 Millionen und für die Mikrofrakturierung auf über EUR 870 Millionen geschätzt [33]. Effektive und preiswerte Alternativen zur Behandlung von Knorpelläsionen werden dringend gesucht.

### Sehnenregeneration

Sehnenrupturen stellen oft Sportverletzungen dar, die durch Überbelastung verursacht werden. Sie können aber auch spontan durch degenerative Veränderungen bedingt bei älteren Menschen auftreten. Die zellarmen und hypovaskulären Sehnen verlieren mit zunehmendem Alter an Zugfestigkeit und ihre Fähigkeit zu regenerieren. 5-10% der Zellen in Sehnen sind Stammzellen, welche durch ihre nachlassende Aktivität für das reduzierte Heilungspotenzial der Sehnen im Alter mitverantwortlich sind [41]. Zu den von Verletzungen häufig betroffenen Sehnen gehören die Sehnen der Rotatorenmanschette und die Achillessehne. 84 000 Achillessehnenrupturen treten in Europa pro Jahr auf, von denen etwa 30% operativ versorgt werden [42]. Die rupturierte Sehne wird hierbei entweder offen oder perkutan zusammengenäht. Eine komplette Regeneration mit Wiederherstellung der ursprünglichen Sehnenarchitektur wird nicht erreicht, sodass es in bis zu 10% der Fälle zu Rerupturen der Achillessehne kommt [43]. In einer Untersuchung lag die Prävalenz von Sehnenrupturen der Rotatorenmanschette unter Erwachsenen bei 20,7% [44]. Die Nachbehandlung nach Naht der Rotatorenmanschettensehnen ist langwierig und das Risiko einer Reruptur ist hoch [45]. Daher wird intensiv an neuen biologischen Behandlungsmethoden geforscht, um die Sehnenheilung zu beschleunigen und die ursprünglichen mechanischen Eigenschaften der Sehnen wieder herzustellen.

## **1.2 Getherapie als mögliche Problemlösung**

Viele Wissenschaftler sind sich darüber einig, dass eine erfolgreiche Gewebereparatur die Kombination aus 3D-Füllmaterialien, Zellen und Wachstumsfaktoren erfordert. Hierbei

erscheint es notwendig, dass Wachstumsfaktoren über längere Zeit im Defektbereich wirken. Durch Gentransfer-Technologien können geringe, relativ physiologische Mengen an therapeutischen Molekülen lokal an bestimmten Stellen des Körpers über einen längeren Zeitraum freigesetzt werden [46]. Gentransfer-Vektoren ermöglichen einen effektiven Transport von genetischem Material in Zellen und dienen als Vehikel für den zu übertragenden Genabschnitt. Eine nachfolgende Expression und Translation des therapeutischen Gens wird erreicht, wenn dieses in den Zellkern gelangt ist und sich entweder in das Chromosom integriert oder episomal verbleibt. Durch einen erfolgreichen Gentransfer können Zellen dann vorübergehend zu Produktionsstätten bioaktiver Moleküle werden, welche die Regeneration anregen. Virale Vektoren und nicht-virale Gentransfervektoren werden eingesetzt, wobei aktuell Viren noch immer als die effizientesten Werkzeuge zur Übertragung von Genabschnitten gelten. Die viralen Vektoren, die im Bereich der Geweberegeneration verwendet werden enthalten keine pathogenen Genabschnitte mehr und können sich nicht replizieren. Anstelle pathogener Sequenzen können gewünschte therapeutische Genabschnitte in das virale Genom eingesetzt werden. Lentiviren (LV), Retroviren (RV), Adeno-assoziierte Viren (AAV) und Adenoviren (Ad) sind die viralen Vektoren, die üblicherweise für Genthapiestudien im Bereich der regenerativen Medizin verwendet werden. Adenoviren sind für solche Zwecke populär, da diese diverse Zellarten erfolgreich transduzieren können und eine transiente, robuste Expression der Gene auf hohem Niveau bewirken [47]. Zudem ist es technisch wenig aufwendig, aufgereinigte Adenoviren in großen Mengen zu relativ geringen Kosten zu produzieren [48]. Aktuelle klinische Studien auf den Gebieten der Knochenregeneration (clinicaltrials.gov: NCT04511689) und Arthrose-Therapie (clinicaltrials.gov: NCT04119687, NCT02790723 und NCT 04124042) verdeutlichen, dass die Genthherapie auch in der muskuloskelettalen Medizin an Bedeutung gewinnt.

### **1.3 *In vivo* Genthherapie**

Die *in vivo* Genthherapie zeichnet sich dadurch aus, dass keine Zellen entnommen, isoliert und expandiert werden müssen, sondern Gentransfervektoren direkt am Ort der Läsion *in situ* appliziert werden. Nach Injektion oder Freisetzung von einer Trägersubstanz werden Zellen aus der direkten Umgebung genetisch modifiziert und produzieren nachfolgend den therapeutischen Wirkstoff. Ihre Einfachheit macht die *in vivo* Genthherapie attraktiv, da lediglich eine Injektion ausreichen könnte, um Gewebe zu regenerieren. Jedoch gibt es

gewisse Bedenken bezüglich der Verteilung des Vektors und damit der Sicherheit der Methode [49].

### Knochenregeneration

Durch mehrere präklinische Studien konnte gezeigt werden, dass die Knochenneubildung durch die *in vivo* Gentherapie angeregt wird [50, 51]. In Ratten führte eine intraläsionale Injektion von Ad.BMP-2 am 1. postoperativen Tag zur Überbrückung segmentaler femoraler Knochendefekte einer kritischen Größe [50]. In einer weiteren Studie wurde der Effekt einer späteren Verabreichung des Vektors erforscht, wobei Ad.BMP-2 auch erst mehrere Tage nach der Defektschaffung appliziert wurde. Im Falle einer späteren Applikation des Vektors zeigte sich hierbei eine verbesserte Reparatur des Knochendefektes [52]. Ein anderes Experiment untersuchte den Einfluß der applizierten Vektormenge auf die Knochenheilung im Rattenmodell [53]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die größte von drei Vektormengen, nämlich  $2,7 \times 10^9$  pfu, alle Knochendefekte zuverlässig reparierte und damit am wirksamsten war. Nachteilig war jedoch der Anstieg der Rate an ektopter Ossifikation, der mit der Erhöhung der Vektormenge einher ging. Das Injizieren von Ad.BMP-2 in Knochendefekte im Schafmodell führte hingegen nicht zu einer nennenswerten Knochenneubildung [54]. Der Nachweis von Antikörpern ließ auf eine Reaktion des Immunsystems der Schafe auf das Adenovirus schließen. Im Hinblick auf eine erfolgreiche *in vivo* Gentherapie liegen die Hoffnungen daher auf viralen und nicht-viralen Vektoren, welche weniger immunogen wirken.

### Knorpelregeneration

Die direkte Injektion eines wenig immunogenen adeno-assoziierten Vektors (AAV), der die cDNA für TGF- $\beta$  überträgt, führte in Minipigs zu einer Stimulation von zellulären und metabolischen Reparaturprozessen im Bereich fokaler Knorpelläsionen [55]. In einer anderen Untersuchung erwies sich die *in vivo* Gentherapie mit AAV SOX9 als erfolgreiche Behandlung von osteochondralen Defekten [56]. Hier wurde eine Anregung der Knorpelreparatur mit verzögerter terminaler Differenzierung und Hypertrophie sowie eine verbesserte Wiederherstellung des subchondralen Knochens beobachtet. Die Genexpression ließ sich dabei über 16 Wochen im Defektbereich nachweisen. Die direkte Verabreichung von IGF-1 cDNA über einen AAV Vektor in osteochondrale Defekte im Kaninchenmodell führte ebenfalls zu verbesserten Reparaturprozessen im Vergleich zu Defekten, die einen mit Markergen beladenen Kontrollvektor erhielten (AAV LacZ) [57].

Auch die Verwendung von IGF-1 verzögerte die terminale Differenzierung und Hypertrophie im neugebildeten Knorpel und verbesserte die Wiederherstellung des subchondralen Knochens.

#### Sehnenregeneration

Achillessehnen von Ratten, die durch *in vivo* Gentransfer mittels adenoviralem BMP-14 Vektor behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu Kontrollgruppen bessere histologische und biomechanische Ergebnisse [58]. Zwei Wochen nach der Injektion des Vektors zeigten die Sehnen der Ad.BMP-14 Gruppe eine um 70% verbesserte Zugfestigkeit als die Kontrollen. Eine unerwünschte Knochen- oder Knorpelbildung in den Sehnen wurde nicht gesehen. Auch der adenovirale GDF-5 *in vivo* Gentransfer konnte in einem Rattenmodell vielversprechende Ergebnisse herbeiführen [59]. Die durchtrennten Achillessehnen, die mit einer Injektion von Ad.GDF-5 behandelt wurden, waren nach 8 Wochen dicker und tendenziell biomechanisch stabiler als die Exemplare der Kontrollgruppen. Die maximale Expression von GDF-5 *in vivo* wurde 4 Wochen nach der Zellimplantation gemessen. In einem weiteren Experiment wurden durchtrennte Flexor digitorum profundus Sehnen von Hühnern durch Injektion eines bFGF übertragenden AAV Vektors behandelt [60]. Auch hier konnten durch die Genmedizin signifikant verbesserte biomechanische Eigenschaften der Sehnen erzielt werden.

### **1.4 Traditionelle *ex vivo* Getherapie**

Wenn der Transfer des Genabschnittes *ex vivo* stattfindet, dann werden beim herkömmlichen Vorgehen isolierte autologe oder (selten) allogene Zellen unter kontrollierbaren Laborbedingungen transduziert oder transfiziert. Die Zellen können vorselektiert werden und eine Qualitätskontrolle kann vor der Implantation durchgeführt werden. Als Vorteil gegenüber der *in vivo* Getherapie wird die höhere Sicherheit gesehen, da sich der Vektor nicht im Körper verteilt.

#### Knochenregeneration

Für die *ex vivo* Getherapie zur Reparatur von Knochen wurden in zahlreichen Studien Stammzellen aus Muskelgewebe verwendet. Ein Vergleich zeigte, dass humane Stammzellen, die aus Muskel gewonnen wurden und BMP-2 überexprimieren genauso osteoinduktiv wirken wie humane Stammzellen, die aus Knochenmark stammen [61]. Die Implantation von Muskelzellen, die BMP-4 produzierten, führte selbst bei sehr großen femoralen Knochendefekten in Ratten zur strukturellen und funktionellen Regeneration



[62]. Aus präklinischen Experimenten ging die Erkenntnis hervor, dass BMP-2 produzierende humane Muskelstammzellen von älteren Spendern genauso effektiv Knochen regenerieren können wie solche von jungen Spendern [63]. Um dies zu untersuchen, wurden die Muskelstammzellen mit einem Lentivirus BMP-2 transduziert und in Schädelknochendefekte von Ratten implantiert.

Ossäre segmentale Defekte einer kritischen Größe wurden im Rattenmodell auch mit Knochenmarkzellen behandelt, die mit Hilfe von Ad.BMP-2 genetisch modifiziert wurden [64]. Im Vergleich zur Behandlung mit rekombinantem BMP-2 erzielte die Implantation von transduzierten Knochenmarkzellen eine bessere Reparatur der Defekte. In anderen Untersuchungen konnte ferner demonstriert werden, dass Stammzellen aus dem Knochenmark, die lentiviral BMP-2 transduziert werden, länger Wachstumsfaktor produzieren und zu einer noch robusteren Regeneration von Knochendefekten führen als durch Adenovirus modifizierte Knochenmarkstammzellen [65]. Eine Überexpression von BMP-2 durch Stammzellen aus dem Knochenmark konnte in präklinischen Experimenten auch durch die Verwendung von nicht-viralen liposomalen Vektoren erreicht werden [66]. Das Einsetzen dieser Zellen in ossäre Läsionen des Unterkiefers rief im Rattenmodell eine Reparatur hervor.

Das osteogene Potenzial humaner Stammzellen, die aus Fettgewebe gewonnen wurden, konnte ebenfalls eindrucksvoll demonstriert werden [67]. Die adenovirale BMP-2 Transduktion [68] wie auch die genetische BMP-7 Modifikation durch Lentivirus [69] generierte Stammzellen aus Fettgewebe, mit Hilfe derer die Heilung von Knochendefekten erreicht wurde. Der Vergleich von BMP transduzierten Zellen aus Knochenmark und aus Fettgewebe zeigte, dass die Zellen aus Fettgewebe eine größere Fähigkeit zur Osteoinduktion aufweisen [70].

### Knorpelregeneration

*Ex vivo* Gentherapie mit retroviral BMP-4 transduzierten Muskelstammzellen zeigte in einer Untersuchung von Knorpeldefekten in Ratten über bis zu 24 Wochen eine verbesserte Knorpelregeneration im Vergleich zu der Behandlung mit Markergen (LacZ) transduzierten Muskelstammzellen [71]. Solche Muskelstammzellen wurden durch die „preplate“-Technik identifiziert und isoliert. Diese basiert auf der selektiven Anhaftung der Zellen an Kollagen-beschichteten Zellkulturschalen. Aus einer Vergleichsstudie ging hervor, dass Muskelstammzellen (PP6) aufgrund ihrer größeren Fähigkeit *in vivo* zu überleben und chondrogen zu differenzieren besser zur Knorpelregeneration geeignet sind

als andere primäre Zellen (PP1 oder PP3) aus Muskelgewebe [72]. Auch humane mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark wurden erfolgreich transduziert und experimentell zur Knorpelreparatur eingesetzt [73]. Die Knochenmarkstammzellen wurden mit einem AAV Vektor TGF- $\beta$ 1 transduziert und in osteochondrale Defekte von Ratten implantiert. Nach 12 Wochen zeigte sich eine verbesserte Regeneration der Knorpeldefekte durch die Implantation der BMP-4 produzierenden Knochenmarkstammzellen. Der Vergleich von adenoviral BMP-2 modifizierten Zellen verschiedenen Ursprungs zur Behandlung von Knorpeldefekten in Ratten zeigte, dass Zellen aus dem Knochenmark besser als Zellen aus Fettgewebe zur Knorpelregeneration geeignet sind [74]. Allerdings regten BMP-4 modifizierte Stammzellen aus Fettgewebe in einer anderen Studie erfolgreich die Heilung von Knorpeldefekten in Kaninchen an [75]. In diesem Experiment dienten PLGA Nanopartikel als nicht-virale Genfähren, um BMP-4 cDNA in Fettstammzellen einzuschleusen. Im Vergleich zu Kontrollgruppen registrierte man bei der Gruppe, deren Knorpeldefekte mit BMP-4 transfizierten Zellen behandelt wurde, die effektivste Knorpelregeneration. Die Tatsache, dass man die für die *ex vivo* Gentherapie brauchbaren Fettzellen nicht nur aus subkutanem Fettgewebe sondern auch aus dem infrapatellaren Fettkörper gewinnen kann [76], macht Fettzellen für das Gebiet der muskuloskelettalen Chirurgie sehr interessant.

#### Sehnenregeneration

Lentiviral FGF-2 transduzierte humane Stammzellen, die aus Sehngewebe gewonnen wurden, konnten in einem Rattenmodell die Achillessehnenheilung verbessern [77]. In der Gruppe, die die FGF-2 transduzierten Zellen erhielt, zeigte sich nach 4 Wochen eine erhöhte Expression von Kollagen I und Kollagen III und nach 4 und 8 Wochen eine erhöhte Belastbarkeit der Achillessehnen im Vergleich zu Kontrollgruppen. In einer anderen Studie zeigten sich über einen Zeitraum von 12 Wochen keine Verbesserungen der Heilung von Achillessehnen in Ratten nach der Injektion von lentiviral bFGF transduzierten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark [78]. Weder histologisch noch biomechanisch konnte für die Achillessehnen, die mit den bFGF produzierenden Stammzellen behandelt wurden, eine bessere Heilung im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden. Eine weitere Arbeitsgruppe berichtete über eine erfolgreiche Sehnenreparatur durch lentiviral Scleraxis (Scx) transduzierte Stammzellen aus Sehngewebe [79]. Die Transplantation der genetisch modifizierten Zellen führte histologisch und biomechanisch zu einer beschleunigten Heilung von Patellarsehnen im

Rattenmodell. In dieser Behandlungsgruppe zeigte sich außerdem 2 Wochen postoperativ ein höherer Gehalt an Kollagen I als in den Kontrollgruppen.

### **1.5 Beschleunigte *ex vivo* Gentherapie**

Durch traditionelle *ex vivo* Gentransfer-Methoden konnte man experimentell interessante Resultate auf dem Gebiet der Geweberegeneration erzielen, wobei sich ein besseres Sicherheitsprofil als bei der *in vivo* Gentherapie zeigte. Allerdings behindern ein größerer Aufwand und höhere Kosten die klinische Umsetzung der traditionellen *ex vivo* Gentherapie. Ein erster chirurgischer Eingriff ist notwendig, um zunächst Gewebe zu entnehmen. Dieses Gewebe muss dann in ein Labor transportiert werden, das unter GMP Bedingungen Zellen aus dem Gewebe isoliert, expandiert, genetisch modifiziert und auf einem artifiziellen Trägermaterial züchtet. Erst nach mehreren Wochen entsteht so ein dreidimensionales Zellkonstrukt, welches in einer zweiten Operation implantiert werden kann. Motiviert durch den Wunsch, die Praktikabilität einer *in vivo* Gentherapie mit der erhöhten Sicherheit der traditionellen *ex vivo* Gentherapie zu kombinieren, wurden neue „beschleunigte“ *ex vivo* Gentransfer-Technologien entwickelt. Solche Neuentwicklungen sind Gegenstand der hier vorliegenden Habilitationsschrift.

#### Knochenregeneration

Um zukünftig intraoperativ, ohne die Extraktion und Vermehrung von Stammzellen, genetisch modifizierte, autologe Gewebeimplantate herstellen zu können, wurden Muskel- und Fettgewebefragmente transduziert und in präklinischen Experimenten als osteoregenerative Materialien erprobt. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass der Kontakt von Muskelgewebestücken mit einem adenoviralen BMP-2 Gentransfervektor zur Transduktion von Zellen und anschließender Produktion von BMP-2 führt [80]. In dieser Studie wurde durch das Einsetzen von BMP-2 genaktivierten Muskelgewebestücken eine Regeneration von großen segmentalen Knochendefekten in Rattenfemora erreicht. Ein Vergleich mit dem klinischen Goldstandard, der autologen Knochentransplantation, zeigte im Rattenmodell die gleiche Effektivität der beschleunigten Gentherapie [81]. Auch der andere klinisch zugelassene Knochenwachstumsfaktor, BMP-7, wurde in Kombination mit Muskelgewebeimplantaten getestet [82]. Die adenoviral BMP-7 transduzierten Muskelimplantate regten die Regeneration der femoralen Knochendefekte in Ratten ebenfalls deutlich an, jedoch konnte mit diesen nicht dieselbe zuverlässige und robuste Knochenheilung erzielt werden, wie mit BMP-2 transduzierten Muskelfragmenten. Da

subkutanes Fettgewebe ebenfalls als interessantes regeneratives Material, das viele multipotente Stammzellen enthält, gilt, wurden auch Fettgewebefragmente als osteoregenerative Implantate eingesetzt und nach Transduktion mit Ad.BMP-2 [83], sowie nachfolgend mit Ad.BMP-7 [84] experimentell getestet. Zur Evaluation der Knochenreparatur dienten histologische, radiologische und biomechanische Untersuchungsmethoden. Auch die Verwendung von aktivierten Fettgewebeimplantaten im Rattenmodell ergab, dass die Transduktion durch Ad.BMP-2 – im Vergleich zu Ad.BMP-7 - zu einer zuverlässigeren und stabileren Reparatur der Knochendefekte führt.

#### Knorpelregeneration

Die beschleunigte *ex vivo* Gentherapie wurde auch auf dem Gebiet der Knorpelregeneration experimentell erprobt [85]. Muskelgewebefragmente wurden mit Hilfe eines adenoviralen BMP-2 Vektors genetisch modifiziert und in osteochondrale Defekte in Kaninchenknien implantiert. Die Behandlung mit BMP-2 genaktivierten Muskelimplantaten führte 13 Wochen postoperativ biomechanisch zu einer erhöhten Steifigkeit des Regenerats im Vergleich zur Kontrollgruppe mit unbehandeltem Muskelgewebe und histologisch zu einer besseren Regeneration des subchondralen Knochens im Vergleich zu unbehandelten Defekten.

#### Sehnenregeneration

Es wurde untersucht, ob durch die beschleunigte *ex vivo* Gentherapie die Regeneration von Sehnen verbessert werden kann [86, 87]. Im Rattenmodell wurden hierzu Achillessehnen durchtrennt und mit genetisch modifiziertem Muskelgewebe behandelt. Die Regenerate wurden histologisch und biomechanisch zu verschiedenen Zeitpunkten bis maximal 8 Wochen postoperativ untersucht. Die Implantation eines adenoviral TGF- $\beta$ 1 transduzierten Muskelgewebestückes direkt neben den Defektbereich führte im Vergleich zu Kontrollgruppen zu einer beschleunigten Heilung mit erhöhtem Gehalt an Kollagen I, niedrigerem Anteil an Kollagen III, besserem histologischen Score-Ergebnis und besseren mechanischen Eigenschaften [87]. Auch die Implantation von adenoviral BMP-12 transduziertem Muskelgewebe an den Defektbereich von Achillessehnen von Ratten erzielte eine erhöhte Belastbarkeit und ein schnelleres Remodeling mit verbesserter Anordnung der Kollagenfasern als Kontrollgruppen [86].

## 2. Material und Methoden

### In vivo – Studien zur Knochenregeneration: (Publikationen 1 bis 4)

Die *in vivo* Studien zur Knochenregeneration wurden an männlichen Ratten durchgeführt. Für alle 4 Experimente wurde ein 5 mm großer segmentaler Knochendefekt im rechten Femur der Tiere gefräßt. Die Stabilisierung der Defekte war durch einen externen (Publikation 1) oder internen Fixateur (Publikationen 2 bis 4) gewährleistet. Die segmentalen femoralen Defekte wurden dann unterschiedlich behandelt. Für Publikation 1 erfolgte eine direkte perkutane Injektion von adenoviralen BMP-2 Gentransfervektoren in die Mitte des Defektes. Für die Publikation 2 wurden adenoviral BMP-2 transduzierte Muskelgewebestücke und für die Publikation 3 adenoviral BMP-7 transduzierte Muskelstücke „pressfit“ implantiert. Für Publikation 4 wurden BMP-7 genaktivierte Fettgewebefragmente in den Knochendefekt eingesetzt. Muskelgewebe und subkutanen Fettgewebe wurden genetisch identischen Spenderratten entnommen. Mit Hilfe einer Hautbiopsiestanze wurden Fragmente einer standardisierten Größe (4 mm Durchmesser, ca. 1 mm Dicke) geschaffen. Die Gewebestücke wurden für 1 Stunde im Brutschrank mit dem adenoviralen Gentransfervektor in Kontakt gebracht, sodass es zur Transduktion der oberflächlich liegenden Zellen kam. Danach wurde freier Vektor von den Gewebestücken abgewaschen und es folgte die Implantation von jeweils 5 Muskel- oder Fettgewebestücke in die 5 mm großen Knochendefekte. In Publikation 1 wurde die perkutane Injektion 3 verschiedener Ad.BMP-2 Mengen ( $2,7 \times 10^7$ ,  $2,7 \times 10^8$  und  $2,7 \times 10^9$  pfu) verglichen. Gegenstand des Experiments für Publikation 2 war ein Vergleich zwischen BMP-2 genaktivierten Muskelfragmenten und autologem Knochen, der von den Beckenkämmen und den Epiphysen der Röhrenknochen entnommen wurde. In den Publikationen 3 und 4 wurden die experimentellen Behandlungsgruppen, die genetisch modifizierte Gewebe erhielten, mit Tieren verglichen, deren Defekte mit unmodifizierten Gewebeimplantaten behandelt wurden. Die Heilung der Knochendefekte wurde 8 Wochen (Publikation 1 und 2) oder 6 Wochen (Publikationen 4 und 5) postoperativ mit Hilfe von Röntgenaufnahmen (Publikationen 1 bis 4),  $\mu$ CT (Publikationen 1 bis 4), DEXA (Publikation 1), Histologie (Publikationen 1, 3 und 4) und biomechanischen Tests (Publikation 2) evaluiert.

*In vivo* – Studie zur Knorpelregeneration: (Publikation 5)

28 weiblichen Kaninchen (Weiße Neuseeländer) wurde Muskelgewebe vom rechten oberen Hinterlauf entnommen. Das Muskelgewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert und mit einer Hautbiopsiestanze in Fragmente einer standardisierten Größe (4 mm Durchmesser und ca. 1 mm Dicke) zerteilt. Die Muskelgewebestücke wurden dann entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit unbehandelt belassen oder mit einem adenoviralen BMP-2 Vektor transduziert.  $1 \times 10^8$  pfu des Gentransfervektors wurden hierfür in einem Volumen von 10  $\mu$ l auf ein Muskelstück gegeben und in einem Brutschrank für 1 Stunde in Kontakt belassen. 2 Tage nach der Entnahme des Muskelgewebes wurden zwei osteochondrale Defekte mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Tiefe von 5 mm in der medialen Femurkondyle des rechten Kaninchenknie mit Hilfe eines Bohrers geschaffen. Die Tiere wurden in 3 Gruppen aufgeteilt: Die Defekte der Gruppe 1 wurden mit 5 BMP-2 genaktivierten Muskelstücken behandelt, in die Defekte der Gruppe 2 wurden 5 unmodifizierte Muskelfragmente implantiert und die Defekte der Gruppe 3 blieben unbehandelt. Nach 13 Wochen wurden die Regenerate histologisch und immunhistochemisch mit Hilfe eines erweiterten O'Driscoll Scores, mittels Histomorphometrie und durch biomechanische Indentation beurteilt.

*In vivo* – Studie zur Sehnenregeneration: (Publikation 6)

133 männlichen Ratten wurden für die Studie zur Sehnenregeneration verwendet. Die Tiere wurden auf 3 Gruppen mit jeweils 40 Ratten aufgeteilt. Muskelgewebe wurde Spenderratten entnommen, zerkleinert und mit einer 4 mm Hautbiopsiestanze in kleinere Fragmente zerteilt. Entsprechend der Gruppenzugehörigkeit wurden die Muskelstücke entweder mit Ad.TGF- $\beta$ 1 transduziert oder unbehandelt belassen. Für die Transduktion wurden  $5 \times 10^{10}$  virale Partikel Ad.TGF- $\beta$ 1 auf ein Muskelstück gegeben und in einem Brutschrank für 30 min. inkubiert. In einem chirurgischen Eingriff erfolgte die Transsektion der Achillessehne 5 mm proximal der Ansatzstelle am Kalkaneus. Die Achillessehnen wurden dann mit einer Kessler-Kirchmeyer Naht wieder zusammengenäht. Gruppe 1 erhielt keine Behandlung der verletzten Achillessehnen, die Sehnen der Gruppe 2 wurden mit einem unmodifizierten Muskelstück und die der Gruppe 3 mit einem TGF- $\beta$ 1 genaktivierten Muskelimplantat versorgt. Hierbei wurden die Muskelfragmente auf der Achillessehnenläsion festgenäht. Nach 7, 14, 28 und 56 Tagen

wurden die Achillessehnen histologisch, immunhistochemisch und biomechanisch untersucht.

*In vitro* – Studien zur Knochenregeneration: (Publikationen 7 und 8)

In den *in vitro* Experimenten wurden Muskelgewebestücke (Publikation 7) und Fettgewebefragmente (Publikation 8) in Kultur gehalten und der Einfluss von homodimerem BMP-2 im Vergleich zu heterodimerem BMP-2/6 und BMP-2/7 studiert. Das Gewebe wurde Spenderratten entnommen, mit einem Skalpell zerkleinert und mit Hilfe einer Hautbiopsiestanze in Gewebestücke einer standardisierten Größe (4 mm Durchmesser und 1 mm Dicke) zerteilt. Die Gewebestücke wurden dann für bis zu 20 Tage in 24-well-plates kultiviert. Hierbei wurden die Gewebestücke auf 8 verschiedene Gruppen / Kulturbedingungen aufgeteilt: Gruppe 1 = Normales Nährmedium; Gruppe 2 = Osteogenes Medium; Gruppen 3 – 8 = Osteogenes Medium + BMP-2 oder BMP-2/6 oder BMP-2/7 in einer niedrigen (50 ng/ml) oder hohen (200 ng/ml) Konzentration. Die Osteoinduktion in den Gewebestücken wurde durch PCR, Histologie, Immunhistochemie und Histomorphometrie nach 10 und 20 Tagen in Kultur untersucht. Mittels qRT-PCR wurde die Genexpression der Knochenmarker ALP, Runx2, Col1a1, OPN, OCN und BSP nachgewiesen. Durch eine Alzarin Rot Färbung wurde anhand der histologischen Schnitte Kalzium in den Geweben detektiert. Immunhistochemisch wurden die knochenspezifischen Proteine OCN, OPN und Scl nachgewiesen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Publikation 1

**Betz V.M., Betz O.B., Glatt V., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A., Bouxsein M.L., Vrahas M.S., and Evans C.H. (2007). *Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose.* Hum Gene Ther, 18(10): p. 907-15. Impact Factor: 4,20**

In dieser Studie wurde die Knochenregeneration in Ratten durch die *in vivo* Gentherapie untersucht. Die Effekte von 3 verschiedenen Vektordosen wurden verglichen.

27 ausgewachsene Sprague-Dawley Ratten erhielten 24 Stunden nach der Defektschaffung eine einmalige, perkutane Injektion von 3 verschiedenen Mengen an Ad.BMP-2 in die Defektmitte:  $2,7 \times 10^7$  pfu (niedrige Dosis),  $2,7 \times 10^8$  pfu (mittlere Dosis) und  $2,7 \times 10^9$  pfu (hohe Dosis). 8 Wochen später wurden die Femora durch Röntgen, DEXA,  $\mu$ CT und Histologie untersucht. Röntgen- und  $\mu$ CT-Aufnahmen zeigten, dass die Injektion der hohen Dosis zur knöchernen Überbrückung von 100% der Defekte führte. Nur 11% der Defekte, die die mittlere Dosis erhielten und 25% der Defekte, die die niedrige Dosis erhielten, waren nach 8 Wochen überbrückt. Sowohl der Knochenmineralgehalt ( $0,129 \pm 0,029$  g) als auch das Knochenvolumen ( $34,89 \pm 8,85$  mm<sup>3</sup>) war in der Gruppe, die die hohe Dosis injiziert bekam, signifikant höher als in den 2 anderen Gruppen (mittlere Dosis:  $0,068 \pm 0,022$  g und  $9,38 \pm 6,66$  mm<sup>3</sup>; niedrige Dosis:  $0,091 \pm 0,024$  g und  $15,57 \pm 8,77$  mm<sup>3</sup>). Bezüglich des Knochenmineralgehaltes und des Knochenvolumens zeigte sich zwischen Femora, die die hohe Dosis erhielten und intakten, kontralateralen Femora ( $0,114 \pm 0,007$  g und  $26,45 \pm 1,69$  mm<sup>3</sup>) kein signifikanter Unterschied. Durch die histologische Untersuchung fiel auf, dass sich durch die hohe Dosis im Defektbereich trabekulärer Knochen mit kleinen Knorpelinseln gebildet hatte. Die Tiere, die mit der mittleren und niedrigen Dosis behandelt wurden, zeigten hingegen große Areale an Bindegewebe und Knorpel in den Defekten. In der Gruppe, die mit der hohen Dosis behandelt wurde, bildete sich allerdings vermehrt ektooper Knochen.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass die einmalige Injektion einer hohen Dosis von  $2,7 \times 10^9$  pfu Ad.BMP-2 zu einer zuverlässigen Überbrückung knöcherner Defekte im Rattenmodell führen kann. Jedoch zeigte sich auch, dass die Erhöhung der Vektormenge auch zu einer Zunahme von ektooper Knochenbildung führt.



### 3.2. Publikation 2

Betz O.B., **Betz V.M.**, Schroeder C., Penzkofer R., Gottlinger M., Mayer-Wagner S., Augat P., Jansson V., and Müller P.E. (2013). *Repair of large segmental bone defects: BMP-2 gene activated muscle grafts vs. autologous bone grafting*. BMC Biotechnol, 13: p. 65. Impact Factor: 2,59

Da sich in vorherigen Studien zeigte, dass die *in vivo* Gentherapie zwar eine zuverlässige Regeneration großer segmentaler Knochendefekte hervorrufen kann, sich jedoch mit steigender Vektormenge auch das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen - wie ektope Knochenbildung - erhöht, wurde eine beschleunigte *ex vivo* Gentherapie entwickelt.

In diesem Experiment wurde die Verwendung von adenoviral BMP-2 genaktivierten Muskelgewebeimplantaten mit autologer Knochen transplantation zur Heilung von segmentalen Knochendefekten verglichen. Von 14 genetisch identischen Fischer 344 Ratten dienten 2 als Spendertiere für Muskelgewebe und Knochen. Die 5 mm großen femoralen Defekte von 6 Tieren wurden mit BMP-2 transduziertem Muskelgewebe und die von weiteren 6 Tieren mit Knochen aufgefüllt. Nach 8 Wochen wurde die Heilung der Femora durch Röntgenbilder,  $\mu$ CT-Untersuchungen und biomechanische Torsionstest verglichen. 8 Wochen postoperativ waren auf den Röntgenbildern sowohl 100% der mit BMP-2 genaktivierten Muskelimplantaten behandelten Knochendefekte, als auch 100% der mit Knochen transplantierten behandelten Defekte überbrückt. Die  $\mu$ CT-Aufnahmen ließen hingegen bei einigen Femora aus der mit Knochen behandelten Gruppe eine inkomplette Heilung entdecken. Die BMP-2 Muskel Gruppe zeigte hingegen ein weiter fortgeschrittenes Remodeling. Im Hinblick auf das Knochenvolumen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der BMP-2 Muskel Gruppe ( $33,44 \pm 12,26 \text{ mm}^3$ ) und der Knochen Gruppe ( $39,66 \pm 4,63 \text{ mm}^3$ ). Auch die biomechanischen Eigenschaften der beiden Gruppen waren 8 Wochen postoperativ nicht signifikant unterschiedlich. Eine ektope Knochenbildung wurde in beiden Gruppen nicht gesehen.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die beschleunigte *ex vivo* Gentherapie unter Verwendung von BMP-2 genaktivierten Muskelimplantaten zu einer zuverlässigen und robusten Knochenreparatur führt. Hinsichtlich der radiologischen und biomechanischen Ergebnisse waren die genaktivierten Muskelgewebefragmente genau so effektiv wie die autologe Knochen transplantation. Ein aufwendiges Isolieren und Vermehren von Zellen war nicht erforderlich.

### 3.3 Publikation 3

**Betz V.M.**, Betz O.B., Rosin T., Keller A., Thirion C., Salomon M., Manthey S., Augat P., Jansson V., Müller P.E., Rammelt S., and Zwipp H. (2015). *The effect of BMP-7 gene activated muscle tissue implants on the repair of large segmental bone defects*. *Injury*, 46(12): p. 2351-8. Impact Factor: 1,91

In vorherigen Studien zeigte sich, dass die beschleunigte *ex vivo* Gentherapie mit BMP-2 transduzierten Muskelimplantaten effektiv Knochen regeneriert und dabei die Sicherheit der traditionellen *ex vivo* Gentherapie mit der Praktikabilität der *in vivo* Gentherapie vereint. Daher sollte nun in dieser Studie erforscht werden, ob die genetische Modifikation von Muskelgewebe mit BMP-7, dem anderen klinisch zugelassenen rhBMP, ebenfalls effektiv die Osteogenese anregt.

2 von 25 genetisch identischen Fischer 344 Ratten dienten als Spendertiere für Muskelgewebe, welches entweder unbehandelt blieb oder adenoviral BMP-7 transduziert wurde. Bei 23 Ratten wurde der etablierte, 5 mm große, segmentale Knochendefekt im rechten Femur geschaffen. Eine Gruppe von 12 Ratten erhielt als Behandlung der Defekte BMP-7 transduzierte Muskelfragmente, der anderen Gruppe von 11 Tieren wurde unbehandeltes Muskelgewebe implantiert. Nach 6 Wochen wurde die Heilung der Femora durch Röntgen,  $\mu$ CT und Histologie untersucht. 3 Tiere der BMP-7 Gruppe konnten aufgrund von Wundinfektionen nicht zum 6 Wochen Endpunkt evaluiert werden. Die Röntgen- und  $\mu$ CT-Bilder zeigten, dass 41,7% der Defekte, die mit BMP-7 genaktiviertem Muskel behandelt wurden, knöchern überbrückt waren. Im Gegensatz dazu war kein Defekt, der unbehandeltes Muskelgewebe erhalten hatte, knöchern überbrückt. Das Knochenvolumen der BMP-7 Gruppe war mit  $13,63 \pm 10,20 \text{ mm}^3$  signifikant höher als das der Gruppe, die unbehandeltes Muskelgewebe erhielt ( $2,94 \pm 2,07 \text{ mm}^3$ ) und nicht signifikant unterschiedlich zum Knochenvolumen von intakten kontralateralen Femora ( $17,03 \pm 0,61 \text{ mm}^3$ ). Auch die histologischen Schnitte bestätigten die knöchernen Überbrückung von 41,7% der Defekte aus der BMP-7 Gruppe. In 2 Defekten dieser Gruppe zeigte sich eine signifikante Menge an neugebildetem Knochen ohne knöchernen Überbrückung und in 2 weiteren Defekten konnte nur wenig Knochen im Defektbereich nachgewiesen werden. In den Defekten, die unbehandeltes Muskelgewebe erhielten, zeigte sich nach 6 Wochen vorwiegend Bindegewebe und Fettgewebe.

Die Ergebnisse der Studie demonstrieren, dass BMP-7 genaktivierte Muskelimplantate das Potenzial haben, große segmentale Knochendefekte zu reparieren. Im Vergleich zu vorherigen Experimenten, unter Verwendung des gleichen etablierten Rattenmodells, waren BMP-7 transduzierte Muskelimplantate jedoch weniger effektiv als BMP-2 genaktivierte Muskelgewebefragmente.

### 3.4 Publikation 4

**Betz V.M.**, Betz O.B., Rosin T., Keller A., Thirion C., Salomon M., Manthey S., Augat P., Jansson V., Müller P.E., Rammelt S., and Zwipp H. (2016). *An expedited approach for sustained delivery of BMP-7 to bone defects using gene activated fragments of subcutaneous fat*. J Gene Med, 18(8):199-207. Impact Factor: 3,25

Neben rhBMP-2 ist auch rhBMP-7 klinisch zugelassen. Vorherige vorklinische Untersuchungen demonstrieren, dass BMP-2 transduziertes Fettgewebe effektiv Knochen regenerieren kann. Wie im Falle des Muskelgewebes sollte nun anhand des etablierten Rattenmodells untersucht werden, ob auch adenoviral BMP-7 transduzierte Fettgewebefragmente zur Reparatur von Knochendefekten geeignet sind.

Insgesamt wurden für diesen Versuch 25 genetisch identische Fischer 344 Ratten verwendet, wobei 2 davon als Spendertiere für subkutanes Fettgewebe dienten. Das Fettgewebe wurde in kleine Fragmente einer standardisierten Größe zerteilt und blieb entweder unbehandelt oder wurde mit einem adenoviralen BMP-7 Vektor genetisch modifiziert. 23 Ratten erhielten einen 5 mm großen, segmentale Knochendefekt im rechten Femur, wobei 12 Ratten BMP-7 transduzierte Fettfragmente und weiteren 11 Tieren unbehandeltes Fettgewebe implantiert wurde. 6 Wochen postoperativ dienten Röntgenaufnahmen,  $\mu$ CT-Messungen und histologische Schnitte zur Evaluation der Knochenregeneration. 2 Tiere der BMP-7 Gruppe und 1 Tier der Fettgruppe konnten wegen Wundinfektionen nicht evaluiert werden. 6 von 10 Ratten, die mit BMP-7 transduziertem Fettgewebe behandelt wurden, zeigten eine relevante Knochenbildung im Defektbereich, wobei 2 Defekte knöchern überbrückt waren. 4 von diesen 10 Tieren zeigten lediglich geringe Mengen an mineralisiertem Gewebe im Defekt. Alle Defekte, in die unbehandeltes Fettgewebe implantiert wurde, zeigten radiologisch keine knöchernen Überbrückung und keine relevante Knochenneubildung im Defektbereich. Die Implantation von BMP-7 genaktiviertem Fettgewebe führte mit  $11,18 \pm 9,48 \text{ mm}^3$  zu

einem signifikant höheren Knochenvolumen als die Implantation von unbehandeltem Fettgewebe ( $3,19 \pm 1,68 \text{ mm}^3$ ). Histologisch zeigte sich in Defekten, die unbehandeltes Fett erhielten, nach 6 Wochen nicht-mineralisiertes Binde- und Fettgewebe. In 6 von 10 Femora, die die BMP-7 transduzierten Fettgewebestücke erhielten, zeigte sich histologisch hingegen eine massive Knochenneubildung, wobei 2 Defekte knöchern überbrückt waren. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass adenoviral BMP-7 genaktivierte Fettgewebefragmente dreidimensionale osteo-regenerative Implantate darstellen, die große segmentale Knochendefekte im Rattenmodell zur Reparatur anregen können. In vorherigen Experimenten erwiesen sich BMP-2 transduzierte Fettgewebeimplantate jedoch als effektiver.

### 3.5 Publikation 5

**Betz V.M.**, Keller A., Foehr P., Thirion C., Salomon M., Rammelt S., Zwipp H., Burgkart R., Jansson V., Müller P.E., and Betz O.B. (2017). *BMP-2 gene activated muscle tissue fragments for osteochondral defect regeneration in the rabbit knee*. J Gene Med, 19: p. (9-10). Impact Factor: 1,65

Da BMP-2 genaktivierte Muskelgewebestücke in vorherigen Experimenten erfolgreich Knochen regenerierten und BMP-2 auch eine chondrogene Wirkung hat, sollte auch der Effekt dieser beschleunigte *ex vivo* Gentherapie auf die Knorpelregeneration untersucht werden.

28 weiblichen Kaninchen wurde Muskelgewebe vom rechten oberen Hinterlauf entnommen. Die geschaffenen standardisierten Muskelgewebestücke wurden entweder unbehandelt belassen oder mit Ad.BMP-2 transduziert. Das Muskelgewebe wurde in zwei osteochondrale Defekte in der medialen Femurkondyle des rechten Kaninchenknies implantiert. Die Regenerate der 3 Gruppen (BMP-2 genaktiviertes Muskelgewebe, unmodifizierte Muskelfragmente, Leerdefekte) wurden 13 Wochen postoperativ histologisch und immunhistochemisch mit Hilfe eines erweiterten O'Driscoll Scores, mittels Histomorphometrie und durch biomechanische Indentation evaluiert. 13 Wochen postoperativ waren die Mittelwerte der Steifigkeit für die Gruppe, die BMP-2 transduzierten Muskel erhielt, mit  $28,5 \pm 4,8 \text{ N/mm}$  höher als die der Kontrollgruppen, die unmodifizierten Muskel erhielten ( $22,3 \pm 7,2 \text{ N/mm}$ ) oder unbehandelt blieben ( $27,0 \pm 8,6 \text{ N/mm}$ ). Eine statistisch signifikant höhere Steifigkeit der BMP-2 Gruppe zeigte sich im

Vergleich zur Gruppe, der unbehandeltes Muskelgewebe implantiert wurde. Die BMP-2 Gruppe erreichte 77% der Steifigkeit von intakten nativen Präparaten ( $37,2 \pm 4,7$  N/mm). Intakte native Exemplare zeigten eine signifikant höhere Steifigkeit als alle anderen Gruppen. Histologisch zeigten sich heterogene Resultate in allen 3 Gruppen. Insgesamt waren die Defektfüllung, die Anfärbung der Matrix mit Safranin-O, die Zellmorphologie und die Integration des neugebildeten Knorpels leicht verbessert in der BMP-2 Gruppe, ohne statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollgruppen im Hinblick auf die histologischen Scores. In der Histomorphometrie wies die BMP-2 Gruppe die höchsten Werte bezüglich der Fläche des regenerierten subchondralen Knochens auf, wobei sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu unbehandelten Defekten zeigte. Die Ergebnisse der Studie demonstrieren, dass adenoviral BMP-2 transduziertes Muskelgewebe auch Potenzial zur Regeneration von osteochondralen Defekten besitzt.

### 3.6 Publikation 6

Majewski M., Porter R.M., Betz O.B., **Betz V.M.**, Clahsen H., Fluckiger R., and Evans C.H. (2012). *Improvement of tendon repair using muscle grafts transduced with TGF-beta1 cDNA*. Eur Cell Mater, 23: p. 94-101; discussion 101-2. Impact Factor: 4,56

Da sich zeigte, dass genaktivierte Muskelgewebeimplantate dazu geeignet sind, bioaktive Moleküle an den Ort einer Gewebeläsion zu bringen und dort über längere Zeit zu produzieren, sollte diese beschleunigte *ex vivo* Gentherapie auch im Bereich der Sehnenregeneration erprobt werden.

Für diese Studie wurden 133 männlichen Ratten verwendet und auf 3 Gruppen aufgeteilt. Muskelgewebefragmente wurden entweder mit Ad.TGF- $\beta$ 1 transduziert oder unbehandelt belassen. Es erfolgte eine Transsektion der Achillessehnen mit anschließender Naht und entsprechend der Gruppenzugehörigkeit entweder keine Behandlung oder die Implantation eines unmodifizierten Muskelstücks oder eines TGF- $\beta$ 1 genaktivierten Muskelimplantats. Nach 7, 14, 28 und 56 Tagen folgte die histologische und biomechanische Untersuchung der Achillessehnen. Die Implantation eines adenoviral TGF- $\beta$ 1 transduzierten Muskelgewebestückes neben den Defektbereich führte im Vergleich zu Kontrollgruppen zu einer beschleunigten Heilung mit einer statistisch signifikant höheren maximalen Versagenslast nach 7 Tagen und einer statistisch signifikant höheren Steifigkeit nach 7 und 14 Tagen. Die Sehnen der TGF- $\beta$ 1 Gruppe

waren nach 7 und 14 Tagen zunächst signifikant dicker und nach 56 Tagen signifikant dünner als die Sehnen der Kontrollgruppen. Sehnen, die mit TGF- $\beta$ 1 transduziertem Muskelgewebe behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen zu allen Zeitpunkten ein besseres Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III. Die TGF- $\beta$ 1 Gruppe lag bezüglich des histologischen Scores, ab Tag 14, stets niedriger und somit näher an einem normalen histologischen Erscheinungsbild als die Kontrollgruppen.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die *ex vivo* Gentherapie unter Verwendung von TGF- $\beta$ 1 genaktivierten Muskelimplantaten zu einer beschleunigten Sehnenheilung mit verbesserten histologischen und biomechanischen Resultaten führen kann. Eine Extraktion und Expansion von Stammzellen war nicht notwendig.

### 3.7 Publikation 7

**Betz V.M.**, Ren B., Messmer C., Jansson V., Betz O.B., and Müller P.E. (2018). *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, 20(9): p. e3042. Impact Factor: 1,65

Vorherige Experimente zeigten das große Potenzial von genaktivierten Muskelimplantaten für die Regeneration von Knochen. Nun sollte erforscht werden, ob die Osteoinduktion in Muskelgewebefragmenten noch stärker angeregt werden kann. Hierbei interessierte, ob die Heterodimere rhBMP-2/6 und rhBMP-2/7 stärker osteoinduktiv wirken als homodimeres rhBMP-2. In einem *in vitro* Kultursystem wurden Muskelgewebefragmente kultiviert und rhBMP-2 oder rhBMP-2/6 oder rhBMP-2/7 in einer niedrigen (50 ng/ml) oder hohen (200 ng/ml) Konzentration in das osteogene Nährmedium hinzugegeben. Die Osteoinduktion in den Gewebestücken wurde durch qRT-PCR, Histologie (Alzarin Rot Färbung), Immunhistochemie und Histomorphometrie nach 10 und 20 Tagen in Kultur untersucht. BMP-2 hatte den größten Effekt auf die Genexpression der knochenspezifischen Marker zu beiden Zeitpunkten. Die hohe Konzentration von 200 ng/ml rhBMP-2 erzielte signifikant höhere Genexpressionswerte an ALP, Runx2, Col1a1, OPN, OCN und BSP als alle anderen Gruppen. Auch unter Einfluß der niedrigen Konzentration von 50 ng/ml rhBMP-2 ergaben sich durchweg höhere Genexpressionswerte als durch beide Heterodimere in der niedrigen und hohen Konzentration. Beispielsweise zeigte sich am Tag 10 in der Gruppe 50 ng/ml rhBMP-2 ein 15-fach höherer Anstieg der ALP Expression als bei 50 ng/ml

rhBMP-2/6 oder 50 ng/ml rhBMP-2/7. Desweiteren war die Genexpression von OCN am Tag 20 in der Gruppe 50 ng/ml rhBMP-2 15-fach höher als in der Gruppe 50 ng/ml rhBMP-2/6 und 14-fach höher als in der Gruppe rhBMP-2/7. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen 50 ng/ml rhBMP-2/6 und 50 ng/ml rhBMP-2/7 in Bezug auf die Expression der knochenspezifischen Gene. Jedoch hatte die hohe Konzentration von 200 ng/ml rhBMP-2/7 signifikant stärkere Effekte auf die Genexpression als 200 ng/ml rhBMP-2/6. Die Alzarin Rot Färbung der histologischen Schnitte wies am meisten Kalzium in den Gruppen rhBMP-2 50 ng/ml und rhBMP-2 200 ng/ml jeweils an Tag 20 nach. Hier zeigte sich eine kräftige Anfärbung über nahezu die gesamte Fläche der Proben. Auch der immunhistochemische Nachweis von OCN, OPN und Scl demonstrierte die Überlegenheit von rhBMP-2, die Bildung der knochenspezifischen Proteine zu induzieren. Bereits am Tag 10 waren OCN, OPN und Scl sowohl bei 50 ng/ml rhBMP-2 als auch bei 200 ng/ml rhBMP-2 großflächig nachweisbar, wohingegen die Heterodimere deutlich weniger dieser knochenspezifischen Proteine induzierten. Dies bestätigte sich durch die histomorphometrischen Untersuchungen, die bereits für die niedrige Konzentration von rhBMP-2 signifikant höhere Werte für die Kalziumeinlagerung und die Expression von OCN, OPN und Scl ergaben als für beide Konzentrationen von rhBMP-2/6 und rhBMP-2/7. An Tag 20 zeigten sich für die Gruppe 200 ng/ml BMP-2 Kalziumeinlagerungen auf  $25,91 \pm 1,98\%$  der Gesamtfläche. Dies war ein signifikant höherer Wert im Vergleich zu  $14,18 \pm 1,11\%$  für die Gruppe 200 ng/ml rhBMP-2/7 und  $11,54 \pm 1,04\%$  für die Gruppe 200 ng/ml rhBMP-2/6.

Die Ergebnisse der Studie demonstrieren, dass das homodimere rhBMP-2 deutlich stärker osteogen auf Muskelgewebe von Ratten wirkt als heterodimeres rhBMP-2/6 und rhBMP-2/7. Die Osteoinduktion erfolgte durch rhBMP-2 schneller und bei einer niedrigeren Konzentration.

### **3.8 Publikation 8**

**Betz V.M.**, Ren B., Betz O.B., Jansson V., and Müller P.E. (2021). *Osteoinduction within adipose tissue fragments by heterodimeric Bone Morphogenetic Proteins-2/6 and -2/7 versus homodimeric Bone Morphogenetic Protein-2: therapeutic implications for bone regeneration.* J Gene Med, 2021: p. e3311. Impact Factor: 3,25

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass BMP-2 oder BMP-7 transduzierte Fettgewebeimplantate *in vivo* die Osteogenese anregen und Knochendefekte reparieren können. Um diese beschleunigte *ex vivo* Gentherapie zu optimieren, sollte nun *in vitro* untersucht werden, ob heterodimeres rhBMP-2/6 und rhBMP-2/7 noch stärker osteoinduktiv auf Fettgewebe wirken als das homodimere rhBMP-2. Analog zum Versuchsdesign von Publikation 7 wurden Fettgewebefragmente unter Zugabe von rhBMP-2 oder rhBMP-2/6 oder rhBMP-2/7 in einer niedrigen (50 ng/ml) oder hohen (200 ng/ml) Konzentration *in vitro* kultiviert. Die Evaluation erfolgte auch hier durch qRT-PCR, histologisch (Alzarin Rot Färbung), immunhistochemisch und histomorphometrisch nach 10 und 20 Tagen. Die höchsten Genexpressionswerte aller untersuchter knochenspezifischer Marker ALP, Runx2, Col1a1, OPN, OCN und BSP waren zu beiden Zeitpunkten unter dem Einfluß von 200 ng/ml rhBMP-2 zu sehen. Der Unterschied war gegenüber beiden Konzentrationen von rhBMP-2/6 und rhBMP-2/7 sowie auch gegenüber der niedrigen Konzentration von 50 ng/ml rhBMP-2 signifikant. Auch die niedrige Konzentration von 50 ng/ml rhBMP-2 führte zu signifikant höheren Genexpressionswerten als beide Konzentrationen von rhBMP-2/6 und die niedrige Konzentration von rhBMP-2/7, außer für ALP am Tag 20 und Col1a1 am Tag 20. 200 ng/ml rhBMP-2/7 erreichte bezüglich der Anregung der Genexpression ähnliche Effekte wie 50 ng/ml rhBMP-2 und war damit die potenteste Gruppe der Heterodimere. Die OCN Expression wurde am stärksten durch die hohe Konzentration an rhBMP-2 am Tag 20 stimuliert und war hier ungefähr 2-fach höher als in der Gruppe 200 ng/ml rhBMP-2/7. Die Anfärbung von Kalzium in den histologischen Präparaten durch die Alzarin Rot Färbung zeigte keinen Nachweis von Kalzium in Fettgewebe, das in normalem Medium kultiviert wurde und nur wenig Kalzium in Proben, die in osteogenem Medium ohne BMPs in Kultur gehalten worden waren. Die meiste Einlagerung von Kalzium zeigte sich in der Gruppe rhBMP-2 200 ng/ml am Tag 20. Dasselbe Bild ergab der immunhistochemische Nachweis von OCN, OPN und Scl. Auch bei der Induktion der Bildung von knochenspezifischen Proteinen war das homodimere rhBMP-2 den Heterodimeren überlegen. In der Gruppe 50 ng/ml rhBMP-2 zeigte sich bereits am Tag 10 ein deutlicher Nachweis an Kalzium, OCN, OPN und Scl. Auch durch die quantitative histomorphometrische Analyse wurde deutlich, dass 200 ng/ml rhBMP-2 die größten positiv gefärbten Areale und damit die signifikant höchsten Werte für die Kalziumeinlagerung und die Expression von OCN, OPN und Scl aufwies. Der Wert für die Kalziumeinlagerungen an Tag 20 lag für die Gruppe 200 ng/ml rhBMP-2



bei  $23,8 \pm 1,5\%$  der Gesamtfläche und war damit signifikant höher als der Wert der Gruppe 200 ng/ml rhBMP-2/7 mit  $15,1 \pm 1,2\%$  und der Wert der Gruppe 200 ng/ml rhBMP-2/6 mit  $12,2 \pm 1,0\%$ . Die Gruppe 200 ng/ml rhBMP-2 erreichte an Tag 20 einen Wert für die OCN Expression von  $20,4 \pm 0,6\%$  der Gesamtfläche, für OPN  $19,5 \pm 0,6\%$  und für Scl  $16,9 \pm 0,8\%$ . Diese Werte waren signifikant höher als die, aller anderer Gruppen.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Osteogenese in subkutanem Fettgewebe von Ratten durch rhBMP-2 effektiver als durch die Heterodimere rhBMP-2/6 und rhBMP-2/7 induziert wird. Unter den Heterodimeren war rhBMP-2/7 effektiver als rhBMP-2/6.

#### 4. Diskussion

Von Patienten, die an *Fibrodysplasia ossificans progressiva* (FOP) erkrankt sind, ist bekannt, dass sich Knochen in Muskelgewebe bilden kann [88]. Ursächlich für die Osteoinduktion im Muskelgewebe ist bei diesen Patienten eine Mutation des Gens, das für einen BMP Rezeptor Typ I codiert [89]. BMP vermittelte Signalkaskaden führen dann zu einem extremen heterotopen Knochenwachstum, wodurch aufgezeigt wird, wie effektiv BMPs die Osteogenese in Muskelgewebe auslösen können. Dieser Sachverhalt gab mitunter den Anstoß für die Entwicklung der in dieser Habilitationsschrift dargestellten beschleunigten *ex vivo* Gentherapie, welche zunächst für die Regeneration von Knochen entwickelt wurde [80, 81]. Zudem liefert die Erkrankung FOP eine Erklärung für die Wirksamkeit der mit BMP genaktivierten Muskelgewebeimplantate in den bisher durchgeführten präklinischen Studien zur Knochenregeneration.

Auch die initial durchgeführten *in vivo* Experimente, die den Effekt einer perkutanen, intraläsionalen Injektion von Ad.BMP-2 untersuchten, gaben Hinweise auf die Rolle der umgebenden Muskulatur bei der Knochenheilung. In einer Studie wurde ein mit einem Markergen (Luziferase) beladener adenoviraler Gentransfervektor direkt in einen Knochendefekt in Kaninchen injiziert und nachfolgend untersucht in welchen Geweben und Organen das Transgen exprimiert wird [90]. Die Genexpression wurde in hohem Maße im umgebenden Muskelgewebe, sowie in Knochen und Knochenmark und in geringen Mengen transient in der Leber nachgewiesen. In einer weiteren Studie, die Gegenstand dieser kumulativen Habilitationsschrift ist (Publikation 1), führte die einmalige Injektion einer hohen Dosis von  $2,7 \times 10^9$  pfu Ad.BMP-2 zwar zu einer zuverlässigen Überbrückung knöcherner Defekte im Rattenmodell, jedoch bildete sich auch in einigen Fällen ektoper Knochen im umgebenden Muskelgewebe [53].

Zunächst lag es also nahe, eine beschleunigte *ex vivo* Gentherapie unter Verwendung von Muskelgewebe zu entwickeln. Die Verwendung und Transplantation von Muskelgewebe ist in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie üblich und wird zur Deckung und Rekonstruktion von Weichteildefekten seit langem erfolgreich durchgeführt [91-93]. Dabei wurde berichtet, dass die Entnahme von Gewebe aus dem Musculus vastus lateralis oder dem Musculus gracilis nur zu einer geringen Morbidität führt und keine wesentlichen funktionellen Einschränkungen zur Folge hat [94-96]. Es konnte gezeigt werden, dass genaktiviertes Muskelgewebe bei der Knochenregeneration nicht nur als Transportsystem

für bioaktive Moleküle fungiert, Stammzellen anlockt und Reparaturzellen aus der Umgebung aktiviert, sondern sich selbst unter dem Einfluß von BMPs in Knochen umwandeln kann und so einen Beitrag zur Bildung von neuem Knochen *in vivo* leistet [97]. Darauf weisen auch die Ergebnisse des *in vitro* Experimentes von Publikation 7 hin [98]. Diese Studie demonstrierte, dass BMPs die Osteogenese in Muskelgewebefragmenten induzieren, großflächig zur Kalzifizierung führen und Differenzierungsprozesse einleiten können. Interessanterweise zeigte sich, dass das homodimere rhBMP-2 auf Muskelgewebe deutlich stärker osteoinduktiv wirkte als die beiden Homodimere rhBMP-2/6 und rhBMP-2/7. Eine klinische Anwendung von genaktivierten Gewebeimplantaten unter Verwendung der cDNA des homodimeren BMP-2 ließe sich auch einfacher verwirklichen, da BMP-2 bereits als rekombinantes Protein für den klinischen Gebrauch zugelassen ist [11, 12]. Ein *in vitro* Experiment demonstrierte, dass auch humanes Muskelgewebe, das adenoviral BMP-2 transduziert wurde, osteogen differenzieren kann [99]. In einem weiteren Experiment konnte herausgefunden werden, dass 30 min. ausreichen, um humanes Muskelgewebe erfolgreich mit Hilfe von Ad.BMP-2 zu transduzieren, sodass das Gewebe BMP-2 produziert und osteogen differenziert [100]. All diese Erkenntnisse und generierten Daten lassen darauf schließen, dass die Entwicklung einer beschleunigten *ex vivo* Gentherapie zur Knochenregeneration im Menschen unter Verwendung von intraoperativ BMP-2 genaktivierten humanen Muskelgewebeimplantaten möglich ist.

Die Ergebnisse des Experiments von Publikation 5 demonstrieren, dass genaktiviertes Muskelgewebe auch Potenzial für die Regeneration von osteochondralen Defekten hat [85]. Allerdings scheint die Verwendung von BMP-2 cDNA alleine für die Behandlung osteochondraler Defekte nicht ideal zu sein, da es zwar zu einer verbesserten Regeneration des subchondralen Knochens kam, sich jedoch suboptimale Ergebnisse bezüglich der Reparatur der Knorpelschicht ergaben. Optimiert werden könnte die Methode in diesem Fall durch den Einsatz von zwei verschiedenen Wachstumsfaktoren. Beispielsweise könnten Muskelimplantate für die Behandlung von osteochondralen Defekten im knöchernen Bereich BMP-2 exprimieren und in der oberen Schicht auf Knorpelniveau einen anderen chondrogenen Faktor, wie IGF-1, TGF- $\beta$  oder BMP-7. Biphaseische Implantate bestehend aus Biomaterialien in Kombination mit 2 verschiedenen rekombinanten Proteinen werden experimentell getestet [101].

Genaktiviertes Muskelgewebe hat in präklinischen Experimenten mit Ratten auch die Regeneration von Sehnen beschleunigt [86, 87]. Die Ergebnisse von Publikation 6 zeigen, dass das Fixieren von TGF- $\beta$ 1 genaktivierten Muskelimplantaten im Bereich der Achillessehnenläsion zu einer beschleunigten Sehnenheilung mit verbesserten histologischen und biomechanischen Resultaten führen kann. Die Vorteile der Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 genaktivierten Muskelimplantaten zeigten sich vor allem in der frühen Phase der Heilung. Dies ist klinisch relevant, da Rupturen häufig in der frühen postoperativen Phase auftreten. In diesem Experiment wurde das Muskelgewebe nicht in einen Defekt implantiert, sondern auf die durchtrennte Sehne genäht. Die Heilung wurde hier eher durch die Abgabe von TGF- $\beta$ 1 und das Einwandern von Reparaturzellen aus dem Muskelgewebe in den Bereich der Sehnenläsion unterstützt, als durch eine Tenogenese innerhalb des Muskelimplantats. Auch bei diesem Experiment war für die Herstellung des Implantates eine Extraktion und Expansion von Stammzellen nicht notwendig. Im Vergleich zu einer früheren Studie, die adenoviral BMP-12 transduzierte Muskelimplantate zur Regeneration der Achillessehne in Ratten einsetzte, wurde durch die TGF- $\beta$ 1 Transduktion eine noch deutlicher verbesserte biomechanische Stabilität nach 1 Woche erreicht [86, 87]. Die Identifikation des geeignetsten Transgens wird Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Neben Muskelgewebe stellt auch subkutanes Fettgewebe ein interessantes Material dar, das für die regenerative Medizin von großem Interesse ist und vielfältig experimentell sowie klinisch eingesetzt wird [102-105]. Ursprünglich konzentrierte man sich lediglich auf die aus dem Fett extrahierten Stammzellen, um deren Differenzierungspotenzial zu ergründen [106]. Es zeigte sich, dass Fettstammzellen multipotent sind [107]. Es wurde außerdem festgestellt, dass die Eignung von Stammzellen aus subkutanem Fettgewebe für die Knochenregeneration nicht durch das Alter der Spender begrenzt wird [108]. In letzter Zeit rückte auch die Verwendung von Fettgewebefragmenten in den Vordergrund, um minimal manipulierte zelluläre Produkte zu generieren. Solch minimal manipuliertes Lipoaspirat wird zur Behandlung der Gonarthrose intra-artikulär injiziert [109, 110].

Die Ergebnisse von Publikation 4 demonstrieren, dass auch genaktivierte Fettgewebefragmente große segmentale Knochendefekte im Rattenmodell regenerieren können [84]. Die in dieser Studie verwendeten Ad.BMP-7 transduzierten Fettgewebeimplantate waren jedoch nicht so effektiv wie BMP-2 transduzierte Fettgewebeimplantate, die im gleichen Rattenmodell bei 100% der Tiere eine strukturelle und funktionelle Heilung der Knochendefekte hervorgerufen haben [83]. Sowohl in

Kombination mit Muskelgewebe als auch mit Fettgewebe regte BMP-2 *in vivo* die Osteogenese effektiver an als BMP-7 [80, 82-84]. Die Feststellung, dass BMP-2 effektiver als BMP-7 Knochen regeneriert, steht in Einklang mit Erkenntnissen aus der Literatur [11, 111]. In diesen klinischen Untersuchungen zeigte sich für Patienten, die mit rhBMP-2 behandelt wurden, eine höhere Heilungsrate von Pseudarthrosen als bei Patienten, die rhBMP-7 erhielten.

Die Erfahrungen aus den durchgeführten Studien zur Knochen-, Knorpel- und Sehnenregeneration lehrten, dass Muskelgewebe im Vergleich zu Fettgewebe eine bessere Formstabilität besitzt und sich besser „press fit“ in den Defekten platzieren lässt. Vor allem für die Sehnenregeneration könnten Muskelgewebeimplantate besser geeignet sein als Fettgewebefragmente, da man das Muskelgewebe an die Sehnen festnähen kann. Fettgewebe hat hingegen den Vorteil, dass es als mikro-fragmentiertes Gewebe auch injiziert werden kann [109, 110].

## 5. Schlussfolgerung und Ausblick

Gegenstand der vorliegenden Habilitationsarbeit ist die Entwicklung einer neuen biologischen Behandlungsmethode zur Regeneration von Knochen, Gelenkknorpel und Sehnen. Die Methode basiert auf einer beschleunigten *ex vivo* Gentherapie unter Verwendung von genetisch modifiziertem autologem Muskel- und Fettgewebe. Es konnte gezeigt werden, dass dies eine vielfältig einsetzbare Plattform-Technologie darstellt, die in ersten präklinischen Experimenten vielversprechende Ergebnisse erzielt hat. Die beschleunigte *ex vivo* Gentherapie vereint die Praktikabilität des direkten *in vivo* Gentransfers mit der Sicherheit der konventionellen *ex vivo* Gentherapie und könnte eine Möglichkeit darstellen, die Gentherapie im Fachgebiet der muskuloskelettalen Medizin in den kommenden Jahren klinische Realität werden zu lassen. Durch die Entwicklung dieser Technologie soll der Kliniker in der Lage sein, ein rein biologisches autologes zell- und genbasiertes Konstrukt innerhalb ein und derselben Operation zu generieren und zu implantieren. Da weder das aufwendige und langwierige Extrahieren und Vermehren von Zellen, noch der Einsatz eines künstlichen Biomaterials erforderlich ist, könnte diese Methode kosteneffektiv sein. Allerdings sind noch viele weitere Untersuchungen und Optimierungen notwendig, bevor an eine klinische Anwendung gedacht werden kann. Insbesondere muss sich solch eine gentherapeutische Behandlung als sicher herausstellen, wofür ausgedehnte Toxikologiestudien durchgeführt werden müssen. Zudem muss die Effektivität auch in Großtiermodellen nachgewiesen werden. Für erste Untersuchungen in Schafen bieten sich Knochenheilungsstudien mit BMP-2 transduzierten Muskel- und Fettimplantaten an, da diese bereits im Rattenmodell sehr effektiv waren. Auf dem Gebiet der Knorpel- und Sehnenregeneration sind zunächst noch *in vitro* Arbeiten und Kleintierstudien notwendig, um die wirksamsten Transgene oder auch Kombinationen von bioaktiven Molekülen zu identifizieren.

Die Genmedizin wird in den kommenden Jahren auch für das Tissue Engineering und die Regeneration des muskuloskelettalen Systems eine zunehmend wichtige Rolle spielen. Darauf weisen sowohl zahlreiche präklinische Erfolge als auch aktuelle klinische Studien zur Knochenheilung (clinicaltrials.gov: NCT04511689) und Arthrose-Behandlung (clinicaltrials.gov: NCT04119687, NCT02790723 und NCT 04124042) hin.

Auch die weltweite Anwendung der gentherapeutischen Coronavirus-Impfstoffe verleiht der Genmedizin Akzeptanz.

## VI. Literaturverzeichnis

1. Ohtori, S., et al., *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.
2. 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.
3. 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.
4. Masquelet, A.C., et al., *[Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]*. Ann Chir Plast Esthet, 2000. **45**(3): p. 346-53.
5. Giannoudis, P.V., et al., *Restoration of long bone defects treated with the induced membrane technique: protocol and outcomes*. Injury, 2016. **47 Suppl 6**: p. S53-S61.
6. Lowenberg, D.W., et al., *Combined muscle flap and Ilizarov reconstruction for bone and soft tissue defects*. Clin Orthop Relat Res, 1996(332): p. 37-51.
7. Marsh, D.R., et al., *The Ilizarov method in nonunion, malunion and infection of fractures*. J Bone Joint Surg Br, 1997. **79**(2): p. 273-9.
8. Lavini, F., C. Dall'Oca, and P. Bartolozzi, *Bone transport and compression-distraction in the treatment of bone loss of the lower limbs*. Injury, 2010. **41**(11): p. 1191-5.
9. 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.

10. Morelli, I., et al., *Masquelet technique: myth or reality? A systematic review and meta-analysis*. *Injury*, 2016. **47 Suppl 6**: p. S68-s76.
11. Haubruck, P., et al., *Comparison of the clinical effectiveness of Bone Morphogenetic Protein (BMP) -2 and -7 in the adjunct treatment of lower limb nonunions*. *Orthop Traumatol Surg Res*, 2018. **104**(8): p. 1241-1248.
12. Garrison, K.R., et al., *Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review*. *Health Technol Assess*, 2007. **11**(30): p. 1-150, iii-iv.
13. Talwar, R., et al., *Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo*. *J Clin Periodontol*, 2001. **28**(4): p. 340-7.
14. Fu, R., et al., *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.
15. Simmonds, M.C., et al., *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.
16. James, A.W., et al., *A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2016. **22**(4): p. 284-97.
17. 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.
18. Schacter, G.I. and W.D. Leslie, *Diabetes and Bone Disease*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2017. **46**(1): p. 63-85.
19. 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.



20. Tzioupis, C. and P.V. Giannoudis, *Prevalence of long-bone non-unions*. *Injury*, 2007. **38 Suppl 2**: p. S3-9.
21. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation*. *Instr Course Lect*, 1998. **47**: p. 487-504.
22. Maurer, J., et al., *A Registry for Evaluation of Efficiency and Safety of Surgical Treatment of Cartilage Defects: The German Cartilage Registry (KnorpelRegister DGOU)*. *JMIR Res Protoc*, 2016. **5(2)**: p. e122.
23. Marchi, B.C., E.M. Arruda, and R. Coleman, *The effect of articular cartilage focal defect size and location in whole knee biomechanics models*. *J Biomech Eng*, 2019.
24. Brittberg, M., et al., *Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Five-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial*. *Am J Sports Med*, 2018. **46(6)**: p. 1343-1351.
25. Steinwachs, M.R., T. Guggi, and P.C. Kreuz, *Marrow stimulation techniques*. *Injury*, 2008. **39 Suppl 1**: p. S26-31.
26. Filardo, G., et al., *Is the clinical outcome after cartilage treatment affected by subchondral bone edema?* *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2014. **22(6)**: p. 1337-44.
27. Niethammer, T.R., et al., *Bone Marrow Edema in the Knee and Its Influence on Clinical Outcome After Matrix-Based Autologous Chondrocyte Implantation: Results After 3-Year Follow-up*. *Am J Sports Med*, 2015. **43(5)**: p. 1172-9.
28. Wylie, J.D., et al., *Failures and Reoperations After Matrix-Assisted Cartilage Repair of the Knee: A Systematic Review*. *Arthroscopy*, 2016. **32(2)**: p. 386-92.
29. Niethammer, T.R., et al., *Graft Hypertrophy After Third-Generation Autologous Chondrocyte Implantation Has No Correlation With Reduced Cartilage Quality: Matched-Pair Analysis Using T2-Weighted Mapping*. *Am J Sports Med*, 2018. **46(10)**: p. 2414-2421.

30. Andriolo, L., et al., *Failure of Autologous Chondrocyte Implantation*. Sports Med Arthrosc Rev, 2017. **25**(1): p. 10-18.
31. Welch, T., B. Mandelbaum, and M. Tom, *Autologous Chondrocyte Implantation: Past, Present, and Future*. Sports Med Arthrosc Rev, 2016. **24**(2): p. 85-91.
32. Dell'Osso, G., et al., *Up-to-date Review and Cases Report on Chondral Defects of Knee Treated by ACI Technique: Clinical-instrumental and Histological Results*. Surg Technol Int, 2015. **26**: p. 317-23.
33. Niemeyer, P., et al., *Treatment Costs of Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation Compared With Microfracture: Results of a Matched-Pair Claims Data Analysis on the Treatment of Cartilage Knee Defects in Germany*. Orthop J Sports Med, 2019. **7**(12): p. 2325967119886583.
34. Schrock, J.B., et al., *A Cost-Effectiveness Analysis of Surgical Treatment Modalities for Chondral Lesions of the Knee: Microfracture, Osteochondral Autograft Transplantation, and Autologous Chondrocyte Implantation*. Orthop J Sports Med, 2017. **5**(5): p. 2325967117704634.
35. Kosiur, J.R. and R.A. Collins, *Weight-bearing compared with non-weight-bearing following osteochondral autograft transfer for small defects in weight-bearing areas in the femoral articular cartilage of the knee*. J Bone Joint Surg Am, 2014. **96**(16): p. e136.
36. Quarch, V.M., et al., *Fate of large donor site defects in osteochondral transfer procedures in the knee joint with and without TruFit plugs*. Arch Orthop Trauma Surg, 2014. **134**(5): p. 657-66.
37. LaPrade, R.F. and J.C. Botker, *Donor-site morbidity after osteochondral autograft transfer procedures*. Arthroscopy, 2004. **20**(7): p. e69-73.
38. Martin, J.A. and J.A. Buckwalter, *The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 2**: p. 106-10.

39. Brittberg, M., et al., *Cartilage repair in the degenerative ageing knee*. Acta Orthop, 2016. **87**(sup363): p. 26-38.
40. Imade, S., et al., *Effectiveness and limitations of autologous osteochondral grafting for the treatment of articular cartilage defects in the knee*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. **20**(1): p. 160-5.
41. Kohler, J., et al., *Uncovering the cellular and molecular changes in tendon stem/progenitor cells attributed to tendon aging and degeneration*. Aging Cell, 2013. **12**(6): p. 988-99.
42. Gross, C.E. and J.A. Nunley, 2nd, *Acute Achilles Tendon Ruptures*. Foot Ankle Int, 2016. **37**(2): p. 233-9.
43. Longo, U.G., M. Ronga, and N. Maffulli, *Acute ruptures of the achilles tendon*. Sports Med Arthrosc Rev, 2009. **17**(2): p. 127-38.
44. Yamamoto, A., et al., *Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population*. J Shoulder Elbow Surg, 2010. **19**(1): p. 116-20.
45. Randelli, P., et al., *Complications associated with arthroscopic rotator cuff repair: a literature review*. Musculoskelet Surg, 2012. **96**(1): p. 9-16.
46. Betz, V.M., et al., *Bone tissue engineering and repair by gene therapy*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 833-41.
47. Cao, H., D.R. Koehler, and J. Hu, *Adenoviral vectors for gene replacement therapy*. Viral Immunol, 2004. **17**(3): p. 327-33.
48. Wei, Q., et al., *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.
49. Liu, Y. and D.A. Wang, *Viral vector-mediated transgenic cell therapy in regenerative medicine: safety of the process*. Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(4): p. 559-67.

50. Betz, O.B., et al., *Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(2): p. 355-65.
51. Baltzer, A.W., et al., *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.
52. Betz, O.B., et al., *Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects*. Gene Ther, 2007. **14**(13): p. 1039-44.
53. Betz, V.M., et al., *Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose*. Hum Gene Ther, 2007. **18**(10): p. 907-15.
54. Egermann, M., et al., *Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep*. Gene Ther, 2006. **13**(17): p. 1290-9.
55. Cucchiarini, M., et al., *Effects of TGF- $\beta$  Overexpression via rAAV Gene Transfer on the Early Repair Processes in an Osteochondral Defect Model in Minipigs*. Am J Sports Med, 2018. **46**(8): p. 1987-1996.
56. Cucchiarini, M., P. Orth, and H. Madry, *Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo*. J Mol Med (Berl), 2013. **91**(5): p. 625-36.
57. Cucchiarini, M. and H. Madry, *Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo*. Gene Ther, 2014. **21**(9): p. 811-9.
58. Bolt, P., et al., *BMP-14 gene therapy increases tendon tensile strength in a rat model of Achilles tendon injury*. J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(6): p. 1315-20.
59. Rickert, M., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer of growth and differentiation factor-5 into tenocytes and the healing rat Achilles tendon*. Connect Tissue Res, 2005. **46**(4-5): p. 175-83.

60. Tang, J.B., et al., *Adeno-associated virus-2-mediated bFGF gene transfer to digital flexor tendons significantly increases healing strength. an in vivo study.* J Bone Joint Surg Am, 2008. **90**(5): p. 1078-89.
61. Gao, X., et al., *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.
62. Shen, H.C., et al., *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.
63. Gao, X., et al., *Influences of donor and host age on human muscle-derived stem cell-mediated bone regeneration.* Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 316.
64. Lieberman, J.R., et al., *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.
65. Virk, M.S., et al., *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.
66. Park, J., et al., *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.
67. Dragoo, J.L., et al., *Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat.* J Orthop Res, 2003. **21**(4): p. 622-9.
68. Peterson, B., et al., *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.
69. Qing, W., et al., *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.

70. Mizrahi, O., et al., *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.
71. Kuroda, R., et al., *Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(2): p. 433-42.
72. Li, H., et al., *The superior regenerative potential of muscle-derived stem cells for articular cartilage repair is attributed to high cell survival and chondrogenic potential*. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016. **3**: p. 16065.
73. Pagnotto, M.R., et al., *Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair*. *Gene Ther*, 2007. **14**(10): p. 804-13.
74. Park, J., et al., *Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells*. *J Gene Med*, 2006. **8**(1): p. 112-25.
75. Shi, J., et al., *Nanoparticle delivery of the bone morphogenetic protein 4 gene to adipose-derived stem cells promotes articular cartilage repair in vitro and in vivo*. *Arthroscopy*, 2013. **29**(12): p. 2001-2011.e2.
76. 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.
77. Guo, D., et al., *Fibroblast growth factor-2 promotes the function of tendon-derived stem cells in Achilles tendon restoration in an Achilles tendon injury rat model*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020. **521**(1): p. 91-97.
78. Kraus, T.M., et al., *Stem cells and bFGF in tendon healing: Effects of lentiviral gene transfer and long-term follow-up in a rat Achilles tendon defect model*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2016. **17**: p. 148.
79. Tan, C., et al., *Scx-transduced tendon-derived stem cells (tdscs) promoted better tendon repair compared to mock-transduced cells in a rat patellar tendon window injury model*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e97453.

80. Betz, O.B., et al., *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.
81. Betz, O.B., et al., *Repair of large segmental bone defects: BMP-2 gene activated muscle grafts vs. autologous bone grafting*. BMC Biotechnol, 2013. **13**: p. 65.
82. Betz, V.M., et al., *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.
83. Betz, O.B., et al., *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.
84. Betz, V.M., et al., *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.
85. Betz, V.M., et al., *BMP-2 gene activated muscle tissue fragments for osteochondral defect regeneration in the rabbit knee*. J Gene Med, 2017. **19**(9-10).
86. Majewski, M., et al., *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.
87. Majewski, M., et al., *Improvement of tendon repair using muscle grafts transduced with TGF- $\beta$ 1 cDNA*. Eur Cell Mater, 2012. **23**: p. 94-101; discussion 101-2.
88. Kaplan, F.S., et al., *Hard targets for a second skeleton: therapeutic horizons for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)*. Expert Opin Orphan Drugs, 2017. **5**(4): p. 291-294.
89. Kaplan, F.S., et al., *Investigations of activated ACVR1/ALK2, a bone morphogenetic protein type I receptor, that causes fibrodysplasia ossificans progressiva*. Methods Enzymol, 2010. **484**: p. 357-73.

90. Baltzer, A.W., et al., *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.
91. Lee, M.G., et al., *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.
92. 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.
93. Veyrat, M., et al., *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.
94. Chen, H.C., et al., *Microvascular vastus lateralis muscle flap for chronic empyema associated with a large cavity*. Ann Thorac Surg, 1999. **67**(3): p. 866-9.
95. Deutinger, M., et al., *Donor-site morbidity of the gracilis flap*. Plast Reconstr Surg, 1995. **95**(7): p. 1240-4.
96. Lakhiani, C., et al., *Donor-Site Morbidity Following Free Tissue Harvest from the Thigh: A Systematic Review and Pooled Analysis of Complications*. J Reconstr Microsurg, 2016. **32**(5): p. 342-57.
97. De La Vega, R.E., et al., *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.
98. Betz, V.M., et al., *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.



99. Miao, C., et al., *Osteogenic Differentiation Capacity of In Vitro Cultured Human Skeletal Muscle for Expedited Bone Tissue Engineering*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 8619385.
100. Rod, E., et al., *Optimization of an ex vivo gene transfer to the hamstrings tendons muscle remnants: potential for genetic enhancement of bone healing*. Croat Med J, 2019. **60**(3): p. 201-211.
101. Lu, S., et al., *Dual growth factor delivery from bilayered, biodegradable hydrogel composites for spatially-guided osteochondral tissue repair*. Biomaterials, 2014. **35**(31): p. 8829-8839.
102. Minteer, D., K.G. Marra, and J.P. Rubin, *Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013. **129**: p. 59-71.
103. Banyard, D.A., et al., *Implications for human adipose-derived stem cells in plastic surgery*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(1): p. 21-30.
104. Rihani, J., *Microfat and Nanofat: When and Where These Treatments Work*. Facial Plast Surg Clin North Am, 2019. **27**(3): p. 321-330.
105. Lee, W.S., et al., *Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase IIB, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial*. Stem Cells Transl Med, 2019. **8**(6): p. 504-511.
106. Harasymiak-Krzyżanowska, I., et al., *Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications*. Cell Mol Biol Lett, 2013. **18**(4): p. 479-93.
107. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
108. Dufrane, D., *Impact of Age on Human Adipose Stem Cells for Bone Tissue Engineering*. Cell Transplant, 2017. **26**(9): p. 1496-1504.

109. Roato, I., et al., *Concentrated adipose tissue infusion for the treatment of knee osteoarthritis: clinical and histological observations*. Int Orthop, 2019. **43**(1): p. 15-23.
110. Panchal, J., G. Malanga, and M. Sheinkop, *Safety and Efficacy of Percutaneous Injection of Lipogems Micro-Fractured Adipose Tissue for Osteoarthritic Knees*. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2018. **47**(11).
111. Conway, J.D., et al., *BMP-7 versus BMP-2 for the treatment of long bone nonunion*. Orthopedics, 2014. **37**(12): p. e1049-57.

## VII. Publikationen des Autors

### Originalarbeiten

1. **Betz, V.M.**, B. Ren, O.B. Betz, V. Jansson, and P.E. Müller. *Osteoinduction within adipose tissue fragments by heterodimeric Bone Morphogenetic Proteins-2/6 und -2/7 versus homodimeric Bone Morphogenetic Protein-2: therapeutic implications for bone regeneration.* J Gene Med, 2021. p. e3311. Impact Factor: 3,25
2. Wilke H.J., **V.M. Betz**, and A. Kienle. Morphometry of the kangaroo spine and ist comparison with human spinal data. J Anat, 2020. 00:1-17. Impact Factor: 2,01
3. 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. Impact Factor: 3,20
4. 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. Impact Factor: 4,12
5. **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. Impact Factor: 1,65
6. 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. (\*geteilte Erstautorenschaft).* Impact Factor: 4,08

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). Impact Factor: 1,65
8. **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. Impact Factor: 3,25
9. **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. (\*geteilte Erstautorenschaft). Impact Factor: 1,62
10. **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. Impact Factor: 1,91
11. Betz, O.B., **V.M. Betz**, C. Schröder, R. Penzkofer, M. Göttliger, 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. Impact Factor: 2,59
12. 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. Impact Factor: 4,56
13. 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. Impact Factor: 4,64*
14. 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. Impact Factor: 5,38*
  15. 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. Impact Factor: 4,20*
  16. 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. Impact Factor: 4,97*
  17. **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. Impact Factor: 4,20*
  18. 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. Impact Factor: 2,78*

## Übersichtsartikel/Reviews

1. **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. Impact Factor: 1,65
2. **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. Impact Factor: 3,30
3. 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. Impact Factor: 3,61

## VIII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson, Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation am Klinikum der LMU München. Er hat mir die Forschungsarbeiten im Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie und das Erstellen dieser Habilitationsarbeit ermöglicht. Herzlichen Dank für das Vertrauen und die Unterstützung.

Ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller, stellvertretender Klinikdirektor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation und medizinischer Leiter der AG Regenerative Medizin am Klinikum der LMU München. Der Großteil der Arbeiten ist in enger Zusammenarbeit über viele Jahre mit ihm entstanden. Ich bin ihm sehr dankbar für seine Unterstützung und das Einbringen seiner Expertise.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. med. Andreas Helck sehr herzlich für sein Mitwirken als Teil des Fachmentorats. Er hat sich freundlicherweise bereit erklärt, diese Habilitationsleistung zu bewerten und das Habilitationsverfahren zu begleiten.

Besten Dank an meine wissenschaftlichen Kooperationspartner und Mentoren: Herrn Prof. Dr. Peter Augat in Murnau, Herrn Prof. Dr. Rainer Burgkardt in München, Herrn Dr. Christian Thirion in München, Herrn Dr. Michael Salomon in München, Herrn Prof. Dr. Stefan Rammelt in Dresden und Herrn Prof. Dr. Zwipp in Dresden.

Großer Dank gebührt auch den Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern, die eng mit mir an den Projekten zusammengearbeitet haben: Herrn Dr. Bin Ren, Herrn Dr. Tom Rosin, Herrn Dr. Alexander Keller und Herrn Dipl.-Ing. Peter Foehr.

Herzlichen Dank an meine gesamte Familie für ihre Unterstützung, Motivation und Liebe. Meinem Bruder und langjährigen wissenschaftlichen Kooperationspartner Dr. Oliver Betz danke ich für die tolle gemeinsame Zeit in diversen Forschungseinrichtungen der alten und neuen Welt.

## IX. Anhang – Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation

(Anstelle des Anhangs sind in dieser publizierten Version aufgrund des copyright lediglich die Titel der Arbeiten mit Fundstellen und DOI auf den nachfolgenden Seiten aufgelistet.)



## Originalarbeiten zur kumulativen Habilitation

### Publikation 1

**Betz V.M.**, Betz O.B., Glatt V., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A., Boussein M.L., Vrahas M.S., and Evans C.H. (2007). *Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose*. Hum Gene Ther, 18(10): p. 907-15. Impact Factor: 4,20. doi: 10.1089/hum.2007.077

### Publikation 2

Betz O.B., **Betz V.M.**, Schroeder C., Penzkofer R., Gottlinger M., Mayer-Wagner S., Augat P., Jansson V., and Müller P.E. (2013). *Repair of large segmental bone defects: BMP-2 gene activated muscle grafts vs. autologous bone grafting*. BMC Biotechnol, 13: p. 65. Impact Factor: 2,59. doi: 10.1186/1472-6750-13-65

### Publikation 3

**Betz V.M.**, Betz O.B., Rosin T., Keller A., Thirion C., Salomon M., Manthey S., Augat P., Jansson V., Müller P.E., Rammelt S., and Zwipp H. (2015). *The effect of BMP-7 gene activated muscle tissue implants on the repair of large segmental bone defects*. Injury, 46(12): p. 2351-8. Impact Factor: 1,91. doi: 10.1016/j.injury.2015.09.016

### Publikation 4

**Betz V.M.**, Betz O.B., Rosin T., Keller A., Thirion C., Salomon M., Manthey S., Augat P., Jansson V., Müller P.E., Rammelt S., and Zwipp H. (2016). *An expedited approach for sustained delivery of BMP-7 to bone defects using gene activated fragments of subcutaneous fat*. J Gene Med, 18(8):199-207. Impact Factor: 3,25. doi: 10.1002/jgm.2892

### **Publikation 5**

**Betz V.M.**, Keller A., Foehr P., Thirion C., Salomon M., Rammelt S., Zwipp H., Burgkart R., Jansson V., Müller P.E., and Betz O.B. (2017). *BMP-2 gene activated muscle tissue fragments for osteochondral defect regeneration in the rabbit knee*. J Gene Med, 19: p. (9-10). Impact Factor: 1,65. doi: 10.1002/jgm.2972

### **Publikation 6**

Majewski M., Porter R.M., Betz O.B., **Betz V.M.**, Clahsen H., Fluckiger R., and Evans C.H. (2012). *Improvement of tendon repair using muscle grafts transduced with TGF-beta1 cDNA*. Eur Cell Mater, 23: p. 94-101; discussion 101-2. Impact Factor: 4,56. doi: 10.22203/ecm.v023a07

### **Publikation 7**

**Betz V.M.**, Ren B., Messmer C., Jansson V., Betz O.B., and Müller P.E. (2018). *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, 20(9): p. e3042. Impact Factor: 1,65. doi: 10.1002/jgm.3042

### **Publikation 8**

**Betz V.M.**, Ren B., Betz O.B., Jansson V., and Müller P.E. (2021). *Osteoinduction within adipose tissue fragments by heterodimeric Bone Morphogenetic Proteins-2/6 and -2/7 versus homodimeric Bone Morphogenetic Protein-2: therapeutic implications for bone regeneration*. J Gene Med, 2021: p. e3311. Impact Factor: 3,25. doi: 10.1002/jgm.3311