

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie mit dem  
Arbeitsbereich Orthopädie am Campus Benjamin Franklin der Medizinischen  
Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

---

DISSERTATION

Effekte von dendritischen Polyglycerolsulfaten (dPGS) auf den  
Gelenkknorpel bei Arthrose

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tobias Schneider  
aus Eberswalde

Datum der Promotion: 09.09.2016

## **INHALTSVERZEICHNIS**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ABSTRACT (DEUTSCH)	2
ABSTRACT (ENGLISCH)	3
EINFÜHRUNG	4
ZIELSTELLUNG	4
METHODIK	5
Nanopartikelherstellung und Hydrogelvorbereitung	5
Chondrozytenisolierung und -kultivierung	5
Vitalitäts-Assays	5
Aufnahme in Zellen	6
Immunhistologische Färbungen	6
Quantitative Analysen	6
RTD-PCR	6
Rattenmodell	7
Histologie	7
Statistik	8
ERGEBNISSE	9
Zytotoxizität und Aufnahme verschiedener dendritischer Polyglycerole in Chondrozyten	9
Einfluss von dPGS auf das Expressionsverhalten humaner Chondrozyten in der Monolayer-Kultur	10
Einfluss von dPGS auf das Expressionsverhalten humaner Chondrozyten in dPGS-basierten Hydrogelen	11
Protektiver Einfluss dendritischer Polyglycerolsulfate auf den Knorpel im Rattenmodell	11
DISKUSSION	13
LITERATURVERZEICHNIS	16
EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG UND ANTEILSERKLÄRUNG	19
AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN	22
Selectivity in Bone Targeting with Multivalent Dendritic Polyanion Dye Conjugates	23
Effects of Dendritic Polyglycerol Sulfate on Articular Chondrocytes	34
Mimicking of Chondrocyte Microenvironment Using <i>in situ</i> Forming Dendritic Polyglycerol Sulfate Based Synthetic Polyanionic Hydrogels	46
LEBENS LAUF	57
PUBLIKATIONS LISTE	59
DANKSAGUNG	61

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

C3aR	Rezeptor des C3a Proteins
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dPG	dendritisches Polyglycerol
dPGBP	dendritisches Polyglycerolbisphosphonat
dPGC	dendritisches Polyglycerolcarboxylat
dPGP	dendritisches Polyglycerolphosphat
dPGPn	dendritisches Polyglycerolphosphonat
dPGS	dendritisches Polyglycerolsulfat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDA	Fluorescein diacetate
HCl	Salzsäure
ICC, Cy3	Indocarbocyanin
IL	Interleukin
LSM	Laserscanning Mikroskop
MMP	Matrixmetalloproteinase
OA	Osteoarthritis
PEG	Polyethylenglycol
RTD-PCR	Real Time Detection-Polymerase Chain Reaction
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **ABSTRACT (DEUTSCH)**

*Einleitung:* Arthrose stellt immer noch eine der größten Herausforderungen für die moderne Medizin dar. Die inflammatorischen Prozesse, welche die Arthrosepathogenese begleiten, sind noch nicht vollständig verstanden und die geringe Regenerationsfähigkeit des Knorpels stellt eine große Hürde für mögliche therapeutische Ansätze dar. Anti-inflammatorisch wirkende Nanopartikel, wie dendritische Polyglycerolsulfate (dPGS), könnten einen interessanten Ansatzpunkt bilden. Aus diesem Grund wurden dPGS und verschiedene andere Modifikationen von dPG in der vorliegenden Arbeit charakterisiert und deren Einflüsse auf den Gelenkknorpel untersucht.

*Methodik:* Zunächst wurde die Zytokompatibilität der dPG-Varianten mittels Zytotoxizitätsuntersuchungen und die Aufnahmefähigkeit in verschiedene Zelltypen bestimmt. Weiterhin wurde der Einfluss von dPGS auf wichtige extrazelluläre Matrixbestandteile (Kollagen Typ II, Aggrekan) und Arthrose-assoziierte Marker (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, VEGF, C3aR und MMP-1) mittels RTD-PCR, FACS, ELISA, immunzytochemischen Färbungen und quantitativer Analysen nachgewiesen. Es wurden Lebend/Tod-Assays für Hydrogele, in die dPGS inkorporiert war, durchgeführt und ausgewertet. Die dPGS Wirkung auf die Gonarthrose wurde im *in vivo* Rattenmodell analysiert, wofür Tiere nach chirurgischer Arthroseinduktion mit dPGS behandelt wurden und deren Gelenke und Organe abschließend histologisch aufgearbeitet und ausgewertet wurden.

*Ergebnisse:* Fast alle Nanopartikel, außer wenigen dPG-Modifikationen, zeigten keinerlei supprimierenden Effekt auf die metabolische Aktivität der Zellen unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Ebenso überlebten die Zellen in Hydrogelen mit verschiedenen dPGS-Konzentrationen. Weiterhin konnten alle Nanopartikel von verschiedenen getesteten Zelltypen aufgenommen und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden. dPGS selbst hatte keinen Einfluss auf die Expression wichtiger Knorpelmatrixproteine wie Kollagen Typ II nach 24 h Inkubation. Die dPGS-Nanopartikel hatten einen signifikant supprimierenden Effekt auf die Selbstinduktion von TNF $\alpha$  und in mit dPGS behandelten Proben wurden erhöhte Konzentrationen des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 gefunden. Die operierten Gelenke der Ratten entwickelten eine mittlere bis schwere Arthrose. Die Verwendung verschiedener Scoresysteme bestätigte zusammen mit den histologischen Färbungen, dass durch eine Behandlung mit dPGS eine erkennbare aber nicht signifikante Verbesserung der Scorewerte in den operierten Knien festgestellt wurde.

*Schlussfolgerung:* Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sprechen für eine weitere Erforschung von dPGS und seiner anti-inflammatorischen und chondroprotektiven Eigenschaften.

## **ABSTRACT (ENGLISCH)**

*Introduction:* Osteoarthritis (OA) is still one of the major challenges for modern medicine. Inflammatory processes which are involved in OA pathogenesis are yet not fully understood and remain, together with the low repair capacity in cartilage, a major obstacle when trying to find effective therapeutic approaches. Nanoparticulate compounds with anti-inflammatory properties, such as dendritic polyglycerol sulfates (dPGS) may pose a new approach. Therefore, the main topic of this study was to characterize the influence of dPGS on cultured chondrocytes and joint cartilage *in vivo*.

*Methods:* Different types of nanoparticulate dPGS were checked for their effect on metabolic activity of cells to assess cytocompatibility. Their uptake in different cell types was tested using dPGS coupled with fluorescent ICC. Furthermore, the influence of dPGS alone or in combination with pro-inflammatory TNF $\alpha$  was analyzed on important extracellular matrix components (type II collagen, aggrecan) as well as OA-associated markers (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, VEGF, C3aR and MMP-1) in chondrocyte cultures using RTD-PCR, FACS, ELISA, immunocytochemical staining. In addition, the survival of chondrocytes embedded in different hydrogels which contained varying amounts of dPGS was analyzed using Live/Dead assays. Evaluation of the impact of dPGS on the progression of surgically induced OA in the knee joints of rats was studied after treatment of the rats with the nanoparticulate dPGS by analyzing histologically the explanted joints and organs applying different score systems.

*Results:* Almost all nanoparticulate compounds tested, except for higher concentrations of some dPG modifications, revealed no suppressive effect on metabolic activity in tested cell types. Furthermore, all tested nanoparticulate compounds were internalized by different cell types. dPGS stimulation by itself did not reveal any effect on cartilage marker type II collagen after 24 h. On the other hand the dPGS reduced the TNF $\alpha$  induced upregulation of TNF $\alpha$  in a costimulation setting. Samples treated with dPGS also revealed a higher concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10. After surgically induction, the knee joints of rats developed OA over the time course of 8 weeks. Histological stainings and score systems alike showed a clear (not significant) trend for less severe OA in animals treated with dPGS compared to the control group. No major accumulation of dPGS could be shown in parenchymal cells of kidney, liver and spleen.

*Conclusion:* Taken together the results of this study support the claim that dPGS exhibits anti-inflammatory and possible chondroprotective features. Further experimental (animal-) studies with further elaborated treatment courses might be performed in order to evaluate dPGS as a potential candidate in the treatment of OA.

## **EINFÜHRUNG**

Knorpeldefekte, die mit fortschreitender Zeit in Arthrose münden und zur dauerhaften Zerstörung von Gelenkoberflächen führen, sind immer noch eine der größten Herausforderungen der Medizin [1, 2]. Die extrem begrenzte Regenerationsfähigkeit des Knorpels stellt hierbei ein besonderes Problem dar. In Folge der Verletzung kommt es zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  und Interleukinen [3, 4], die zum Abbau der Knorpelmatrix führen. Gleichzeitig kommt es zu einer Verringerung von spezifischen Knorpelmatrixproteinen wie Kollagen Typ II und Aggrecan. Nanopartikel, die in den vergangenen Jahren immer wieder in den Fokus als medizinische Applikation gelangten [5-9], könnten hier vielversprechende Kandidaten darstellen. Im Bereich der Arthrose könnte das anti-inflammatorische Potential dendritischer Polyglycerolsulfate (dPGS) [10-12] dazu genutzt werden, die entzündlichen Prozesse bei der Arthroseentstehung in einem therapeutischen Sinn zu beeinflussen. Da die Wiederherstellung der glatten Gelenkoberfläche ein vorrangiges Ziel der Arthrotherapie ist [13], lässt sich durch eine Beeinflussung der Pathogenese mit Hilfe von Nanopartikeln möglicherweise die Notwendigkeit operativer Eingriffe verringern. Durch die Verwendung von Hydrogelen könnten möglicherweise arthrotische Knorpeldefekte abgedeckt und die unerwünschten Veränderungen im Phänotyp der Chondrozyten verringert werden. Die 3D Struktur, die Hydrogele formen, entspricht nämlich den natürlichen Erfordernissen der Chondrozyten [14, 15] und kann daher den differenzierten Phänotyp von Chondrozyten stabilisieren.

## **ZIELSTELLUNG**

Ziel ist in die biochemischen Prozesse bei der Arthroseentstehung regulierend einzugreifen. Als Grundlage für mögliche spätere Therapieoptionen sollte zunächst eine Charakterisierung der dPGS-Nanopartikel hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und ihres Einflusses auf die Genexpression von Chondrozyten *in vitro* erfolgen. Neben dPGS sollten auch noch andere dendritische Polyglycerole hinsichtlich ihrer Biokompatibilität analysiert werden. Anschließend sollte der Einfluss der Nanopartikel auf Entstehung und Fortschreiten der Arthrose im Rattenmodell untersucht werden. Abschließend wird in dieser Arbeit die Verbindung von dPGS-Nanopartikeln und Hydrogelen als Matrix für Knorpelzellen untersucht.

## **METHODIK**

### **Nanopartikelherstellung und Hydrogelvorbereitung**

Das Grundgerüst der dPGS bildet einen Polyglycerolkern, welcher aus mehreren Glycerol-Monomeren zusammengesetzt ist. Der Kern wird durch eine Polymerisierungsreaktion des Glycerols an einem Startermolekül vergrößert. Endständige Hydroxy-Gruppen können anschließend durch Sulfatgruppen ersetzt werden. Alle verwendeten dPGS-Nanopartikel hatten ein Gewicht zwischen 2.000 und 50.000 g/mol sowie einen finalen Sulfatierungsgrad zwischen 75% und 92%. Neben dPGS wurden weiterhin dPG-Partikel mit anderen Funktionalisierungen (-sulfonate, -phosphate, -phosphonate, -carboxylate und -bisphosphonate) untersucht. Die zu testenden Hydrogele bestanden aus den drei Makromonomeren homobifunktionales Polyethylenglykol (PEG)-cyclooctin, dendritisches Polyglycerolsulfat-Azid und vierarmiges-PEG-Azid, welche *in situ* verknüpft wurden. Die verschiedenen Gelkonfigurationen wurden dabei durch die Verwendung unterschiedlicher Anteile der dPGS-Komponente realisiert. Die Nanopartikel und Gelkomponenten wurden durch die AG Haag (Freie Universität Berlin) entwickelt und in Zusammenarbeit mit der Firma mivenion GmbH zur Verfügung gestellt.

### **Chondrozytenisolierung und -kultivierung**

Die verwendeten humanen Gelenkchondrozyten stammten von Spendern, denen im Zuge einer Endoprothese der Hüftkopf entfernt wurde. Die erforderlichen Genehmigungen der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Nutzung des Patientenknorpels lag vor (EA4/063/06). Primäre Rattenchondrozyten für die Aufnahmeversuche wurden von in anderen Tierversuchen euthanasierten Ratten gewonnen (Tötungsanzeige: T0224/08). Die Chondrozyten wurden enzymatisch durch den Verdau mittels Pronase (2%) und Kollagenase (0,1%) aus der Knorpelmatrix gelöst. Für die Herstellung von Hydrogelkulturen wurden zwischen 100.000 und 500.000 Zellen in 100 µL Hydrogel verbracht.

### **Vitalitäts-Assays**

Zur optischen und quantitativen Erfassung des Einflusses der Nanopartikel auf die Knorpelzellen wurden Lebend-Tod-Färbungen und ein Alamar Blue® Test durchgeführt. Bei der Lebend-Tod-Färbung wurden mehrere Segmente einzelner Gelkonstrukte, in die Chondrozyten eingebettet wurden, mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt. Vitale Zellen werden durch FDA grün gefärbt, während EtBr durch Interkalation in die DNA tote Zellen rot färbt. Die Darstellung erfolgte anschließend im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) und die quantitative Analyse mittels ImageJ Software. Der anfängliche Zytotoxizitätstest wurde mit Alamar Blue® vorgenommen, in welchem stoffwechselaktive Zellen Resazurin zu Resorufin

reduzieren. Mittels Plattenphotometer (Tecan, CH) lässt sich dieser colorimetrische Assay als Farbumschlag von blau nach pink darstellen.

### **Aufnahme in Zellen**

Um beurteilen zu können, ob die dPGS-Nanopartikel überhaupt von den Zellen aufgenommen werden, wurden Nanopartikel verwendet, welche Indocarbocyanin (ICC, Cy3) gekoppelt waren. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde das Aktin-Zytoskelett der Zellen mit Phalloidin-FITC (Santa Cruz Biotech, USA) und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die anschließende Bewertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop und LSM für mehrere Zeitpunkte.

### **Immunhistologische Färbungen**

Zur Darstellung des Knorpelmarkerproteins Kollagen Typ II wurde dieses immunmarkiert. Hierfür wurden kultivierte und besiedelte Gelstücke nach 7 Tagen mit dem Primär- (Kaninchen, anti-Kollagen Typ II, Acris Antibodies GmbH, DE) und dem Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-Alexa488, Acris Antibodies GmbH) inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte anschließend an einem LSM.

### **Quantitative Analysen**

Um den Gesamtkollagengehalt in den Hydrogelen festzustellen wurde ein Hydroxyprolin-Assay verwendet [16]. Da die Gele nicht degradierbar waren, wurden sie über Nacht bei 100°C in 6 M HCl hydrolysiert. Nach der weiteren Prozessierung der Gele wurde die Absorption gemessen, wobei L-Hydroxyprolin als Standard diente. Anschließend wurde der Kollagengehalt mit dem Umrechnungsfaktor 7,1 berechnet [17].

### **RTD-PCR**

Zur Charakterisierung des Einflusses der dPGS Nanopartikel ( $c = 10^{-6}$  mol/L) auf kultivierte Chondrozyten wurde die Genexpression von Knorpelmarkerproteinen wie Kollagen Typ I, II, und Aggrekan, diversen Zytokinen wie Interleukin-1 $\beta$ , -6, -10, TNF $\alpha$  sowie auch am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligten Proteasen wie MMP-1 untersucht. Die PCR-Experimente erfolgten nach Herstellerangaben (Qiagen, DE und Applied Bioscience, USA) unter Verwendung der semi-quantitativen RTD-PCR. Als Housekeeping-Gen diente  $\beta$ -Aktin [18]. Hierbei wurde die Gesamt-RNA der Zellen mittels RNeasy Mini Kit 250 isoliert (Qiagen, DE) und dann die Konzentration am Spektralphotometer (NanoDrop 1000, Peqlab, DE) gemessen. Zur Umschreibung von RNA in cDNA wurde das QuantiTect Reverse Transkription Kit<sup>®</sup> (Qiagen, DE) benutzt. Die abschließende RTD-PCR wurde mit dem Quantitec Probe PCR Kit



(Qiagen, DE) und dem TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Kit (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Als Thermocycler kam der Opticon 1 - Real-Time Cycler (Opticon<sup>™</sup> RTD-PCR, BioRad, DE) zum Einsatz. Die anschließende Auswertung der Daten erfolgte nach Pfaffl [19].

### **Rattenmodell**

Ein entsprochener Tierantrag (Registrierungsnummer: G0159/11 und T0224/08) liegt dem Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) vor. Die Gonarthrose wurde chirurgisch im rechten Knie von 12 adulten, männlichen Wistar-Ratten induziert. Hierfür wurde das mediale Kollateralband durchtrennt, ein Teil (1-2 mm) entfernt und ein Teil des medialen Meniskus (1-2 mm) entfernt [20, 21]. Die linken Kniegelenke der Tiere wurden nicht operiert und dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Tiere für 6 Wochen beobachtet und dabei je 6 Tiere entweder für 2 Wochen vor Finalisierung mit dPGS (30 mg/kg, *s.c.*) oder einem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung (*s.c.*) behandelt. Zur Verstärkung des Effektes wurden die Tiere 1 Woche nach Arthroseinduktion auf einem speziellen Laufband (5x/Woche für 10 min) trainiert. Weiterhin erfolgten Ganganalysen. Hierfür wurden die Hinterpfoten der Tiere mit Farbe bestrichen und sie anschließend animiert über ein weißes Papier zu laufen, um Schrittweite und -breite zu messen (Footprinting). Die Untersuchungen erfolgten zu drei Zeitpunkten: Vor Arthroseinduktion, vor Behandlungsbeginn und vor der Finalisierung. Nach 8 Wochen wurden beide Kniegelenke sowie zum Nachweis von Akkumulation und potentiellen toxischen Effekten von dPGS auch Leber, Niere und Milz explantiert.

### **Histologie**

Die Gelenke und Organe wurden histologisch aufgearbeitet. Die Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung wurde zur generellen Beurteilung der Gewebe verwendet, während die Safranin-O-Färbung zur detaillierten Darstellung der Verteilung der Proteoglykane diente. Die folgende Evaluation des Gelenkknorpels erfolgte mittels Arthrosescore nach Mankin *et al.* [22]. Desweiteren wurde eine Bewertung des Knorpels nach dem an Nagerknorpel angepassten Glasson Score vorgenommen [23]. Zusätzlich wurde die Synovialis der Testtiere mit dem Score von Krenn *et al.* [24] in Bezug auf das Vorhandensein einer Synovitis bewertet.

## **Statistik**

Die Ergebnisse aller Untersuchungen wurden mittels statistischer Software (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc, USA und SPSS, IBM, USA) auf Signifikanzen hin geprüft. Alle Daten sind als Mittelwerte bzw. Medianwerte mit Standardabweichung angegeben. Als statistische Test wurden je nach Daten die One-way ANOVA (*post hoc* Tukey Test), Mann-Whitney-U-Test oder der Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) verwendet. Als Konfidenzintervall wurde  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## **ERGEBNISSE**

### **Zytotoxizität und Aufnahme verschiedener dendritischer Polyglycerole in Chondrozyten**

Die Untersuchungen zeigten, dass die dPGS Behandlung von humanen Chondrozyten keine zytotoxischen Effekte auf die Zellen hatte. Diese Beobachtung war unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen. Konzentrationen von  $10^{-6}$  und  $10^{-8}$  mol/L führten zu einer nicht-signifikanten Erhöhung der Stoffwechselaktivität der Zellen.

Eine Konzentration von  $10^{-6}$  mol/L reichte aus um die Aufnahme der Nanopartikel in den Zellen nach 2 h zu visualisieren. Die primäre Lokalisation der dPGS-Partikel in den Zellen war kernnah, ein Eindringen in den Kern konnte nicht festgestellt werden. Zellen, die lediglich mit der nicht-funktionalisierten Glycerol-ICC Kontrolle behandelt wurden, ließen kein fluoreszierendes Glycerol in ihrem Inneren erkennen. Zusätzlich zu humanen Chondrozyten wurde die Aufnahme der Nanopartikel noch in anderen Zellen wie humanen Synovialfibroblasten, porcinen Knorpelzellen, Rattenknorpelzellen und Mäusefibroblasten überprüft. Alle getesteten Zellen zeigten das gleiche Aufnahmeverhalten. Weiterhin wurde festgestellt, dass nach 72 h die Fluoreszenzintensität wieder abnahm, was ein Ausschleusen der Nanopartikel nahelegt. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Nanopartikel die Knorpelmatrix penetrierten. 4 mm dicke Knorpelchips konnten von dPGS-ICC Partikeln bis zu einer Tiefe von 50  $\mu$ m durchdrungen werden. Wie in den Zellversuchen konnte eine Abschwächung der Fluoreszenzintensität nach 72 h festgestellt werden. Allerdings ließen sich auch noch nach 7 d Spuren des dPGS-ICC in den Knorpelchips finden.

Die Testung der drei verschiedenen Hydrogelkonfigurationen, welche verschiedene Anteile an dPGS enthielten, ließ keine Zytotoxizität erkennen. Obwohl alle Gele zu einer signifikant niedrigeren metabolischen Aktivität der Chondrozyten gegenüber der Monolayerkontrolle führten, war die Differenz zu der SDS-Negativkontrolle um ein Vielfaches höher. Weiterhin wurde ein Leben-Tod-Assay über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt um den Einfluss, den eine längere Exposition der Zellen bei Einbettung in ein Gel hat, zu überprüfen. Für alle getesteten Substanzen, die drei Gelkonfigurationen, sowie das Alginat als Kontrolle konnte nachgewiesen werden, dass über den Verlauf des Experiments die Vitalität der Zellen abnimmt. Für die Alginatkontrolle, sowie Gel 1, welches kein dPGS enthielt, war diese Verringerung signifikant. Im Gegensatz dazu war bei den Gelen mit steigendem dPGS-Gehalt auch eine jedoch nicht signifikant höhere Vitalität über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Bemerkenswert ist, dass eine homogene Verteilung der Zellen in den polymerisierten Gelen erreicht werden

konnte. Es fanden sich Zellen sowohl im oberen, im mittleren, sowie auch im basalen Bereich der Gelmatrix.

Die Untersuchung anders funktionalisierter dPG-Anionen (bspw. dPG, -sulfonate, -phosphonate, -bisphosphonate) ergab, dass bei relativ geringen Konzentrationen von  $10^{-5}$  mol/L keine der zu testenden Substanzen einen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte. Bei einer erhöhten Konzentration von  $10^{-3}$  mol/L war eine Suppression der metabolischen Zell-Aktivität für die dPG zu sehen, die mit Carboxylaten, Phosphonaten und Bisphosphonaten funktionalisiert waren. Alle getesteten Substanzen, außer das nicht funktionalisierte dPG, wurden von Fibroblasten aufgenommen. Den deutlichsten Effekt zeigte hierbei das mit Phosphonat funktionalisierte dPG.

### **Einfluss von dPGS auf das Expressionsverhalten humaner Chondrozyten in der Monolayer-Kultur**

Der Einfluss von dPGS auf die Genexpression verschiedener Knorpelmarkerproteine und am Entzündungsprozess beteiligter Zytokine und Proteasen wurde nicht nur nach 24 h Inkubation untersucht, sondern auch nach 24 h nach erfolgter 24 stündiger Vor-Inkubation der Zellen mit dPGS um mögliche verzögerte Effekte aufzuzeigen. Wie erwartet, führte die Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression des Knorpelmarkerproteins Kollagen Typ II und zu einer Selbstinduktion der  $\text{TNF}\alpha$  Genexpression. Zu bemerken ist, dass die Ko-Stimulation von dPGS in Kombination mit  $\text{TNF}\alpha$  sich ebenso in einer signifikanten Verringerung der Kollagen Typ II Genexpression niederschlug. Weiterhin führte die längere Inkubation mit dPGS allein auch zu einer Verringerung der Kollagen Typ II und Aggrecan Genexpression. MMP-1 ließ keine Veränderung der Genexpression nach dPGS-Stimulation erkennen. Bemerkenswert ist, dass dPGS die Selbstinduktion von  $\text{TNF}\alpha$  teilweise zu unterbinden scheint, ein Effekt, der sich durch Vor-Inkubation mit dPGS sogar noch verstärkte und die  $\text{TNF}\alpha$  Genexpression signifikant unter das Kontrollniveau sinken ließ. Die nach  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation beobachtete Genexpression des inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  blieb unbeeinflusst durch die dPGS-Stimulation.

Die supprimierenden Effekte von dPGS auf die Kollagen Typ II Expression ließen sich auf Proteinebene nicht bestätigen. Die Analysen anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und des angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF bestätigten die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen, wonach  $\text{TNF}\alpha$  zu einer Induktion führte, dPGS jedoch keinen regulierenden Effekt hatte. Die Konzentration des anti-inflammatorisch wirkenden IL-10 war im

Medium behandelte Zellen höher nach dPGS Stimulation als in der Kontrolle und mit TNF $\alpha$  behandelte Proben.

### **Einfluss von dPGS auf das Expressionsverhalten humaner Chondrozyten in dPGS-basierten Hydrogelen**

Es ist bekannt dass 3D-Kulturmodelle einen positiven Einfluss auf den Erhalt des differenzierten Phänotyps von Chondrozyten *in vitro* haben. Im Vergleich zur Monolayerkontrolle bewirkten alle Hydrogelkonfigurationen eine verringerte Expression von Kollagen Typ I in den Chondrozyten. Des Weiteren führten auch die Hydrogele mit höherem dPGS-Gehalt zu einer Erniedrigung der Kollagen Typ I Expression gegenüber dem reinen PEG-Gel. Die Kollagen Typ I Genexpression in dem nicht sulfatierten PEG-Gel war signifikant höher als in dem Gel mit dem höchsten dPGS Anteil. Ebenso wurde evident, dass alle Gelkonfigurationen im Vergleich zur Monolayerkontrolle eine höhere (jedoch nicht signifikant) Expression des Knorpelmarkerproteins Kollagen Typ II zeigten. Die Gele führen offenbar zu einer Verschiebung im Verhältnis des unspezifischen Matrixproteins Kollagen Typ I gegenüber dem Knorpelmarker Kollagen Typ II, die den differenzierten Knorpelphänotyp begünstigen könnte. Die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung zeigten, dass Zellen in allen Gelen Kollagen Typ II synthetisierten, wobei das gebildete Protein hier vor allem zellnah abgelagert wurde.

### **Protektiver Einfluss dendritischer Polyglycerolsulfate auf den Knorpel im Rattenmodell**

Der Einfluss der Nanopartikel auf die Arthrosepathogenese wurde im *in vivo* Rattenmodell untersucht. Das Gewicht aller Untersuchungstiere entwickelte sich unabhängig von Arthroseinduktion und 2 wöchigen dPGS-Gabe in einem normalen Rahmen. Bei den Tieren konnten zwar nach chirurgischer Arthroseinduktion keine klinischen Erkrankungszeichen wie eine zurückgehende Aktivität, Gelenksschmerzen oder anderweitige Veränderungen wie Entlastungsbewegungen methodisch erfasst werden, alle Tiere zeigten aber histologisch Arthrose-assoziierte Knorpelveränderungen. Obwohl in den histologischen Untersuchungen teilweise schwerwiegende arthrotische Gelenkdestruktionen gefunden wurden, führte dies zu keinen Veränderungen von Parametern wie Schrittweite oder Schrittbreite bei den Versuchstieren. Ebenso blieben die Gelenkflächen direkt nach der Explantation makroskopisch unauffällig. In den histologischen Färbungen zeigten die nicht operierten Gelenke (Kontrollen), weder in dPGS-behandelten noch in den unbehandelten Tieren arthrotische Veränderungen. Die Knorpeloberfläche wies nahezu keine krankhaften Veränderungen wie eine übermäßige

Fibrillierung auf. Die Analyse der Färbungen ergab eine homogene Zellverteilung in der Knorpelmatrix sowie eine intakte Tidemark. Färbungen zur Darstellung der Proteoglykane visualisierten die von gesundem Knorpel zu erwartende Intensität. Die operierten Gelenke der unbehandelten Tiere zeigten deutlich differierende Ergebnisse. Die Tidemark war nicht länger zu detektieren, zudem war in weiten Bereichen der medialen Gelenkflächen die Knorpelmatrix nahezu komplett zerstört und zeigte Fissuren bis in die kalzifizierte Zone. Es konnten große hypozelluläre Bereiche, sowie Chondrozytencluster und in einigen Fällen subchondrale Zysten gefunden werden. Histologische Proteoglykan-Färbungen visualisierten den fast kompletten Proteoglykan-Verlust durch eine extrem schwächere oder gar keine Färbung mehr in den betroffenen Gelenkknorpelbereichen. Im Gegensatz dazu beschränkten sich angegriffene Knorpelareale in dPGS-behandelten Tieren zumeist auf die oberen Knorpelschichten und nur wenige Fälle zeigten tiefergehende Verletzungen der Knorpelmatrix. Dieses Ergebnis bestätigt sich in der Intensität der Proteoglykanfärbung und dem histologischen Gesamtbild der Gelenke, welche überwiegend den Normerwartungen entsprachen.

Bei der Betrachtung der histologischen Scores nach 8 Wochen zeigten sich erwartungsgemäß hochsignifikante Unterschiede zwischen operierten und nicht-operierten Knien aller Tiere. Der Unterschied nicht-operierter Knie zwischen behandelten und unbehandelten Ratten war nicht signifikant. Beide verwendeten Score-Systeme zeigten einen geringeren Score bei behandelten gegenüber unbehandelten Tieren und obwohl dieser nicht-signifikant war ( $p=0.051$ ) legen die Gesamtergebnisse nahe, dass die Arthrose bei behandelten Tieren weniger schwerwiegend ist als bei unbehandelten. Die Untersuchung der Synovialmembran der Gelenkkapsel ergab zwar ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen operierten und nicht-operierten Gelenk allerdings keinen in Abhängigkeit einer Behandlung.

Zur Beurteilung einer möglichen Akkumulation von Nanopartikeln in Organen wurden Färbungen der Leber, der Milz und der Niere der Tiere durchgeführt. Bis auf wenige positive Zellen in Leber und Milz (Makrophagen) nicht aber in den Parenchymzellen, konnten keine Akkumulationen von Nanopartikeln in den untersuchten Organen gefunden werden.

## **DISKUSSION**

Das Verständnis der Arthrosepathogenese ist vor allem auf zellulärer Ebene immer noch unzureichend und daher gibt es bislang keine Therapie, die das Fortschreiten einer Arthrose aufhalten kann. Das in diesem Bereich noch relativ unerforschte nanopartikuläre dPGS könnte einen interessanten Ansatz, in die inflammatorischen Prozesse in diesem Gebiet einzugreifen, darstellen. Das dPGS führte nicht zu einer Verringerung der metabolischen Aktivität der Zellen, sondern steigerte im Gegensatz dazu die metabolische Aktivität sogar. Die rasche Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen, die nur wenige Stunden benötigte, lässt einen aktiven Carrier-vermittelten Prozess vermuten. Ebenso bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Zellen auch in der Lage sind einmal aufgenommene dPGS-Partikel wieder abzugeben, eine wünschenswerte Beobachtung, da eine Anreicherung der Nanopartikel in den Zellen das Risiko späterer toxischer Effekte bergen würde. Untersuchungen mit murinen Fibroblasten und in früheren Versuchen, Schweineknorpelzellen, zeigen, dass der Prozess auch speziesunabhängig zu sein scheint. Da die Färbung der Zellen vor allem perinukleär zu finden ist, liegt es nahe zu vermuten, dass die Nanopartikel in Vesikeln durch das Zytoplasma transportiert werden. Hier sind noch weitere Untersuchungen nötig um den genauen Prozess der Aufnahme, intrazelluläre Funktionsweise und Ausschleusen der dPGS-Partikel genauer zu verstehen. Im Vergleich zu anderen dendritischen Polyanionen zeigte sich, dass sich bei relativ niedrigen Konzentrationen die anderen dendritischen Anionen ebenso wie dPGS nicht suppressiv auf die Vitalität von Zellen auswirkten. Dies ist insbesondere bei dPGBP bemerkenswert, da Bisphosphonate üblicherweise bereits in sehr geringen Konzentrationen zytotoxisch wirken [25, 26]. Ebenso wie dPGS werden alle anderen Polyanionen außer, erwartungsgemäß, unfunktionalisiertes dPG [27] von den Zellen aufgenommen. Die extrem starke Färbung von dPG-Phosphat in den Zellen lässt vermuten, dass auch eine Aufnahme in den Zellkern erfolgt. Um dies zu bestätigen, müssen allerdings noch weitere Untersuchungen folgen. Die Stimulation der Chondrozyten mit dPGS, TNF $\alpha$  oder einer Kombination der beiden Stoffe zur Analyse verschiedener Schlüsselproteine im Knorpel und in der Arthrosepathogenese zeigte, dass dPGS selbst keinen Einfluss auf die Genexpression verschiedener wichtiger Knorpelmatrixproteine wie Kollagen Typ II oder Aggrekan, nach 24 h hat. In Kombination mit TNF $\alpha$  konnte dPGS zumindest teilweise den selbstinduzierenden Effekt von TNF $\alpha$  entgegenwirken. Die Beobachtung, dass die Konzentration des anti-inflammatorischen, chondroprotektiv wirkenden [28, 29] Interleukin-10 in mit dPGS behandelten Knorpelzellkulturen höher war als in unbehandelten ist ebenso interessant, da IL-10 die TNF $\alpha$  Produktion in entzündeter Gewebe senken kann [30]. Insgesamt lässt sich sagen, dass

dPGS, durch die Beeinflussung sowohl pro-inflammatorischer (TNF $\alpha$ ) als auch anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10) in der Lage sein könnte, entzündliche Abläufe in therapeutischen oder protektiven Sinne zu beeinflussen.

Die Analyse verschiedener Hydrogelkonstrukte mit und ohne dPGS ergab, dass ein Großteil der Zellen nach 24 h noch vital war. Die Anzahl metabolisch aktiver Zellen verringerte sich jedoch in den folgenden Untersuchungszeitpunkten. Dieser Umstand könnte auch auf das Alter der Chondrozytenspender (50-87 Jahre) zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu anderen Studien, die vor allem von jungen und gesunden Tieren gewonnene Chondrozyten in Hydrogelen untersuchten [31, 32], wurden in unserer Studie direkt von Arthrosepatienten gewonnene Knorpelzellen verwendet, da es bekannt ist, dass Zellen speziesspezifisch auf Stimulationen reagieren [33]. Die Beobachtung, dass mit zunehmender Zeit die Vitalität der Zellen in Alginateinbettung abnimmt, befindet sich in Übereinstimmung mit anderen Studien [34]. Bemerkenswert ist, dass die Hydrogele mit dem höchsten dPGS-Gehalt in unserer Studie über den Zeitraum von 21 Tagen höhere Vitalitätswerte im Vergleich zu Alginat und Gelen ohne dPGS aufgezeigt haben. Die schnelle Polymerisation der Hydrogele erlaubt es den Zellen ihre abgerundete native Form beizubehalten und ermöglicht eine gleichmäßige Verteilung der Zellen. Diese Eigenschaften könnten die Synthesekapazität positiv beeinflussen [35, 36]. Die mittels Hydroxyprolin-Assay gemessene Kollagenproduktion zeigt, dass die Zellen in allen Gelen noch in der Lage sind Kollagen zu produzieren. Es konnte kein Unterschied zwischen dem Gel ohne und denen mit dPGS Anteil gezeigt werden. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Gele keinen direkten Einfluss auf die Genexpression haben. Allerdings zeigt die angeschlossene RTD-PCR der Kollagen Typ I und Typ II Genexpression, dass mit steigendem dPGS-Gehalt die Kollagen Typ I Genexpression sinkt. Dies ist wünschenswert, da Kollagen Typ I als Dedifferenzierungsmarker für neu gebildeten Knorpel gilt. Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Gele im nächsten Schritt in einen degradierbaren Zustand gebracht werden müssen, damit im gleichen Maße wie sich die Hydrogelmatrix abbaut eine von den Chondrozyten gebildete Matrix aufbauen kann.

Zur Untersuchung des Einflusses von dPGS auf die Gonarthrose im Rattenknie wurde ein bereits etabliertes chirurgisches Versuchsmodell gewählt [37, 38]. Die chirurgische Induktion der Arthrose in den rechten Knien der Versuchstiere war erfolgreich wie durch den Vergleich der operierten und nicht-operierten Knie mittels Glasson und Mankin Score gezeigt werden konnte. Der Vergleich der histopathologischen Score-Werte der rechten Knie von behandelten und unbehandelten Tieren ergab einen erkennbaren, jedoch nicht signifikanten Unterschied. Die Tatsache, dass auch in den nicht-operierten linken Knien, Tiere, die mit dPGS behandelt wurden,



einen niedrigen Mankin-Score aufwiesen als nicht behandelte Tiere, bekräftigt die Vermutungen, dass dPGS chondroprotektive Eigenschaften haben kann. Diese müssen allerdings noch weiter untersucht werden. Andere Studien haben gezeigt, dass dPGS einen suppressiven Effekt auf die NF- $\kappa$ B and AP-1 Aktivierung ausübt, welches beides Transkriptionsfaktoren sind, die eine Rolle in der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen haben [39, 40]. Die Vermutung, dass dPGS eher einen protektiven als einen therapeutischen Effekt zu haben scheint, legt nahe, dass in zukünftigen Studien möglicherweise die Behandlungszeiträume angepasst werden sollten und da wir trotz schwerer pathologischer Veränderungen (auf histologischer Ebene) keine klinischen Zeichen für eine Arthrose bei den Tieren feststellen konnten, sollten alternative und sensitivere klinische Evaluierungsmethoden für nachfolgende Versuche identifiziert und angewendet werden.

Die Gesamtheit der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bekräftigt die Einsatzmöglichkeiten von dPGS und Nanopartikeln im Allgemeinen im medizinischen Kontext. Besonders die anti-inflammatorischen Eigenschaften von dPGS sollten weiter untersucht werden und nach den vielversprechenden Ergebnissen, *in vitro* und in der Rattenstudie im Großtiermodell fortgesetzt werden, möglicherweise auch in Kombination mit dPGS-basierten PEG-Hydrogelen.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Albrecht D, Weise K. *Therapie von Gelenkknorpelschäden*. Chirurg. 2008;79(10):989-1000.
2. Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K. *Stellenwert und Technik der Autologen Chondrozyten-Transplantation*. Zentralbl Chir. 2005;130(04):327-32.
3. Hildebrand F, Pape H-C, Krettek C. *Die Bedeutung der Zytokine in der posttraumatischen Entzündungsreaktion*. Der Unfallchirurg. 2005;108(10):793-803.
4. Goldring MB. *The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models*. Connect Tissue Res. 1999;40(1):1-11.
5. Lockman P, Mumper R, Khan M, Allen D. *Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier*. Drug development and industrial pharmacy. 2002;28(1):1-13.
6. Fernandes C, Oliveira C, Benfeito S, Soares P, Garrido J, Borges F. *Nanotechnology and antioxidant therapy: an emerging approach for neurodegenerative diseases*. Current medicinal chemistry. 2014;21(38):4311-27.
7. Gajbhiye V, Kumar PV, Sharma A, Agarwal A, Asthana A, Jain N. *Dendrimeric nanoarchitectures mediated transdermal and oral delivery of bioactives*. Indian journal of pharmaceutical sciences. 2008;70(4):431.
8. Agarwal R, Volkmer TM, Wang P, Lee LA, Wang Q, García AJ. *Synthesis of self-assembled IL-1Ra-presenting nanoparticles for the treatment of osteoarthritis*. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2015.
9. Bhatia S, Haag R. *Dendritic polymers in targeted drug delivery*. Targeted Drug Delivery: Concepts and design: Springer; 2015. p. 543-69.
10. Dervedde J, Rausch A, Weinhart M, Enders S, Tauber R, Licha K, et al. *Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(46):19679-84.
11. Haag R, Dervedde J, Tauber R, Bernhard G, Enders S, Weinhart H, et al. *Dentric polyglycerol sulfates and sulfonates and their use for inflammatory diseases*. Google Patents; 2007.
12. Reimann S, Gröger D, Kühne C, Riese SB, Dervedde J, Haag R. *Shell Cleavable Dendritic Polyglycerol Sulfates Show High Anti-Inflammatory Properties by Inhibiting L-Selectin Binding and Complement Activation*. Advanced healthcare materials. 2015;4(14):2154-62.
13. Hunziker E. *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. Osteoarthritis and cartilage. 2002;10(6):432-63.

14. Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. *Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. 2009;17(6):561-77.
15. Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, et al. *Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99(15):9996-10001.
16. Stegemann H, Stalder K. *Determination of hydroxyproline*. Clin Chim Acta. 1967;18(2):267-73.
17. Homicz MR, McGowan KB, Lottman LM, Beh G, Sah RL, Watson D. *A compositional analysis of human nasal septal cartilage*. Arch Facial Plast Surg. 2003;5(1):53-8.
18. McCulloch RS, Ashwell MS, O'Nan AT, Mente PL. *Identification of stable normalization genes for quantitative real-time PCR in porcine articular cartilage*. J Anim Sci Biotechnol. 2012;3(1):36.
19. Pfaffl MW. *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum. 2004;1(04):92-5.
20. Iijima H, Aoyama T, Ito A, Tajino J, Nagai M, Zhang X, et al. *Destabilization of the medial meniscus leads to subchondral bone defects and site-specific cartilage degeneration in an experimental rat model*. Osteoarthritis Cartilage. 2014;22(7):1036-43.
21. Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, Osborn MN, Sanchez BM, Guzman RE, et al. *Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia*. Osteoarthritis Cartilage. 2006;14(10):1041-8.
22. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data*. J Bone Joint Surg Am. 1971;53(3):523-37.
23. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB. *The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse*. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18 Suppl 3:S17-23.
24. Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B, et al. *Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis*. Histopathology. 2006;49(4):358-64.
25. Walter C, Klein M, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. *Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells*. Clinical oral investigations. 2010;14(1):35-41.
26. Tanaka Y, Nagai Y, Dohdoh M, Oizumi T, Ohki A, Kuroishi T, et al. *In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells*. Archives of oral biology. 2013;58(6):628-37.

27. Reichert S, Welker P, Calderón M, Khandare J, Mangoldt D, Licha K, et al. *Size-Dependant Cellular Uptake of Dendritic Polyglycerol*. *Small*. 2011;7(6):820-9.
28. John T, Müller R, Oberholzer A, Zreiqat H, Kohl B, Ertel W, et al. *Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF- $\alpha$  in human articular chondrocytes in vitro*. *Cytokine*. 2007;40(3):226-34.
29. Müller R, John T, Kohl B, Oberholzer A, Gust T, Hostmann A, et al. *IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF- $\alpha$  in human articular chondrocytes in vitro*. *Cytokine*. 2008;44(3):377-85.
30. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P. *The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology*. *Biorheology*. 2002;39(2):237-46.
31. Kim M, Hong B, Lee J, Kim SE, Kang SS, Kim YH, et al. *Composite system of PLCL scaffold and heparin-based hydrogel for regeneration of partial-thickness cartilage defects*. *Biomacromolecules*. 2012;13(8):2287-98.
32. Jin R, Teixeira LSM, Dijkstra PJ, van Blitterswijk CA, Karperien M, Feijen J. *Chondrogenesis in injectable enzymatically crosslinked heparin/dextran hydrogels*. *Journal of Controlled Release*. 2011;152(1):186-95.
33. Roberts JJ, Nicodemus GD, Greenwald EC, Bryant SJ. *Degradation improves tissue formation in (un) loaded chondrocyte-laden hydrogels*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2011;469(10):2725-34.
34. Kim M, Shin Y, Hong B-H, Kim Y-J, Chun J-S, Tae G, et al. *In vitro chondrocyte culture in a heparin-based hydrogel for cartilage regeneration*. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2009;16(1):1-10.
35. Glowacki J, Trepman E, Folkman J. *Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes*. *Experimental Biology and Medicine*. 1983;172(1):93-8.
36. Brodtkin K, Garcia A, Levenston M. *Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers*. *Biomaterials*. 2004;25(28):5929-38.
37. Appleton CTG, McErlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL, et al. *Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis*. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(1):R13.
38. Elsaid K, Zhang L, Waller K, Tofte J, Teeple E, Fleming B, et al. *The impact of forced joint exercise on lubricin biosynthesis from articular cartilage following ACL transection and intra-articular lubricin's effect in exercised joints following ACL transection*. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012;20(8):940-8.
39. Tak PP, Firestein GS. *NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases*. *Journal of clinical investigation*. 2001;107(1):7.
40. Han Z, Boyle D, Manning A, Firestein G. *AP-1 and NF- $\kappa$ B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis*. *Autoimmunity*. 1998;28(4):197-208.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG UND ANTEILSERKLÄRUNG

„Ich, Tobias Schneider, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Effekte von dendritischen Polyglycerolsulfaten (dPGS) auf den Gelenkknorpel bei Arthrose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## **Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen**

Der Promovend Tobias Schneider hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

### Publikation 1:

Gröger D, Kerschnitzki M, Weinhart M, **Schneider T**, Kohl B, Wagermaier W, Schulze-Tanzil G, Fratzl P, Haag R. Selectivity in Bone Targeting with Different Polyanionic Dendritic Dye Conjugates. *Advanced Healthcare Materials*. 2014. 3: 375–385. doi: 10.1002/adhm.201300205

Anteil: 20%

Beitrag im Einzelnen: Kultivierung der L929 Mäusefibroblasten, Planung und Durchführung der angewendeten Methoden (Zytotoxizitätsuntersuchungen, Immunzytochemische Färbungen), statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse, Mitarbeit am Manuskript und Revision

### Publikation 2:

**Schneider T**, Welker P, Haag R, Dervedde J, Hug T, Licha K, Kohl B, Arens S, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Effects of Dendritic Polyglycerol Sulfate on Articular Chondrocytes. *Inflamm Res*. 2015 Nov;64(11):917-28. doi: 10.1007/s00011-015-0875-0. Epub ahead of print

Anteil: 60%

Beitrag im Einzelnen: Isolierung und Kultivierung der Chondrozyten, Planung und Durchführung aller angewendeten Methoden (Zytotoxizitätsuntersuchungen, Immunzytochemische Färbungen, RNA-Isolation, RTD-PCR, FACS, Kryotomie) statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse, überwiegende Mitarbeit am Manuskript und Revision

Publikation 3:

Dey P, **Schneider T**, Chiappisi L, Gradzielski M, Schulze-Tanzil G, Haag R. Mimicking of Chondrocyte Microenvironment Using *in situ* Forming Dendritic Polyglycerol Sulfate Based Synthetic Polyanionic Hydrogels. 2015. Macromol. Biosci. Accepted

Anteil: 40%

Beitrag im Einzelnen: geteilte Erstautorenschaft, Isolierung und Kultivierung der Chondrozyten, Planung und Durchführung der angewendeten zellbiologischen Methoden

(Zytotoxizitätsuntersuchungen, Immunzytochemische Färbungen, RNA-Isolation, RTD-PCR, Hydroxyprolin-Assay), statistische und graphische Auswertung der Ergebnisse, Mitarbeit am Manuskript und Revision

Unterschrift, Datum und Stempel  
der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

---

Prof. Dr. med.-vet. Gundula Schulze-Tanzil  
(Doktormutter)

---

Tobias Schneider, MSc  
(Doktorand)

## AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN

Gröger D, Kerschitzki M, Weinhart M, **Schneider T**, Kohl B, Wagermaier W, Schulze-Tanzil G, Fratzl P, Haag R.

*Selectivity in Bone Targeting with Different Polyanionic Dendritic Dye Conjugates.*

*Advanced Healthcare Materials.* 2014. 3: 375–385. doi: 10.1002/adhm.201300205

Impact Factor: 5.797

**Schneider T**, Welker P, Haag R, Dervedde J, Hug T, Licha K, Kohl B, Arens S, Ertel W, Schulze-Tanzil G.

*Effects of dendritic polyglycerol sulfate on articular chondrocytes.*

*Inflamm Res.* 2015 Nov;64(11):917-28. doi: 10.1007/s00011-015-0875-0; im Druck

Impact Factor: 2.347

Dey P\*, **Schneider T\***, Chiappisi L, Gradzielski M, Schulze-Tanzil G, Haag R.

*Mimicking of Chondrocyte Microenvironment Using in situ Forming Dendritic Polyglycerol Sulfate Based Synthetic Polyanionic Hydrogels.*

*Macromolecular Bioscience* 2015; Accepted, shared first authorship

Impact Factor: 3.650



## **Selectivity in Bone Targeting with Multivalent Dendritic Polyanion Dye Conjugates**

### *Selectivity in Bone Targeting with Different Polyanionic Dendritic Dye Conjugates.*

Gröger D, Kerschitzki M, Weinhart M, **Schneider T**, Kohl B, Wagermaier W, Schulze-Tanzil G, Fratzl P, Haag R.

*Advanced Healthcare Materials*. 2014. 3: 375–385.

<http://dx.doi.org/10.1002/adhm.201300205>

## **Effects of Dendritic Polyglycerol Sulfate on Articular Chondrocytes**

*Effects of dendritic polyglycerol sulfate on articular chondrocytes.*

**Schneider T**, Welker P, Haag R, Dervede J, Hug T, Licha K, Kohl B, Arens S, Ertel W, Schulze-Tanzil G.

*Inflamm Res. 2015 Nov;64(11):917-28.*

<http://dx.doi.org/10.1007/s00011-015-0875-0>

**Mimicking of Chondrocyte Microenvironment Using *in situ* Forming Dendritic Polyglycerol Sulfate Based Synthetic Polyanionic Hydrogels**

*Mimicking of Chondrocyte Microenvironment Using in situ Forming Dendritic Polyglycerol Sulfate Based Synthetic Polyanionic Hydrogels.*

Dey P\*, **Schneider T\***, Chiappisi L, Gradzielski M, Schulze-Tanzil G, Haag R.

*Macromol Biosci.* 2016 Apr;16(4):580-90. *shared first authorship*

<http://dx.doi.org/10.1002/mabi.201500377>

## **LEBENS LAUF**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**



## PUBLIKATIONSLISTE

### Publikationen

1. **Schneider T**, Kohl B, Sauter T, Becker T, Kratz K, Schossig M, Hiebl B, Jung F, Lendlein A, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Viability, adhesion and differentiated phenotype of articular chondrocytes on degradable polymers and electro-spun structures thereof. *Macromolecular Symposia*. Volume 309-310, Issue 1, pages 28–39 12/2011
2. **Schneider T**, Kohl B, Sauter T, Kratz K, Jung F, Lendlein A, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Interaction of Chondrocytes with Electrospun Polymer Scaffolds depending on fiber orientation. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012;52(2-4):325-36
3. Gröger D, Kerschnitzki M, Weinhart M, **Schneider T**, Kohl B, Wagermaier W, Schulze-Tanzil G, Fratzl P, Haag R. Selectivity in Bone Targeting with Different Polyanionic Dendritic Dye Conjugates. *Advanced Healthcare Materials*. 2014. 3: 375–385. doi: 10.1002/adhm.201300205
4. **Schneider T**, Welker P, Haag R, Dervede J, Hug T, Licha K, Kohl B, Arens S, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Effects of dendritic polyglycerol sulfate on articular chondrocytes. *Inflamm Res*. 2015 Nov;64(11):917-28. doi: 10.1007/s00011-015-0875-0. Epub ahead of print
5. Dey P, **Schneider T**, Chiappisi L, Gradzielski M, Schulze-Tanzil G, Haag R. Mimicking of Chondrocyte Microenvironment Using *in situ* Forming Dendritic Polyglycerol Sulfate Based Synthetic Polyanionic Hydrogels. 2015. *Macromol. Biosci*. Accepted
6. **Schneider T**, Welker P, Licha K, Haag R, Schulze-Tanzil G. Influence of dendritic polyglycerol sulfates on knee osteoarthritis: an experimental study in the rat osteoarthritis model. 2015. *BMC Musculoskelet Disord*. *In minor revision*

### Kongressbeiträge

1. **Schneider T**, Kohl B, Sauter T, Becker T, Kratz K, Schossig M, Hiebl B, Jung F, Lendlein A, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Viability, Adhesion and Differentiated Phenotype of Articular Chondrocytes on Degradable Polymers and Electro-spun Structures Thereof. *Advanced Functional Polymers for Medicine 2011*, 15. – 17. Juni 2011, Enschede, Niederlande, *Poster, (Posterpreis)*

2. **Schneider T**, Kohl B, Sauter T, Kratz K, Jung F, Lendlein A, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Interaction of Chondrocytes with Electrospun Polymer Scaffolds depending on fiber orientation. XXXVIII Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2011) and IV Biennial Congress of the International Federation on Artificial Organs (IFAO 2011), 9. – 12. Oktober 2011, Porto, Portugal, *Poster*
  
3. Sauter T, Rüder C, **Schneider T**, Kohl B, Zohlhöfer D, Schulze-Tanzil G, Kratz K, Lendlein A. *In-vitro* evaluation of electrospun scaffolds prepared from degradable poly(ether)esterurethanes. XXXIX Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2012) 26. – 29. September, 2012, Rostock, Deutschland, *Poster*
  
4. Popowski E, Kohl B, **Schneider T**, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Effects of ciprofloxacin and phenylacetic acid on human tenocytes *in vitro*. 109. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, 24. – 27. September 2014, Salzburg, Österreich, *Poster*
  
5. Silawal S, Kohl B, Lemke M, Ertel W, **Schneider T**, Schulze-Tanzil G. Regulation of complement in tenocytes by the complement split fragment c5a and by co-culture with leukocytes. 109. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, 24. – 27. September 2014, Salzburg, Österreich, *Poster*
  
6. **Schneider T**, Welker P, Licha K, Haag R, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Einfluss dendritischer Polyglycerolsulfate auf die Gonarthrose im Rattenmodell. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 28. – 31. Oktober 2014, Berlin, Deutschland, *Poster*
  
7. **Schneider T**, Dey P, Haag R, Arens S, Schulze-Tanzil G. dPGS-based injectable hydrogels for cartilage repair. 4th International Conference "Strategies in Tissue Engineering", 10. – 12. Juni 2015, Würzburg, Deutschland, *Poster*
  
8. **Schneider T**, Welker P, Licha K, Haag R, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Influence of dendritic polyglycerol sulfates on knee osteoarthritis: an experimental study in the rat model. 110. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, 23. – 25. September 2015, Würzburg, Deutschland, *Poster*

## **DANKSAGUNG**

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter FRAU PROF. DR. GUNDULA SCHULZE-TANZIL. Vielen Dank für die Vergabe dieses interessanten Themas und die perfekte Betreuung. Ihr Vertrauen, ihre Unterstützung, ihre Förderung und die mir gelassenen Freiheiten haben mir es ermöglicht meine Doktorarbeit in einer Umgebung und Atmosphäre zu absolvieren, an die ich mich ein Leben lang gern erinnern werde. Ihre wissenschaftliche Hingabe und Expertise sind inspirierend.

Mein besonderer Dank gilt der zielgerichteten Betreuung und weitreichenden Unterstützung durch HERR PROF. DR. RAINER HAAG, der mir durch seine Expertise, sowie die Bereitstellung der Nanopartikel und Hydrogele durch seine Arbeitsgruppe es erlaubt hat chemische und medizinische Sichtweisen zu verknüpfen. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer sehr geschätzt.

Ich möchte mich weiterhin bei PROF. DR. WOLFGANG ERTEL für die Möglichkeit bedanken, diese Doktorarbeit in seiner Klinik anzufertigen sowie für die Bereitstellung der Knorpelproben aus der Unfallchirurgie.

HERR BENJAMIN KOHL und FRAU CAROLA MEIER möchte ich ganz herzlich für die stets hilfsbereite und freundliche Art danken, sowie ihre herausragende Hilfe bei jeglichen methodischen Fragen. Ihre Geduld und Unterstützung, auf die ich mich jederzeit blind verlassen konnte und immer noch kann sind einzigartig.

Weiterhin möchte ich mich bei DR. PRADIP DEY für die Bereitstellung der Hydrogele und bei DR. DOMINIC GRÖGER für die Bereitstellung diverser dPG-Nanopartikel sowie die wertvollen Diskussionen und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Außerdem danke ich FRAU PD DR. PIA WELKER und HERR PD DR. KAI LICHA sowie der Firma mivenion für die Bereitstellung der dPGS-Nanopartikel.

All denen, die an diesem Projekt beteiligt waren, hier jedoch nicht namentlich aufgeführt wurden, gilt ebenso mein herzlichster Dank für die vielfältige Unterstützung.

Meinem Vater, meiner Mutter und meinem Bruder sowie meiner ganzen Familie möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen: Sie haben mich immer bedingungslos unterstützt und mir es erst ermöglicht diesen Weg zu gehen.

Ich danke der „Dahlem Research School“ (DRS) für die gewährte finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums.