

**Grundlegende Arbeiten zum bio-artifiziellen renalen Tubulus aus
ko-kultivierten adipozytären mesenchymalen Stammzellen und
Endothelzellen auf einer synthetischen Kapillarmembran**



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Moritz Tulke

aus Erlenbach a. Main

Würzburg 2020

Eingereicht am: 22.10.2020

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Detlef H. Krieter
- 3. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Vladimir Sukhorukov

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

**Grundlegende Arbeiten zum bio-artifiziellen renalen Tubulus aus
ko-kultivierten adipozytären mesenchymalen Stammzellen und
Endothelzellen auf einer synthetischen Kapillarmembran**



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Moritz Tulke

aus Erlenbach a. Main

Würzburg 2020

Zusammenfassung

Mit fortschreitender chronischer Niereninsuffizienz kommt es zur Akkumulation von Urämietoxinen und im Endstadium unbehandelt zum Tod im sogenannten Urämischen Syndrom. Die Blutreinigung erfolgt bei der am häufigsten verwendeten Form der Nierenerersatztherapie, der Hämodialyse, nur unzureichend. Die Folge ist eine erhöhte Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten. Bei der Hämodialyse werden nur Urämietoxine bis zu einer Größe von 20 kDa über die im Dialysator eingesetzten Hohlfasermembranen diffusiv und konvektiv semiselektiv nach Größenausschluss entfernt. Proteingebundene Urämietoxine, deren effektive Größe durch die Bindung an Transportproteine wie beispielsweise Albumin die Trennschärfe der Dialysemembranen übersteigt, werden retiniert. *In-vivo* werden proteingebundene Urämietoxine im proximalen Tubulus, einem Teil des tubulären Systems des Nephrons, sekretorisch eliminiert.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden die ersten Entwicklungsschritte auf dem Weg zu einem sogenannten bio-artifiziellen Tubulus evaluiert. Der angedachte biohybride Filter sollte aus einer Ko-Kultur funktionaler humaner proximaler Tubuluszellen und humaner Endothelzellen (HUVEC) auf synthetischen Hohlfasermembranen bestehen und könnte während der Hämodialyse als zusätzlicher Reinigungsschritt angewendet werden, um unter anderem proteingebundene Urämietoxine effektiv durch aktiven Transport aus dem Blut der Patienten zu entfernen. Die Differenzierung der proximalen Tubuluszellen erfolgte dabei aus adulten adipozytären mesenchymalen Stammzellen (ASC), deren Herkunft eine spätere autologe Behandlung ermöglicht. Die Ko-Kultur mit Endothelzellen wurde zur potentiellen Steigerung der Sekretion proteingebundener Urämietoxine verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnten ASCs durch eine Kombination der löslichen Differenzierungsfaktoren All-Trans-Retinoinsäure (ATRA), Aktivin A und BMP-7 erfolgreich in Zytokeratin 18-exprimierende Zellen differenziert werden, wodurch die erwünschte epitheliale Differenzierung bestätigt wurde. Die Expression funktionaler Proteine, wie das für den Wassertransport relevante Aquaporin 1 oder auch der Na^+/K^+ -ATPase, konnte in dieser Arbeit bereits vor der Differenzierung nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurde erfolgreich gezeigt, dass eine simultane, qualitativ hochwertige Ko-Kultur von ASCs und HUVECs auf der mit dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin modifizierten Innen- bzw. Außenseite von synthetischen Hohlfasermembranen aus Polypropylen bzw. Polyethersulfon möglich ist. Die Viabilität beider Zelltypen wurde dabei durch die Verwendung eines für die Ko-Kultur entwickelten Nährmediums erreicht, in welchem die

Proliferation von ASCs bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung ihrer Stammzeleigenschaften deutlich erhöht war.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stellen eine aussichtsreiche Basis für einen bio-artifiziellen renalen Tubulus dar. Weitere Entwicklungsschritte, wie die Differenzierung der ASCs zu proximalen Tubuluszellen im 3D-Bioreaktor einschließlich ihrer funktionalen Charakterisierung anhand Tubulusepithel-spezifischer Transporter, sind erforderlich, bevor erste funktionale Experimente vor dem „Upscaling“ auf klinisch verwendbare Module möglich sind.

Summary

Progressing chronic kidney disease results in the accumulation of uremic toxins and, if left untreated in end-stage kidney disease, death due to the developing uremic syndrome. The most common renal replacement therapy is hemodialysis. It is a life-prolonging therapy but only delivering inadequate blood purification, which is associated with excess morbidity and mortality of the patients. In hemodialysis, only uremic toxins with a molecular size of up to 20 kDa are removed by diffusion or convection. Solutes are eliminated by semi-selective size exclusion across a hollow fiber dialysis membrane in a dialyzer. Binding of certain uremic toxins to carrier proteins, such as albumin, results in an increased effective size, which excludes them from passing through dialysis membranes. In the native kidney, these protein-bound uremic toxins are eliminated from blood by secretory transport in the proximal tubule, a specific part of the tubular filtration apparatus of the nephron.

The present doctoral thesis evaluated the first steps towards a so-called bio-artificial tubule. The intended biohybrid filter was supposed to consist of a co-culture of functional human proximal tubule cells and human endothelial cells on synthetic hollow fiber membranes. In its final form, it would be implemented during hemodialysis as an additional purification step to more efficiently remove protein-bound uremic toxins from the patients' blood by active transport. The proximal tubule cells were differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells, which facilitates a later autologous treatment. The co-culture with endothelial cells should further promote the expression of transporters for organic anions and, thereby, potentially increase the secretion of protein-bound uremic toxins.

In the present study, the differentiation from ASCs to a CK18-expression lineage, which confirmed successful epithelial differentiation, was induced by a combination of the soluble differentiation factors all-trans-retinoic acid, activin A and BMP-7. The expression of functional proteins, i.e., of aquaporin 1, which is relevant for water transport, and Na^+/K^+ -ATPase, was shown already before differentiation. Additionally, the present work demonstrated a high-quality co-culture of ASCs and HUVECs on the inner- and outer membrane surfaces of synthetic polypropylene- or polyethersulfone-based hollow fiber membranes, which initially were surface-modified with the extracellular matrix protein fibronectin. The viability of both cell types was thereby ensured by the application of a specific co-culture medium, which further increased the proliferation of ASCs intensely while maintaining their stem-cell character.

The results of the present approach represent a promising basis for a bio-artificial renal tubule. The further development requires the differentiation of ASCs into proximal tubule cells on the 3D-bioreactor membrane and their characterization by verifying tubulusepithel-

specific transporters. Finally, subsequent functional experiments have to precede an up-scaling to clinically applicable modules.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Niere - Struktur und Physiologie	1
1.1.1. <i>Anatomie und physiologische Bedeutung</i>	1
1.1.2. <i>Die funktionelle Grundeinheit der Niere: Das Nephron</i>	2
1.1.3. <i>Der proximale Tubulus</i>	4
1.2. Die Niereninsuffizienz	7
1.3. Urämietoxine	9
1.4. Existierende Nierenersatztherapien	10
1.4.1. <i>Die Hämodialyse</i>	12
1.4.2. <i>Der artifizielle Tubulus</i>	13
1.5. Zellen für den artifiziellen Tubulus	14
1.5.1. <i>Mögliche Zelltypen - von Primärzellen bis Zelllinien</i>	15
1.5.2. <i>Mesenchymale Stammzellen - Charakteristika und Potential</i>	16
1.6. Membranen für den artifiziellen Tubulus	18
1.7. Zielsetzung	21
2. MATERIAL	22
2.1. Zellen	22
2.2. Geräte	22
2.3. Software	23
2.4. Reagenzien	24
2.4.1. <i>Chemikalien</i>	24
2.4.2. <i>Nährmedien und Zusätze</i>	25
2.5. Verbrauchsmaterialien	26
2.6. Membranspezifikationen der Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren	27
3. METHODEN	28
3.1. Standard Arbeiten mit Primärzellen	28

3.1.1.	<i>Mediumwechsel bei adhärennten Monolayer-Kulturen</i>	29
3.1.2.	<i>Subkultivierung</i>	29
3.1.3.	<i>Zellzählung und Viabilitätstest im Hämocytozometer</i>	30
3.1.4.	<i>Kryokonservierung</i>	30
3.1.5.	<i>Auftauen kryokonservierter Zellen</i>	31
3.1.6.	<i>Beschichtung von 96-Well-Platten</i>	31
3.2.	<i>Analytische Methoden</i>	31
3.2.1.	<i>Hoechst-Zellkernfärbung</i>	31
3.2.2.	<i>Rasterelektronenmikroskopie</i>	32
3.2.3.	<i>Durchflusszytometrie</i>	32
3.2.3.1.	<i>Zellzählung und Bestimmung der Zellviabilität</i>	33
3.2.3.2.	<i>Markeranalyse</i>	34
3.2.3.3.	<i>Charakterisierung des Stammzellstatus</i>	34
3.2.4.	<i>AlamarBlue™-Assay</i>	35
3.2.5.	<i>γ-Glutamyltransferase-Assay</i>	35
3.2.6.	<i>Fluoreszenzbasierte Funktionalitäts-Assays</i>	36
3.2.7.	<i>Statistische Methoden</i>	37
3.3.	<i>In-vitro-Differenzierungsprotokolle</i>	37
3.3.1.	<i>Adipogene Differenzierung</i>	37
3.3.2.	<i>Osteogene Differenzierung</i>	37
3.3.3.	<i>Chondrogene Differenzierung</i>	38
3.3.4.	<i>Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu proximalen Tubuluszellen</i>	38
3.4.	<i>Histologische Färbemethoden</i>	39
3.4.1.	<i>Oil-Red-O-Färbung</i>	39
3.4.2.	<i>Alizarin-Red-S-Färbung</i>	39
3.4.3.	<i>Alcian-Blau-Färbung</i>	39
3.5.	<i>Arbeiten mit Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren</i>	40
3.5.1.	<i>Hydrophilisierung der Bioreaktoren</i>	40
3.5.2.	<i>Aufbau des Besiedlungssetups</i>	41
3.5.3.	<i>Beschichtung und Äquilibration vor der Zellbesiedlung</i>	42
3.5.4.	<i>Besiedlung der funktionalisierten Membranoberflächen</i>	43

4. ERGEBNISSE	44
4.1. Charakterisierung proximaler Tubuluszellen	44
4.1.1. <i>Vergleich der Phänotypen von ASCs und PTCs</i>	44
4.1.2. <i>Aktivität der γ-Glutamyltransferase</i>	47
4.1.3. <i>Funktionale Expression und Effluxaktivität von MRP4 und P-gp</i>	48
4.2. In-vitro-Differenzierung von ASCs zu PTCs in der 2D-Zellkultur	51
4.3. Entwicklung eines Mediums zur Ko-Kultur von ASCs und HUVECs	57
4.3.1. <i>Wachstumsverhalten von HUVECs im Standard-ASC-Medium</i>	57
4.3.2. <i>Wachstumsverhalten von ASCs im Standard-Endothelmedium</i>	59
4.3.2.1. <i>Charakterisierung von ASCs über die Expression spezifischer Oberflächenmarker</i>	62
4.3.2.2. <i>Charakterisierung von ASCs durch ihr Differenzierungspotential in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten</i>	64
4.4. Etablierung einer Zellkultur von ASCs und HUVECs in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren	68
4.4.1. <i>Optimierte Beschichtung zur Unterstützung der Zellkultur auf der Oberfläche der Hohlfasermembranen</i>	68
4.4.2. <i>Entwicklung der ASC-Zellkultur auf der Innenoberfläche der Hohlfasermembranen</i>	71
4.4.3. <i>Entwicklung der HUVEC-Zellkultur auf der Außenoberfläche der Hohlfasermembranen</i>	77
4.4.4. <i>Besiedlung der Hohlfasermembranen mit einer Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs</i>	81
4.5. Kultivierung primärer proximaler Tubuluszellen auf Hohlfasermembranen.....	83
5. DISKUSSION	86
5.1. Charakterisierung proximaler Tubuluszellen zur Unterscheidung von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe	88
5.1.1. <i>Phänotypische Analyse von ASCs und PTCs über die Zellmorphologie und durchflusszytometrische Analyse tubulusspezifischer Marker</i>	88
5.1.2. <i>Charakterisierung von PTCs über die Aktivität der γ-Glutamyltransferase</i>	90

5.1.3.	<i>Bestimmung der Transportaktivität von MRP4 und P-gp</i>	90
5.2.	Differenzierung von ASCs zu Zellen mit proximal tubulärem Phänotyp	92
5.3.	Optimales Nährmedium für die Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs.....	94
5.4.	Zellkultur in Hohlfaserbioreaktoren	97
5.4.1.	<i>Optimale Adhärenz und Proliferation von ASCs durch Fibronektin</i>	97
5.4.2.	<i>Entwicklung der 3D-Ko-Kultur von ASCs und HUVECs</i>	98
5.5.	Bewertung der vorliegenden Arbeiten zum artifiziellen Tubulus.....	103
6.	LITERATURVERZEICHNIS	105
7.	ANHANG	120
7.1.	Abbildungsverzeichnis.....	120
7.2.	Tabellenverzeichnis.....	121
7.3.	Abkürzungsverzeichnis.....	122
8.	PUBLIKATIONSLISTE	125
9.	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG UND DANKSAGUNG	126
9.1.	Eidesstattliche Erklärung	126
9.2.	Danksagung	128

1. Einleitung

1.1. Die Niere - Struktur und Physiologie

1.1.1. Anatomie und physiologische Bedeutung

Die Niere (*lateinisch: ren, griechisch: nephros*) ist ein paariges, bohnenförmiges Organ mit vielfältigen physiologischen Funktionen. Neben ihrer Hauptaufgabe als harnbildendes Ausscheidungsorgan, ist sie für essentielle systemische Regulationen wie der kontinuierlichen Gewährleistung der extrazellulären Homöostase verantwortlich. Durch die Aufrechterhaltung des Säure-Base-Gleichgewichts durch Reabsorption und Sekretion von Bicarbonat- und H^+ -Ionen wird der physiologische pH-Wert des Blutes konstant gehalten. Der Wasserhaushalt wird von der Niere über die Reabsorption von Wasser ebenso beeinflusst wie der Elektrolythaushalt über die Regulation der Konzentration verschiedener Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} und PO_4^{2-} . Weiterhin ist die Niere durch Glukoneogenese direkt an der Energieversorgung des Körpers beteiligt und übernimmt als endokrines Organ die Synthese und Sekretion sowohl von Renin, einem Hormon, welches über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System den Blutdruck und die Na^+ -Konzentration kontrolliert, als auch von verschiedenen anderen Hormonen wie beispielsweise Erythropoetin, wodurch sie direkten Einfluss auf die Blutbildung (Erythropoese) nimmt. Die wichtigste Funktion der Niere ist die Ausscheidung von Endprodukten des Stoffwechsels, sogenannten harnpflichtigen Substanzen, wie Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin, sowie von Giftstoffen und verschiedene Xenobiotika, die aus dem Körper über den Harn entfernt werden [1].

Weniger als 1 % des Körpergewichtes entfallen auf die Nieren, welche bei einer Größe von $12 * 6 * 3$ cm im Durchschnitt ein Gewicht von jeweils 150-200 g besitzen. Dennoch beträgt der renale Blutfluss etwa ein Fünftel des Herzzeitvolumens [1]. Bei allen Säugetieren sind die Nieren paarig beidseitig der Wirbelsäule, unterhalb des Zwerchfells lokalisiert. Die auf der konkaven Seite der Niere befindliche Einziehung wird als Nierenhilus bezeichnet. Hier münden sowohl die renalen Blutgefäße (*Arteria renalis, vena renalis*), als auch der Harnleiter (*Ureter*).

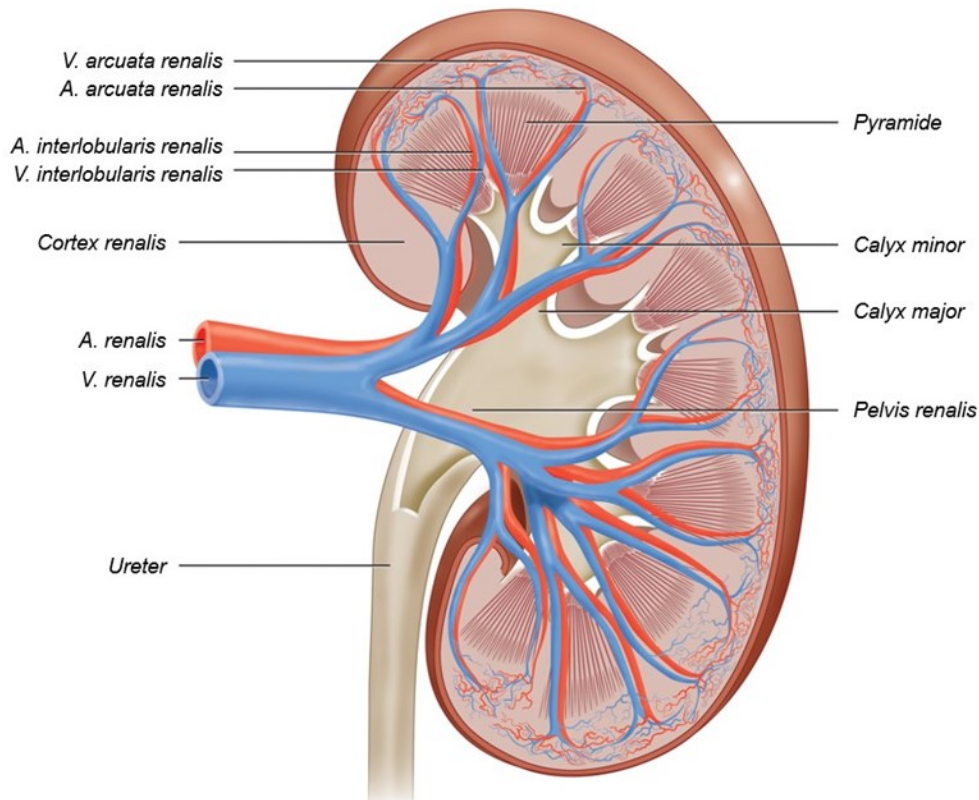


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Anatomie der Niere, modifiziert nach Interactive Biology [2]

Ein Querschnitt der multipapillären menschlichen Niere (vgl. Abbildung 1) zeigt eine heterogene Vielfalt angeschnittener Strukturen, wobei die Niere grundsätzlich makroskopisch in zwei deutlich voneinander abgegrenzte Bereiche, die Nierenrinde (*Cortex renalis*) und das Nierenmark (*Medulla renalis*), gegliedert ist. Die Nierenrinde umhüllt dabei das Nierenmark, welches etwa die Form einer Pyramide besitzt. Deren Spitze, die Nierenpapillen, ragen in die Nierenkelche (*Calyx major, calyx minor*) hinein, welche sich zum Nierenbecken (*Pelvis renalis*) vereinen, aus dem der konzentrierte Harn durch den Harnleiter in die Blase transportiert wird [3].

1.1.2. Die funktionelle Grundeinheit der Niere: Das Nephron

Die Harnbildung findet in der zusammenhängenden anatomischen und funktionellen Untereinheit der Niere statt, dem Nephron. Jede Niere besteht aus ungefähr 1-3 Millionen Nephronen, von denen sich jedes grob in Nierenkörperchen (*Corpusculum renale*) und Nierenkanälchen (*Tubulus renalis*) untergliedern lässt [3] (vgl. Abbildung 2).

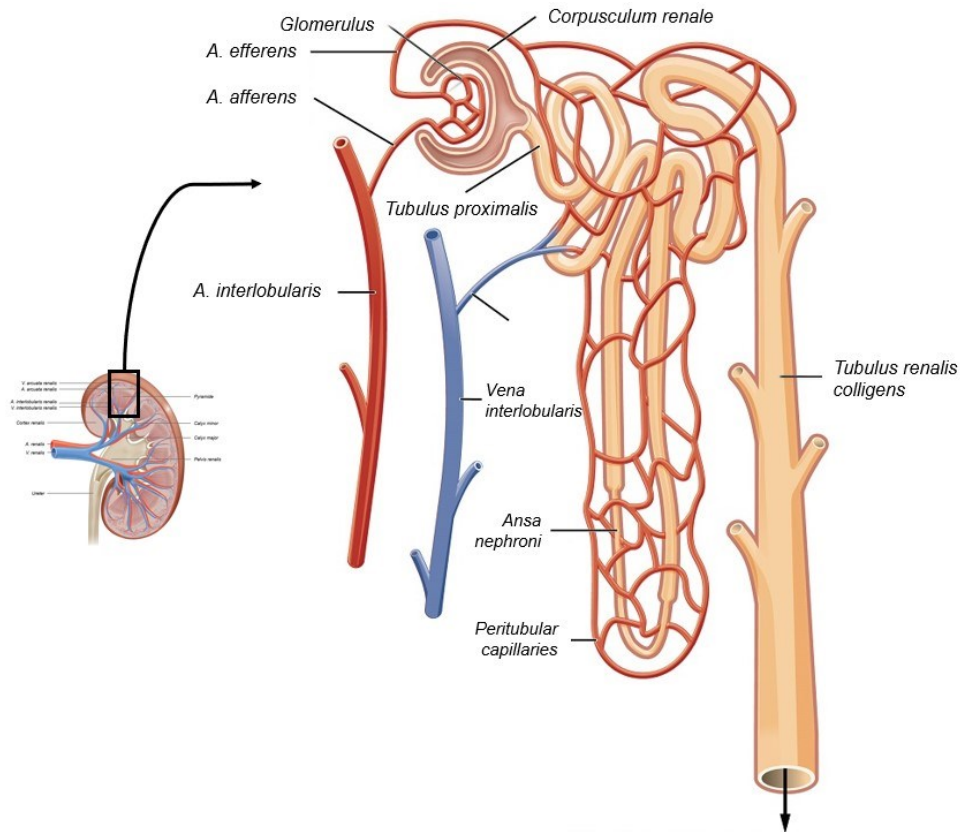


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anatomie eines Nephrons, vom Glomerulus bis zum Sammelrohr als funktionelle Untereinheit der Niere, modifiziert nach OpenStax College [4]

Das Nierenkörperchen (Durchmesser ca. 0,2 mm) besteht aus dem Glomerulus, einem feinen Netz von Kapillargefäßen, und der sogenannten Bowman-Kapsel, einer Epithelkapsel, welche das Glomerulus umgibt. Im Glomerulus findet die glomeruläre Filtration, der erste Schritt der Harnbildung statt. Diese Ultrafiltration über eine Filtrationsmembran, die sich aus dem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und von zwischen aufsitzenden Podozyten ausgebildeten Filtrationslücken zusammensetzt, hält Zellen, Proteine und andere hochmolekulare Plasmabestandteile durch Größen- und Ladungselektivität im Blutkreislauf zurück. Die Trennschärfe dieser auch als Blut-Harn-Schranke bezeichneten Barriere liegt mit ungefähr 65 kDa im Bereich der Molekülmasse von Albumin, was kleinere Substanzen die Filtrationsmembran passieren lässt [3]. Das von allen Glomeruli der Nieren pro Minute filtrierte Flüssigkeitsvolumen (glomeruläre Filtrationsrate, GFR) beträgt beim Menschen etwa 120 mL pro Minute [5].

Der Primärharn ähnelt in seiner Zusammensetzung dem Blutplasma und enthält zunächst neben Wasser ebenfalls Elektrolyte, Puffer, kleinere Proteine und Glukose, die im nachfolgenden Tubulussystem rückresorbiert werden.

Das Tubulussystem, welches sich in den proximalen Tubulus (*Tubulus proximalis*), die Henle-Schleife (*Ansa nephroni*) und den distalen Tubulus unterteilen lässt, verändert die Zusammensetzung des Primärharns durch Wasserrückresorption, durch Rücktransport von Molekülen aus dem Urin in das Blut und durch aktive Sekretion von Molekülen aus dem Blut in den Urin.

Im gewundenen ersten Abschnitt des proximalen Tubulus (*Pars convoluta*) findet der größte Anteil der Reabsorptions- und Sekretionsprozesse statt. Hier werden unter anderem über 98 % der Glukose und Aminosäuren sowie 60-80 % des filtrierten Kochsalzes und Wassers zurückgewonnen [3]. Während der dadurch entstandene sogenannte Sekundärharn anschließend den geraden Teil des proximalen Tubulus (*Pars recta*), die Henle-Schleife und den distalen Tubulus, welcher als letzter Teil des Nephrons mit dem Sammelrohr (*Tubulus renalis colligens*) verbunden ist, durchläuft, wird der Harn weiter durch Rückresorption des Wassers und Reabsorption verbliebener Ionen aufkonzentriert [1].

1.1.3. Der proximale Tubulus

Der proximale Tubulus stellt den Anfang des Tubulussystems dar und besteht aus hochdifferenzierten Epithelzellen, den proximalen Tubuluszellen (PTC). Von den mindestens 15 verschiedenen Typen von Epithelzellen der Niere mit unterschiedlichen Funktionen und Eigenschaften sind die PTCs für den Großteil der Reabsorption und Sekretion verantwortlich [6]. PTCs lassen sich durch die Expression spezifischer Markergene oder die Aktivität bestimmter Enzyme identifizieren [7]. Spezifische Marker für PTCs sind dabei unter anderem die γ -Glutamyltransferase 1 (GGT1), Aquaporin 1 (AQP1), Zytokeratin 18 (CK18), die Na^+/K^+ -ATPase und Villin 1 (VIL1) [6, 8, 9].

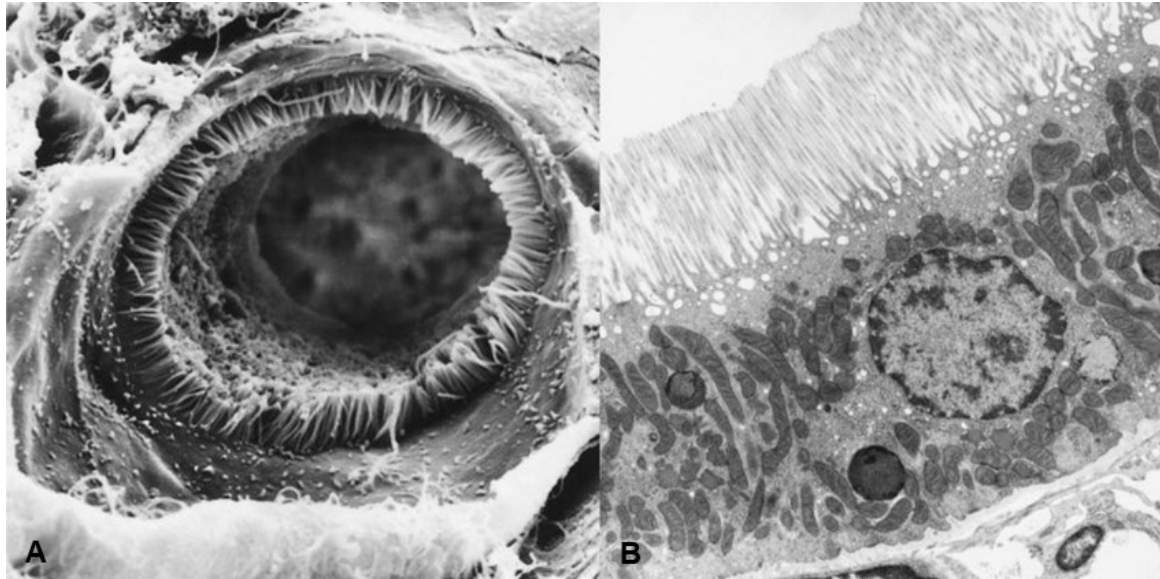


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des proximalen Tubulus einer Ratte

(A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Übergangs von der Bowman-Kapsel in den proximalen Tubulus; (B) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von proximalen Tubuluszellen. Es sind sowohl ausgeprägte Mikrovilli (A, B), als auch eine Vielzahl an Mitochondrien (B) deutlich zu erkennen [10].

Als einschichtige Epithelzellen besitzen die PTCs eine charakteristische kubische Zellform mit einer ausgeprägten Polarität zwischen der apikalen (zum Primärharn gerichteten) und der basolateralen (zum Blut gerichteten) Seite. Die apikale Seite verfügt zur Oberflächenvergrößerung über einen ausgeprägten Bürstensaum mit zahlreichen Mikrovilli (vgl. Abbildung 3). Um den Stoffaustausch zwischen den Zellen und dem Tubuluslumen bzw. dem basalen Interstitium zu gewährleisten, befinden sich sowohl in der apikalen als auch der basolateralen Membran eine hohe Anzahl verschiedener Transportsysteme. So werden beispielsweise durch Aquaporine, den mengenmäßig bedeutendsten Membranproteinen der Niere, täglich ungefähr 100 L Wasser aus dem Primärharn in den Körper zurückgeführt. Das Zytoplasma aller PTCs weist eine große Anzahl von Mitochondrien auf, welche den hohen Energiebedarf der Transportvorgänge decken. Die zusammenhängende Einzellschicht aus PTCs kleidet das Tubuluslumen aus und ist somit für die spezifischen Barriereigenschaften des proximalen Tubulus verantwortlich [1].

Der proximale Tubulus ist für die Reabsorption essentieller Komponenten des Primärharns, aber auch für die zusätzliche Entfernung einer Vielzahl von gelösten Stoffen und Abfallprodukten aus dem Blut, zu denen unter anderem auch die Urämietoxine gehören, verantwortlich. Dafür bilden PTCs eine Barriere, die von Stoffen von der basolateralen zur apikalen Seite überquert werden muss. Basolateral und apikal lokalisierte Transporter

sind in ihrer Substratspezifität komplementär, was die Exkretion aufgenommener Stoffe ermöglicht [11].

Die funktionalen Charakteristika der PTCs sind größtenteils auf unterschiedlichste, energiegekoppelte Membrantransporter zurückzuführen. Diese sind für den Transport von Ionen, kleinen Molekülen, Nukleotiden, Xenobiotika und weiteren Substanzen verantwortlich. Die Transporter sind in der Lage, die gelösten Stoffe entgegen starken Konzentrationsgradienten zu transportieren, und sorgen für die hohe Exkretionskapazität und die barrierespezifische Selektivität. Die Transporter können entweder unidirektionale Efflux-Pumpen, Co-Transporter oder Carrier darstellen, welche die Diffusion unterstützen. Sie gehören entweder zur ABC-Transporter-Superfamilie (*ATP-binding cassette, ABC*) [12] oder zur SLC-Transporter-Superfamilie (*solute carrier*) [13]. Die Funktion der ABC-Transporter ist von ATP-Hydrolyse abhängig, welche durch die erhöhte mitochondriale Aktivität in PTCs gewährleistet wird. Die Aktivität der SLC-Transporter beinhaltet unter anderem Ko-Transporte, die über das Membranpotential energetisiert werden, das wiederum durch die basolateral exprimierte Na^+/K^+ -ATPase gesichert wird.

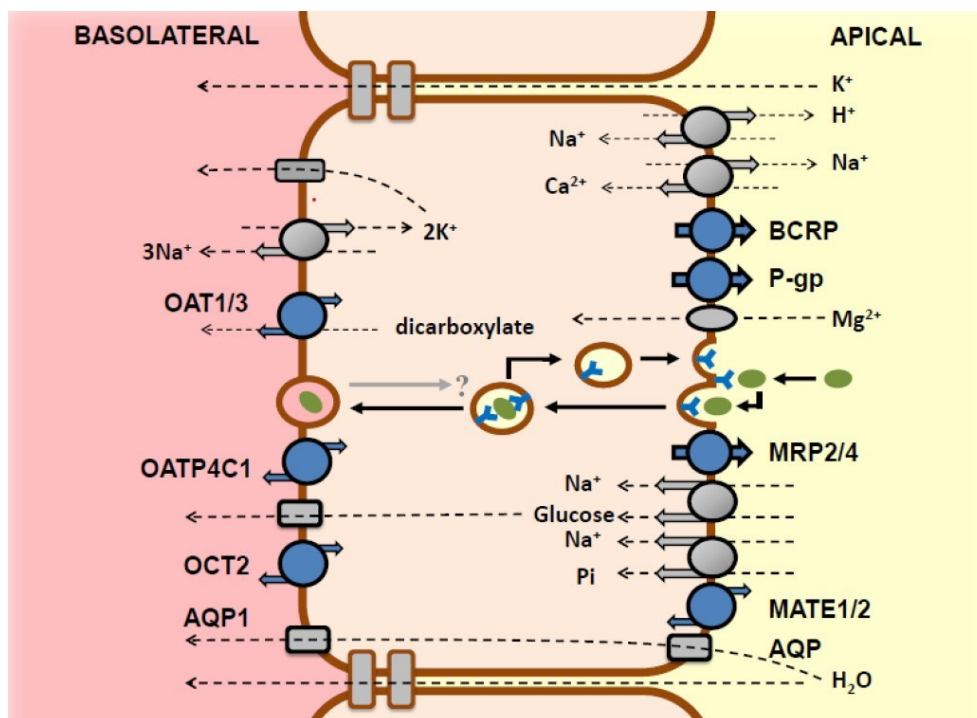


Abbildung 4: Darstellung der Transportmechanismen in proximalen Tubuluszellen

Schematische Darstellung der wichtigsten apikalen und basolateralen membrangebundenen Transportsysteme in proximalen Tubuluszellen. Reabsorptionsmechanismen sind in grau, Wirkstofftransporter in blau dargestellt [14].

Die für den Menschen wichtigsten Efflux-Transporter im proximalen Tubulus sind das *breast cancer protein* (BCRP; *ABCG2*) [15], das *P-glycoprotein* (P-gp; *ABCC2/4*) [13] und das *multidrug resistance protein 2 und 4* (MRP2/4; *ABCC2/4*) [16]. Die Haupt-Aufnahme-Transporter sind der *organic anion transporter 1* (OAT1; *SLC22A6*), der *organic anion transporter 3* (OAT3; *SLC22A8*) und der *organic cation transporter 2* (OCT2; *SLC22A2*) [17]. Außerdem spielen Carrier, wie der *organic anion transporter polypeptide* (OATP4C1; *SLC04C1*) und die *multidrug and toxin extrusion 1 and 2 transporter* (MATE1/2K; *SLC47A1/2K*) eine essentielle Rolle bei der Sekretion kationischer Wirkstoffe [13]. Der aktive Membrantransport an der basolateralen Seite der PTCs ermöglicht das Entfernen von Substanzen, welche an Plasmaproteine gekoppelt sind. Dazu gehören verschiedene Toxine und Wirkstoffe, welche vor allem durch Bindung an Albumin im Blutfluss transportiert werden. Diese werden ausschließlich durch den aktiven Membrantransport der basolateralen Seite aus dem Blut entfernt.

Zusätzlich übernehmen PTCs eine essentielle Rolle bei der Reabsorption von Nährstoffen und Ionen in den Blutkreislauf. Dabei ist die Rezeptor-vermittelte Endozytose ein wichtiger Mechanismus. *Megalin*, *cubilin* und *amnionless* sind drei, in der Apikalmembran lokalisierte, Rezeptoren, welche die Reabsorption von Proteinen verschiedener Größe vermitteln, die im Glomerulus filtriert wurden [18]. Weiterhin werden durch PTCs eine Reihe von Ionen reabsorbiert, wobei diese Prozesse nicht auf die PTCs begrenzt sind, sondern auch im restlichen Tubulussystem stattfinden. Im Gegensatz dazu ist die Reabsorption von Glukose, die durch Na⁺-gekoppelte Co-Transporter (*glucose transporter*, GLUT) vermittelt wird, ausschließlich in PTCs lokalisiert [19].

1.2. Die Niereninsuffizienz

2017 litten ca. 10 % der Weltbevölkerung an chronischer Niereninsuffizienz (CKD; *chronic kidney disease*) [20]. Der Anstieg der durchschnittlichen Lebenserwartung, genetische Veranlagungen, die zunehmenden Häufungen von Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen führen zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der Nierenfunktion und Entwicklung einer CKD [21]. Nierenversagen kann entweder akut, wobei sich die Nierenfunktion innerhalb von Stunden verschlechtern kann, oder chronisch verlaufen. Die Retention und Akkumulation von Substanzen, die normalerweise durch die gesunden Nieren aus dem Blut entfernt werden, und die Störung des renalen Hormon- und Enzym-Haushaltes haben einen schwerwiegenden Einfluss auf funktionelle Systeme des Körpers (kardiovaskulär, neurologisch, hämatologisch und immunologisch) [22]. Das fortschreitende Nierenversagen führt zunächst zu einer Beeinträchtigung der biochemischen und

physiologischen Körperfunktionen und endet im schließlich urämischen Syndrom. Dieses zeichnet sich durch multiple Symptome wie Übelkeit, Veränderungen des mentalen Zustandes, Herzprobleme und schließlich dem Tod aus [5].

Das Stadium der Niereninsuffizienz wird anhand der glomerulären Filtrationsrate kategorisiert, welche aus der Konzentration von Kreatinin im Serum und weiteren Markern im Urin und Plasma bestimmt wird. Die *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative guidelines of the National Kidney Foundation* (NKF KDOQI) empfehlen dabei folgende Klassifizierung.

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz. Klassifizierung nach den NKF KDOQI Richtlinien [23]

Stadium	Beschreibung	GFR [mL / min / 1,73 m ²]
1	Nierenschaden - GFR normal oder erhöht	≥ 90
2	Nierenschaden - GFR leicht verringert	60 - 89
3	GFR moderat verringert	30 - 59
4	GFR stark verringert	15 - 29
5	Nierenerkrankung im Endstadium (ESRD)	< 15 (oder Dialyse)

Die Diagnose CKD wird gestellt, wenn die GFR über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten erniedrigt ist. Die Nierenfunktion lässt dabei mit der Zeit nach, bis sie nahezu komplett verloren geht (CKD Stadium 5), was als terminale Niereninsuffizienz (ESKD, *end stage kidney disease*) bezeichnet wird. Patienten mit ESKD benötigen eine permanente Nierenersatztherapie, entweder in Form einer chronischen Dialyse oder als Organtransplantation [24].

Das akute Nierenversagen (AKI, *acute kidney injury*; ARF, *acute renal failure*) ist eine fast immer schwere Form der plötzlich einsetzenden Niereninsuffizienz [25]. AKI stellt mit ungefähr 13,3 Millionen Patienten jährlich ein globales Gesundheitsproblem mit einem hohen medizinischen Bedarf dar [26]. Das akute Nierenversagen tritt bei etwa 50 % der Patienten auf Intensivstationen auf, von denen bis zu 42 % ein chronisches Nierenversagen entwickeln [21].

1.3. Urämietoxine

Patienten mit Niereninsuffizienz zeigen eine verringerte Ausscheidung von hauptsächlich oder ausschließlich renal zu eliminierenden Metaboliten, was eine Akkumulation dieser Stoffe zur Folge hat. Diese nicht-eliminierten Stoffe, die entweder gelöst oder proteingebunden vorkommen, werden auch als *uremic retention solutes* bezeichnet [27], welche zu pathophysiologischen Erscheinungen bis hin zum urämischen Syndrom führen können [28]. Verursachen diese retinierten gelösten Substanzen pathophysiologische Erscheinungen, werden sie als Urämietoxine bezeichnet [29].

Im Jahr 2003 hat die *European Uremic Toxin Work Group* (EUTox) einen Überblick über die, bis dahin bekannten, *uremic retention solutes* erstellt, und dabei 90 verschiedene Bestandteile identifiziert [27]. Diese Liste wurde seitdem stetig aktualisiert, mittlerweile werden in der Datenbank der EUTox 130 Stoffe aufgeführt, die im Plasma von Patienten mit Nierenversagen akkumulieren [30]. Diese werden, basierend auf ihren physikochemischen Eigenschaften und ihrer Entfernbarkeit durch Dialyse oder ähnliche Verfahren, in drei Gruppen eingeteilt [29].

Die erste Gruppe enthält kleine, wasserlösliche Moleküle mit einer Molekülmasse von unter 500 Da, mit Urea (Harnstoff) und Kreatinin als typische Beispiele. Beide Stoffe können als Markermoleküle zur Einschätzung der Schwere der Niereninsuffizienz und zur Quantifizierung der Behandlungseffizienz der Dialyse genutzt werden [31]. Kleinmolekulare Urämietoxine können einfach durch jegliche Dialysestrategie aus dem Blut entfernt werden und zeigen nicht notwendigerweise eine toxische Aktivität.

Die Bestandteile der zweiten Gruppe haben eine Molekülmasse von über 500 Da und werden als Mittelmoleküle bezeichnet. Diese Moleküle, wie beispielsweise β_2 -Mikroglobulin, können nur durch großporige Membranen (z.B. High-Flux-Hämodialysemembranen) aus dem Blut entfernt werden und haben häufig eine biologische Wirkung. Eine effizientere Entfernung der Mittelmoleküle wird durch einen Wechsel der Dialysemethode von Diffusion (hauptsächlich passiver Transport der gelösten Stoffe über die Dialysemembran) zu Konvektion (Wasser und darin gelösten Stoffe werden unter hydrostatischem Druck über die Membran gedrückt) gewährleistet [32].

Die dritte Gruppe beinhaltet die proteingebundenen Moleküle. Zwar besitzen die meisten gelösten Stoffe dieser Gruppe eine niedrige Molekülmasse, dennoch enthält sie auch Moleküle mittlerer Masse (Leptin, Zytokine). Viele der proteingebundenen Moleküle besitzen eine toxische Aktivität, wobei nur der ungebundene, frei vorliegende Anteil der Moleküle

einen Effekt auf das biologische System hat [27]. Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der Konzentration der proteingebundenen urämischen Retentionssolute und klinischen Parametern [33-35]. Derzeitige Dialysestrategien zeigen nur eine geringe Clearance der mit unterschiedlich starker Affinität proteingebundenen Moleküle, da diese trotz ihrer eigentlich geringen Größe durch ihre Bindung an die Trägerproteine und der dadurch erhöhten effektiven molekularen Größe nicht in der Lage sind, eine Dialysemembran zu passieren, wodurch ausschließlich der ungebundene, oft sehr geringe Anteil dialysiert wird [36]. So hat die High-Flux-Hämodialyse keinen größeren Einfluss auf die Konzentration der proteingebundenen urämischen Retentionssolute als die Low-Flux Hämodialyse [37]. Um eine verbesserte Entfernung dieser Stoffe aus dem Blut zu ermöglichen, ist es notwendig, komplexere Behandlungsmethoden zu entwickeln.

Tabelle 2: Klassifizierung der urämischen Retentionssolute [29]

Bezeichnung	Charakteristika	Beispiele	Toxizität
Kleine, wasserlösliche Moleküle	MG < 500 Da einfache Entfernung durch Dialyse	Urea Kreatinin	Nicht immer toxisch
Mittelmoleküle	MG > 500 Da Entfernung nur über großporige Dialysemembranen	β ₂ -Mikroglobulin Leptin	Vielfältige biologische Auswirkungen
Proteingebundene Moleküle	Alle molekularen Massen Schwierige Entfernung durch Dialyse	Phenole Indole	Vielfältige biologische Auswirkungen

1.4. Existierende Nierenersatztherapien

Nierenersatztherapien verfolgen zwei unmittelbare Ziele: Zum einen sollen toxische Abfallprodukte aus dem Blut entfernt [31], zum anderen Abweichungen des Elektrolyt-, Wasser- und Säure-Base-Haushaltes korrigiert werden [24]. Derzeit existieren verschiedene Formen der Nierenersatztherapie: Hämodialyse (HD), Peritonealdialyse (PD) und die Nierentransplantation, bei der sowohl Spenderorgane von Verstorbenen, als auch von Lebenden genutzt werden. Im Jahr 2017 wurden weltweit über 90.000 Nieren erfolgreich transplantiert (63,4 % von Verstorbenen, 36,4 % von Lebenden; Daten der *Global Observatory on Donation and Transplantation (GOTD)*, im Auftrag der *WHO-ONT collaboration*) [38]. Mit erfolgreicher Transplantation ist die Nierenfunktion des Patienten in unterschiedlichem Maße wiederhergestellt, allerdings ist auch die Transplantation keine endgültige Heilung - nach 10 Jahren sind nur noch etwa 54 % der transplantierten Nieren funktionsfähig [39].

Weiterhin ist nach dem Eingriff eine immunsuppressive Therapie notwendig, die häufig mit Nebenwirkungen einhergeht. Limitiert ist die Transplantation durch die Organverfügbarkeit, die Wartelisten variieren hierbei je nach Land, wobei die durchschnittliche globale Wartezeit etwa 3-5 Jahre beträgt. 2019 standen in Deutschland ca. 7.000, europaweit 10.000 und aktuell in den USA ca. 94.000 registrierte Patienten auf den Wartelisten [40, 41].

Während der Hämodialyse wird das Blut des Patienten durch eine artifizielle Niere (Hämodialysator, Kapillardialysator) gereinigt, die aus semi-permeablen Hohlfasermembranen aufgebaut ist (vgl. Abbildung 5). Die Peritonealdialyse hingegen nutzt das *Peritoneum* (Bauchfell) des Patienten als Membran zur Blutreinigung [3].

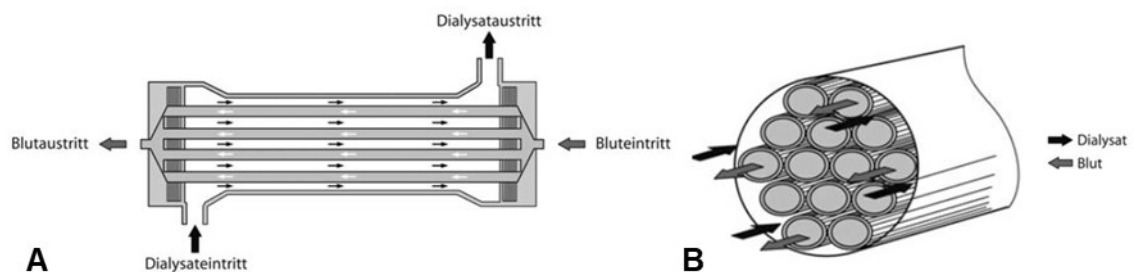


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Kapillardialysators

(A) Längsschnitt eines Kapillardialysators mit Blutanschlüssen und seitlichen Anschlüssen für das Dialysat; (B) Querschnitt eines Kapillardialysators mit erkennbaren Einzelkapillaren [3].

Das Ziel der artifiziellen Niere ist die exkretorische Funktion der gesunden Niere als Filterorgan zu ersetzen. Die Kombination aus glomerulärer Filtration und selektiver Reabsorption im Tubulussystem soll durch das Dialysieren des Blutes über eine semi-permeable Membran abgebildet werden [31]. Dabei ist es allerdings nicht möglich, die endokrinen Aufgaben der Niere nachzustellen [24, 42], hierfür sind zusätzliche medikamentöse Therapien, z.B. die Erythropoietin-Substitution, erforderlich.

1.4.1. Die Hämodialyse

2017 wurden laut *Annual Report of the European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA)* 85 % der Patienten, die eine Nierenersatztherapie erhielten, mit der Hämodialyse behandelt [43]. Diese ist demnach die am weitesten verbreitete Dialysetherapie und beruht auf einem Stoffaustausch entlang eines osmotischen Gradienten (Diffusion) über eine semipermeable Membran (vgl. Abbildung 6). Dabei werden nur kleine, wasserlösliche Toxine und ggf. Mittelmoleküle, die ungebunden im Blut vorliegen, semiselektiv nach dem Größenausschlussverfahren entfernt [44]. Durch Veränderung der Flussrate oder der Membranpermeabilität wird in der aktuellen Forschung versucht, die Effizienz der Methode stetig zu verbessern. Die Kombination aus Diffusion bzw. Konvektion und Adsorptionsmechanismen ermöglicht die Entfernung größerer Moleküle, unter anderem auch einiger proteingebundener Toxine [45].

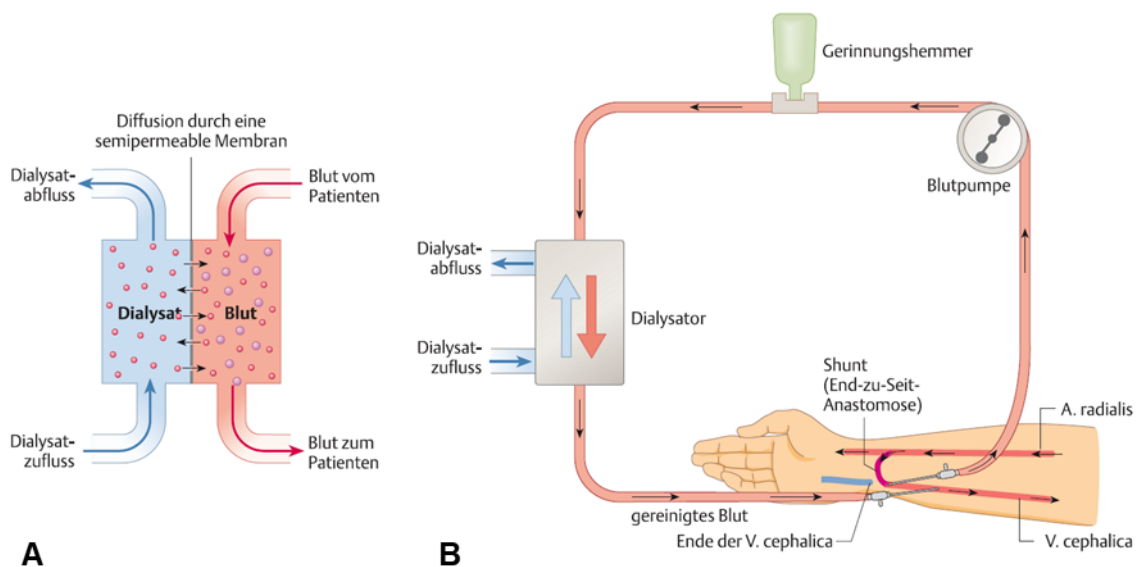


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Hämodialyse

(A) Prinzip der Hämodialyse: Extrakorporale Reinigung des Blutes. Die Semipermeabilität der Membran erlaubt die semiselektive Diffusion von wasserlöslichen Stoffen bis zu einer bestimmten Größe; (B) Ablauf der Hämodialyse: Das zu reinigende Blut wird aus dem Körper zunächst durch den Dialysator geleitet und anschließend gereinigt wieder dem Blutkreislauf des Patienten zugeführt [46].

Aktuell verwendete Hämodialysemembranen werden aus synthetischen Polymeren hergestellt [47] und sind als Hohlfasermembranen üblicherweise entweder High- oder Low-Flux-Membranen. Low-Flux-Membranen haben eine Trennschärfe von etwa 10 kDa und werden für rein diffusionsbasierende Behandlungsmethoden genutzt (Hämodialyse).

High-Flux-Membranen sind sehr wasserdurchlässig, haben bei einer Trennschärfe von unter 40 kDa [48] deutlich größere Poren als Low-Flux-Membranen und wurden entwickelt, um ähnliche Clearance-Eigenschaften wie die native Niere abzubilden [49]. Sie werden sowohl für die Hämodialyse, als auch für konvektive Behandlungsmethoden (Hämo-filtration) genutzt, in denen dem Blut über einen künstlich angelegten Druckgradienten Flüssigkeit entzogen wird, wodurch bei Bedarf eine schnelle Volumenänderung beim Patienten vorgenommen werden kann. Dieses ultrafiltrierte Plasmawasser wird anschließend durch eine Substitutionsflüssigkeit ersetzt, die dem Dialysat ähnelt [50]. Die Vergrößerung der Poren zur effizienteren Entfernung größerer Moleküle ist allerdings durch die molekulare Größe von Albumin (65 kDa) begrenzt, welches für den Transport gelöster Stoffe im Blut und der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes essentiell ist [31] und dessen Verlust während der Dialyse möglichst zu verhindern ist.

1.4.2. Der artifizielle Tubulus

Zwischen der Konzentration der proteingebundenen Toxine Indoxyl-Sulfat und p-Cresyl-Sulfat und der Mortalität von Patienten mit chronisch dialysepflichtiger Niereninsuffizienz konnte ein direkter Zusammenhang nachgewiesen werden [51, 52]. Dabei ist der Grund für die Akkumulation proteingebundener Toxine die unzureichende Elimination im Rahmen der Dialysebehandlung, da sie die komplexe Entfernung dieser Substanzen, die bei Gesunden im proximalen Tubulus erfolgt, nicht leisten kann.

Der artifizielle Tubulus könnte im Rahmen der gängigen Hämodialysetherapie angewendet werden, aber auch ein Einsatz in einem tragbaren oder implantierbaren Dialysemodul wäre denkbar. Dabei besteht die mögliche Behandlungsform aus drei seriellen Komponenten. Ein Standarddialysator, der entweder High- oder Low-Flux-Membranen enthält, repräsentiert die glomeruläre Funktion und entfernt kleine, wasserlösliche Moleküle aus dem Blut, das in einem folgenden, zu definierenden Plasmafraktionierungsfilter, der eine Fraktion des Plasmas inklusive Carrierproteine und proteingebundener Toxine vom Blut trennt, geleitet wird. Dieses generierte, zellfreie Plasma fließt durch den biohybriden artifiziellen Tubulus, welcher die proteingebundenen Toxine analog zum proximalen Tubulus im Körper entfernt. Der artifizielle Tubulus muss folgende Kriterien erfüllen:

- 1) Die verwendeten Membranen müssen eine ausreichende Permeabilität für den Transport von Nährstoffen und Toxinen aufweisen. Gleichzeitig müssen die Membranen eine hohe Zellkompatibilität aufweisen [53].

- 2) Die proximalen Tubuluszellen müssen humanen Ursprungs sein und auf der Membranoberfläche ein konfluentes Epithelium bilden, um die zellulären Funktionen zu gewährleisten [54]. Weiterhin müssen die Zellen einfach und in hoher Zahl verfügbar sein.
- 3) Die Zellkultur muss im Bioreaktor über einen längeren Zeitraum konstant gehalten werden können: Gasaustausch, konstante Temperatur und die kontinuierliche Versorgung der Zellen mit Nährmedium, um die optimale Zelladhärenz, -proliferation und -viabilität zu ermöglichen, müssen gewährleistet sein.

Ein vereinfachtes Modell eines humanen proximalen Tubulus könnte der Hämodialyse zusätzliche renale Funktionalität in Bezug auf die Sekretion bzw. Elimination proteingebundener Urämietoxine verleihen, und somit eine effizientere Nierenersatztherapie ermöglichen. Der artifizielle Tubulus bezeichnet dabei ein tubulusähnliches Konstrukt aus synthetischen Hohlfasermembranen, Endothelzellen und proximalen tubulären Epithelzellen, in welchem der Intrakapillarraum der Hohlfasermembranen den peritubulären Raum des Tubulussystems darstellt. Die Membran trennt die Zellkulturen auf der Membraninnenseite (proximale tubuläre Epithelzellen) und der Membranaußenseite (Endothelzellen). Diese Ko-Kultur ist notwendig, da primäre proximale Tubuluszellen in Kultur die Fähigkeit zum sekretorischen Transport organischer Anionen, die den überwiegenden Teil der proteingebundenen Urämietoxine darstellen, verlieren [55]. Die Ko-Kultur aus proximalen Tubuluszellen und endothelialen Zellen stimuliert eine erhöhte Expression von Transportproteinen für organische Anionen (OAT1, OAT3) in den Tubuluszellen [56, 57], wodurch dementsprechend die Sekretionsfähigkeit des Epithels im Intrakapillarraum des Bioreaktors gesteigert, und damit die Reinigungsleistung des Gesamtsystems erhöht werden könnte.

1.5. Zellen für den artifiziellen Tubulus

Derzeit existieren viele verschiedene, teilweise direkt von der Niere abstammende Zelltypen, die eine Nachahmung renaler Prozesse *ex-vivo* erlauben. Die wichtigste Prämisse ist dabei stets, dass die kultivierten Zellen einem Phänotyp entsprechen, wie er *in-vivo* vorkommt. Allerdings lassen sich die komplexen *in-vivo* Wachstumsbedingungen der Zellen (Wachstum in 3D-Strukturen, Crosstalk mit unterschiedlichen Zelltypen, Austausch von sekretierten Wachstumsfaktoren etc.) *in-vitro* kaum abbilden, weshalb zur Kultivierung die Zugabe von spezifischen Wachstumsfaktoren benötigt wird. Diese können jedoch durch Genmutationen oder Änderungen der Proteinexpression bzw. metabolischen

Aktivität den Phänotyp der Zellen beeinflussen [58], weshalb dieser kontinuierlich kontrolliert werden muss.

1.5.1. Mögliche Zelltypen - von Primärzellen bis Zelllinien

Primärzellen werden direkt aus dem Nierengewebe oder dem Urin gesunder Spender gewonnen. Dabei wird das Gewebe zu einer Zellsuspension enzymatisch aufgelöst. Anschließend können die gewünschten Zellen anhand spezifischer Oberflächenmarker sortiert werden. Primäre PTCs behalten ihren Phänotyp in Kultur nur für einen begrenzten Zeitraum. Sie verlieren ihre epithelialen Eigenschaften mit jeder Populationsverdopplung [59-61]. Zusätzlich sind sie aufgrund der begrenzten Spenderverfügbarkeit stark limitiert [54].

Eine weitere beliebte Quelle für Nierenzellen für die Forschung und Entwicklung sind Zelllinien. Diese wurden ursprünglich aus einer Primärzellkultur entwickelt, um längere Kultur-dauern zu ermöglichen und gleichzeitig die Zelltyp-spezifischen Phänotypen zu erhalten. Die häufigsten verwendeten renalen Zelllinien sind dabei HEK293 (*human embryonic kidney*) und HK-2 (*human kidney*). HEK293 wurden aus embryonalen Nierenzellen durch Transduktion mit Adenovirus-Partikeln entwickelt [62]. Obwohl sie direkt aus Nierengewebe stammen, fehlen diesen Zellen die Transporteigenschaften und spezifische Charakteristika proximaler Tubuluszellen. HK-2 wurde aus primären PTC-Kulturen durch Transfektion mit humanen Papilloma-Virus E6/E7 Genen abgeleitet [63]. HK-2 Zellen exprimieren viele PTC spezifische Enzyme und zeigen einige ihrer Funktionen (beispielsweise Glukose Aufnahme), entsprechen allerdings nicht vollständig dem PTC-Phänotyp [64].

Durch neue molekularbiologische Techniken, wie z.B. Tools zur konditionellen Immortalisierung von Zellen, konnten weitere Zelllinien mit geringerer genetischer Variabilität und erhöhter Stabilität entwickelt werden. Konditionell immortalisierte humane proximale Tubuluszellen (ciPTECs) stellen dabei eine Zelllinie dar, die aus dem Urin und dem Nierengewebe Erwachsener gewonnen werden kann [65] und spezifische Transporter des proximalen Tubulus wie OCT2, BRCP, P-gp und MRP4 [66, 67] funktional exprimiert [65]. Weiterhin zeigen ciPTECs auf Hohlfasermembranen eine gegenüber der unbesiedelten Membran erhöhte Clearance von proteingebundenem Indoxyl-Sulfat [68]. Die Verwendung von Zelllinien bedeutet für ein mögliches besiedeltes Modul in direktem Patientenkontakt jedoch ein deutlich höheres Patientenrisiko, als die Anwendung autologer humaner Primärzellen.

Eine weitere Art der Primärzellen sind Stammzellen, die ein großes Potential und weitreichende Möglichkeiten bieten, um physiologische Prozesse *ex-vivo* nachzuahmen und zu verstehen. Sie sind nicht an die Limitierungen sonstiger adulter Primärzellen gebunden, werden als „unreife“ oder „undifferenzierte“ Zellen beschrieben, und sind in der Lage, identische Tochterzellen zu produzieren [69]. Sie können ohne den Verlust ihrer Stammzeleigenschaften expandiert werden oder durch Zugabe spezifischer Differenzierungsfaktoren in einen anderen Zelltyp differenziert werden [70]. Embryonale Stammzellen weisen ein extrem hohes Differenzierungspotential auf. Ihre Gewinnung unterliegt allerdings hochkontroversen ethischen Bedenken. Zusätzlich birgt die Behandlung mit embryonalen Stammzellen ein hohes Risiko der Abstoßung der Zellen durch das Immunsystem des Patienten [71, 72]. Alternativ dient das Blut, das Knochenmark oder das Fettgewebe von Erwachsenen als leicht zugängliche Quelle für adulte Stammzellen, die minimal invasiv gewonnen werden können. Die autologe Behandlung mit adulten Stammzellen minimiert das Risiko einer Abstoßung durch das körpereigene Immunsystem erheblich. Trotz dieser Vorteile ist die Verwendung von Stammzellen in der regenerativen Medizin vor allem aufgrund der Schwierigkeiten bei der Differenzierung *ex-vivo* limitiert, da sie zum einen sehr zeitaufwendig und kostenintensiv, zum anderen je nach Zielzelltyp extrem schwierig umzusetzen ist.

1.5.2. Mesenchymale Stammzellen - Charakteristika und Potential

In den letzten Jahren sind in den Forschungsgebieten der Zelltherapie, des „Tissue Engineering“ und der regenerativen Medizin immer häufiger mesenchymale Stromazellen bzw. mesenchymale Stammzellen (MSCs) in den Fokus der Wissenschaft getreten. Diese Zellen sind mesodermalen Ursprungs und können laut Definition in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren [73]. Die *International Society for Cellular Therapy* hat Minimalkriterien definiert, welche von MSCs erfüllt werden müssen, um eindeutig als solche charakterisiert werden zu können:

- Die Adhärenz auf Kunststoffoberflächen
- Adipogenes, Chondrogenes und Osteogenes Differenzierungspotential
- Positiver Nachweis einer bestimmten Kombination aus Oberflächenmarkern, bei gleichzeitiger fehlender Expression anderer Oberflächenmarker (vgl. Tabelle 3) [74]

Tabelle 3: Oberflächenantigene, für die MSCs laut Definition der *International Society for Cellular Therapy* positiv bzw. negativ sein müssen [74]

	Oberflächenantigen	Bezeichnung	Exprimierende Zellen (u.a.)
positiv	CD105	Endoglin	Monozyten, Fibroblasten
	CD73	Ekto-5'-nukleotidase	Lymphozyten, Endothelzellen
	CD90	Thy-1	hämatopoetische Stammzellen
negativ	CD45	L-CA, PTPRC	Leukozyten
	CD34	-	hämatopoetische Vorläuferzellen
	CD14 oder CD11b	- / Integrin α -M, CR3A	Monozyten, Makrophagen
	CD79 α oder CD19	MB1, IGA / -	B-Zellen
	HLA-DR	-	Makrophagen, B-Zellen, dendritische Zellen

MSCs wurden ursprünglich aus dem Knochenmark Erwachsener gewonnen, können aber mittlerweile aus unterschiedlichstem [75], unter anderem auch aus Fettgewebe [76] isoliert werden. MSCs aus dem Knochenmark (*bone marrow mesenchymal stem cells*, bm-MSCs) können, zusätzlich zur Fähigkeit in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren, in eine Vielzahl verschiedener Zelltypen wie Tendo- und Myozyten, glatte Muskelzellen und Neuronen differenziert werden [77-79]. Weiterhin konnten Singaravelu et al. im Jahr 2009 durch den Nachweis der Tubulusepithel-spezifischen Marker Ksp-Cadherin und AQP1 zeigen, dass bm-MSCs die Fähigkeit besitzen, in Zellen zu differenzieren, die einen renalen, Tubulusepithel-ähnlichen Phänotyp aufweisen [80].

MSCs aus Fettgewebe (*adipose-derived mesenchymal stem cells*, adMSCs, ASCs) besitzen Oberflächenantigene und ein ähnliches Differenzierungspotential wie bm-MSCs [81-83]. ASCs konnte ebenfalls ihr Differenzierungspotential in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten nachgewiesen werden [84]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von ATRA die CK18-Expression der ASCs induziert, was auf ein epitheliales Differenzierungspotential hinweist [81]. Zusätzlich konnten Yan et al. ASCs durch die Zugabe einer Kombination aus ATRA und Dexamethason in eine epitheliale Linie differenzieren, welche weiterhin Stammzeleigenschaften inklusive osteogenem Differenzierungspotential aufwies [85]. Weiterhin ließ sich die Differenzierung von ASCs in Richtung einer epithelialen Linie durch Kultivierung in konditioniertem Medium, dem Zellkulturüberstand inklusive, von renalen Tubulusepithelzellen sezernierter Stoffe, initiieren [86].

1.6. Membranen für den artifiziellen Tubulus

In der Entwicklung einer bio-artifiziellen Niere (*bio-artificial kidney*, BAK) wurden bereits verschiedene kommerzielle Hämodialyse- oder Ultrafiltrationsmembranen aus unterschiedlichen Materialien als Basis der Zellbesiedlung verwendet. Hohlfasermembranen aus Polysulfon (PSF) [87], Polyethersulfon (PES) [53, 88] und Ethylen-Vinylalkohol [89] zeigten dabei vielversprechende Ergebnisse. Die verwendeten Membranen besitzen eine hohe Permeabilität, wodurch sie durchlässig für Nährstoffe, Toxine und Metabolite sind. Diese Permeabilität wird zum einen durch die dünne Wandstärke der Hohlfasermembranen, welche in der Literatur, abhängig vom verwendeten Membranmaterial, zwischen 40 µm und 145 µm angegeben wird [53, 87, 90], zum anderen durch die hohe Porosität der Membranen gewährleistet. Hämodialysemembranen sind asymmetrisch oder symmetrisch aufgebaut [47], haben außen aber immer eine sehr poröse und offene Seite und eine geringere Porengröße auf der inneren Seite, welche den *molecular mass cut off* (MWCO), d.h. die Trennschärfe der Membranen definiert. Um dem Verlust von Albumin vorzubeugen, liegt die Trennschärfe von High-Flux-Dialysemembranen üblicherweise unterhalb von 40 kDa [48]. Eine optimale Trennschärfe einer Membran für die bio-artifizielle Niere ist in der Literatur allerdings nicht beschrieben.

Shen et al. haben den Einfluss der Krümmung von Hohlfasermembranen auf die Viabilität und Funktionalität von Nierenzellen untersucht, welche auf der Membranoberfläche kultiviert wurden. Die resultierenden einfach Zellschichten, d.h. Monolayer, zeigten für die verwendeten Innendurchmesser von 0,4 mm, 0,8 mm und 1,2 mm jeweils vergleichbare Qualität, eine zunehmende Krümmung (d.h. kleinerer Innendurchmesser) resultierte in einer erhöhten Funktionalität der Nierenzellen (höhere Aktivität von GGT, GLUT und MRP2) [91]. Der humane proximale Tubulus besitzt *in-vivo* einen Innendurchmesser von 30-60 µm [92], was die Vermutung zulässt, dass ein geringerer Innendurchmesser und die damit einhergehende stärkere Krümmung einer Hohlfasermembran zu einer verbesserten Funktion einer derartig konfigurierten künstlichen Niere führen könnte. Dennoch wird in der aktuellen Forschung durch die weit verbreitete Nutzung kommerzieller Dialysemembranen hauptsächlich mit Innendurchmessern im Bereich von 175-250 µm gearbeitet.

Hohlfasermembranen wurden ursprünglich für die Dialyse mit dem Ziel einer möglichst hohen Clearance der zu entfernenden Stoffe aus dem Blut entwickelt, wobei gleichzeitig möglichst wenig Blutzellen an die Membran adhären sollten, um eine Verstopfung der Poren und eine daraus resultierende verminderte Reinigungsleistung der Dialysatoren zu verhindern. Chemische Gruppen an der Membranoberfläche verhindern dabei die Adhärenz, können diese aber auch begünstigen. Apolaren Gruppen (z.B. Methylgruppen)

konnte nachgewiesen werden, dass sie die Zelladhärenz effektiv verhindern, wohingegen polare oder geladene Gruppen (z.B. Amino- oder Carboxylgruppen) die Zelladhärenz fördern [93]. Die für einen artifiziellen Tubulus essentielle Zellkompatibilität der verwendeten Hohlfasermembranen könnte also durch die Eingliederung bestimmter Gruppen in die Membranoberfläche verbessert werden. Eine in der Forschung weit verbreitete Alternative mit deutlich geringerem Aufwand ist die Modifikation der Membranoberflächen nach der Produktion.

So konnten Ni et al. 2011 zeigen, dass humane proximale Tubuluszellen (hPTCs) nicht in der Lage sind, auf Membranen aus unterschiedlichen Materialien (Hydratzellulose, Polysulfon/Polyvinylpyrrolidon (PSF/PVP), Polyethersulfon/Polyvinylpyrrolidon (PES/PVP) zu adhären und zu proliferieren. Selbst durch Beschichtung der Membranoberflächen mit einer biologischen extrazellulären Matrix (ECM) aus Collagen I, Collagen IV, oder einer Doppelbeschichtung aus Collagen IV und Laminin, sowie mit L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) konnte die Adhärenz und Vitalität der hPTCs nicht erhöht werden [94]. Humane proximale Tubuluszellen zeigten hingegen eine deutlich verbesserte Performance auf einer Doppelbeschichtung aus L-DOPA und Collagen IV [94], einem extrazellulären Matrixprotein, welches endogen in der Basallamina vorkommt und die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in eine epitheliale Richtung begünstigt [95]. Ebenso konnten Schophuizen et al. 2015 während der Entwicklung einer *living membrane* zeigen, dass die Doppelbeschichtung aus L-DOPA und Collagen IV als Basis für die Zellkultur konditionell immortalisierter proximaler Tubuluszellen auf Flachmembranen aus Polyethersulfon geeignet ist [96].

Salzig et al. analysierten in einer 2D-Zellkulturumgebung die Adhäsion, Proliferation und das Ablösen einer immortalisierten, humanen mesenchymalen Stammzelllinie (hMSC-TERT) und von primären mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe (ad-hMSCs, ASCs) auf verschiedenen Beschichtungen. Dabei konnten sie sowohl das Wachstum der Zelllinie, als auch das Wachstum der primären mesenchymalen Stammzellen erfolgreich auf Beschichtungen aus den extrazellulären Matrixproteinen Vitronektin, Laminin und Fibronektin nachweisen [97].

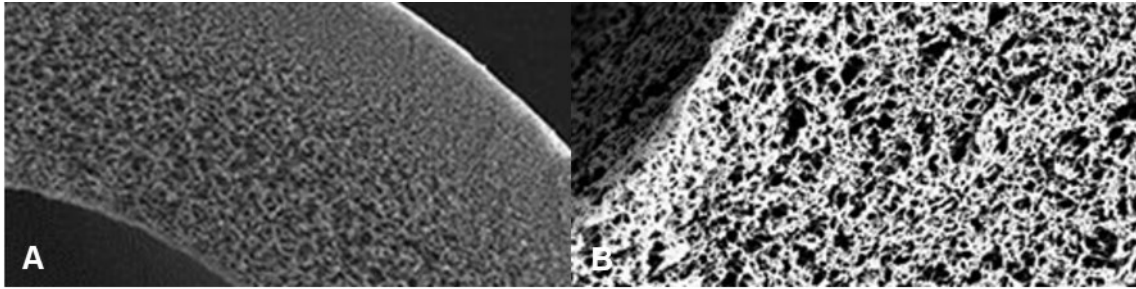


Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hohlfasermembranen

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer 3M™ MicroPES® TF10 (A) und einer 3M™ Plasmaphan® P1 LX Kapillarmembran (B). Zu sehen ist jeweils der Ausschnitt eines Querschnitts durch eine Hohlfaser [98].

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Membrantypen als Basis für den artifiziellen Tubulus verwendet (vgl. Abbildung 7). 3M™ MicroPES® TF10-Kapillarmembranen (Innendurchmesser: 300 μm , Wandstärke 100 μm) werden durch lösungsmittelinduzierte Phasentrennung (*solvent induced phase separation, SIPS*) aus Polyethersulfon hergestellt, wobei die Zugabe von Polyvinylpyrrolidon für eine optimierte Balance zwischen Biokompatibilität und optimaler Benetzbarkeit sorgt. Die 3M™ Plasmaphan® P1 LX-Kapillarmembranen (Innendurchmesser: 330 μm , Wandstärke 150 μm) werden hingegen durch thermisch induzierte Phasentrennung (*thermally induced phase separation, TIPS*) aus Polypropylen hergestellt, wodurch sie von Natur aus hydrophob sind. Ihre Zellkulturkompatibilität kann jedoch durch einfache Hydrophilierungen erreicht werden. Beide Membrantypen weisen eine hohe Biokompatibilität auf und werden in der Plasmaseparation eingesetzt [98].

1.7. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein vereinfachtes Modell eines humanen proximalen Tubulus entwickelt werden, welches eine die Hämodialyse ergänzende, zusätzliche renale Funktionalität, vor allem in Bezug auf die Sekretion proteingebundener Urämietoxine, ausweist. Die grundsätzliche klinische Anwendbarkeit des zu entwickelnden Systems im Rahmen einer normalen Hämodialysebehandlung hatte dabei besondere Priorität. Basierend auf bekannten Vorarbeiten sollte der artifizielle Tubulus aus verfügbaren synthetischen Hohlfasermembranen, Endothelzellen (humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene, *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) und proximal-tubulären Epithelzellen aufgebaut sein, wobei Letztere aus humanen mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe differenziert werden sollten.

2. Material

2.1. Zellen

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Primärzellen gearbeitet. Dabei wurden sowohl kommerziell erhältliche, als auch aus im Rahmen einer anonymisierten Liposuction anfallendem Fettgewebe isolierte und aufgereinigte humane mesenchymale Stammzellen verwendet. Für die Verwendung des Fettgewebes lagen ein positives Votum des Ethikkomitees der Universitätsklinik Würzburg und das Einverständnis der Patienten vor. Sämtliche verwendeten Zelltypen sind in der folgenden Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Zelltypen

Bezeichnung	Herkunft
Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells	Liposuction
Mesenchymal Stem Cells 2758	jeweils verschiedene Spender
Human Adipose Derived Stem Cells	Lonza Cologne GmbH, Köln
Human Umbilical Vein Endothelial Cells	Lonza Cologne GmbH, Köln
Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells	Lonza Cologne GmbH, Köln

2.2. Geräte

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
BD FACSVerse	BD Biosciences, Heidelberg
CO ₂ -Inkubator/Brutschrank	SANYO Electric Biomedical CO. Ltd.
Dampfsterilisator	Gössner Fritz GmbH & Co. KG, Hamburg
Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach
Gefrierschrank, -80 °C	Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau
Kühlschrank	Liebherr International Deutschland GmbH, Biberach

Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Leitz Laborlux 12	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Leica Axiovert 40	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Leica AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrotiterplattenluminometer FLx800TB	BioTek Instruments GmbH
Mikrotiterplattenreader Elx808IU	Bad Friedrichshall
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Peristaltische Pumpe	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
pH Meter	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim
Pipetten, Einkanal, verschiedene Volumina	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten, Mehrkanal, verschiedene Volumina	Eppendorf AG, Hamburg
PowerpettePro	VWR International GmbH, Darmstadt
Sterilwerkbank	Heto-Holten A/S, Allerød, Dänemark
Stickstoffgefrierschrank	Consarctic GmbH, Westerngrund
Tischzentrifuge Z 233 M-2	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen
Vortexer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG Staufen
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze
Zentrifuge Z513 K	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen

2.3. Software

Tabelle 6: Übersicht über die verwendete Software

Software	Entwickler
AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen
FACSuite	BD Biosciences, Heidelberg
Gen5	BioTek Instruments GmbH Bad Friedrichshall
Microsoft Office Home and Business 2016	Microsoft Corporation Redmond, WA, USA
Minitab® 17	Additive GmbH, Friedrichsdorf

2.4. Reagenzien

2.4.1. Chemikalien

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
3-Isobutyl-1-methylxanthin	Merck KGaA, Darmstadt
3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine	Merck KGaA, Darmstadt
5-Chloromethylfluorescein diacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Aktivin A	Merck KGaA, Darmstadt
alamarBlue™ Cell Viability Reagent	Life Technologies Corporation, Eugene
Albiomin®	Biotest Pharma GmbH, Dreieich
Alcian-Blau	Merck KGaA, Darmstadt
Alizarin Red S	Merck KGaA, Darmstadt
All-Trans-Retinoinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Aqua Ecotainer®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ascorbinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
BD CellWash	BD Biosciences, Heidelberg
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Biosciences, Heidelberg
BD Perm/Wash™	BD Biosciences, Heidelberg
BD Via-Probe™ Cell Viability Solution	BD Biosciences, Heidelberg
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Merck KGaA, Darmstadt
BMP-7	Merck KGaA, Darmstadt
Calcein-AM	Merck KGaA, Darmstadt
Collagen from human placenta	Merck KGaA, Darmstadt
Dexamethason	Merck KGaA, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Fibronectin from human plasma	Merck KGaA, Darmstadt
Freezing Medium Cryo	PromoCell GmbH, Heidelberg
Glutardialdehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Hexamethyldisilazan	Merck KGaA, Darmstadt
Indomethacin	Merck KGaA, Darmstadt
Insulin	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Krebs-Henseleit-Puffer	Merck KGaA, Darmstadt

Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane	Merck KGaA, Darmstadt
MK571	Merck KGaA, Darmstadt
Normal-Goat-Serum	Merck KGaA, Darmstadt
Oil-Red O	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe
PSC833	Merck KGaA, Darmstadt
ReagentPack™ Subculture Reagents	Lonza Cologne GmbH, Köln
Sacomanno Fixation Solution	Morphisto GmbH, Frankfurt
Trypan Blue solution	Merck KGaA, Darmstadt
β-Glycerophosphat	Merck KGaA, Darmstadt

2.4.2. Nährmedien und Zusätze

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Nährmedien, Zusätze und Kits

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
BD Stemflow™ hMSC Analysis Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle's Medium 4,5 g/L Glucose, with L-Glutamine	Lonza Cologne GmbH, Köln
Endothelial Cell Basal Medium (phenol red free)	PromoCell GmbH, Heidelberg
Fetales Kälberserum	neoFroxx GmbH, Einhausen
MSC Chondrogenic Differentiation Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg
Penicillin-Streptomycin	Merck KGaA, Darmstadt
REBM™ Renal Epithelial Cell Basal Medium	Lonza Cologne GmbH, Köln
REBM™ SingleQuots®	Lonza Cologne GmbH, Köln
SupplementPack Endothelial Cell GM	PromoCell GmbH, Heidelberg
γ-Glutamyltransferase (GGT) Activity Colorimetric Assay Kit	Merck KGaA, Darmstadt

2.5. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
Combifix® Adapter (male / male, female / female)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Combitips advanced (verschiedene Größen)	Eppendorf AG, Hamburg
Combi-Stopper	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
CryoPure Gefäß, 1,8 mL	Sarstedt AG & CO. KG, Nürnberg
Deckgläser	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Einmalhandschuhe, pH soft Nitril	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Falcons (verschiedene Größen)	Sarstedt AG & CO. KG, Nürnberg
Multiwellplatten (verschiedene Größen)	Sarstedt AG & CO. KG, Nürnberg
Objektträger	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Pipettenspitzen (verschiedene Volumina)	Eppendorf AG, Hamburg
Pumpschlauch, PharMed® BPT, ID = 1,52 mm	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Reagiergefäß, 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten (verschiedene Volumina)	Sarstedt AG & CO. KG, Nürnberg
Spritzen (verschiedene Volumina)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterican Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	Merck KGaA, Darmstadt
Vier-Wege-Hahn	Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
Zellkulturflaschen (verschiedene Größen)	Sarstedt AG & CO. KG, Nürnberg

2.6. Membranspezifikationen der Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren

Tabelle 10: Spezifikationen der in den Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren verwendeten Membranen

	3M™ MicroPES® TF10	3M™ Plasmaphan® P1 LX
Membranmaterial	Polyethersulfon-Polyvinylpyrrolidon-Gemisch	Polypropylen
Kapillanzahl pro Modul	15	14
Innendurchmesser	300 µm	330 µm
Wandstärke	100 µm	150 µm
Aktive Innenfläche	7 cm ²	7 cm ²
Aktive Außenfläche	12 cm ²	14 cm ²
Aktive Membranlänge	50 mm	50 mm
Sterilisationsart	Dampf	Dampf

3. Methoden

Die Arbeit lässt sich grundsätzlich in zwei Themengebiete gliedern. Im ersten Teil der Arbeit sollten zunächst Grundlagen unter standardisierten Zellkulturbedingungen einer 2D-Zellkulturumgebung erarbeitet werden. Dabei waren Methoden zu etablieren, um proximale Tubuluszellen eindeutig zu charakterisieren, und sie von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe zu unterscheiden. Des Weiteren musste die *In-vitro*-Differenzierung von ASCs zu PTCs entwickelt und etabliert sowie ein Medium identifiziert werden, welches die Ko-Kultur von ASCs und HUVECs sowie schließlich von ausdifferenzierten PTCs und HUVECs ermöglicht.

Die in der 2D-Zellkulturumgebung erarbeiteten Methoden sollten anschließend in eine 3D-Zellkulturumgebung aus Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren übertragen werden. Dabei war der Fokus zunächst auf der Entwicklung und Etablierung einer Methode, die eine Ko-Kultur von ASCs und HUVECs auf synthetischen Hohlfasermembranen reproduzierbar über eine längere Kulturdauer sicherstellt, zu legen. Dazu musste zunächst der Einfluss verschiedener Beschichtungen aus extrazellulären Matrixproteinen auf die Vitalität einer ASC-Zellkultur in der standardisierten 2D-Zellkulturumgebung evaluiert werden, um sie anschließend in die 3D-Kultur adaptieren zu können. Das adhärente Zellwachstum sollte dabei sowohl qualitativ, als auch quantitativ überprüft werden.

Abschließend sollten die auf der Membranoberfläche wachsenden ASCs durch analoge Anwendung des 2D-Differenzierungsprotokolls in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren zu proximalen Tubuluszellen differenziert werden sowie anhand der in Punkt 1 entwickelten Charakterisierungsmethoden funktional charakterisiert und identifiziert werden.

3.1. Standard Arbeiten mit Primärzellen

Arbeiten mit Primärzellen erfordern eine sterile Arbeitstechnik, um eine Umgebung und Kulturen ohne Kontaminationen sicherzustellen. Dazu wurden alle Arbeitsschritte auf einer Sterilwerkbank durchgeführt, und sämtliche Geräte wurden vor der Nutzung gereinigt und desinfiziert. Falls nicht anders angegeben, fanden Inkubationen unter standardisierten Zellkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Alle verwendeten Nährmedien beinhalteten standardmäßig 10 mL/L Penicillin/Streptomycin (100 Units Penicillin und 100 µg Streptomycin pro mL Medium). Soweit nicht anders angegeben, wurde als Basalmedium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 4,5 g/L Glukose und L-Glutamin verwendet.

3.1.1. Mediumwechsel bei adhärennten Monolayer-Kulturen

ASCs und HUVECs stellen in einer 2D-Zellkulturumgebung adhärennte Monolayer-Kulturen dar, die zur Proliferation und Aufrechterhaltung der Vitalität einen regelmäßigen Wechsel des Nährmediums erfordern, da die Zellen entweder die Nährstoffe des Mediums metabolisiert haben oder aber Bestandteile des Mediums bei 37 °C mit der Zeit zerfallen [99].

Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage, wobei das alte Medium aus dem Zellkulturgefäß entnommen wurde, ohne dabei den Zellrasen auf der Oberfläche zu beschädigen. Anschließend wurde die gleiche Menge auf 37 °C vorgewärmtes Nährmedium hinzugegeben und die Inkubation fortgesetzt.

3.1.2. Subkultivierung

Die Behandlung adhärennt wachsender Zellen mit der Serinprotease Trypsin ermöglichte es, die Zellen scherkräftefrei und ohne mechanische Beschädigungen von der Oberfläche zu lösen. Die Kulturen wurden bei einer Konfluenz von 70-80 % subkultiviert, um in der Kultur einen Selektionsdruck zu verhindern, unter dem das Wachstum der Zellen gefördert worden wäre, die trotz ungünstigerer Bedingungen (weniger Nährstoffe, mögliche pH-Unterschiede) weiterhin proliferieren. Dieses Vorgehen verhinderte eine Veränderung der Zellpopulation über die Zeit [100].

Dabei wurde zunächst das Nährmedium vollständig entfernt, sowie der Zellrasen mit HEPESBSS (*hepes buffered saline solution*) gewaschen. Anschließend erfolgte die enzymatische Ablösung der Zellen durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,025 %) und Inkubation für 7-9 min bei 37 °C unter mikroskopischer Kontrolle (Leica Axiovert 40, Carl Zeiss AG, Oberkochen), wobei noch an der Oberfläche anheftende Zellen durch leichtes Klopfen gelöst wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TNS (*trypsin neutralizing solution*) abgestoppt, die Zellsuspension zentrifugiert (400 g, 5 min, Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen entweder neu ausgesät oder kryokonserviert.

Analog zur 2D-Zellkultur wurde die Subkultivierung auch mit Zellen durchgeführt, die auf der Oberfläche der Membranen in den Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren proliferierten. Die Zellen wurden in der Trypsin/EDTA-Lösung in ein Röhrchen überführt und das Trypsin dort durch Zugabe von TNS neutralisiert. Zusätzlich wurden die Membranen zweimal mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen, um mögliche verbliebene Zellen aus dem Reaktor zu spülen.

3.1.3. Zellzählung und Viabilitätstest im Hämozytometer

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Trypanblau-Färbung stellt einen Routinetest zur Zellzahlbestimmung dar, mit dem zeitgleich die Vitalität der Zellen analysiert werden kann. Dabei färbt das Anion des sauren Trypanblaus selektiv Zellproteine toter Zellen, deren Zellmembran, im Gegensatz zur Membran lebender Zellen, permeabel für den Farbstoff geworden ist [100]. Die Zählung der ungefärbten lebenden Zellen erfolgte im Hämozytometer, einer flachen, perforierten Glaskammer mit definierter Tiefe.

Zur Analyse der viablen Zellzahl wurden 10 µL der zu untersuchenden Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau-Lösung (0,4 %) gefärbt. Anschließend wurde die gefärbte Zellsuspension für die Zellzählung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Aus dieser so ermittelten Zellzahl ließ sich anhand der folgenden Formel 1 die Gesamtzellzahl berechnen:

Formel 1: Berechnung der Gesamtzellzahl

$$\text{Zellzahl} = Z \times F \times V \times 10^4$$

Z = Mittelwert der gezählten Zellen aus den vier Zählkammergroßquadraten

F = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension

V = Gesamtvolumen der ursprünglichen Zellsuspension

10^4 = Kammerfaktor der Zählkammer

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl (inklusive gefärbter toter Zellen) berechnet.

3.1.4. Kryokonservierung

Die Kryokonservierung bietet die Möglichkeit, Zellen durch Lagerung unter der Temperaturgrenze für biochemische Reaktionen von -120 °C langfristig aufzubewahren [99].

Um in den Experimenten jeweils auf einen einheitlichen Zellpool zurückgreifen zu können wurden ASCs, HUVECs und PTCs zunächst vervielfältigt und kryokonserviert. Um diese auf die Kryokonservierung vorzubereiten, wurde zunächst die Zellzahl der Suspension bestimmt, die Suspension zentrifugiert (400 g, 5 min, Raumtemperatur), der Überstand verworfen sowie durch die Zugabe eines speziellen, serumfreien Einfriermediums (*Freezing Medium Cryo-SFM*, 10 % DMSO) die gewünschte Zellzahl pro mL Medium eingestellt. Jeweils ein mL dieser Suspension wurde in spezielle Kryoröhrchen gegeben, welche

zunächst in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C mit -1 °C pro Minute über Nacht eingefroren und am nächsten Tag in einen Flüssigstickstofftank (ca. -190 °C) zur weiteren Lagerung überführt wurden.

3.1.5. Auftauen kryokonservierter Zellen

Um die toxischen Einflüsse der Gefrierschutzmittel des Einfriermediums auf die Zellen zu verringern, wurden diese Substanzen beim Auftauen der Zellen möglichst schnell entfernt oder zu einer nicht zellschädigenden Konzentration verdünnt [100].

Dazu wurden die gefrorenen Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, bis etwa 90 % der Eiskristalle aufgelöst waren. Die Suspension wurde zur Vermeidung von Zellagglomerationen zunächst vorsichtig resuspendiert, anschließend ein Volumen entsprechend der gewünschten Zellzahl entnommen und in neue Zellkulturgefäße, deren Oberfläche bereits für 30 min bei Standardbedingungen mit dem entsprechenden Nährmedium äquilibriert wurden, überführt.

3.1.6. Beschichtung von 96-Well-Platten

Um die Adhäsion und Proliferation von ASCs auf Beschichtungen aus verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen zu evaluieren wurden jeweils $50\text{ }\mu\text{l}$ Fibronectin ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$ in PBS) und Laminin ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$ in PBS) in Wells von 96-Well-Platten gegeben und für 1 bzw. 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Wells wurden anschließend gewaschen (2 x, PBS) und mit entsprechendem Nährmedium äquilibriert (37 °C). Zur Doppelbeschichtung mit L-DOPA und Collagen IV wurden die Wells zunächst für 1 bzw. 2 h mit $50\text{ }\mu\text{L}$ L-DOPA (2 mg/mL in PBS) für 1 bzw. 2 h bei 37 °C beschichtet, die Wells gewaschen (2 x, PBS) und mit $50\text{ }\mu\text{L}$ Collagen IV ($25\text{ }\mu\text{g/mL}$ in H_2O) für 1 bzw. 2 h inkubiert. Das Collagen IV wurde verworfen, die Wells gewaschen (2 x, PBS), mit Nährmedium äquilibriert (37 °C) und die Zellen in den Wells ausgesät.

3.2. Analytische Methoden

3.2.1. Hoechst-Zellkernfärbung

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride) wurde genutzt, um die Zellkerne von lebenden und abgestorbenen Zellen zu färben. Dabei bindet der Farbstoff selektiv in der kleinen Furche der AT-reichen Regionen doppelsträngiger

DNA. Hoechst33342 weist dank einer zusätzlichen lipophilen Ethylgruppe eine deutlich höhere Membrangängigkeit auf als andere Mitglieder der Hoechst-Farbstofffamilie [101].

Zur Zellkernfärbung adhärent wachsender Zellen auf Hohlfasermembranen in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren wurden diese zunächst mit PBS gewaschen, mit Glutardialdehyd (2,5 % in PBS, 5 min, Raumtemperatur) fixiert, erneut gewaschen, mit Hoechst (10 µg/mL in 0,5 % Humanes Serum Albumin (HSA) in PBS, 5 min, Raumtemperatur) gefärbt sowie abschließend mit HSA/PBS (0,5 %, 1 min, Raumtemperatur, 2 x) gewaschen. Zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurde das Bioreaktormodul aufgesägt, die Membranen entnommen und in PBS gelagert. Mit einer Rasierklinge wurden Längs- und Querschnitte der einzelnen Membranen angefertigt, um die Zelladhärenz auf der Innen- bzw. Außenseite unter dem Fluoreszenzmikroskop zu analysieren.

3.2.2. Rasterelektronenmikroskopie

Zur weiteren Evaluierung der Zelladhäsion und Proliferation wurden die Zellen auf besiedelten Hohlfasermembranen analog zur Zellkernfärbung fixiert. Daraufhin wurden die Zellen durch sequentielle Inkubation in unterschiedlich konzentriertem Ethanol (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % (in H₂O) und absolut, jeweils 15 min) dehydratisiert und mit Hexamethyldisilazan (HMDS) als chemisches Trocknungsmittel (erst 50 % in EtOH, 1 h, dann 100 %, 5 min) getrocknet [102]. Anschließend wurden die Zellen auf den Membranen mit Hilfe eines Phenom Pro Tisch-Rasterelektronenmikroskops (REM, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) analysiert. Die Aufnahmen wurden in Kooperation mit Herrn Stefan Belle im Labor von Prof. Dr. Ralf Hellmann, Angewandte Lasertechnik und Photonik, Technische Hochschule Aschaffenburg, Deutschland, durchgeführt.

3.2.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, einzelne Zellen in einer Suspension nach ihrer Struktur, Form und/oder Färbung zu analysieren, indem die Zellen einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem Lichtstrahl vorbei entlang transportiert und detektiert werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens lässt sich beispielsweise die Zellzahl einer Zellsuspension und die Viabilität von Zellen bestimmen. Dabei wird die den Peptiden angehörende organische Verbindung 7-Aminoactinomycin (7-AAD), die spezifisch an der DNA von nicht-viablen Zellen interkaliert [103, 104], genutzt. Weiterhin lassen sich durch fluoreszenzmarkierte Antikörper sowohl Oberflächenmarker als auch intrazelluläre Proteine nachweisen [105].

3.2.3.1. Zellzählung und Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Anzahl und der Viabilität von Zellen einer Zellsuspension wurde diese zunächst zentrifugiert (400 g, 5 min, Raumtemperatur), der Überstand verworfen und die Zellen resuspendiert (PBS, 500 µL). Anschließend wurden 50 µL dieser Zellsuspension mit 20 µL 7-AAD (*BD Via-Probe™ Cell Viability Solution*) versetzt, kurz gevortext, für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, CellWash hinzugegeben (500 µL), erneut gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension am Durchflusszytometer (BD FACSVerse, BD Biosciences) analysiert. Die Zellpopulation wurde zunächst anhand der Größe (*forward scatter*, FSC) und Granularität (*side scatter*, SSC) der Zellen bestimmt, die auf einer linearen Skala analysiert wurden. Die Bestimmung des viablen Anteils der Zellpopulation erfolgte über die exponentielle Darstellung der gemessenen Fluoreszenz (7-AAD PerCP-Cy5.5-A). Die Messungen und Auswertungen erfolgten mittels FACSuite Software (Version 1.05, BD Biosciences). Anhand der folgenden Formel 2 konnte die tatsächliche Zellzahl der ursprünglichen Probe berechnet werden:

Formel 2: Berechnung der Zellzahl in der ursprünglichen Zellsuspension

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Events}}{V_G \times 1000} \times \frac{V_R}{V_P} \times V_Z$$

Events =	Anzahl der gemessenen lebenden Zellen
V_G =	Tatsächlich vom Durchflusszytometer gemessenes Probenvolumen [nL]
V_R =	Gesamtvolumen im Probenröhrchen [µL]
V_P =	Volumen der eingesetzten Zellsuspension [µL]
V_Z =	Volumen der ursprünglichen Zellsuspension [µL]

3.2.3.2. Markeranalyse

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden je $5 \cdot 10^5$ Zellen pro Röhrchen mit FACS-Puffer (PBS + 10 % FCS (fetales Kälberserum)) gewaschen (Zentrifugation: 400 g, 5 min, Raumtemperatur, Überstand verworfen), mit Fix/Perm-Puffer fixiert (30 min, Eis, dunkel), abermals gewaschen und zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der Antikörper mit Normal-Goat-Serum (10 % in PBS, 30 min, Raumtemperatur, dunkel) geblockt. Nach erneutem Waschen wurde zunächst der Primärantikörper (30 min, Raumtemperatur, dunkel) sowie nach einem Waschschrift der konjugierte Sekundärantikörper hinzugegeben (30 min, Raumtemperatur, dunkel). Nach einem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurde die Zellen nach ihrer Größe (FSC, linear) und ihrer Fluoreszenz (FITC-A, exponentiell) bestimmt. Bei Verwendung konjugierter Primärantikörper wurde der Waschschrift jeweils mit Perm/Wash- statt FACS-Puffer durchgeführt.

Tabelle 11: Beschreibung der in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper

Antikörper	Lieferant	Konjugation	Spezies	Verdünnung
Anti-Aquaporin 1	ptglab	-	Maus	1:50
Anti-Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase	abcam	-	Maus	1:50
Anti-Villin	abcam	-	Maus	1:200
Anti-Zytokeratin 18	abcam	FITC	Maus	1:500
Goat Anti-Mouse IgG H&L	abcam	Alexa Fluor® 488	Ziege	1:500

3.2.3.3. Charakterisierung des Stammzellstatus

Mesenchymale Stammzellen exprimieren eine spezifische Kombination aus Oberflächenmarkern, die sich mit Hilfe fluoreszenzmarkierter CD-Antikörper (*Cluster of differentiation*) nachweisen lassen. Sie sind u.a. positiv für CD44, CD73, CD90 und CD105 und gleichzeitig negativ für CD11b, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR [74].

Um diese Kombination aus Oberflächenmarkern nachzuweisen, wurde das *BD Stem-flow™ hMSC Analysis Kit* (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Das Kit wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die Zellen am Durchflusszytometer entsprechend analysiert.

3.2.4. AlamarBlue™-Assay

Der AlamarBlue™- (oder Resazurin-) Assay bietet eine simple und effektive Methode zur *In-vitro*-Analyse der Proliferationsraten von Zellkulturen und zur Durchführung von Zytotoxizitätstests. Der Test beruht auf der Bioreduktion des oxidierten, blauen, nicht fluoreszierenden Farbstoffes Resazurin in seine rosa, fluoreszierende Form Resorufin [106, 107]. Die Fluoreszenz wurde am Fluoreszenz-Mikroplattenreader (Mikrotiterplattenfluorometer FLx800TB, BioTek) ausgewertet.

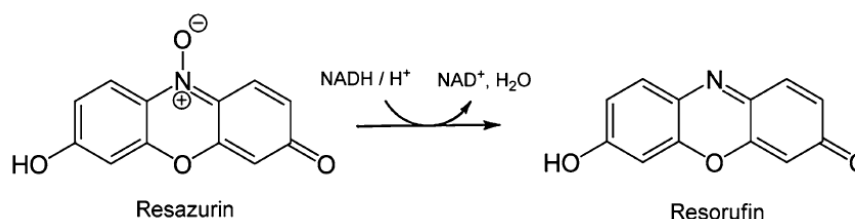


Abbildung 8: Mechanismus der Bioreduktion von Resazurin zu Resorufin [108]

Zur Analyse der Bioreduktion des Resazurins wurden die Zellen in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät und inkubiert. Nach entsprechend des Assays definierten Zeitpunkten wurden je 2 mM Resazurin pro Well hinzugegeben. Nach 1-4 h Inkubationszeit wurden je 70 μL des Überstands pro Well in eine Mikroplattenreader-Platte überführt und die Fluoreszenz (Extinktion: 560 nm, Emission: 590 nm) quantifiziert.

3.2.5. γ -Glutamyltransferase-Assay

Die γ -Glutamyltransferase (γ -GGT, GGT) ist ein membrangebundenes Protein, welches den Transfer von γ -Glutamineinheiten zu Akzeptormolekülen (z.B. Proteine, Peptide) katalysiert. Sie spielt eine Schlüsselrolle im γ -Glutamylzyklus und wird in der humanen Niere am stärksten im proximalen Tubulus exprimiert [109].

Die Analyse der GGT-Aktivität erfolgte mit Hilfe des *γ -Glutamyltransferase (GGT) Activity Colorimetric Assay Kit* (Merck KGaA, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Das Prinzip beruht auf der Entfernung der γ -Glutamylgruppe des Substrates L- γ -Glutamyl-p-Nitroanilin durch das Enzym, wodurch das Chromogen p-Nitroanilin (418 nm) proportional zur GGT-Aktivität entsteht. Zur Analyse der GGT-Aktivität wurden ASCs und PTCs (je $1 \cdot 10^6$ Zellen) in 200 μL eiskaltem GGT-Assay-Puffer homogenisiert. Die optische Dichte wurde am Mikrotiterplattenluminometer (Elx808IU, BioTek) ausgelesen.

Die GGT-Aktivität wurde basierend auf den gemessenen optischen Dichten anhand der folgenden Formel 3 berechnet:

Formel 3: Berechnung der GGT-Aktivität anhand der optischen Dichte

$$\text{GGT Aktivität} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{min}} = \frac{\text{milliunit}}{\text{mL}} \right] = \frac{B \times \text{Proben-Verdünnungsfaktor}}{\text{Reaktionszeit} \times V}$$

B = Menge generiertes p-Nitroanilin zwischen T_{initial} und T_{final} [nmol]
 Reaktionszeit = T_{final} - T_{initial} [min]
 V = Probenvolumen pro Well [mL]

Dabei stellt eine Unit GGT die Menge Enzym dar, die pro Minute bei 37 °C exakt 1 µmol p-Nitroanilin generiert.

3.2.6. Fluoreszenzbasierte Funktionalitäts-Assays

Durch Zugabe von membrangängigen, hydrophilen und nicht fluoreszierenden Farbstoffen, die intrazellulär zu fluoreszierenden Produkten abgebaut werden, und der gleichzeitigen Inhibierung der substratspezifischen Effluxtransporter, wurde in den adhärennten Zellkulturen ein intrazellulärer Fluoreszenzunterschied im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nachgewiesen. Diese Fluoreszenzakkumulation tritt nur bei funktionaler Expression der inhibierten Transporter auf [110].

5-Chloromethylfluorescein-diacetat (CMFDA) und Calcein-AM wurden verwendet, um die Aktivität der Transporter *multidrug resistance protein 4* und *P-glycoprotein* zu evaluieren, wobei MK571 und PSC833 als Inhibitoren der Effluxtransporter dienten. Um die GS-MF Retention (fluoreszierendes Abbauprodukt von CMFDA) zu bestimmen, wurden die Zellen mit CMFDA (0,5 µM in Krebs-Henseleit-Puffer) in Kombination mit 2,5 bzw. 5 µM MK571 inkubiert (30 min), gewaschen (Krebs-Henseleit-Puffer, eiskalt, 2 x), inkubiert (30 min) und anschließend die Fluoreszenz (Extinktion: 492 nm, Emission: 517 nm) gemessen.

Zur Bestimmung der Calcein-Retention wurden die Zellen mit Calcein-AM (1 µM in Krebs-Henseleit-Puffer) in Kombination mit 1 bzw. 0,5 µM PSC833 inkubiert (1 h), gewaschen (Krebs-Henseleit-Puffer, eiskalt, 2 x), mit Triton X-100 (1 %) lysiert, inkubiert (1 h) und die Fluoreszenz (Extinktion: 485 nm, Emission: 530 nm) gemessen.

3.2.7. Statistische Methoden

Die Messergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Die statistische Analyse wurde für normal verteilte Daten mittels zweifacher ANOVA gefolgt von einem paarweisem Post-hoc-Vergleich nach Tukey mit der Software Minitab® 17 (Additive GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland) durchgeführt. Bei nicht normal verteilten Daten wurde der Friedman-Test für nicht-parametrische statistische Tests genutzt. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3.3. *In-vitro*-Differenzierungsprotokolle

3.3.1. Adipogene Differenzierung

Zur adipogenen Differenzierung von ASCs *in-vitro* wurden diese bis zur Konfluenz expandiert. Die konfluente Kultur wurde durch einen dreimaligen Zyklus aus Induktion und Aufrechterhaltung optimal zur Differenzierung stimuliert. Jeder Zyklus bestand aus einer dreitägigen Inkubation mit adipogenem Differenzierungsmedium, sowie einer eintägigen Inkubation im Erhaltungsmedium (Zusammensetzung vgl. Tabelle 12). Nach Abschluss der drei Zyklen wurden die Zellen sieben Tage im Erhaltungsmedium inkubiert. Die adipogene Differenzierung wurde mittels Oil-Red-O-Färbung nachgewiesen.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Medien zur adipogenen Differenzierung und zur Erhaltung des Differenzierungsstatus von ASCs

	Differenzierungsmedium	Erhaltungsmedium
Fetales Kälberserum	10 %	10 %
Insulin	10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$
3-Isobutyl-1-methylxanthin	1 mM	-
Dexamethason	1 μM	-
Indomethacin	0,1 mM	-

3.3.2. Osteogene Differenzierung

Um ASCs *in-vitro* zu Osteoblasten zu differenzieren, wurden die ASCs bis zur Konfluenz proliferiert und anschließend für 21 d in einem osteogenen Differenzierungsmedium (Zusammensetzung vgl. Tabelle 13) kultiviert. Die osteogene Differenzierung wurde durch eine Alizarin-Red-S-Färbung nachgewiesen.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Mediums zur osteogenen Differenzierung von ASCs

	Differenzierungsmedium
Fetales Kälberserum	10 %
β-Glycerophosphat	10 mM
Ascorbinsäure	0,1 mM
Dexamethason	0,1 μM

3.3.3. Chondrogene Differenzierung

Die Differenzierung von ASCs in Chondrozyten wird durch Zellkulturbedingungen ermöglicht, die eine hohe Zelldichte erlauben, wie beispielsweise 3D-Spheroide [111].

Zur Spheroidbildung wurden $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in einer unbehandelten 96-Well U-Boden-Platte in Standardmedium ausgesät, woraus sich nach 24-48 h Inkubation spontan Spheroide bildeten. Die Spheroide wurden für 21 d in *MSC-Chondrogenic-Differentiation-Medium* (PromoCell GmbH, Heidelberg) inkubiert, wobei alle drei Tage das Medium gewechselt wurde. Die chondrogene Differenzierung wurde über eine Alcian-Blau-Färbung nachgewiesen.

3.3.4. Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu proximalen Tubuluszellen

Um ASCs *in-vitro* zu proximalen Tubuluszellen zu differenzieren, wurden diese mit verschiedenen löslichen Differenzierungsfaktoren (vgl. Tabelle 14) für bis zu 35 Tage inkubiert, wobei alle vier Tage das Nährmedium gewechselt wurde.

Tabelle 14: Konzentration der verwendeten Differenzierungsfaktoren im Differenzierungsmedium

Differenzierungsfaktor	Konzentration (niedrig)	Konzentration (hoch)
ATRA	2,5 μM	5 μM
Aktivin A	5 ng/mL	10 ng/mL
BMP-7	25 ng/mL	50 ng/mL

3.4. Histologische Färbemethoden

3.4.1. Oil-Red-O-Färbung

Der fettlösliche Azofarbstoff Oil-Red-O aus der Gruppe der Sudan-Farbstoffe wird in der Histologie zur Darstellung von Lipiden verwendet, wobei die Färbung auf einer höheren Affinität des Farbstoffes zu Fett als zu seinem Lösungsmittel beruht. Ausdifferenzierte Adipozyten können über die Färbung intrazellulärer Lipid-Tropfen charakterisiert werden [112].

Für die Oil-Red-O-Färbung wurden die Zellen zunächst gewaschen (PBS), mit Paraformaldehyd (4 %, 1 h, Raumtemperatur) fixiert, mit H₂O gewaschen und getrocknet (1 h, Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen mit Oil-Red-O (0,5 %, 5 min, Raumtemperatur) gefärbt sowie erneut mit H₂O gewaschen (3 x). Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

3.4.2. Alizarin-Red-S-Färbung

Der Farbstoff Alizarin-Red-S wird zur histologischen Charakterisierung von Calcium genutzt und ermöglicht den Nachweis von Kalkablagerungen in Geweben [113]. Dabei bildet er durch Chelation an Calcium das rot erscheinende Alizarin-Red-S-Calcium. Die Alizarin-Red-S-Färbung stellt eine gängige Methode dar, um calciumhaltige Osteozyten in differenzierten Osteoblasten nachzuweisen und ist somit ein Indikator für eine erfolgreiche Differenzierung von ASCs in Osteoblasten [114].

Zur Färbung der extrazellulären Calcium-Ablagerungen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Paraformaldehyd (4 %, 30 min, Raumtemperatur) fixiert, mit H₂O erneut gewaschen (3 x), mit der Alizarin-Red-S-Lösung (5 min, Raumtemperatur, dunkel) gefärbt sowie abschließend erneut mit H₂O gewaschen. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

3.4.3. Alcian-Blau-Färbung

Die Differenzierung von ASCs zu Chondrozyten in 3D-Spheroidkulturen führt zu einer Knorpelbildung inklusive charakteristischer extrazellulärer Matrix. Das Proteoglykan Aggrecan stellt eines der wichtigsten Moleküle innerhalb der Knorpelmatrix dar und wurde als Indikator für die Knorpelbildung durch den Farbstoff Alcian-Blau nachgewiesen [115].

Zur Detektion des Aggrecans wurden die Spheroide zunächst vorsichtig mit PBS gewaschen, mit Saccomanno Fixation Solution (3 h, Raumtemperatur) fixiert, gewaschen (H₂O, 2 x) und mit der Alcian-Blau-Lösung (45 min, Raumtemperatur, dunkel) gefärbt. Anschließend wurden die Spheroide mit Entfärbelösung (EtOH in Essigsäure 3:2, 10 min, 2 x) gewaschen, in PBS aufgenommen und analysiert.

3.5. Arbeiten mit Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren

Um während der Arbeiten mit Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren das Kontaminationsrisiko so gering wie möglich zu halten, wurden sämtliche verwendete Lösungen über eine sterile Spritze aufgezogen. Jegliche Arbeitsschritte an den Modulen wurden darüber hinaus auf einer Sterilwerkbank durchgeführt. Weiterhin war luftblasenfreies Arbeiten essentiell, mögliche Luftblasen in den Modulen wurden durch vorsichtiges Klopfen entfernt.

3.5.1. Hydrophilisierung der Bioreaktoren

Aufgrund ihrer Hydrophobie mussten die Polypropylen-Membranen zunächst durch Spülen mit Ethanol hydrophilisiert werden, bevor sie mit Zellen besiedelt werden konnten. Dazu wurden 3 mL Ethanol (70 %) im Intrakapillarraum zwischen Ein- und Ausgang hin und her sowie über die jeweiligen Spritzen erzeugten Unterdruck über die Membran in den Außenraum und wieder zurück gespült, und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ethanol wurde anschließend verworfen, mögliche verbliebene Ethanolreste durch zweimaliges Spülen mit H₂O (5 mL, Inkubation jeweils 1 min, Raumtemperatur) entfernt, wobei die Durchführung analog zur Hydrophilisierung erfolgte. Nach der Hydrophilisierung konnte mit den Polypropylen- und Polyethersulfon-Membranen parallel gearbeitet werden.

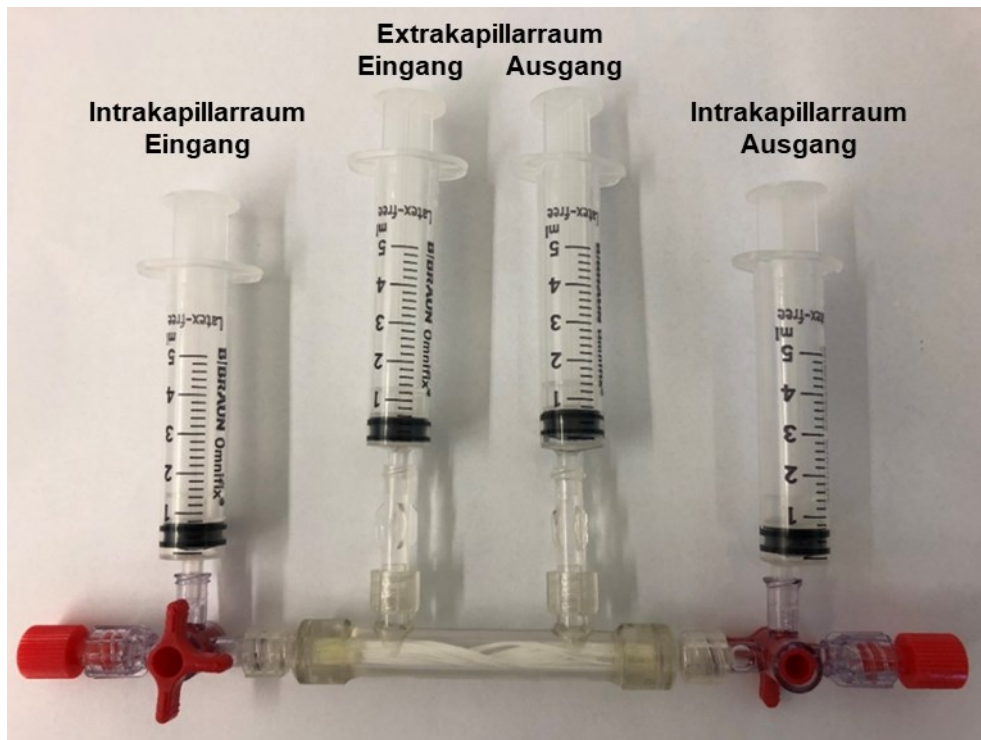


Abbildung 9: Setup für die Arbeiten mit Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren

Der Intrakapillarein- bzw. -ausgang ist mit 4-Wege-Hähnen und Spritzen, der Extrakapillarein- bzw. -ausgang nur mit Spritzen zum Hinzugeben oder Entfernen der Flüssigkeiten versehen.

3.5.2. Aufbau des Besiedlungssetups

Das Setup zur Zellbesiedlung von Hohlfasern in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren bestand aus einer peristaltischen Pumpe (Ismatec® IPC, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim), die präzise sehr niedrige Flussraten ermöglichte und einem Reservoir für Medien inklusive Sterilfilter, der den Gasaustausch der Medien mit der Umgebung sicher stellte. Die Bioreaktoren wurden über Schläuche einem thermoplastischen Elastomer (PharMed® BPT, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim) mit einem Innendurchmesser von 1,52 mm mit dem Reservoir verbunden (Abbildung 10). Um ein leichteres Handling zu ermöglichen (für den Transport in den CO₂-Inkubator), befand sich der Aufbau in einem selbst angefertigten Plexiglasgestell.

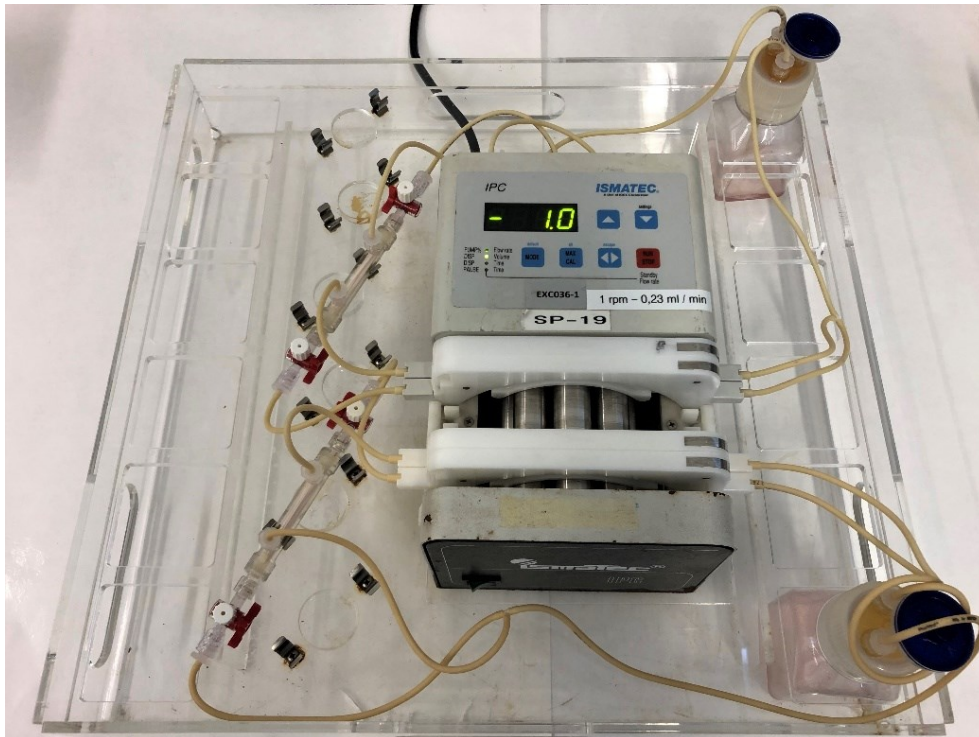


Abbildung 10: Setup zur Besiedlung von Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren

Zu sehen ist die peristaltische Pumpe, die Reservoire mit den Sterilfiltern, sowie die integrierten Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren.

Sterilisierte Schlauchsets wurden mit den jeweiligen Modulausgängen der Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren verbunden, um sowohl einen intra- als auch extrakapillaren Mediumfluss zu gewährleisten, die Reservoire mit 30 mL PBS befüllt, die gesamten Sets in den Pumpkreislauf angeschlossen und für 24-72 h bei einem Volumenstrom von 1,2 mL/min bei 37 °C und 5 % CO₂ gespült, um mögliche Verunreinigungen aus der Produktion und mögliche verbliebene Ethanolreste aus den Membranen zu entfernen.

3.5.3. Beschichtung und Äquilibrierung vor der Zellbesiedlung

Zur Beschichtung der Membranen mit Fibronectin wurden die Module zunächst vom jeweiligen Schlauchset getrennt und der Innen- und Außenraum geleert, um eine mögliche Verdünnung der Fibronectinlösung zu verhindern. Das Fibronectin (3 mL, 10 µg/mL in PBS) wurde zur Beschichtung der Membraninnenseite zunächst in den Intrakapillarraum sowie anschließend über die Membran in den Außenraum gespült. Zur Beschichtung der Membranaußenseite wurde in umgekehrter Reihenfolge gespült. Die Module wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ für 1 h inkubiert, wobei die Module nach 30 min um 180° gewendet wurden, um eine optimale Verteilung des Fibronectins zu gewährleisten. Nach der

Beschichtung wurden die Module erneut an die Schlauchsets angeschlossen und die Membranen bei einem Volumenstrom von 0,15 mL/min bei 37 °C und 5 % CO₂ für 1 h mit Nährmedium äquilibriert.

3.5.4. Besiedlung der funktionalisierten Membranoberflächen

Zur Zellbesiedlung der Oberflächen der Hohlfasermembranen in den Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren wurden je nach Zelltyp und Assay unterschiedliche Besiedlungsdichten verwendet. Jeweils 3 mL der jeweiligen Zellsuspension wurde in den zu besiedelnden Raum der Module gebracht. Dabei wurde die Suspension zunächst im Intrakapillarraum (für die Innenbesiedlung) oder im Außenraum (Besiedlung der Außenoberfläche) gespült. Anschließend wurden die Zellen durch Filtration der Zellsuspension über die Membran durch den so entstehenden Filtrationsdruck leicht an die Membranen gedrückt, wodurch eine Adhäsion der Zellen an die Membran unterstützt werden sollte. Die Module wurden bei 37 °C statisch inkubiert, wobei die Module je nach Zelltyp zwischenzeitlich um 180° gewendet wurden, um eine einseitige Zellbesiedlung durch Sedimentierung der Zellen innerhalb der Kapillaren bzw. Module zu verhindern. Dabei wurden die Zeitpunkte anhand der beobachteten Adhärenzdauer in der 2D-Zellkulturumgebung ausgewählt:

- ASCs: Alle 4 min, bis Minute 24, dann alle 30 min bis Minute 180
- HUVECs: Alle 5 min, bis Minute 30, dann alle 30 min bis Minute 90
- HRPTEpCs: Nach 4 h, dann Inkubation über Nacht

Zur Ko-Kultur von ASCs auf der Innen- und HUVECs auf der Außenseite der Membranen wurde zunächst die Innenseite (2 h) und anschließend die Außenseite (1,5 h) besiedelt.

Anschließend konnten die Module entweder auf ihre Besiedlungsdichte analysiert oder zur weiteren Inkubation (d.h. Untersuchung der Proliferation der Zellen über einen längeren Zeitraum) erneut an den Nährmedienkreislauf (Volumenstrom 0,15 mL/min, 37 °C, 5 % CO₂) angeschlossen werden.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung proximaler Tubuluszellen

4.1.1. Vergleich der Phänotypen von ASCs und PTCs

Um primäre proximale Tubuluszellen durchflusszytometrisch auf ihre Expression der spezifischen Marker AQP1, CK18, Na⁺-/K⁺-ATPase und Villin 1 zu analysieren, wurden *human renal proximal tubule epithelial cells* (hRPTEpC) zunächst im *REBM™ Renal Epithelial Cell Basal Medium + REBM™ SingleQuots®* und ASCs unter Standardbedingungen bis zur Konfluenz proliferiert. Dabei wurden die Zellmorphologien unter täglicher mikroskopischer Kontrolle miteinander verglichen. Zur Analyse der Markerexpression in hRPTEpCs und ASCs wurden die Zellen in Suspension genommen, fixiert und nach der entsprechenden Antikörperfärbung (Konzentration vgl. Tabelle 11) durchflusszytometrisch analysiert.

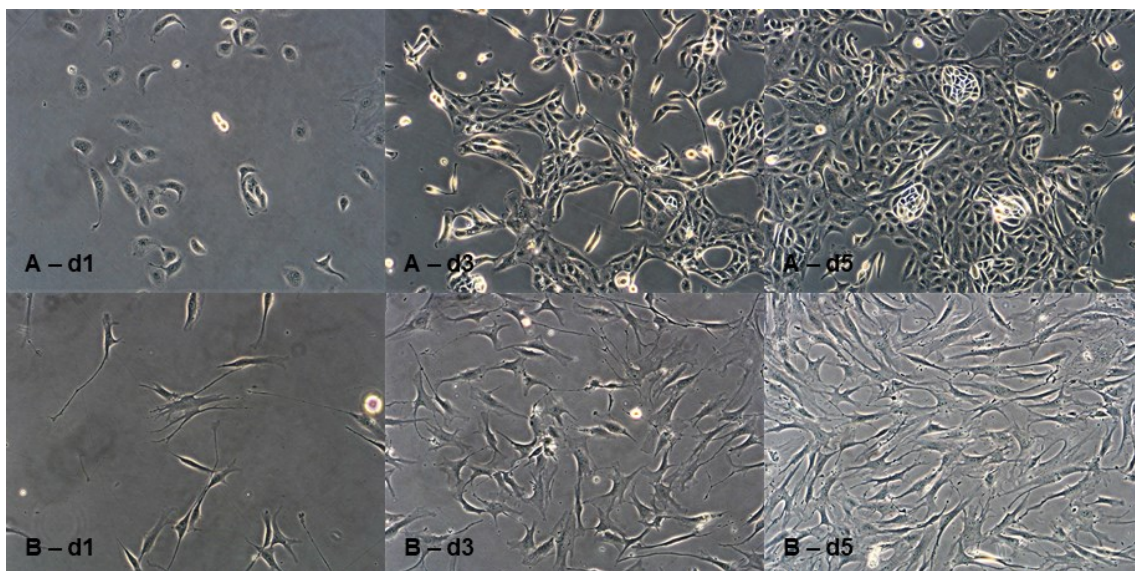
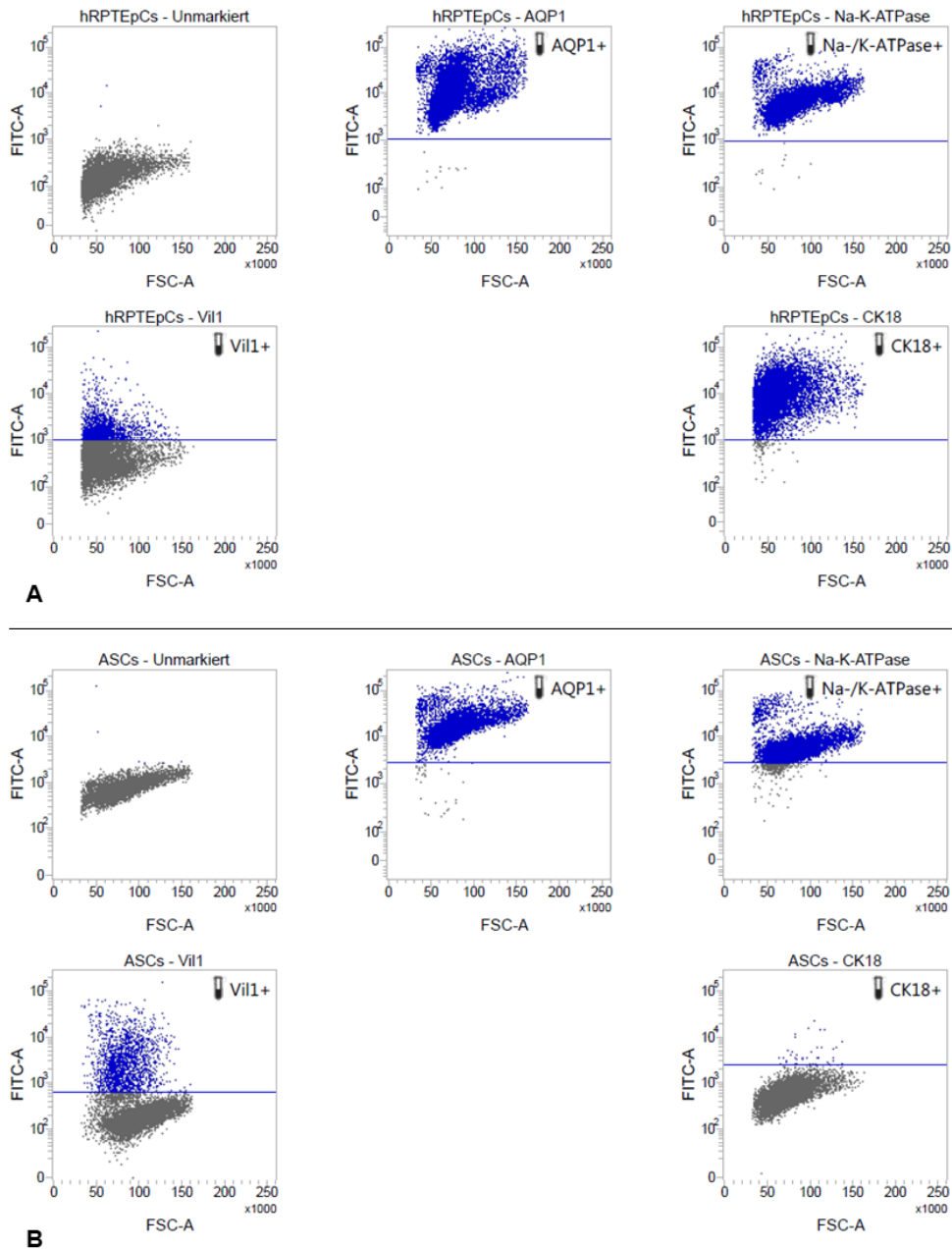


Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von hRPTEpCs und ASCs

Die Aufnahmen zeigen proliferierende Zellkulturen von hRPTEpCs (A, Aussaatdichte: $4 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2) und ASCs (B, Aussaatdichte: $5 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2) jeweils an Tag 1, 3 und 5 nach Aussaat der Zellen. Proliferierende hRPTEpCs zeigten die typische Zellmorphologie eines isoprismatischen Epithels mit nahezu würfelförmiger Gestalt der Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten die ASCs eine Morphologie mit diffusem, deutlich weitreichenderem Zytoplasma (Vergrößerung: 100x).

Die optische Kontrolle der Zellmorphologie am Phasenkontrastmikroskop zeigte deutliche Unterschiede in Form und Größe von hRPTEpCs und ASCs (Abbildung 11). Bereits an Tag 1 nach Aussaat war die typische Spiegeleiform der ASCs mit raumgreifendem, zerklüftetem Zytoplasma zu sehen. Weiterhin bildeten die ASCs während der Proliferation vermehrt Zellausläufer und behielten ihre Erscheinung bei. Im Gegensatz dazu zeigten die hRPTEpCs bereits an Tag 1 die für ein einschichtiges, isoprismatisches Epithel typische, beinahe würfelförmige Gestalt mit vereinzelt langen Zellausläufern. Zusätzlich zeigten sie an Tag 5 nach Aussaat bereits erste Kuppelbildungen, was auf ein ausgereiftes Epithelium und unidirektionellen Wassertransport schließen lässt [116].



hRPTEpCs - Statistiken				ASCs - Statistiken			
Name	Events	% Total	% Parent	Name	Events	% Total	% Parent
AQP1:AQP1+	8,047	80.47	99.83	AQP1:AQP1+	8,002	80.02	99.54
ATPase:Na-/K-ATPase+	8,070	80.70	99.85	ATPase:Na-/K-ATPase+	7,218	72.18	91.06
PTC villin:Tube:Vil1+	1,405	14.05	21.67	ASC villin:Tube:Vil1+	1,732	17.32	18.76
PTC CK18:Tube:CK18+	7,557	75.57	98.87	ASC CK18:Tube:CK18+	32	0.32	0.34

Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse von hRPTEpCs und ASCs

Dargestellt sind zum einen die unmarkierten Zellen, zum anderen Zellpopulationen, die mit Antikörpern gegen AQP1, Na⁺-/K⁺-ATPase, Vil1 und CK18 markiert sind, jeweils nach ihrer Größe (FSC-A) und der Fluoreszenzintensität (FITC-A). Die blau dargestellten Zellen oberhalb des Gatings sind jeweils für den entsprechenden Marker positiv, die unterhalb des Gatings liegenden Zellen sind für den entsprechenden Marker negativ. Die abgebildeten Statistiken zeigen die quantitative Auswertung des für die verschiedenen Marker positiven Anteils der Gesamtpopulation (% Parent). (A) Darstellung der analysierten hRPTEpCs. (B) Darstellung der analysierten ASCs.

Die nach der Proliferation durchgeführten durchflusszytometrischen Markeranalysen von hRPTEpCs und ASCs sind in Abbildung 12 dargestellt. Sowohl die unmarkierten hRPTEpCs, als auch die unmarkierten ASCs bildeten eine homogene Zellpopulation. Die hRPTEpCs waren für die tubulusspezifischen Marker AQP1 (99,8 % der analysierten Zellen), Na⁺-/K⁺-ATPase (99,9 %) und CK18 (98,9 %) positiv. Hingegen konnten in nur 21,7 % der analysierten Zellen eine Villin 1-Expression nachgewiesen werden. Ebenso war eine Expression von AQP1 (99,5 %) und der Na⁺-/K⁺-ATPase (91,1 %) in nahezu allen ASCs zu beobachten, wohingegen Villin 1 nur in 18,8 % der Zellen exprimiert wurde. Die Zytokeratin 18-Expression in ASCs unterschied sich mit 0,3 % positiven Zellen deutlich von der in hRPTEpCs.

4.1.2. Aktivität der γ -Glutamyltransferase

Zur weiteren eindeutigen Charakterisierung der proximalen Tubuluszellen wurde die Aktivität der γ -Glutamyltransferase, einem membrangebundenen Protein analysiert, welches in der humanen Niere am stärksten im proximalen Tubulus exprimiert wird [109]. Die Messung der Enzymaktivität in hRPTEpCs und ASCs erfolgte kolorimetrisch anhand des γ -Glutamyltransferase (GGT) Activity Colorimetric Assay Kit (Merck KGaA, Darmstadt).

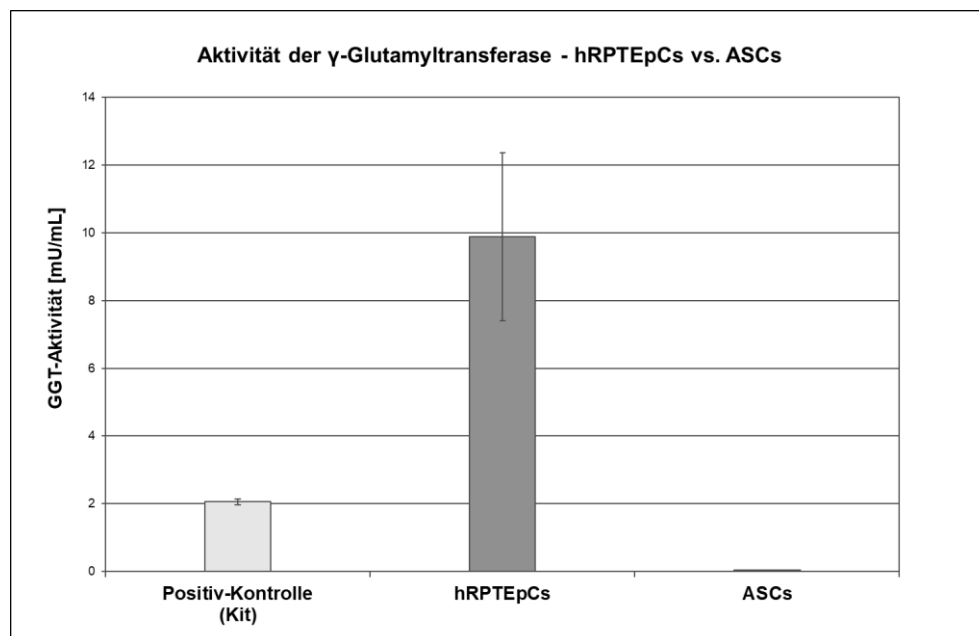


Abbildung 13: Aktivität der GGT in ASCs und hRPTEpCs

Abgebildet ist die Aktivität der GGT in ASCs und hRPTEpCs sowie der Positiv-Kontrolle des Kit-Herstellers, um die Funktionalität des Assays zu bestätigen (n = 2). Im Vergleich zu ASCs wiesen die hRPTEpCs eine um ca. 25-fach höhere Aktivität auf.

Abbildung 13 zeigt eine graphische Abbildung der aus den gemessenen optischen Dichten berechneten Aktivität der GGT in hRPTEpCs und ASCs (vgl. Formel 3). Die Aktivität der GGT in hRPTEpCs lag bei $9,9 \pm 2,5$ mU/mL, in ASCs konnte mit $0,4 \pm 0,0$ mU/mL nahezu keine GGT-Aktivität gemessen werden.

4.1.3. Funktionale Expression und Effluxaktivität von MRP4 und P-gp

Um die Transportaktivität des *multidrug resistance protein 4* und des *P-glycoprotein* in kultivierten hRPTEpCs zu analysieren, wurde die Aktivität der jeweiligen Transporter durch Zugabe spezifischer Inhibitoren inhibiert [110]. Die Aktivität der ABC-Transporter MRP4 und P-gp wurde in An- und Abwesenheit der Inhibitoren MK571 bzw. PSC833 analysiert und miteinander verglichen. Die Substrate CMFDA (für MRP4) und Calcein-AM (für P-gp) generieren nach intrazellulärer Hydrolyse durch Esterasen im Zytoplasma fluoreszierende Eigenschaften, wobei CMFDA zu Carboxylfluorescein-Gluthathion (GS-MF) konjugiert wird. Die fluoreszenten Endprodukte des intrazellulären Abbaus wurden jeweils zur Bestimmung der Transportaktivität von MRP4 (GS-MF) und P-gp (Calcein) genutzt. Aus der gemessenen Fluoreszenzretention konnte die Aktivität der Transporter berechnet werden.

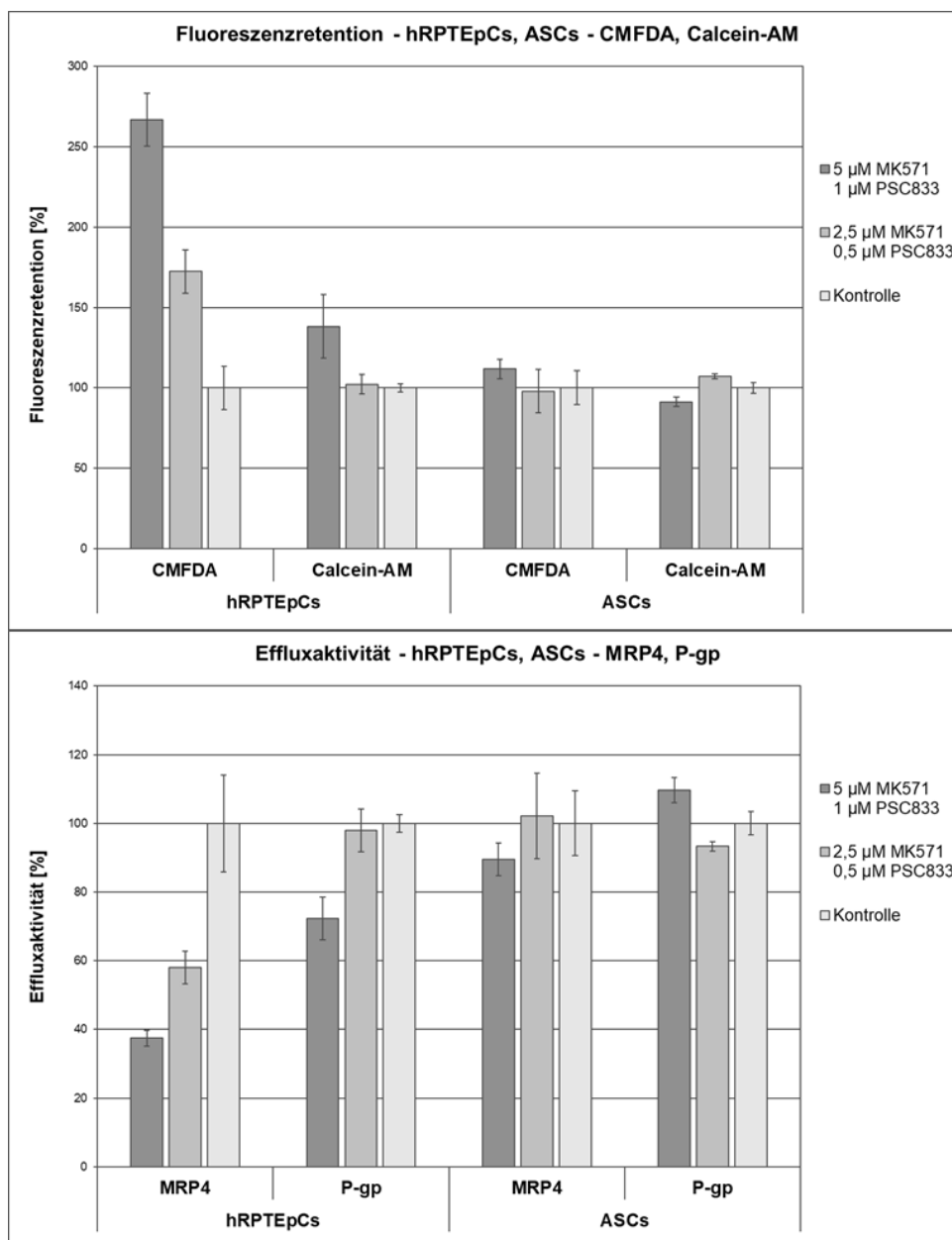


Abbildung 14: Fluoreszenzretention und Effluxaktivität

Die Abbildung zeigt die gemessene Fluoreszenzretention (oben) und die daraus errechnete Effluxaktivität der untersuchten Transporter MRP4 und P-gp (unten) für die jeweiligen Substrate CMFDA und Calcein-AM bzw. deren fluoreszenten Abbauprodukte (GS-MF bzw. Calcein) in An- und Abwesenheit der Inhibitoren MK571 (5 bzw. 2,5 μ M) und PSC833 (1 bzw. 0,5 μ M) in hRPTEpCs und ASCs (n = 5). Die Kontrollen (Fluoreszenzretention bzw. Effluxaktivität in Abwesenheit der Inhibitoren) wurden normalisiert. Die Daten sind im Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle abgebildet. Die aus der GS-MF Retention berechnete Effluxaktivität des MRP4 ließ sich in hRPTEpCs auf 38 % der unbehandelten Kontrolle inhibieren. Die Effluxaktivität des P-gp in hRPTEpCs zeigte nach Inhibierung eine Reduktion auf 72 % der Aktivität der unbehandelten Kontrolle.

Da die Inhibierung der Effluxaktivität in der Akkumulation der fluoreszenten Abbauprodukte GS-MF und Calcein der zugegebenen Substrate CMFDA und Calcein-AM resultiert, wird die Effluxaktivität als Inversion der Fluoreszenzintensität abgebildet. Die Effluxaktivität wurde durch Normalisierung der Intensität der intrazellulären Fluoreszenzretention berechnet. Dabei wurde das Verhältnis der Intensität in den zu untersuchenden Zellen (mit Inhibitor) zur Intensität in Kontrollzellen (ohne Inhibitor) dargestellt.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, erhöhte sich die intrazelluläre Akkumulation in hRPTEpCs von GS-MF in Anwesenheit von 5 μM des Inhibitors MK571 etwa um das 2,6-fache ($267 \pm 17 \%$; $p < 0.05$ zur unbehandelten Kontrolle) und in Anwesenheit von 2,5 μM um das 1,7-fache ($172 \pm 14 \%$; $p < 0.05$ zur unbehandelten Kontrolle) im Vergleich zu nicht inhibierten hRPTEpCs. In ASCs konnte kein signifikanter Unterschied ($111 \pm 6 \%$ bzw. $98 \pm 14 \%$) in der Fluoreszenzretention gemessen werden. Die aus der Retention berechneten Effluxaktivitäten der MRP4 lagen in hRPTEpCs unter Inhibierung mit 5 μM MK571 bei $38 \pm 2 \%$ und mit 2,5 μM MK571 bei $58 \pm 4 \%$ der nicht inhibierten Kontrolle. Die Effluxaktivität in ASCs zeigte keinen Unterschied zwischen mit MK571 behandelten (90 \pm 5 % für die hohe, 102 \pm 12 % für die niedrige Inhibitorkonzentration) und unbehandelten Kontrollen.

Die intrazelluläre Akkumulation von Calcein, dem fluoreszenten Abbauprodukt von Calcein-AM, in hRPTEpCs erhöhte sich in Anwesenheit von 1 μM des P-gp-Inhibitors PSC833 etwa um das 1,4-fache ($138 \pm 9 \%$; $p < 0.05$ zu nicht inhibierter Kontrolle), wohingegen für die niedrige Konzentration (0,5 μM) keine Erhöhung (102 \pm 6 %) verglichen mit der unbehandelten Kontrolle zu beobachten war. In ASCs war für beide Konzentrationen keine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle zu sehen (91 \pm 3 % bzw. 107 \pm 2 %).

Die errechneten Effluxaktivitäten des P-gp für Calcein lagen in hRPTEpCs nach der Inhibierung durch die hohe PSC833 Konzentration mit 72 \pm 6 % unter der der nicht inhibierten Kontrollzellen. Bei Inhibierung durch die niedrige PSC833-Konzentration zeigte P-gp mit 98 \pm 5 % die gleiche Aktivität wie in nicht inhibierten Kontrollzellen. In ASCs unterschied sich die Aktivität (110 \pm 4 % für 1 μM und 93 \pm 2 % für 0,5 μM) sowohl bei Inhibierung durch die hohe, als auch durch die niedrige Konzentration nicht von der Aktivität in den Kontrollzellen.

4.2. *In-vitro*-Differenzierung von ASCs zu PTCs in der 2D-Zellkultur

Um ASCs *in-vitro* in der standardisierten 2D-Zellkulturumgebung zu proximalen Tubuluszellen zu differenzieren, wurden diese unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen löslicher Differenzierungsfaktoren, All-Trans-Retinoinsäure, Aktivin A und BMP-7, kultiviert.

Einfluss der Konzentration der Differenzierungsfaktoren auf den Differenzierungsstatus

Um die Abhängigkeit der Differenzierung von der jeweiligen Konzentration der Differenzierungsfaktoren zu analysieren, wurde die Differenzierung zunächst mit einem niedrig (2,5 μ M ATRA, 5 ng/mL Aktivin A, 25 ng/mL BMP-7) und einem hoch konzentrierten (5 μ M ATRA, 10 ng/mL Aktivin A, 50 ng/mL BMP-7) Ansatz durchgeführt. Der Differenzierungsstatus wurde durchflusszytometrisch über die CK18-Expression und die Aktivität der γ -Glutamyltransferase zum jeweiligen Zeitpunkt kontrolliert. Die bei einer Aussaatdichte von $5 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2 nach jeweils 7, 21, 28 und 35 Tagen der Kultivierung mit bzw. ohne Differenzierungsfaktoren durchgeführten Analysen sind in den Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellt. Die quantitativen Auswertungen der Analysen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

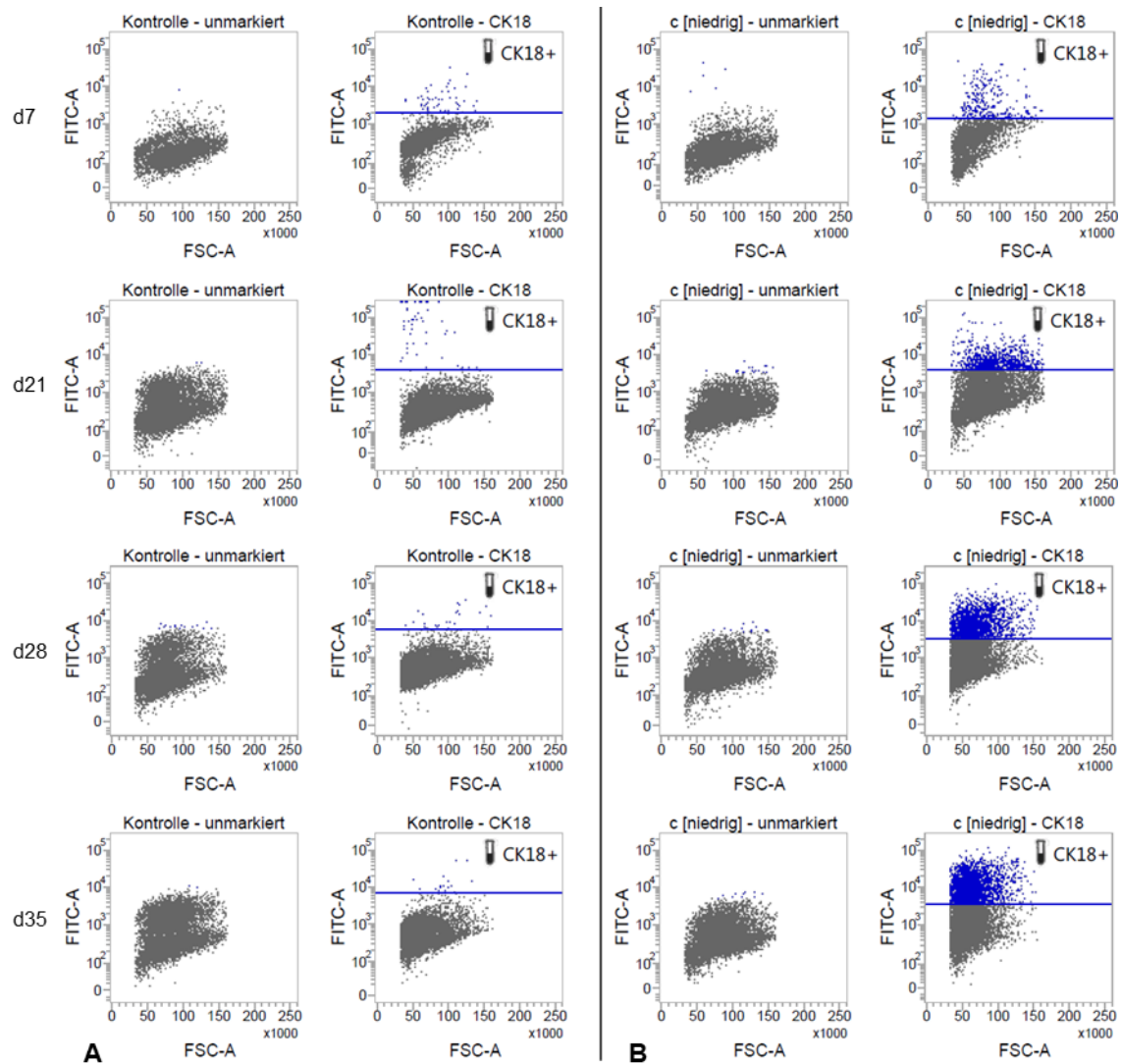


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse von undifferenzierten bzw. differenzierten ASCs

(A) Dot-Blots der im Standardmedium kultivierten Kontrollen (B) Dot-Blots der mit der niedrigen Konzentration der Differenzierungsfaktoren kultivierten ASCs. Dargestellt sind jeweils unmarkierte und mit Antikörpern gegen CK18 markierte Zellpopulationen nach 7, 21, 28 und 35 Tagen in Kultur, jeweils nach ihrer Größe (FSC-A) und der Fluoreszenzintensität (FITC-A). Über die Dauer der Kultivierung war eindeutig eine Zunahme der CK18 positiven Zellen zu sehen, wohingegen die unbehandelten Kontrollen keine Veränderung zeigten.

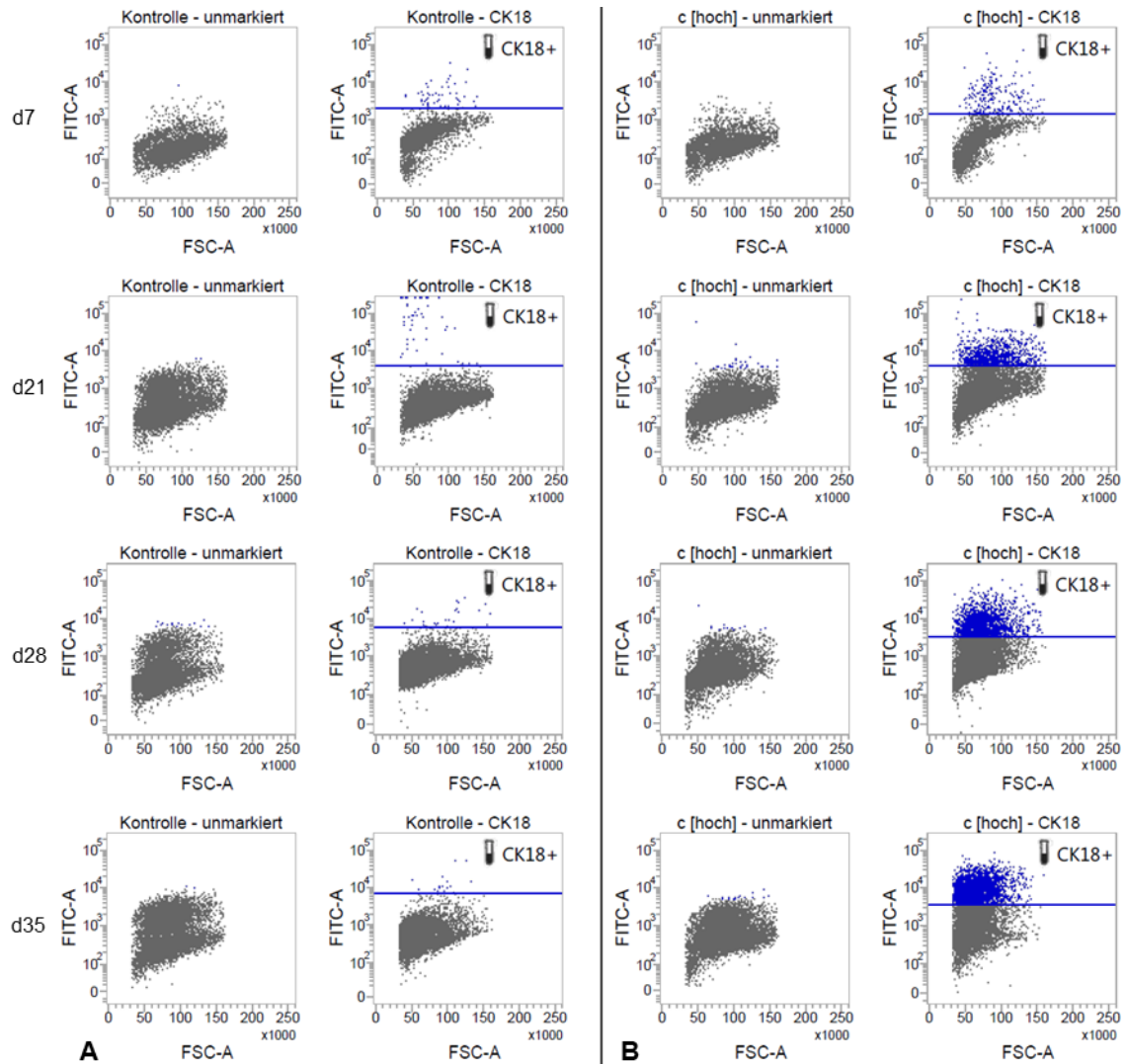


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analysen von undifferenzierten bzw. differenzierten ASCs

(A) Dot-Blots der Kontrollen. (B) Dot-Blots der mit der hohen Konzentration der Differenzierungsfaktoren differenzierten ASCs. Es sind jeweils unmarkierte und CK18 markierte Zellpopulationen nach 7, 21, 28 und 35 Tagen in Kultur dargestellt. Mit längerer Kulturdauer stieg der Anteil der CK18-positiven Zellen der mit den Differenzierungsfaktoren kultivierten ASCs, wohingegen die unbehandelte Kontrolle keine Veränderung in der Zellpopulation zeigte.

Tabelle 15: Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen der undifferenzierten bzw. differenzierten ASCs

Tag	Anteil CK18-positiver Zellen an der Gesamtzellpopulation		
	Kontrollen	Konzentration der Differenzierungsfaktoren	
		niedrig	hoch
7	1,3 %	6,7 %	7,5 %
21	0,7 %	10,7 %	11,6 %
28	0,3 %	25,1 %	20,6 %
35	0,2 %	33,7 %	32,4 %

In den kultivierten Kontrollzellen konnte zu keinem Zeitpunkt eine nennenswerte CK18-Expression nachgewiesen werden (maximal 1,3 % an Tag 7). Im Gegensatz dazu ließ sich für beide getesteten Konzentrationen der Differenzierungsfaktoren eine Zunahme der CK18-positiven Population über die Dauer der Kultivierung beobachten (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 16, sowie Tabelle 15). Die Zellpopulation änderte sich von einer noch fast homogenen Verteilung an Tag 7 unterhalb des CK18-Gatings zu einer heterogenen Population mit zunehmender Anzahl im Gate. So waren nach 7 Tagen 6,7 % bzw. 7,5 % der Zellen positiv für CK18, nach 21 Tagen bereits 10,7 % bzw. 11,6 %. Nach 35 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium präsentierten 33,7 % der mit der niedrigen Konzentration behandelten und 32,4 % der mit der hohen Konzentration behandelten Zellen einen für CK18-positiven Phänotypen. Es fand sich ferner kein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Konzentrationen, ASCs zu einem für den tubulusspezifischen Marker CK18 positiven Zelltyp zu differenzieren.

Vergleich der Aktivität der γ -Glutamyltransferase in undifferenzierten bzw. differenzierten Zellen

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen CK18-Analyse wurde zum jeweiligen Zeitpunkt die GGT-Aktivität in den Zellen gemessen.

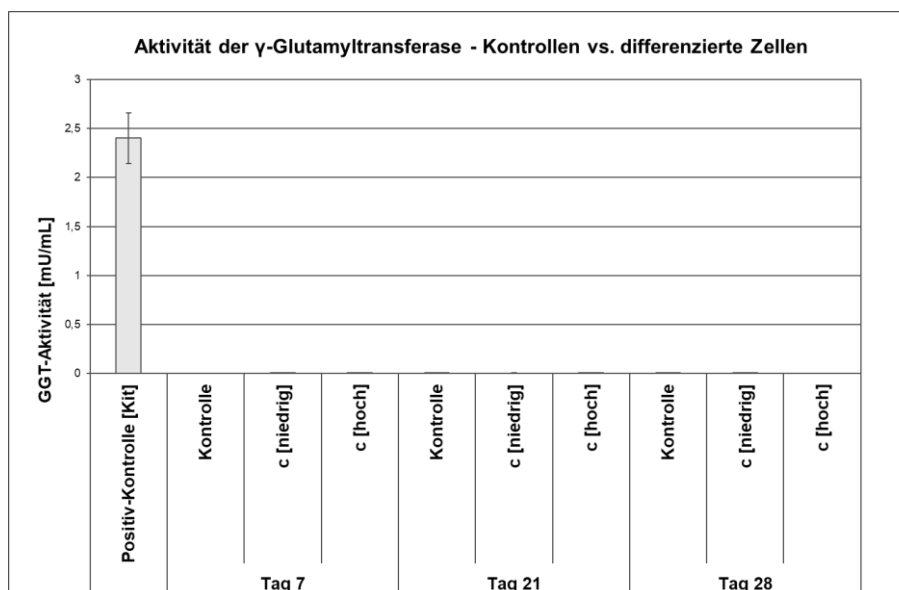


Abbildung 17: GGT-Aktivität in Kontrollzellen und differenzierten ASCs

Abgebildet ist die aus den optischen Dichten berechnete GGT-Aktivität in undifferenzierten Kontrollzellen und differenzierten ASCs für die beiden verwendeten Konzentrationen der Differenzierungsfaktoren jeweils nach 7, 21 und 28 Tagen in Kultur. Zu keinem Zeitpunkt konnte GGT-Aktivität nachgewiesen werden.

Wie in Abbildung 17 zu sehen, zeigten sowohl die Kontrollzellen, als auch die mit den beiden verwendeten Konzentrationen der Differenzierungsfaktoren differenzierten ASCs zu keinem der Messzeitpunkte eine nachweisbare GGT-Aktivität. Durch die Positiv-Kontrolle konnte die Funktionalität des Assays bestätigt werden.

Aufgrund der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse wurde in allen weiteren Differenzierungsexperimenten ausschließlich die niedrige Konzentration der Differenzierungsfaktoren angewendet sowie der Differenzierungsstatus über die CK18-Expression nachgewiesen.

Differenzierung von ASCs zu PTCs aus Zellen unterschiedlicher Herkunft

Das Differenzierungsprotokoll wurde anschließend analog mit ASCs aus zwei weiteren unterschiedlichen Quellen mit der niedrigen Konzentration der Differenzierungsfaktoren wiederholt. ASC1 beschreibt dabei kommerziell verfügbare Zellen, ASC2 und ASC3 jeweils aus Fettgewebe zweier verschiedener Patienten isolierte und aufgereinigte Sponderzellen. Die Analysen erfolgten analog zum vorherigen Versuch. Es werden nur die quantitativen Ergebnisse dargestellt.

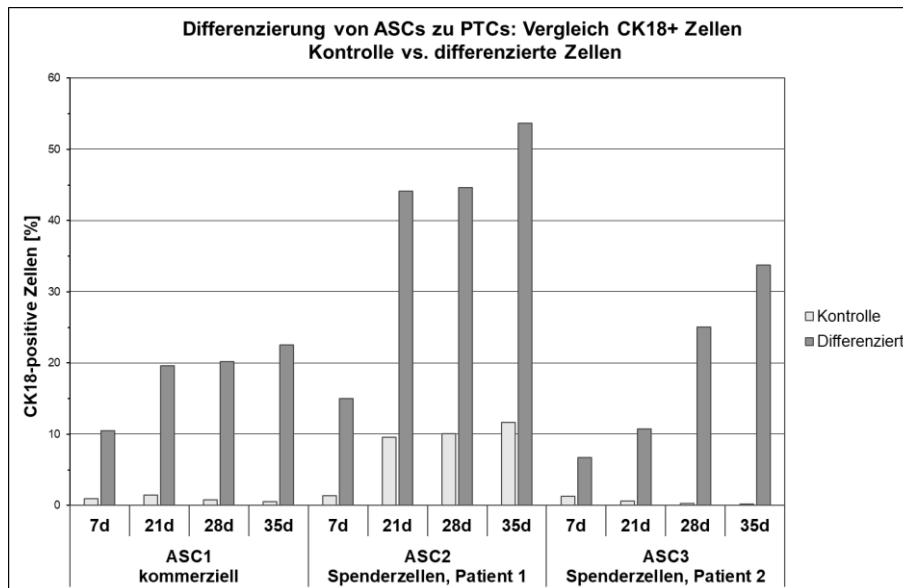


Abbildung 18: Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen der undifferenzierten bzw. differenzierten ASCs

Die Abbildung zeigt die quantitative Auswertung der Durchflusszytometrie für die ASCs unterschiedlicher Herkunft. Es ist jeweils der CK18-positive Anteil an der Gesamtzellpopulation der Kontrollen und der differenzierten Zellen nach 7, 21, 28 und 35 Tagen in Kultur dargestellt. Der Anteil der CK18-positiven Zellen stieg für jeden ASC-Zelltyp über die Kulturdauer an.

Die nicht mit Differenzierungsfaktoren behandelten Kontrollzellen der kommerziell erworbenen ASCs (maximal 1,4 % an Tag 21) zeigten ebenso wie die ASCs des zweiten Spenders (maximal 1,3 % an Tag 7) zu keinem Zeitpunkt eine nennenswerte CK18-Expression (vgl. Abbildung 18). Hingegen konnte in 9,6 % (Tag 21), 10,0 % (Tag 28) und 11,7 % (Tag 35) der Kontrollzellen des zweiten Spenders CK18 nachgewiesen werden. Die differenzierten Zellen zeigten für alle untersuchten ASCs eine Zunahme der CK18-Expression mit zunehmender Kulturdauer: 22,5 % der ASC1, 53,7 % der ASC2 und 33,7 % der ASC3 waren nach 35 Tagen Kultur CK18-positiv.

4.3. Entwicklung eines Mediums zur Ko-Kultur von ASCs und HUVECs

4.3.1. Wachstumsverhalten von HUVECs im Standard-ASC-Medium

Zur Entwicklung des Ko-Kulturmediums wurde zunächst das Wachstumsverhalten der HUVECs in verschiedenen Nährmedien miteinander verglichen. Dazu wurde dem Standard-ASC-Nährmedium (DMEM + 10 % FCS + Pen/Strep) das für die Kultur von Endothelzellen notwendige *SupplementPack Endothelial Cell Growth Medium* (Endkonzentration im Medium: *Endothelial Cell Growth Supplement* 0,004 mL/mL, *Epidermal Growth Factor (recombinant human, EGF)* 0,1 ng/mL, *Basic Fibroblast Growth Factor (recombinant human, bFGF, FGF-2)* 1 ng/mL, *Heparin* 90 µg/mL, *Hydrocortisone* 1 µg/mL) zugesetzt. Als Kontrolle des Wachstumsverhaltens wurde das Standard-Endothelzellenmedium *Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)* inklusive Supplement und Pen/Strep verwendet. Die Proliferation wurde unter wiederholter optischer Kontrolle via AlamarBlue™ Assay ausgewertet (Inkubation mit Resazurin jeweils 2 h).

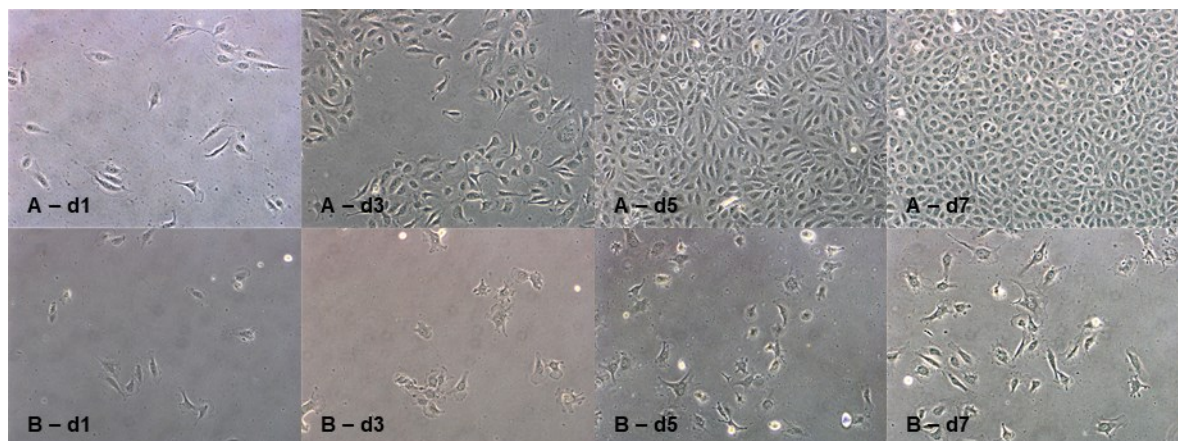


Abbildung 19: Phasenkontrastmikroskopische Kontrolle proliferierender HUVECs

HUVECs (Aussaatdichte: $5 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2) an den Tagen 1, 3, 5 und 7 der Kultur, die zum einen im Standardmedium für Endothelzellen, ECGM + Supplement, (A), zum anderen im Standardmedium für ASCs, DMEM mit Endothelsupplement, (B), proliferiert wurden. An Tag 1 war in beiden verwendeten Medien die, für einzelne Endothelzellen typische Morphologie mit einer leicht höheren Zelldichte im Endothelmedium zu erkennen. Ab Tag 5 bildeten sie im ECGM + Supplement das für endotheliale Monolayer typische Kopfsteinpflaster mit einer hohen Zelldichte. Im Gegensatz dazu war die Proliferationsgeschwindigkeit im DMEM + Supplement stark verlangsamt, die HUVECs wiesen ein diffuses Zytoplasma auf und erreichten nach Tag 7 trotz gestiegener Zellzahl nicht die typische Morphologie eines Endothels (Vergrößerung: 100x).

Die in Abbildung 19 dargestellte optische Kontrolle der Proliferation der HUVECs in den beiden Nährmedien demonstrierte markante Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit, der Zellmorphologie und der Endzelldichte der HUVECs. An Tag 1 der Kultur konnten nur geringe Unterschiede zwischen der Zelldichte der Kulturen in den verschiedenen Medien beobachtet werden. Bereits an Tag 3 zeigten die HUVECs im Standard-Endothelmedium eine deutlich höhere Zellzahl. Ab Tag 5 präsentierten die HUVECs im ECGM die für Endothelzellen bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens typische Morphologie eines Kopfsteinpflasters. Im Gegensatz dazu erreichte die Zellkultur in DMEM + Supplement nach 7 Tagen Kultur keinen konfluenten Monolayer. Außerdem zeigten die HUVECs ein diffuseres Zytoplasma.

Das AlamarBlue™-Assay dient als simples und effektives Verfahren, um die metabolische Aktivität und die Proliferation lebender Zellen *in-vitro* nachzuweisen, wobei das Assay auf der intrazellulären Bioreduktion des nicht fluoreszenten Resazurins in das fluoreszente Resorufin beruht [106].

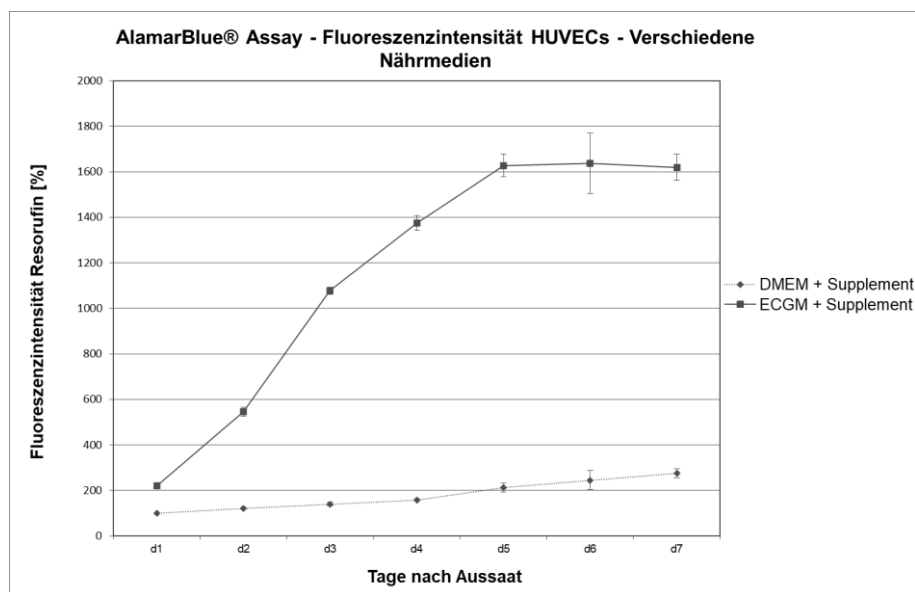


Abbildung 20: Fluoreszenzintensität des AlamarBlue™-Assays der proliferierenden HUVECs in verschiedenen Nährmedien

Die aus der intrazellulären Bioreduktion von Resazurin zu Resorufin resultierende Fluoreszenz diente als Indikator für die viable Zellzahl. Die Intensitäten sind jeweils relativ zur Fluoreszenz an Tag 1 nach Aussaat im ASCs Standardnährmedium abgebildet. Die Proliferationsrate der HUVECs im ASC Medium (DMEM) + Supplement war im Vergleich zum Standard-Endothelmedium (ECGM + Supplement) deutlich verlangsamt. Nach 5 Tagen erreichten die HUVECs im ECGM + Supplement eine konfluente Zellzahl, die ca. 7-fach über der Zellzahl im DMEM + Supplement zum selben Zeitpunkt lag.

Die mikroskopisch beobachtete deutlich höhere Proliferationsrate der HUVECs in ECGM + Supplement konnte durch die Messung der Fluoreszenzintensität des Resorufins bestätigt werden (vgl. Abbildung 20). Trotz der optisch geringen Unterschiede präsentierten die in ECGM + Supplement kultivierten HUVECs bereits an Tag 1 eine 2,2-fach höhere Fluoreszenzintensität ($220,0 \pm 9,0 \%$), die an Tag 4 auf das 8,6-fache ($866,4 \pm 20,5 \%$) der Intensität im DMEM + Supplement anstieg. An Tag 7, 2 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz in ECGM + Supplement, konnte noch eine 5,9-fache Fluoreszenzintensität der Zellen gegenüber DMEM + Supplement gemessen werden ($587,6 \pm 21,1 \%$).

4.3.2. Wachstumsverhalten von ASCs im Standard-Endothelmedium

Zur weiteren Entwicklung des Mediums für die Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs wurde das Wachstumsverhalten von ASCs im Standard-Endothelmedium analysiert. Dazu wurde die Proliferation der ASCs in den verschiedenen Kombinationen DMEM (10 % FCS) mit und ohne Endothelsupplement und ECGM (10 % FCS) mit und ohne Endothelsupplement miteinander verglichen.

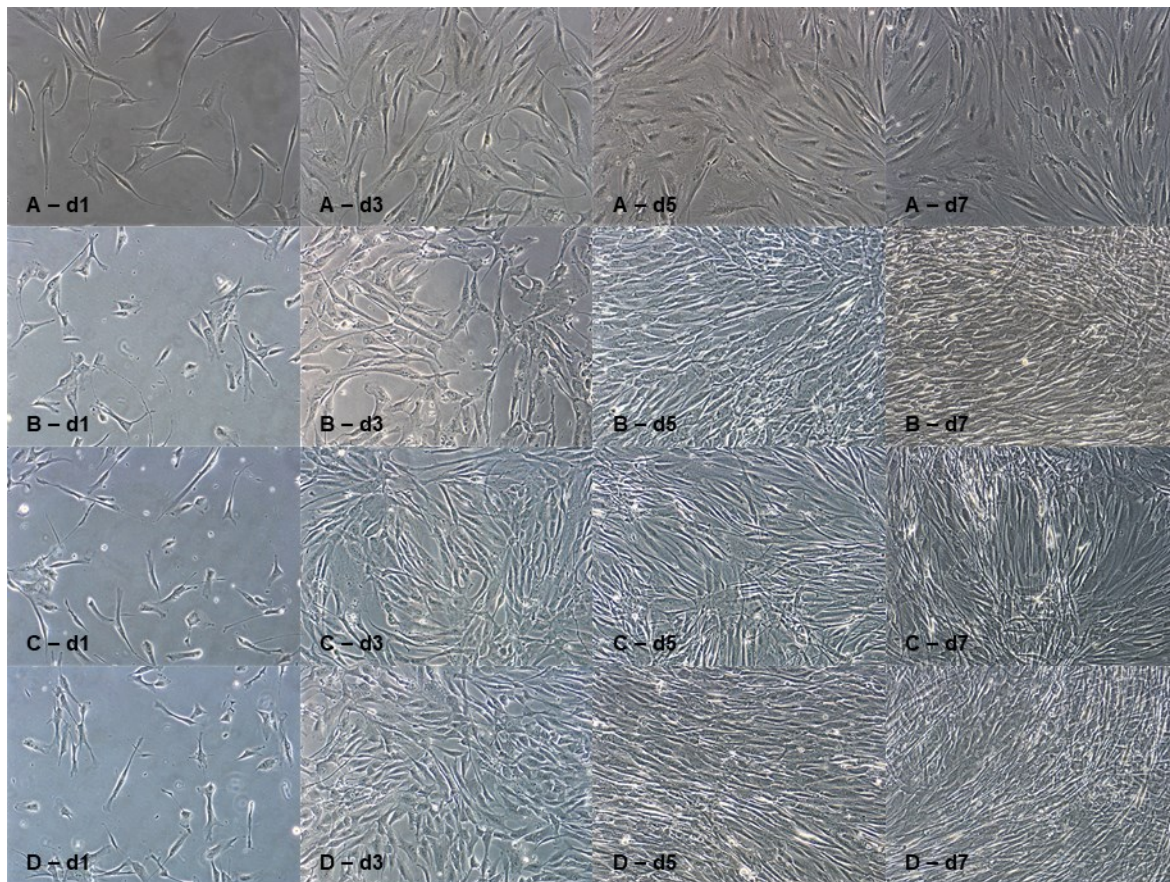


Abbildung 21: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen proliferierender ASCs

Es fanden sich proliferierende ASCs (Aussaatdichte: $5 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2) in DMEM (A), DMEM + Endothelsupplement (B), ECGM (C) und ECGM + Endothelsupplement (D) an den Tagen 1, 3, 5 und 7. Die ASCs erschienen an Tag 1 in allen Medien in ihrer typischen Form. Mit längerer Kulturdauer war ein deutlich schnelleres Wachstum in den Kombinationen DMEM + Supplement und ECGM +/- Supplement im Vergleich zum Standardmedium zu erkennen. Zusätzlich wiesen die ASCs bei Zugabe des Endothelsupplements (B und D) und in ECGM (C) eine veränderte Morphologie auf. Sie erschienen gedrungener, mit deutlich kleinerem Zytoplasma bei gleichzeitig deutlich höherer Zellzahl (Vergrößerung: 100x).

Unter dem Phasenkontrastmikroskop konnten während der Proliferation deutliche Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit und der Zellmorphologie der ASCs beobachtet werden (vgl. Abbildung 21). An Tag 1 nach Aussaat der Zellen zeigten die ASCs in allen Medien ihre typische Form. In allen getesteten Kombinationen (DMEM + Supplement, ECGM +/- Supplement) veränderte sich die Morphologie der ASCs während der Proliferation. An Tag 7 präsentierten die ASCs im Vergleich zum Standardmedium ein deutlich kleineres, wenig diffuses Zytoplasma. Außerdem ließ sich optisch eine eindeutig höhere Zellzahl mit dem daraus resultierenden dichteren Zellrasen erkennen.

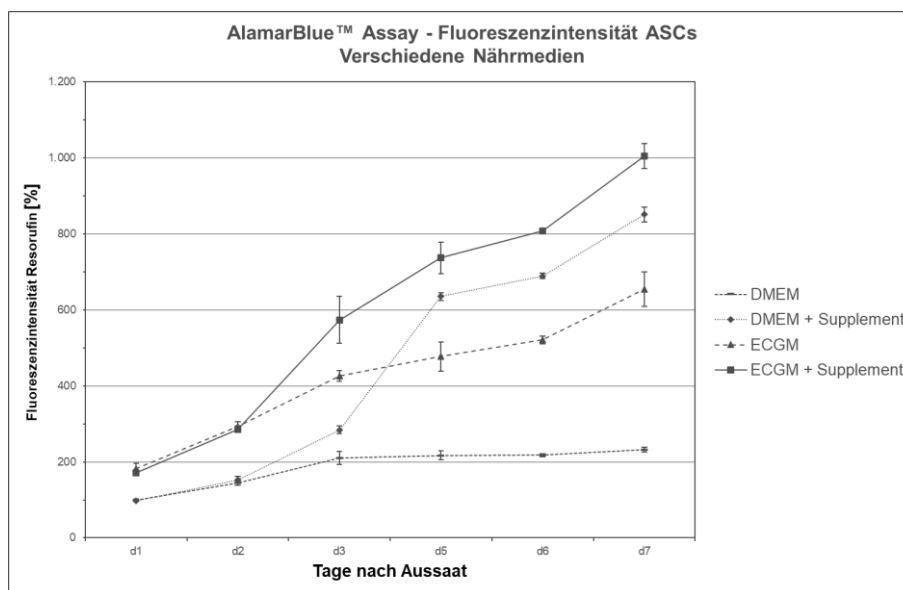


Abbildung 22: Fluoreszenzintensität des AlamarBlue™-Assays der proliferierenden ASCs in verschiedenen Nährmedien

Gemessen wurde die Fluoreszenz des intrazellulär aus Resazurin reduzierten Resorufins, welches als Indikator für die viablen Zellen in den Kulturen diente. Die Intensitäten sind jeweils relativ zur gemessenen Fluoreszenz an Tag 1 nach Aussaat im ASC Standardnährmedium DMEM abgebildet. In den Medien DMEM + Supplement und ECGM +/- Supplement war im Vergleich zum Standard-ASC-Medium (DMEM) eine erhöhte Proliferationsrate und eine nach 7 Tagen deutlich höhere Gesamtzellzahl zu erkennen, wobei die höchste zu beobachtende Anzahl an ASCs in ECGM + Supplement zu sehen war (4,3-fach höher als im Standard-ASC-Medium).

Die Messung der Fluoreszenzintensität bestätigte die Beobachtungen aus der mikroskopischen Beurteilung des Wachstumsverhalten der ASCs in den verschiedenen Nährmedien (vgl. Abbildung 22). Dennoch wiesen die in ECGM kultivierten Zellen trotz ähnlichen optischen Erscheinungsbildes bereits an Tag 1 eine 1,8-fach ($181,8 \pm 14,0$ % ohne Supplement) bzw. 1,7-fach ($171,3 \pm 5,6$ % mit Supplement) höhere Fluoreszenzintensität auf, die an Tag 3 der Kultur auf das 2- bzw. 2,7-fache ($202,4 \pm 6,7$ % bzw. $272,3 \pm 29,2$ %) der Intensität der Kontrollzellen angestiegen war. Nach 5 Tagen in mit Supplement versetztem DMEM stieg die Fluoreszenzintensität sprunghaft auf das 2,9-fache ($292,5 \pm 4,7$ %) der Kontrollzellen an, um daraufhin, analog der in ECGM +/- Supplement proliferierten Zellen, konstant anzusteigen (Tag 7: DMEM + Supplement 3,7-fache ($366,5 \pm 8,3$ %), ECGM 2,8-fache ($282,0 \pm 19,4$ %), ECGM + Supplement 4,3-fache ($432,5 \pm 14,2$ % Fluoreszenzintensität der Zellen im Standard-ASC-Nährmedium).

Anstieg der Proliferation in ECGM bei veränderter Zellmorphologie

Die ASCs zeigten in allen verwendeten Medienkombinationen (DMEM + Endothelsupplement, ECGM +/- Endothelsupplement) demnach ein deutlich schnelleres Wachstum inklusive höherer Konfluenzzellzahl als im Standard-ASC-Medium (DMEM). Die Fluoreszenzintensität des durch die Zellen aus Resazurin reduzierten Resorufins lag nach Tag 7 in ECGM + Endothelsupplement um das 4,3-fache über der der Kontrollzellen. Die mikroskopisch beobachtete deutlich veränderte Morphologie der ASCs in ECGM + Supplement wies auf eine mögliche Differenzierung der Stammzellen durch die Bestandteile des Mediums oder des Supplements hin. Aufgrund der deutlich erhöhten Proliferationsrate und der höheren Endzelldichte wurde in der weiteren Entwicklung des artifiziellen Tubulus die Kombination aus ECGM + Endothelsupplement zur Kultur der ASCs verwendet. Da die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus der ASCs für das zu entwickelnde Ko-Kulturmedium von essentieller Bedeutung ist, musste zunächst nachgewiesen werden, dass die in ECGM + Supplement kultivierten ASCs weiterhin über ihre spezifischen Eigenschaften verfügen, die sie eindeutig zu Stammzellen charakterisieren.

4.3.2.1. Charakterisierung von ASCs über die Expression spezifischer Oberflächenmarker

Eines der typischen Kriterien, die mesenchymale Stammzellen besitzen müssen, ist die Fähigkeit, auf Kunststoffoberflächen adhärent kultiviert werden zu können. Notwendig ist außerdem die Präsentation der Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 bei gleichzeitigem Fehlen der Marker CD11b, CD34, CD45, CD19 und HLA-DR [74]. Diese Kombination der Oberflächenmarker wurde durchflusszytometrisch durch das *BD Stemflow™ hMSC Analysis Kit* analysiert.

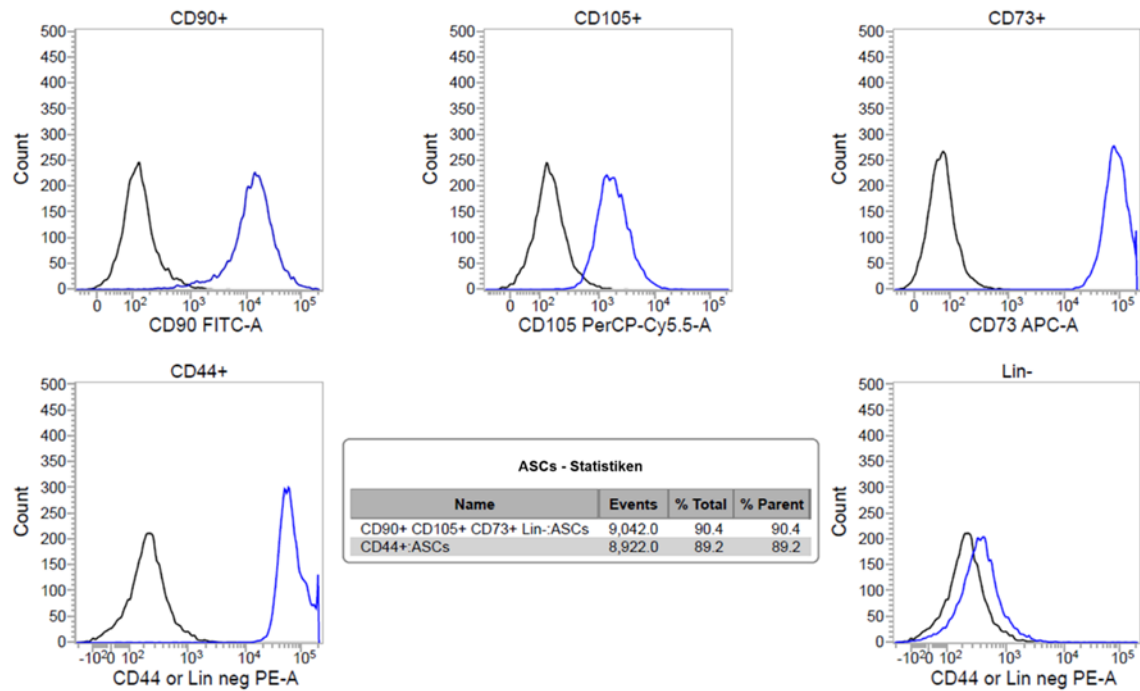


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse von in ECGM + Endothelsupplement bis zur Konfluenz kultivierten ASCs

Dargestellt sind die unmarkierten Zellen (schwarz) und die mit den Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD90, CD105, CD73 und CD44 bzw. für eine Mischung (Lin) aus den Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD11b, CD34, CD45, CD19 und HLA-DR markierten Zellen (blau), wobei die Häufigkeit der auftretenden Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die gefärbten ASCs waren eindeutig positiv für CD90, CD105, CD73 und CD44, sowie negativ für CD11b, CD34, CD45, CD19 und HLA-DR.

Nach der Proliferation in ECGM + Endothelsupplement wurden die ASCs durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD90, CD105, CD73, CD44 sowie CD11b, CD34, CD45, CD19 und HLA-DR analysiert, um ihren Stammzellstatus zu identifizieren (vgl. Abbildung 23). Dabei entsprachen 89,2 % der untersuchten Zellen dem Phänotyp, der sie eindeutig als mesenchymale Stammzellen charakterisierte (positiv für CD90, CD105, CD73 sowie CD44; negativ für CD11b, CD34, CD45, CD19 und HLA-DR).

4.3.2.2. Charakterisierung von ASCs durch ihr Differenzierungspotential in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten

Nach der *International Society for Cellular Therapy* ist das dritte Kriterium um mesenchymale Stammzellen als solche zu identifizieren, ihre Fähigkeit in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren [74]. Die Differenzierung der in ECGM + Supplement kultivierten ASCs in Adipozyten und Osteoblasten erfolgte durch Kultivierung in speziellen Differenzierungsmedien (Tabelle 12, Tabelle 13), die Differenzierung in Chondrozyten in 3D-Spheroidkulturen wurde durch Kultivierung in *MSC-Chondrogenic-Differentiation-Medium* induziert.

Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung lässt sich über eine Oil-Red-O Färbung nachweisen, einem Farbstoff, der in der Histologie zur Darstellung von Lipiden verwendet wird. Ausdifferenzierte Adipozyten bilden charakteristisch anfärbbare, intrazelluläre Lipidtropfen [112].

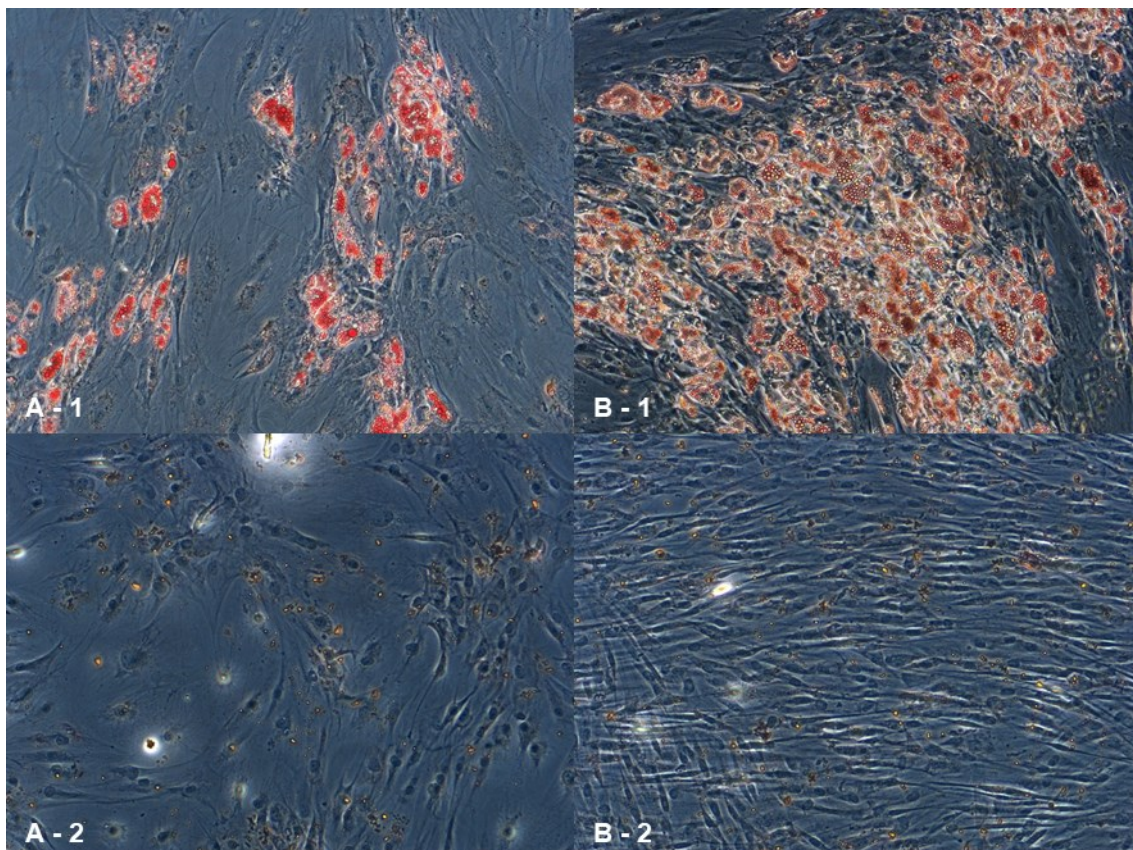


Abbildung 24: Mikroskopische Aufnahmen der Oil-Red-O-Färbung von aus ASCs differenzierten Adipozyten

Dargestellt sind ASCs in DMEM (A) und in ECGM + Endothelsupplement (B), wobei A - 1 und B - 1 die mit Oil-Red-O gefärbten differenzierten Zellen, (A - 2) und (B - 2) die gefärbten undifferenzierten Kontrollzellen zeigen. Die charakteristische Rotfärbung des Oil-Red-O-Farbstoffes stand als Indikator für die erfolgreiche Differenzierung in Adipozyten, sowohl für ASCs im Standard- als auch im Endothelmedium (Vergrößerung: 100x).

Die im Differenzierungsmedium kultivierten ASCs zeigten unabhängig vom Nährmedium deutliche morphologische Veränderungen, die intrazellulären Flüssigkeitstropfen entsprachen (nicht dargestellt). Diese konnten durch die Oil-Red-O-Färbung als intrazelluläre Lipidtropfen identifiziert werden (vgl. Abbildung 24), wodurch sich die Zellen eindeutig als ausdifferenzierte Adipozyten charakterisieren ließen. In den undifferenzierten Kontrollzellen konnten keine Lipidtropfen nachgewiesen werden. Die Kultur im Endothelmedium zeigte im Vergleich zur Kultur im Standardmedium außerdem eine deutlich höhere Zellzahl mit der für ASCs im Endothelmedium bereits beobachteten veränderten Zellmorphologie sowie deutlich mehr Lipidtropfen.

Osteogene Differenzierung

Calciumhaltige Osteozyten können in ausdifferenzierten Osteoblasten über die Färbung mit dem Farbstoff Alizarin-Red-S nachgewiesen werden [114], einem Farbstoff, der zur histologischen Charakterisierung von Calcium genutzt wird [113]. Dabei werden extrazelluläre Calciumablagerungen spezifisch gefärbt, wodurch die Alizarin-Red-S-Färbung die Möglichkeit bietet, das osteogene Differenzierungspotential von ASCs zweifelsfrei zu bestätigen.

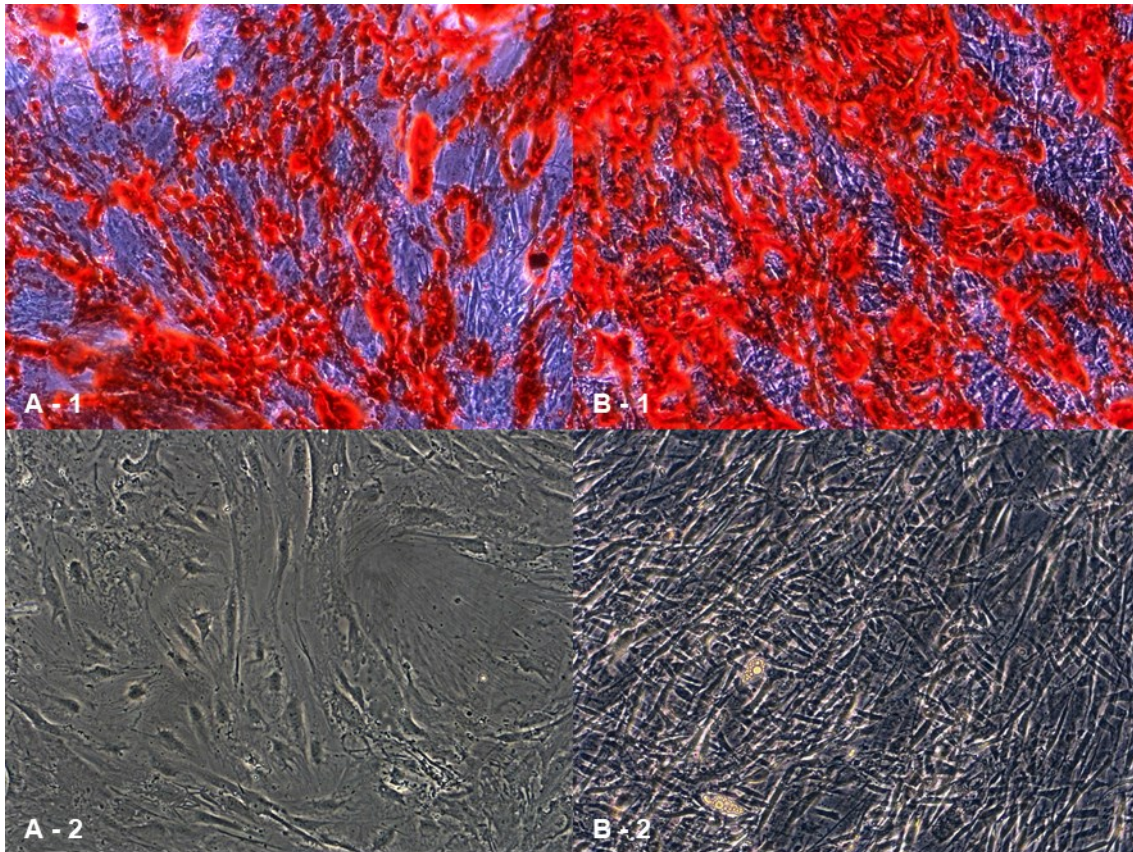


Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahmen der Alizarin-Red-S-Färbung von in Osteoblasten differenzierten ASCs

Es sind ASCs im Standardmedium (A) und in ECGM + Supplement (B) abgebildet. (A - 1) und (B - 1) stellen jeweils die gefärbten differenzierten Zellen dar, (A - 2) und (B - 2) die gefärbten un-differenzierten Kontrollzellen. Die charakteristische Rotfärbung der extrazellulären Calciumablagerungen wies die erfolgreiche Differenzierung der ASCs zu Osteoblasten sowohl im Standard- als auch im Endothelmedium nach (Vergrößerung: 100x).

Die mikroskopische Analyse der Alizarin-Red-S-Färbung der osteogenen Differenzierung ist in Abbildung 25 abgebildet. Dabei bildeten die mit dem osteogenen Differenzierungsmedium kultivierten ASCs sowohl in DMEM als auch in ECGM + Supplement extrazelluläre Calciumablagerungen, welche durch die Alizarin-Red-S-Färbung im Vergleich zur un-differenzierten Kontrolle eindeutig nachgewiesen werden konnten. Die un-differenzierten Kontrollzellen zeigten außerdem ihre mediumspezifische Morphologie.

Chondrogene Differenzierung

Das chondrogene Differenzierungspotential von ASCs lässt sich durch Differenzierung zu Chondrozyten in einer 3D-Spheroidkultur nachweisen, während welcher die Spheroiden Knorpel inklusive charakteristischer extrazellulärer Matrix bilden. Eines der wichtigsten

Moleküle innerhalb der Knorpelmatrix ist das Aggrecan [115], welches sich als Indikator der Knorpelbildung durch die Färbung mit Alcian-Blau eindeutig identifizieren lässt.

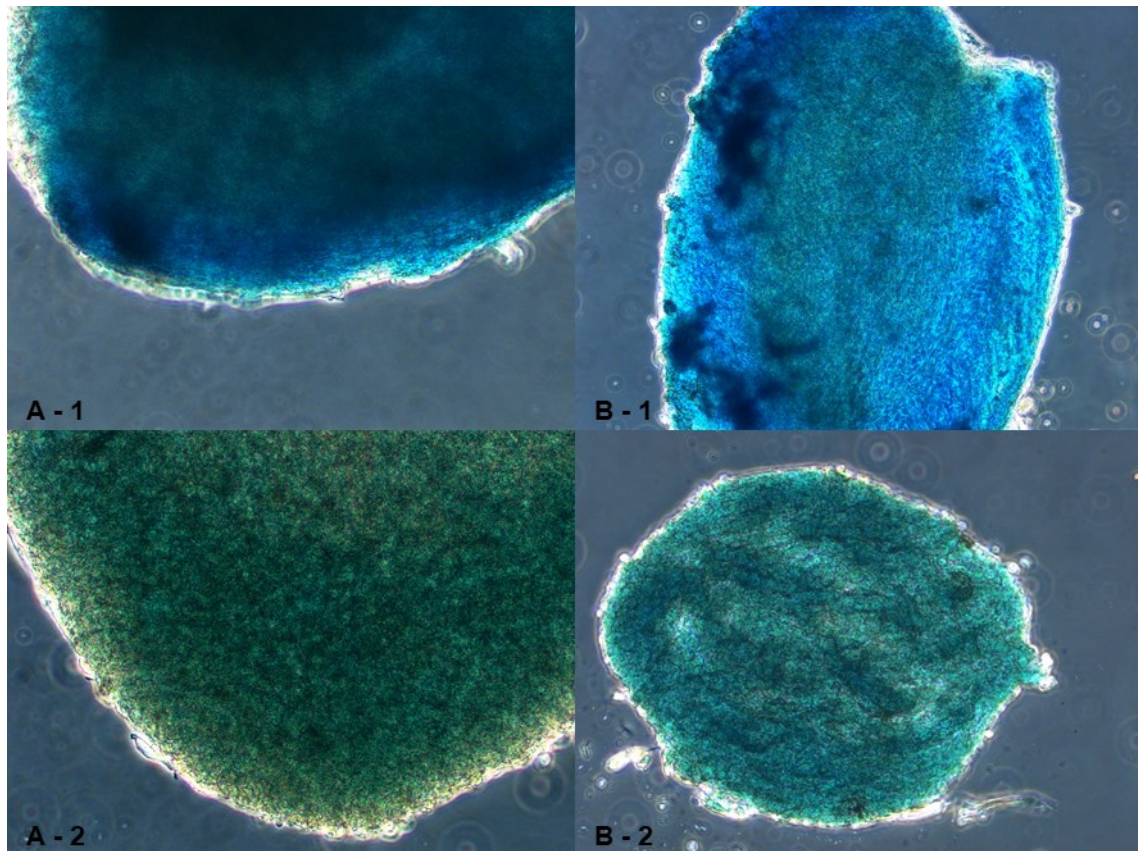


Abbildung 26: Mikroskopische Aufnahmen von Querschnitten der Spheroide

Zu sehen sind Querschnitte durch die Spheroide, die mit Alcian-Blau gefärbt wurden. (A) zeigt Querschnitte von Spheroide aus ASCs, die im Standardmedium kultiviert wurden, (B) von Spheroide aus ASCs, die in ECGM + Supplement kultiviert wurden. (A - 1) und (B - 1) zeigen differenzierte Zellen, (A - 2) und (B - 2) jeweils undifferenzierte Spheroide. Die typische, tiefblaue Färbung des Aggrecans in differenzierten Spheroide durch Alcian-Blau war ein Indikator für die erfolgreiche Differenzierung der ASCs in Chondrozyten (Vergrößerung: 100x).

Abbildung 26 zeigt mikroskopische Aufnahmen von Querschnitten der Spheroide aus ASCs, die in DMEM bzw. ECGM + Supplement kultiviert und differenziert, sowie anschließend mit Alcian-Blau gefärbt wurden. Sowohl die in DMEM als auch die in ECGM + Supplement kultivierten Kontrollzellen präsentierten bei Färbung mit Alcian-Blau nicht die typische intensive Blau Färbung (A - 2, B - 2). Im Gegensatz dazu war die charakteristische, tiefblaue Farbe des Aggrecan färbenden Alcian-Blaus in den differenzierten Spheroide zu beobachten, wodurch die Differenzierung der ASCs in Chondrozyten sowohl in DMEM als auch in ECGM + Supplement eindeutig nachgewiesen wurde.

4.4. Etablierung einer Zellkultur von ASCs und HUVECs in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren

Die Erkenntnisse der Versuche in der standardisierten 2D-Zellkulturumgebung bezüglich des Nährmediums für die Ko-Kultur und der funktionalen Charakterisierung proximaler Tubuluszellen dienten als Basis für die darauffolgenden Versuche in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren. Das primäre Ziel war dabei zunächst eine Ko-Kultur aus ASCs (Membraninnenseite) und HUVECs (Membranaußenseite) reproduzierbar über eine lange Kulturdauer zu etablieren. Nach qualitativer und quantitativer Auswertung der Zellviabilität auf den Membranoberflächen sollte das Differenzierungsprotokoll aus der 2D-Zellkulturumgebung auf die ASCs in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren adaptiert werden sowie der Differenzierungsstatus anhand der etablierten Protokolle analysiert werden.

4.4.1. Optimierte Beschichtung zur Unterstützung der Zellkultur auf der Oberfläche der Hohlfasermembranen

Um eine effektive Zelladhäsion und Funktionalisierung der Zellen auf der Oberfläche von Hohlfasermembranen zu gewährleisten, musste zunächst der Einfluss von Beschichtungen aus verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen auf die Performance der ASC Zellkultur untersucht werden. Vorversuche in der 2D-Zellkulturumgebung sollten dabei aus den in der Literatur beschriebenen potentiellen Beschichtungen aus Laminin, Fibronectin und einer Doppelbeschichtung aus L-DOPA und Collagen IV [94, 96, 97] die für ASCs optimale Methode ableiten.

Tabelle 16: Konzentrationen und Inkubationsdauer der jeweiligen Beschichtungen

Beschichtung	Konzentration	Inkubation [37 °C, 5 % CO ₂]
Fibronectin	10 µg/mL	1 h, 2 h
Laminin	10 µg/mL	1 h, 2 h
L-DOPA + Collagen IV	2 mg/mL + 25 µg/mL	1 h + 1h, 2 h + 2 h

Tabelle 17: Fluoreszenzintensitäten des AlamarBlue™-Assays der proliferierenden ASCs auf verschiedenen Beschichtungen

Gemessen wurde die Fluoreszenz des Resorufins, welches als Indikator für die viablen Zellen in den ASC-Kulturen (Aussaatdichte: $5 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2) auf Beschichtungen aus Fibronectin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Laminin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), L-DOPA (2 mg/mL) und Collagen IV (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sowie in unbehandelten Kontrollen diente. Die Intensitäten sind jeweils relativ zur normalisierten Fluoreszenz an Tag 1 nach Aussaat in der unbeschichteten Kontrolle. Die Zelldichte ist auf der Beschichtung aus Fibronectin (1 h) an Tag 1, Tag 2 und Tag 7 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht ($p < 0,05$) und wies entsprechend die höchste Endzelldichte auf ($n = 3$).

	Fibronectin		Laminin		L-DOPA + Collagen IV		unbeschichtet
	1 h	2 h	1 h	2 h	1 h + 1 h	2 h + 2 h	
d1	133,5 ± 6 %	107,8 ± 2,0 %	120,1 ± 3,7 %	106,3 ± 4,4 %	112,4 ± 7,6 %	103,8 ± 1,9 %	100,0 ± 2,4 %
d2	193,4 ± 18,5 %	174,9 ± 3,5 %	164,7 ± 4,3 %	168,0 ± 8,7 %	170,9 ± 8,4 %	166,7 ± 0,4 %	153,0 ± 6,2 %
d3	306,2 ± 7,0 %	281,0 ± 14,3 %	244,2 ± 9,3 %	245,5 ± 20,9 %	273,0 ± 4,3 %	246,5 ± 4,6 %	265,0 ± 25,1 %
d4	328,1 ± 15,0 %	318,8 ± 13,5 %	310,5 ± 9,7 %	303,4 ± 7,0 %	315,6 ± 15,3 %	313,2 ± 4,4 %	311,1 ± 10,7 %
d5	382,8 ± 4,8 %	382,0 ± 4,8 %	390,4 ± 18,3 %	381,4 ± 29,8 %	391,3 ± 26,9 %	387,4 ± 7,4 %	391,2 ± 2,1 %
d6	474,7 ± 25,1 %	457,4 ± 10,5 %	446,6 ± 5,8 %	457,7 ± 28,4 %	454,4 ± 13,7 %	442,5 ± 3,9 %	445,9 ± 9,4 %
d7	556,2 ± 9,3 %	549,1 ± 19,6 %	491,0 ± 41,5 %	489,5 ± 66,6 %	489,9 ± 18,8 %	456,4 ± 11,9 %	450,4 ± 13,1 %

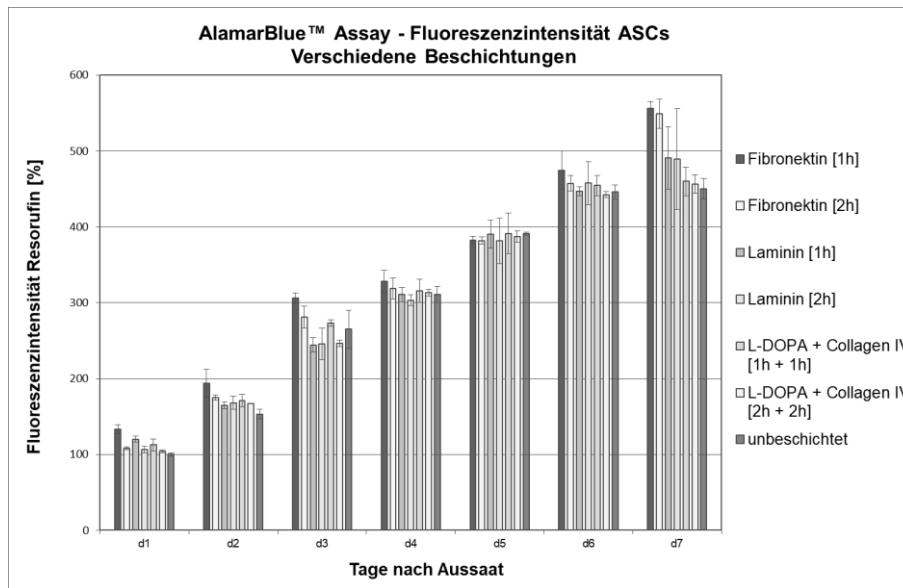


Abbildung 27: Fluoreszenzintensitäten des AlamarBlue™-Assays der proliferierenden ASCs auf verschiedenen Beschichtungen

Es sind die in Tabelle 17 aufgeführten Fluoreszenzwerte des Resorufins als Indikator für die viable Zellzahl der adhärennten ASC Kulturen in ECGM + Supplement, auf Beschichtungen aus Fibronectin (10 µg/mL), Laminin (10 µg/mL), einer Doppelbeschichtung aus L-DOPA (2 mg/mL) und Collagen IV (25 µg/mL) sowie unbeschichteten Kontrollen abgebildet. Die Wachstumsrate ähnelte sich auf den verschiedenen Beschichtungen und lag in etwa auf dem gleichen Niveau der unbeschichteten Kontrollen, mit einer signifikant (Tag 1, Tag 2 und Tag 7) erhöhten Zelldichte auf Fibronectin (1 h). ASCs auf der Beschichtung mit Fibronectin (1 h) wiesen nach 7 Tagen Kultur demnach die höchste Zelldichte auf (n = 3).

Die Performance der ASC-Kultur auf den verschiedenen beschichteten Zellkulturoberflächen wurde über das AlamarBlue™ Assay über 7 Tage ausgewertet, da bisherige Experimente das Erreichen der Konfluenz der ASC Kultur nach spätestens 7 Tagen zeigten (vgl. Abbildung 21). Die ASCs präsentierten auf den Beschichtungen mit Laminin (10 µg/mL, 1 h und 2 h) sowie der Doppelbeschichtung aus L-DOPA (2 mg/mL) und Collagen IV (25 µg/mL, 1 h + 1 h und 2 h + 2 h) ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten wie in unbeschichteten Kontrollen (vgl. Tabelle 17 und Abbildung 27). Die ASCs auf Fibronectin (10 µg/mL, 1 h) proliferierten zu Beginn der Kultur statistisch signifikant schneller ($133,5 \pm 6,0$ % an Tag 1, $126,4 \pm 12,1$ % an Tag 2; $p < 0,05$ vs. unbeschichtet an Tag 1 und Tag 2) als in den Kontrollen. Die Zelldichte glich sich an Tag 5 der Kultur in allen Bedingungen an. An Tag 7 lag die Zelldichte auf der Fibronectinbeschichtung (1 h und 2 h) erneut über der unbeschichteten Kontrollen ($123,5 \pm 2,1$ % bzw. $121,9 \pm 4,4$ %; $p < 0,05$ vs. unbeschichtet an Tag 7).

4.4.2. Entwicklung der ASC-Zellkultur auf der Innenoberfläche der Hohlfasermembranen

Die Entwicklung der Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs erforderte zunächst die Etablierung der Monokulturen auf der jeweiligen Membranseite. Dazu wurden zunächst die Module mit den Hohlfasermembranen aus Polyethersulfon/Polyvinylpyrrolidon bzw. aus Polypropylen wie beschrieben für die Besiedlung vorbereitet, mit ASCs in unterschiedlichen Aussaatdichten besiedelt und nach verschiedenen Kulturdauern auf die Qualität der Zellkultur analysiert.

Zu Beginn wurde die Fähigkeit der ASCs, auf den mit Fibronectin beschichteten Innenoberflächen der Polyethersulfon- bzw. Polypropylen-Membranen zu adhären bzw. die Vitalität der Kultur (Zellviabilität, Proliferationsfähigkeit) über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht. Dazu wurde eine Zellzahl von $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 entsprechend der Konfluenz in der 2D-Zellkultur als Aussaatdichte gewählt. Um die Membranen nach 3 h statischer Adhäsion und 7 Tagen im Pumpkreislauf (Volumenstrom 0,15 mL/min, 37 °C, 5 % CO_2) auf ihre Besiedlung mit ASCs zu analysieren, wurden deren Zellkerne intrakapillar mit Hoechst33342 fluoreszenzmarkiert, woraufhin Längsschnitte der Membranen fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden konnten. Um zusätzlich zum durch die Fluoreszenzmarkierung gewonnenen Eindruck der Qualität der Zellbesiedlung eine quantitative Aussage zum Besiedlungsstatus treffen zu können, wurden die Zellen in zusätzlich besiedelten Modulen durch Trypsinierung von den Membranen gelöst. So konnte die Anzahl der Zellen durch eine Lebend-/Tot-Diskriminierung mittels 7-AAD-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt werden [103, 104].

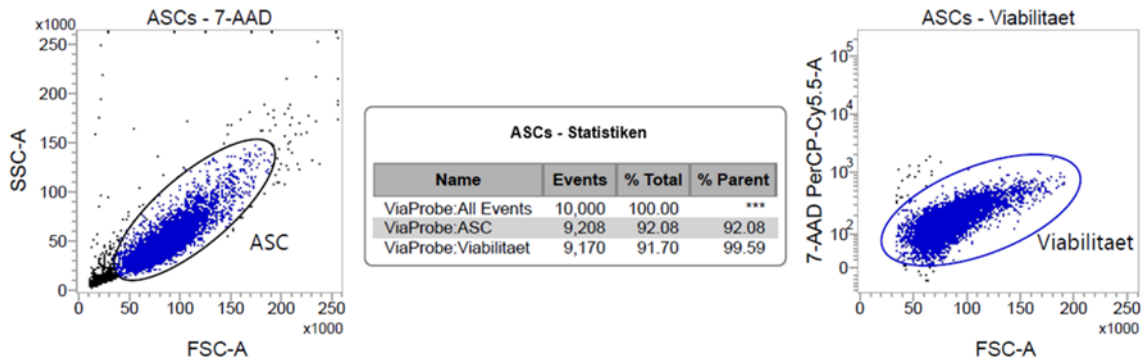


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Lebend-/Tot-Diskriminierung der ASC-Zellsuspension

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Zellzählung via Lebend-/Tot-Diskriminierung einer aus der Kryokonservierung aufgetauten Zellsuspension, aus welcher die Zellzahlen zur Besiedlung der Hohlfasermembranen abgeleitet wurden. Links die Analyse der mit 7-AAD gefärbten Suspension nach Größe und Granularität, aus welcher die Population der ASCs bestimmt wurde. Rechts ist die Bestimmung der viablen Zellen der ASC-Population aufgrund der entsprechenden Fluoreszenz dargestellt. Aus der Anzahl der ASCs pro analysiertem Probenvolumen wurde die tatsächliche Zellzahl berechnet. Die ASC-Population beinhaltet zu 99,6 % viable Zellen.

Die in Abbildung 28 dargestellten Dot-Blots zeigen beispielhaft die Analysen der Lebend-/Tot-Diskriminierung einer aus der Kryokonservierung aufgetauten Zellsuspension. Aus der berechneten Zellzahl (vgl. Formel 2) von 1,06 Mio Zellen bei 99,6 % viablen Zellen konnte das für die folgenden Besiedlungen notwendige Volumen abgeleitet werden.

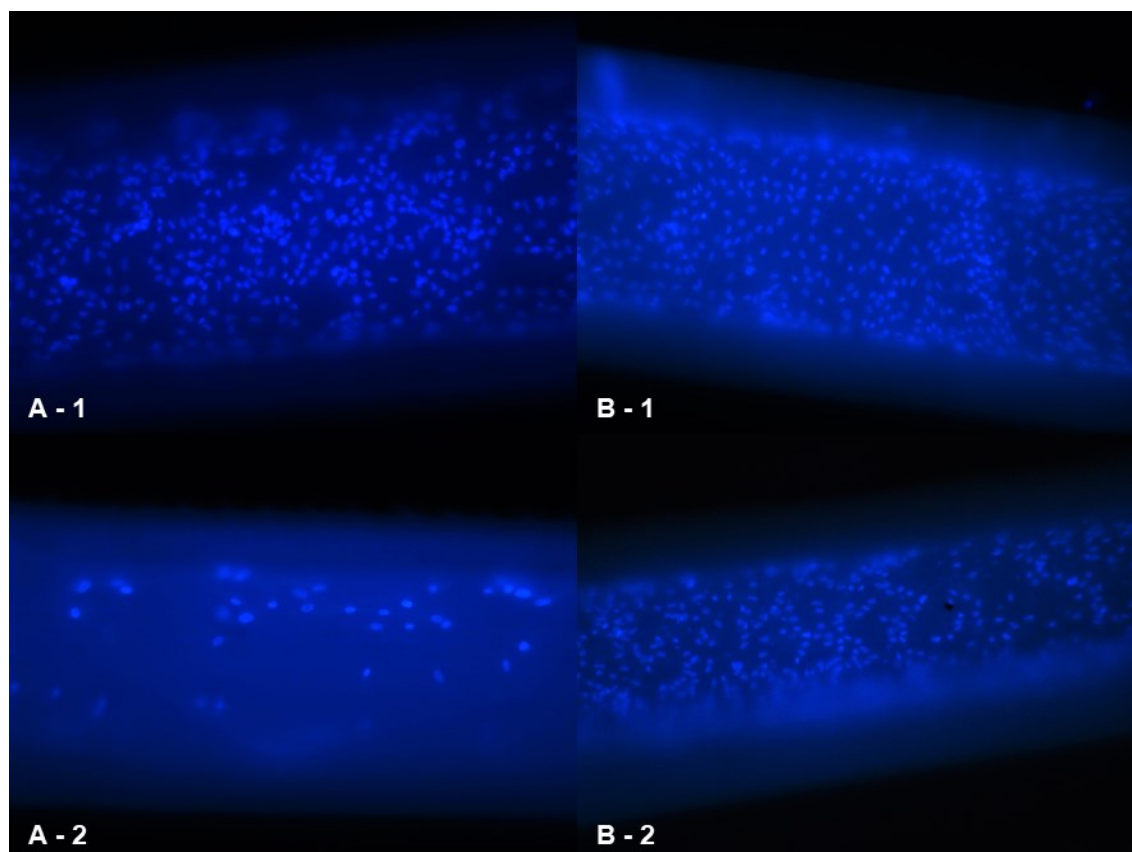


Abbildung 29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit ASCs besiedelten Polyethersulfon- und Polypropylen-Hohlfasermembranen

Hoechst33342 fluoreszenzmarkierte Zellkerne von ASCs auf der Innenoberfläche von Polyethersulfon- (A) und Polypropylen-Membranen (B), die mit einer Besiedlungsdichte von $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 ausgesät wurden. Dabei ist jeweils eine Aufnahme eines Längsschnittes nach 3 h statischer Adhäsion (1) und nach 7 Tagen Kultur im Pumpkreislauf (2) dargestellt. Der nach der statischen Inkubation dichte Zellrasen war nach 7 Tagen Kultur auf den Polypropylen-Membranen weiterhin zu erkennen. Im Gegensatz dazu hatte die Zelldichte auf der Innenoberfläche der Polyethersulfon-Membranen abgenommen (Vergrößerung: 125x).

In Abbildung 29 sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Längsschnitten durch mit ASCs besiedelte Polyethersulfon- und Polypropylen-Membranen dargestellt. Die Membranen präsentierten nach 3 h statischer Inkubation eine, durch die Zellkernfärbung eindeutig identifizierbare, homogene Besiedlung mit ASCs. Die beispielhaften Aufnahmen implizieren eine konfluente Besiedlung der kompletten Hohlfasern. Allerdings existierten auch Stellen der Membranoberfläche, auf denen die Zelldichte nicht der konfluente Besiedlung entsprach. Weiterhin zeigten einige Stellen der Membranen keine Besiedlung oder nur sehr schwach besiedelte Stellen. Der Großteil der Membranen präsentierte eine hohe Besiedlungsdichte. Die Analysen aller besiedelten Membranen der Module ergab insgesamt eine Konfluenz von ca. 80 %. Die Analyse nach 7 Tagen im Pumpkreislauf offenbarte einen deutlichen Abfall der Zelldichte für Polyethersulfon-Membranen.

Im Gegensatz dazu konnte auf den Polypropylen-Membranen die gleiche Zelldichte wie nach 3 h Adhärenz nachgewiesen werden. Die nach 3 h beobachteten kaum besiedelten Stellen waren nach 7 Tagen weiterhin präsent und die Konfluenz lag weiterhin bei ca. 80 %, weshalb der Fokus in den weiteren Versuchen zunächst auf die Polypropylen-Module gelegt wurde. Die durchflusszytometrische Bestimmung der tatsächlichen Zellzahl auf den Membranen ergab nach 7 Tagen Kultur eine Zellzahl von etwa $2,8 \cdot 10^5$ Zellen bei einer Viabilität von 85,9 % (vgl. Abbildung 30), entsprechend einer Zelldichte von etwa $4,6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 und somit einer umgerechneten Konfluenz von ca. 76 %.

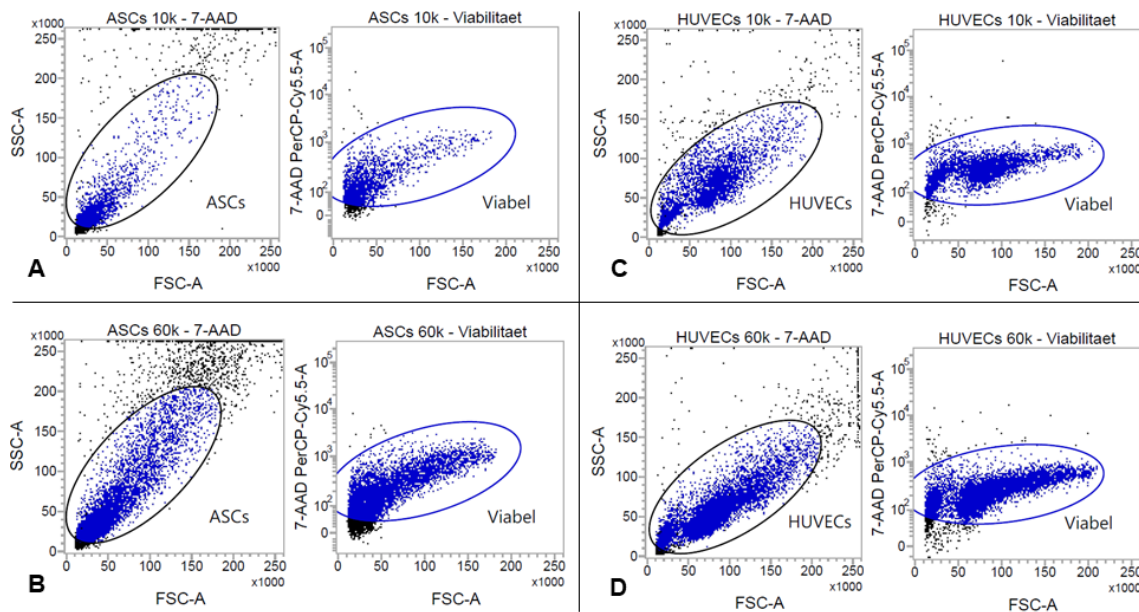


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Lebend-/Tod-Diskriminierung von ASCs und HUVECs kultiviert auf Polypropylen-Membranen

Dot-Blots der durchflusszytometrischen Zellzählung von Zellkulturen nach 7 Tagen dynamischer Kultur auf Polypropylen-Membranen. Die jeweiligen linken Dot-Blots bilden die gemessene, 7-AAD gefärbte Zellsuspension ab, aus welchen die Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe und Granularität bestimmt wurden. Die rechten Dot-Blots visualisieren den viablen Teil der Zellpopulation auf Basis der gemessenen Fluoreszenz. (A) zeigt ASCs mit einer Aussaatdichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 , (B) zeigt ASCs mit einer Aussaatdichte von $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 , (C) zeigt HUVECs mit einer Aussaatdichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 , (D) zeigt HUVECs mit einer Aussaatdichte von $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 .

Um die Integrität des Zellrasens aus ASCs auf der Innenoberfläche der Polypropylen-Membranen zu bestätigen, wurde der Besiedlungsstatus durch Rasterelektronenmikroskopie weiter analysiert.

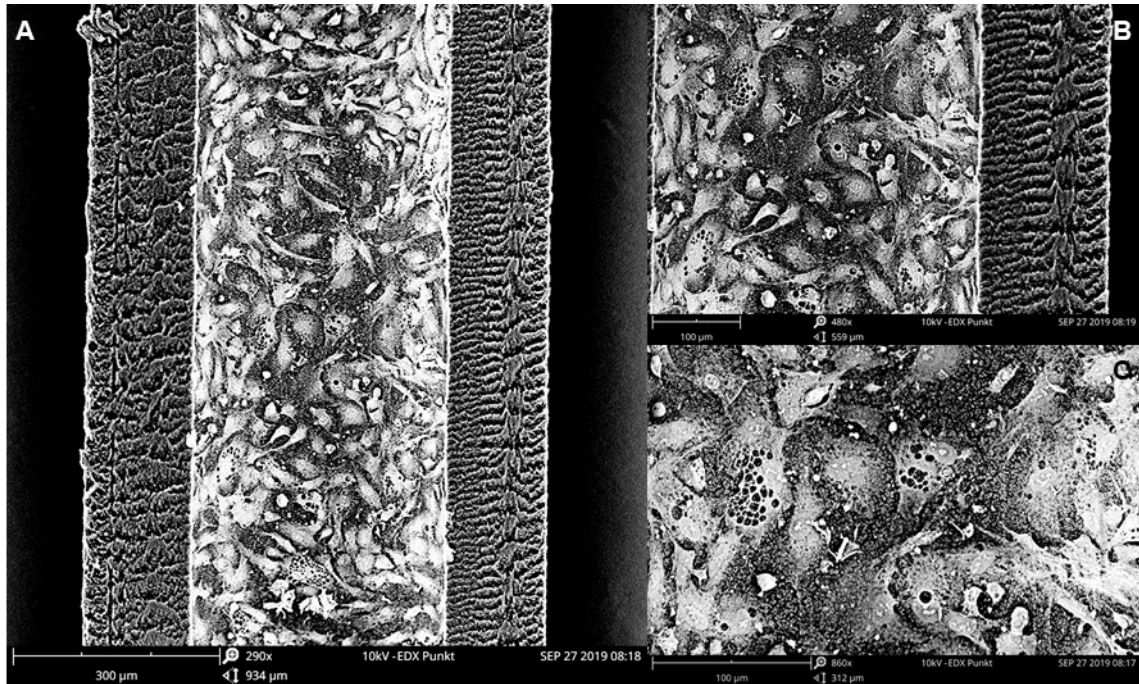


Abbildung 31: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von mit ASCs besiedelten Innenseiten der Polypropylen-Hohlfasermembranen

Die REM-Aufnahmen zeigen einen Längsschnitt einer auf der Innenoberfläche mit ASCs (Aussaaddichte: $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 , Adhärenzdauer: 3 h) besiedelten Polypropylen-Membran. (A) Überblick über die gesamte Membran (Vergrößerung: 290x), (B) vergrößerter Ausschnitt mit Blick auf die Membranwand (Vergrößerung: 480x), (C) Aufsicht auf den Zellrasen (Vergrößerung: 860x). Auf den Aufnahmen ist eine dichte Zellschicht über nahezu die komplette Membraninnenoberfläche zu sehen.

Die in Abbildung 31 dargestellten REM-Aufnahmen der konfluent mit ASCs besiedelten Polypropylen-Membranen bestätigten den durch die Zellkernfärbung gewonnenen Eindruck der homogenen Besiedlung der Membranoberfläche. Zum einen konnte der dichte, gleichmäßige Zellrasen beobachtet, zum anderen die Porenstruktur der Membranwand visualisiert werden.

Um zusätzlich zur Viabilität die Proliferationsfähigkeit der ASCs auf der Innenoberfläche der Polypropylen-Membranen während der Kultivierung über einen Zeitraum von 7 Tagen zu evaluieren, wurden die Besiedlungsexperimente mit einer geringeren Aussaadichte ($1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2) wiederholt und Membranen nach 3 h, 2 bzw. 4 Tagen im Pumpkreislauf auf ihre Besiedlungsdichte analysiert.

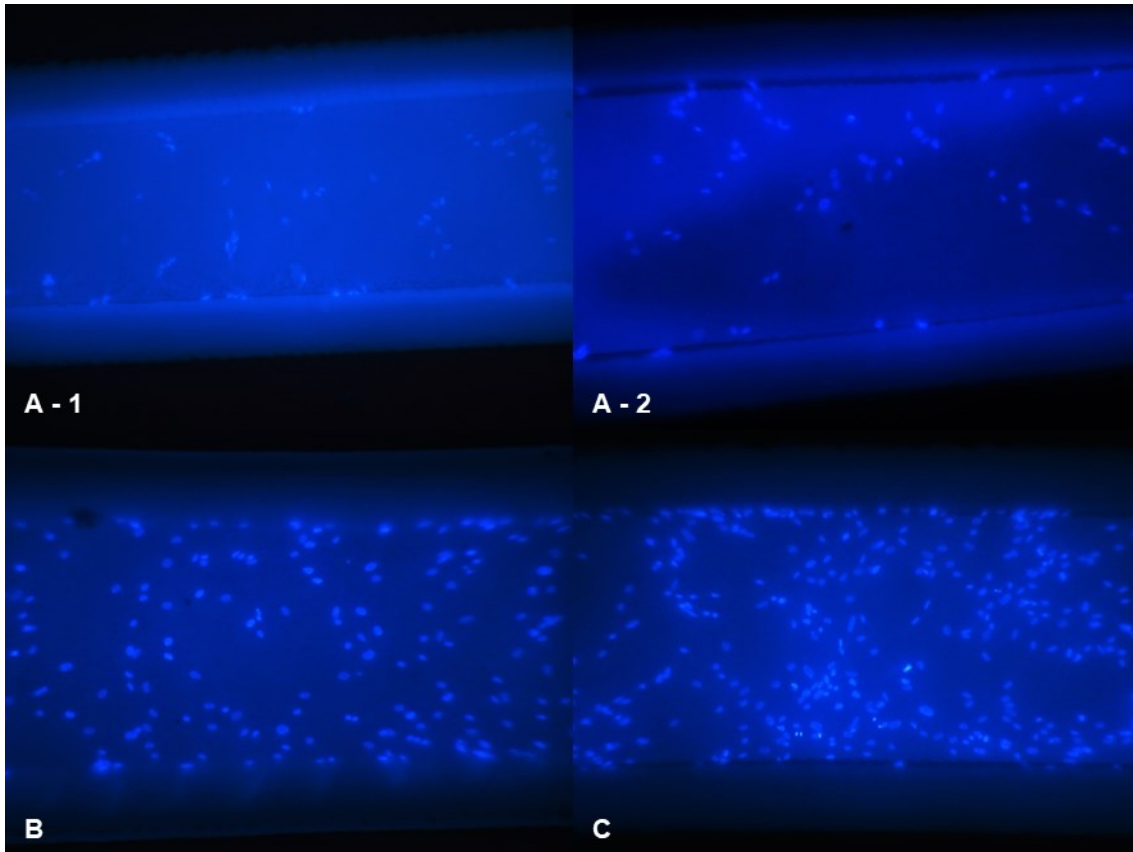


Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Proliferation von ASCs auf Polypropylen-Membranen

(A - 1) und (A - 2) zeigen jeweils fluoreszenzmarkierte Zellkerne von ASCs auf der Innenoberfläche von Polypropylen-Membranen nach 3 h statischer Adhäsion bei einer Aussaatdichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 , (B) zeigt die Zellkerne nach 2 Tagen Kultur, (C) die Zellkerne nach 4 Tagen Kultur im Pumpkreislauf. Die Aufnahmen bilden jeweils Längsschnitte durch die Hohlfasermembranen ab und demonstrieren einen eindeutigen Anstieg der Zellzahl mit zunehmender Kulturdauer (Vergrößerung: 125x).

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen nach 3 h Adhäsion bzw. nach 2 und 4 Tagen Kultur im Pumpkreislauf sind in Abbildung 32 dargestellt. Im Vergleich zur konfluenten Besiedlung konnte die Zellkernfärbung die deutlich geringere Zelldichte auf den Membranoberflächen nach 3 h statischer Adhäsion nachweisen (A - 1, A - 2). Die Zelldichte nahm mit der Dauer der Kultur im Pumpkreislauf zu, wobei auch nach 4 Tagen kein konfluenter Zellrasen erreicht wurde. Analog zur Auswertung der konfluent besiedelten Membranen existierten auch wenige Membranen, die kaum mit Zellen besiedelt waren. Die Bestimmung der tatsächlichen Zellzahl durch die durchflusszytometrische Lebend-/Tot-Diskriminierung zeigte nach 4 Tagen Proliferation eine Gesamtzellzahl von etwa $1,1 \cdot 10^5$ Zellen (Viabilität: 88,1 %) (vgl. Abbildung 30), was einer Zelldichte von etwa $1,8 \cdot 10^4$ pro cm^2 aktiver Innenmembranoberfläche entsprach.

4.4.3. Entwicklung der HUVEC-Zellkultur auf der Außenoberfläche der Hohlfasermembranen

Der nächste Schritt in Richtung der Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren beinhaltet die Etablierung der HUVEC-Zellkultur auf der Außenoberfläche der Hohlfasermembranen. Analog zur Entwicklung der ASC-Kultur auf der Innenoberfläche wurde zunächst die Fähigkeit der HUVECs auf den mit Fibronectin beschichteten Außenoberflächen der Polyethersulfon- bzw. Polypropylen-Membranen zu adhären und die Vitalität der Zellen auf der Membranoberfläche über eine längere Kulturdauer analysiert. Dazu wurden die HUVECs in einer der 2D-Konfluenz entsprechenden Zellzahl ($6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2) ausgesät und die Qualität der Besiedlung der Membranen nach 1,5 h statischer Adhäsion bzw. 7 Tagen Kultur im Pumpkreislauf mittels Zellkernfärbung ausgewertet sowie nach 7 Tagen die Zellzahl der adhären und viablen HUVECs bestimmt.

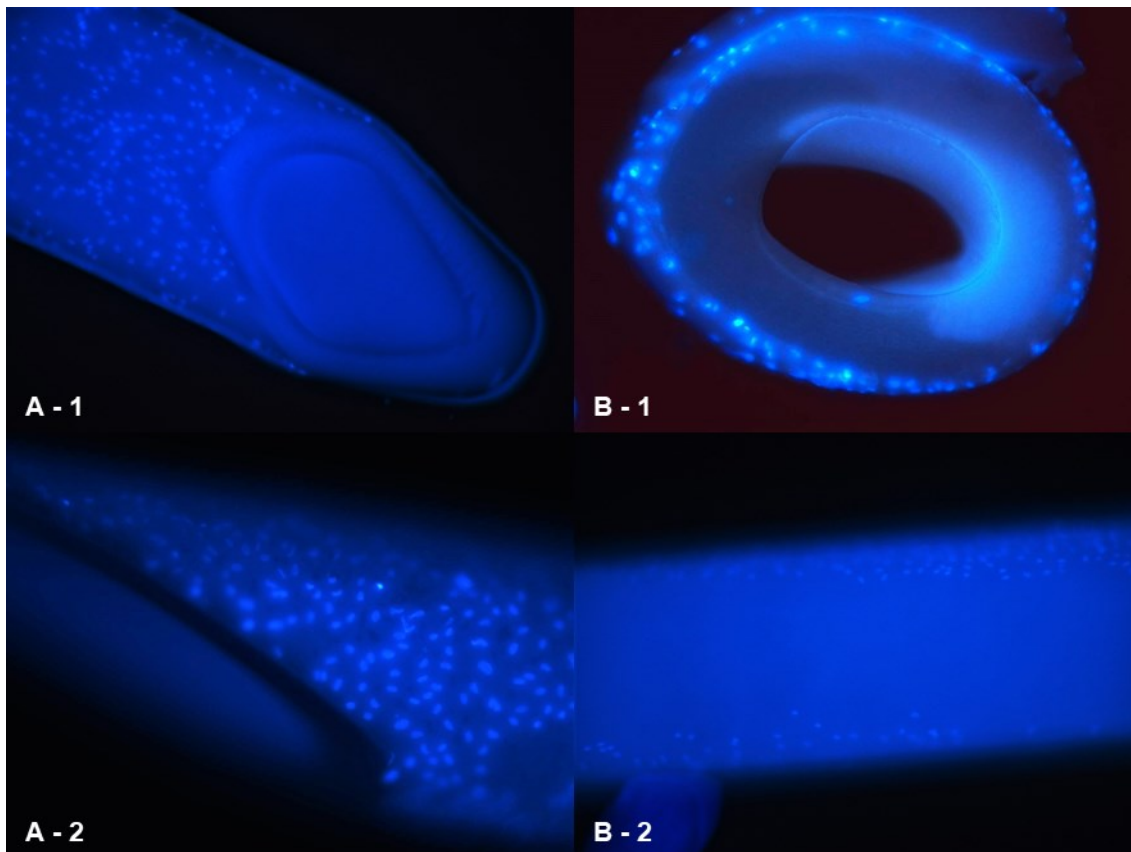


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HUVEC-Kultur auf den Außenoberflächen von Polyethersulfon- und Polypropylen-Hohlfasermembranen

Repräsentative Auswahl von fluoreszenzmarkierten Zellkernen von HUVECs auf der Außenoberfläche von mit Fibronectin beschichteten Polyethersulfon- (A) und Polypropylen-Hohlfasermembranen (B) bei einer Besiedlungsdichte von $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 nach 1,5 h statischer Inkubation (1) bzw. 7 Tagen Kultur im Pumpkreislauf (2). Die dichten Monolayer der HUVECs waren sowohl nach 1,5 h Adhäsion, als auch nach 7 Tagen im Pumpkreislauf auf beiden Membrantypen stark ausgebildet. Die Abbildungen (A - 1), (A - 2), und (B - 1) zeigen jeweils einen Querschnitt durch die Hohlfasern. B - 2 repräsentiert die Aufsicht auf eine Hohlfaser und demonstriert eine markante Abtrennung des homogenen Zellrasens von der nahezu unbesiedelten Membran (Vergrößerung: 125x).

Die Analysen der Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne der HUVECs (vgl. Abbildung 33) offenbarten nach 1,5 h statischer Adhäsion eine sehr homogene Verteilung der eingesetzten Zellen auf den Membranoberflächen sowohl für Polyethersulfon-als auch für Polypropylen-Membranen. Die gleichmäßige Zellverteilung im Endothelzellen-Monolayer konnte auch nach 7 Tagen Kultur im Pumpkreislauf weiterhin nachgewiesen werden. Beide Membrantypen präsentierten zum Teil längs der Membran verlaufende, scharf vom gleichmäßigem Zellrasen abgetrennte Abschnitte ohne nennenswerte Zellbesiedlung (vgl. Abbildung 33, B-2). Die ansonsten besiedelten Stellen waren nahezu vollständig mit einem konfluenten Zellrasen bedeckt. Die durchflusszytometrische Zellzählung der HUVECs auf Polypropylen-Membranen offenbarte eine tatsächliche Zellzahl von $7,7 \cdot 10^5$ Zellen

(Viabilität: 95,4 %) (vgl. Abbildung 30) entsprechend einer Zelldichte von $4,5 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 und somit einer umgerechneten Konfluenz von etwa 68 %.

Die Qualität des Zellrasens auf der Außenoberfläche der Polypropylen-Membranen wurde zusätzlich zur Zellkernfärbung über REM-Aufnahmen weiter spezifiziert.

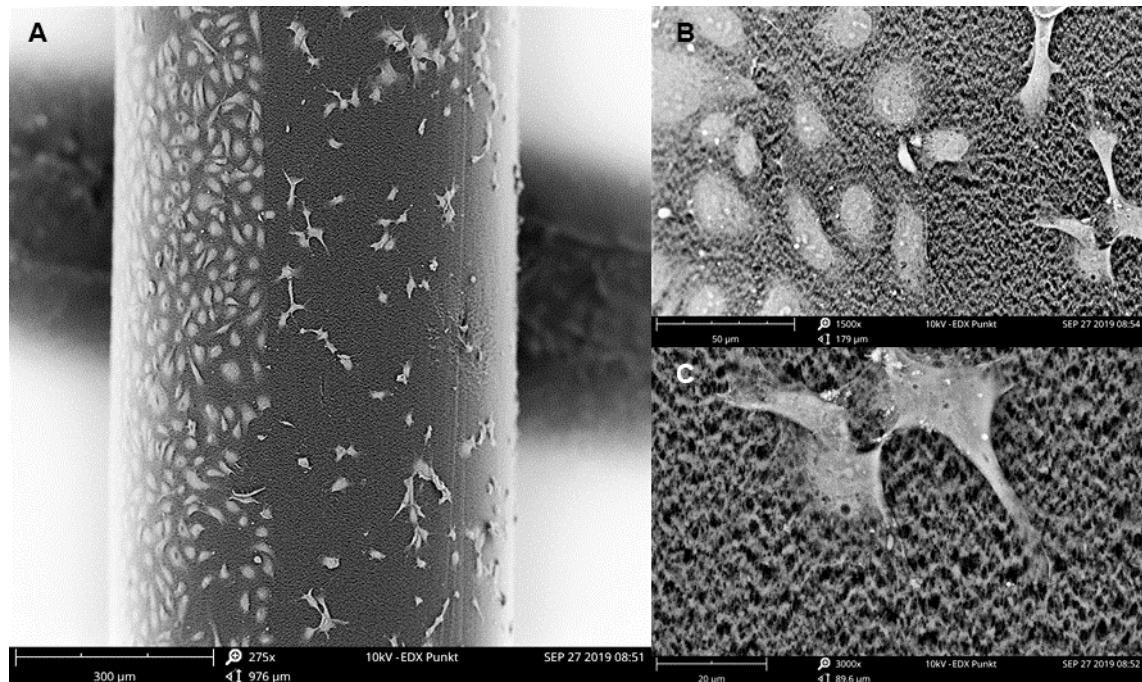


Abbildung 34: REM-Aufnahmen einer mit HUVECs besiedelten Polypropylen-Hohlfaser-membran

REM-Aufnahmen einer Polypropylen-Membran, die auf der Außenseite mit HUVECs besiedelt wurde nach 1,5 h Adhäsionszeit. Die Aussaatdichte betrug $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 . Der homogene, dichte Zellrasen bei Aufsicht auf die Membran ist zu erkennen und offenbart kaum freie Membranoberfläche, wobei der Zellrasen markant abgeschnitten ist (A, Vergrößerung: 275x). Der Übergang ist in B (Vergrößerung 1500x) vergrößert dargestellt. Dadurch lässt sich die Adhäsion einer einzelnen Zelle an die Membranoberfläche erkennen (C, Vergrößerung 3000x).

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse der auf der Außenseite mit HUVECs besiedelten Polypropylen-Membranen (vgl. Abbildung 34) veranschaulichte die Homogenität und Dichte des HUVEC-Monolayers. Die abgebildete Membran präsentierte einen markant abgetrennten Zellrasen auf der einen Seite der Membran, wie schon bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zu beobachten war, und der damit verbundenen geringeren Zelldichte auf der anderen Seite. Die Auswertungen bestätigten die erfolgreiche und gleichmäßige Adhäsion der HUVECs auf der Membranaußenseite der Polypropylen-Membranen.

Zusätzlich zur Vitalität der HUVEC-Kultur über die Kultivierungsdauer von 7 Tagen wurde ihre Proliferationsfähigkeit analysiert. Dazu wurden die Besiedlungsexperimente, analog zur Entwicklung der ASC Zellkultur auf der Innenseite, mit einer Aussaatdichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 wiederholt. Nach 1,5 h, 2, 5 und 7 Tagen im Pumpkreislauf wurde die Besiedlungsdichte der Membranen über fluoreszente Zellkernfärbung ausgewertet sowie nach 7 Tagen zusätzlich quantitativ via durchflusszytometrischer Zellzahlbestimmung.

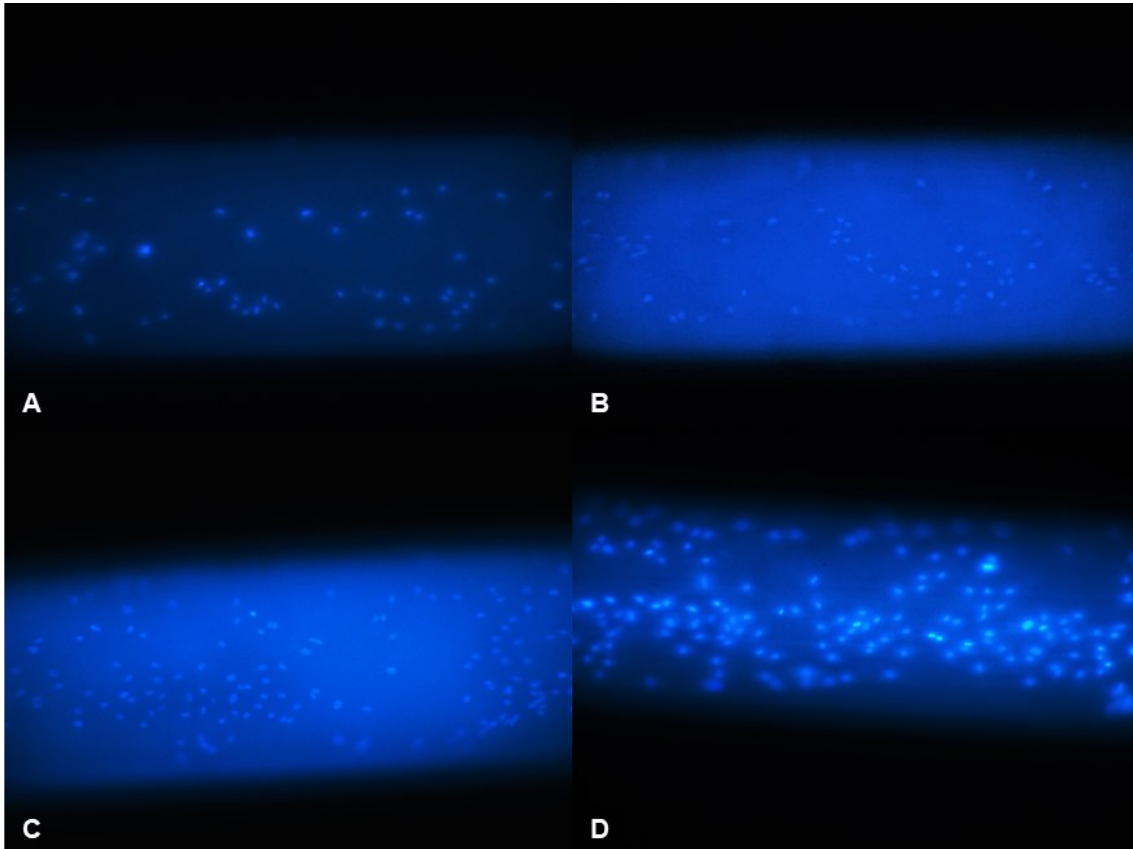


Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen während der Proliferation von HUVECs auf Polypropylen-Membranen nach Zellkernfärbung

Die Aufnahmen zeigen jeweils fluoreszenzmarkierte Zellkerne von HUVECs auf der Außenoberfläche von Polypropylen-Membranen bei einer Aussaatdichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 . Nach 1,5 h Adhäsion ist eine Zelldichte zu erkennen, die etwa der Aussaatdichte entspricht (A). Über die Dauer der Kultur im Pumpkreislauf von 2 (B), 5 (C) und 7 (D) Tagen nahm die Zelldichte auf der Außenoberfläche sichtbar zu. Es sind jeweils Aufsichten auf die Membranen dargestellt (Vergrößerung: 125x).

Abbildung 35 beinhaltet eine repräsentative Auswahl von Aufnahmen der Zellkernfärbung von HUVECs auf der Außenoberfläche von Polypropylen-Membranen, die für bis zu 7 Tage im Pumpkreislauf kultiviert wurden. Die Proliferationsfähigkeit der HUVECs auf der Membranoberfläche konnte durch die Zellkernfärbung qualitativ bestätigt werden. Die

Zelldichte der besiedelten Stellen nahm über die Dauer der Kultur unter dynamischen Bedingungen zu, wobei nach 7 Tagen kein konfluenter Zellrasen erreicht wurde (vgl. Abbildung 35, D). Einige Abschnitte der Oberfläche blieben unbesiedelt. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellzahl offenbarte eine Gesamtzellzahl von etwa $2,2 \cdot 10^5$ Zellen (Viabilität: 96,9 %) (vgl. Abbildung 30), entsprechend einer umgerechneten Zelldichte von $1,1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 .

4.4.4. Besiedlung der Hohlfasermembranen mit einer Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs

Die Entwicklung und Etablierung der Ko-Kultur aus ASCs auf der Innen-, bei gleichzeitiger Besiedlung mit HUVECs auf der Außenmembranoberfläche für die Entwicklung des bio-artifiziellen Tubulus ist von essentieller Bedeutung. Die bisher dargestellten Ergebnisse bestätigen die Etablierung der Monokulturen. Die Besiedlungsmethoden wurden im nächsten Teil der Arbeit zusammengeführt, um eine qualitativ hochwertige Ko-Kultur zu erreichen. Dazu wurde zunächst die Membraninnenseite mit ASCs besiedelt (2 h statische Adhäsion, Aussaatdichte: $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2), anschließend die Membranaußenseite mit HUVECs (1,5 h, $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2).

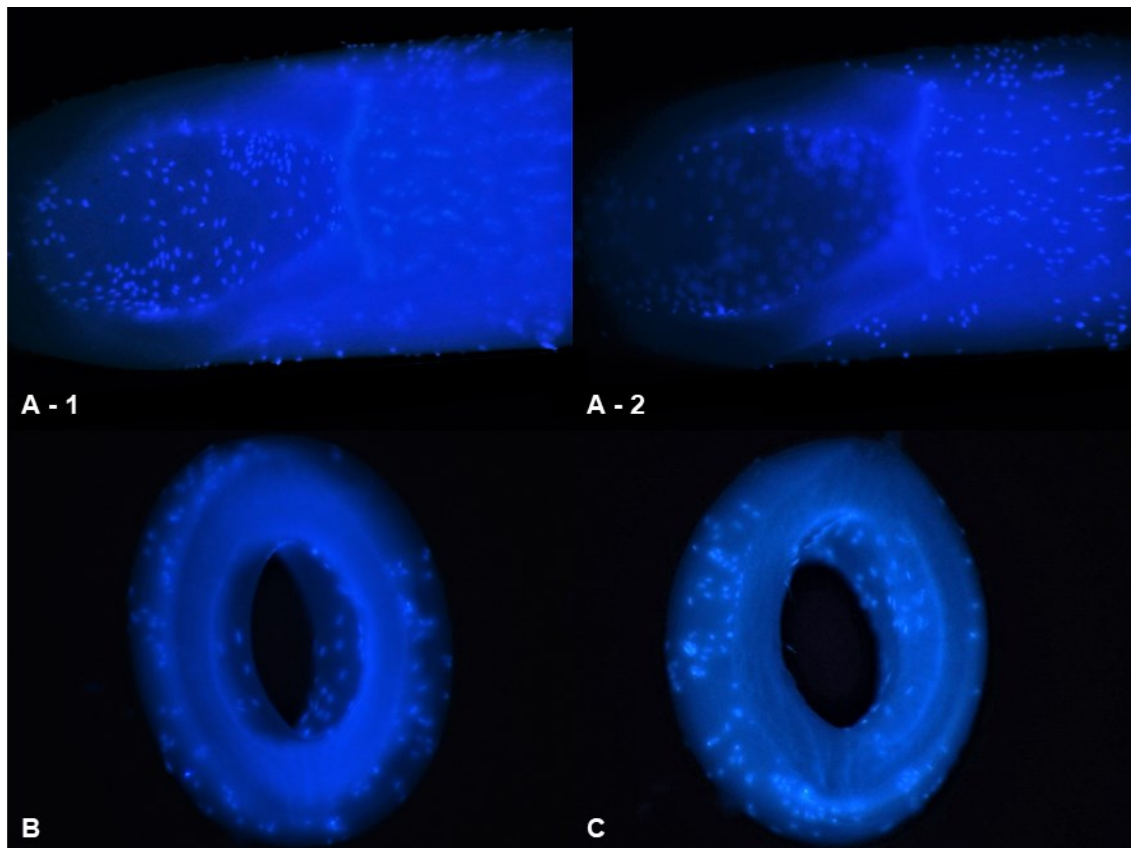


Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs auf Polypropylen-Membranen

Die Abbildungen zeigen fluoreszenzmarkierte Zellkerne von ASCs (innen) und HUVECs (außen) auf Polypropylen-Hohlfasermembranen (jeweils $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2). In (A - 1) und (A - 2) ist ein schräger Schnitt durch eine Membran dargestellt, jeweils mit unterschiedlicher Fokusebene ((1) innen, (2) außen). (C) und (D) zeigen Querschnitte durch eine Membran. Nach 3,5 h (2 h ASCs gefolgt von 1,5 h HUVECs) statischer Adhäsion war sowohl auf der Innen- als auch der Außenmembranoberfläche die erfolgreiche Besiedlung zu sehen. Die Zellverteilung war homogen, die Membranen zeigten über große Abschnitte der Oberfläche ein ähnliches Besiedlungsbild (Vergrößerung: 125x).

Der Besiedlungsstatus der Polypropylen-Hohlfasermembranen mit ASCs auf der Innen- und HUVECs auf der Außenseite wurde analog zu den bisherigen Besiedlungsexperimenten via Fluoreszenzfärbung der Zellkerne ausgewertet. Repräsentative Aufnahmen der gefärbten Hohlfasermembranen sind in Abbildung 36 abgebildet. Die Zellverteilung auf den jeweiligen Seiten der Membran entsprach in etwa der der Monokulturen, sie war größtenteils homogen, die angenommene Zelldichte aber im Vergleich zur Zelldichte der Monokulturen etwas niedriger. Die Außenseite war über ihre Gesamtheit ähnlich besiedelt, mit den gleichen markanten Abtrennungen des Zellrasens wie in der Monokultur. Die Innenseite zeigte ebenfalls analog der Monokultur einige Stellen, die nicht oder nur vereinzelt besiedelt waren, die gleichmäßig dicht besiedelten Abschnitte überwogen jedoch

deutlich. Durch die optische Analyse von Querschnitten bzw. schrägen Schnitten konnte die eindeutige räumliche Trennung der beiden Zelltypen durch die Membranwand demonstriert werden. Die Zellverteilung war größtenteils homogen. Die durch die Zellkernfärbung sichtbare Zelldichte war im Vergleich zu der Zelldichte der Monokulturen etwas geringer.

4.5. Kultivierung primärer proximaler Tubuluszellen auf Hohlfasermembranen

Um die Funktionalität der aus den mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe differenzierten Zellen mit proximal tubulärem Phänotyp mit der primärer proximaler Tubuluszellen vergleichen zu können, sollte eine Zellkultur von hRPTEpCs auf der Membrannenseite von Polypropylen-Hohlfasermembranen etabliert werden. Diese könnte, ebenfalls in Ko-Kultur mit Endothelzellen, als Positivkontrolle für das zu entwickelnde System angewendet werden. Dazu wurden hRPTEpCs in der aus der 2D-Zellkultur übernommenen Zellzahl von $4 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 analog zu ASCs auf der Innenoberfläche von mit Fibronectin beschichteten Polypropylen-Membranen kultiviert. Die Besiedlung wurde aufgrund der deutlich längeren Adhäsionszeit der Zellen nach 24 h statischer Adhäsion, sowie nach 2 und 4 Tagen Kultur im Pumpkreislauf analysiert.

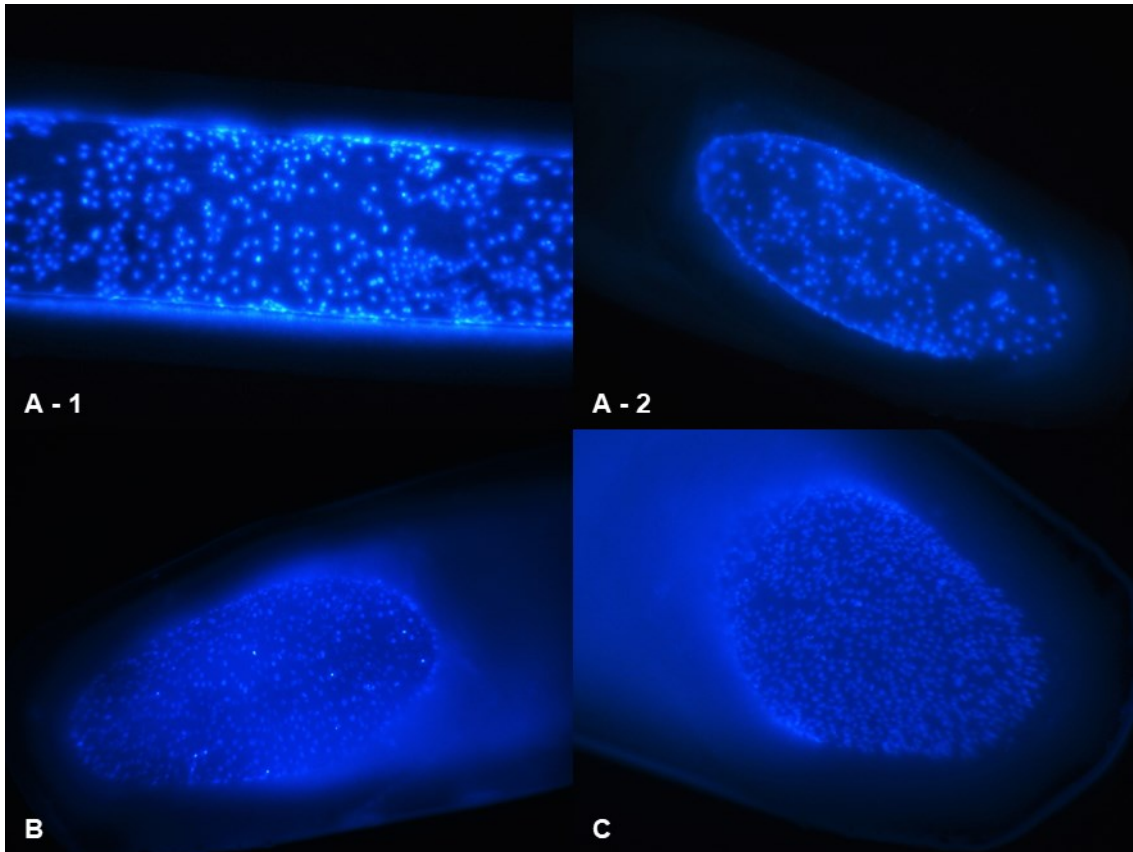


Abbildung 37: Zellkernfärbung von hRPTEpCs auf der Innenoberfläche von Polypropylen-Membranen

Repräsentative Aufnahmen fluoreszenzmarkierter Zellkerne von hRPTEpCs auf der Innenoberfläche von Polypropylen-Membranen mit einer Besiedlungsdichte von $4 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 nach 24 h statischer Adhäsion (A), 2 (B) und 4 Tagen (C) Kultur im Pumpkreislauf. Der nach der Adhäsion erkennbare gleichmäßig homogene Zellrasen ist nach 2 bzw. 4 Tagen Kultur weiterhin zu erkennen (Vergrößerung: 125x).

Die in Abbildung 37 gezeigten Aufnahmen der besiedelten Innenoberfläche von Polypropylen-Membranen demonstrieren die erfolgreiche Kultivierung von hRPTEpCs. Der nach 24 h Adhäsion erkennbare Zellrasen konnte auch nach 2 bzw. 4 Tagen unter dynamischen Kulturbedingungen nachgewiesen werden. Die Membranen präsentierten überwiegend eine dichte, gleichmäßige Besiedlung. Analog zur Besiedlung mit ASCs existieren auch hier Stellen mit geringer Zellbesiedlung. Die dicht besiedelten Stellen überwiegen an allen Analysezeitpunkten deutlich.

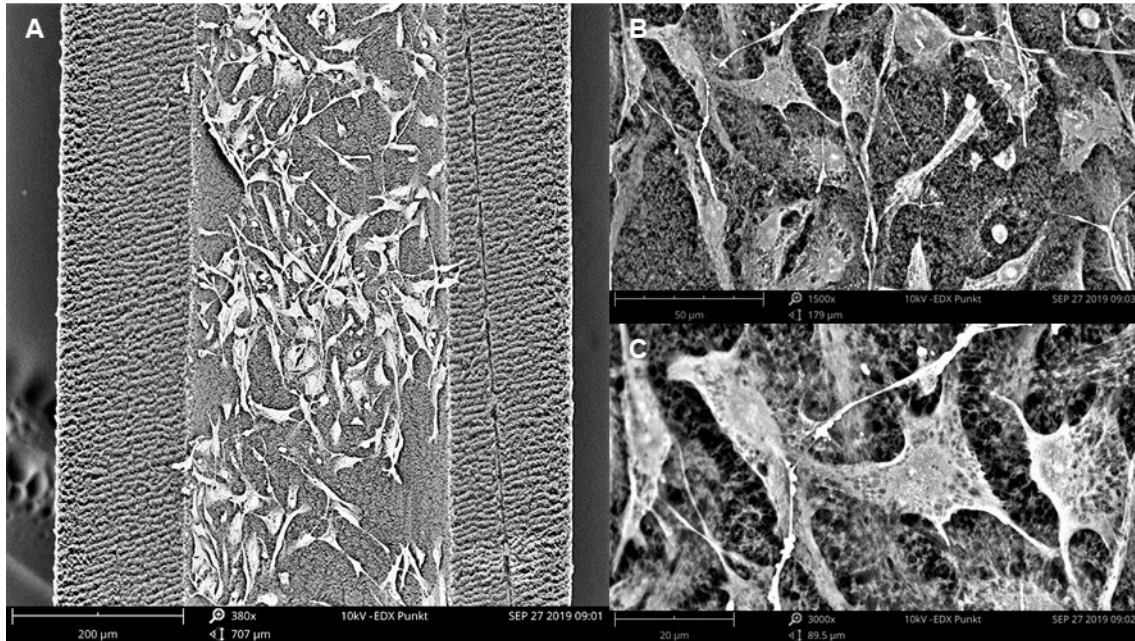


Abbildung 38: REM-Aufnahmen einer mit hRPTEpCs besiedelten Polypropylen-Hohlfaser

Die REM-Aufnahmen zeigen einen Längsschnitt einer auf der Innenseite mit hRPTEpCs (Aussaatdichte: $4 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 , Adhäsionsdauer: 24 h) besiedelten Polypropylen-Membran. (A) Überblick über die komplette Membran (Vergrößerung: 380x), (B, Vergrößerung: 1500x + C, Vergrößerung: 3000x) Abbildung einzelner Zellen. Die Aufnahmen zeigen eine nahezu dichte Zellschicht mit teilweise sichtbarer freier Membranoberfläche.

Die REM-Aufnahmen (vgl. Abbildung 38) bestätigten die durch die Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne angenommene Zelldichte der hRPTEpCs. Das optische Erscheinungsbild der Kultur auf der Hohlfaser ähnelte dem der Kultur unter 2D-Bedingungen (vgl. Abbildung 11). Die hRPTEpCs präsentierten viele dünne, über die benachbarten Zellen reichende Zellausläufer. Weiterhin zeigten die Zellen eine ähnliche Akkumulation wie in 2D, wodurch partiell erhöhte Zelldichten entstanden.

Primäre proximale Tubuluszellen ließen sich demnach erfolgreich auf der Innenoberfläche von Polypropylen-Membranen kultivieren. Die Kultur wurde bei einer hohen Besiedlungsdichte für eine Kultur von mindestens 4 Tagen unter dynamischen Bedingungen im Pumpkreislauf etabliert, wodurch die Module als Positivkontrolle für Assays bezüglich des Differenzierungsstatus der aus ASCs differenzierten Zellen genutzt werden können.

5. Diskussion

Die Hämodialyse und verwandte extrakorporale Verfahren stellen die weltweit gebräuchlichste Form der Nierenersatztherapie bei chronisch dialysepflichtiger Niereninsuffizienz dar. Heute werden weltweit etwa 3,5 Millionen Patienten mit chronischem Nierenversagen regelmäßig mit derartigen extrakorporalen Verfahren behandelt [117]. Schätzungen zufolge werden es 2030 über 5 Millionen Patienten sein [118]. Obwohl mit der Hämodialyse eine lebensverlängernde Therapie existiert, sind aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität (2014 etwa 19 % der Patienten, die mit Hämodialyse behandelt wurden [119]) kontinuierliche Verbesserungen der Behandlung notwendig. Die derzeit angewandten Nierenersatztherapien entfernen gelöste Urämietoxine aus dem Blut des Patienten semiselektiv nach dem Größenausschlussverfahren über eine Dialysemembran durch diffusiven oder konvektiven Stoffaustausch [44, 45]. Die bisher erzielten Fortschritte bei der Entwicklung einer künstlichen Niere basieren unter anderem auf einer Erhöhung der Permeabilität der Dialysemembranen zur effektiveren Entfernung von größeren Toxinen [120]. Die Elimination gelöster Stoffe ist allerdings durch die molare Masse von Albumin limitiert. Albumin ist für den Transport verschiedener gelöster Stoffe im Blut und den kolloidosmotischen Druck im Blutplasma essentiell. Eine Retention im Blut während der Hämodialyse ist daher unbedingt zu gewährleisten [31]. Außerdem könnte ein chronisch intermittierender Albuminverlust während der typischerweise dreimal wöchentlichen Dialyse zu Hypoalbuminämie führen [121], welche mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität bei ESKD-Patienten assoziiert ist [122]. *In-vivo* finden in der Niere nach der glomerulären Filtration im nachgeschalteten tubulären Apparat wichtige Sekretions- und Resorptionsvorgänge statt, die aus dem Primärfiltrat den Endharn prozessieren. Der entscheidende sekretorische Transport proteingebundener Urämietoxine ist dabei im proximalen Tubulus lokalisiert [123]. Gegenwärtige klinische Verfahren der Blutreinigung bilden die komplexen renalen Funktionen nur unzureichend ab. So findet keine Reabsorption essentieller, primär filtrierter Substanzen (wie im Tubulusapparat) statt, endokrine oder synthetisierende Funktionen der Niere werden nicht ersetzt. In Folge dessen gehört z.B. die Substitution von rekombinantem Erythropoetin häufig zur kostenintensiven medikamentösen Standardtherapie eines Dialysepatienten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Basis für einen bio-artifiziellen Tubulus entwickelt werden, welcher die gegenwärtige Hämodialyse um die bisher nicht vorhandenen tubulären Funktionen erweitern soll.

In den vergangenen Jahren haben verschiedene Arbeitsgruppen die Fortschritte in der Entwicklung des bio-artifiziellen Tubulus bzw. einer *bio-artificial kidney* vorgestellt [42, 54].

Humes et al. berichteten unter anderem von einer erfolgreichen Kultivierung primärer hRPTEpCs auf der Innenoberfläche von funktionalisierten Polysulfon-Membranen, die in der Anwendung bei urämischen Hunden bereits positive Behandlungsergebnisse zeigten [87]. Außerdem beschrieben Saito et al. eine Kultur von humanen proximalen Tubuluszellen, deren *Ex-vivo*-Lebensdauer durch Transfektion mit p16^{INK4a}-siRNA künstlich verlängert wurde, auf einer Ethylen-Vinylalkohol-Hohlfasermembran. Erste Anwendungen in der Behandlung von Ziegen, die an akutem Nierenversagen litten, zeigten dabei vielversprechende Ergebnisse [89]. Weiterhin wurde kürzlich die Kultivierung von ciPTECs auf der Außenseite funktionalisierter Polyethersulfon-Membranen beschrieben, in der die Zellen auf der Membran bereits aktiven Transport für organische Anionen aufwiesen. Die Kultur wurde bisher allerdings nur unter statischen Bedingungen entwickelt [53]. Die aufgeführten existierenden Modelle des artifiziellen Tubulus unterliegen allerdings entweder der durch die Verwendung von Primärzellen auftretenden Limitierungen (eingeschränkte Verfügbarkeit, Donorvariabilität, Dedifferenzierung) [87], oder sind durch die Verwendung von Zelllinien mit einem erhöhten Patientenrisiko verbunden [53, 89]. Durch die Verwendung von autologen adipozytären mesenchymalen Stammzellen werden die beschriebenen Risiken und Beschränkungen in der Entwicklung eines artifiziellen Tubulus in der vorliegenden Arbeit umgangen [70].

Das zu entwickelnde bio-artifizielle Konstrukt sollte dabei aus einer Ko-Kultur von PTCs und Endothelzellen bestehen, die auf einer als Basalmembran fungierenden, semipermeablen und in einem für die Dialyseanwendung passenden Modul eingebauten Kapillarmembran kultiviert werden. Die Entwicklung basierte dabei zunächst auf miniaturisierten-Hohlfasermembranbioreaktoren. Für die spätere Anwendung wäre eine Skalierung auf klinische Module erforderlich, was aber nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Im ersten Teil der Arbeit wurden zunächst Methoden und Protokolle für standardisierte Zellkulturbedingungen im Rahmen einer 2D-Zellkulturumgebung etabliert. Dabei lag ein Fokus zunächst auf den Methoden zur eindeutigen Charakterisierung proximaler Tubuluszellen einschließlich ihrer Unterscheidung von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe. Diese Unterscheidungsfähigkeit war von essentieller Bedeutung, um die ebenfalls zu etablierende *In-vitro*-Differenzierung von ASCs zu PTCs nachweisen zu können. Verschiedene Studien beschrieben dabei die potentielle Möglichkeit, ASCs in eine epitheliale Linie zu differenzieren [81, 85, 86]. Ausdifferenzierte PTCs könnten allerdings, wie bereits für primäre proximale Tubuluszellen beschrieben, in Kultur die Fähigkeit zum sekretorischen Transport organischer Anionen verlieren [55]. Da eine Ko-Kultivierung mit endothelialen Zellen nachweislich die Expression von Transportproteinen für organische Anionen

(OAT1, OAT3) in proximalen Tubuluszellen stimuliert [56, 57] könnte so die Sekretionsfähigkeit der differenzierten PTCs auf der Hohlfasermembran mutmaßlich gesteigert werden. Deshalb musste in Vorversuchen für die spätere Anwendung in der 3D-Zellkulturumgebung eines Hohlfaserbioreaktors außerdem ein Medium entwickelt werden, welches die Ko-Kultur von ASCs und HUVECs optimiert, sowie die Adhärenz, Proliferation und Vitalität der beiden Zelltypen bestmöglich garantiert.

5.1. Charakterisierung proximaler Tubuluszellen zur Unterscheidung von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe

In dieser Arbeit sollte unter anderem ein Protokoll zur Differenzierung von ASCs zu funktionalen Zellen mit proximal tubulärem Phänotyp entwickelt werden. Dabei wurde der Differenzierungsstatus über die Dauer der Kultivierung kontinuierlich beurteilt. Die analysierten charakteristischen Merkmale ermöglichten die eindeutige Unterscheidung der ausdifferenzierten proximalen Tubuluszellen von undifferenzierten ASCs.

5.1.1. Phänotypische Analyse von ASCs und PTCs über die Zellmorphologie und durchflusszytometrische Analyse tubulusspezifischer Marker

Eine potentielle Möglichkeit der Charakterisierung primärer proximaler Tubuluszellen ist die Analyse der Expression spezifischer Markergene und der Aktivität spezifischer Enzyme [7]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp primärer proximaler Tubuluszellen durchflusszytometrisch anhand der Expression der tubulusspezifischen Marker AQP1, Na⁺-/K⁺-ATPase, CK18 und Villin 1 [6, 8, 9] charakterisiert.

Aquaporine sind Wasserkanäle für den transmembranen renalen Wassertransport [124]. AQP1 wird konstitutiv im proximalen Tubulus und im absteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert und spielt eine essentielle Rolle in der im proximalen Tubulus lokalisierten Wasserresorption [125].

Die Na⁺-/K⁺-ATPase übernimmt durch die Etablierung und Aufrechterhaltung des transepithelialen Na⁺-Gradienten vielfältige Rollen in epithelialen Transportprozessen. Der Na⁺-Gradient kontrolliert zum einen die Wasserbewegung und energetisiert zum anderen sekundäre transmembrane Transportprozesse [126]. In der Niere ist ihre polarisierte Verteilung ausschließlich auf die basolaterale Membran tubulusepithelialer Zellen begrenzt. Ihre Aktivität ist essentiell für die Reabsorption von Ionen und anderen kleinen Molekülen

aus dem Ultrafiltrat und zur Aufkonzentrierung des Urins [127, 128]. Ihre Expression in primären proximalen Tubuluszellen in Kultur konnte bereits gezeigt werden [8].

Zytokeratine sind die Intermediärfilament-bildenden Proteine von Epithelzellen. Sie werden in Epithel- und Endothelzellen exprimiert, in denen sie die mechanische Stabilität der Zellen gewährleisten [129]. Die Synthese von Zytokeratinen findet während der Induktion der epithelialen Differenzierung statt [130]. Sie stellen eine der ersten epithelialen Strukturproteine dar. CK18 ist eines der am häufigsten vorkommenden Mitglieder der Keratinfamilie. Die Expression ist in ausdifferenzierten Epithelzellen zu beobachten [8], unter anderem auch in Kulturen proximaler Tubuluszellen [131].

Vil1 stellt ein gewebespezifisches, Aktin-bindendes Protein dar, das in Bürstensaummembranen exprimiert wird, wo es das Wachstum der Mikrovilli induziert [132]. Seine Expression konnte in der epithelialen Bürstensaummembran proximaler Tubuluszellen nachgewiesen werden [9, 133].

Zur Charakterisierung wurden primäre hRPTEpCs und ASCs bis zur Konfluenz kultiviert (Abbildung 11). ASCs präsentierten einen spiegeleiförmigen Phänotyp, mit großem zerklüftetem Zytoplasma und weiten Zellausläufern, die typische Zellmorphologie für die 2D-Zellkultur von ASCs [134]. Die hRPTEpCs zeigten eine beinahe würfelförmige Morphologie, typisch für einschichtiges isoprismatisches Epithel, wobei nach 5 Tagen Kultur bereits eine erste Kuppelbildung zu beobachten war, ein Indikator für ein ausgereiftes Epithelium und unidirektionalen Wassertransport [116, 131].

Die durchflusszytometrischen Analysen (Abbildung 12) konnten die Expression der tubulusspezifischen Marker in hRPTEpCs eindeutig nachweisen (für AQP1 waren 99,8 %, für Na⁺/K⁺-ATPase 99,9 % und für CK18 98,9 % der analysierten Zellen positiv). Einzig der Anteil der Vil1-positiven Zellen war mit 21,7 % geringer. Interessanterweise war außerdem festzustellen, dass der Anteil der AQP1- (99,6 %), Na⁺/K⁺-ATPase- (91,1 %) und Vil1-positiven (18,8 %) ASCs vergleichbar mit dem der hRPTEpCs war. Vorherige Studien hatten die Expression von AQP1 in undifferenzierten ASCs ebenfalls gezeigt: Avola et al. gelang dies 2017 [135], während Graziano und Mitarbeiter 2018 zusätzlich nachweisen konnten, dass das Expressionslevel von AQP1 während der chondrogenen Differenzierung sogar anstieg [136]. Acosta et al. beobachteten, dass Alpha- und Beta-Untereinheiten der Na⁺/K⁺-ATPase in frisch isolierten ASCs aus der Ratte exprimiert werden [137], wodurch die vorliegenden Ergebnisse ebenfalls unterstützt werden. Der CK18-positive Teil in der vorliegenden Arbeit kultivierten Populationen unterschied sich zwischen den zwei Zelltypen hingegen deutlich (98,9 % in hRPTEpCs vs. nur 0,34 % in ASCs), was

durch die exklusive Expression von CK18 in ausdifferenzierten Epithelzellen wenig überrascht [8]. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Expression von CK18 somit als Charakterisierungsmerkmal einer funktionalen Differenzierung von ASCs in proximale Tubuluszellen genutzt werden, die Expression von AQP1, Na⁺-/K⁺-ATPase und insbesondere dem bei beiden Zelltypen in erheblich geringerem Maße exprimierten Vil1 aufgrund vergleichbarer Expression in ASCs und hRPTEpCs hingegen nicht.

5.1.2. Charakterisierung von PTCs über die Aktivität der γ -Glutamyltransferase

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Evaluierung der Expression bestimmter Proteine sollte durch die Aktivitätsbestimmung der γ -Glutamyltransferase eine weitere Möglichkeit geschaffen werden, PTCs eindeutig von ASCs zu unterscheiden. Die GGT ist ein an der Plasmamembran verankertes, extrazelluläres Enzym, welches unter anderem γ -Glutamyl-Gruppen von Glutathion hydrolysiert und auf Akzeptormoleküle transferiert [138]. Die GGT ist in tierischem Gewebe weit verbreitet und weist die höchste hydrolytische Aktivität in der Bürstensaummembran der Niere auf [139], [140]. In der humanen Niere wird die GGT am stärksten im proximalen Tubulus exprimiert [109]. Die GGT offenbarte in hRPTEpCs eine Aktivität von $9,9 \pm 2,5$ mU/mL, in ASCs hingegen mit $0,4 \pm 0,0$ mU/mL keine nachweisbare Aktivität (Abbildung 13), wodurch die Bestimmung ihrer Aktivität eine hervorragende Möglichkeit darstellte, den Differenzierungsstatus und gleichzeitig die Funktionalität der differenzierten PTCs zu bestimmen.

5.1.3. Bestimmung der Transportaktivität von MRP4 und P-gp

Der energieabhängige Efflux über die tubuläre Apikalmembran der Niere wird durch Mitglieder der ABC-Transporter-Familie vermittelt, spielt eine Schlüsselrolle in der renalen Clearance und trägt maßgeblich zur sekretorischen Funktionalität des Gewebes bei [141, 142]. P-gp, MRP2 und 4 sowie BCRP sind dabei die vier für den Efflux hauptverantwortlichen ABC-Transporter und eliminieren u.a. eine Vielzahl verschiedener Xenobiotika [143, 144], welche bei gestörter renaler Exkretion in den proximalen Tubuli akkumulieren und zu Nephrotoxizität führen können [145]. Zur weiteren Evaluierung des Differenzierungsstatus ausdifferenzierter PTCs sollte die funktionale Expression von MRP4 und P-gp nachgewiesen werden.

Fluoreszenzbasierte Transport-Assays bieten exzellente Möglichkeiten zur Analyse der Aktivität von Transportsystemen. Dabei nutzen sie Fluorophore, die wiederum spezifische

Substrate für bestimmte Transporter darstellen, wodurch Fluoreszenz basierend auf der metabolischen Aktivität der Zellen entsteht [146]. Die Assays beruhen auf der diffusiven Membrangängigkeit von Stoffen, deren fluoreszente Abbauprodukte bei gleichzeitiger Inhibierung der substratspezifischen Effluxtransporter zu einem messbaren Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz aufgrund der Substratretention führen [64]. Bisherige Studien zeigten, dass CMFDA nach seiner Hydrolyse und Glutathion-Konjugation zu GS-MF, einem spezifischen, fluoreszenten Substrat für Mitglieder der MRP-Familie wird [110, 147]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass sich der von MRP4 vermittelte Efflux von GS-MF in ciPTECs durch den Inhibitor MK571 blockieren lässt [110]. Darüber hinaus wurde Calcein als Substrat für P-gp in ciPTECs verifiziert und der spezifische P-gp vermittelte Calcein-Efflux ließ sich durch PSC833 erfolgreich inhibieren [110].

Nachweis der funktionalen Expression von MRP4 und P-gp in hRPTEpCs durch Inhibierung der spezifischen Transportaktivität

Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse bestätigen die aus der Funktionsanalyse in ciPTECs getroffenen Annahmen für hRPTEpCs, dass sich die Transportaktivität von MRP4 und P-gp durch die spezifischen Inhibitoren MK571 und PSC833 verringern lässt und sich somit die funktionale Expression der Transporter nachweisen lässt [110]. Die errechneten Effluxaktivitäten von MRP4 präsentierten in hRPTEpCs eine starke Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors ($38 \pm 2\%$ für $5\ \mu\text{M}$, $58 \pm 4\%$ für $2,5\ \mu\text{M}$) und somit - im Gegensatz zu ASCs, die keinen Fluoreszenzunterschied zwischen inhibierten und nicht inhibierten Zellen zeigten - die funktionale Expression von MRP4. Die Kontrollzellen ohne Substrat demonstrierten außerdem eine niedrige Fluoreszenz ($8 \pm 0\%$ in hRPTEpCs, $15 \pm 1\%$ in ASCs, jeweils von der Fluoreszenz der nicht inhibierten Kontrolle mit Substrat), was auf die Anwesenheit der für die Umsetzung von CMFDA zu GS-MF notwendigen intrazellulären Esterasen in hRPTEpCs und ASCs schließen lässt. Die deutlich höhere absolut gemessene Fluoreszenzretention in hRPTEpCs im Vergleich mit ASCs (4,6-fach für $5\ \mu\text{M}$, 3,4-fach für $2,5\ \mu\text{M}$, 2,0-fach für nicht inhibierte Kontrollen) wies zum einen auf eine höhere Zellzahl der hRPTEpCs hin, was durch bisherige Beobachtungen des Wachstumsverhaltens (vgl. Abbildung 11), die eine eindeutig höhere Zellzahl im Vergleich zu ASCs zeigten, bestätigt wurde und ist zum anderen durch eine für isoprismatisches Epithel typische höhere metabolische Aktivität der hRPTEpCs, welche sie aufgrund ihrer hohen sekretorischen Leistung *in-vivo* besitzen müssen, zu erklären. Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass sich der von MRP4 vermittelte substratspezifische Efflux von GS-MF in hRPTEpCs effektiv blockieren lässt, was eine funktionale

Expression von MRP4 impliziert. Im Gegensatz dazu zeigten ASCs keine Reaktion auf die Behandlung mit Inhibitoren, woraus das Fehlen von MRP4 gefolgert werden kann.

Die Effluxaktivität von P-gp zeigte sich ebenfalls konzentrationsabhängig, 0,5 μM PSC833 waren zu gering, um den P-gp vermittelten Efflux von Calcein in hRPTEpCs zu inhibieren, während die Inhibierung mit 1 μM PSC833 die Effluxaktivität um 28 % verminderte. ASCs zeigten keine P-gp-vermittelte Effluxaktivität für Calcein. Der Fluoreszenzunterschied zwischen ASC-Kontrollen mit und ohne Substrat bestätigte erneut die Aktivität intrazellulärer Esterasen. Die absolut gemessene Fluoreszenz lag für hRPTEpCs erneut deutlich über der der ASCs (6,6-fach für 1 μM , 2,1-fach für 0,5 μM , 2,3-fach für nicht inhibierte Kontrollen), wodurch die höhere Zellzahl und die stärkere metabolische Aktivität von hRPTEpCs nochmals bestätigt wurde. Aus den Ergebnissen lässt sich vermuten, dass sich P-gp in hRPTEpCs in seiner substratspezifischen Effluxaktivität für Calcein einschränken lässt, was für seine funktionale Expression spricht. Weiterhin lassen die Ergebnisse die Annahme zu, dass P-gp in ASCs nicht exprimiert wird.

Der funktionale Nachweis von MRP4 und P-gp bietet aufgrund der vorliegenden Ergebnisse demnach eine effektive Möglichkeit, um den funktionalen Differenzierungsstatus von PTCs zu analysieren und nachzuweisen und sie eindeutig von undifferenzierten ASCs zu unterscheiden.

5.2. Differenzierung von ASCs zu Zellen mit proximal tubulärem Phänotyp

Die ideale Stammzelle für therapeutische Zwecke oder Anwendungen in der regenerativen Medizin sollte hinsichtlich ihrer Herkunft keinen ethischen Bedenken unterliegen und ihre Gewinnung und Isolierung sollte möglichst minimal invasiv vorgenommen werden können. Weiterhin muss sie in quantitativ ausreichender Zahl verfügbar sein, in Kultur proliferieren können und weit gefächerte Differenzierungsmöglichkeiten bieten - Eigenschaften die auf mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe zutreffen [148].

Während der Organogenese entstehen im humanen Körper epitheliale Strukturen, wie beispielsweise das Tubulusepithel, aus mesenchymalen Zellen [149]. Um *in-vitro* epitheliale Zellen aus mesenchymalen Stammzellen zu differenzieren, wurden in der Vergangenheit verschiedene Strategien verfolgt: In bisherigen Studien, die Fortschritte in der *In-vitro*-Differenzierung von ASCs in eine epitheliale Richtung beinhalteten, wurde die Differenzierung durch Zugabe von All-Trans-Retinoinsäure induziert [81, 85]. Weitere Arbeitsgruppen beschrieben die Differenzierung durch Kultivierung in konditioniertem Medium renaler Tubulusepithelzellen [86]. Darüber hinaus wurde die Differenzierung von bm-MSCs in Zellen

mit renalem tubulären epithel-ähnlichem Phänotyp auch durch eine Ko-Kultur mit beschädigten Zellen des Tubulusepithel erreicht [80]. Die erfolgreiche Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen in renale Epithelzellen konnte von Kim und Dressler 2005 durch Inkubation der Zellen mit einer Kombination aus ATRA, Aktivin A und BMP-7 nachgewiesen werden [150]. Außerdem konnten Narayanan et al. humane embryonale Stammzellen durch Kultur auf einer extrazellulären Matrix aus Matrigel und Inkubation mit ATRA, Aktivin A, BMP-2 und BMP-7 erfolgreich in funktionale renale proximal tubulusähnliche Zellen differenzieren [151].

Aufgrund der vorgesehenen späteren Anwendung des artifiziellen Tubulus im direkten Patientenkontakt sollten in der vorliegenden Arbeit aus Gründen der „Good Manufacturing Practice“ lösliche Substanzen als Differenzierungsfaktoren verwendet werden. Dadurch wird sichergestellt, dass der artifizielle Tubulus dauerhaft unter definierten Bedingungen entwickelt werden kann, ohne Medien oder Zusätze zu verwenden, deren exakte Zusammensetzung unklar ist (wie beispielsweise konditioniertes Medium von beschädigten Tubuluszellen). Deshalb wurde die Differenzierung der ASCs durch Zugabe einer Kombination der löslichen Differenzierungsfaktoren ATRA, Aktivin A und BMP-7 induziert. ATRA ist ein aktiver Metabolit von Vitamin A, dessen Bedeutung in der Entwicklung der Niere bereits 1948 nachgewiesen werden konnte [152]. ATRA spielt eine essentielle Rolle in der embryonalen Entwicklung und reguliert Signaltransduktionswege über die Bindung an spezifische Retinolsäurerezeptoren [153]. Aktive sind multifunktionale Zytokine der *transforming growth factor- β* -(TGF- β)-Superfamilie, die das Zellwachstum und die Differenzierung in vielen biologischen Systemen regulieren [154]. Aktivin A wirkt entweder über den TGF- β - oder den MAPK-Signalweg und reguliert die Differenzierung und das Wachstum proximaler Tubuluszellen über einen autokrinen Wirkmechanismus [155]. Die BMP-Familie moduliert die früh in der renalen Genese gebildete Ureterknospe, wobei BMP-7 vom Mesenchym und Epithelgewebe produziert wird. Der Einfluss auf die dabei stattfindende Tubulogenese ist dosisabhängig, BMP-7 kann abhängig vom renalen Entwicklungszustand sowohl stimulierend, als auch hemmend wirken [156]. Es ist essentiell für die Entwicklung der Niere und wird im adulten Körper hauptsächlich in der Niere produziert [157].

In einer ersten Untersuchung wurde der Einfluss der Konzentration der Differenzierungsfaktoren auf den Differenzierungsstatus analysiert, in welcher die Expression des tubulusspezifischen Markers CK18 als Nachweis für eine erfolgreiche Differenzierung in Zellen mit epithelialem Phänotyp herangezogen wurde. Die Differenzierung der ASCs mit dem niedrig und dem hoch konzentrierten Ansatz präsentierten dabei vergleichbare

Ergebnisse: nach 35 Tagen waren 33,7 % (niedrige Konzentration) bzw. 32,4 % (hohe Konzentration) der analysierten Zellen CK18-positiv (vgl. Abbildung 15, Abbildung 16). Zusätzlich wurde zum jeweiligen Zeitpunkt die GGT-Aktivität bestimmt, um bereits erste Hinweise auf eine mögliche Funktionalität der differenzierten Zellen zu erhalten. Allerdings konnte zu keinem Zeitpunkt eine Aktivität der GGT nachgewiesen werden, weder in den im Standardmedium kultivierten Kontrollzellen, noch in differenzierten Zellen (vgl. Abbildung 17). Die Sensitivität des verwendeten Kits zur Messung der GGT-Aktivität lag laut Herstellerangaben bei $1 \cdot 10^6$ Zellen. Die Differenzierung in 6-Well-Platten führte jedoch bei maximal ca. $6 \cdot 10^5$ Zellen pro Well mit maximal 34 % differenzierten Zellen bezogen auf die Auflösungsgrenze des Kits zu keiner ausreichenden Zellzahl, die eine nachweisbare GGT-Aktivität hätte haben können (ca. $2 \cdot 10^5$ Zellen). Um die Differenzierung demnach über die GGT-Aktivität bestätigen zu können, müssten bei zukünftigen Differenzierungen größere Flächen verwendet werden, um eine höhere Zahl an differenzierten Zellen gewährleisten zu können oder alternativ ein sensitiverer Assay zur Bestimmung der GGT-Aktivität verwendet werden. Die aktuell verfügbaren sowohl kolorimetrischen als auch fluoreszenzbasierten Kits zur Aktivitätsbestimmung verfügen ausnahmslos über keine ausreichende Sensitivität. Die Validierung des Differenzierungsprotokolls mit ASCs unterschiedlicher Herkunft (vgl. Tabelle 4) konnte das Ergebnis für alle ASCs, mit einer maximalen Differenzierungsrate von etwa 54 % CK18-positiver Zellen nach 35 Tagen Differenzierung bestätigen (vgl. Tabelle 15). Zusätzlich demonstrierten die Ergebnisse eine hohe Donorvariabilität, ein Effekt der bereits in der Literatur beschrieben wurde [158]. So waren 54 % der ASCs des ersten Spenders nach 35 Tagen CK18-positiv, hingegen nur 22,54 % der kommerziell erhältlichen ASCs. Parallel dazu zeigten die undifferenzierten Kontrollzellen des ersten Spenders ebenfalls vereinzelte CK18-Expression (11,7 % an Tag 35). Für alle verwendeten ASCs konnte jedoch eine Zunahme des CK18-positiven Anteils der Gesamtpopulation beobachtet werden.

5.3. Optimales Nährmedium für die Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs

Um die Funktionalität und damit die Effektivität des zu entwickelnden Systems potentiell zu erhöhen, sollte das bio-artifizielle Modell des humanen proximalen Tubulus eine Ko-Kultur aus ASCs bzw. ausdifferenzierten PTCs auf den Innenseiten und HUVECs auf den Außenseiten eines Kapillarmembranbündels beinhalten. Die jeweiligen Monokulturen waren dabei im Sinne einer Basalmembran durch die Membranwand räumlich voneinander getrennt. Die Poren in der Membranwand ermöglichten sowohl indirekten Zell-Zell-Kontakt durch sezernierte Stoffe, als auch die Diffusion des Nährmediums über die Membran. Die

Verwendung eines Nährmediums, welches optimale Wachstumseigenschaften (Adhärenz, Proliferation, Vitalität) für beide Zelltypen bietet, ohne jedoch die jeweiligen zellspezifischen Eigenschaften negativ zu beeinflussen, wie beispielsweise durch die Auslösung einer ungewollten Differenzierung, war in dieser Konstellation essentiell. In der Literatur werden für die Kultur von ASCs verschiedene Basalmedien beschrieben. Häufig wurde DMEM genutzt, welches in Kombination mit FCS das gebräuchlichste Medium darstellt [76, 134, 159]. Weiterhin verwendeten einige Arbeitsgruppen DMEM/F12, ein Basalmedium mit geringem Calciumanteil [160, 161], oder *alpha minimum essential medium* (alpha-MEM), wobei die Effekte des Mediums auf die Expression der Oberflächenmarker nicht analysiert wurden [162]. Das am häufigsten genutzte Medium für die Kultur von HUVECs ist M199 [163, 164]. Für ein optimales Wachstum benötigen HUVECs ein mit 20 - 30 % FCS supplementiertes Medium, allerdings sind bereits 10 % ausreichend, um die Wachstumsdichte zu garantieren [165]. Der Zusatz von Wachstumsfaktoren, wie vasculärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Heparin und dem *endothelial cell growth factor* (ECGF), stimuliert das Wachstum von Endothelzellen, weshalb die FCS-Konzentration gesenkt werden kann [163, 166]. Aufgrund der Erfahrungen in der HUVEC-Kultivierung wurde in dieser Arbeit mit dem kommerziell erhältlichen und auf die Kultur von Endothelzellen angepassten Medium ECGM gearbeitet, das ebenfalls bereits in der Vergangenheit bei verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Ansätzen genutzt wurde [167-170].

Zur Evaluierung des Mediums zur Ko-Kultur wurden dementsprechend zunächst die Wachstumseigenschaften der Zellen im Standardmedium des jeweils anderen Zelltyps analysiert. Dabei konnte für HUVECs bei einer Aussaatdichte von $5 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2 im mit Endothelsupplement angereichertem DMEM kein vergleichbares Wachstum wie im Standard-Endothelmedium nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 19, Abbildung 20). Überraschenderweise präsentierten ASCs (Aussaatdichte $5 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2) bei gleichzeitig veränderter Zellmorphologie mit deutlich kleinerem, wenig diffusem Zytoplasma (vgl. Abbildung 21) in DMEM + Endothelsupplement und ECGM \pm Endothelsupplement eine deutlich stärkere Proliferation im Vergleich zur Kultivierung im Standard-ASC-Medium (DMEM) (4,3-fach höhere Fluoreszenz, vgl. Abbildung 22). Die Änderung des Basalmediums von DMEM in ECGM führte bereits zu einer verbesserten Proliferation, wie auch die Zugabe von Endothelsupplement zu DMEM. Der größte die Proliferation verbessernde Effekt wurde in der Kultur von ASCs in ECGM + Endothelsupplement sichtbar. Suga et al. beschrieben in einer Studie ebenfalls einen die Proliferation von ASCs fördernden Effekt von Endothelmedium [171]. Allerdings konnten weitere Arbeitsgruppen, die die Ko-Kultur von MSCs und Endothelzellen untersuchten, keinen wachstumsfördernden

Einfluss von Endothelmedium im Vergleich zu DMEM oder alpha-MEM beobachten [168, 172]. Verschiedene bekannte Wachstumsfaktoren im Endothelmedium könnten im Zusammenhang mit dem beobachteten proliferationsfördernden Effekt von Bedeutung sein. FGF-2, ein Wachstumsfaktor, konnten derartige Eigenschaften in mehreren Studien nachgewiesen werden [171, 173, 174]. Der Einfluss von EGF, einem weiteren Bestandteil des Endothelsupplements, auf die Proliferation von ASCs ist in der Literatur hingegen widersprüchlich beschrieben. So wurde gezeigt, dass EGF die Proliferation von humanen prä-Adipozyten stimuliert [175]. Weiterhin wurde von Baer et al. 2009 eine signifikant verbesserte ASC-Proliferation unter EGF-Zugabe publiziert [176]. Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie von Suga et al., dass die alleinige Zugabe von EGF keinen wachstumsfördernden Effekt auf ASCs hat [171], eine Beobachtung die durch eigene, in dieser Arbeit nicht dargestellte Experimente bestätigt werden konnte.

Die veränderte Zellmorphologie der ASCs legte darüber hinaus die Vermutung nahe, dass entweder durch Wachstumsfaktoren im Endothelsupplement, oder durch Verwendung des ECGM eine Differenzierung der Zellen induziert wurde. In ECGM + Endothelsupplement kultivierte ASCs präsentierten in weiteren, gemäß der *International Society for Cellular Therapy* geforderten [74], Charakterisierungsschritten Eigenschaften, die sie weiterhin als mesenchymale Stammzellen identifizierten. Es konnte durchflusszytometrisch die Expression von CD90, CD105, CD73 und CD44 bei gleichzeitigem Fehlen von CD11b, CD34, CD45, CD19 und HLA-DR nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 23), was zunächst darauf hinwies, dass die kultivierten Zellen trotz veränderter Morphologie weiterhin ASCs darstellten. Es konnte außerdem das geforderte Differenzierungspotential in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten gezeigt werden. Diese wurde über Oil-Red-O-Färbung intrazellulärer Lipidtropfen (vgl. Abbildung 24), über Alizarin-Red-S-Färbung extrazellulärer Calciumablagerungen (vgl. Abbildung 25) bzw. über Alcian-Blau-Färbung von Aggrecan (vgl. Abbildung 26) nachgewiesen. Diese Analysen bestätigten schließlich die weiterhin vorhandenen Stammzellcharakteristika der in ECGM + Supplement kultivierten ASCs. Aufgrund der optimalen Proliferation von HUVECs und der deutlich erhöhten Proliferationsrate inklusive höherer Endzelldichte schien das Endothelmedium somit das optimale Nährmedium für die geplante Ko-Kultur aus HUVECs und ASCs in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren zu sein. Daher wurde das Endothelmedium (ECGM + Endothelsupplement, 10 % FCS, Pen/Strep) in den weiteren Entwicklungsschritten in Richtung des bio-artifiziellen Tubulus als Nährmedium für beide Zelltypen verwendet.

5.4. Zellkultur in Hohlfaserbioreaktoren

5.4.1. Optimale Adhärenz und Proliferation von ASCs durch Fibronectin

Aufgrund ihres spezifischen Designs für die Plasmasparation und damit den direkten Blut-Membran-Kontakt besitzen die in dieser Arbeit verwendeten Membranen (3M™ MicroPES® TF10 und 3M™ Plasmaphan® P1 LX) hämokompatible und dadurch die Adhäsion von Zellen eigentlich behindernde Eigenschaften. Zusätzlich wiesen bisherige Untersuchungen darauf hin, dass z.B. hPTCs ohne Vorbehandlung der Membranoberflächen nicht auf Membranen aus Hydratzellulose, Polysulfon/Polyvinylpyrrolidon oder Polyethersulfon/Polyvinyl-pyrrolidon adhären und proliferieren [94]. Die Membranoberfläche musste daher vor Zellkontakt mit extrazellulären Matrixproteinen funktionalisiert werden.

Die Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrix wird durch spezifische Adhäsionsmoleküle der Zelloberfläche vermittelt, den Integrinen. Diese regulieren dabei die Bindung an spezifische ECM-Strukturen, unter anderem Laminin und Fibronectin [177]. Die Analyse der Zellviabilität durch AlamarBlue™ offenbarte für ASC-Kulturen im Vergleich mit unbeschichteten Kontrollen auf Beschichtungen aus Laminin, Fibronectin und einer Doppelbeschichtung aus L-DOPA und Collagen IV vergleichbare Wachstumseigenschaften, wobei die beste Performance auf Fibronectin gefunden wurde (vgl. Abbildung 27). Die Beschichtungsdauer hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Proliferationsraten, allerdings wurden nur 1 h und 2 h Beschichtungsdauer untersucht. Der Grund für die beste Performance der ASCs auf der Fibronectin-Beschichtung könnte die erhöhte Expression von Fibronectin-Rezeptoren sein, während Laminin- oder Collagen IV-Rezeptoren in hMSCs deutlich geringer ausgeprägt sind [178, 179]. Weiterhin konnte in auf Fibronectin wachsenden hMSCs Integrin α_4 nachgewiesen werden [97], einer der wichtigsten Fibronectin-Rezeptoren [180]. In der standardisierten 2D-Zellkulturumgebung eigneten sich letztlich zwar alle getesteten Beschichtungen als Basis für die ASC-Zellkultur, aufgrund der höheren Endzelldichte wurde in den weiteren Experimenten die Beschichtung der Membranoberflächen mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fibronectin (1 h, 37 °C, 5 % CO_2) für die Zellkultur angewendet. Ein möglicher Einfluss der Beschichtungen auf das Stammzellenpotential der ASCs wurde nicht untersucht, die Literatur beschreibt allerdings einen inhibierenden Einfluss von Fibronectin auf die adipogene Differenzierung [181] sowie eine essentielle Rolle in der osteogenen Differenzierung von ASCs [182]. Da die ASC-Kultur zur späteren Differenzierung genutzt werden sollte, könnte die Beschichtung auch einen die Differenzierung verbessernden Effekt bewirken.

5.4.2. Entwicklung der 3D-Ko-Kultur von ASCs und HUVECs

Derzeit existieren verschiedene Modelle der Zellkultur von mesenchymalen Stammzellen oder Endothelzellen auf Hohlfasermembranen. 2016 wurde von Haack-Sørensen zum ersten Mal beschrieben, dass das „Quantum Cell® Expansion System“, welches kommerziell zur Expansion von bm-MSCs genutzt wird [183], sich ebenfalls zur Vervielfältigung von ASCs eignet [184]. Da allerdings nur die ASC-Expansion analysiert wurde, beinhaltet die Studie nur quantitative, nicht aber qualitative Untersuchungen zur Membranbesiedlung [184]. Weiterhin beschrieben verschiedene Arbeitsgruppen die Kultur von HUVECs auf Hohlfasermembranen, wie beispielsweise Ciechanowska et al., die 2016 eine HUVEC-Kultur auf der Innenoberfläche von mit Fibronektin beschichteten HFMs aus Polysulfon als *In-vitro*-Modell eines Blutgefäßes präsentierten [185]. Außerdem wurde von Janke et al. 2013 für die Entwicklung einer künstlichen Arterie eine Ko-Kultur aus HUVECs und glatten Muskelzellen auf HFM aus Polypropylen publiziert, in der die Endothelzellen auf der inneren Membranoberfläche kultiviert wurden [167]. Weiterhin finden sich einige Studien zur Ko-Kultur von hMSCs und Endothelzellen [168, 169, 172, 186], allerdings ohne einen Hohlfaserbioreaktor als Matrix zu verwenden. Der in dieser Arbeit entwickelte Ansatz beschreibt hingegen die Ko-Kultur von ASCs auf der inneren und HUVECs auf der äußeren Membranoberfläche von HFMs aus Polypropylen bzw. Polyethersulfon, mit dem späteren Ziel der funktionalen Differenzierung in einen artifiziellen renalen Tubulus.

Etablierung der jeweiligen Monokulturen von ASCs und HUVECs auf Hohlfasermembranen

Aus den Vorversuchen wurde ersichtlich, dass die Verwendung von ECGM + Endothel-supplement in Kombination mit einer Beschichtung der Hohlfasermembranen mit Fibronektin die optimale Basis für die Zellkultur von ASCs und HUVECs in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren bieten könnte. Im ersten Schritt zur Etablierung der Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs wurden zunächst Monokulturen, beginnend mit der ASC-Kultur auf der Innenoberfläche der Hohlfasermembranen, entwickelt.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Zelltypen (Aussaatdichten jeweils $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2) auf mit Fibronektin beschichteten Polyethersulfon- und Polypropylen-Membranen adhärten (vgl. Abbildung 29, Abbildung 33). Die Aussaatdichte für HUVECs entsprach dabei der in einer Studie zur Entwicklung eines Blutgefäßes für *In-vitro*-Untersuchungen beschriebenen optimalen Zelldichte zur HUVEC-Besiedlung auf einer Membraninnenoberfläche [185]. Sowohl ASCs als auch HUVECs präsentierten einen dichten Monolayer nach

statischer Adhäsion, der durch Zellkernfärbung und REM-Aufnahmen bestätigt wurde (vgl. Abbildung 31, Abbildung 34) und dessen Qualität über 7 Tage dynamischer Kultur auf den Polypropylen-Membranen aufrechterhalten werden konnte. Die Qualität des ASC-Zellrasens auf Polyethersulfon-Membranen war hingegen nach dieser Zeit deutlich verschlechtert. Der Abfall der Qualität durch die dynamischen Bedingungen wies darauf hin, dass der durch den Volumenfluss des Wachstumsmediums erhöhte mechanische Stress einen negativen Einfluss auf die Viabilität der adhärenen Zellen hatte. Der im Vergleich zur Polypropylen-Membran niedrigere Innendurchmesser der Polyethersulfon-Membranen (300 μM gegen 330 μM) resultiert einerseits in einer erhöhten Krümmung der Membran, verursacht aber andererseits bei gleichem Volumenfluss eine höhere Fließgeschwindigkeit und damit höheren mechanischen Stress. Diese Unterschiede könnten neben den chemischen Membraneigenschaften jeweils für sich oder auch in Kombination das Zellwachstum möglicherweise inhibiert oder zur Apoptose geführt haben. Eine Studie zum Vergleich der Hämokompatibilität der verwendeten Membranen ist derzeit allerdings ebenso wenig bekannt, wie Untersuchungen zum Einfluss der chemischen Zusammensetzung auf eine potentielle Zelladhäsion, potentielles Zellwachstum oder schließlich eine mögliche Apoptose. Als für die klinische Anwendung zugelassene Medizinprodukte haben beide verwendeten Membrantypen jedoch die in Europa und anderswo gültigen diesbezüglichen Anforderungen an die Hämokompatibilitätseigenschaften im Rahmen des Zulassungsprozesses erfüllen müssen (siehe dazu [187]).

In der 2D-Zellkultur erreichten ASCs in ECGM + Endothelsupplement eine konfluente Zellzahl von etwa $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 . Zur Berechnung des Besiedlungszustandes der Hohlfasermembranen wurde angenommen, dass auf Hohlfasermembranen kultivierte ASCs die gleiche konfluente Zelldichte hätten erreichen können. Dementsprechend entsprach die durch die durchflusszytometrische Zellzählung nach 7 Tagen dynamischer Kultur auf den Polypropylen-Membranen niedrigere bestimmte Zellzahl ($2,8 \cdot 10^5$ Zellen) einer Konfluenz von etwa 76 %. Die konfluente Aussaatdichte ($6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 Membraninnenoberfläche) resultierte demnach nicht in einem, die gesamte Membranoberfläche bedeckenden Zellrasen. Es existierten einige wenige Stellen ohne bzw. mit geringerer Zelldichte. Bereits kleine Unterschiede des Durchmessers der einzelnen Fasern des Bioreaktors könnten zu einem ungleichmäßigen Fluss der Zellsuspension während der Besiedlung geführt haben, so dass zumindest teilweise unterschiedliche Zelldichten nach der Adhäsion resultierten. Änderungen der Besiedlungsstrategie - getestet wurden verschiedene transmembranöse Filtrationsrichtungen des Nährmediums und eine Besiedlung nur durch Sedimentation - hatten keinen Einfluss auf die Zellverteilung entlang der einzelnen Fasern. Die Verteilung der weniger dicht besiedelten Stellen schien rein zufällig

aufzutreten. Der im Vergleich zur 2D-Aussaart hohe mechanische Stress während der Besiedlung könnte zusätzlich einen schädigenden Einfluss auf die Viabilität und die Adhäsionsfähigkeit der Zellen gehabt haben. Weiterhin ist nicht davon auszugehen, dass sämtliche eingesetzte Zellen auch tatsächlich auf den Membranen adhärieren konnten, denn selbst unter standardisierten 2D-Zellkulturbedingungen wurde keine 100-prozentige Adhäsionsrate erreicht. So berichteten beispielsweise Salzig et al. darüber, dass ungeachtet der Beschichtung der Oberflächen bei Aussaat von $3 \cdot 10^3$ ASCs pro cm^2 lediglich etwas über 90 % der Zellen nach 2 h adhärirt hatten [97].

Diese Limitierungen hätten allerdings einen geringeren Einfluss auf die Qualität der HUVEC-Verteilung auf der Außenseite der Polyethersulfon- und Polypropylen-Membranen haben müssen, da das höhere Extrakapillarovolumen der Module (ca. 500 μL im Vergleich zu ca. 70 μL Intrakapillarovolumen) zu einer deutlichen Verringerung des mechanischen Stresses während der Besiedlung führte. Dementsprechend präsentierten die HUVECs einen homogenen Zellrasen über nahezu die komplette Membranoberfläche beider Membrantypen. Dieser Unterschied zur Intrakapillarbesiedlung wird von den durch Ciechanowska et al. beschriebenen Beobachtungen gestützt, wonach HUVECs nach Besiedlung der Membraninnenseite von Fibronectin-beschichteten Polysulfon-Membranen tatsächlich nicht homogen verteilt waren und nach Aussaat von $6 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 zusätzlich zur heterogenen Zellverteilung bereits direkt nach der Besiedlung durch manuelle Zellzählung nur noch 77 % der Zellen auf der Membran nachgewiesen werden konnten [185]. Im Rahmen der vorliegenden Experimente waren darüber hinaus jedoch längsverlaufende, scharf vom Zellrasen abgetrennte, unbesiedelte Bereiche im Besiedlungsmuster der Membranaußenseite auffällig (vgl. Abbildung 33 B - 2, Abbildung 34), die auf direkt kontaktierende Überlagerungen benachbarter Einzelfasern aufgrund ihrer Ondulation oder nicht perfekt parallelen Einbettung im Modulgehäuse zurückzuführen waren. Durch diesen direkten physischen Kontakt der Hohlfasern konnten die betroffenen Abschnitte der Membranoberfläche von der Zellsuspension primär nicht erreicht werden. Die durchflusszytometrische Zellzählung offenbarte eine dadurch unvollständige Konfluenz von etwa 68 % nach 7 Tagen dynamischer Kultur auf Polypropylen-Membranen. Der Nettoverlust der Besiedlungsoberfläche durch die Überlagerungen wurde in der Berechnung nicht abgebildet, die eigentliche Zelldichte in den bewachsenen Arealen war demnach deutlich höher. Aufgrund der besseren Eignung der Polypropylen-Membranen für die ASC-Zellkultur wurden alle weiteren Untersuchungen mit dieser Membrantype durchgeführt.

Das spätere „Upscaling“ der Methode von Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren zu klinisch anwendbaren Großmodulen mit einer aktiven Innenoberfläche von über 1 m^2 wird extrem hohe Zellzahlen erfordern. Deshalb ist eine Proliferation der Zellen im Modul essentiell. Die, durch die durchflusszytometrische Zellzählung bestimmte Proliferationsrate der ASCs nach Aussaat in einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 im Bioreaktor war im Vergleich zur 2D-Kultur jedoch verlangsamt (vgl. Abbildung 21, Abbildung 22). Dennoch demonstrierte die Fluoreszenzfärbung nach 4 Tagen dynamischer Kultur Stellen mit nahezu konfluenter Zelldichte (vgl. Abbildung 32), andere Bereiche der Membran blieben hingegen dünner oder sogar unbesiedelt. Die tatsächliche Proliferationsrate war möglicherweise auch im Intrakapillarraum höher als die errechnete, da die durch die flussbedingten Scherkräfte in den Membranhohlfasern verringerte Adhäsion bereits in einer niedrigeren Zelldichte resultierte. Weiterhin könnte eine teilweise inhomogene Zellverteilung im Intrakapillarraum eine ungleichmäßige Besiedlung der Membranen zur Folge gehabt haben, wodurch lokale Abschnitte mit niedrigerer Zelldichte unter der für die Proliferation notwendige Mindestzelldichte entstanden sein könnten. Haack-Sørensen beschrieben dazu passend, dass ASCs in 2D-Kultur bei zu niedriger Aussaatdichte nicht proliferierten und zu keinem Zeitpunkt einen homogenen Zellrasen erreichten [184]. Den Angaben in der Literatur zufolge werden für die 2D-Zellkultur üblicherweise Aussaatdichten ab $2 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2 verwendet [134]. Die optimale Aussaatdichte für kommerziell erhältliche ASCs wird hingegen bei $4 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2 angegeben [188]. Diese Annahmen - unbesiedelte oder zu gering besiedelte Stellen verbleiben unbesiedelt - werden durch die Beobachtung nicht besiedelter Stellen der Membranen nach 7 Tagen dynamischer Kultur bei konfluenter Aussaatdichte unterstützt.

Die Proliferation der HUVECs wurde durch Zellkernfärbung nachgewiesen. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die lokale Zelldichte besiedelter Membranen (Aussaatdichte $1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2) mit der Kultivierungsdauer zunahm (vgl. Abbildung 35) - abgesehen von einigen unbesiedelten Stellen der Membranen. In bisherigen Untersuchungen zur Proliferation von HUVECs auf Hohlfasermembranoberflächen konnte unter dynamischen Bedingungen kein Zellwachstum nachgewiesen werden, die Zellzahl an Tag 0 nach Aussaat änderte sich in einer Kultur von bis zu 96 h nicht [185]. Verglichen mit der Wachstumsrate in der 2D-Kultur, hier erreichen HUVECs bei einer Aussaatdichte von $5 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2 die Konfluenz nach etwa 5 Tagen (vgl. Abbildung 19), war die Verdopplungsdauer der HUVECs im Hohlfasermodul erhöht. Dazu passend zeigten Proliferationsstudien zu HUVECs auf der Membraninnenseite, dass sich die Zellen nach 72 h dynamischer Kultur höchstens einmal, im selben Zeitraum in 2D-Kultur aber bis zu fünfmal geteilt hatten [185]. Die bei einer Aussaatdichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 nach 7 Tagen

dynamischer Proliferation auf der Polypropylen-Membran gezählte Zellzahl von $1,1 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 wies zunächst nur auf eine stark verlangsamte Proliferationsrate hin. Allerdings führten die unbesiedelten Teile der Membranen und die angewandte Methode der Zellzählung - analog zur ASC-Kultur - zu einem, die eigentliche Proliferation unterschätzenden, deutlich geringeren Wert als die potentiell mögliche Zellzahl bei vollständig konfluentem Wachstum aller Bereiche der Membran.

Durch die vorliegenden, im vorherigen Abschnitt diskutierten Ergebnisse der Untersuchungen der 3D-Zellkultur auf Fibronectin beschichteten Polyethersulfon- und Polypropylen-Hohlfasermembranen konnte die Adhäsionsfähigkeit von ASCs eindeutig und reproduzierbar nachgewiesen werden. Fluoreszente Zellkernfärbung, REM-Aufnahmen und die durchflusszytometrische Bestimmung der adhärenierten Zellen bestätigten dabei die erfolgreiche Membranbesiedlung. Darüber hinaus konnte die Proliferationsfähigkeit und Viabilität von ASCs auf Polypropylen-Membranen unter dynamischen Kulturbedingungen für mindestens 7 Tage demonstriert werden. Zusätzlich konnte die HUVEC-Kultur auf der Außenmembranoberfläche von sowohl Polyethersulfon- als auch Polypropylen-Membranen über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen gezeigt sowie die Proliferationsfähigkeit von HUVECs auf Polypropylen-Membranen bestätigt werden.

Ko-Kultur von ASCs und HUVECs im 3D-Bioreaktor

In bisherigen Studien konnte durch die Ko-Kultivierung von primären proximalen Tubuluszellen und Endothelzellen die Expression der Transportproteine für organische Anionen (OAT1, OAT3) in proximalen Tubuluszellen gesteigert werden [56, 57]. Da der überwiegende Teil der proteingebundenen Urämietoxine organische Anionen sind [55], können ko-kultivierte Endothelzellen demnach die Sekretionsfähigkeit des Epithels aus PTCs im Intrakapillarraum der Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren mutmaßlich steigern. In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Zusammenführung der zunächst etablierten Monokulturen der jeweiligen Zellen zu einer Ko-Kultur (vgl. Abbildung 36) möglich ist. Die analysierten Hohlfasermembranen präsentierten bei gleichzeitiger Besiedlung der Innen- und Außenoberfläche eine Besiedlungsqualität, die mit der der jeweiligen Monokulturen vergleichbar war. Obwohl die Ko-Kultur bis zu diesem Zeitpunkt nur nach statischer Inkubation analysiert wurde, erlauben die vorliegenden Vorversuche zur Proliferation und Viabilität der Monokulturen die Annahme, dass sich die Zellen in der Ko-Kultur auch bei räumlicher Trennung durch die Kapillarmembranwand ähnlich verhalten, insbesondere bei Verwendung identischer Kulturbedingungen wie in den Monokulturen.

5.5. Bewertung der vorliegenden Arbeiten zum artifiziellen Tubulus

In der vorliegenden Arbeit sollte die Machbarkeit eines sogenannten artifiziellen Tubulus evaluiert werden. Ein artifizieller Tubulus stellt ein vereinfachtes Modell des humanen proximalen Tubulus dar, der die klinische Hämodialyse idealerweise um bisher nicht vorhandene renal tubuläre Funktionen, wie die adäquate Entfernung proteingebundener Urämietoxine aus dem Blut dialysepflichtiger Patienten, ergänzt. Die funktionale Differenzierung der proximalen Tubuluszellen aus mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe sollte dabei eine neue Quelle der notwendigen Zellen bieten. Die Isolation adipozytärer Stammzellen ist simpel und minimalinvasiv, sie sind in einer hohen Zellzahl verfügbar, ethische Bedenken wie beispielsweise bei der Verwendung embryonaler Stammzellen entfallen, und durch eine spätere autologe Behandlung der Patienten mit körpereigenen Zellen sinkt das Patientenrisiko drastisch. Die Basis für die Entwicklung des artifiziellen Tubulus beinhaltet zum einen die erfolgreiche Differenzierung von ASCs in Zellen mit proximal tubulärem Phänotyp. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit durch Zugabe von löslichen Differenzierungsfaktoren - ATRA, Aktivin A und BMP-7 - induziert sowie über die Expression von CK18 nachgewiesen. Zusätzlich war die Etablierung einer 3D-Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs in Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren für die weitere Entwicklung essentiell. Das dabei verwendete Medium, welches optimale Wachstumsbedingungen für beide Zelltypen garantierte, führte überraschenderweise zu einem extremen Anstieg der Proliferation von ASCs bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung des Stammzellstatus. Daraus folgend konnte in dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden, dass sowohl Monokulturen über eine Dauer von mindestens 7 Tagen auf den funktionalisierten Membranoberflächen von Polyethersulfon- bzw. Polypropylen-Hohlfasermembranen in Bioreaktoren möglich sind, als auch dass die simultane Besiedlung beider Membranseiten in qualitativ hochwertigen Zellrasen resultiert.

Weitere Untersuchungen und Entwicklungsschritte müssen die Ergebnisse jedoch ergänzen. So sind beispielsweise die Analysen der Besiedlungserfolge auf Hohlfasermembranen über die durchflusszytometrische Zellzählung, REM-Aufnahmen oder Zellkernfärbung Endpunktanalysen, welche die Zerstörung der Bioreaktoren erfordern. Deshalb könnte ein zukünftiges Ziel sein, eine zerstörungsfreie Möglichkeit zu entwickeln, um den Besiedlungsstatus der Membranen in Echtzeit zu evaluieren, wodurch das Erreichen eines konfluenten Zustandes punktgenau ermittelt werden könnte. Die Expression bestimmter Glukoseaufnahmetransporter in ASCs (Mitglieder der GLUT-Familie) [189-191] könnte dabei genutzt werden, um durch eine Messung der Glukoseaufnahmekinetik der auf den Hohlfasermembranen im Bioreaktor kultivierten ASCs eine Bestimmung der Zellzahl zu

ermöglichen. Weiterhin könnte die durch die Ausbildung eines konfluenten Epithelgewebes entstehende Funktion einer transepithelialen Barriere dazu dienen, um durch freie Membranstellen diffundierendes FITC-Inulin zu analysieren, was von Jansen et al. 2015 bereits für einen Monolayer aus ciPTECs auf Hohlfasermembranen aus Polyethersulfon gezeigt werden konnte [68]. Nach der Adaption des Differenzierungsprotokolls in die Umgebung des Hohlfaserbioreaktors muss in weiteren Schritten die Funktionalität der differenzierten Zellen gewährleistet werden. Dazu ist es zum einen notwendig, die differenzierten Zellen auf die Expression weiterer Marker (AQP1, Na⁺-/K⁺-ATPase) zu analysieren. Zum anderen muss die Transportaktivität der für den Transport der proteingebundenen Urämietoxine verantwortlichen Transporter, wie beispielsweise OAT1 oder OAT3, evaluiert werden, deren Expression in primären PTCs bei Ko-Kultur mit Endothelzellen nachweislich gesteigert wird [56, 57]. Dabei kann die Sekretionsleistung jeweils mit der Funktionalität primärer PTCs auf Hohlfasermembranen verglichen werden, deren Kulturmöglichkeit auf Polypropylen-Membranen in dieser Arbeit über Zellkernfärbung und REM-Aufnahmen ebenfalls bereits demonstriert wurde (Abbildung 37, Abbildung 38), bisher allerdings nur als Monokultur und nicht als Ko-Kultur mit Endothelzellen. Diese Form der Charakterisierung könnte unmittelbar nach der Besiedlung erfolgen, um möglichen funktionalitätseinschränkenden Effekten wie der Dedifferenzierung der primären PTCs über eine längere Kulturdauer zu entgehen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse stellen grundlegende Vorarbeiten zum bio-artifiziellen renalen Tubulus dar. Sie legen nahe, dass das Konzept des bio-artifiziellen Tubulus auf Basis von Polypropylen-Hohlfasermembranen und einer Ko-Kultur von ASCs und HUVECs funktional sein könnte. Die gezeigte Differenzierungsmöglichkeit in Kombination mit der etablierten Ko-Kultur von ASCs und HUVECs auf Polypropylen-Membranen bieten dabei eine vielversprechende Basis für die zukünftige Entwicklung des bio-artifiziellen Tubulus.

6. Literaturverzeichnis

1. Baumann, R., *Physiologie*. 2010: Georg Thieme Verlag.
2. Samuel, I. *The Anatomy of a Kidney*. 2012 [cited 2020 02.07.]; Available from: <http://www.interactive-biology.com/3254/the-anatomy-of-the-kidney/>.
3. Nowack, R., R. Birck, and T. Weinreich, *Dialyse und Nephrologie für Fachpersonal*. 2009: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
4. OpenStax, C. *Anatomy and Physiology*. [cited 2020 23.01]; Available from: <https://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46429.html>.
5. Pschyrembel, W., *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 2007: De Gruyter.
6. Baer, P.C., et al., *Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note*. *Kidney Int*, 1997. **52**(5): p. 1321-31.
7. Helbert, M.J., S. Dauwe, and M.E. De Broe, *Flow cytometric immunodissection of the human nephron in vivo and in vitro*. *Exp Nephrol*, 1999. **7**(5-6): p. 360-76.
8. Baer, P.C., et al., *Differentiation status of human renal proximal and distal tubular epithelial cells in vitro: Differential expression of characteristic markers*. *Cells Tissues Organs*, 2006. **184**(1): p. 16-22.
9. Robine, S., et al., *Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells?* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(24): p. 8488-92.
10. Johnson, M., *Brenner & Rector's the kidney*. *Canadian Journal of Surgery*, 1996. **39**(6): p. 515-516.
11. El-Sheikh, A.A., et al., *Interaction of immunosuppressive drugs with human organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3, and multidrug resistance-associated protein (MRP) 2 and MRP4*. *Transl Res*, 2013. **162**(6): p. 398-409.
12. Vasiliou, V., K. Vasiliou, and D.W. Nebert, *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. *Hum Genomics*, 2009. **3**(3): p. 281-90.
13. Giacomini, K.M., et al., *Membrane transporters in drug development*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010. **9**(3): p. 215-236.
14. Chevtchik, N.V., *Development of an upscaled bio-artificial kidney*. 2017, University of Twente, Enschede: Enschede.

15. Huls, M., et al., *The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane*. *Kidney Int*, 2008. **73**(2): p. 220-5.
16. Russel, F.G., J.B. Koenderink, and R. Masereeuw, *Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules*. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. **29**(4): p. 200-7.
17. Motohashi, H. and K. Inui, *Organic cation transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the human kidney*. *AAPS J*, 2013. **15**(2): p. 581-8.
18. Nielsen, R., E.I. Christensen, and H. Birn, *Megalyn and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease*. *Kidney International*, 2016. **89**(1): p. 58-67.
19. Rahmoune, H., et al., *Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(12): p. 3427-34.
20. Carney, E.F., *The impact of chronic kidney disease on global health*. *Nat Rev Nephrol*, 2020. **16**(5): p. 251.
21. Hoste, E.A., et al., *Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study*. *Intensive Care Med*, 2015. **41**(8): p. 1411-23.
22. Vanholder, R.C., R. De Smet, and N.H. Lameire, *Uremic toxicity*, in *Replacement of Renal Function by Dialysis*, W.H. Hörl, et al., Editors. 2004, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 15-55.
23. Levey, A.S., et al., *Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*. *Kidney International*, 2005. **67**(6): p. 2089-2100.
24. Levy, J., E. Brown, and C. Daley, *Oxford Handbook of Dialysis*. 2009: OUP Oxford.
25. Khwaja, A., *KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury*. *Nephron Clinical Practice*, 2012. **120**(4): p. c179-c184.
26. Zuk, A. and J.V. Bonventre, *Acute Kidney Injury*. *Annu Rev Med*, 2016. **67**: p. 293-307.
27. Vanholder, R., et al., *Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability*. *Kidney Int*, 2003. **63**(5): p. 1934-43.
28. Vanholder, R.C. and G.L. Glorieux, *An overview of uremic toxicity*. *Hemodial Int*, 2003. **7**(2): p. 156-61.

29. Vanholder, R., S. Van Laecke, and G. Glorieux, *What is new in uremic toxicity?* *Pediatr Nephrol*, 2008. **23**(8): p. 1211-21.
30. EUTox. *Uremic Solutes Database*. 2020 [cited 2020 12.08.]; Available from: <https://database.uremic-toxins.org/statistics.php>.
31. Depner, T. and L. Garred, *Solute transport mechanisms in dialysis*, in *Replacement of Renal Function by Dialysis*, W.H. Hörl, et al., Editors. 2004, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 73-93.
32. Ledebro, I., *Principles and practice of hemofiltration and hemodiafiltration*. *Artif Organs*, 1998. **22**(1): p. 20-5.
33. De Smet, R., et al., *Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis*. *Clin Chem*, 2003. **49**(3): p. 470-8.
34. Bammens, B., et al., *Removal of middle molecules and protein-bound solutes by peritoneal dialysis and relation with uremic symptoms*. *Kidney Int*, 2003. **64**(6): p. 2238-43.
35. Bammens, B., et al., *Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 2006. **69**(6): p. 1081-7.
36. Krieter, D.H., et al., *Protein-bound uraemic toxin removal in haemodialysis and post-dilution haemodiafiltration*. *Nephrol Dial Transplant*, 2010. **25**(1): p. 212-8.
37. Lesaffer, G., et al., *Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane*. *Nephrol Dial Transplant*, 2000. **15**(1): p. 50-7.
38. GOTD. *Organ Donation and Transplantation Activities*. 2019 [cited 2020 19.02.]; Available from: <http://www.transplant-observatory.org/>.
39. Tushla, L.E. *When a Transplant Fails*. 2019 [cited 2020 21.02.]; Available from: https://www.kidney.org/transplantation/transaction/TC/summer09/TCsm09_TransplantFails.
40. Eurotransplant. *Yearly Statistics Overview - 2019*. 2019 [cited 2020 21.02.]; Available from: <https://www.eurotransplant.org/statistics/yearly-statistics/>.
41. HRSA. *Organ Procurement and Transplantation Network*. 2020 [cited 2020 21.02.]; Available from: <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/>.
42. Humes, H.D., et al., *The bioartificial kidney: current status and future promise*. *Pediatr Nephrol*, 2014. **29**(3): p. 343-51.

43. Kramer, A., et al., *The ERA-EDTA Registry Annual Report 2017: a summary*. Clinical Kidney Journal, 2020.
44. Vanholder, R.C., S. Eloot, and G.L. Glorieux, *Future Avenues to Decrease Uremic Toxin Concentration*. Am J Kidney Dis, 2016. **67**(4): p. 664-76.
45. Eloot, S., I. Ledebro, and R.A. Ward, *Extracorporeal removal of uremic toxins: can we still do better?* Semin Nephrol, 2014. **34**(2): p. 209-27.
46. Arastéh, K., et al., *Duale Reihe Innere Medizin*. 2018: Thieme.
47. Krieter, D.H. and C. Wanner, *Membranes for Dialysis and Hemofiltration*, in *Management of Acute Kidney Problems*, A. Jörres, C. Ronco, and J.A. Kellum, Editors. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 491-505.
48. Boschetti-de-Fierro, A., et al., *MCO Membranes: Enhanced Selectivity in High-Flux Class*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18448.
49. Leyboldt, J.K. and C. Ronco, *Optimization of high-flux, hollow-fiber artificial kidneys*, in *Replacement of Renal Function by Dialysis*, W.H. Hörl, et al., Editors. 2004, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 95-113.
50. Polaschegg, H.-D. and N.W. Levin, *Hemodialysis Machines and Monitors*, in *Replacement of Renal Function by Dialysis*, C. Jacobs, et al., Editors. 1996, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 333-379.
51. Barreto, F.C., et al., *Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(10): p. 1551-8.
52. Meijers, B.K., et al., *p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease*. Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(7): p. 1182-9.
53. Chevtchik, N.V., et al., *Upscaling of a living membrane for bioartificial kidney device*. Eur J Pharmacol, 2016. **790**: p. 28-35.
54. Tasnim, F., et al., *Achievements and challenges in bioartificial kidney development*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2010. **3**: p. 14.
55. Nigam, S.K., et al., *Handling of Drugs, Metabolites, and Uremic Toxins by Kidney Proximal Tubule Drug Transporters*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(11): p. 2039-49.
56. Aydin, S., et al., *Influence of microvascular endothelial cells on transcriptional regulation of proximal tubular epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(2): p. C543-54.

57. Tasnim, F. and D. Zink, *Cross talk between primary human renal tubular cells and endothelial cells in cocultures*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(8): p. F1055-62.
58. Griffith, L.G. and M.A. Swartz, *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(3): p. 211-24.
59. Verhulst, A., et al., *Human proximal tubular epithelium actively secretes but does not retain rosuvastatin*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(4): p. 1084-91.
60. Vesey, D.A., et al., *Isolation and primary culture of human proximal tubule cells*. Methods Mol Biol, 2009. **466**: p. 19-24.
61. Zhang, H., et al., *The impact of extracellular matrix coatings on the performance of human renal cells applied in bioartificial kidneys*. Biomaterials, 2009. **30**(15): p. 2899-911.
62. Stepanenko, A.A. and V.V. Dmitrenko, *HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution*. Gene, 2015. **569**(2): p. 182-90.
63. Ryan, M.J., et al., *HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney*. Kidney Int, 1994. **45**(1): p. 48-57.
64. Jenkinson, S.E., et al., *The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule*. Pflugers Arch, 2012. **464**(6): p. 601-11.
65. Wilmer, M.J., et al., *Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(2): p. 449-57.
66. Schophuizen, C.M., et al., *Cationic uremic toxins affect human renal proximal tubule cell functioning through interaction with the organic cation transporter*. Pflugers Arch, 2013. **465**(12): p. 1701-14.
67. Mutsaers, H.A., et al., *Proximal tubular efflux transporters involved in renal excretion of p-cresyl sulfate and p-cresyl glucuronide: Implications for chronic kidney disease pathophysiology*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(7): p. 1868-77.
68. Jansen, J., et al., *Human proximal tubule epithelial cells cultured on hollow fibers: living membranes that actively transport organic cations*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16702.

69. Watt, F.M. and B.L. Hogan, *Out of Eden: stem cells and their niches*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1427-30.
70. Klingemann, H., D. Matzilevich, and J. Marchand, *Mesenchymal Stem Cells - Sources and Clinical Applications*. Transfus Med Hemother, 2008. **35**(4): p. 272-277.
71. Wu, D.C., A.S. Boyd, and K.J. Wood, *Embryonic stem cells and their differentiated derivatives have a fragile immune privilege but still represent novel targets of immune attack*. Stem Cells, 2008. **26**(8): p. 1939-50.
72. Bhartiya, D., *Ideal Stem Cell Candidate for Regenerative Medicine: Pluripotent Stem Cells, Adult Stem Cells, or Pluripotent Stem Cells in Adult Organs?*, in *Regenerative Medicine: Laboratory to Clinic*, A. Mukhopadhyay, Editor. 2017, Springer Singapore: Singapore. p. 143-158.
73. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
74. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
75. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
76. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
77. Youngstrom, D.W., J.E. LaDow, and J.G. Barrett, *Tenogenesis of bone marrow-, adipose-, and tendon-derived stem cells in a dynamic bioreactor*. Connect Tissue Res, 2016. **57**(6): p. 454-465.
78. Galli, D., M. Vitale, and M. Vaccarezza, *Bone marrow-derived mesenchymal cell differentiation toward myogenic lineages: facts and perspectives*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 762695.
79. Tatard, V.M., et al., *Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons*. Bone, 2007. **40**(2): p. 360-73.
80. Singaravelu, K. and B.J. Padanilam, *In vitro differentiation of MSC into cells with a renal tubular epithelial-like phenotype*. Ren Fail, 2009. **31**(6): p. 492-502.

81. Brzoska, M., et al., *Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **330**(1): p. 142-50.
82. Wagner, W., et al., *Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood*. *Exp Hematol*, 2005. **33**(11): p. 1402-16.
83. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. *Stem Cells*, 2006. **24**(5): p. 1294-301.
84. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Tissue Eng*, 2001. **7**(2): p. 211-28.
85. Yan, Y., et al., *Differentiation of adipose-derived adult stem cells into epithelial-like stem cells*. *Ann Anat*, 2013. **195**(3): p. 212-8.
86. Baer, P.C., et al., *Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells*. *Cell Prolif*, 2009. **42**(1): p. 29-37.
87. Humes, H.D., et al., *Metabolic replacement of kidney function in uremic animals with a bioartificial kidney containing human cells*. *Am J Kidney Dis*, 2002. **39**(5): p. 1078-87.
88. Oo, Z.Y., et al., *A novel design of bioartificial kidneys with improved cell performance and haemocompatibility*. *J Cell Mol Med*, 2013. **17**(4): p. 497-507.
89. Saito, A., et al., *Evaluation of bioartificial renal tubule device prepared with lifespan-extended human renal proximal tubular epithelial cells*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27**(8): p. 3091-9.
90. Oo, Z.Y., et al., *The performance of primary human renal cells in hollow fiber bioreactors for bioartificial kidneys*. *Biomaterials*, 2011. **32**(34): p. 8806-15.
91. Shen, C., Q. Meng, and G. Zhang, *Increased curvature of hollow fiber membranes could up-regulate differential functions of renal tubular cell layers*. *Biotechnol Bioeng*, 2013. **110**(8): p. 2173-83.
92. Li, Q., et al., *Automated quantification of microstructural dimensions of the human kidney using optical coherence tomography (OCT)*. *Opt Express*, 2009. **17**(18): p. 16000-16.
93. Kirchhof, K. and T. Groth, *Surface modification of biomaterials to control adhesion of cells*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2008. **39**(1-4): p. 247-51.

94. Ni, M., et al., *Characterization of membrane materials and membrane coatings for bioreactor units of bioartificial kidneys*. *Biomaterials*, 2011. **32**(6): p. 1465-76.
95. Oliver, J.A., et al., *Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **283**(4): p. F799-809.
96. Schophuizen, C.M., et al., *Development of a living membrane comprising a functional human renal proximal tubule cell monolayer on polyethersulfone polymeric membrane*. *Acta Biomater*, 2015. **14**: p. 22-32.
97. Salzig, D., et al., *Attachment, Growth, and Detachment of Human Mesenchymal Stem Cells in a Chemically Defined Medium*. *Stem Cells Int*, 2016. **2016**: p. 5246584.
98. 3M. *Membranes for new therapies*. 2020 [cited 2020 11.03.]; Available from: https://www.3m.com/3M/en_US/membrana-us/products/medical-membranes/membranes-for-new-therapies/.
99. Gstraunthaler, G. and T. Lindl, *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 2013: Springer Berlin Heidelberg.
100. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 2007: Spektrum Akademischer Verlag.
101. Bucevičius, J., G. Lukinavičius, and R. Gerasimaitė, *The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond*. *Chemosensors*, 2018. **6**(2): p. 18.
102. Koroleva, A., et al., *Two-photon polymerization-generated and micromolding-replicated 3D scaffolds for peripheral neural tissue engineering applications*. *Biofabrication*, 2012. **4**(2): p. 025005.
103. Wadkins, R.M. and T.M. Jovin, *Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA*. *Biochemistry*, 1991. **30**(39): p. 9469-78.
104. Schmid, I., et al., *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry*. *Cytometry*, 1992. **13**(2): p. 204-8.
105. Boeck, G., *Current status of flow cytometry in cell and molecular biology*. *Int Rev Cytol*, 2001. **204**: p. 239-98.
106. Fields, R.D. and M.V. Lancaster, *Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity*. *Am Biotechnol Lab*, 1993. **11**(4): p. 48-50.
107. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(17): p. 5421-6.

108. Czekanska, E.M., *Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye*. *Methods Mol Biol*, 2011. **740**: p. 27-32.
109. Wolf, G.B., J.E. Scherberich, and W. Schoeppe, *Peptidase-associated antigens as markers of differentiation in human kidney and renal adenocarcinoma*. *Cell Mol Biol*, 1988. **34**(3): p. 311-21.
110. Caetano-Pinto, P., et al., *Fluorescence-Based Transport Assays Revisited in a Human Renal Proximal Tubule Cell Line*. *Mol Pharm*, 2016. **13**(3): p. 933-44.
111. Johnstone, B., et al., *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. *Exp Cell Res*, 1998. **238**(1): p. 265-72.
112. Fujimoto, T., et al., *Lipid droplets: a classic organelle with new outfits*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(2): p. 263-79.
113. Puchtler, H., S.N. Meloan, and M.S. Terry, *On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium*. *J Histochem Cytochem*, 1969. **17**(2): p. 110-24.
114. Jeon, J., M.S. Lee, and H.S. Yang, *Differentiated osteoblasts derived decellularized extracellular matrix to promote osteogenic differentiation*. *Biomater Res*, 2018. **22**: p. 4.
115. Doege, K.J., et al., *Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(2): p. 894-902.
116. Aschauer, L., et al., *Delineation of the key aspects in the regulation of epithelial monolayer formation*. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(13): p. 2535-50.
117. Fresenius. *Facts & figures*. 2020 [cited 2020 15.06.]; Available from: <https://www.freseniusmedicalcare.com/en/investors/at-a-glance/facts-figures/>.
118. Liyanage, T., et al., *Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review*. *Lancet*, 2015. **385**(9981): p. 1975-82.
119. Robinson, B.M., et al., *Worldwide, mortality risk is high soon after initiation of hemodialysis*. *Kidney Int*, 2014. **85**(1): p. 158-65.
120. Boschetti-de-Fierro, A., et al., *Membrane Innovation in Dialysis*. *Contrib Nephrol*, 2017. **191**: p. 100-114.
121. Krieter, D.H. and B. Canaud, *High permeability of dialysis membranes: what is the limit of albumin loss?* *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18**(4): p. 651-4.

122. Foley, R.N., et al., *Hypoalbuminemia, cardiac morbidity, and mortality in end-stage renal disease*. J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(5): p. 728-36.
123. Nowack, R., R. Birck, and T. Weinreich, *Dialyse und Nephrologie für Pflegeberufe*. 2013: Springer Berlin Heidelberg.
124. Nielsen, S., et al., *Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 205-44.
125. Bedford, J.J., J.P. Leader, and R.J. Walker, *Aquaporin expression in normal human kidney and in renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2581-7.
126. Vander, A.J., *Renal physiology*. 1980.
127. Kashgarian, M., et al., *Monoclonal antibody to Na, K-ATPase: immunocytochemical localization along nephron segments*. Kidney international, 1985. **28**(6): p. 899-913.
128. Marrs, J.A., et al., *Distinguishing roles of the membrane-cytoskeleton and cadherin mediated cell-cell adhesion in generating different Na⁺, K (+)-ATPase distributions in polarized epithelia*. The Journal of cell biology, 1993. **123**(1): p. 149-164.
129. Chou, C.F., et al., *A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility*. J Cell Sci, 1993. **105 (Pt 2)**: p. 433-44.
130. Bacallao, R., *The role of the cytoskeleton in renal development*. Semin Nephrol, 1995. **15**(4): p. 285-90.
131. Baer, P.C., et al., *Transdifferentiation of distal but not proximal tubular epithelial cells from human kidney in culture*. Exp Nephrol, 1999. **7**(4): p. 306-13.
132. Friederich, E., et al., *Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. Correlation of in vivo effects to its biochemical activities in vitro*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26751-60.
133. Decuyper, J.P., et al., *Plasmatic Villin 1 Is a Novel In Vivo Marker of Proximal Tubular Cell Injury During Renal Ischemia-Reperfusion*. Transplantation, 2017. **101**(11): p. e330-e336.
134. Baer, P.C., et al., *Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness*. Cytotherapy, 2010. **12**(1): p. 96-106.

135. Avola, R., et al., *Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue Differentiated into Neuronal or Glial Phenotype Express Different Aquaporins*. Mol Neurobiol, 2017. **54**(10): p. 8308-8320.
136. Graziano, A.C.E., et al., *Aquaporin1 and 3 modification as a result of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cell*. J Cell Physiol, 2018. **233**(3): p. 2279-2291.
137. Acosta, E., et al., *Na⁺, K⁺-ATPase genes are down-regulated during adipose stem cell differentiation*. Front Biosci (Elite Ed), 2011. **3**: p. 1229-40.
138. Heisterkamp, N., et al., *The human gamma-glutamyltransferase gene family*. Hum Genet, 2008. **123**(4): p. 321-32.
139. Glenner, G.G. and J.E. Folk, *Glutamyl peptidases in rat and guinea pig kidney slices*. Nature, 1961. **192**: p. 338-40.
140. Albert, Z., M. Orłowski, and A. Szewczuk, *Histochemical demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase*. Nature, 1961. **191**: p. 767-8.
141. Varma, M.V., et al., *Physicochemical determinants of human renal clearance*. J Med Chem, 2009. **52**(15): p. 4844-52.
142. Masereeuw, R. and F.G. Russel, *Regulatory pathways for ATP-binding cassette transport proteins in kidney proximal tubules*. AAPS J, 2012. **14**(4): p. 883-94.
143. Mutsaers, H.A., et al., *Uremic toxins inhibit transport by breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 4 at clinically relevant concentrations*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18438.
144. Pavek, P., et al., *Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(1): p. 144-52.
145. Perazella, M.A., *Drug-induced renal failure: update on new medications and unique mechanisms of nephrotoxicity*. Am J Med Sci, 2003. **325**(6): p. 349-62.
146. Mahringer, A., J. Delzer, and G. Fricker, *A fluorescence-based in vitro assay for drug interactions with breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2)*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **72**(3): p. 605-13.
147. Weiss, J., et al., *Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(3): p. 340-4.

148. Han, Y., et al., *Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine*. Cells, 2019. **8**(8).
149. Stuart, R.O. and S.K. Nigam, *Development of the tubular nephron*. Semin Nephrol, 1995. **15**(4): p. 315-26.
150. Kim, D. and G.R. Dressler, *Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(12): p. 3527-34.
151. Narayanan, K., et al., *Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells*. Kidney Int, 2013. **83**(4): p. 593-603.
152. Wilson, J.G. and J. Warkany, *Malformations in the genito-urinary tract induced by maternal vitamin A deficiency in the rat*. Am J Anat, 1948. **83**(3): p. 357-407.
153. Neuville, P., et al., *Retinoic acid regulates arterial smooth muscle cell proliferation and phenotypic features in vivo and in vitro through an RARalpha-dependent signaling pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(6): p. 1430-6.
154. Ying, S.Y., et al., *Activins and activin receptors in cell growth*. Proc Soc Exp Biol Med, 1997. **214**(2): p. 114-22.
155. Maeshima, A., Y. Nojima, and I. Kojima, *Activin A: an autocrine regulator of cell growth and differentiation in renal proximal tubular cells*. Kidney Int, 2002. **62**(2): p. 446-54.
156. Davies, J.A. and C.E. Fisher, *Genes and proteins in renal development*. Exp Nephrol, 2002. **10**(2): p. 102-13.
157. Simic, P. and S. Vukicevic, *Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(3): p. 299-308.
158. Phinney, D.G., et al., *Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells*. J Cell Biochem, 1999. **75**(3): p. 424-36.
159. Rodriguez, A.M., et al., *Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse*. J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1397-405.
160. Mitchell, J.B., et al., *Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 376-85.

161. Lin, Y., et al., *Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein*. Mol Cell Biochem, 2006. **291**(1-2): p. 1-10.
162. Lund, P., et al., *Effect of growth media and serum replacements on the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells*. Cytotherapy, 2009. **11**(2): p. 189-97.
163. Marin, V., et al., *Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells*. J Immunol Methods, 2001. **254**(1-2): p. 183-90.
164. Cheung, A.L., *Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)*. Curr Protoc Microbiol, 2007. **Appendix 4**: p. Appendix 4B.
165. Baudin, B., et al., *A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 481-5.
166. Medina-Leyte, D.J., et al., *Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review*. Applied Sciences, 2020. **10**(3): p. 938.
167. Janke, D., et al., *The "artificial artery" as in vitro perfusion model*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57227.
168. Ern, C., et al., *Interactions of human endothelial and multipotent mesenchymal stem cells in cocultures*. Open Biomed Eng J, 2010. **4**: p. 190-8.
169. Pati, S., et al., *Human mesenchymal stem cells inhibit vascular permeability by modulating vascular endothelial cadherin/beta-catenin signaling*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(1): p. 89-101.
170. Steiner, D., et al., *Effects of endothelial cells on proliferation and survival of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts*. J Orthop Res, 2012. **30**(10): p. 1682-9.
171. Suga, H., et al., *Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency*. Cytotherapy, 2007. **9**(8): p. 738-45.
172. Wang, Y., et al., *A mathematical model predicting the coculture dynamics of endothelial and mesenchymal stem cells for tissue regeneration*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(9-10): p. 1155-64.
173. Zaragosi, L.E., G. Ailhaud, and C. Dani, *Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(11): p. 2412-9.

174. Quarto, N. and M.T. Longaker, *FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state*. Tissue Eng, 2006. **12**(6): p. 1405-18.
175. Hauner, H., K. Rohrig, and T. Petruschke, *Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function*. Eur J Clin Invest, 1995. **25**(2): p. 90-6.
176. Baer, P.C., et al., *Expression of a functional epidermal growth factor receptor on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its signaling mechanism*. Eur J Cell Biol, 2009. **88**(5): p. 273-83.
177. Kuraitis, D., et al., *Exploiting extracellular matrix-stem cell interactions: a review of natural materials for therapeutic muscle regeneration*. Biomaterials, 2012. **33**(2): p. 428-43.
178. Niehage, C., et al., *The cell surface proteome of human mesenchymal stromal cells*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20399.
179. Foster, L.J., et al., *Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation*. Stem Cells, 2005. **23**(9): p. 1367-77.
180. Plow, E.F., et al., *Ligand binding to integrins*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21785-8.
181. Spiegelman, B.M. and C.A. Ginty, *Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes*. Cell, 1983. **35**(3 Pt 2): p. 657-66.
182. Moursi, A.M., R.K. Globus, and C.H. Damsky, *Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 18)**: p. 2187-96.
183. Nold, P., et al., *Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **430**(1): p. 325-30.
184. Haack-Sorensen, M., et al., *Culture expansion of adipose derived stromal cells. A closed automated Quantum Cell Expansion System compared with manual flask-based culture*. J Transl Med, 2016. **14**(1): p. 319.

185. Ciechanowska, A., et al., *Human endothelial cells hollow fiber membrane bioreactor as a model of the blood vessel for in vitro studies*. J Artif Organs, 2016. **19**(3): p. 270-7.
186. Bidarra, S.J., et al., *Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells*. Stem Cell Res, 2011. **7**(3): p. 186-97.
187. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. *Medizinprodukte*. 2013 [cited 2020 05.10.]; Available from: https://www.bfarm.de/DE/Medizinprodukte/_node.html.
188. PromoCell. *Product Information*. 2019 [cited 2020 17.06.]; Available from: <https://www.promocell.com/f/product-information/manual/C-12977.pdf>.
189. Park, H.S., et al., *Hypoxia induces glucose uptake and metabolism of adiposederived stem cells*. Mol Med Rep, 2016. **14**(5): p. 4706-4714.
190. Lindstad, T., et al., *STAMP2 is required for human adipose-derived stem cell differentiation and adipocyte-facilitated prostate cancer growth in vivo*. Oncotarget, 2017. **8**(54): p. 91817-91827.
191. Penkov, D.N., et al., *Transcriptional control of insulin-sensitive glucose carrier Glut4 expression in adipose tissue cells*. Dokl Biochem Biophys, 2016. **467**(1): p. 145-9.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Anatomie der Niere, modifiziert nach Interactive Biology [2].....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anatomie eines Nephrons, vom Glomerulus bis zum Sammelrohr als funktionelle Untereinheit der Niere, modifiziert nach OpenStax College [4].....	3
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des proximalen Tubulus einer Ratte	5
Abbildung 4: Darstellung der Transportmechanismen in proximalen Tubuluszellen	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Kapillardialysators	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Hämodialyse	12
Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hohlfasermembranen .	20
Abbildung 8: Mechanismus der Bioreduktion von Resazurin zu Resorufin [105]	35
Abbildung 9: Setup für die Arbeiten mit Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren.....	41
Abbildung 10: Setup zur Besiedlung von Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren	42
Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von hRPTEpCs und ASCs.	44
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse von hRPTEpCs und ASCs	46
Abbildung 13: Aktivität der GGT in ASCs und hRPTEpCs.....	47
Abbildung 14: Fluoreszenzretention und Effluxaktivität	49
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse von undifferenzierten bzw. differenzierten ASCs	52
Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analysen von undifferenzierten bzw. differenzierten ASCs	53
Abbildung 17: GGT-Aktivität in Kontrollzellen und differenzierten ASCs.....	55
Abbildung 18: Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen der undifferenzierten bzw. differenzierten ASCs.....	56
Abbildung 19: Phasenkontrastmikroskopische Kontrolle proliferierender HUVECs	57
Abbildung 20: Fluoreszenzintensität des AlamarBlue™-Assays der proliferierenden HUVECs in verschiedenen Nährmedien.....	58
Abbildung 21: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen proliferierender ASCs	60
Abbildung 22: Fluoreszenzintensität des AlamarBlue™-Assays der proliferierenden ASCs in verschiedenen Nährmedien.....	61
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse von in ECGM + Endothelsupplement bis zur Konfluenz kultivierten ASCs	63

Abbildung 24: Mikroskopische Aufnahmen der Oil-Red-O-Färbung von aus ASCs differenzierten Adipozyten 64

Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahmen der Alizarin-Red-S-Färbung von in Osteoblasten differenzierten ASCs..... 66

Abbildung 26: Mikroskopische Aufnahmen von Querschnitten der Spheroide 67

Abbildung 27: Fluoreszenzintensitäten des AlamarBlue™-Assays der proliferierenden ASCs auf verschiedenen Beschichtungen 70

Abbildung 28: Durchflusszytometrische Lebend-/Tot-Diskriminierung der ASC-Zellsuspension 72

Abbildung 29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit ASCs besiedelten Polyethersulfon- und Polypropylen-Hohlfasermembranen 73

Abbildung 30: Durchflusszytometrische Lebend-/Tod-Diskriminierung von ASCs und HUVECs kultiviert auf Polypropylen-Membranen 74

Abbildung 31: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von mit ASCs besiedelten Innenseiten der Polypropylen-Hohlfasermembranen 75

Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Proliferation von ASCs auf Polypropylen-Membranen 76

Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HUVEC-Kultur auf den Außenoberflächen von Polyethersulfon- und Polypropylen-Hohlfasermembranen 78

Abbildung 34: REM-Aufnahmen einer mit HUVECs besiedelten Polypropylen-Hohlfasermembran..... 79

Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen während der Proliferation von HUVECs auf Polypropylen-Membranen nach Zellkernfärbung 80

Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Ko-Kultur aus ASCs und HUVECs auf Polypropylen-Membranen 82

Abbildung 37: Zellkernfärbung von hRPTEpCs auf der Innenoberfläche von Polypropylen-Membranen..... 84

Abbildung 38: REM-Aufnahmen einer mit hRPTEpCs besiedelten Polypropylen-Hohlfaser 85

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz. Klassifizierung nach den NKF KDOQI Richtlinien [23] 8

Tabelle 2: Klassifizierung der urämischen Retentionssolute [29] 10

Tabelle 3: Oberflächenantigene, für die MSCs laut Definition der <i>International Society for Cellular Therapy</i> positiv bzw. negativ sein müssen [71]	17
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Zelltypen.....	22
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Geräte	22
Tabelle 6: Übersicht über die verwendete Software	23
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	24
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Nährmedien, Zusätze und Kits.....	25
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 10: Spezifikationen der in den Miniatur-Hohlfaserbioreaktoren verwenden Membranen.....	27
Tabelle 11: Beschreibung der in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper	34
Tabelle 12: Zusammensetzung der Medien zur adipogenen Differenzierung und zur Erhaltung des Differenzierungsstatus von ASCs	37
Tabelle 13: Zusammensetzung des Mediums zur osteogenen Differenzierung von ASCs	38
Tabelle 14: Konzentration der verwendeten Differenzierungsfaktoren im Differenzierungsmedium	38
Tabelle 15: Quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen der undifferenzierten bzw. differenzierten ASCs.....	54
Tabelle 16: Konzentrationen und Inkubationsdauer der jeweiligen Beschichtungen.....	68
Tabelle 17: Fluoreszenzintensitäten des AlamarBlue™-Assays der proliferierenden ASCs auf verschiedenen Beschichtungen.....	69

7.3. Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
alpha-MEM	<i>alpha minimum essential medium</i>
ABC	ATP-binding cassette
AQP1	Aquaporin 1
ASC, ad-hMSC	<i>human adipose-derived mesenchymal stem cells</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	All-Trans-Retinoinsäure
BAK	<i>bio-artificial kidney</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
bFGF, FGF-2	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bm-MSC	<i>bone marrow mesenchymal stem cells</i>

BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
bzw.	Beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD11b	Integrin α -M
CD19	B-Lymphozytenantigen
CD34	Hämatopoetisches Vorläuferzellantigen
CD44	Extrazellulärer Matrix Rezeptor III
CD45	Tyrosin-Proteinphosphatase C
CD73	5'-Nukleotidase
CD90	Thy-1-Membran-Glykoprotein
CD105	Endoglin
ciPTECs	konditionell immortalisierte proximale Tubuluszellen
CK18	Zytokeratin 18
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein diacetat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ESRD	<i>end stage renal disease</i>
EtOH	Ethanol
EUTox	<i>European Uremic Toxin working group</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GGT	γ -Glutamyltransferase
GLT	<i>glucose transporter</i>
GOTD	<i>Global Observatory on Donation and Transplantation</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney</i>
HK-2	<i>human kidney</i>
HD	Hämodialyse
HDF	Hämodiafiltration
HLA-dr	<i>human leukocyte antigen</i>
HMDS	Hexamethyldisilazan
hMSC	<i>human mesenchymal stem cells</i>

hPTC	humane proximale Tubuluszellen
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
hRPTEpC	<i>human renal proximal tubule epithelial cells</i>
HSA	Humanes Serum Albumin
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobulin G
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MATE1/2K	<i>multidrug and toxin extrusion 1 and 2 transporter</i>
MG	Molekulargewicht
MRP2/4	<i>multidrug resistance protein 2/4</i>
MWCO	<i>molecular mass cut-off</i>
NKF KDOQI	<i>Kidney Disease Outcomes Quality Initiative guidelines of the National Kidney Foundation</i>
OAT1	<i>organic anion transporter 1</i>
OAT3	<i>organic anion transporter 3</i>
OATP4C1	<i>organic anion transporter polypeptide</i>
OCT2	<i>organic cation transporter 2</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD	Peritonealdialyse
PES	Polyethersulfon
P-gp	P-glycoprotein
PSF	Polysulfon
PTC	<i>proximal tubule cells</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REBM	<i>renal epithelial cell basal medium</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
SLC	<i>solute carrier</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TNS	<i>trypsin neutralizing solution</i>
u.a.	unter anderem
VIL1	Villin
z.B.	zum Beispiel

8. Publikationsliste

Eingereicht:

Tulke M*, Rüth M*, Lemke, H-D, Sauer, M, Sukhorukov, V L, Krieter, D H. „*Co-culture of adipose-derived mesenchymal stem cells and endothelial cells on hollow fiber membranes*” Biotechnology and Bioengineering

* Autoren sind gleichberechtigt

9. Eidesstattliche Erklärung und Danksagung

9.1. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Grundlegende Arbeiten zum bio-artifiziellen renalen Tubulus aus ko-kultivierten adipozytären mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen auf einer synthetischen Kapillarmembran“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „Fundamental work on a bio-artificial renal tubule consisting of co-cultivated adipose-derived mesenchymal stem cells and endothelial cells on a synthetic capillary membrane“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Obernburg, den 20.10.2020

.....
Moritz Tulke

9.2. Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei allen Personen bedanken, durch deren Unterstützung diese Dissertation erst möglich wurde.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. Horst-Dieter Lemke, dafür dass er mir die Möglichkeit gegeben hat dem Team von eXcorLab beizutreten und meine Dissertation hier anzufertigen. Außerdem möchte ich mich gerne bei Herrn Prof. Dr. Detlef H. Krieter bedanken, der mir während der Ausarbeitung der Thesis äußerst hilfsbereit zur Seite stand, sowie bei Herrn Prof. Dr. Markus Sauer und PD Dr. Vladimir Sukhorukov, die dankenswerterweise die Betreuung meiner Thesis übernommen haben.

Ich möchte mich außerdem herzlichst bei Frau Dr. Marieke Rüth bedanken, die in zahlreichen Diskussionen und Fragen stets ein offenes Ohr für mich hatte, und mich mit ihrer Expertise durch die Experimente begleitet hat. Danke, dass du deine Erfahrung an mich weitergegeben hast.

Ich danke weiterhin all meinen Kollegen von der eXcorLab GmbH. Dank euch hatte ich im Labor fast immer gute Laune. Danke, dass ihr mich so lieb in eurem Team aufgenommen und bei immer wieder aufkommenden Hilferufen unterstützt habt.

Von ganzem Herzen möchte ich mich zum Schluss bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, allen voran Denise. Danke dass du mich immer aufgemuntert, mir immer zur Seite gestanden und mich ertragen hast.