

**Entwicklung eines humanen In-vitro-Modells
des renalen proximalen Tubulus**

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

vorgelegt von

Anke Hoppensack

aus Berlin

Würzburg, 2013

Eingereicht am: 25. April 2013

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Dagmar Beier

Gutachter: Prof. Dr. Heike Walles

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: 11. September 2013

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass diese Dissertation weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe zuvor keinen Doktorgrad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 25.04.2013

Anke Hoppensack

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Bedeutung und Einsatz von In-vitro-Modellen.....	5
1.2 Anwendung von Methoden des Tissue Engineering für die Entwicklung von dreidimensionalen In-vitro-Modellen	7
1.3 Die Niere und der renale proximale Tubulus	10
1.3.1 Funktionen und Anatomie der humanen Niere.....	10
1.3.2 Morphologische Besonderheiten und Funktionen des humanen renalen proximalen Tubulus	14
1.4 Stand der Wissenschaft	16
1.4.1 Anwendungsbereiche für In-vitro-Modelle des renalen proximalen Tubulus.....	16
1.4.2 Zellquellen.....	18
1.4.3 Matrices.....	20
1.5 Ziel der Arbeit	22
2 Material.....	24
2.1 Zell- und Gewebematerial	24
2.2 Chemikalien.....	24
2.3 Zellkulturmedien	26
2.4 Lösungen und Puffer	27
2.5 Antikörper.....	29
2.6 Isotypkontrollen	30
2.7 Lektine.....	30
2.8 Verbrauchsmaterial	30
2.9 Laborgeräte.....	31
3 Methoden	34
3.1 Allgemeine Zellkulturmethoden.....	34
3.1.1 Arbeit mit Zellkulturen	34
3.1.2 Zellzahlbestimmung	34
3.1.3 Auftauen von Zellen	35

3.1.4	Passagieren der Zellkulturen	35
3.1.5	Kryokonservierung von Zellen.....	36
3.2	Zellgewinnung und spezielle Zellkultur.....	37
3.2.1	Human Kidney-derived Cells (hKDCs).....	37
3.2.2	HK-2-Zelllinie.....	37
3.2.3	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen.....	37
3.2.4	Humane dermale Fibroblasten.....	38
3.2.5	Humane mesenchymale Stammzellen.....	39
3.3	Differenzierungsversuche.....	39
3.3.1	Adipogene Differenzierung.....	39
3.3.2	Osteogene Differenzierung	40
3.3.3	Chondrogene Differenzierung	40
3.4	Charakterisierung der Endothelzellen über die Aufnahme von acLDL.....	40
3.5	Herstellung der Matrices	41
3.5.1	Small intestinal submucosa (SIS).....	41
3.5.2	Biological Vascularized Scaffold (BioVaSc).....	42
3.6	Aufbau der Kulturmodelle.....	44
3.6.1	Statische Kulturen	44
3.6.1.1	Multiwellplatten.....	44
3.6.1.2	Multiwellplatten-Inserts.....	44
3.6.1.3	Kollagenhydrogele	45
3.6.1.4	Small intestinal submucosa (SIS).....	46
3.6.2	Dynamische BioVaSc-Kultur	47
3.7	Messung allgemeiner Stoffwechselfparameter	50
3.8	MTT-Test	50
3.9	Lebend-Tot-Färbung.....	51
3.10	Albuminaufnahme-Test.....	51
3.11	Probenvorbereitung für die Raman-Spektroskopie	52
3.12	Cytochemische Färbungen	53
3.12.1	Immuncytochemische Färbung	53
3.12.2	Lektincytochemie	54
3.12.3	Ölrot-O-Färbung.....	55
3.12.4	Alizarinrot-S-Färbung	55
3.13	Histochemische Färbungen.....	56
3.13.1	Herstellen von Paraffinschnitten.....	56
3.13.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	57
3.13.1	Alcianblaufärbung	58
3.13.2	Immunhistochemische Färbung	58
3.13.3	Lektinhistochemische Färbung	60
3.14	Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie	60

4	Ergebnisse	62
4.1	Charakterisierung der hKDCs	62
4.1.1	Differenzierungspotential.....	62
4.1.2	Cytochemische Färbungen	64
4.2	Kultur der hKDCs in etablierten In-vitro-Modellen.....	65
4.2.1	Multiwellplatten.....	66
4.2.2	Multiwellplatten-Inserts.....	66
4.2.3	Kollagen-Typ-I-Hydrogele	67
4.3	Kultur der hKDCs auf der Small Intestinal Submucosa (SIS).....	68
4.3.1	Qualitätskontrolle der SIS.....	68
4.3.2	Wachstum und Morphologie.....	69
4.3.3	Basalmembranbildung	72
4.3.4	Markerexpression.....	73
4.3.5	Raman-spektroskopische Messungen	75
4.3.6	Albuminaufnahme	77
4.3.7	Co-Kultur von hKDCs mit Endothelzellen.....	77
4.4	Kultur der HK-2-Zelllinie auf der SIS	80
4.5	Dynamische Kultur der hKDCs in der BioVaSc (Biological Vascularized Scaffold).....	81
4.5.1	Besiedlung der Gefäßmatrix mit HDMECs.....	84
4.5.2	Überprüfung der Stoffwechselaktivität und der Besiedlungsdichte	84
4.5.3	Morphologie und Markerexpression	87
4.5.4	Kultur der hKDCs auf der Submucosa der BioVaSc	89
4.6	Übersicht der Markerexpression	92
5	Diskussion	94
6	Literaturverzeichnis	109
7	Abbildungsverzeichnis	121
8	Tabellenverzeichnis	126
9	Veröffentlichungen	127
10	Danksagung	128

Abkürzungsverzeichnis

acLDL	acetyliertes <i>Low Density Lipoprotein</i>	MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole	p	Passage
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
BioVaSc	<i>Biological Vascularized Scaffold</i> , Biologische vaskularisierte Matrix	PET	Polyethylenterephthalat
BR	Bioreaktor	PI	Propidiumiodid
BSA	Bovines Serumalbumin	PT	Proximaler Tubulus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	REBM	<i>Renal Epithelial Cell Basal Medium</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	REGM	<i>Renal Epithelial Cell Growth Medium</i>
DBA	<i>Dolichos-biflorus</i> -Agglutinin	RT	Raumtemperatur
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	SIS	<i>Small intestinal Submucosa</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	SZM	Stammzellmedium
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure	TE	<i>Tissue Engineering</i> , Gewebezüchtung
ECGMmv	<i>Endothelial Cell Growth Medium microvascular</i>	VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
ECM	<i>Extracellular matrix</i> , Extrazelluläre Matrix	vWF	Von-Willebrand-Faktor
EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure	<u>Einheiten</u>	
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fötale Kälberserum	%	Prozent
FDA	Fluoresceindiacetat	°C	Grad Celsius
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	µg, mg, g, kg	Mikrogramm, Milligramm, Gramm, Kilogramm
HDMECs	<i>Human dermal microvascular endothelial cells</i> , humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	µl, ml, dl, l	Mikroliter, Milliliter, Deziliter, Liter
HE	Hämatoxylin-Eosin	µm, nm, mm, cm	Mikrometer, Nanometer, Millimeter, Zentimeter
hKDCs	<i>Human Kidney-derived Cells</i>	Hz	Hertz
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase	mm², cm²	Quadratmillimeter, -zentimeter
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin	mm³	Kubikmillimeter
LDH	Laktatdehydrogenase	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
LTL	<i>Lotus-tetragonobolus</i> -Lektin	nM, µM, mM	Nano-, Mikro-, Millimolar
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>	s, min, h	Sekunde, Minute, Stunde
MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> , Mesenchymale Stammzellen	U	Unit
		xg	mal Erdschwerebeschleunigung (9,81 m/s ²)

Zusammenfassung

Die Epithelzellen des renalen proximalen Tubulus resorbieren große Mengen an Wasser, Glucose und weiteren wertvollen Substanzen aus dem Primärharn, um deren Ausscheidung zu verhindern. Weiterhin sekretieren sie harnpflichtige Substanzen in den Primärharn und sind in der Lage, in die Zelle aufgenommene Substanzen enzymatisch umzusetzen. Diese Funktionen machen den renalen proximalen Tubulus zu einer wichtigen Einheit für die Nierenfunktion. Sie führen aber auch zu einer hohen Empfindlichkeit gegenüber toxischen Effekten von Fremdstoffen. Daher ist ein In-vitro-Modell des renalen proximalen Tubulusepithels sowohl für die Erforschung physiologischer und pathologischer Mechanismen als auch zur Testung der Toxizität von Substanzen, insbesondere neuen Arzneimitteln, bedeutend. Ein weiteres Forschungsfeld, für das ein In-vitro-Gewebe von großem Nutzen wäre, ist die Entwicklung von bioartifiziellen Nierenersatzsystemen.

Aufgrund Spezies-spezifischer Unterschiede, z.B. in der Expression von Transportproteinen und Enzymen, ist ein Modell mit humanen Zellen anzustreben. Bisher besteht jedoch ein Mangel an Modellen, die das renale proximale Tubulusepithel für die oben genannten Anwendungsbereiche adäquat abbilden.

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb der Aufbau eines humanen In-vitro-Modells des renalen proximalen Tubulus unter Verwendung von humanen Nierenzellen (*human kidney-derived cells*, hKDCs), die Eigenschaften renaler Vorläuferzellen aufweisen. In Kombination mit diesen Zellen wurden verschiedene Kultursubstrate getestet. Dabei zeigte sich, dass die Zellen sowohl in Zellkulturplatten als auch auf Kollagen-Typ-I-beschichteten Insertmembranen mehrschichtig wachsen, ohne die typische Morphologie renaler proximaler Tubuluszellen auszubilden. In einem dreidimensionalen Kollagen-Typ-I-Hydrogel bildeten die hKDCs hingegen tubuläre bzw. zystäre Strukturen mit einer kubischen bis hochprismatischen Morphologie. Da für die oben erwähnten Anwendungsbereiche jedoch eine planare Zellschicht benötigt wird, erfolgte die Testung weiterer biologischer Matrices. Diese waren die *Small intestinal submucosa* (SIS) und das *Biological vascularized scaffold* (BioVaSc). Beide ließen sich aus porcinem Dünndarm herstellen, wobei bei der SIS die Mucosa sowie das Mesenterium entfernt wurden. Bei der BioVaSc handelt es sich um ein Darmsegment mit erhaltenem Gefäßsystem, das zur Perfusion genutzt wird.

Nach ihrer Kultur auf der SIS wiesen die hKDCs das typische Wachstum und die charakteristische Morphologie des renalen proximalen Tubulusepithels auf. Dazu gehören die Kontakthemmung, die das einschichtige Wachstum ermöglicht, die kubisch bis

hochprismatische Morphologie sowie die Bildung eines Bürstensaums an der apikalen Zell-Zellmembran. Anhand einer Kollagen-Typ-IV- und einer Alcianblau-Färbung ließ sich die Bildung einer Basalmembran an der Grenze zur SIS nachweisen. Bürstensaum- und Basalmembranbildung zeigten die zelluläre Polarisierung. Weiterhin waren typische Markerproteine renaler proximaler Tubuluszellen wie N-Cadherin und Aquaporin-1 immunhistochemisch, zum Teil deutlich stärker als bei den Ausgangszellen, nachweisbar. Dies belegt einen positiven Einfluss der extrazellulären Matrixkomponenten der SIS auf die Ausbildung von Charakteristika des renalen proximalen Tubulusepithels. Die Albuminaufnahme als spezifische Funktion war ebenfalls nachweisbar. Die molekularen Veränderungen der hKDCs während der Kultivierung auf der SIS ließen sich weiterhin mittels Raman-Spektroskopie bestätigen. Aufgrund der starken Interaktion zwischen Tubulusepithel und umgebenden Kapillarnetzwerk wurde weiterhin die Co-Kultur mit Endothelzellen etabliert.

Für den Vergleich der hKDCs mit einer etablierten humanen Zelllinie renaler proximaler Tubuluszellen wurde die HK-2-Zelllinie verwendet. Mit dieser Zelllinie ließen sich die Ergebnisse der hKDCs jedoch nicht reproduzieren, was auf die fehlende Sensitivität der transformierten Zelllinie auf die Substrateigenschaften zurückzuführen ist.

In der dynamischen Kultur mit der BioVaSc als Matrix waren ein inhomogenes Wachstum sowie eine variierende Markerexpression zu beobachten. Dies ließ sich vor allem auf den starken Einfluss der Aussaatdichte sowie die Festigkeit der Matrix zurückführen. Bei einer erfolgreichen Optimierung der Kultur kann dieses Modell jedoch für komplexere Studien in der pharmakologischen Entwicklung nützlich sein.

Mit der Kombination aus hKDCs und SIS ist es gelungen, eine einzelne, durchgängige Zellschicht zu generieren, die wichtige Charakteristika des renalen proximalen Tubulusepithels aufweist. Weitere Untersuchungen sind nun nötig, um die Funktionalität des Modells weitergehend zu charakterisieren (z.B. der Transport von Substanzen und Sensitivität gegenüber toxischen Substanzen). Anschließend kann es für die spezifischen Anwendungen weiterentwickelt werden.

Abstract

The epithelial cells of the renal proximal tubule resorb high amounts of water, glucose and other valuable substances from the primary urine to prevent their excretion. Furthermore, they secrete metabolic waste products into the primary urine and are able to enzymatically alter absorbed substances. These functions make the renal proximal tubule an important unit for kidney function, but also lead to a high sensitivity towards toxicity of xenobiotics. Therefore, an in vitro model of the renal proximal tubular epithelium is important not only for the investigation of physiological and pathological processes, but also for toxicity testing of substances, in particular, new pharmaceuticals. A further research area, for which an in vitro tissue would be of great value, is the development of bioartificial kidney assist devices.

Due to species-specific differences, e.g. regarding the expression of transport proteins and enzymes, a model with human cells should be aimed. Until recently, there has been a lack of models that adequately simulate the renal proximal tubular epithelium for the above mentioned fields.

Therefore, the aim of this work was to develop a human in vitro model of the renal proximal tubule using human kidney-derived cells (hKDCs), which exhibit renal progenitor cell characteristics. Different culture substrates were tested in combination with these cells. hKDCs in cell culture plates as well as on collagen type I-coated insert membranes grew in multilayers without developing the typical morphology of renal proximal tubular cells. In contrast, in a three-dimensional collagen type I hydrogel, hKDCs formed tubular and cystic structures with a cubic to high-prismatic morphology. However, since a planar cell layer is required for the above mentioned research fields, small intestinal submucosa (SIS) and the biological vascularized scaffold (BioVaSc) were tested, which are both made of porcine small intestine. For SIS production, the mucosa and the mesenterium were removed, whereas the BioVaSc is a segment of the small intestine with a preserved vascular system, which can be used for perfusion.

Following their culture on the SIS, hKDCs featured the typical growth and characteristic morphology of the renal proximal tubule epithelium. hKDCs were contact-inhibited, which allows monolayered growth; they had a cubic to high-prismatic morphology and developed a brush border at their apical cell membrane. By collagen type IV and alcian blue staining, the formation of a basement membrane at the cell-matrix border was detectable. Brush border and basement membrane formation showed cellular polarization. Furthermore, marker proteins of renal proximal tubular cells such as aquaporin-1 and N-cadherin were shown by

immunohistochemistry, which were partially stronger than before SIS culture. This demonstrates a positive influence of the extracellular matrix components of the SIS on the development of characteristics of the renal proximal tubular epithelium by hKDCs. Albumin uptake as a specific function was likewise detectable. The molecular changes of hKDCs during their culture on the SIS were also identified by Raman spectroscopy. Due to the strong interaction of the tubule epithelium with the peritubular capillaries, the co-culture of hKDCs with endothelial was established as well.

For comparison of hKDCs with a well-established human cell line of renal proximal tubular origin, the HK-2 cell line was used. With this cell line, the results of hKDCs were not reproducible, which can be explained by the lacking sensitivity of the transformed cell line towards the substrate properties.

In the dynamic culture with the BioVaSc scaffold, an inhomogeneous growth and a varying marker expression were observed. This was ascribed to the strong influence of the cell seeding density and the low matrix stiffness. If successfully optimized, this culture model can be useful for more complex studies in the pharmacological development.

In summary, with the combination of hKDCs and the SIS, a single, continuous cell layer could be generated that exhibits essential characteristics of the renal proximal tubular epithelium. More studies are required to further characterize the functionality of the model (e.g. transport of substances and sensitivity towards toxic substances). Subsequently, it can be further developed for specific applications.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Einsatz von In-vitro-Modellen

Viele Fragestellungen in der biomedizinischen Grundlagenforschung werden im Tiermodell untersucht, da die physiologischen und pathologischen Vorgänge ähnlich wie im Menschen verlaufen. Auch in der pharmakologischen Forschung und Entwicklung werden Tierstudien durchgeführt, da dies ermöglicht, Arzneimittelkandidaten im physiologischen Kontext auf ihre Wirksamkeit und Toxizität zu testen. Zudem sind Tierstudien für die Zulassung von Arzneimitteln gesetzlich vorgeschrieben. Probleme von Tierexperimenten sind vor allem die eingeschränkte Übertragbarkeit der Daten auf den humanen Organismus aufgrund Spezies-spezifischer Unterschiede [Knight, 2008; Perel *et al.*, 2007]. Somit können in der Grundlagenforschung Differenzen zwischen den gewonnenen Erkenntnissen im Tiermodell und den Vorgängen im Menschen vorkommen. In der pharmakologischen Entwicklung können Spezies-spezifische Unterschiede dazu führen, dass Nebenwirkungen, die im Menschen auftreten, im Tiermodell nicht erkannt werden. Dies ist unter anderem auf die Spezies-spezifische Expression von Transportproteinen und Enzymen im Darm, in der Leber und der Niere zurückzuführen [Bleasby *et al.*, 2006; Martignoni *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2009; Tuschl *et al.*, 2008]. Die Leber und die Niere sind aufgrund der zellulären Aufnahme und Metabolisierung von Xenobiotika die Hauptzielorgane potentieller toxischer Effekte [Gomez-Lechon *et al.*, 2007; Jennings *et al.*, 2008; Nolin und Himmelfarb, 2010].

Weitere Kritikpunkte von Tierstudien sind ethische Bedenken sowie der Zeit- und Kostenaufwand [Hartung, 2011; Jennings *et al.*, 2008]. Die Komplexität des Gesamtorganismus im Tiermodell ist zwar essentiell für die physiologische Relevanz, die Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf Vorgänge in einzelnen Geweben oder Zelltypen ist dadurch jedoch erschwert [Hartung, 2011].

Als Alternative zu Tiermodellen konnten mit dem Fortschritt der extrakorporalen Vermehrung von Zellen, der Zellkultur, In-vitro-Modelle (in vitro = „im Reagenzglas“) entwickelt werden, die nun immer stärker in verschiedenen Forschungsfeldern, wie der biomedizinischen und pharmakologischen Forschung, Anwendung finden. Mit der Zellkulturtechnik können Untersuchungen gezielt an spezifischen Zelltypen durchgeführt und somit systemische Einflüsse ausgeschaltet werden [Kandarova und Letasiova, 2011]. Dabei sind auch Hochdurchsatzverfahren möglich. Bedeutend ist vor allem, dass solche In-vitro-Methoden die Untersuchung von humanen Zellen, die z.B. aus bei Operationen anfallendem Biopsat- oder

Tumorgewebe isoliert werden können, ermöglichen. Viele Zellen können kryokonserviert und gelagert werden. Dies erlaubt Untersuchungen mit einer Zellcharge zu verschiedenen Zeitpunkten. Zudem sind die Versuchsbedingungen bei In-vitro-Tests im Vergleich mit Tierstudien im Allgemeinen einfacher zu standardisieren und damit die Methoden leichter zu validieren [Hartung, 2011; Kandarova und Letasiova, 2011; Schmitz, 2007].

Als Zellquellen werden primäre Zellen und kontinuierliche Zelllinien unterschieden. Primäre Zellen können aus Geweben verschiedener Spenderorganismen isoliert und anschließend über einen begrenzten Zeitraum in vitro kultiviert werden. Nach der ersten Passage werden sie als primäre Zelllinien bezeichnet. Der Vorteil dieser Zellen besteht darin, dass sie am wenigsten verändert sind und daher noch viele ihrer typischen Funktionen aufweisen. Nachteile sind die zum Teil aufwändige Isolation, die Verfügbarkeit einiger humaner Gewebe sowie die möglichen Unterschiede zwischen den Zellen verschiedener Spender hinsichtlich ihrer Morphologie und ihrem Metabolismus. Während des Kulturzeitraums können sich die Differenzierungsmuster der Zellen stark verändern. Die Teilungsrates ist ebenfalls nicht konstant, sie nimmt bis zur Seneszenz der Zellen im Kulturverlauf ab. Herausforderungen bestehen weiterhin in der Gewinnung einer Reinkultur, da zumeist auch andere Zelltypen als der gewünschte mitisoliert werden [Schmitz, 2007].

Kontinuierliche Zelllinien sind immortalisiert, d.h. sie können in vitro nahezu unbegrenzt vermehrt werden. Sie stammen von Zellen aus Tumoren ab oder sind in vitro, z.B. viral oder mit h-TERT (engl. *Human Telomerase Reverse Transcriptase*), transfiziert. Selten kann es auch zu einer spontanen Immortalisierung von in Kultur genommenen Zellen kommen. Der Phänotyp dieser Zellen ist verändert. Dies kann sich in einer Änderung der Morphologie, fehlender Kontaktinhibition, verringerten Kulturansprüchen sowie einer Änderung in der Funktionalität der Zellen äußern. Vorteile von kontinuierlichen Zelllinien sind, dass sie über lange Zeit kryokonserviert und stark vermehrt werden können. Dies erlaubt Untersuchungen an Zellen mit gleichbleibenden Eigenschaften über einen langen Zeitraum. Nachteile bestehen vor allem in der Änderung des Phänotyps - die Eigenschaften der Zellen weichen meist stark von denen des Ursprungszelltyps ab. Beide Zellarten, Primärzellen und Zelllinien, können kommerziell erworben werden [Schmitz, 2007].

Limitationen von In-vitro-Modellen bestehen vor allem im Funktionsverlust zahlreicher Zelltypen unter artifiziellen Kulturbedingungen. Des Weiteren sind sie nicht geeignet, um komplexe, systemische Vorgänge zu erfassen [Kandarova und Letasiova, 2011].

In-vitro-Modelle können jedoch eingesetzt werden, wenn insbesondere einzelne Zelltypen oder humane Zellen untersucht werden sollen bzw. die zu untersuchenden Parameter nicht von systemischen Einflüssen abhängen. Zellkulturen kommen z.B. zur Anwendung, um intra-

und interzelluläre Mechanismen, Signalwege und Infektionsmechanismen zu analysieren sowie um die Toxizität von Fremdstoffen zu untersuchen. Weiterhin können Zellkulturen zur Produktion von rekombinanten Proteinen und Impfstoffen dienen [Schmitz, 2007].

Mit In-vitro-Methoden konnten bereits Tierstudien im Sinne des 3R-Konzeptes (*Replace, Reduce, Refine*) [Russell und Burch, 1959] ersetzt werden. Es sind z.B. In-vitro-Modelle der Hautreizung durch Fremdstoffe regulatorisch anerkannt (z.B. EpiSkin[®], EpiDerm[™], Übersicht in: [Kandarova und Letasiova, 2011]). Dabei muss berücksichtigt werden, dass auch für In-vitro-Testungen häufig Material tierischen Ursprungs benötigt wird; es sind jedoch keine Versuche am lebenden Tier notwendig. Die Erkenntnisse, die sich mit In-vitro-Modellen gewinnen lassen, können weiterhin dazu dienen, Tierversuche effektiver zu gestalten und ihre Anzahl zu reduzieren. Ein weiteres Hilfsmittel dafür sind In-silico-Studien, bei denen physiologische Vorgänge mittels Computerprogrammen simuliert werden [Colquitt *et al.*, 2011; Valerio, 2009].

Ersatzmethoden zu Tierversuchen gewinnen immer mehr an Bedeutung, u.a. auch aufgrund der REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals*)-Verordnung der EU (2007 in Kraft getreten), die die Risikobewertung sowohl von neuen als auch bereits eingesetzten Chemikalien und Naturstoffen verlangt [Foth und Hayes, 2008] und der EU-Kosmetikrichtlinie 76/768/EWG (7. Änderung), die den Verkauf von Kosmetika, die in Tierversuchen getestet wurden, ab Juli 2013 verbietet.

1.2 Anwendung von Methoden des Tissue Engineering für die Entwicklung von dreidimensionalen In-vitro-Modellen

Die größte Limitation von Zellkulturmodellen ist die meist eingeschränkte Funktionalität der Zellen im Vergleich mit den Zellen *in vivo* („im lebenden Organismus“). Das Herauslösen der Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung und ihre Kultur unter artifiziellen Bedingungen führen bei den meisten Zellen zum Funktionsverlust [Bhadriraju und Chen, 2002; Mazzoleni *et al.*, 2009; Pampaloni *et al.*, 2007; Pampaloni und Stelzer, 2010]. Dabei spielen vor allem die Struktur und die Eigenschaften des Kultursubstrates eine entscheidende Rolle. Bei der konventionellen Zellkultur werden die Zellen auf einem planaren, synthetischen Material kultiviert. Im Gegensatz dazu sind die Zellen *in vivo* in einer organspezifischen, dreidimensionalen Struktur angeordnet [Mazzoleni *et al.*, 2009; Pampaloni und Stelzer, 2010]. Diese wird vor allem durch die extrazelluläre Matrix (ECM) aufrechterhalten. Die ECM wird von Zellen synthetisiert sowie ggf. um- und abgebaut und besteht aus Strukturproteinen

(z.B. Kollagene, Elastin), Adhäsionsproteinen (z.B. Fibronectin, Laminin) sowie einer gelarti-gelartigen Grundsubstanz aus Proteoglykanen. Je nach Gewebetyp besitzt sie unterschiedliche mechanische und biochemische Eigenschaften. Im Gegensatz zum starren, undurchlässigen Zellkultursubstrat weist die ECM in vielen Geweben eine gelartige Konsistenz auf [Alberts *et al.*, 2004; Minuth, 2003; Rosso *et al.*, 2004]. Dies ermöglicht unter anderem einen ständigen Gas- und Flüssigkeitsaustausch. Dadurch können z.B. Stoffwechselabfallprodukte kontinuierlich ins Blutgefäßsystem übertreten und abtransportiert werden. Im Vergleich dazu sind in vitro kultivierte Zellen mit Nährmedium überschichtet, das in regelmäßigen Zeitabständen abrupt entfernt und durch frisches Medium ersetzt wird [Hartung, 2011]. Zusätzlich zur Strukturgebung erfüllt die ECM vielfältige weitere Funktionen. Sie beeinflusst z.B. maßgeblich die Zelladhäsion, -proliferation, -migration sowie die – differenzierung [Minuth, 2003]. Bei Epithelien dient die Basalmembran als spezialisierte ECM zur Regulation der Polarität der Epithelzellen [Kruegel und Miosge, 2010].

Für die Aufrechterhaltung der zelltypischen Funktionen sind weiterhin die Interaktion von verschiedenen Zelltypen sowie mechanische Stimuli, z.B. durch Druck oder Fluss, unverzichtbar [Griffith und Swartz, 2006; Kaji *et al.*, 2011]. Diese Faktoren können bei der konventionellen Zellkultur nicht ausreichend umgesetzt werden.

Um den Limitationen der klassischen zweidimensionalen Zellkultur entgegenzutreten, wurde die dreidimensionale Zell- bzw. Gewebekultur entwickelt. In diesem Rahmen wurde die Disziplin des „*Tissue Engineering*“ (TE, engl. Gewebezüchtung) begründet. TE wird definiert als “die Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieurs- und Lebenswissenschaften, um Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologischen Säuger-Geweben zu verstehen sowie die Entwicklung von biologischen Substituten, um Gewebefunktionen zu ersetzen, erhalten oder zu verbessern“ (aus dem Engl., [Fox und Skalak, 1988]).

Der TE-Prozess umfasst die Zellisolation, die Zellexpansion sowie die Aussaat und Kultivierung der Zellen auf bzw. in einer meist dreidimensionalen Matrix (siehe Abbildung 1-1). Diese kann aus natürlichem oder synthetischem Material bestehen [Atala, 2007; Naderi *et al.*, 2011]. Häufig erfolgt die dreidimensionale Kultur in speziell entwickelten Bioreaktoren. Diese erlauben z.B. die Applikation gewebespezifischer mechanischer Stimuli, wie Druck durch eine Kompression oder Scherkräfte durch einen Medienfluss [Martin *et al.*, 2004]. Weiterhin lässt sich das zelluläre Verhalten über die Zugabe von Zytokinen (z.B. Wachstumsfaktoren) beeinflussen [Rustad *et al.*, 2010]. Das generierte Konstrukt kann als Transplantat oder In-vitro-Modell eingesetzt werden.

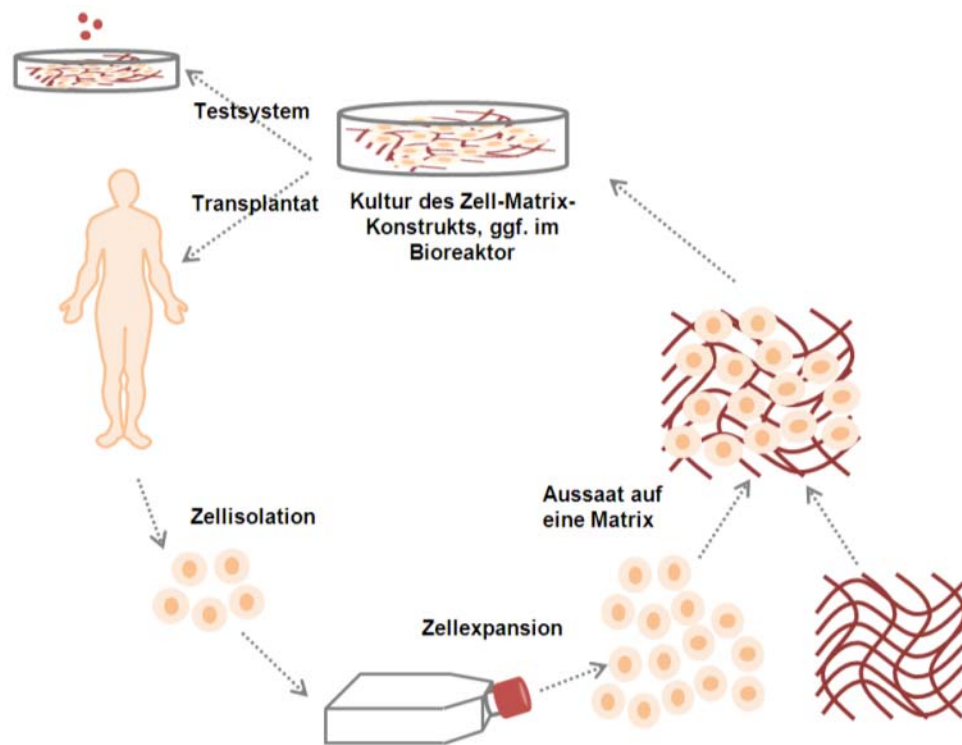


Abbildung 1-1: Prinzip des Tissue Engineering

Durch die Anforderungen an die unterschiedlichen Prozessschritte und die vielfältigen Variationsmöglichkeiten umfasst das TE verschiedene Teilgebiete, die interdisziplinär erforscht werden.

Ein Fokus liegt auf der Auswahl der geeigneten Zellquelle sowie ggf. auf der Gewinnung der Zellen. Für die Anwendung in der regenerativen Medizin stehen autologe, allogene und xenogene primäre Zellen zur Wahl, wobei das Spektrum sowohl ausdifferenzierte Zellen als auch verschiedene Stammzellarten (z.B. mesenchymale Stammzellen und induziert pluripotente Stammzellen) umfasst [Olson *et al.*, 2011]. Für den Bereich der Grundlagenforschung und der pharmakologischen Testungen kommen auch Zelllinien in Frage.

Mit der Entwicklung geeigneter Matrices beschäftigt sich vor allem die Biomaterialforschung. Die eingesetzten Matrices sollten idealerweise zahlreiche Kriterien erfüllen, z.B. die Förderung zelltypischer Charakteristika und der Gewebestruktur, die Möglichkeit ausreichender Versorgung der Zellen in dreidimensionalen Matrices, eine definierte Zusammensetzung in Hinblick auf die Reproduzierbarkeit und die behördliche Zulassung, die Transparenz für die Mikroskopierbarkeit und die Anpassbarkeit von Form und Struktur an die

jeweiligen Anforderungen [Prestwich, 2007]. Weiterhin können Biomoleküle, z.B. Wachstums-, Differenzierungs- und Angiogenesefaktoren, eingebracht werden [Rustad *et al.*, 2010].

Für die Kultur von dreidimensionalen Geweben ist die Entwicklung von geeigneten Bioreaktoren notwendig. Sie müssen sowohl gewebespezifische Stimuli realisieren können als auch die Versorgung der Zellen gewährleisten [Griffith und Swartz, 2006; Haycock, 2011; Martin *et al.*, 2004; Wendt *et al.*, 2009].

Weiterhin sind geeignete Analysemethoden notwendig, um die dreidimensionalen Kulturen während bzw. nach der Kultivierung zu bewerten, da sie zumeist nur schwach transluzent sind und somit die lichtmikroskopische Bewertung bei vielen 3D-Kulturen nicht möglich ist [Pampaloni *et al.*, 2007; Pancrazio *et al.*, 2007].

Den Impuls für die Entwicklung komplexer Kulturmethoden gab insbesondere die regenerative Medizin. Doch in Anbetracht dessen, dass ein funktionelles In-vitro-Gewebe auch für die Grundlagenforschung sowie pharmakologische Testungen von hoher Relevanz ist, kommt die dreidimensionale Kultur in diesen Bereichen als Brücke zwischen den 2D-Zellkulturtests und In-vivo-Tierstudien immer stärker zum Einsatz.

1.3 Die Niere und der renale proximale Tubulus

1.3.1 Funktionen und Anatomie der humanen Niere

Die Hauptaufgabe der Nieren (lat. *Renes*; griech. *Nephri*) als Ausscheidungsorgane ist die Bildung des Harns. Die Nieren filtrieren täglich ca. 150 Liter Blut, um harnpflichtige Stoffwechselendprodukte (z.B. Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin) und Fremdstoffe (Toxine, Arzneimittel) auszuscheiden [Huppelsberg und Walter, 2009]. Für den Körper wertvolle, mitfiltrierte Stoffe werden anschließend zurückgewonnen, sodass schließlich nur ca. 1,5 Liter Harn ausgeschieden werden. Mit der Harnausscheidung regulieren die Nieren zudem den Wasser-, Säure-Basen- und Salzhaushalt und darüber den Blut-pH-Wert, der in einem sehr engen Bereich reguliert werden muss ($7,40 \pm 0,05$), sowie langfristig den Blutdruck [Thews und Vaupel, 2005]. Neben der Ausscheidung erfüllen die Nieren wichtige endokrine Aufgaben. Sie synthetisieren Erythropoetin zur Stimulation der Erythropoese [Jelkmann, 2011] sowie Renin für die Blutdruckregulation [Castrop *et al.*, 2010]. Die Mineralisierung des Knochens beeinflussen die Nieren über die Metabolisierung von Vitamin D₃ in seine aktive Form [Lips, 2006] sowie über die Regulation der Kalzium- und Phosphatkonzentration im

Blutplasma [Allgrove, 2009]. Weiterhin sind die Nieren neben der Leber zur Gluconeogenese fähig [Mitrakou, 2011].

Die Nieren haben eine bohnenähnliche Form und liegen zusammen mit den Nebennieren (*Glandulae suprarenales*) und den Harnleitern (*Ureteren*) paarig im Retroperitonealraum. Sie sind durchschnittlich 10-12 cm lang, 5-6 cm breit, etwa 4 cm dick, 120-200 g schwer und befinden sich vom 11. bis 12. Brustwirbel bis etwa zum 3. Lendenwirbel beidseitig der Wirbelsäule unterhalb des Zwerchfells. Die Nieren besitzen eine derbe, bindegewebige Organkapsel (*Capsula fibrosa*), die von einer Fettgewebsschicht (*Capsula adiposa*) umgeben ist. Sie dient dem Schutz vor Erschütterungen. Zusammen mit der Gerotafaszie (*Fascia renalis*) stabilisiert sie außerdem die Position der Nieren. An der medialen Einsenkung (Nierenpforte, *Hilum renale*) treten die *Arteria renalis* sowie die Nerven ein und die *Vena renalis*, die Lymphgefäße sowie der *Ureter* aus [Zilles und Tillmann, 2010] (siehe Abbildung 1-2).

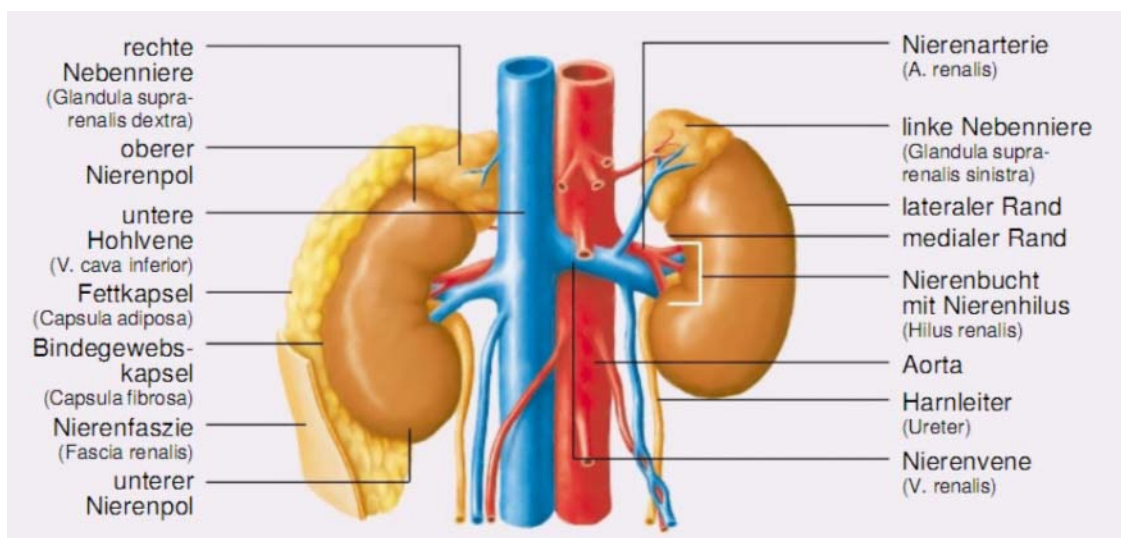


Abbildung 1-2: Nieren mit Nierenkapseln und Gefäßversorgung, aus [Trebsdorf, 2011]

Das Niereninnere ist unterteilt in die Nierenrinde (*Cortex renalis*), das Nierenmark (*Medulla renalis*) und das Nierenbecken (*Pelvis renalis*) (siehe Abbildung 1-3). Das Nierenmark gliedert sich in mehrere Markpyramiden, die durch das Rindengewebe (Säulen des Rindengewebes, *Columnae renales*) voneinander und zur Nierenkapsel hin abgegrenzt sind. An den Spitzen der Markpyramiden (Nierenpapillen, *Papillae renales*) tropft der Harn aus den Sammelrohren in die Nierenkelche, die sich anschließend zum Nierenbecken vereinigen [Nowack, 2009]. Von dort aus gelangt der Harn weiter über den Ureter zur Harnblase.

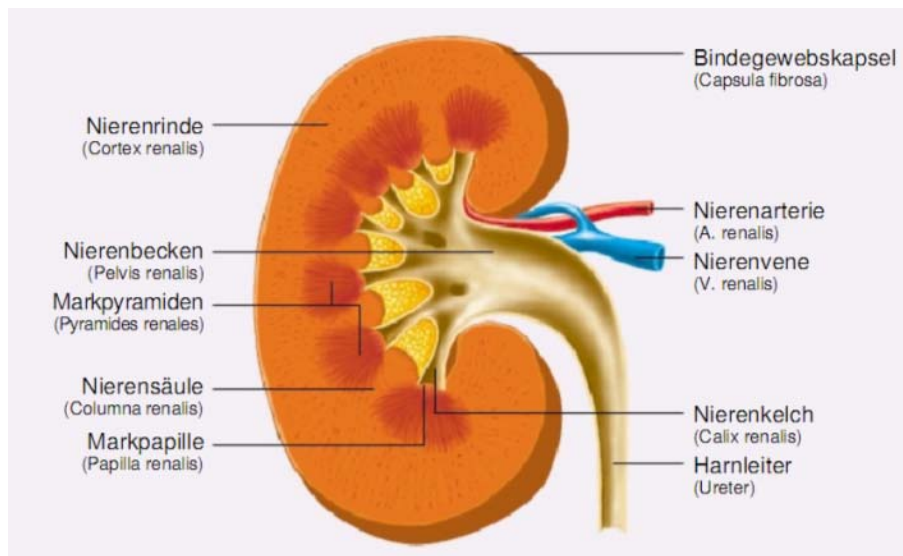


Abbildung 1-3: Makroskopische Anatomie der Niere, aus [Trebsdorf, 2011]

Die funktionelle Grundeinheit der Niere ist das Nephron (siehe Abbildung 1-4), von dem jede Niere durchschnittlich ca. 1 Million enthält. Sie setzen sich aus einem kugeligen Nierenkörperchen (*Corpusculum renale*), in dem der Primärharn entsteht, und dem Tubulussystem zusammen. Am Gefäßpol tritt die *Arteriola glomerularis afferens* (kurz *Vas afferens*) in das Nierenkörperchen ein und verzweigt sich zum *Glomerulus*. Diese feinen Kapillarschlingen werden durch dazwischenliegendes intraglomeruläres Mesangium am Gefäßpol stabilisiert und gestützt. Es besteht aus kontraktile Mesangiumzellen und extrazellulärer Matrix. Die Kapillarschlingen sind mit einem fenestrierten Endothel ausgekleidet, das einer Basalmembran mit zahlreichen negativ geladenen Proteoglykanen aufliegt. Auf der anderen Seite der Basalmembran sitzen die fein verzweigten Fortsätze der Podozyten, die so miteinander verzahnt sind, dass gleichmäßige Zwischenräume entstehen. In den Zwischenräumen befinden sich Schlitzdiaphragmen, die durch Zell-Zell-Kontakte der Podozyten gebildet werden [Zilles und Tillmann, 2010]. Die Podozyten besitzen zudem eine negativ geladene Glykokalix [Horn *et al.*, 2009]. Endothel, Basalmembran und Podozyten bilden zusammen einen permselektiven Filter (Blut-Harn-Schranke), an dem Substanzen größen- und ladungsabhängig zurückgehalten werden. Dadurch verbleiben die Blutzellen und die meisten Plasmaproteine im Blut. Wasser und kleine gelöste Bestandteile, wie Glucose, passieren hingegen den Filter und gelangen als Primärharn in den Kapselraum und anschließend über den Harnpol in das Tubulussystem [Horn *et al.*, 2009; Schmidt, 2010]. Am

Filter hängengebliebene Substanzen können durch die intraglomerulären Mesangiumzellen phagozytiert werden [Zilles und Tillmann, 2010]. Die Kapillarschlingen des *Glomerulus* vereinigen sich wieder zur *Arteriola glomerularis efferens* (kurz *Vas efferens*), die das Nierenkörperchen über den Gefäßpol mit dem gefilterten Blut verlässt und anschließend in ein zweites Kapillarsystem mündet, das das Tubulussystem umgibt und die Tubulusepithelzellen versorgt [Zilles und Tillmann, 2010].

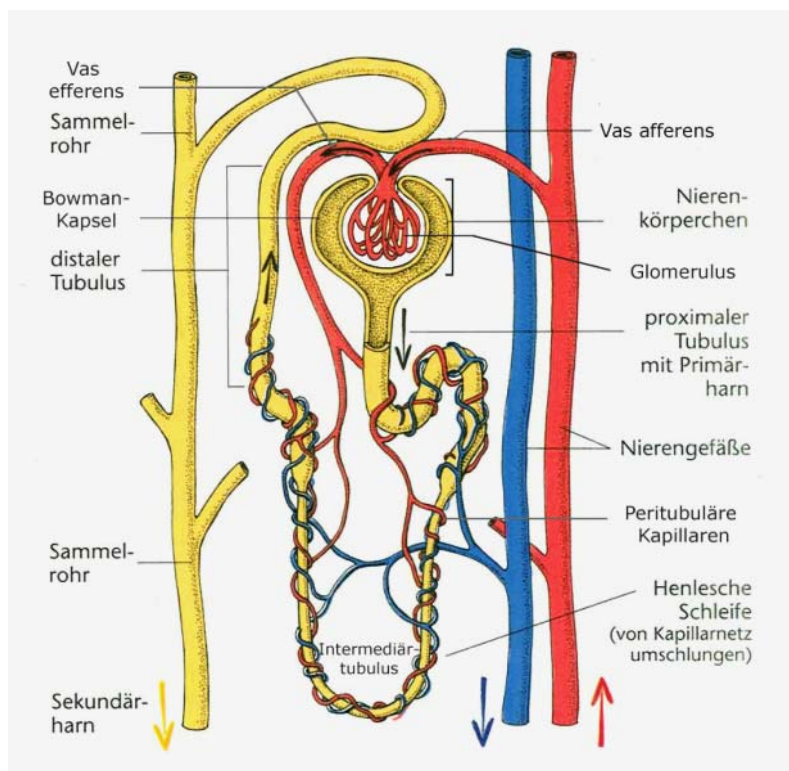


Abbildung 1-4: Mikroskopische Anatomie der Niere: Nephron, Sammelrohr und Blutgefäße, aus [Menche, 2002] (modifiziert)

Im Tubulussystem wird der Primärharn stark modifiziert. Ca. 99 % des filtrierte Wassers werden von den Tubuluszellen rückresorbiert und in die peritubulären Kapillaren abgegeben. Weiterhin werden über 90 % der im Filtrat gelösten Substanzen rückresorbiert, aber auch Substanzen aus den peritubulären Kapillaren für die Ausscheidung in das Tubuluslumen sezerniert [Schmidt, 2010].

Das Tubulussystem ist in mehrere Abschnitte unterteilt, die jeweils individuelle Aufgaben erfüllen und sich dadurch bedingt auch morphologisch unterscheiden [Schmidt, 2010]. An den Glomerulus schließt sich zunächst der proximale Tubulus (PT) an. Er besteht aus einem gewundenen Abschnitt (*Pars convoluta*), der in der Nierenrinde liegt, und setzt sich mit einem geraden Abschnitt (*Pars recta*) in das Nierenmark fort [Zilles und Tillmann, 2010].

Seine Funktion besteht v.a. in der Rückresorption von großen Flüssigkeitsmengen (bis zu 75 % des Primärharns), Ionen, Harnstoff, Aminosäuren und Glucose sowie in der Sekretion von Stoffwechselendprodukten und Arzneimitteln bzw. ihren Metaboliten in den Harn [Baumhoer *et al.*, 2003]. Auf den PT folgen der Intermediärtubulus und der distale Tubulus, der ebenfalls aus einem geraden und gewundenen Abschnitt besteht. Der gerade Abschnitt des PT, der Intermediärtubulus und der gerade Abschnitt des distalen Tubulus bilden zusammen die Henle-Schleife, die sich im Nierenmark befindet [Baumhoer *et al.*, 2003]. In der Henle-Schleife erfolgt mittels Gegenstromprinzip u.a. eine weitere Konzentrierung des Harns. Dazu resorbiert der distale Tubulusabschnitt der Henle-Schleife Natrium in das umliegende Gewebe. Da er jedoch wasserimpermeabel ist, kann kein Wasser nachfolgen. Dadurch wird das interstitielle Gewebe hyperosmolarisch und entzieht dem wasserpermeablen, proximalen Tubulusabschnitt der Henle-Schleife Wasser. Der distale Tubulus nähert sich dem Gefäßpol des Glomerulus und besitzt dort an der zum Glomerulus gewandten Seite hochprismatische Tubuluszellen, die als *Macula densa* bezeichnet werden und als Teil des juxtaglomerulären Apparates an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sind [Baumhoer *et al.*, 2003]. Der Harn gelangt weiter in das Sammelrohr, das aufgrund der embryonalen Entwicklung nicht dem Nephron zugeordnet wird [Zilles und Tillmann, 2010]. Im Sammelrohr erfolgt eine weitere Wasserresorption, die durch das antidiuretische Hormon (ADH) gesteuert wird [Schmidt, 2010; Zilles und Tillmann, 2010]. Die Sammelrohre vereinigen sich miteinander, sodass schließlich ca. 20 Gänge an jeder Papille ankommen und den Endharn in das Nierenbecken abführen [Baumhoer *et al.*, 2003].

1.3.2 Morphologische Besonderheiten und Funktionen des humanen renalen proximalen Tubulus

Der proximale Tubulus entspringt am Harnpol des Nierenkörperchens. Mit seinem gewundenen und geraden Abschnitt kann er bis zu 14 mm lang sein [Schiebler und Korf, 2007]. Zytologisch wird der proximale Tubulus in drei Segmente (S1,S2,S3) unterteilt, die sich morphologisch leicht unterscheiden und auf die verschiedenen Funktionen des proximalen Tubulus spezialisiert sind [Klinke und Bauman, 2010]. Der äußere Durchmesser des proximalen Tubulus beträgt ca. 60 µm [Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000]. Wie alle anderen Tubulusabschnitte ist er mit einem einschichtigen Epithel, das einer Basalmembran aufliegt, ausgekleidet. Proximale Tubulusepithelzellen sind kubisch bis hochprismatisch und besitzen einen stark polarisierten Aufbau. Sie weisen auf der zum Lumen gewandten,

apikalen Seite einen hohen Bürstensaum auf. Diese Oberflächenvergrößerung ist für die hohen Transportraten im proximalen Tubulus notwendig. In den Mikrovilli sind zahlreiche Transportproteine lokalisiert. Der Bürstensaum ist von einer Glykokalix mit Glykoproteinen überzogen [Junqueira *et al.*, 2004; Zilles und Tillmann, 2010]. Die basolaterale Oberfläche ist durch starke Membraneinfaltungen und Interdigitationen mit benachbarten Zellen ebenfalls vergrößert (siehe Abbildung 1-5). Dort befinden sich zahlreiche Natriumpumpen ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasen}$), die dazu dienen, einen Natrium-Konzentrationsgradienten aufzubauen, der für verschiedene Transportprozesse genutzt wird. Des Weiteren dient die basolaterale Oberflächenvergrößerung dem Stoffaustausch mit den Blutgefäßen und dem Interstitium [Klinke und Bauman, 2010; Zilles und Tillmann, 2010]. Der proximale Tubulus ist für den starken Flüssigkeitsaustausch intensiv vom Kapillarnetz umgeben [Rohen und Lütjen-Drecoll, 2005]. Basal liegen weiterhin zahlreiche Mitochondrien, die das ATP für die Natriumpumpen liefern. Der Zellkern ist zentral bis basal gelegen (siehe Abbildung 1-5B). Benachbarte Zellen sind nur punktiert über Tight Junctions miteinander verbunden. Dadurch handelt es sich beim proximalen Tubulus um ein „leckes“ Epithel. Dies ermöglicht einen starken passiven, parazellulären Transport. Hohe Konzentrationsgradienten können hingegen nicht aufgebaut werden [Klinke und Bauman, 2010; Schmidt, 2010; Zilles und Tillmann, 2010]. Weitere Zell-Zell-Kontakte werden über Cadherine gebildet. Proximale Tubuluszellen exprimieren N-Cadherin; die Epithelzellen der späteren Nephronsegmente und des Sammelrohrs hingegen E-Cadherin [Prozialeck und Edwards, 2007].

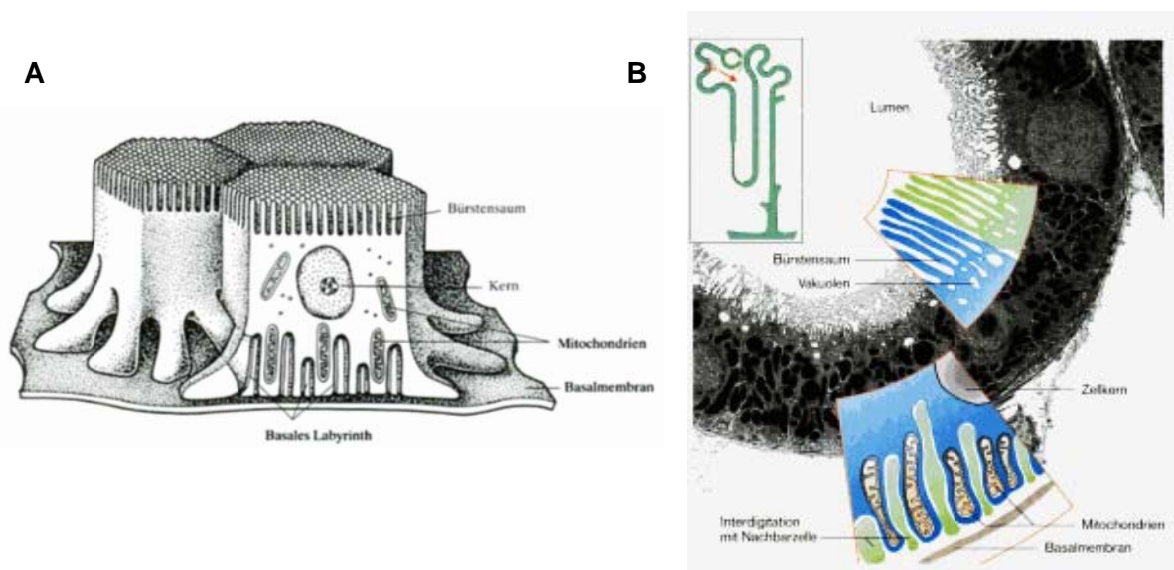


Abbildung 1-5: Morphologie des proximalen Tubulusepithels. (A) Schematische Darstellung, aus [Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000] und (B) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme mit schematisch hervorgehobenen morphologischen Besonderheiten, aus [Klinke und Bauman, 2010]

Proximale Tubuluszellen resorbieren die meisten Substanzen, die aus dem Primärharn zurückgewonnen werden müssen, z.B. ca. 60 % des Wassers und der Salze sowie 99 % der Glucose und Aminosäuren [Schmidt, 2010]. Wasser wird vor allem über den Transporter Aquaporin-1 in der apikalen und basalen Membran transzellulär resorbiert [Nielsen *et al.*, 2002]. Des Weiteren sezernieren proximale Tubuluszellen endogene Abfallprodukte und Xenobiotika zur Ausscheidung in das Tubuluslumen und können sowohl endogene als auch exogene Substanzen enzymatisch umwandeln [Roch-Ramel und Broe, 2004; Schmidt, 2010]. Über Cytochrom P450 27B1 wird z.B. das Vitamin D₃ in seine aktive Form metabolisiert [Perwad und Portale, 2011]. Weitere Funktionen bestehen in der Gluconeogenese sowie der Beteiligung an der pH-Regulation.

Aus den diversen Transport- und Metabolisierungsfunktionen ergibt sich eine hohe Sensitivität gegenüber Toxinen [Jennings *et al.*, 2008]. Proximale Tubuluszellen können eine Vielzahl von Substanzen über rezeptorvermittelte Endocytose und verschiedene Transportproteine in die Zelle aufnehmen sowie metabolisieren [Launay-Vacher *et al.*, 2006; Lock und Reed, 1998; Roch-Ramel und Broe, 2004]. Werden toxische Substanzen in die Zellen aufgenommen, die nicht wieder ausgeschleust oder abgebaut werden können, kann es zu einer Akkumulation dieser Substanzen in den Zellen und einer Schädigung des Epithels kommen. Weiterhin können Substanzen in toxische Metabolite umgewandelt werden. Weitere Faktoren, die die Exposition gegenüber (potentiell) toxischen Substanzen erhöhen, sind die hohe Durchblutung der Nieren mit 20-25 % des Herzzeitvolumens sowie die Position des proximalen Tubulus als erstes Tubulussegment, das mit dem glomerulären Filtrat in Kontakt kommt. Weiterhin sind proximale Tubuluszellen durch die starke Wasserresorption weitaus höheren Konzentrationen von Fremdstoffen ausgesetzt als die Zellen anderer Organe [Jennings *et al.*, 2008; Pfaller und Gstraunthaler, 1998].

1.4 Stand der Wissenschaft

1.4.1 Anwendungsbereiche für In-vitro-Modelle des renalen proximalen Tubulus

Aussagekräftige In-vitro-Modelle des renalen proximalen Tubulusepithels werden in der Grundlagenforschung, für pharmakologische Testungen sowie in der Entwicklung von bioartifiziellen Nierenersatzsystemen benötigt.

In der Grundlagenforschung zum renalen proximalen Tubulus werden vor allem Transportvorgänge und deren Regulation, Mechanismen nephrotoxischer Substanzen sowie Regenerationsvorgänge im Hinblick auf mögliche Regenerations- bzw. Stammzelltherapien untersucht. Bisher werden für diese Studien hauptsächlich Tiermodelle angewandt. In der Zellkultur lassen sich Untersuchungen auch an renalen proximalen Tubuluszellen isoliert vornehmen. Dies ist von Vorteil, da die Niere sehr komplex und aus über 15 verschiedenen Zelltypen aufgebaut ist [Kriz *et al.*, 1988]. In vivo ist somit die gezielte Untersuchung von primären Vorgängen in den proximalen Tubuluszellen erschwert.

In der pharmakologischen Entwicklung ist das proximale Tubulusepithel neben Studien zur Wirksamkeit von nephrologischen Arzneimitteln besonders für toxikologische Tests neuer Arzneimittel bedeutend, da es gegenüber nephrotoxischen Effekten sehr empfindlich ist. Arzneimittel oder ihre Metabolite können über die zahlreichen Transportsysteme der proximalen Tubuluszellen in hohem Maße absorbiert und von Enzymen zu toxischen Metaboliten oder reaktiven Zwischenprodukten metabolisiert werden [Jennings *et al.*, 2008; Pfaller und Gstraunthaler, 1998; Roch-Ramel und Broe, 2004]. Dies beeinflusst des Weiteren die Exkretion und somit die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln [Inui *et al.*, 2000; Launay-Vacher *et al.*, 2006; Perri *et al.*, 2003]. Bisher werden für Studien in der pharmakologischen Entwicklung fast ausschließlich Tiermodelle herangezogen, da diese die bisher zuverlässigsten Informationen über nierenschädigende Wirkungen liefern und keine In-vitro-Methode für den regulatorischen Gebrauch validiert ist. Aufgrund Spezies-spezifischer Unterschiede sind die Ergebnisse aus den Tiermodellen jedoch nur eingeschränkt auf den humanen Organismus übertragbar [Mahmood, 1998; Walton *et al.*, 2004].

Ein weiterer Bereich, für den geeignete Zell-Matrix-Kombinationen benötigt werden, ist die Entwicklung von bioartifiziellen Nierenersatzsystemen [Ding und Humes, 2008; Humes *et al.*, 1999; Oo *et al.*, 2011; Tasnim *et al.*, 2010]. Aufgrund der lebenswichtigen Funktionen der Nieren muss bei einem Nierenversagen die ausgefallene Organfunktion sehr schnell und adäquat ersetzt werden. Dafür wird vor allem die Hämodialyse eingesetzt. Der konventionelle Hämodialysefilter kann jedoch nur die glomeruläre Filtration zu einem gewissen Grad ersetzen – die Rückresorption nützlicher Substanzen sowie regulatorische, metabolische und endokrine Funktionen fehlen. Daher besteht ein Optimierungsansatz darin, einen Bioreaktor mit renalen Epithelzellen als extrakorporale Niereneinheit zu integrieren. Dabei sind insbesondere proximale Tubuluszellen relevant, da sie eine Vielzahl von Funktionen aufweisen, wie die Reabsorption und Sekretion, metabolische, endokrine und möglicherweise auch immunmodulatorische Funktionen [Tasnim *et al.*, 2010]. Für ein System mit Hohlfasermembranen, die mit humanen renalen Tubuluszellen besiedelt waren, konnten

in einer klinischen Phase II- Studie bereits signifikante Verbesserungen der Überlebensrate nachgewiesen werden. Die nachfolgende Phase IIb-Studie wurde nach einer Zwischenbilanz jedoch abgebrochen [Tumlin *et al.*, 2008].

Bioartifizielle Nierenersatzsysteme müssen vor allem hinsichtlich der Zellquelle und der Membranen noch optimiert werden. Primäre Zellen erscheinen aus Sicht der Funktionalität die am besten geeignete Zellquelle. Aufgrund ihrer Limitationen, die im folgenden Kapitel beschrieben sind, wird jedoch nach weiteren möglichen Zellquellen gesucht. Weiterhin müssen geeignete Membranmaterialien entwickelt werden, die sowohl die Adhäsion und Differenzierung der Zellen ermöglichen, als auch hämokompatible Eigenschaften aufweisen [Oo *et al.*, 2011; Tasnim *et al.*, 2010].

In den Kapiteln 1.4.2 und 1.4.3 werden Zellen und Matrices vorgestellt, die bereits für In-vitro-Studien in der Anwendung sind bzw. für diese Arbeit verwendet wurden.

1.4.2 Zellquellen

Es werden primäre Zellen und Zelllinien unterschieden, wie in 1.1 beschrieben. Diese können jeweils humanen oder tierischen Ursprungs sein. Primäre renale proximale Tubuluszellen bieten im Allgemeinen das beste Funktionsspektrum. Durch die in vitro stattfindende Dedifferenzierung kann es jedoch relativ schnell zu einem Funktionsverlust kommen. Des Weiteren variieren das Zellwachstum und die –funktionalität zwischen verschiedenen Spendern. Die Isolation, Aufreinigung und Kultivierung der Zellen sind zudem sehr aufwändig. Insbesondere bei humanen Zellen ist die Verfügbarkeit von Spendergewebe eingeschränkt. Dies ist vor allem bei Anwendungen problematisch, bei denen große Zellmengen benötigt werden, wie den bioartifiziellen Nierenersatzsystemen.

Häufig kommen daher xenogene primäre Zellen, z.B. aus der Maus, der Ratte, dem Kaninchen und dem Schwein, zum Einsatz. Sie weisen ein größeres Funktionsspektrum als die verfügbaren Zelllinien dieser Spezies auf und wurden daher bereits für Studien zur Evaluierung der Kurzzeittoxizität verschiedener Substanzen verwendet [Jennings *et al.*, 2008]. Die meisten Untersuchungen werden jedoch mit Zelllinien durchgeführt. Sie haben den Vorteil, dass sie sich uneingeschränkt vermehren lassen. Limitierend bei Zelllinien ist jedoch deren eingeschränktes Funktionsspektrum. Für die Untersuchung nephrotoxischer Mechanismen werden häufig die OK-Zelllinie (aus Nierengewebe des Amerikanischen Opossums etabliert [Koyama *et al.*, 1978]) und die LLC-PK1-Zelllinie (aus porcinem Nierengewebe etabliert [Hull *et al.*, 1976]) eingesetzt. Ihre Eigenschaften weisen auf eine

proximale renale Herkunft hin [Jennings *et al.*, 2008]. Für die Grundlagenforschung zum renalen Epithel und der epithelialen Polarisierung wird häufig die MDCK (*Madin-Darby canine kidney*)-Zelllinie eingesetzt. Sie weist vor allem Eigenschaften der Zellen des distalen Tubulus sowie des Sammelrohrs auf [Gaush *et al.*, 1966; Jennings *et al.*, 2008]. Eine humane Zelllinie aus adultem Nierengewebe mit proximalen Eigenschaften ist die HK-2-Zelllinie (HK = *human kidney*). Sie wurde viral immortalisiert [Ryan *et al.*, 1994]. Dies führt im Allgemeinen zur Veränderung der zellulären Eigenschaften.

In den letzten Jahren wurden diverse Studien durchgeführt, um die Herkunft und Identität der Zellen aufzuklären, die bei geringen Schädigungen der Nierentubuli zur deren Regeneration in der Lage sind [Benigni *et al.*, 2010; Gupta und Rosenberg, 2008; Lindgren *et al.*, 2011]. Dies ist insbesondere für die regenerative Medizin bedeutend, da die Erkenntnisse zur Entwicklung von Stammzelltherapien oder Therapien zur Förderung des endogenen Regenerationspotentials dienen können. Putative renale Progenitor- oder Stammzellen könnten aber auch eine nützliche Zellquelle für In-vitro-Anwendungen darstellen, da sie verglichen mit ausdifferenzierten Zellen ein höheres Proliferationspotential besitzen und eine bessere Funktionalität als kontinuierliche Zelllinien unter geeigneten Kulturbedingungen aufweisen könnten. Es gibt eine Vielzahl von Studien, die gezeigt haben, dass vor allem intrarenale Zellen die Regeneration von renalen Tubuli ermöglichen. Es ist jedoch noch nicht endgültig geklärt, ob es sich dabei um dedifferenzierende überlebende Epithelzellen oder ansässige Stamm- bzw. Progenitorzellen handelt [Benigni *et al.*, 2010; Perin *et al.*, 2011]. Beide Mechanismen lassen sich durch experimentelle Daten stützen [Gupta *et al.*, 2006; Humphreys *et al.*, 2011; Humphreys *et al.*, 2008; Lindgren *et al.*, 2011; Oliver *et al.*, 2004], daher ist auch ein Zusammenwirken beider Vorgänge möglich.

In dieser Arbeit wurden Zellen verwendet, die ebenfalls Eigenschaften von Progenitorzellen aufweisen („*Human Kidney-derived Cells*“, hKDCs). Ihre Isolation aus adultem humanem Nierengewebe verstorbener Spender wurde von der Firma *Advanced Technologies & Regenerative Medicine* (ATRM, Somerville - USA) etabliert. Die Isolation umfasste die mechanische Zerkleinerung von Nierengewebe aus verschiedenen Regionen der Nierenrinde und des Nierenmarks sowie den anschließenden enzymatischen Verdau mit einem Gemisch aus Kollagenase, Dispase und Hyaluronidase. Die Charakterisierung der Zellen zeigte, dass sie mit einer durchschnittlichen Verdopplungszahl von 28,5 bis zur Seneszenz ein hohes Wachstumspotential aufweisen und somit große Zellmengen generiert werden können. Weiterhin weisen sie einige allgemeine Stammzellmarker (z.B. Oct-3/4 und Rex-1) sowie nierenspezifische Entwicklungsmarker (Pax-2 und WT-1) auf, die über den

gesamten Kulturzeitraum erhalten bleiben. Die Ergebnisse konnten über verschiedene Spender reproduziert werden [Colter *et al.*, 2008].

1.4.3 Matrices

Der Erfolg dreidimensionaler In-vitro-Kulturen hängt maßgeblich von der geeigneten Kombination aus Zellen, Matrices und Kulturbedingungen ab. Die extrazelluläre Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM) ist essentiell für die Bildung sowie Erhaltung einer epithelialen Zellschicht [Pampaloni *et al.*, 2007], weshalb ihr Einfluss auf renale proximale Tubuluszellen Gegenstand vieler Studien ist. Es wurde gezeigt, dass Bestandteile der Basalmembran wie Laminin und Kollagen Typ IV die Adhäsion von renalen Tubuluszellen auf synthetischen Polymeroberflächen verbessern [Zhang *et al.*, 2009]. Dies ist z.B. bedeutend für die Entwicklung von bioartifiziellen Nierenersatzsystemen, bei denen häufig Hohlfasermembranen eingesetzt werden. Sie sind zwar hämokompatibel, eignen sich jedoch nicht als Substrat für die Adhäsion von Zellen [Tasnim *et al.*, 2010]. Weiterhin reagieren verschiedene Zellquellen unterschiedlich auf ECM-Bestandteile und die damit verbundenen Bedingungen, z.B. die eingesetzte Konzentration. Es konnten Unterschiede zwischen Primärzellen und Zelllinien [Ni *et al.*, 2011] sowie zwischen verschiedenen Zelllinien [Kanai *et al.*, 1999] hinsichtlich ihres Adhäsions- und Proliferationsverhaltens auf verschiedenen Beschichtungen nachgewiesen werden. Dies zeigt die Komplexität der Interaktionen zwischen den Zellen und der ECM sowie die Individualität jeder verwendeten Komponente. Der starke Einfluss der ECM auf renale Tubuluszellen in vitro konnte ebenfalls unter Verwendung von dreidimensionalen Hydrogelen aus Kollagen Typ I, Matrigel und bioaktivierten synthetischen Polymeren verdeutlicht werden. Eingebettet in diesen 3D-Matrices bilden MDCK-Zellen polarisierte zystäre und tubuläre Strukturen mit epitheliale Phänotyp [Chung *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 1982; O'Brien *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1990]. In einer der Studien wurde beobachtet, dass die Anwesenheit von mindestens einer ECM-Komponente notwendig für die Zystenbildung ist [Guo *et al.*, 2008]. Hydrogele sind für Studien zur epithelialen Morphogenese und Polarisierung geeignet, für Anwendungen mit dem Fokus auf Transportfunktionen werden jedoch andere Modelle benötigt, da die epithelialen Strukturen diffus im Hydrogel verteilt sind. Somit ist es in Routineanwendungen weder möglich, gezielt Substanzen in ein Kompartiment zu applizieren, noch den Transport zu detektieren.

Für Transportstudien werden häufig poröse Well-Einsätze, sog. *Inserts*, eingesetzt, da sie eine planare Kulturoberfläche und zwei getrennte Kompartimente bieten [Justice *et al.*, 2009]. Die synthetischen Membranen der *Inserts* können z.B. mit Kollagen Typ I beschichtet werden, um die Adhäsion und Differenzierung der Zellen zu fördern, sie bieten jedoch keine dreidimensionale Matrix.

Weitere Matrices, die für das TE eingesetzt werden, jedoch bisher noch nicht für die Kultur renaler Tubuluszellen zur Anwendung kamen, sind die *Small intestinal Submucosa* (SIS, engl. für Submucosa des Dünndarms) und die *BioVaSc* (*Biological vascularized scaffold*, engl. für biologische, vaskularisierte Matrix). Diese beiden Matrices wurden in dieser Arbeit verwendet.

Die SIS wird üblicherweise aus porcinem Dünndarm hergestellt, indem die Mucosa und die Muskelschichten sowie alle verbleibenden Zellen entfernt werden. Dadurch verbleibt eine natürliche Matrix aus Kollagen Typ I und III, Proteoglykanen, Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen und Wachstumsfaktoren [Brown-Etris *et al.*, 2002; Hodde *et al.*, 2007; Hodde *et al.*, 1996; Hodde *et al.*, 2001; McDevitt *et al.*, 2003; Voytik-Harbin *et al.*, 1997]. Diese, auch kommerziell erhältliche, natürliche Matrix wurde bereits intensiv in präklinischen und klinischen Studien getestet. Diese zeigten die Eignung der SIS als Biomaterial-Transplantat für die Gewebsrekonstruktion in verschiedenen klinischen Anwendungen, z.B. zur Hernienregeneration und der urologischen Rekonstruktion. Die SIS fördert ebenfalls *in vitro* das Einwachsen von verschiedenen Zelltypen, deren Proliferation sowie die Ausbildung zelltypischer Charakteristika [Badylak *et al.*, 1998; Lindberg und Badylak, 2001; Voytik-Harbin *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2010]. Sie wurde jedoch noch nicht für die Kultur von renalen Tubuluszellen verwendet.

Die SIS bietet weiterhin die Möglichkeit einer beidseitigen Besiedlung zur Co-Kultur von zwei verschiedenen Zelltypen. Dabei sind besonders Endothelzellen relevant, da das renale Tubulusepithel und das peritubuläre Kapillarnetzwerk *in vivo* sehr stark interagieren. Wasser und gelöste Substanzen, die aus dem Tubuluslumen reabsorbiert werden, gelangen in die Kapillaren und es werden dem proximalen Tubulusepithel Substanzen aus den Kapillaren für die Sekretion präsentiert. Der Einfluss der Co-Kultur mit Endothelzellen auf die Transporterexpression von proximalen Tubuluszellen *in vitro* ließ sich bereits nachweisen [Aydin *et al.*, 2008].

Die *BioVaSc* ist ebenfalls eine natürliche Matrix, die aus porcinem Dünndarm gewonnen wird. Im Unterschied zur SIS erfolgt hier die Präparation eines Dünndarmsegments unter

Erhalt der Gefäßstrukturen einschließlich eines arteriellen und venösen Gefäßanschlusses. Die porcinen Zellen lassen sich durch eine Perfusion des Gefäßsystems und des Darmlumens mit einer Tensidlösung entfernen. Bei der BioVaSc wird die Mucosa-Matrix im Gegensatz zur SIS nicht entfernt. Die azellularisierte Matrix eignet sich für die Co-Kultur von Endothelzellen in den Gefäßstrukturen und einem zweiten Zelltyp auf der Mucosamatrix. Die Kultivierung erfolgt in einem Bioreaktor, der die Perfusion des Gefäßsystems mit einem physiologischen Druck ermöglicht. Der dadurch entstehende Scherstress auf die Endothelzellen trägt zu deren Differenzierung bei [Garcia-Cardena *et al.*, 2001; Malek und Izumo, 1996; Resnick *et al.*, 2003; Riha *et al.*, 2005; Song und Munn, 2011]. Die BioVaSc und die Kultivierungsbedingungen zeigten bereits ihr Potential bei der Co-Kultur von Hepatozyten mit Endothelzellen [Linke *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2010].

1.5 Ziel der Arbeit

Es besteht ein großer Bedarf an geeigneten In-vitro-Modellen des humanen renalen proximalen Tubulus in verschiedenen Anwendungsgebieten. Bisher werden in der Grundlagen- und pharmakologischen Forschung hauptsächlich Tiermodelle angewendet, da es einen Mangel an aussagekräftigen In-vitro-Modellen gibt. Für die Entwicklung von bioartifiziellen Nierenersatzsystemen werden ebenfalls geeignete Zell-Matrix-Kombinationen gesucht.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit den *Human Kidney-derived Cells* (hKDCs) als humane Zellquelle in Kombination mit einer natürlichen Matrix ein In-vitro-Modell des renalen proximalen Tubulus aufzubauen, das in verschiedenen Bereichen Anwendung finden kann.

Dazu sollte zunächst die weitere Charakterisierung der hKDCs erfolgen und ihr Differenzierungspotential untersucht werden. Anschließend lag der Schwerpunkt darauf, ein Kultursubstrat zu finden, auf dem die hKDCs die Charakteristika des renalen proximalen Tubulusepithels ausprägen. Dafür waren zum einen zwei- und dreidimensionale Substrate, die bereits für die Kultur von renalen proximalen Tubuluszellen zur Anwendung kommen (Multiwellplatten, Kollagen-Typ-I-beschichtete Multiwellplatten-Inserts, Kollagen-Typ-I-Hydrogele), zu testen. Zum anderen sollten Matrices miteinbezogen werden, auf denen renale Tubuluszellen noch nicht kultiviert worden sind, die jedoch für andere Zelltypen bzw. Anwendungsbereiche bereits erfolgreich zum Einsatz kamen (SIS, BioVaSc).

Auf dem Substrat, mit dem sich die besten Ergebnisse erzielen ließen, sollten die hKDCs anschließend mit der HK-2-Zelllinie, einer bekannten und häufig eingesetzten proximalen

Tubulusepithelzelllinie aus adultem humanem Nierengewebe als Referenz verglichen werden.

Ein weiteres Ziel war der Aufbau der Co-Kultur der hKDCs mit Endothelzellen für eine weitere Annäherung der in vitro generierten Funktionen an die In-vivo-Situation des proximalen Nierentubulus.

2 Material

2.1 Zell- und Gewebematerial

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen bzw. Gewebe und deren Herkunft sind im Folgenden aufgeführt.

Zellen oder Gewebe	Bezugsquelle
Human Kidney-derived Cells (hKDCs)	Advanced Technologies and Regenerative Medicine (ATRM), Somerville (USA)
HK-2-Zelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), #CRL-2190
MSCs aus humanem Knochenmark	Lehrstuhl für Tissue Engineering & Regenerative Medizin der Universität Würzburg
Adultes humanes Hautgewebe zur Isolation von Endothelzellen und Fibroblasten	Klinik Charlottenhaus Stuttgart mit Einverständnis der Patienten
Porcine Darmsegmente zur Matrixherstellung	Experimentelle Medizin Tübingen (Explantation der Darmsegmente aus Deutschen Landrasseschweinen). Alle Entnahmen fanden entsprechend dem Tierschutzgesetz (§4 Abs. 3) statt und wurden über den zuständigen Tierschutzbeauftragten dem Regierungspräsidium Tübingen regelmäßig mitgeteilt

2.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind im Folgenden aufgeführt.

Chemikalie	Lieferant	Bestellnr.
β -Glycerophosphat-Dinatriumsalz-Hydrat	Sigma-Aldrich (München)	G6376
0,5% Trypsin-EDTA (10x)	Life Technologies (Darmstadt)	15400-054
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium ·bromide (MTT)	SERVA Electrophoresis (Heidelberg)	20395
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich (München)	15879
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) - dihydrochlorid	Roche Diagnostics (Mannheim)	10236276001
Aceton	Merck (Darmstadt)	100014
acLDL-Alexa Flour [®] 488 1 mg/ml	Life Technologies (Darmstadt)	L23380
AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)-Substrat Kit	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg)	HK129-5KE
Alcianblau 8GX	Sigma-Aldrich (München)	A-3157
Alizarinrot S	Sigma-Aldrich (München)	A-5533
Aluminiumsulfat-18-hydrat	Merck (Darmstadt)	101102
Ammoniaklösung (25 %)	Merck (Darmstadt)	1054221000

Chemikalie	Lieferant	Bestellnr.
Antibody Diluent with background reducing components	Dako (Hamburg)	S3022
Aquatex [®] (wässriges Eindeckmittel)	Merck (Darmstadt)	1085620050
Ascorbat-2-phosphat-Sesquimagnesium-Salz	Sigma-Aldrich (München)	A-8960
Bouin's Reagenz	Sigma-Aldrich (München)	HT101128
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (München)	A9647
BSA-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Konjugat	Sigma-Aldrich (München)	A9771
Casy [®] -ton	Roche Diagnostics (Mannheim)	05651808001
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)-Substrat Kit	Dako (Hamburg)	K3468
Dako Pen	Dako (Hamburg)	S2002
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth (Karlsruhe)	3484
Dexamethason	Sigma-Aldrich (München)	D4902
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München)	D2438
Dinatriumphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Merck (Darmstadt)	1065801000
Dispase [®]	Life Technologies (Darmstadt)	17105-041
DMEM-Pulver	Life Technologies (Darmstadt)	52100-021
DNase I	Roche Diagnostics (Mannheim)	10104159001
EnVision [™] Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse	Dako (Hamburg)	K5007
EnVision [™] + HRP Mouse	Dako (Hamburg)	K4001
Eosin B	Sigma-Aldrich (München)	861006
Essigsäure 96 % p. a.	Merck (Darmstadt)	100062
Ethanol 96 %	Alkoholvertrieb Süd (Horb)	Sorte 641
Ethanol vergällt >99,8 %	Carl Roth (Karlsruhe)	K928
Fluoresceindiacetat (FDA)	Sigma-Aldrich (München)	F7378
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Darmstadt)	10270-106
Gentamycin 10 mg/ml	Life Technologies (Darmstadt)	15710-049
HEPES PUFFERAN [®] ≥ 99,5%	Carl Roth (Karlsruhe)	9105
Indomethacin	Sigma-Aldrich (München)	I-7378
Insulin human	Sigma-Aldrich (München)	I-9278
Isomount 2000	Labonord (Templemars, F)	05547535
Isopropanol	Brenntag (Mülheim)	10010401
ITS+1 Liquid Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich (München)	I-2521
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)	1049365000
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)	1048731000
Kalziumchlorid CaCl ₂	Merck (Darmstadt)	1023871000
Kalziumchlorid-Dihydrat CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Carl Roth (Karlsruhe)	S2391
Kernechtrot (<i>Nuclear Fast Red</i>)	Sigma-Aldrich (München)	60700
Kollagenase NB 4	SERVA Electrophoresis (Heidelberg)	17454
L-Prolin	Sigma-Aldrich (München)	P5607
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Carl Roth (Karlsruhe)	2189
Methanol Rotipuran [®]	Carl Roth (Karlsruhe)	4627
Meyers Hämalunlösung	Merck (Darmstadt)	1092492500
Natriumchlorid NaCl	Carl Roth (Karlsruhe)	3957
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Salz	Sigma-Aldrich (München)	E5134

Chemikalie	Lieferant	Bestellnr.
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth (Karlsruhe)	8551
Ölrot O	Merck (Darmstadt)	1052300025
Paraffin	Labonord (Templemars, F)	F097200
ProLong [®] Gold antifade reagent with DAPI	Life Technologies (Darmstadt)	P-36931
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich (München)	P4170
Pyruvat	Sigma-Aldrich (München)	P5280
Randox Reagenzien Glucose-Messung	Randox Laboratories (Wülfrath)	GL3881
Randox Reagenzien Laktatdehydrogenase (LDH)-Messung	Randox Laboratories (Wülfrath)	LD3842
Randox Reagenzien Laktat-Messung	Randox Laboratories (Wülfrath)	LC3980
Recombinant human TGF-β3	R&D Systems (Wiesbaden)	243-B3
Roti [®] -Histofix 4 %	Carl Roth (Karlsruhe)	P087
Roticlear [®]	Carl Roth (Karlsruhe)	A538.1
Salzsäure HCl (37 %)	Merck (Darmstadt)	100317000
Streptavidin-Peroxidase-Diluent	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg)	HK157-5KE
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg)	HK320-UKE
Target Retrieval Solution Citrate pH 6	Dako (Hamburg)	S2369
Target Retrieval Solution pH 9	Dako (Hamburg)	S2367
Trizma [®] base	Sigma-Aldrich (München)	T6066
Trizma [®] hydrochloride	Sigma-Aldrich (München)	T5941
Trypanblaulösung 0,4 %	Sigma-Aldrich (München)	93595
Versen	Life Technologies (Darmstadt)	15040-033
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck (Darmstadt)	1085971000
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe)	9713.3

2.3 Zellkulturmedien

Die nachfolgend aufgeführten Medien wurden für die In-vitro-Kultivierung der Zellen eingesetzt.

Medium	Zusammensetzung
Renal Epithelial Cell Growth Medium (REGM [™]) (Lonza, #CC-3190)	Renal Epithelial Cell Basal Medium (REBM) + im Kit enthaltene Supplemente (recombinant human Epidermal growth factor, Hydrocortison, Epinephrin, Insulin, Triiodothyronin, Transferrin, GA-1000, FCS)
Endothelial Cell Growth Medium MV (ECGMmv) (Promocell, #C-22120)	Endothelial Cell Basal Medium MV (ECBMmv) + im Kit enthaltene Supplemente (FCS, Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin, recombinant human Epidermal growth factor, Hydrocortison)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) pH 7,2	13,4 g/l DMEM-Pulver 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat ad Aqua bidestillata (Aqua bidest.)

Medium	Zusammensetzung
Stammzellmedium 1	50 µg/ml Ascorbat-2-phosphat-Sesquimagnesium-Salz 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Gentamycin (10 mg/ml) ad DMEM/Ham's F12 (PAA, #E15-813)
Stammzellmedium 2	1 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Gentamycin (10 mg/ml) ad TheraPEAK™ MSCGM-CD™ Mesenchymal Stem Cell Medium, Chemically Defined (Lonza, #190632)
Adipogenes Differenzierungsmedium	1 µM Dexamethason 500 µM IBMX 1 µg/ml Insulin 100 µM Indomethacin 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Gentamycin (10 mg/ml) ad DMEM
Osteogenes Differenzierungsmedium	50 µg/ml Ascorbat-2-phosphat-Sesquimagnesium-Salz 10 mM β-Glycerophosphat 100 nM Dexamethason 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Gentamycin (10 mg/ml) ad DMEM
Chondrogenes Differenzierungsmedium	50 µg/ml Ascorbat-2-phosphat-Sesquimagnesium-Salz 100 nM Dexamethason 100 µg/ml Pyruvat 40 µg/ml L-Prolin 1 % (v/v) ITS+ 1 10 ng/ml Recombinant human TGF-β3 1 % (v/v) Gentamycin (10 mg/ml) ad DMEM

2.4 Lösungen und Puffer

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt.

Lösungen und Puffer für die Zellkultur und Zellisolation	
Dispaselösung	1 U/ml Dispase ad PBS ⁻
Gelneutralisationslösung pH 7,8	2,5 % (v/v) HEPES-Lösung (3 M) 20,0 % (v/v) FCS 2,0 % (v/v) Gentamycin (10 mg/ml) ad DMEM 2x
Kollagenaselösung	500 U/ml Kollagenase ad PBS ⁺

Lösungen und Puffer für die Zellkultur und Zellisolation		
Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i> , PBS ⁻) pH 7,2	140,0 mM 2,0 mM 1,5 mM 8,5 mM ad	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O Aqua bidest.
Phosphatgepufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium (PBS ⁺) pH 7,2	140,0 mM 2,0 mM 1,5 mM 8,5 mM 0,5 mM 0,9 mM ad	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O MgCl ₂ x 6 H ₂ O CaCl ₂ x 2 H ₂ O Aqua bidest.
PBS/EDTA pH 7,2	140,0 mM 2,0 mM 1,5 mM 8,5 mM 0,5 mM ad	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O Natrium-EDTA-Salz Aqua bidest.
Trypsin/EDTA-Lösung	10 % (v/v) ad	0,5% Trypsin-EDTA (10x) Versen
Lösungen und Puffer für die Matrixherstellung		
PBS ⁻ aus Tabletten	Je 1 PBS-Tablette in 500 ml Aqua bidest. lösen	
Natriumdesoxycholatlösung	80 mM ad	Desoxycholsäure Natriumsalz Aqua bidest.
DNase-Lösung	650 U/ml 1 % (v/v) ad	DNase Gentamycin (10 mg/ml) PBS ⁺
Lösung für die Lebend-Tot-Färbung		
Fluoresceindiacetat- Propidiumiodid-Lösung	75 µM 10 µM ad	Propidiumiodid Fluoresceindiacetat REBM
Lösungen für den Albuminaufnahmetest		
BSA-FITC-Lösung	440 µM ad	BSA-FITC REBM
DAPI-Lösung	2,85 µM ad	DAPI (1 mg/ml in Methanol) PBS ⁺
Lösungen und Puffer für cytochemische und histochemische Färbungen		
Waschpuffer für Immun- und Lektinfärbungen (pH 7,5)	82,9 mM 19,4 mM 150,0 mM 3,1 mM 1 g/l ad	Trizma® hydrochloride Trizma® base NaCl CaCl ₂ BSA Aqua bidest.
Streptavidin-Peroxidase- Konjugat-Lösung	1 % (v/v) ad	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat Streptavidin-Peroxidase-Diluent

Lösungen und Puffer für cytochemische und histochemische Färbungen		
AEC-Chromogenlösung	1 Tropfen 20 % (v/v) ad	AEC-Chromogen aus AEC-Substrat Kit Substratpuffer aus AEC-Substrat Kit Vollentsalztes Wasser (VE-Wasser)
DAB-Chromogenlösung	2 % (v/v) ad	DAB-Chromogen aus DAB-Substrat Kit Substratpuffer aus DAB-Substrat Kit
Ölrot O-Lösung	7 mM ad	Ölrot O Isopropanol (60 %)
Alizarinrot S-Lösung	27 mM 1 % (v/v) ad	Alizarinrot S Ammoniak (25 %) Aqua bidest.
Eosinlösung	16 mM 0,05 % (v/v) ad	Eosin B Essigsäure (96 % p.a.) VE-Wasser
Differenzierungsalkohol	0,25 % (v/v) ad	HCl Ethanol (50 %)
Alcianblaulösung pH 1	7,7 mM ad	Alcianblau 8GX HCl (0,1 N)
Alcianblaulösung pH 2,5	7,7 mM ad	Alcianblau 8GX Essigsäure (3 %)
Kernechtrotlösung	2,8 mM 146 mM ad	Kernechtrot Aluminiumsulfat-18-hydrat VE-Wasser

2.5 Antikörper

Im Folgenden sind die verwendeten Antikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen und Demaskierungen aufgeführt.

Zielantigen	Spezies	Isotyp	Konzentration	Verdünnung	Demaskierung	Hersteller	Bestellnummer
Aquaporin 1	Maus	IgG2b	200 µg/ml	1:1000	Hitze, pH6	Abcam	ab9566
Aquaporin 2	Kaninchen	IgG	1 mg/ml	1:300	Hitze, pH9	Abcam	ab15081
CD31	Maus	IgG1	515 µg/ml	1:800	Hitze, pH9	Dako	M0823
E-Cadherin	Maus	IgG2a	250 µg/ml	1:300	Hitze, pH6	BD Biosciences	610181
Ki67	Maus	IgG1	80 µg/ml	1:150	Hitze, pH9	Dako	M7240
Kollagen Typ IV	Maus	IgG1	80 µg /ml	1:25	Hitze, pH6	Dako	M0785
N-Cadherin	Kaninchen	IgG	1 mg/ml	1:300	Hitze, pH9	Abcam	ab12221
Von-Willebrand-Faktor	Maus	IgG1	240 µg/ml	1:600	Hitze, pH6	Dako	M0616

2.6 Isotypkontrollen

Im Folgenden sind die verwendeten Isotypkontrollen aufgeführt.

Spezies	Isotyp	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
Maus	IgG1	100 µg/ml	Dako	X0931
Maus	IgG2a	100 µg/ml	Dako	X0943
Maus	IgG2b	100 µg/ml	Dako	X0944
Kaninchen	IgG	20 mg/ml	Dako	X0903

2.7 Lektine

Im Folgenden sind die verwendeten Lektine sowie die eingesetzten Verdünnungen aufgeführt.

Lektin	Spezifität	Konzentration	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
<i>Lotus tetragonobolus</i> Lektin, Biotin-Konjugat	L-Fucose	2 mg/ml	1:500	Biozol	B-1325
<i>Dolichos Biflorus</i> Agglutinin, Biotin-Konjugat	N-Acetylgalactosamin	2 mg/ml	1:500	Biozol	B-1035

2.8 Verbrauchsmaterial

Es wurden die im Folgenden aufgelisteten Verbrauchsmaterialien verwendet.

Material	Hersteller
Casy [®] -Becher	Roche Diagnostics (Mannheim)
Chirurgische Fäden Silkam [®] , USP 1	B. Braun (Melsungen)
Combitips [®] plus	Eppendorf (Hamburg)
Deckgläser	Carl Roth (Karlsruhe)
Einbettkassetten	Labonord (Templemars, F)
Einmalpipetten CELLSTAR [®]	Greiner (Frickenhausen)
Einweg-Dome für Transducer SP 844	HJK Sensoren + Systeme (Friedberg)
Eppendorf Safe-Lock Gefäße	Eppendorf (Hamburg)
Kryoröhrchen 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Lab-Tek [™] Chamber Slides [™] (Permanox) mit 4 und 8 Kammern	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Luftfilter Midisart [®] 2000, Porengröße 0,2 µm	Sartorius (Göttingen)
Multiwellplatten	Greiner (Frickenhausen)
Objektträger mit Mattrand	Labonord (Templemars, F)
Pasteurpipetten	Hirschmann (Eberstadt)
Pipettenspitzen EasyLoad [®]	Greiner (Frickenhausen)

Material	Hersteller
Polysine Adhäsions-Objektträger	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Pumpschläuche 2-Stopper PharMed BPT	IDEX Health & Science (Wertheim-Mondfeld)
Silikonschläuche Rotilabo®	Carl Roth (Karlsruhe)
Skalpellklingen BAYHA 22	C. Bruno Bayha (Tuttlingen)
Spritzen BD Plastipak™	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen Injekt® Solo	B. Braun (Melsungen)
Spritzenvorsatzfilter Whatman™ Puradisc™ FP 30, Porengröße 0,2 µm	Whatman (Dassel)
Sterican® Standardkanülen	B. Braun (Melsungen)
ThinCerts™ - 12-Well-Platten-Einsätze (Porengröße 1 µm)	Greiner (Frickenhausen)
Verbindungsdom mit Injektionsanschluss	Baxter (Lessines, B)
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Greiner (Frickenhausen)
Zellsiebe BD Falcon™, 100 µm Porenweite	BD Biosciences (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner (Frickenhausen)

2.9 Laborgeräte

Es kamen die im Folgenden aufgelisteten Geräte zur Anwendung.

Gerät	Hersteller oder Lieferant
Arterienklemme	Medicon (Tuttlingen)
Autoklav Federgari Autoclavi SPA	Teconomara (Abuzzano, I)
Autoklav GE 66	Getinge (Getinger, S)
Autoklav Typ 24	MELAG (Berlin)
Bechergläser	Schott (Mainz)
CO ₂ -Inkubator Heraeus® BBD6220	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Cryo-Lagerbehälter Biosafe MD mit Füllstandsregler Adur β	Cryotherm (Kirchen/Sieg)
Dampfgarer MultiGourmet	Braun (Kronberg)
Dichtungen für Schraubverbindungskappen (Silikon mit PTFE-Stulpe)	VWR (Darmstadt)
Drucksensor SP844	MEMSCAP (Skoppum, N)
Einbettautomat Shandon Citadell 1000	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Einfriercontainer „Mr. Frosty“	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Erlenmeyerkolben	Schott (Mainz)
Färberahmen	Labonord (Templemars, F)
Feuchtekkammer TG1-101	Tissue Ognostics
Folienschweißgerät MELAseal®101	MELAG (Berlin)
Gefäßklemmen Novaclips gerade 24 mm	FUMEDICA Medizintechnik (Reichshof)
Gefrierschrank G5216	Liebherr (Biberach an der Riss)
Glasglocke	Glasbläserei Zinsstag (Stuttgart)
Glasküvetten	Labonord (Templemars, F)
Glasreaktoren	Glasbläserei Zinsstag (Stuttgart)
Glasröhrchen	Glasbläserei Zinsstag (Stuttgart)
Heißluftsterilisator Heraeus® ST5050	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Heizplatte 13501	Snijders Scientific (Tilburg, NL)

Gerät	Hersteller oder Lieferant
Inversmikroskop Eclipse TS100 mit Kamera Digital Sight DS-2Mv	Nikon (Düsseldorf)
Inversmikroskop Nikon TMS	Nikon (Düsseldorf)
Kühlplatte Modell 2084	Bavimed (Birkenau)
Kühlschrank Profiline 230874	Liebherr (Biberach an der Riss)
Laborglasflaschen Duran	Schott (Mainz)
Laborglasflaschen mit Oliven	Glasbläserei Zinsstag (Stuttgart)
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 mit Axio Observer.Z1 und Beleuchtungseinrichtung HXP 120c	Zeiss (Göttingen)
Magnetrührer MR Hei-Tec	Heidolph Instruments (Schwabach)
Membran-Vakuumpumpe N811 KN.18	KNF Neuberger (Freiburg)
Messkolben	Hirschmann (Eberstadt)
Messpipetten	Hirschmann (Eberstadt)
Messzylinder	Brand (Wertheim)
Mikrocontroller C-Control II Station	Conrad Electronics (Hirschau)
Mikroskop Axiovert 200M mit Kamera AxioCam HRc	Zeiss (Göttingen)
Mikroskop Axiovert 200M mit Kamera AxioCam MRC5 und Fluoreszenzlampe X-Cite series 120	Zeiss (Göttingen) Lumen Dynamics Group (Mississauga, CDN)
Multipette Plus	Eppendorf (Hamburg)
Neubauerzählkammer	Brand (Wertheim)
Paraffinspender 47311	MEDAX (Neumünster)
Paraffinstreckbad 27601	MEDAX (Neumünster)
Petrischalen mit Glasboden	Greiner (Frickenhausen)
pH-Messgerät S20 - SevenEasy™	Mettler-Toledo (Giessen)
Pinzetten	Aesculap (Tuttlingen), Hammacher (Solingen)
PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences (Zizers, CH)
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenstopfgerät Technoplug	Teconomara (Abuzzano, I)
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments (Schwabach)
Pumpe MCP Standard mit Pumpenkopf CA 8 und Kassetten	IDEX Health & Science (Wertheim-Mondfeld)
Radox RX daytona Chemie-Analysator	Radox Laboratories (Wülfrath)
Reinstwasseranlage Super Q	Millipore (Schwalbach)
Rotationsmikrotom RM2145	Leica (Wetzlar)
Scheren	VeHu-Medical (Tuttlingen), Carl Roth (Karlsruhe)
Schlauchklemmen WILO 15 mm	Multimed Wicker (Kirchheim/Teck)
Schlauchverbinder (PP), Luer-Lock	Neolab (Heidelberg)
Schlauchverbinder aus TPX, Reduzierstück	Neolab (Heidelberg)
Schlauchverbinder aus TPX, Y-Form	Neolab (Heidelberg)
Schüttelwasserbad GFL-1083	GFL (Burgwedel)
Sicherheitsschlauchklemme KL 20	Achim Schulz-Lauterbach VMP (Iserlohn)
Skalpellhalter	C. Bruno Bayha (Tuttlingen)
Sterilwerkbank UVF 6.18S	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl-Genkingen)
Tiefkühlschrank HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
Trockenschrank T6 Heraeus® Function Line	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)

Gerät	Hersteller oder Lieferant
VACUBOY	INTEGRA Biosciences (Zizers, CH)
Vortexer VF2	Janke & Kunkel (Stauffen)
Waage Adventurer®	Ohaus (Nänikon, CH)
Waage Precisa 4000c	Precisa Gravimetrics (Dietikon, CH)
Wärmeschrank	Memmert (Schwabach)
Wärmetisch 13501	MEDAX (Neumünster)
Zellkronen aus Edelstahl	Fraunhofer IGB (Stuttgart)
Zellzählgerät Casy®-1	Schärfe-System (Reutlingen)
Zentrifuge 5810R mit Rotor A-4-62	Eppendorf (Hamburg)

3 Methoden

3.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

3.1.1 Arbeit mit Zellkulturen

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilwerkbank mit laminarer Luftströmung, um die Kulturen vor Kontaminationen mit Mikroorganismen zu schützen. Für die Zellkultur verwendete Materialien lagen entweder bereits steril vor oder wurden sterilisiert. Die Sterilisationsmethoden umfassten in Abhängigkeit von der Materialbeschaffenheit die Sterilfiltration, die Hitzesterilisation, das Autoklavieren sowie die Gammabestrahlung.

Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellkulturen wurden drei bis fünf Mal wöchentlich im Inversmikroskop auf ihre Morphologie, Kontaminationen mit Mikroorganismen oder anderen Zelltypen sowie ihre Zelldichte überprüft.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte bei der routinemäßigen Passage der Zellkulturen mit dem elektronischen Zellzählgerät CASY[®]-1. Dafür waren 100 µl aus der zu zählenden Zellsuspension zu entnehmen, mit 10 ml CASY[®]-ton, einer isotonen Elektrolytlösung, in einem CASY[®]-Becher zu verdünnen und im CASY[®]-1 zu vermessen. Bei der Messung mit dem CASY[®]-1 werden dreimal je 400 µl der Suspension durch eine Kapillare mit definiertem Durchmesser gesaugt, an der eine elektrische Spannung angelegt ist. Beim Durchtreten einer Zelle mit intakter Zellmembran erhöht sich der elektrische Widerstand und es entsteht ein elektrischer Impuls. Über Anzahl und Stärke der Impulse wird die Anzahl der gemessenen Partikel sowie deren Größenverteilung analysiert und ausgegeben. In der Software lässt sich ein Größenbereich auswählen und der Faktor der Verdünnung mit dem CASYton[®] eingeben. Es wird anschließend angezeigt, wie viel Zellen sich pro Milliliter in der Ausgangszellsuspension befanden.

Bei der Primärzellisolation wurde die Zellzahl der erhaltenen Zellsuspension manuell mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zählkammer verfügt über ein Liniennetz aus neun Großquadraten mit jeweils 1 mm Kantenlänge und somit einer Fläche von 1 mm². Seitlich der Zählfläche befinden sich um 0,1 mm erhöhte Trägerstege, auf die ein

Deckgläschen aufgebracht wird. Somit entsteht ein Zwischenraum mit einem definierten Volumen von 0,1 mm³ pro Großquadrat.

Für die Zellzahlbestimmung wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau versetzt. Trypanblau färbt tote Zellen blau, sodass sie sich von lebenden Zellen mikroskopisch unterscheiden lassen. Daher konnte neben der Zellzahl auch die Vitalität bestimmt werden. Es erfolgte das Befüllen des Zwischenraums zwischen Zählkammer und Deckgläschen mit der Suspension. Am Mikroskop ließen sich die Zellen in den vier Eckquadraten der Neubauer-Zählkammer anschließend auszählen. Die Anzahl vitaler Zellen pro Milliliter ergab sich durch die Formel

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{in 4 Großquadraten gezählte vitale Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000,$$

wobei sich der Verdünnungsfaktor auf die Verdünnung der Zellsuspension mit der Trypanblaulösung bezieht und 10.000 dem Faktor zwischen dem Volumen eines Großquadrates (= 0,1 µl) und einem Milliliter entspricht.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Die HK-2-, hKDC-, und MSC-Zellen standen zunächst kryokonserviert zur Verfügung. Das Auftauen der Kryoröhrchen mit der enthaltenen Zellsuspension erfolgte im 37°C-warmen Wasserbad. Die Zellsuspension wurde anschließend zügig mit vorgewärmtem zellspezifischem Medium in einem Zentrifugenröhrchen 1:10 verdünnt. Die Zellzahl ließ sich am Zellzählgerät CASY[®]-1 bestimmen. Die Zellsuspension wurde bei 200 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand ließ sich anschließend absaugen und das Zellpellet in zellspezifischem Medium aufnehmen sowie in Zellkulturflaschen aussäen. Die Zellen wurden im CO₂-Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel, um die beim Auftauprozess ggf. abgestorbenen Zellen zu entfernen.

3.1.4 Passagieren der Zellkulturen

Bei einer Besiedlung von 80-90 % der Kulturfläche in den Zellkulturflaschen wurden die Zellen abgelöst und in neuen Flaschen weiterexpandiert oder für die jeweiligen Versuche verwendet. Dafür erfolgte zunächst das Absaugen des Mediums sowie einmaliges Waschen mit vorgewärmtem PBS⁻/EDTA. Anschließend ließen sich die Zellen durch eine 3-6-minütige

Inkubation mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA bei 37°C bei den hKDCs, MSCs, Fibroblasten und Endothelzellen bzw. Raumtemperatur (RT) bei den HK-2-Zellen ablösen. Die Trypsinvolumina betragen 3 ml in einer Flasche mit 25 cm² Kulturfläche („T25“), 5 ml in einer Flasche mit 75 cm² Kulturfläche („T75“) und 10 ml in einer Flasche mit 175 cm² („T175“). Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Es folgte die Zugabe von 0,3/0,5/1,0 ml (T25/T75/T175) FCS bei den MSCs, Fibroblasten und Endothelzellen bzw. von 3/5/10 ml (T25/T75/T175) Zellkulturmedium bei den HK-2-Zellen und den hKDCs, um die enzymatische Reaktion zu hemmen. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 200 xg zentrifugiert. Zuvor erfolgte noch die Abnahme von 100 µl für die Zellzählung am Zellzählgerät. Das Zellpellet ließ sich in Medium aufnehmen und in neue Zellkulturflaschen oder auf die Versuchssubstrate aussäen. Ein Medienwechsel erfolgte zwei bis drei Mal wöchentlich.

Die Medienvolumina für die Kultivierung in den Zellkulturflaschen betragen für die hKDCs, MSCs, Fibroblasten und Endothelzellen je 5 ml in einer T25, 10 ml in einer T75 und 20 ml in einer T175. Für die HK-2-Zellen wurde aufgrund der starken Stoffwechselaktivität jeweils das doppelte Medienvolumen verwendet.

3.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Für die spätere Verwendung der hKDCs und HK-2-Zellen in geringen Passagezahlen wurden die Zellen zunächst in Zellkulturflaschen expandiert und anschließend für die Langzeitlagerung im Stickstofftank vorbereitet. Dazu erfolgten das Ablösen der Zellen aus den Zellkulturflaschen (siehe 3.1.4) und die Zellzahlbestimmung am Zellzählgerät. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension ließ sich das Zellpellet in REGM resuspendieren. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 900 µl (hKDCs) bzw. 925 µl (HK-2-Zellen) REGM in ein Kryoröhrchen vorgelegt und anschließend mit Dimethylsulfoxid (DMSO) auf jeweils 1 ml aufgefüllt. DMSO ist ein Kryoprotektivum, das die Beschädigung der Zellen durch Eiskristallbildung verhindern soll. Es ist jedoch bei Raumtemperatur zelltoxisch, weshalb die Kryoröhrchen mit der Zellsuspension nach Zugabe des DMSOs sofort gekühlt werden müssen. Dazu erfolgte die Überführung in einen -80°C-Gefrierschrank im Einfriercontainer „Mr. Frosty“. Er ermöglicht die schonende Herunterkühlung um 1°C pro Minute. Am nächsten Tag konnten die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in einen Kryo-Lagerbehälter überführt werden. Dort ließen sie sich in der Gasphase von flüssigem Stickstoff auf unter -130°C herunterkühlen.

3.2 Zellgewinnung und spezielle Zellkultur

3.2.1 Human Kidney-derived Cells (hKDCs)

Die hKDCs wurden vom Projektpartner ATRM isoliert und kryokonserviert zur Verfügung gestellt. Das Auftauen der Zellen (Passage 3 bis 4) erfolgte wie in 3.1.3 beschrieben. Die Aussaatdichte betrug dabei 7.000 bis 10.000 Zellen/cm². Die Zellen wurden in *Renal Epithelial Growth Medium* (REGM) kultiviert, wobei zwei bis drei Mal wöchentlich ein Medienwechsel erfolgte. In den Passagen 4 bis 5 konnten die Zellen für die jeweiligen Versuche oder zur Kryokonservierung verwendet werden.

3.2.2 HK-2-Zelllinie

Die HK-2-Zellen wurden wie in 3.1.3 beschrieben aufgetaut und in einer Dichte von 13.000 bis 20.000 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in REGM, wobei dreimal wöchentlich ein Medienwechsel durchzuführen war. Bei dem Passagieren der Zellen wurden 10.000 bis 13.000 Zellen/cm² zur weiteren Expansion in Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.3 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

Für die Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen wurde adultes humanes Hautgewebe aus ästhetisch-plastischen Operationen verwendet. Die Aufarbeitung des Gewebes erfolgte am Tag der Operation oder spätestens am darauffolgenden Tag.

Im ersten Schritt ließ sich Fettgewebe der Haut mechanisch mittels Skalpell entfernen. Es folgte zweimaliges Waschen des verbliebenen Gewebes mit PBS⁺. Anschließend wurde es in ca. 1 mm breite und 5-8 mm lange Streifen geschnitten und 17-20 h bei 4°C in Dispase-Lösung inkubiert. Nach der Inkubationszeit konnten die Stückchen in PBS⁺ überführt und die Dermis von der Epidermis mit Pinzetten getrennt werden. Anschließend erfolgte eine 40-minütige Inkubation der Dermis in Trypsin/EDTA bei 37°C. Nach Ende der Inkubationszeit ließ sich das Trypsin mit 10 % FCS inaktivieren und die Dermisstückchen in vorgewärmtes ECGMmv überführen. Anschließend konnten die Zellen mit einem Skalpell unter leichtem Druck aus den Dermisstückchen ausgestrichen werden. Die Dermisstückchen wurden im

Anschluss verworfen oder für die Isolation von Fibroblasten weiterverwendet. Um Gewebe-Geweberückstände abzutrennen, war die entstandene Zellsuspension über ein Zellsieb der Porenweite 100 μm zu filtrieren. Das Filtrat wurde bei 200 xg für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in ECGMmv mit 1 % Gentamycin und die Aussaat von ca. 50.000 Zellen/ cm^2 in Zellkulturflaschen. An den darauffolgenden ein bis zwei Tagen wurde die Kultur jeweils ein- bis zweimal für 15 min mit Versen bei 37°C inkubiert, um kontaminierende Fibroblasten selektiv zu entfernen. Zeigten sich im Verlauf der Kultivierung noch Fibroblasten, war eine erneute Versenbehandlung nötig.

Bei der Passage der mikrovaskulären Endothelzellen zur weiteren Expansion wurden 2.500 bis 4.000 Zellen/ cm^2 in Zellkulturflaschen ausgesät. Ein Medienwechsel erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche. Zellen der Passagen 2 bis 4 wurden für die Versuche verwendet.

3.2.4 Humane dermale Fibroblasten

Aus der Dermis der adulten Haut ließen sich im Anschluss an die Endothelzellisolation humane dermale Fibroblasten gewinnen. Dazu wurden die Dermisstückchen in einer Petrischale mit einem Skalpell zerhackt und zusammen mit 5 ml Kollagenase-Lösung in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte einmaliges Spülen der Petrischale mit weiteren 5 ml Kollagenase-Lösung, die ebenfalls ins Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Die Suspension war für 45 min bei 37°C zu inkubieren. Anschließend ließ sich nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 200 xg der Überstand abnehmen. Das Pellet wurde einmal mit DMEM gewaschen und erneut bei 200 xg für 5 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands erfolgte die Resuspension des Pellets in 2 ml DMEM. Die Suspension wurde auf drei Zentrifugenröhrchen zu gleichen Teilen aufgeteilt und erneut zentrifugiert. Da die Fibroblasten für die Differenzierungsversuche benötigt wurden, erfolgte deren Aussaat zusätzlich in verschiedenen Stammzellmedien. Je ein Pellet war in 1 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % Gentamycin bzw. Stammzellmedium 1 und 2 zu resuspendieren und jeweils in eine T25 auszusäen. Am darauffolgenden Tag wurden jeweils 4 ml zusätzliches Medium hinzugegeben. Anschließend erfolgte zweimal wöchentlich ein Medienwechsel. Bei der Passage der Zellen in neue Zellkulturflaschen waren 1.500-2.000 Zellen/ cm^2 auszusäen. In den Passagen 2 bis 3 wurden die humanen Fibroblasten für die Differenzierungsversuche verwendet.

3.2.5 Humane mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) weisen ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential auf. Sie lassen sich *in vitro* u.a. adipogen, osteogen und chondrogen differenzieren, weshalb sie als Positivkontrolle für die Differenzierungsversuche verwendet wurden.

Kryokonservierte MSCs aus humanem Knochenmark wurden vom Lehrstuhl für Tissue Engineering & Regenerative Medizin der Universität Würzburg in Passage 1 zur Verfügung gestellt. Nach dem Auftauen der Zellen (siehe 3.1.3) erfolgte deren Aussaat mit einer Zelldichte von 2.000 bis 2.500 Zellen/cm² jeweils in Stammzellmedium (SZM) 1 und 2. Ein Medienwechsel erfolgte zwei- bis dreimal wöchentlich. Die Zellen wurden in Passage 2 für die Differenzierungsversuche verwendet.

3.3 Differenzierungsversuche

Zur Untersuchung der adipogenen, osteogenen sowie chondrogenen Differenzierbarkeit der hKDCs wurden Differenzierungsversuche durchgeführt, bei denen die Induktion der Differenzierung über bestimmte Medienzusätze erfolgen sollte. Als Positivkontrolle für die Differenzierungen ließen sich humane mesenchymale Stammzellen in Passage 2 (siehe 3.2.5) und als Negativkontrolle humane dermale Fibroblasten in Passage 2 (siehe 3.2.4) verwenden. Die hKDCs wurden in Passage 5 für die Differenzierungsversuche ausgesät. Alle Ausgangszellen wurden nach dem Auftauen bzw. der Isolation direkt in SZM 1 für die adipogene sowie SZM 2 für die osteogene und chondrogene Differenzierung in Zellkulturflaschen expandiert.

3.3.1 Adipogene Differenzierung

Die Untersuchung der adipogenen Differenzierbarkeit erfolgte in Kammerobjektträgern (Chamber Slides™) mit vier Kammern. Dafür waren 100.000 Zellen in 1 ml Medium pro Kammer auszusäen. Die Zellen wurden zunächst weiter mit SZM 1 kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz erfolgte ein Wechsel auf das adipogene Differenzierungsmedium. Die Zellen wurden für zwei Wochen im Differenzierungsmedium weiterkultiviert. Ein Medienwechsel

erfolgte dreimal wöchentlich. Anschließend ließ sich die adipogene Differenzierung über eine Ölrot-O-Färbung (siehe 3.12.3) nachweisen.

3.3.2 Osteogene Differenzierung

Die Induktion der osteogenen Differenzierung erfolgte ebenfalls in Chamber Slides™ mit vier Kammern. Es waren 100.000 Zellen in 1 ml Medium pro Kammer auszusäen. Die Zellen wurden zunächst weiter mit SZM 2 kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz erfolgte ein Wechsel auf das osteogene Differenzierungsmedium. Die Zellen wurden für vier Wochen im osteogenen Differenzierungsmedium weiterkultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Anschließend ließ sich die osteogene Differenzierung über eine Alizarinrot-S-Färbung (siehe 3.12.4) nachweisen.

3.3.3 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden je 250.000 Zellen in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 290 xg zentrifugiert. Der Überstand war vorsichtig abzunehmen und die Pellets mit je 1 ml Differenzierungsmedium mit TGF- β zu überschichten. Es folgte die Kultivierung der Pelletkulturen für vier Wochen im Differenzierungsmedium, das zweimal wöchentlich ausgetauscht wurde. Anschließend konnten die Pellets mit phosphatgepufferter, 4 %iger Formaldehydlösung (Roti®-Histofix 4 %) fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten werden. Die chondrogene Differenzierung ließ sich über eine Alcianblau (pH 1)-Färbung (3.13.1) der Paraffinschnitte nachweisen.

3.4 Charakterisierung der Endothelzellen über die Aufnahme von acLDL

Die Aufnahme von acetyliertem *Low Density Lipoprotein* (acLDL) ist eine charakteristische Funktion von Endothelzellen und wurde aufgrund dessen als Identitäts- und Funktionsmarker für die verwendeten Endothelzellen eingesetzt.

Für den Test erfolgte zunächst die Aussaat der Endothelzellen in Chamber Slides™ mit je acht Kammern. In jede Kammer wurden je 20.000 Zellen in 400 μ l ECGMmv ausgesät und bei 37°C / 5 % CO₂ kultiviert. Bei Besiedlung von 40 bis 70 % der Kulturfläche erfolgte der

acLDL-Aufnahmetest. Dafür wurde 1 ml ECGMmv mit 1 µl fluoreszenzmarkiertem acLDL (acLDL-Alexa Fluor[®] 488) versetzt. Es folgte der Austausch des verbrauchten Mediums aus den Kammern gegen je 400 µl des acLDL-Alexa Fluor[®] 488-enthaltenden Mediums. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C/ 5 % CO₂ konnte das Medium abgesaugt und die Zellen für 5 min bei 4°C mit gekühlter Fixierlösung aus gleichen Volumina Ethanol (70 %) und Aceton fixiert werden. Nach dem Absaugen und Abdampfen der Fixierlösung erfolgte das Eindecken der Objektträger. Dafür wurde ein Eindeckmittel mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet (ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI). DAPI fluoresziert bei Interkalation in die DNA und eignet sich somit für die Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne. Die Auswertung des Tests erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.5 Herstellung der Matrices

3.5.1 Small intestinal submucosa (SIS)

Die SIS ist eine natürliche Matrix, die sich aus porcinem Dünndarm gewinnen lässt, indem die Mucosa sowie alle sonstigen Zellen herausgelöst werden. Zurück bleibt die extrazelluläre Matrix, die z.B. Bindegewebsfasern und Wachstumsfaktoren enthält. Die SIS kann aufgrund ihrer biokompatiblen Eigenschaften sowohl klinisch als auch für In-vitro-Anwendungen eingesetzt werden (siehe 1.4.3).

Zur Herstellung der SIS wurden Jejunalsegmente aus deutschen Landrasseschweinen zwischen 10 und 15 kg verwendet. Die Explantation erfolgte in der Experimentellen Medizin der Universität Tübingen. Die Darmsegmente wurden in einem verschlossenen Behälter in gekühlter PBS⁻-Lösung mit 1 % Gentamycin zum Labor transportiert.

Zu Beginn der SIS-Präparation erfolgten das Entfernen des Mesenteriums sowie das Zurechtschneiden des Darms in ca. 40 - 50 cm lange Darmstücke, wobei Segmente mit Peyerschen Plaques verworfen wurden. Es folgte das gründliche Spülen der Darmstücke unter fließendem Leitungswasser, um Faecesreste und Bakterien zu entfernen. Die weitere Durchführung konnte optional am nächsten Tag erfolgen. Die Darmstücke wurden in diesem Fall über Nacht in PBS⁻ mit 1 % Gentamycin bei 4°C auf einem Wippschüttler gelagert.

Die Mucosa der Darmsegmente ließ sich mechanisch entfernen, indem die Innenseite des Darms nach außen gekehrt, die Darmsegmente auf eine 10 ml-Spritze gezogen und die Mucosa mit dem Griffende einer Pinzette abgeschabt wurde. Für die anschließende chemische Azellularisierung zur Entfernung aller Zellen aus den verbleibenden

Darmschichten ließen sich die Darmsegmente an einem Ende mit Gefäßklemmen oder chirurgischen Fäden verschließen, mittels 50 ml-Spritze mit Natriumdesoxycholatlösung füllen und am anderen Ende ebenfalls verschließen. Die gefüllten Darmsegmente inkubierten in einem Erlenmeyerkolben mit Natriumdesoxycholatlösung für 1 h auf einem Wippschüttler bei 4°C. Anschließend erfolgten das Öffnen der Darmsegmente an einem Ende, das Entfernen der Lösung sowie das Ausdrücken der Darmsegmente, um auf- und abgelöste Gewebereste zu entfernen. Darauf folgten das Füllen der Darmsegmente mit PBS⁻-Puffer und eine erneute Inkubation für 1 h auf einem Wippschüttler bei 4°C. Für weitere Spülschritte waren die Darmsegmente an beiden Enden aufzuschneiden. Die Darmsegmente wurden mindestens vier- bis fünfmal in je ca. 1,5 l frisches PBS⁻ mit 1 % Gentamycin umgesetzt und jeweils bei 4°C auf dem Wippschüttler inkubiert. Bis zur Gammasterilisierung erfolgte zwei- bis dreimal täglich ein Austausch des Spülpuffers. Anschließend wurde der Darm in 8 bis 10 cm lange Stücke geschnitten und in eine Glasflasche mit PBS⁻ ohne Antibiotikum überführt. Ein 1 bis 2 cm langes Stück zur späteren histologischen Analyse war in ein separates Gefäß zu überführen. Die Matrices wurden gekühlt zur Bestrahlung zur BBF Sterilisationservice GmbH (Rommelshausen) transportiert. Dort erfolgte die Bestrahlung der Matrices mit einer Gesamtdosis von 25 Kilogray. Die sterile SIS ließ sich anschließend in frischen, sterilen PBS⁺-Puffer umsetzen und bei 4°C lagern. Die histologische Probe wurde fixiert, um anschließend Paraffinschnitte herstellen zu können (siehe 3.13.1). Die Azellularisierung ließ sich durch eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Schnitte (siehe 3.13.2) überprüfen.

3.5.2 Biological Vascularized Scaffold (BioVaSc)

Am Fraunhofer IGB wurde in der Abteilung Zellsysteme ein komplexes Kultursystem zur Co-Kultur von Endothelzellen und einem zweiten Zelltyp entwickelt. Dabei diente die BioVaSc, eine azellularisierte, vaskularisierte Matrix aus porcinem Jejunum, als Trägerstruktur (siehe 1.4.3). Deren Herstellung ist im Folgenden beschrieben.

Zur Explantation des porcinen Jejunums lassen sich deutsche Landrasseschweine zwischen 10 und 15 kg verwenden. Die Explantation der Darmsegmente mit der Präparation des arteriellen und venösen Anschlusses erfolgte in der Experimentellen Medizin der Universität Tübingen. Die Schweine wurden dort vor der Explantation der BioVaScs heparinisiert und durch eine Überdosis Narkotika getötet. Es ließen sich pro Schwein drei bis fünf ca. 20 cm lange Jejunumsegmente mit erhaltenem Gefäßsystem, arteriellem Zufluss und venösem Rückfluss explantieren. Der Transport der BioVaScs zum Labor erfolgte in gekühlter PBS⁻

Lösung mit 1 % Gentamycin. Das Gefäßsystem und das Lumen der BioVaScs wurden gründlich mit PBS⁻ gespült, um Faecesreste und andere Verunreinigungen zu entfernen. Weiterhin ließen sich beim Spülen der venöse Rückfluss sowie die Dichtigkeit des Gefäßsystems überprüfen. Undichte Gefäße waren, falls möglich, abzubinden. Bei einigen Versuchen wurde die Mucosa der BioVaSc abgeschabt. Dafür erfolgte zunächst das Umstülpen des Darmrohrs. Dabei war darauf zu achten, die Gefäße nicht zu verletzen, ggf. wurde die Matrix von beiden Seitenöffnungen jeweils zur Hälfte umgestülpt. Anschließend ließ sich die Matrix über eine Spritze ziehen und die Mucosa mit dem Griffende einer Pinzette abschaben.

Über Nacht wurden die BioVaScs in PBS⁻ mit 1 % Gentamycin auf einem Wippschüttler bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der BioVaScs in einen Bioreaktor (siehe Abbildung 3-1). Die Lumenenden waren für die Lumenperfusion auf seitlich angebrachte Glasröhrchen mittels Kabelbinder zu befestigen. Der arterielle Zugang der BioVaSc wurde an die Glasröhrchen für die Gefäßperfusion aufgesteckt. Anschließend konnte die Azellularisierung der Matrix über die beiden Perfusionswege erfolgen. Das Gefäßsystem der BioVaSc ließ sich über den arteriellen Zufluss mit 500 ml Natriumdesoxycholatlösung, einem anionischen Tensid, perfundieren. Diese Perfusion erfolgte unter einem konstanten Druck von 80 mmHg. Der Druck wurde mit Hilfe eines Drucksensors gemessen und manuell über Anpassung der Pumpleistung reguliert. Die Lumenperfusion erfolgte mit 200 ml Natriumdesoxycholatlösung, die im Kreislauf ohne Druckregulation gepumpt wurden. Der Zelldebris und die Natriumdesoxycholatlösung ließen sich über eine anschließende Perfusion des Gefäßsystems mit 1 l PBS⁻ und des Lumens mit 200 ml PBS⁻ herauswaschen. Die Perfusionslösung des Lumens war ggf. auszutauschen, wenn sich Gewebeschotter darin angesammelt hatte.

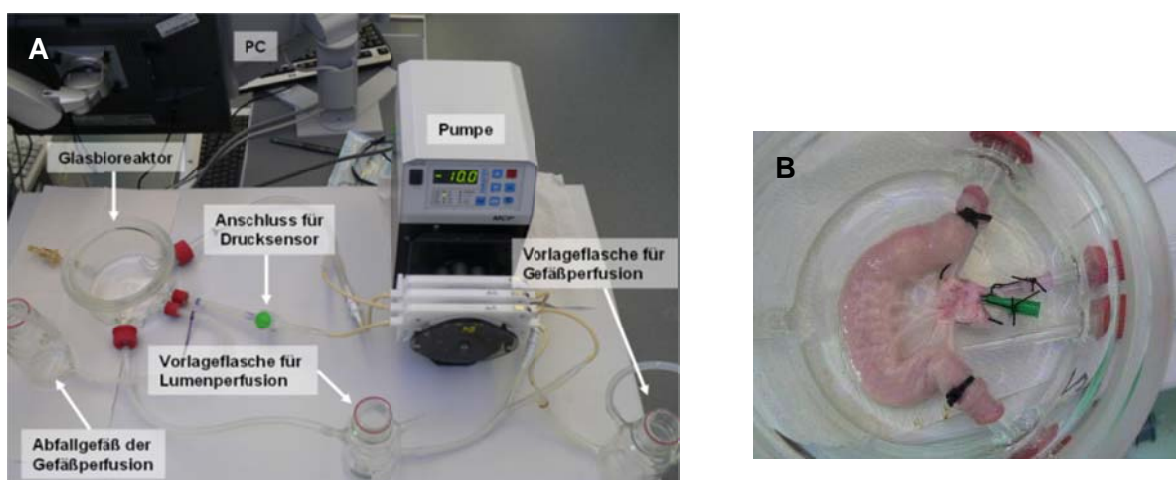


Abbildung 3-1: (A) Aufbau des pumpengesteuertes Bioreaktorsystem zur Azellularisierung und (B) BioVaSc im Glasreaktor

Zur Entfernung von DNA-Resten aus der Matrix wurden die BioVaScs in je 150 ml DNase-Lösung über Nacht auf einem Wippschüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgten mindestens vier je 2,5-stündige Waschschriffe in 250 ml PBS⁻ auf einem Wippschüttler bei 4°C. Vor der Sterilisation wurden die Enden der BioVaSc gekürzt und dabei ggf. betroffene Gefäßäste abgebunden. Ein Teil des abgetrennten Gewebes war für die spätere histologische Analyse in ein separates Gefäß zu überführen. Die BioVaScs und die Proben für die histologische Analyse wurden in PBS⁺ gekühlt zur BBF Sterilisationservice GmbH (Rommelshausen) transportiert und dort über Nacht durch eine Gammabestrahlung mit 25 Kilogray sterilisiert. Abschließend erfolgten der Rücktransport der Matrices sowie deren Überführung in frisches, steriles PBS⁺. Die BioVaScs konnten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden. Die Azellularisierung ließ sich mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf Paraffinschnitten der azellularisierten Matrices überprüfen (siehe 3.13.2).

3.6 Aufbau der Kulturmodelle

3.6.1 Statische Kulturen

3.6.1.1 *Multiwellplatten*

Die Zellkultur in Multiwellplatten ist sehr einfach durchzuführen und erlaubt zahlreiche parallele Ansätze, weshalb sie für viele Experimente die Methode der Wahl ist. Für die Aussaat der hKDCs in die Multiwellplatten erfolgte zunächst die Passage wie in 3.1.4 beschrieben. Anschließend ließen sich 1.300 bis 5.300 Zellen/cm² in je 1 ml REGM pro Well aussäen. Die Kulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ für bis zu 21 Tage inkubiert. Ein kompletter Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

3.6.1.2 *Multiwellplatten-Inserts*

Multiwellplatten-Inserts können in konventionelle Multiwellplatten eingehängt werden. Sie erlauben eine Kompartimentierung in ein apikales und ein basales Kompartiment, zwischen denen Transportvorgänge untersucht werden können. Eine planare synthetische Membran bildet dabei die Kulturfläche für die Zellen.

In dieser Arbeit kamen Inserts mit einer Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) mit definierten Poren von 1 µm Durchmesser sowie einer Umgrenzung aus Polystyrol zur

Anwendung. 12-Well-Inserts wurden in entsprechende Platten überführt und deren Membranen mit jeweils 200 µl Kollagen Typ I (100 µg/ml in 0,1 % Essigsäure) beschichtet. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte das Absaugen der Beschichtungslösung. Anschließend wurden die Platten mindestens 20 min offen unter der Sterilbank stengelassen, damit die restliche Essigsäure verdampfen konnte.

Zur Aussaat der hKDCs erfolgte zunächst die Passage wie in 3.1.4 beschrieben. Anschließend ließen sich 6.500 Zellen/cm² in je 500 µl REGM pro Well in die Inserts aussäen und 1,5 ml Medium außerhalb der Inserts in jedes Well hinzufügen. Die Kulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ für bis zu 21 Tage inkubiert. Ein kompletter Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

3.6.1.3 Kollagenhydrogele

In Kollagenhydrogelen können renale Tubulusepithelzellen in vitro polarisierte zystäre und tubuläre Strukturen mit epithelalem Phänotyp bilden. Daher wurde dieses Kultursubstrat verwendet, um das Potential der hKDCs zur Bildung tubulärer Strukturen zu überprüfen.

Die hKDCs wurden zwischen zwei Kollagenhydrogelschichten in 24-Well-Platten kultiviert. Dafür erfolgte zunächst das Vermischen gleicher Volumina von eisgekühlter Gelneutralisationslösung und Kollagen-Typ-I-Lösung (6 mg/ml in 0,1 % Essigsäure). Von dieser Gellösung wurden 500 µl pro Well als Basisgel vorgelegt. Die Lösung gelierte während einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Anschließend waren die Gele mit je 1 ml Medium zu überschichten, um ein Austrocknen zu verhindern. Bei der Aussaat der hKDCs wurde das Medium von den Gelen entfernt. Anschließend ließen sich 5.000 bis 25.000 Zellen/cm² in 1 ml REGM pro Well auf die Gele aussäen. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und 300 µl Gellösung (s.o.) als Deckgel auf die Zellen gegeben. Die Gellösung gelierte während einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Abschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml REGM pro Well. Die Kulturen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ für bis zu 21 Tage inkubiert. Ein kompletter Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

3.6.1.4 Small intestinal submucosa (SIS)

Zur Verwendung der SIS als Kulturmatrix wurde sie zunächst lateral aufgeschnitten und aufgeklappt. Nach dem weiteren Zurechtschneiden erfolgte das Einspannen der SIS zwischen zwei Metallringe, sog. Zellkronen (Schema siehe Abbildung 3-2). Dabei war die Submucosa-Seite nach oben gerichtet. Anschließend konnten die Zellkronen mit der SIS in 12-Well-Platten überführt und mit je 1,5 ml Medium für mindestens 2 h vorinkubiert werden. Darauf folgten das Absaugen des Mediums und die Aussaat von 6.500 bis 33.000 Zellen/cm² in 1,5 ml REGM pro Well auf die SIS. Die Kulturen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ für bis zu 21 Tage inkubiert. Ein kompletter Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

Aufgrund der hohen Stoffwechselaktivität der HK-2-Zellen wurden für deren Kultur auf der SIS die Zellkronen in 6-Well-Platten überführt und die Zellen mit 5 ml REGM pro Well kultiviert.

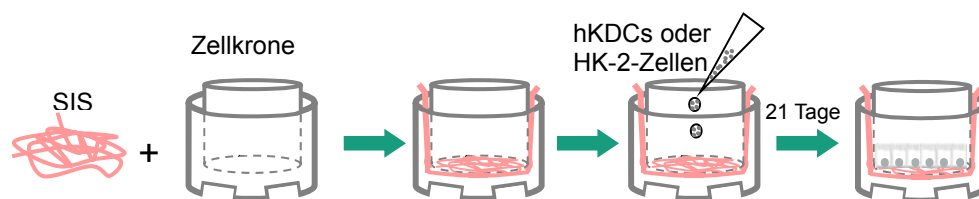


Abbildung 3-2: Vorgehensweise zur Kultivierung von hKDCs bzw. HK-2-Zellen auf der SIS

Weiterhin wurde die Co-Kultur mit Endothelzellen in die Versuche mit einbezogen, um einen Teil der physiologischen Gegebenheiten widerzuspiegeln und den Einfluss der Endothelzellen auf die hKDCs zu untersuchen. Das peritubuläre Kapillarnetzwerk und der proximale Tubulus interagieren sehr stark miteinander. In vitro ließ sich bereits zeigen, dass die Co-Kultur mit Endothelzellen die Genexpression proximaler Tubuluszellen beeinflusst [Aydin *et al.*, 2008].

Für den Aufbau der Co-Kulturen von hKDCs mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMECs) (siehe Schema Abbildung 3-3) war bei der SIS zusätzlich die Serosa abzuziehen, da die Serosaseite bei der Co-Kultur als Kulturfläche für die Endothelzellen dient, die Zellen jedoch nicht auf der Serosa adhären können. Für die Besiedlung mit den HDMECs wurden die SIS-Ringe zunächst in 6-Well-Platten auf ihre Oberseite gestellt und auf die SIS-Unterseite je 5×10^5 Zellen in 50 μ l ECGMmv pro Well ausgesät. In Abständen von ca. 15-30 min erfolgte das Beträufeln der besiedelten Matrix mit

je 100 μ l Medium, ggf. vom durchgeflossenen Medium, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach mindestens 3 h zum Adhären der Endothelzellen wurden die SIS-Ringe wieder umgedreht, in 12-Well-Platten überführt und 1,5 ml Medium pro Well hinzugegeben. Nach der 7-tägigen Vorkultivierung der HDMECs in ECGMmv erfolgten die Aussaat der hKDCs auf die Oberseite der SIS und ein Wechsel auf ein Medium aus gleichen Anteilen REGM und ECGMmv. Die Co-Kulturen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ für bis zu 21 Tage weiterkultiviert. Ein kompletter Medienwechsel mit REGM/ECGMmv erfolgte dreimal wöchentlich.

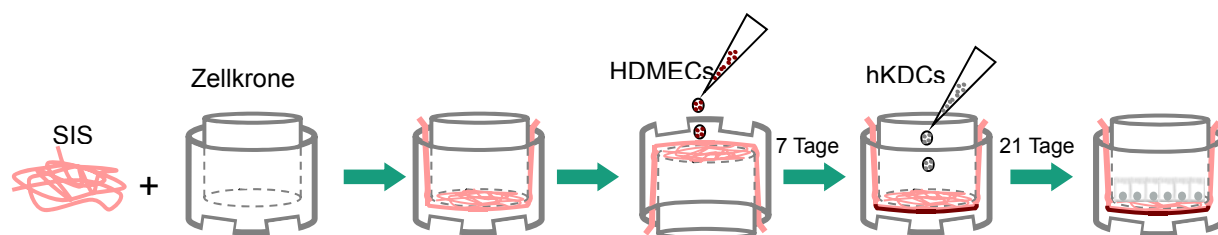


Abbildung 3-3: Vorgehensweise zur Co-Kultivierung von HDMECs und hKDCs auf der SIS

3.6.2 Dynamische BioVaSc-Kultur

In den Gefäßsystemstrukturen der BioVaSc lassen sich Endothelzellen kultivieren, während die Kollagenstrukturen der ehemaligen Darmwand als Kulturfläche für die hKDCs dienen können. Das Bioreaktorsystem (Abbildung 3-4) für die Kultivierung der besiedelten BioVaSc weist u.a. ein Reaktorgefäß mit je einem Anschluss für den Medienzufuhr und den -abfluss auf. Der Arterienstecker der BioVaSc wird an das Glasröhrchen für den Medienzufuhr angeschlossen. Über eine Pumpe lässt sich Medium aus einer Druckflasche in die Arterie der BioVaSc pumpen und darüber das Gefäßsystem mit Medium versorgen. Der Druck des Medienflusses entspricht einem physiologischen Blutdruck von 120 zu 80 mmHg. Es werden über ein Computerprogramm die entsprechenden Druckkurven vorgegeben. Diesen Kurven folgend, steuert ein Mikrocontroller eine Pumpe an, die Medium durch das Gefäßsystem der Matrix im Bioreaktor pumpt. Dabei erhält der Mikrocontroller über einen Drucksensor vor dem arteriellen Anschluss der Matrix Informationen über den Druck im System, die er mit der vorgegebenen Kurve abgleicht. Dementsprechend reguliert er die Pumpe. Über den Medienabfluss gelangt Medium zurück in die Medienflasche und wird anschließend wieder in die Druckflasche gepumpt. Am Schlauch für den Medienabfluss kann weiterhin ein Verbindungsdom mit Injektionsanschluss für Probenahmen eingebaut werden (nicht

abgebildet). Die Versorgung mit Sauerstoff lässt sich über einen an der Medienflasche angebrachten Luftfilter gewährleisten, durch den die Außenluft sterilfiltriert in den Bioreaktor gelangt. Die Kultivierung der BioVaSc im Bioreaktor erfolgte in einem am Fraunhofer IGB entwickelten und aufgebauten Inkubatorwagen bei 37°C und 5 % CO₂.

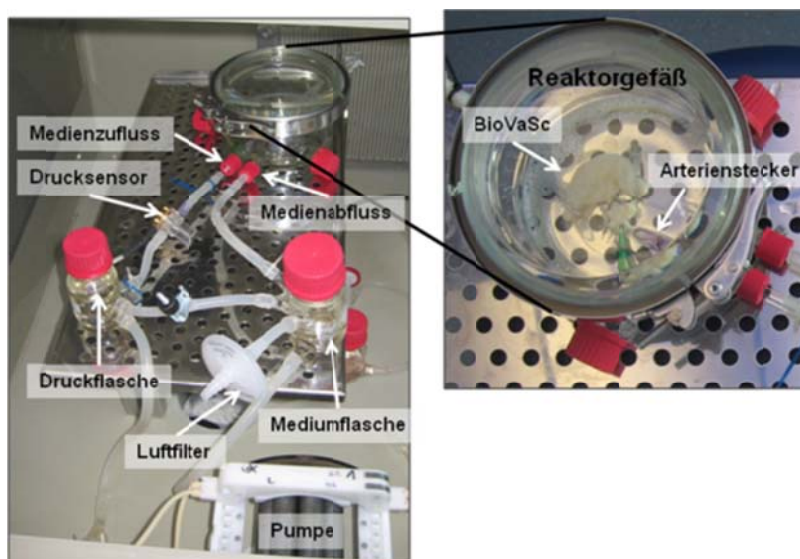


Abbildung 3-4: Aufbau des Bioreaktors zur dynamischen Kultivierung von Zellen in der BioVaSc

Für die Kultivierung der Zellen in der BioVaSc erfolgten zunächst der Zusammenbau und das Autoklavieren des Bioreaktors. Der Dom für den späteren Anschluss des Drucksensors war nicht autoklavierbar, weshalb er nach dem Autoklavieren steril zwischen zwei Luer-Lock-Anschlüsse eingesetzt wurde. Die Schlauchklemme, die Reiter für die Pumpschläuche sowie der Anschluss für Probennahmen waren ebenfalls nach dem Autoklavieren hinzuzufügen. Anschließend ließ sich das Reaktorsystem mit 200 bis 250 ml Medium (ECGMmv bei den Co-Kulturen, REGM bei den hKDC-Monokulturen) füllen und eine BioVaSc in den Reaktor überführen. Die Matrix wurde arteriell angeschlossen und im Bioreaktorsystem mit einem Druck von 120 zu 80 mmHg bis zur Besiedlung perfundiert, um das System zunächst zu prüfen und die BioVaSc in Medium zu inkubieren.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Besiedlungsmethoden über die verschiedenen Versuche optimiert. Das daraus resultierende Protokoll ist im Folgenden beschrieben.

Bei den Co-Kulturen wurde das Gefäßsystem der BioVaSc mit Endothelzellen der Passagen 3 bis 4 besiedelt. Die Besiedlung erfolgte ca. 3 bis 4 h versetzt in zwei Schritten. Zunächst wurden die Endothelzellen aus der Hälfte der Zellkulturflaschen, wie in 3.1.4 beschrieben,

abgelöst und das Zellpellet in 300 bis 500 µl ECGMmv aufgenommen. Anschließend erfolgte die Überführung der BioVaSc in eine Petrischale und das Verschließen der Lumenenden mit Gefäßklemmen, um ein Hinausfließen der Zellsuspension an den angeschnittenen Kapillaren zu verhindern. Die Zellsuspension wurde mithilfe einer Spritze zu zwei Dritteln über den Arterienstecker und zu einem Drittel über den Venenstecker in das Gefäßsystem der BioVaSc eingebracht. Es erfolgte eine 3- bis 4-stündige Inkubation der BioVaSc in der Petrischale im CO₂-Inkubator, um den Zellen das Adhären an die Gefäßwände zu ermöglichen. Es folgte der zweite Besiedlungsschritt. Dafür wurde die BioVaSc umgedreht und die verbliebenen Endothelzellkulturen aus den Flaschen abgelöst und ebenfalls wie oben beschrieben in das Gefäßsystem der BioVaSc ausgesät. Nach einer erneuten Inkubation von 2 bis 3 h im CO₂-Inkubator erfolgten das Entfernen der Gefäßklemmen, das Überführen der BioVaSc in den Bioreaktor und die Perfusion des Gefäßsystems im Reaktorwagen bei 10 zu 0 mmHg und einer Frequenz von 1 Hz über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde der mittlere Druck schrittweise um 10 mmHg nach jeweils 30 min erhöht, bis eine Perfusion bei einem Druck von 120 zu 80 mmHg erreicht war. Nach 5 bis 7 Tagen erfolgten die Besiedlung des Lumens mit hKDCs und dabei ein Wechsel auf REGM.

Das BioVaSc-Lumen war ebenfalls in zwei zeitversetzten Schritten mit den hKDCs zu besiedeln, um beide Seiten der Matrix auszukleiden. hKDCs in den Passagen 3 bis 4 wurden abgelöst (siehe 3.1.4) und die entsprechende Zellzahl in 4 ml REGM aufgenommen. Anschließend erfolgten das Überführen der BioVaSc aus dem Reaktor in eine Petrischale sowie das Verschließen eines Lumenendes mit einer Gefäßklemme. Das Lumen wurde mit der Zellsuspension befüllt und das zweite Lumenende mit einer Gefäßklemme ebenfalls verschlossen. Die BioVaSc war wieder in den Reaktor zu überführen, arteriell anzuschließen und zunächst für 3 bis 4 h bei 60 zu 20 mmHg im Reaktorwagen zu perfundieren. Anschließend konnte der zweite Besiedlungsschritt erfolgen. Dafür wurde die BioVaSc aus dem Reaktor in eine Petrischale überführt, umgedreht und an einer Seite die Gefäßklemme entfernt. Nach Hineingeben der Zellsuspension, Verschließen des Lumens und dem Überführen der BioVaSc zurück in den Reaktor schloss sich eine Perfusion bei 60 zu 20 mmHg für ca. 3 h an. Anschließend erfolgte die Druckerhöhung auf 120 zu 80 mmHg für den restlichen Kulturzeitraum. Am darauffolgenden Tag konnten die Gefäßklemmen entfernt werden. Es wurden regelmäßig Medienproben für die Messung allgemeiner Stoffwechselfparameter entnommen und im Abstand von fünf bis sieben Tagen ein kompletter Medienwechsel durchgeführt. Bei Versuchsende ließen sich Gewebeproben für histologische Analysen, den MTT-Test oder die Lebend-Tot-Färbung entnehmen.

3.7 Messung allgemeiner Stoffwechselfparameter

Während der Kultur der hKDCs in der BioVaSc wurden Medienproben entnommen und auf Glucose, Laktat und Laktatdehydrogenase (LDH) am Randox RX daytona Chemie-Analysator mit den entsprechenden Reagenzienkits vermessen.

Glucose ist als Energiequelle im Zellkulturmedium enthalten. Über einen Abfall der Glucosekonzentration im Kulturverlauf kann somit die Stoffwechselaktivität der Zellen nachgewiesen werden. Laktat entsteht, wenn bei der Glykolyse Pyruvat in größerer Menge gebildet wird als im Tricarbonsäurezyklus weiterverarbeitet werden kann. Das überschüssige Pyruvat wird in Laktat metabolisiert und als Abfallprodukt ins Medium freigesetzt. Daher kann der Verlauf der Laktatkonzentration ebenfalls Hinweise auf die Stoffwechselaktivität geben. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein ubiquitär vorkommendes, cytosolisches Enzym, welches die Oxidation von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Das Absterben von Zellen geht mit einer Membranschädigung und somit mit einer Freisetzung von LDH ins Medium einher. Aufgrund dessen wurde der Verlauf der LDH-Konzentration in den Medienproben über den Kulturzeitraum bestimmt.

3.8 MTT-Test

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein gelbes Tetrazoliumsalz, das lebende Zellen zu einem blauen wasserunlöslichen Formazan reduzieren. Der MTT-Test wurde eingesetzt, um die Eignung der verschiedenen SIS-Chargen für die Kultur der hKDCs zu überprüfen. Dafür erfolgte die Aussaat von hKDCs auf die SIS (siehe 3.6.1.4) und die Kultivierung für 4 bis 5 Tage. Anschließend konnte mit dem MTT-Test innerhalb kürzester Zeit festgestellt werden, ob die Zellen adhärirt haben und vital geblieben sind. Der MTT-Test ließ sich weiterhin als Methode zur makroskopischen Besiedlungskontrolle nach der Kultivierung in der BioVaSc einsetzen.

Für den MTT-Test war zunächst eine Stammlösung mit 3 mg/ml MTT in Aqua bidest. herzustellen. Sie wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Durchführung des Tests erfolgte die Verdünnung der Stammlösung mit Medium auf 1 mg/ml. Aus den SIS-Kronen war das Medium abzusaugen bzw. das entsprechende BioVaSc-Segment in eine Petrischale zu überführen. Das Probenmaterial wurde mit der MTT-Lösung überschichtet und für 1 h im

CO₂-Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgten das Waschen der Proben mit VE-Wasser oder PBS sowie das Fotografieren der Proben.

3.9 Lebend-Tot-Färbung

Die Besiedlung der BioVaSc konnte am Versuchsende weiterhin über eine Lebend-Tot-Färbung untersucht werden. Die Färbung erfolgte mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI). Das farblose FDA wird von Esterasen vitaler Zellen intrazellulär zu Fluorescein metabolisiert. Es akkumuliert in den Zellen und kann fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. PI ist eine kationische, rot fluoreszierende Substanz, die in intakte Membranen vitaler Zellen nicht eindringen kann. Bei toten bzw. apoptotischen Zellen tritt PI durch die permeable Membran und bindet an die DNA. Nach der Färbung fluoreszieren somit lebende Zellen bei entsprechender Anregung grün und tote Zellen rot.

Für die Lebend-Tot-Färbung wurde ein Teilstück der BioVaSc am Ende des Versuchs in eine Petrischale überführt und einmal mit PBS⁺ gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation in der Fluoresceindiacetat-Propidiumiodid-Lösung für 7 min bei 37°C. Die Lösung wurde entfernt und die Gewebeprobe einmal mit PBS⁺ gewaschen, um überschüssige Färbelösung zu entfernen. Die Probe ließ sich anschließend am konfokalen Laserscanning-Mikroskop auswerten.

3.10 Albuminaufnahme-Test

Albumin ist ein wichtiges Transportprotein im Blut, das aufgrund seiner Größe und Ladung nur zu unter 1 % in den Glomeruli filtriert wird. In renalen Erkrankungen kann die Filtration von Albumin zunehmen. In beiden Fällen muss das filtrierte Albumin als nützliches Protein von den renalen proximalen Tubulusepithelzellen reabsorbiert werden. Die Reabsorption des Albumins erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose und stellt eine wichtige Funktion renaler proximaler Tubulusepithelzellen dar. Sie wurde daher an hKDC-Kulturen auf der SIS untersucht.

Dafür erfolgte die Aussaat von 5×10^4 Zellen pro Well auf die SIS. Nach zwei- bis dreiwöchiger Kultivierung wurde der Albuminaufnahme-Test durchgeführt. Zunächst war das Medium der Kulturen abzusaugen und die Proben mit serumfreien Medium (REBM) für 1 h zu inkubieren. Anschließend erfolgte der Austausch des Mediums gegen die BSA-FITC-

Lösung. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurde das Medium abgesaugt und die Proben dreimal mit PBS⁺ gewaschen. Anschließend ließen sich die Zellkerne mit einer DAPI-Lösung gegenfärben. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Auswertung am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Das BSA-FITC fluoreszierte im grünen Bereich, DAPI im blauen Bereich.

3.11 Probenvorbereitung für die Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie ist eine kontaktfreie, hochauflösende Spektroskopiemethode, die klassischerweise für die Materialcharakterisierung eingesetzt wird. In letzter Zeit gewann sie jedoch auch immer mehr an Bedeutung für biologische Untersuchungen, u.a. da es sich um eine nicht-invasive und markerfreie Charakterisierungsmethode handelt.

Bei der Raman-Spektroskopie wird eine Probe mit einem monochromatischen Laser bestrahlt. Das eingefallene Licht wird vom Probenmaterial zum Teil gestreut, wobei ein geringer Teil des Streulichts eine Frequenzverschiebung gegenüber dem einfallenden Licht aufweist. Dieser Effekt wird nach seinem Entdecker, dem indischen Physiker Chandrasekhara Venkata Raman, als Raman-Effekt bezeichnet. Da sich die Streueigenschaften verschiedener Moleküle unterscheiden, lassen sich anhand des Raman-Spektrums Rückschlüsse auf die molekulare Zusammensetzung des Probenmaterials ziehen. Die Raman-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um zu untersuchen, ob sich die hKDCs während ihrer Kultivierung auf der SIS hinsichtlich der molekularen Zusammensetzung verändern.

Für die Raman-Messung wurden sowohl hKDCs aus Zellkulturflaschen als auch hKDCs, die auf der SIS kultiviert worden waren, verwendet. Die hKDCs aus den Zellkulturflaschen wurden dafür, wie in 3.1.4 beschrieben, abgelöst. Für das Ablösen der hKDCs von der SIS erfolgte zunächst eine 5-minütige Inkubation in 1,5 ml PBS⁻/EDTA bei 37°C. Nach Absaugen des PBS⁻/EDTA waren 750 µl Kollagenase (500 U/ml in PBS⁺) außerhalb der Zellkronen und 750 µl Trypsin/EDTA ins Innere der Zellkronen auf die Zellen hinzuzugeben. Nach einer Inkubation für 5 min bei 37°C erfolgte mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Lösungen mit starkem Druck, um die Zellen weiter abzulösen. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit gleichem Volumen REGM versetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 200 xg für 5 min ließ sich der Überstand abnehmen und das Zellpellet in einer Zelldichte von 200.000 Zellen/ml in REGM aufnehmen. Bei den Zellen aus den Zellkulturflaschen wurde die gleiche Zelldichte eingestellt. Ca. 100 µl der jeweiligen

Zellsuspension wurden in eine Petrischale mit Glasboden überführt und der Raman-spektroskopischen Messung zugeführt.

3.12 Cytochemische Färbungen

3.12.1 Immuncytochemische Färbung

Mit immuncytochemischen Färbungen lassen sich Proteine auf fixierten Zellen spezifisch anfärben. Dadurch können Zellen auf spezifische Differenzierungsmarker untersucht und daraus der Zelltyp sowie der Differenzierungsgrad abgeleitet werden. Das Prinzip der Färbung beruht auf der spezifischen Bindung eines Primärantikörpers an ein bestimmtes Antigen. Die Bindung lässt sich über verschiedene Detektionssysteme visualisieren. In dieser Arbeit erfolgte der Nachweis der spezifischen Antikörperbindung nach dem EnVision™-Prinzip (Dako). Dabei wird der Primärkörper durch einen Sekundärantikörper erkannt. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an den F_c-Teil der Immunglobuline der Spezies, aus der der Primärantikörper stammt. Es sind mehrere Sekundärantikörper an ein langes Dextranmolekül gekoppelt. Am Dextran ist wiederum eine Vielzahl von Meerrettichperoxidasen (*Horseradish peroxidases*, HRP) immobilisiert, die ein zugegebenes Chromogen in einen sichtbaren Farbstoff umsetzen können. In dieser Arbeit wurde für die immuncytochemischen Färbungen das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) eingesetzt, das nach der enzymatischen Umsetzung braun erscheint. Durch die große Anzahl der Enzyme am Dextran kommt es zu einer hohen Signalverstärkung.

Für die cytochemischen Färbungen erfolgte zunächst die Aussaat von Zellen in Chamber Slides™ mit je acht Kammern. In jede Kammer wurden 20.000 Zellen in 400 µl zellspezifischem Medium ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei Besiedlung von 40 bis 70 % der Kulturfläche erfolgte die Fixierung der Zellen. Dafür wurden sie einmal mit PBS⁺ gewaschen und anschließend mit einer gekühlten Fixierlösung aus gleichen Volumina Ethanol (70 %) und Aceton für 5 min bei 4°C fixiert. Nachfolgend konnten die Fixierlösung entfernt und die Chamber Slides™ ca. 30 min offen stehen gelassen werden, damit Reste der Fixierlösung verdampften. Die Chamber Slides™ ließen sich bei -20°C bis zur Färbung lagern.

Für die Färbung mit spezifischen Antikörpern wurden die fixierten Zellen in Waschpuffer rehydriert und anschließend für 5 min in einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung inkubiert, um eine Umsetzung der später eingesetzten Chromogene durch endogene Peroxidasen zu verhindern. Anschließend erfolgten ein Waschen der Zellen mit Waschpuffer und die Zugabe

von 100 µl der Primärantikörperlösung in entsprechender Verdünnung pro Kammer. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit Antikörperverdünnungslösung der Fa. Dako (Antibody Diluent). Nach einer einstündigen Inkubation in einer Feuchtekammer wurden die Lösung herausgeklopft und die Zellen dreimal für 2 min mit Waschpuffer gespült. Anschließend erfolgte die 30-minütige Inkubation der entsprechenden Dako EnVision™-Sekundärantikörper-HRP-Konjugat-Lösung. Sie konnte anschließend herausgeklopft und die Zellen dreimal für 2 min mit Waschpuffer gespült werden. Es folgte die Zugabe des Chromogens DAB und dessen Inkubation für 2 bis 5 min. Überschüssiges Chromogen ließ sich mit VE-Wasser abspülen. Die Zellen konnten anschließend für 5 bis 10 s in Hämalaun gegengefärbt werden. Nach dem Bläuen mit Leitungswasser und dem Entfernen der Kammeraufsätze erfolgte das Eindecken mit Aquatex®, einem wässrigen Eindeckmittel. Die Auswertung erfolgte mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen. Das spezifisch gefärbte Antigen stellte sich braun, die Zellkerne blau dar.

Eine Isotypkontrolle war mitzuführen, um eine unspezifische Färbung durch den F_c-Teil der Antikörper auszuschließen.

3.12.2 Lektincytochemie

Die Lektinfärbung beruht auf der spezifischen Bindung von Lektinen an bestimmte proteingebundene Zuckermoleküle, die zum Teil spezifisch für bestimmte Zelltypen sind. In dieser Arbeit wurden biotinylierte Lektine in Kombination mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat verwendet. Das Streptavidin bindet mit hoher Affinität an das Biotin. Die Peroxidasen setzen das für die Lektinfärbungen verwendete Chromogen 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) in einen sichtbaren, roten Farbstoff um.

Für die Lektincytochemie wurden Zellen in Chamber Slides™, wie in 3.12.1 beschrieben, ausgesät und fixiert. Für die Färbung mit spezifischen Lektinen waren die fixierten Zellen in Waschpuffer zu rehydrieren und anschließend für 5 min in einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung zu inkubieren, um eine Umsetzung der später eingesetzten Chromogene durch endogene Peroxidasen zu verhindern. Anschließend erfolgten ein einmaliges Waschen der Zellen mit Waschpuffer und die Zugabe von 100 µl der Lektinlösung in entsprechender Verdünnung pro Kammer. Die Verdünnung der Lektine erfolgte mit Antibody Diluent. Nach einer einstündigen Inkubation in einer Feuchtekammer wurden die Lösung herausgeklopft und die Zellen dreimal für 2 min mit Waschpuffer gespült. Anschließend erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.

Es konnte anschließend herausgeklopft und die Zellen dreimal für 2 min mit Waschpuffer gespült werden. Es folgte die Zugabe des Chromogens AEC und dessen Inkubation für 2 bis 5 min. Überschüssiges Chromogen ließ sich mit VE-Wasser abspülen. Die Zellen konnten anschließend für 5 bis 10 s in Hämalaun gegengefärbt werden. Nach dem Bläuen mit Leitungswasser und dem Entfernen der Kammeraufsätze erfolgte das Eindecken mit Aquatex[®], einem wässrigen Eindeckmittel. Die Auswertung erfolgte mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen. Die spezifisch gefärbten Kohlenhydrate stellten sich dabei rot, die Zellkerne blau dar.

3.12.3 Ölrot-O-Färbung

Mit dem Farbstoff Ölrot O lassen sich Lipide anfärben. Daher diente diese Methode zum Nachweis der adipogenen Differenzierung, bei der intrazelluläre Lipidtröpfchen gebildet werden.

Für die Ölrot-O-Färbung waren die Zellen in den Chamber Slides[™] einmal mit PBS⁻ zu spülen und anschließend mit 4 %iger Formaldehydlösung (Roti[®]-Histofix 4 %) für 10 min zu fixieren. Anschließend wurden sie je einmal mit PBS⁻ und VE-Wasser gewaschen. Es folgten eine 5-minütige Inkubation in Isopropanol (60 %) und die Färbung in der Ölrot-O-Lösung für 10 min. Überschüssiger Farbstoff ließ sich durch zweimaliges Waschen mit VE-Wasser abspülen. Nach dem Entfernen der Kammeraufsätze erfolgte eine Färbung mit Hämalaun für 5 min. Anschließend wurden die Zellen einmal mit VE-Wasser gewaschen, in Leitungswasser gebläut und mit Aquatex[®] eingedeckt. Die Färbung ließ sich lichtmikroskopisch auswerten. Lipidtröpfchen waren rot angefärbt, Zellkerne durch das Hämalaun blau.

3.12.4 Alizarinrot-S-Färbung

Mit der Alizarinrot-S-Färbung lässt sich Kalzium spezifisch anfärben. Daher diente diese Färbung dem Nachweis der osteogenen Differenzierung, bei der Kalziumphosphatablagerungen zur Mineralisierung der extrazellulären Matrix gebildet werden.

Für die Alizarinrotfärbung erfolgten das Waschen der Chamber Slides[™] mit PBS⁻ und das Fixieren der Zellen durch eine 10-minütige Inkubation mit gekühltem Methanol (-20°C) bei RT. Anschließend wurden die Zellen einmal mit VE-Wasser gewaschen und 2 min mit der

Alizarinrot-S-Lösung inkubiert. Überschüssige Färbelösung ließ sich durch dreimaliges Waschen mit VE-Wasser entfernen. Abschließend konnten die Kammeraufsätze entfernt und die Chamber Slides™ mit Aquatex® eingedeckt werden. Die Auswertung erfolgte über lichtmikroskopische Aufnahmen. Kalziumablagerungen stellten sich dabei rötlich dar.

3.13 Histochemische Färbungen

3.13.1 Herstellen von Paraffinschnitten

Biologische Gewebe können für histologische Untersuchungen konserviert werden. Die hier angewandte Konservierungsmethode beruht auf einer chemischen Fixierung mit 4 %iger Formaldehydlösung (Roti®-Histofix 4 %) bei den Pelletkulturen der chondrogenen Differenzierungsversuche bzw. formaldehydhaltiger Bouin'scher Lösung bei allen sonstigen Gewebeproben. Die Konservierung erfolgt durch die Quervernetzung von Proteinen, wodurch die Proben vor Auto- und Heterolyse geschützt werden und die Struktur erhalten bleibt.

Zur Fixierung mit Histofix® wurden die entsprechenden Gewebestücke mind. 2 h bei RT in der Fixierlösung inkubiert, anschließend in Einbettkassetten überführt und in Paraffin eingebettet bzw. bis zur Paraffineinbettung in Leitungswasser gelagert. Für die Fixierung mit Bouin'scher Lösung erfolgte eine Inkubation der Proben in der Fixierlösung für 1 h bei RT. Nach der Inkubationszeit konnten die Proben in Einbettkassetten überführt werden. Überschüssige Fixierlösung ließ sich durch mindestens zweistündiges Waschen in Leitungswasser entfernen.

Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Dabei entstehen harte Blöcke, die am Mikrotom geschnitten werden können. Für die Paraffineinbettung mussten die fixierten Proben schrittweise entwässert werden. Dieser Prozess erfolgte im Einbettautomat Citadell 1000. Der Einbettprozess umfasste eine aufsteigende Alkoholreihe (1 h in 70 % Ethanol, 1 h in 90 % Ethanol, 1 h in 96 % Ethanol, 2x 1 h in Isopropanol), eine Behandlung mit Zwischenflüssigkeiten, die sowohl in Alkohol als auch in Paraffin löslich sind (1 h in Isopropanol/ Xylol 1:1, 2x 1 h Xylol) sowie die abschließende Einbettung in 56°C-warmes, flüssiges Paraffin (2x 3 h). Anschließend konnten die Einbettkassetten aus dem Einbettautomat entnommen und in 63°C-warmes Paraffin überführt werden.

Die Proben ließen sich aus den Einbettkassetten entnehmen, zurechtschneiden und blocken. Die Blöcke härteten bei 4°C über Nacht aus und konnten am Rotationsmikrotom RM 2145 geschnitten werden. Die Schnittdicke betrug 3 µm. Die Schnitte wurden in einem Wärmebad

(38°C) gestreckt und von dort auf unbeschichtete Objektträger für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung und die Alcianblaufärbung bzw. auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger für immun- und Lektinhistochemische Analysen übertragen.

3.13.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist eine histologische Übersichtsfärbung. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der mit mehrwertigen Metall-Kationen Komplexverbindungen bildet. In dieser Form wird er als Hämalaun bezeichnet und färbt basophile Strukturen wie Zellkerne blau. Der synthetische Farbstoff Eosin färbt hingegen acidophile Strukturen wie das Cytoplasma und kollagene Fasern rot an.

Da die Färbung mit wässrigen Farbstofflösungen erfolgte, mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert und in die wässrige Phase überführt werden. Dazu wurden sie 30 min bei 63°C inkubiert, um das Paraffin anzuschmelzen. Anschließend folgte die Inkubation der Schnitte für 10 min in Roticlear® I, 3 min in Roticlear® II, 2 min in 96 % Ethanol I, 2 min in 96 % Ethanol II, 2 min in 70 % Ethanol und 2 min in 50 % Ethanol. Die Objektträger wurden anschließend in VE-Wasser geschwenkt, bis keine Turbulenzen mehr sichtbar waren.

Im Folgenden konnten die Schnitte nacheinander mit Hämalaun und Eosin gefärbt werden. Dazu wurden die Objektträger für 8 min in Hämalaun inkubiert und anschließend mit VE-Wasser gespült, um überschüssige Färbelösung auszuwaschen. Zur Differenzierung erfolgte zweimaliges kurzes Eintauchen der Objektträger im Differenzierungsalkohol. Nach mehrfachem Schwenken in VE-Wasser wurden die Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Dabei steigt der pH-Wert an und basophile Strukturen erhalten die typische blaue Färbung. Anschließend wurden die Objektträger mehrfach in VE-Wasser geschwenkt und 1 min mit Eosin gefärbt. Überschüssiges Eosin ließ sich unter fließendem VE-Wasser abspülen. Danach wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (1 min in 70 % Ethanol, 2 min in 96 % Ethanol, 2 min in 99 % Ethanol, 6 min in Isopropanol I, 6 min in Isopropanol II) geführt. Um sie lagern zu können, erfolgte das Eindecken mit dem organischen Eindeckmedium Isomount®.

3.13.1 Alcianblaufärbung

Mit Alcianblau können saure Glykoproteine angefärbt werden. Bei pH 2,5 lassen sich saure Glykoproteine im Allgemeinen anfärben, weshalb diese Färbung zum Nachweis der Basalmembranbildung der hKDCs auf der SIS diente. Bei pH 1 werden hingegen nur stark sulfatierter Glykoproteine angefärbt. Durch diese Färbung ließ sich die chondrogene Differenzierung, bei der saure sulfatierte Proteoglykane für die Knorpelmatrix gebildet und sekretiert werden, nachweisen.

Für die Alcianblaufärbungen wurden die histologischen Schnitte für 30 min bei 63°C inkubiert, um das Paraffin anzuschmelzen. Anschließend folgte die Inkubation der Schnitte für 10 min in Roticlear® I, 3 min in Roticlear® II, 2 min in 96 % Ethanol I, 2 min in 96 % Ethanol II, 2 min in 70 % Ethanol und 2 min in 50 % Ethanol. Im Anschluss wurden die Objektträger in VE-Wasser geschwenkt bis keine Turbulenzen mehr sichtbar waren. Für die Färbung bei pH 1,0 folgte eine 3-minütige Inkubation in HCl (0,1N), die 30-minütige Färbung in der Alcianblaulösung pH 1,0 und ein kurzes Spülen mit HCl (0,1N). Für die Färbung bei pH 2,5 erfolgte eine 3-minütige Inkubation in Essigsäure (3 %), die 30-minütige Färbung in der Alcianblaulösung pH 2,5 und ein kurzes Spülen mit Essigsäure (3 %). Anschließend konnten die Schnitte in VE-Wasser gewaschen und für 3 bis 5 min mit Kernechtrot gegengefärbt werden. Überschüssige Färbelösung ließ sich durch einen Waschschriff mit VE-Wasser entfernen. Die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (1 min in 70 % Ethanol, 2 min in 96 % Ethanol, 2 min in 99 % Ethanol, 6 min in Isopropanol I, 6 min in Isopropanol II) geführt. Für die Lagerung der Schnitte erfolgte das Eindecken mit Isomount®. Die angefärbten Proteoglykane stellten sich bei der lichtmikroskopischen Auswertung blau, die Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Kernechtrot rötlich da.

3.13.2 Immunhistochemische Färbung

Der Nachweis bestimmter Antigene durch spezifische Antikörper, wie er in 3.12.1 beschrieben ist, lässt sich auch auf histologischen Schnitten durchführen. Sie mussten aufgrund der Fixierungsart und Paraffineinbettung vorbehandelt werden.

Es erfolgte zunächst eine Entparaffinierung durch eine absteigende Alkoholreihe. Dafür inkubierten die Schnitte 15 min bei 63°C und anschließend für 15 min in Roticlear® I, 15 min in Roticlear® II, 2 min Isopropanol, 2 min in 96 % Ethanol I, 2 min in 96 % Ethanol II, 2 min in 70 % Ethanol und 2 min in 50 % Ethanol bei RT. Die Objektträger wurden in VE-Wasser

geschwenkt, bis keine Turbulenzen mehr sichtbar waren und anschließend in Waschpuffer überführt.

Da die Proteine durch die Fixierung mit Bouin'scher Lösung quervernetzt werden und somit die Epitope teilweise nicht mehr von Antikörpern erkannt werden können, war eine Epitopdemaskierung nötig, um die Antigenität wiederherzustellen. Dazu erfolgte eine Hitzedemaskierung, abhängig vom Antikörper entweder in Citratpuffer (*Target Retrieval Solution* pH 6) oder Tris/EDTA-Puffer (*Target Retrieval Solution* pH 9). Die Puffer wurden im Dampfgarer erhitzt und die entparaffinierten Schnitte in die heißen Lösungen überführt. Sie inkubierten für 20 min bei eingeschaltetem Dampfgarer. Anschließend erfolgten das Überführen der Objektträger in Waschpuffer und das Umkreisen der Schnitte mit einem Fettstift (Dako Pen). Da die spätere Färbung eine enzymatische Reaktion der Meerrettichperoxidase beinhaltete, mussten endogene Peroxidasen geblockt werden, um eine Hintergrundfärbung zu verhindern. Dazu wurden die Präparate 5-6 min mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert und anschließend in Waschpuffer für 2 min gespült. Nach dem Abklopfen der Schnitte konnte der jeweilige Primärantikörper in entsprechender Verdünnung mit 50 µl pro Schnitt aufgetragen werden. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit Antibody Diluent. Die Schnitte inkubierten 1 h bei RT mit dem Primärantikörper. Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger abgeklopft und dreimal für je 2 min in Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurden je Schnitt 50 µl der entsprechenden Dako EnVision™-Sekundärantikörper-HRP-Konjugat-Lösung auf die Schnitte gegeben und für 30 min inkubiert. Die Objektträger konnten abgeklopft und dreimal für je 2 min in Waschpuffer gewaschen werden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl DAB-Chromogensubstrat pro Schnitt und eine 2-5-minütige Inkubation. Es folgte ein Spülen der Schnitte mit VE-Wasser. Zur Gegenfärbung wurden sie 5-10 s in Hämalaun inkubiert und 5 min unter fließendem lauwarmem Leitungswasser gebläut. Um die Schnitte zu entwässern, erfolgte eine aufsteigende Alkoholreihe (2 min in 96 % Ethanol, 2 min in 99 % Ethanol, 5 min in Isopropanol I, 5 min in Isopropanol II). Abschließend wurden die Objektträger mit Isomount® eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen. Das spezifisch gefärbte Antigen stellte sich braun, die Zellkerne blau dar. Als Positivkontrollen wurden Schnitte mit nativen humanen Geweben mitgeführt. Um eine unspezifische Färbung durch den F_c-Teil der Antikörper auszuschließen, war weiterhin eine Isotypkontrolle mitzuführen.

3.13.3 Lektin histochemische Färbung

Der Nachweis bestimmter Kohlenhydrate durch spezifische Lektine, wie er in 3.12.2 beschrieben ist, lässt sich auch auf histologischen Schnitten durchführen. Sie mussten dazu zunächst entparaffiniert werden. Dafür inkubierten die Schnitte 15 min bei 63°C und anschließend für 15 min in Roticlear® I, 15 min in Roticlear® II, 2 min Isopropanol, 2 min in 96 % Ethanol I, 2 min in 96 % Ethanol II, 2 min in 70 % Ethanol und 2 min in 50 % Ethanol bei RT. Die Objektträger wurden in VE-Wasser geschwenkt, bis keine Turbulenzen mehr sichtbar waren und in Waschpuffer überführt. Anschließend waren die Schnitte für 5 min in einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung zu inkubieren. Darauf folgten einmaliges Waschen der Zellen mit Waschpuffer und die Zugabe von 50 µl der Lektinlösung in entsprechender Verdünnung pro Schnitt. Die Verdünnung der Lektine erfolgte mit Antibody Diluent. Nach einer einstündigen Inkubation in einer Feuchtekammer wurden die Lösung abgeklopft und die Zellen dreimal für 2 min mit Waschpuffer gespült. Darauf folgte die 30-minütige Inkubation mit 50 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat pro Schnitt. Es konnte anschließend abgeklopft und die Schnitte dreimal für 2 min mit Waschpuffer gespült werden. Es folgte die Zugabe des Chromogens AEC und dessen Inkubation für 2 bis 5 min. Überschüssiges Chromogen ließ sich mit VE-Wasser abspülen. Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 5 bis 10 s durchgeführt. Nach dem Bläuen mit Leitungswasser erfolgte das Eindecken mit Aquatex®, einem wässrigen Eindeckmittel. Die Färbung ließ sich mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen auswerten. Die spezifisch gefärbten Kohlenhydrate stellten sich dabei rot, die Zellkerne blau dar. Als Positivkontrollen wurden Schnitte von nativem humanem Nierengewebe mitgeführt.

3.14 Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie

Mittels der Rasterelektronenmikroskopie können Oberflächen mit einer maximalen Auflösung von 5 bis 10 nm stark vergrößert sichtbar gemacht werden. Während die Vergrößerung im Lichtmikroskop aufgrund physikalischer Gegebenheiten auf ca. 2.000fach begrenzt ist, sind im Rasterelektronenmikroskop theoretisch Vergrößerungen von 500.000fach und mehr möglich. Für die Rasterelektronenmikroskopie wird das Probenmaterial zunächst getrocknet und mit einem leitfähigen Material beschichtet. Im Rasterelektronenmikroskop lässt sich die Oberfläche der Probe anschließend mit einem Elektronenstrahl abrastern. Über die

Interaktion der Elektronen mit dem Material entstehen verschiedene Signale, deren Detektordetektion zur Bildentstehung führt.

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde eingesetzt, um die Bildung von Mikrovilli der hKDCs auf der SIS nachzuweisen. Dazu ließen sich 3 µm-Schnitte (siehe 3.13.1) der Gewebeproben verwenden. Es erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte über eine 30-minütige Inkubation bei 63°C sowie jeweils 10-minütige Inkubationen in Xylol, Roticlear und Isopropanol bei RT. Nach der Lufttrocknung der Schnitte wurden sie der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung zugeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der hKDCs

4.1.1 Differenzierungspotential

Die Charakterisierung der hKDCs durch ATRM hatte gezeigt, dass diese Zellen diverse Stammzell- bzw. Progenitorzellmarker aufweisen (siehe 1.4.2). Zur weiteren Charakterisierung der Stammzeleigenschaften erfolgten, wie in 3.3 beschrieben, Differenzierungsversuche. Für den adipogenen und osteogenen Differenzierungstest wurden hKDCs in Chamber Slides™, für die chondrogene Differenzierung als Zellpellets in Zellkulturröhrchen kultiviert. Die Induktion der Differenzierungen erfolgte jeweils über definierte Zusätze in den Kulturmedien. Der Erfolg der Differenzierung ließ sich anschließend über spezifische Färbungen analysieren.

Die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierbarkeit sind insbesondere Charakteristika mesenchymaler Stammzellen (MSCs). Daher dienten humane MSCs aus dem Knochenmark als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurden als ausdifferenziert betrachtete dermale Fibroblasten verwendet.

Bei einer adipogenen Differenzierung findet eine Einlagerung von Lipidtröpfchen, die mit Ölrot O angefärbt werden können, in die Zellen statt. Anhand der roten, tröpfchenförmigen Färbung in den MSCs und Fibroblasten (Abbildung 4-1B,C) zeigte sich, dass die adipogene Differenzierung bei den MSCs sowie in etwas geringerem Maße bei den Fibroblasten induziert werden konnte. Bei den hKDCs war keine Rotfärbung zu beobachten (Abbildung 4-1A), sie ließen sich folglich nicht adipogen differenzieren.

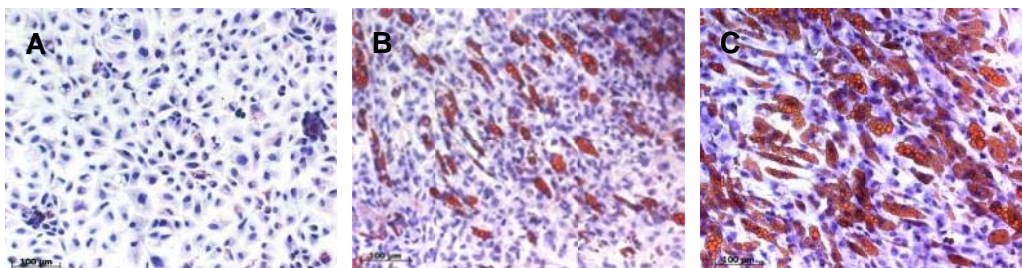


Abbildung 4-1: Anhand der Ölrot-O-Färbung ist erkennbar, dass sich die adipogene Differenzierung bei den humanen dermalen Fibroblasten (B) und den humanen MSCs (C) induzieren ließ. Die hKDCs (A) ließen sich nicht adipogen differenzieren. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun.

Osteogen differenzierte Zellen lagern für die Mineralisierung Kalziumphosphat in die extrazelluläre Matrix ein. Zur Analyse der osteogenen Differenzierung diente eine Alizarinrot-S-Färbung, mit der sich Kalzium nachweisen lässt. Eine rötliche Färbung durch das Alizarinrot S wurde bei den hKDCs und den MSCs (Abbildung 4-2A,C), nicht jedoch bei den Fibroblasten (Abbildung 4-2B) beobachtet. Dies zeigte, dass hKDCs und MSCs im Gegensatz zu Fibroblasten ein osteogenes Differenzierungspotential aufwiesen.

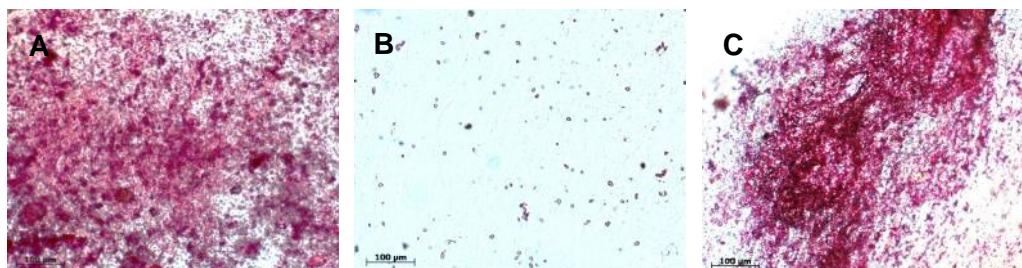


Abbildung 4-2: Anhand der Alizarinrot-S-Färbung ist erkennbar, dass sich die osteogene Differenzierung bei den hKDCs (A) und den humanen MSCs (C) induzieren ließ. Die humanen dermalen Fibroblasten (B) ließen sich nicht osteogen differenzieren.

Für die Bewertung der chondrogenen Differenzierung wurden histologische Schnitte der Pelletkulturen hergestellt und mit Alcianblau (pH 1) gefärbt. Mit diesem Farbstoff können saure, sulfatierte Proteoglykane, die in der Knorpelmatrix vorkommen, spezifisch nachgewiesen werden. Weiterhin kann die Größe der Pellets einen Hinweis darauf geben, ob chondrogenes Gewebe aufgebaut worden ist. Der Durchmesser der Pellets betrug bei den hKDCs ca. 300 µm, den Fibroblasten ca. 1100 µm und den MSCs ca. 1500 µm (Abbildung 4-5). Dies korrelierte mit den Ergebnissen der Alcianblau (pH 1)-Färbung. Die hKDC-Pellets waren nicht blau angefärbt (Abbildung 4-5A), die Fibroblasten- sowie MSC-Pellets zeigten die typisch blaue Färbung, wobei sie bei den Fibroblasten schwächer war als bei den MSCs (Abbildung 4-5B,C).

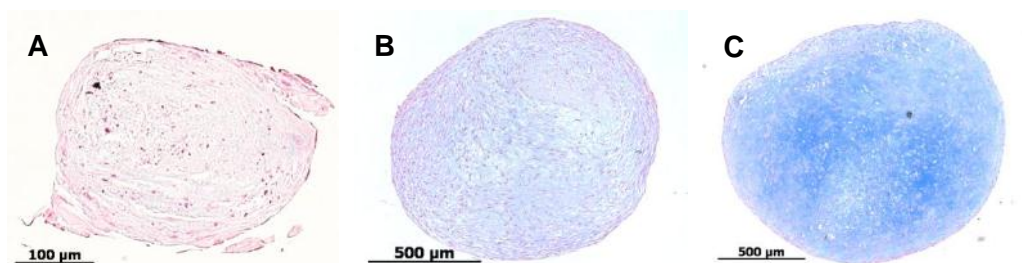


Abbildung 4-3: Anhand der Alcianblau (pH 1)-Färbung auf histologischen Schnitten der Pelletkulturen ist erkennbar, dass sich die chondrogene Differenzierung bei humanen dermalen Fibroblasten (B) und humanen MSCs (C) induzieren ließ. Die hKDCs (A) ließen sich nicht chondrogen differenzieren.

Zusammengefasst ließ sich die osteogene, nicht jedoch die adipogene und chondrogene Differenzierung der hKDCs induzieren. Dermale Fibroblasten wiesen ebenfalls ein eingeschränktes Differenzierungspotential auf, sie ließen sich in die adipogene sowie chondrogene Richtung differenzieren. Die Differenzierung war jedoch schwächer als die der mesenchymalen Stammzellen. Diese waren in alle drei Richtungen differenzierbar.

4.1.2 Cytochemische Färbungen

Die renale Differenzierung der Ausgangszellen wurde wie in 3.12.1 und 3.12.2 beschrieben über cytochemische Färbungen untersucht. Es erfolgte sowohl die Analyse von Markern, die spezifisch für renale proximale Tubuluszellen sind, als auch von Markern späterer Tubulusabschnitte als Gegenkontrolle. Es wurde die Expression zweier Cadherin-Typen untersucht, da Cadherine zum einen essentiell für Adhärenzverbindungen zwischen benachbarten Zellen und so wichtig für die Bildung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten sind, zum anderen variieren die Cadherin-Typen entlang des Nephrons. N-Cadherin gilt als vorherrschend in proximalen Tubuluszellen, wohingegen E-Cadherin in den späteren Nephronabschnitten vorkommt [Prozialeck und Edwards, 2007].

Bei den immuncytochemischen Färbungen in dieser Arbeit stellten sich spezifisch gefärbte Antigene braun, die Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau dar. Es wurden nur Färbungen ausgewertet, bei denen die Färbung der Isotypkontrolle negativ war. Anhand der braunen Färbung aller Zellen in der immuncytochemischen Färbung von N-Cadherin (Abbildung 4-4A) ist erkennbar, dass alle hKDCs diesen Marker durchgängig exprimiert haben. E-Cadherin ließ sich bei ca. 30 % der Zellen immuncytochemisch nachweisen (Abbildung 4-4B). Dies war ein erster Hinweis auf eine vorherrschende proximale Differenzierung der hKDCs. Weiterhin wurde die Expression von Aquaporinen untersucht. Hierbei handelt es sich um Kanalproteine in der Zellmembran, die die starke Wasserresorption entlang des Nephrons ermöglichen. Aquaporin-1 als typischer Marker proximaler Tubuluszellen [Nielsen *et al.*, 2002] war bei ca. 1 % der Zellen über die immuncytochemische Färbung nachweisbar (Abbildung 4-4C). Das in den Sammelrohren vorkommende Aquaporin-2 [Nielsen *et al.*, 2002] wurde nicht exprimiert (Abbildung 4-4D).

Tubuluszellen können weiterhin über die Reaktion von Lektinen mit spezifischen Kohlenhydratmolekülen, die vor allem in der Glykokalix der Tubuluszellen vorkommen, unterschieden werden. Bei den Lektinfärbungen in dieser Arbeit stellten sich spezifisch angefärbte Kohlenhydrate rot, die Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Hämalaun blau dar. Das *Lotus-*

tetragonobolus-Lektin (LTL) bindet an proximale Tubuluszellen, das *Dolichos-biflorus*-Agglutinin (DBA) hingegen an die Epithelzellen späterer Nephronabschnitte [Hennigar *et al.*, 1985; Truong *et al.*, 1988]. Eine Färbung durch das LTL konnte bei ca. 25 % der Zellen beobachtet werden (Abbildung 4-4E). Durch DBA wurden ca. 5 % der hKDCs angefärbt (Abbildung 4-4F).

Aus den cytochemischen Färbungen der hKDCs wurde ersichtlich, dass proximale Marker gegenüber Markern späterer Nephronabschnitte überwogen. Die cytochemischen Färbungen zeigten weiterhin eine zum Teil eine inhomogene Markerexpression.

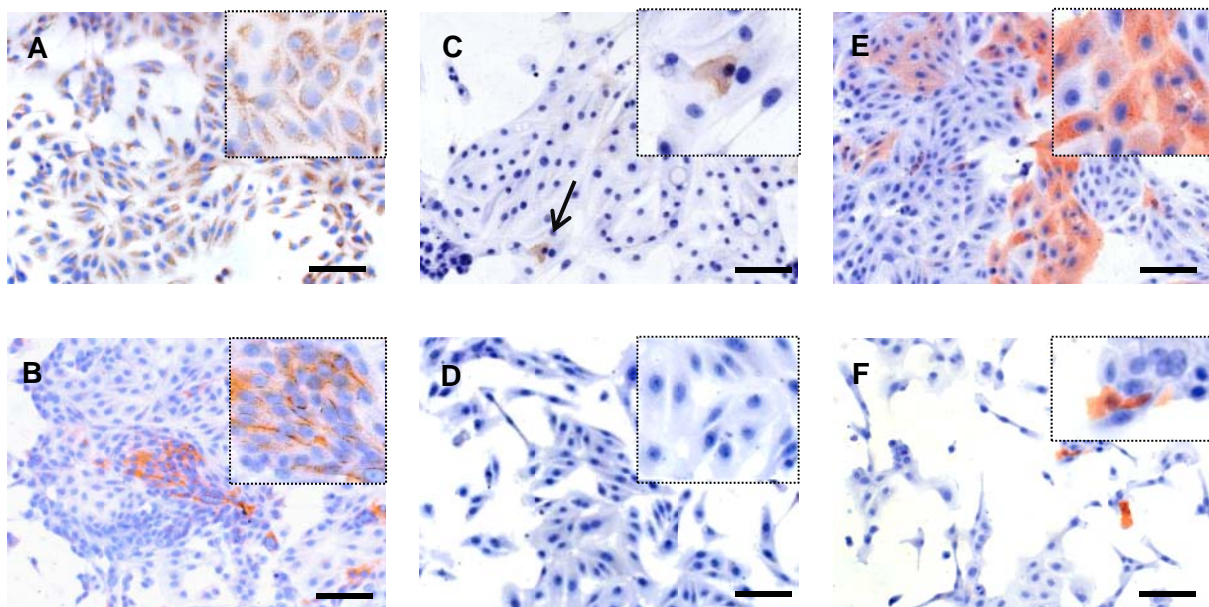


Abbildung 4-4: Charakterisierung der hKDCs in Chamber Slides™. Die immunocytochemischen Färbungen zeigten die Expression von N-Cadherin (A), E-Cadherin (B) und Aquaporin-1. Aquaporin-2 wurde nicht exprimiert (D). hKDCs waren mit den Lektinen LTL (E) und DBA (F) anfärbbar. Maßstabsbalken = 100 µm

4.2 Kultur der hKDCs in etablierten In-vitro-Modellen

Es erfolgte zunächst die Kultur der hKDCs auf einfachen, häufig angewandten Substraten für die Kultur renaler Tubuluszellen. Dabei sollte untersucht werden, ob die hKDCs das typische Wachstum und die charakteristische Morphologie renaler Tubuluszellen unter diesen Bedingungen aufweisen. Des Weiteren war zu testen, ob eines dieser Modelle mit den hKDCs als Zellquelle ein geeignetes In-vitro-Modell des renalen proximalen Tubulus darstellen kann. Es wurden Multiwellplatten, Kollagen-Typ-I-beschichtete Multiwellplatten-Inserts sowie Kollagen-Typ-I-Hydrogele als Substrate getestet.

4.2.1 Multiwellplatten

Das einfachste Modell, das für In-vitro-Untersuchungen angewandt wird, ist die Kultur in konventionellen Zellkulturgefäßen aus Polystyrol, die physikalisch behandelt sind, um die Adhäsion von Zellen zu fördern. Für die Durchführung paralleler Versuchsansätze sind besonders Multiwellplatten geeignet.

Die hKDCs wurden in Zellkulturplatten ausgesät und über einen Zeitraum von drei Wochen kultiviert (siehe 3.6.1.1). In Abbildung 4-5 sind die mikroskopischen Aufnahmen von den Kulturtagen 2, 9 und 21 nach Aussaat gezeigt. Es ist erkennbar, dass die hKDCs nach Erreichen der Konfluenz weiter proliferierten, übereinander wuchsen und sich zu dreidimensionalen Zellaggregaten zusammenlagerten. Diese lösten sich anschließend zum Teil von der Kulturoberfläche ab (Abbildung 4-5C, Pfeile). Es stellte sich keine Kontaktinhibition ein.

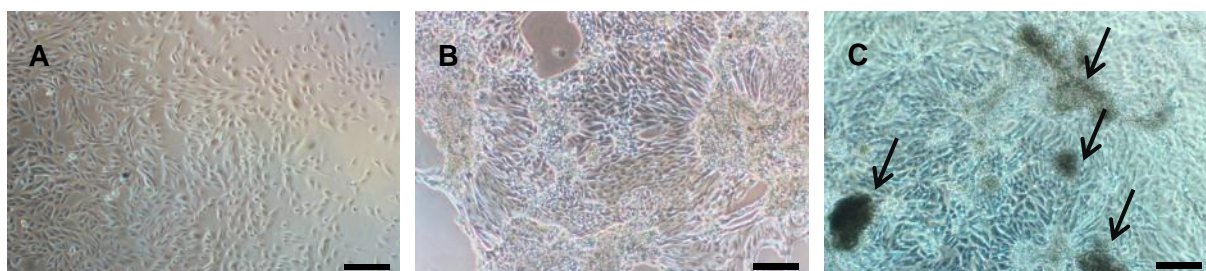


Abbildung 4-5: Mikroskopische Aufnahmen der hKDCs in 24-Well-Platten an Tag 2 (A), 9 (B) und 21 (C) nach Aussaat. Die Zellen bilden mehrschichtige Bereiche. An Tag 21 sind abgelöste Zelleaggregate erkennbar (Pfeile). Maßstabsbalken = 200 μ m

4.2.2 Multiwellplatten-Inserts

Für Transportstudien an Zellkulturen haben sich insbesondere Multiwellplatten-Inserts etabliert. Die in dieser Arbeit verwendeten Inserts bestanden aus einer synthetischen Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) mit definierten Poren von 1 μ m Durchmesser sowie einer Umgrenzung aus Polystyrol. Inserts können in konventionelle Multiwellplatten eingehängt werden und erlauben eine Kompartimentierung in ein apikales und ein basales Kompartiment, zwischen denen sich Transportvorgänge untersuchen lassen. Die PET-Membranen wurden mit einer Kollagen-Typ-I-Lösung beschichtet, um die Adhäsion und Differenzierung der hKDCs zu fördern. Anschließend erfolgte die Kultivierung der hKDCs wie in 3.6.1.2 beschrieben auf dem Substrat für 21 Tage. Die Auswertung erfolgte mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen von histologischen Schnitten (siehe 3.13.2). In dieser Übersichtsfärbung

werden basophile Strukturen wie Zellkerne durch eine Hämalaunlösung blau und acidophile Substanzen wie das Cytoplasma und diverse extrazelluläre Faserproteine durch das Eosin rot gefärbt.

In Abbildung 4-6 ist erkennbar, dass hKDCs in diesem Kulturmodell eine flache Morphologie aufwiesen und wie bei der Kultur in den Zellkulturplatten nicht kontaktinhibiert waren. Sie wuchsen bereits innerhalb von sieben Tagen in mehreren Schichten übereinander und lösten sich auch hier zum Teil vom Substrat bzw. von darunterliegenden Zellschichten ab. Die hKDCs zeigten keinen epithelialen Phänotyp unter diesen Kulturbedingungen.

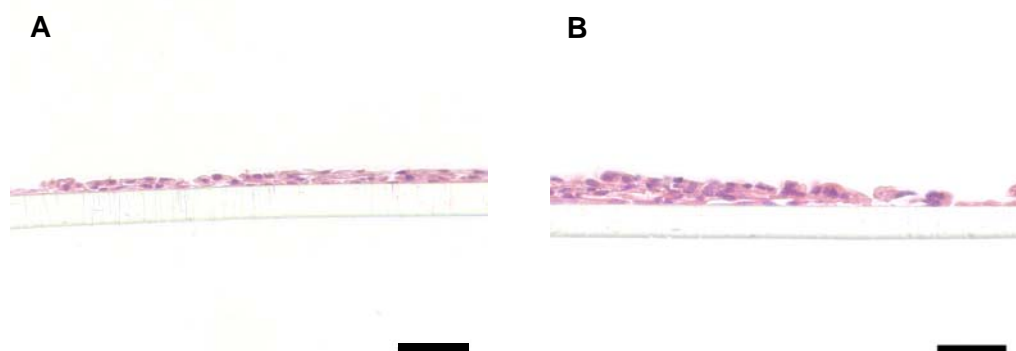


Abbildung 4-6: HE-Färbung von hKDCs auf Kollagen-Typ-I-beschichteten PET-Membranen an Tag 7 (A) und Tag 21 (B) nach Aussaat. Die Zellen weisen eine flache Morphologie und ein mehrschichtiges Wachstum auf. Maßstabsbalken = 50 μ m

4.2.3 Kollagen-Typ-I-Hydrogele

In dreidimensionalen Hydrogelen, die bestimmte ECM-Komponenten, z.B. Kollagen Typ I, enthalten, können renale Tubulusepithelzellen *in vitro* polarisierte zystäre und tubuläre Strukturen mit epitheliale Phänotyp bilden [Chung *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 1982; O'Brien *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1990]. Daher ist diese Kulturart geeignet, um die epitheliale Morphogenese von renalen Tubuluszellen *in vitro* zu untersuchen.

Dieses Kulturmodell diente dazu, das Potential der hKDCs zur Bildung tubulärer Strukturen zu überprüfen. Dazu wurden sie wie in 3.6.1.3 beschrieben in einem dreidimensionalen Kollagen-Typ-I-Hydrogel über 3 Wochen kultiviert. In den histologischen Schnitten ließen sich verschiedene Strukturen beobachten. Die Zellen waren zum Teil in einschichtigen, tubulären Strukturen mit kuboidaler bis hochprismatischer Morphologie angeordnet (Abbildung 4-7 A), wodurch ihr tubulogenes Potential bestätigt wurde. Ferner waren diffuse Zellaggregate sowie Einzelzellen zu beobachten (Abbildung 4-7 B).

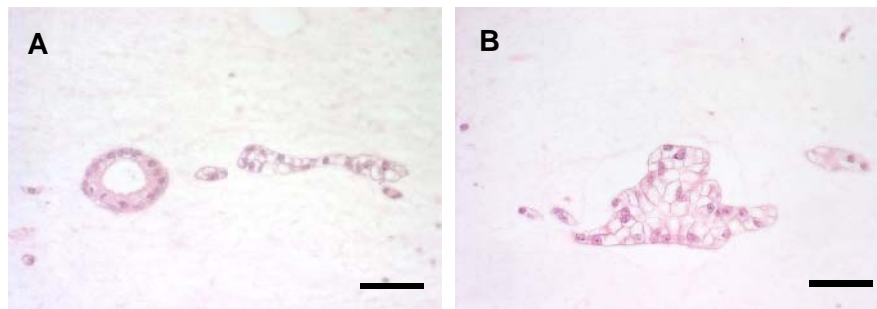


Abbildung 4-7: HE-Färbung von hKDCs in Kollagen-Typ-I-Hydrogel an Tag 14. Es sind tubuläre Strukturen (A) sowie diffuse Zellaggregate (B) erkennbar. Maßstabsbalken = 50 µm

4.3 Kultur der hKDCs auf der Small Intestinal Submucosa (SIS)

Die SIS wurde als Kultursubstrat getestet, um den positiven Einfluss dreidimensionaler Matrices, die ECM-Bestandteile enthalten, zu nutzen und gleichzeitig den Zellen eine Oberfläche anzubieten, die eine einschichtige Kultur ermöglicht (siehe 3.6.1.4). Diese natürliche Matrix ist bekannt für ihre fördernden Eigenschaften auf die Zelladhäsion und -differenzierung von verschiedenen Zelltypen. Es sind jedoch noch keine Daten über ihre Eignung als Substrat für renale Tubuluszellen bekannt. Die hKDCs wurden in 15 Versuchen für bis zu drei Wochen auf der SIS kultiviert.

4.3.1 Qualitätskontrolle der SIS

Für die vorliegenden Versuche wurde die SIS wie in 3.5.1 beschrieben aus porcinem Dünndarm hergestellt, indem die Mucosa mechanisch sowie alle verbliebenen Zellen chemisch entfernt wurden. Abschließend erfolgte die Sterilisierung der Matrix durch eine Gammabestrahlung. Die Zellfreiheit der azellularisierten Matrices ließ sich über HE-Färbungen auf histologischen Schnitten nachweisen. In Abbildung 4-8B ist zu erkennen, dass keine blau gefärbten Zellkerne, sondern ausschließlich die rot gefärbten ECM-Fasern nach der Azellularisierung des Darmgewebes (Abbildung 4-8A) zurückbleiben. Dies zeigte, dass die Mucosa sowie die porcinen Zellen der anderen Darmschichten komplett entfernt wurden.

Zunächst erfolgten Kurzzeitversuche, um die Adhäsion der hKDCs jeder hergestellten SIS-Charge vor der Langzeitkultur zu überprüfen. Dafür wurden hKDCs für fünf Tage auf mindestens drei SIS-Stücken kultiviert und anschließend wie in 3.8 beschrieben mit einer MTT-Lösung inkubiert. Vitale Zellen können das gelbe wasserlösliche MTT in ein blaues wasser-

unlösliches Formazan metabolisieren. Die SIS-Charge wurde als geeignet angesehen, wenn sich auf allen Testwells anhand der blauen Färbung vitale Zellen nachweisen ließen (Abbildung 4-8B). Dies traf auf alle getesteten Chargen zu.

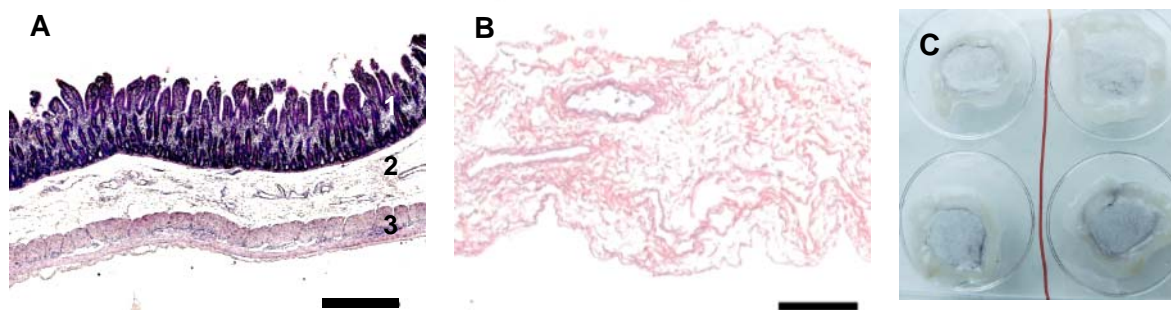


Abbildung 4-8: Qualitätskontrolle der SIS. In der HE-Färbung des nativen Dünndarms (A) sind die Mucosa (1), die Submucosa (2) und die Muscularis (3) noch erkennbar. Durch die Azellularisierung ließ sich die zellfreie Matrix der Submucosa (SIS) gewinnen (B). Die Adhäsion der hKDCs auf der SIS ließ sich nach 5-tägiger Kultur über einen MTT-Test nachweisen (C). Maßstabsbalken A = 500 μm , B = 100 μm

4.3.2 Wachstum und Morphologie

Auf der natürlichen Matrix SIS wiesen die hKDCs an Tag 7 der Kultur eine flache Morphologie auf, sie wuchsen nicht übereinander und es waren noch Lücken in der Zellschicht zu erkennen (Abbildung 4-9A,B). Bis Tag 21 bildeten die hKDCs auf der SIS eine durchgängige, einlagige Zellschicht (Abbildung 4-9C,D). Sie ähnelt dem In-vivo-Epithel (Abbildung 4-9E) und zeigte die Kontaktinhibition der hKDCs auf der SIS. Zudem wiesen die Zellen eine epitheliale kuboidale bis hochprismatische Morphologie auf. Die Zellkerne waren zur basalen Seite hin abgesenkt, was ein weiteres Charakteristikum renaler proximaler Tubuluszellen darstellt.

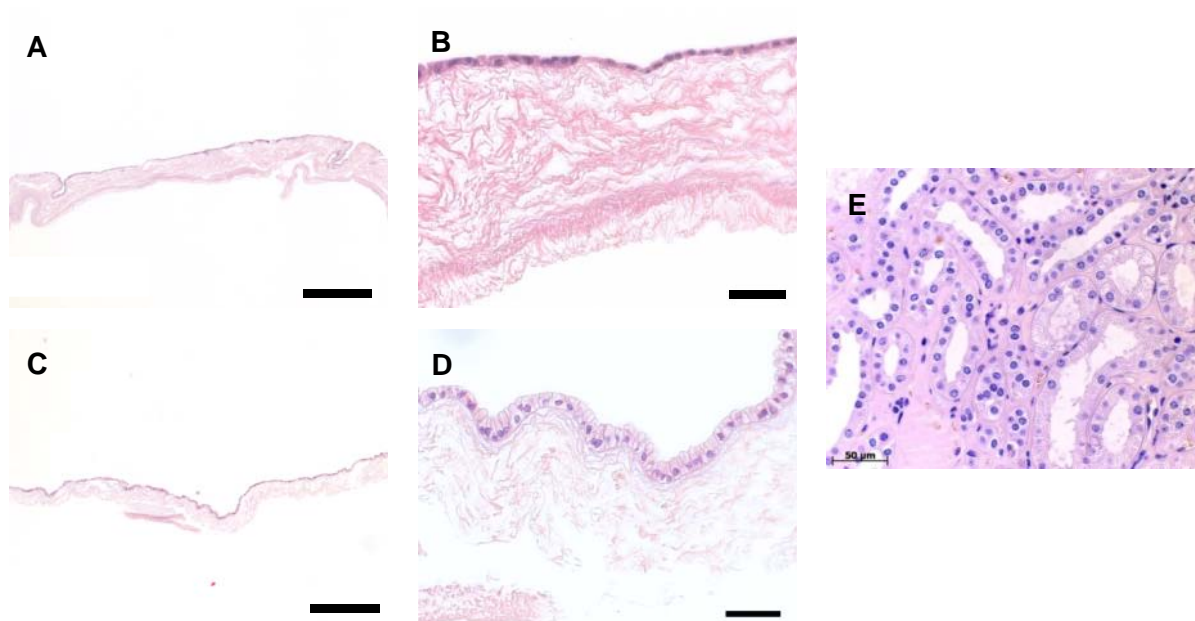


Abbildung 4-9: HE-Färbung von hKDCs auf der SIS 7 (A,B) und 21 (C,D) Tage nach Aussaat sowie humanem nativem Nierengewebe (E). Die hKDCs bilden innerhalb von 21 Tagen eine konfluente Zellschicht aus kubisch bis hochprismatischen Zellen. Maßstabsbalken A und C = 500 μm , B und D = 50 μm

Die Kontaktinhibition der hKDCs auf der SIS konnte durch eine immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 bestätigt werden. Bei den immunhistochemischen Färbungen in dieser Arbeit (siehe 3.13.2) stellten sich spezifisch gefärbte Antigene braun, die Zellkerne durch die Gegenfärbung mit Hämalaun blau dar. Da das spezifische Antigen bei der Ki67-Färbung im Zellkern liegt, waren Ki67-positive Zellkerne braun gefärbt. Es wurden nur Antikörperfärbungen ausgewertet, bei denen die Färbung der Isotypkontrolle negativ war.

Die Braunfärbung der Zellkerne an Tag 7 (Abbildung 4-10A) zeigte, dass zu diesem Zeitpunkt noch ein Großteil der Zellen proliferierte, wohingegen nach 21 Tagen keine bzw. nur vereinzelt proliferierende Zellen nachweisbar waren (Abbildung 4-10B).

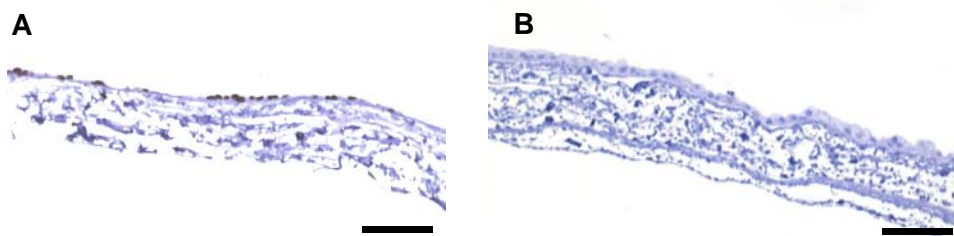


Abbildung 4-10: Über die immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 konnte die Abnahme proliferierender hKDCs von Tag 7 (A) zu Tag 21 (B) nach Aussaat auf der SIS nachgewiesen werden. Maßstabsbalken = 100 μm

In einigen Bereichen der hKDC-Kultur auf der SIS konnten in verschiedenen Färbungen auf der apikalen Zellseite Bürstensaumstrukturen beobachtet werden (Abbildung 4-11A,B). Der Bürstensaum dient *in vivo* als Oberflächenvergrößerung, um die hohen Transportraten im renalen proximalen Tubulus zu ermöglichen. In der Rasterelektronenmikroskopie an 3 μm -Gewebeschnitten (siehe 3.14) waren die Membranfortsätze deutlich sichtbar (Abbildung 4-11C). Der Bürstensaum stellt ein weiteres Charakteristikum renaler proximaler Tubuluszellen dar und zeigte, dass eine Polarisierung der Zellen stattgefunden hat. Die typischen Charakteristika wie die Morphologie renaler proximaler Tubulusepithelzellen einschließlich Bürstensaumausbildung waren jedoch innerhalb verschiedener Bereiche einer Probe und auch zwischen verschiedenen Proben bzw. Versuchen unterschiedlich stark ausgeprägt.

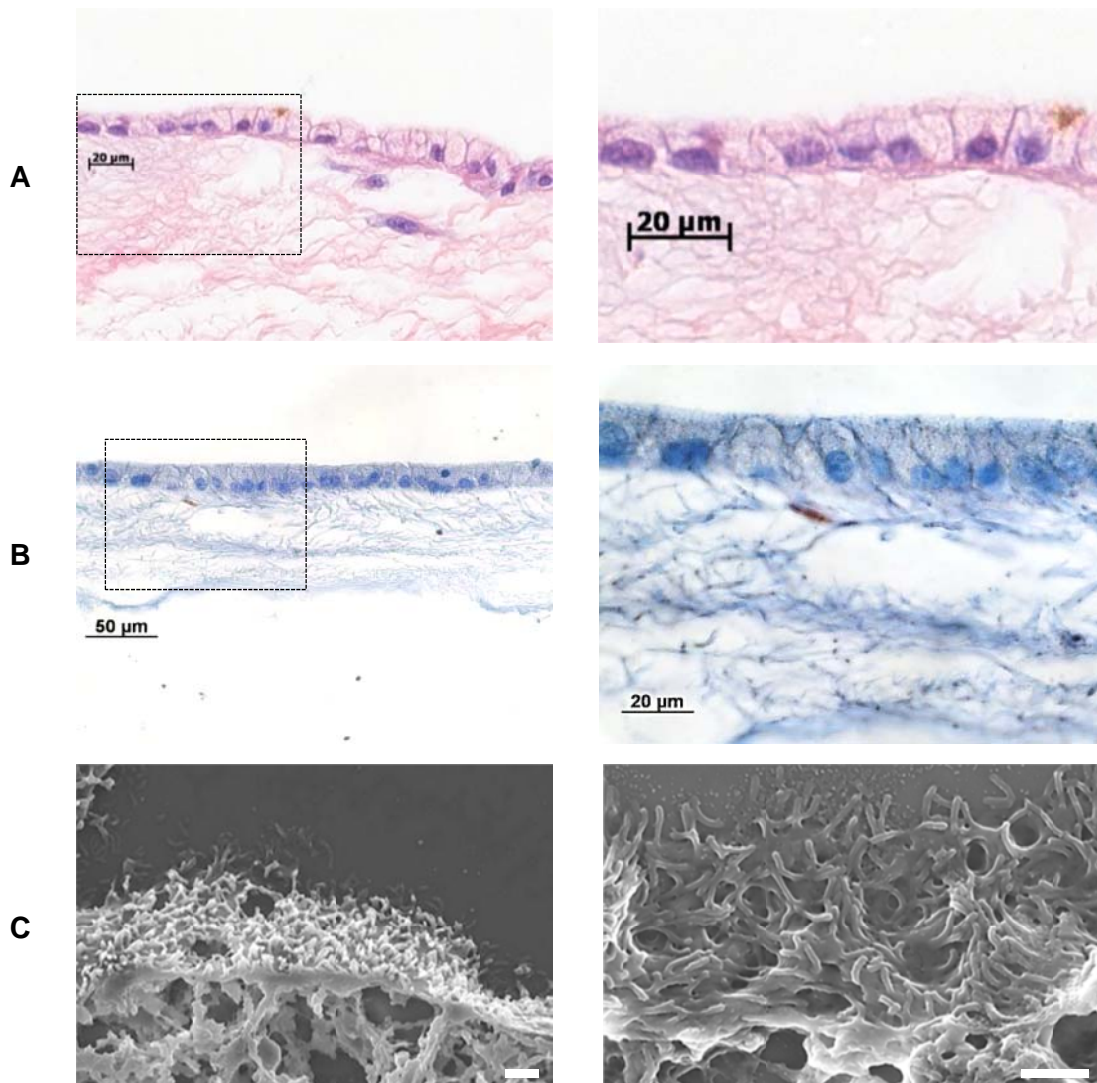


Abbildung 4-11: Bürstensaumstrukturen bei hKDCs nach 21-tägiger Kultivierung auf der SIS. HE-Färbung (A, markierter Ausschnitt rechts vergrößert), Hämalaun-Färbung (B, markierter Ausschnitt rechts vergrößert), rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (C, Maßstabsbalken = 1 μm)

4.3.3 Basalmembranbildung

In den HE-Färbungen der hKDCs auf der SIS an Tag 21 wurde eine dünne kondensierte ECM-Schicht unterhalb der basalen Zellmembranen beobachtet (Abbildung 4-9D). Zur Überprüfung, ob es sich hierbei um eine von den Zellen gebildete Basalmembran handelte, erfolgte eine immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ IV. Es ist das vorherrschende Kollagen in der Basalmembran renaler Tubuli.

Es konnte gezeigt werden, dass an der Grenze zwischen den hKDCs und der SIS nach der dreiwöchigen Kultur eine durchgängige, dünne Kollagen Typ IV-Schicht vorhanden war (Abbildung 4-12A). In der azellularisierten, unbesiedelten Matrix war Kollagen Typ IV ausschließlich in der Wand der ehemaligen Gefäße, jedoch nicht auf der Oberfläche der SIS vorhanden (Abbildung 4-12B). Dies zeigte, dass die hKDCs im Laufe ihres Differenzierungs- und Polarisierungsprozesses Basalmembranbestandteile synthetisiert haben. Mit einer Alcianblau (pH 2,5)-Färbung (siehe 3.13.1) ließen sich Proteoglykane als weitere Bestandteile von Basalmembranen unterhalb der basalen Zellmembran nachweisen (Abbildung 4-12D). Neben der Bildung des Bürstensaums zeigte die Synthese und gerichtete Ablagerung von Basalmembranbestandteilen deutlich die zelluläre Polarisierung.

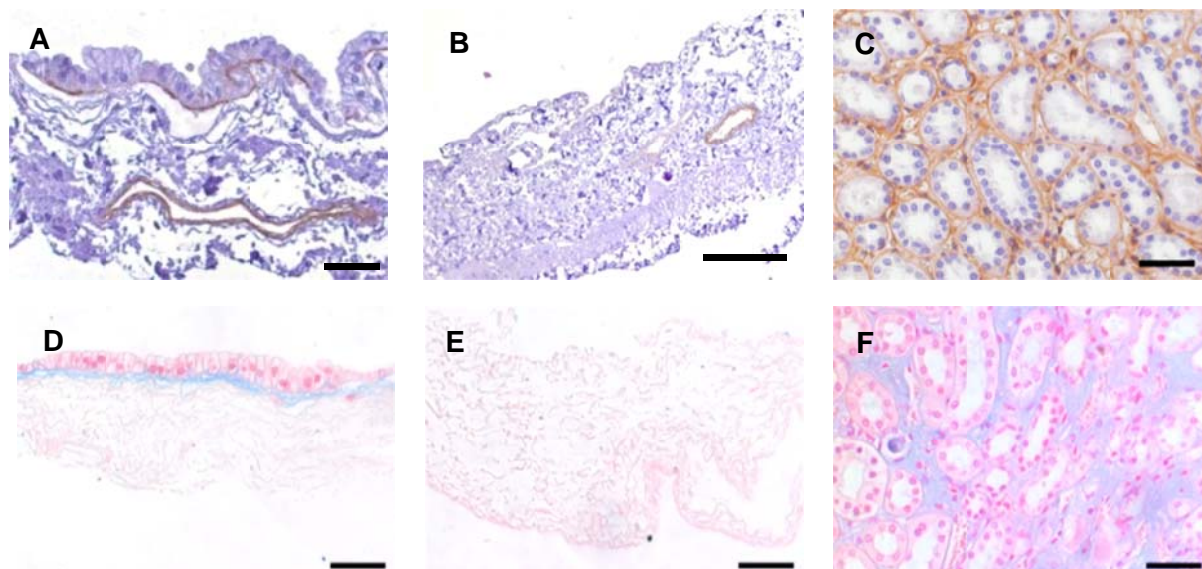


Abbildung 4-12: Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ IV bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (A), azellularisierter SIS (B) und auf nativem humanem Nierengewebe (C). Alcianblau (pH 2,5)-Färbung bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (D), azellularisierter SIS (E) und auf nativem humanem Nierengewebe (F). Es war die Synthese und basale Sekretion von Basalmembranbestandteilen durch die hKDCs nachweisbar. Maßstabsbalken A, C-F = 50 μm , B = 200 μm

4.3.4 Markerexpression

Zur weiteren Charakterisierung der hKDCs nach der Kultivierung auf der SIS wurde eine vergleichende immunhistochemische Analyse der in 4.1.2 beschriebenen Marker proximaler Tubuluszellen und späterer Nephronabschnitte durchgeführt. Wie bei den Ausgangszellen konnte N-Cadherin als typischer Marker der Adhärenzverbindungen zwischen proximalen Tubuluszellen durchgängig bei allen hKDCs auf der SIS nachgewiesen werden (Abbildung 4-13A). Deutlicher als bei der Immunocytochemie auf den Chamber Slides™ war die Färbung insbesondere an den Zell-Zell-Verbindungen konzentriert. E-Cadherin, welches in vivo bei allen späteren Nephronabschnitten zu finden ist, wurde von ca. 15 % der Zellen schwach exprimiert (Abbildung 4-13C).

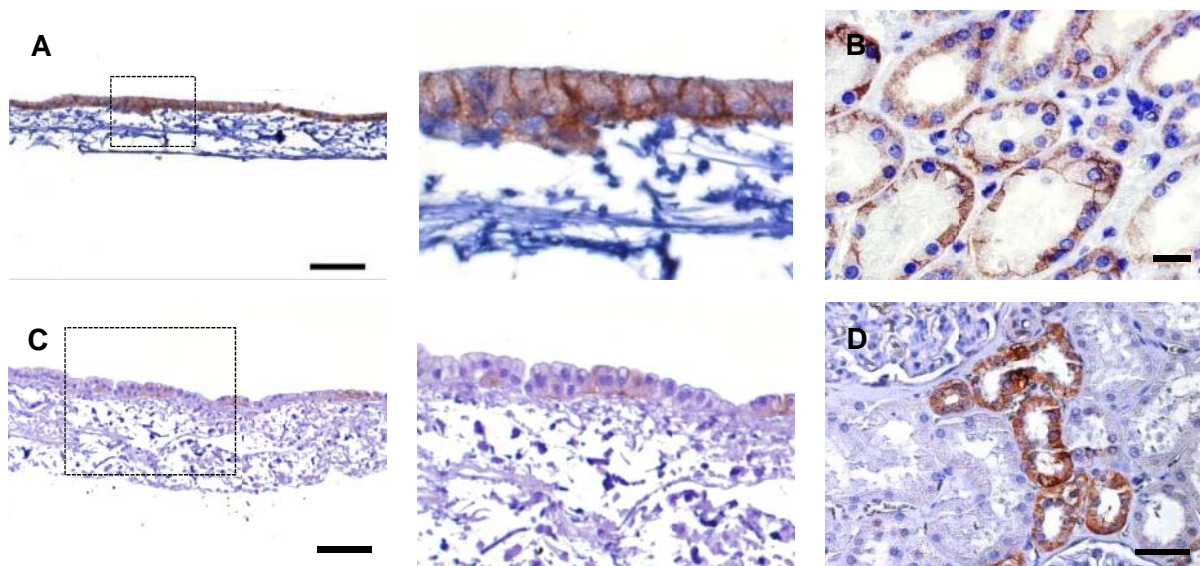


Abbildung 4-13: Immunhistochemische Färbung von Adhärenzproteinen. N-Cadherin bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (A, markierter Ausschnitt rechts vergrößert) und auf nativem humanem Nierengewebe (B). E-Cadherin bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (C markierter Ausschnitt rechts vergrößert) und auf nativem humanem Nierengewebe (D). Maßstabsbalken A = 100 μm , B = 20 μm , C = 100 μm , D = 50 μm

Der Anteil der hKDCs, die nach 21-tägiger Kultur auf der SIS Aquaporin-1 als wichtiges Kanalprotein für die Wasserresorption in proximalen Tubuluszellen exprimieren, betrug bis zu ca. 40 %. Dies stellte einen deutlichen Anstieg gegenüber den Ausgangszellen dar. Aquaporin-1 konnte insbesondere an der apikalen Zellmembran detektiert werden. Zum Teil war deutlich sichtbar, dass es in Bürstensaumbereichen lokalisiert war (Abbildung 4-14A,B). Aquaporin-2 als Kanalprotein für die Wasserresorption im Sammelrohrepithel wurde nicht exprimiert (Abbildung 4-14D).

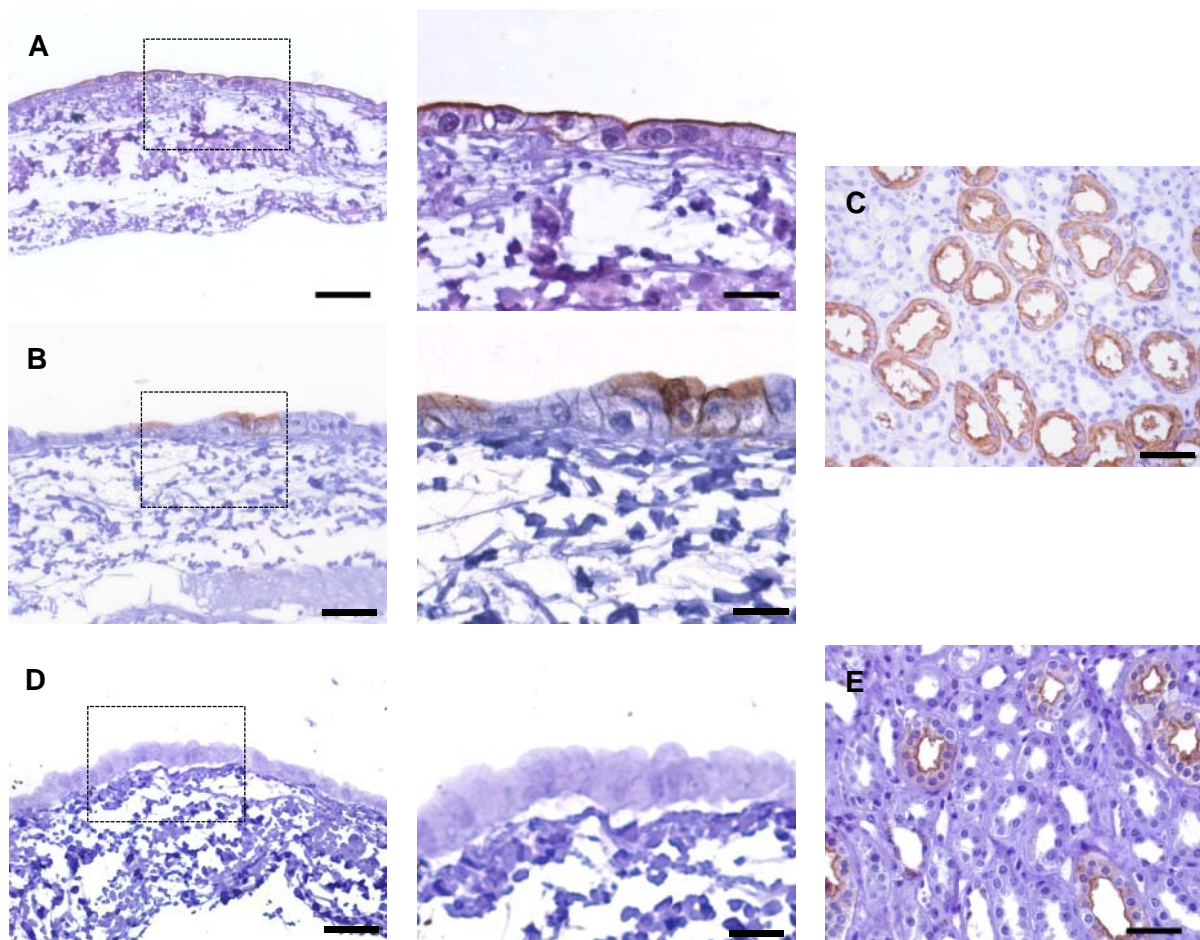


Abbildung 4-14: Immunhistochemische Färbung von Aquaporinen. Aquaporin-1 bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (A und B, markierter Ausschnitt rechts vergrößert) und auf nativem humanem Nierengewebe (C). Aquaporin-2 bei (D) hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (markierter Ausschnitt rechts vergrößert) und auf (E) nativem humanem Nierengewebe. Aquaporin-1 war insbesondere in apikalen Bürstensaumstrukturen der hKDCs auf der SIS nachweisbar, Aquaporin-2 wurde nicht von den hKDCs exprimiert. Maßstabsbalken A-E = 50 μ m, Ausschnitte von A, B und D = 20 μ m

Für die Charakterisierung der hKDCs auf der SIS wurden weiterhin, wie in 3.13.3 beschrieben, Lektinfärbungen durchgeführt. Unter Verwendung von LTL, welches an die Kohlenhydratstrukturen proximaler Tubuluszellen bindet, konnten ca. 45 % der Zellen angefärbt werden. Die Färbung konzentrierte sich jedoch nicht wie im Nativgewebe auf die apikale Zellmembran (insbesondere den Bürstensaum), sondern war gleichmäßig über das gesamte Cytoplasma verteilt (Abbildung 4-15A,B). Durch das DBA, welches mit den Kohlenhydratmolekülen späterer Nephron epithelien reagiert, wurden ca. 5 % der hKDCs auf der SIS angefärbt (Abbildung 4-15D,E).

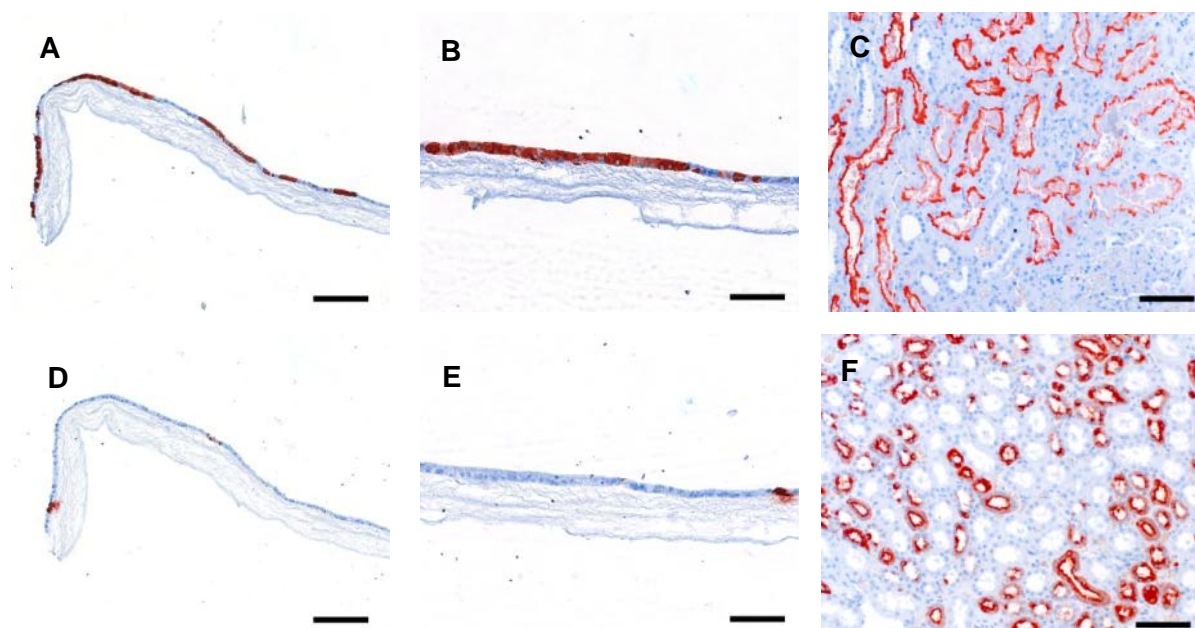


Abbildung 4-15: Lektinfärbungen. LTL bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (A,B) und auf nativem humanem Nierengewebe (C). DBA bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (D,E) und auf nativem humanem Nierengewebe (F). Maßstabsbalken A und D = 200 μm , B,C, E und F = 100 μm

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die Kultivierung der hKDCs auf der SIS neben der Förderung allgemeiner epithelialer Eigenschaften wie dem einschichtigen Wachstum, der kuboidalen bis hochprismatischen Morphologie sowie der Bürstensaum- und Basalmembranbildung auch zu einer Veränderung in der Expression spezieller proximaler Differenzierungsmarker führte. N-Cadherin ließ sich im Gegensatz zu den Ausgangszellen insbesondere an den Zellmembranen nachweisen. Aquaporin-1 wurde von deutlich mehr Zellen exprimiert. Es konnte insbesondere in der apikalen Zellmembran und in Bürstensaumstrukturen nachgewiesen werden. Ein Anstieg gefärbter Zellen ließ sich ebenfalls bei der LTL-Färbung erzielen.

4.3.5 Raman-spektroskopische Messungen

Über die histochemischen Charakterisierungen waren zelluläre Änderungen der hKDCs im Laufe der Kultivierung auf der natürlichen Matrix SIS nachweisbar. Dies sollte über die Raman-Spektroskopie exemplarisch weiter untersucht werden, da in diversen Veröffentlichungen gezeigt werden konnte, dass das Ramanspektrum von Zellen in Abhängigkeit ihres Differenzierungsstatus variiert [Downes *et al.*, 2011; Notingher und Hench, 2006; Pudlas *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011].

Es wurden Zellen vor der Kultivierung auf der SIS sowie nach 1 und 21 Tagen Kultur auf der SIS mittels Raman-Spektroskopie vermessen. Dafür erfolgte die Ablösung der Zellen von der SIS wie in 3.11 beschrieben mittels Trypsin und Kollagenase, um sie mit dem Raman-Mikroskop messen zu können. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen der abgelösten hKDCs von Tag 1 und Tag 21 der Kultur auf der SIS ist erkennbar, dass der Zelldurchmesser sich innerhalb der dreiwöchigen Kultivierungszeit von ca. 13 μm auf ca. 21 μm Durchmesser vergrößert hat (Abbildung 4-16).

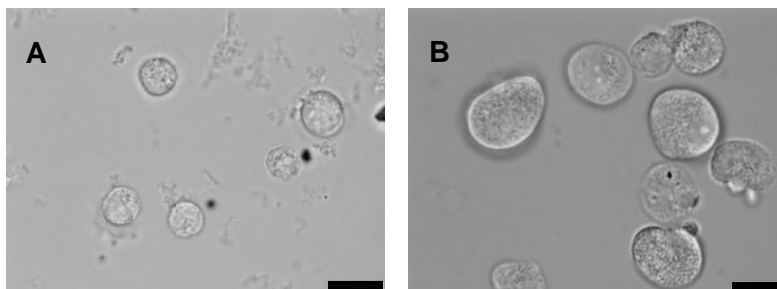


Abbildung 4-16: Für die Raman-Spektroskopie abgelöste Zellen nach 1 Tag (A) und 21 Tagen (B) auf der SIS. Es ist die Vergrößerung des Zelldurchmessers von Tag 1 zu Tag 21 erkennbar. Maßstabsbalken = 20 μm

Im Score Plot der Messdaten (Abbildung 4-17) ist zu erkennen, dass die Messpunkte relativ dicht beieinander liegen. Es ließ sich trotzdem eine leichte Tendenz zur Gruppierung der Proben aus der Zellkulturflasche und den hKDCs nach 1-tägiger Kultur auf der SIS sowie davon getrennt den Zellen nach 21-tägiger Kultur auf der SIS feststellen. Bei Betrachtung von ausschließlich den hKDCs an Tag 1 und Tag 21 wird die Trennung deutlicher. Mit dieser Methode ließ sich die Änderung der biochemischen Zellzusammensetzung der hKDCs über die Kultivierungszeit auf der SIS nachweisen.

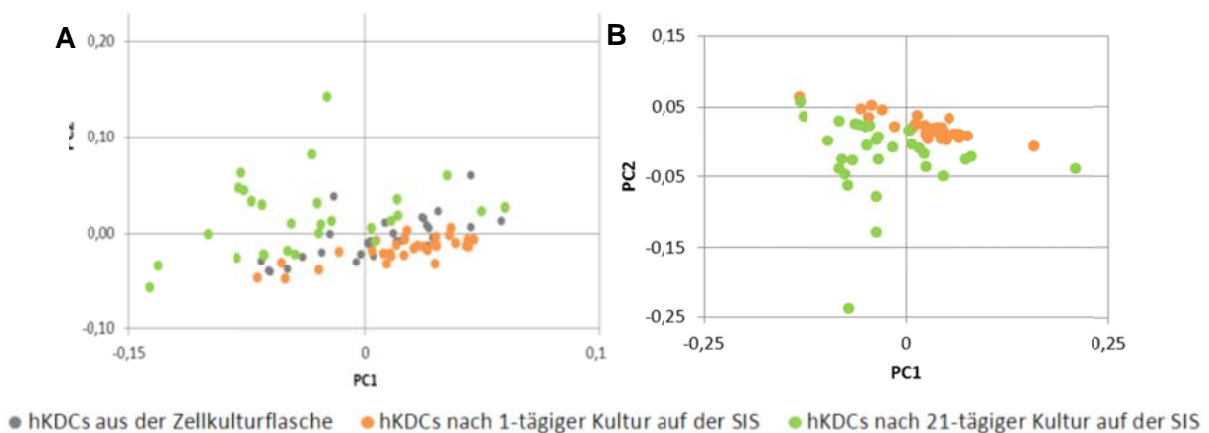


Abbildung 4-17: Score Plot der Hauptkomponentenanalyse von den Raman-Spektren. hKDCs vor der SIS-Kultur sowie nach 1- und 21-tägiger Kultivierung auf der SIS (A). hKDCs nach 1- und 21-tägiger Kultivierung auf der SIS (B). Die Trennung der Zellen nach 1- und 21-tägiger Kultivierung auf der SIS ist insbesondere in (B) erkennbar. PC = Principal Component (Hauptkomponente)

4.3.6 Albuminaufnahme

In der gesunden Niere wird Albumin kaum filtriert, bei Nierenerkrankungen kann die Filtrationsrate jedoch ansteigen. In beiden Fällen muss das Albumin als wichtiges Transportprotein des Blutes von den proximalen Tubuluszellen zurückgewonnen werden. Daher erfolgte als Funktionalitätstest die Untersuchung der Albuminaufnahme durch die hKDCs wie in 3.10 beschrieben exemplarisch bei drei der SIS-Versuche.

Nach 14-tägiger Kultivierung der hKDCs auf der SIS wurden die Zellen mit FITC-markiertem bovinem Serumalbumin inkubiert. Anschließend erfolgten eine DAPI-Färbung der Zellkerne und die Auswertung am Laserscanning-Mikroskop. Das aufgenommene Albumin stellte sich dabei grün, die Zellkerne blau dar. Anhand der punktierten grünen Fluoreszenz um die Zellkerne ist erkennbar, dass ca. 30 % der hKDCs das fluoreszenzmarkierte Albumin in die Zelle aufgenommen haben (Abbildung 4-18).

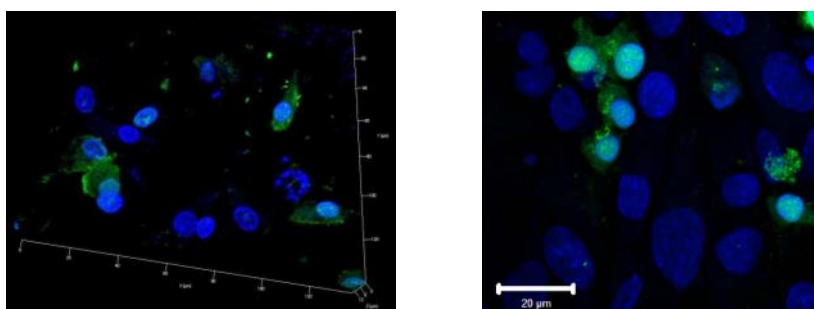


Abbildung 4-18: Albuminaufnahme durch die hKDCs nach 14-tägiger Kultur auf der SIS. Zellkerne = blau (DAPI-Färbung), FITC-markiertes bovines Serumalbumin = grün

4.3.7 Co-Kultur von hKDCs mit Endothelzellen

Die SIS als Matrix erlaubt eine räumlich getrennte Co-Kultur von zwei verschiedenen Zelltypen. Aufgrund der starken Interaktion zwischen dem Tubulusepithel und dem peritubulären Kapillarnetzwerk in vivo ist insbesondere die Co-Kultur der hKDCs mit Endothelzellen relevant und wurde daher etabliert. Vor der Aussaat auf die SIS ließ sich die Identität der aus humaner Haut isolierten mikrovaskulären Endothelzellen (human dermale mikrovaskuläre Endothelzellen, HDMECs) mittels immunocytochemischer Färbungen der Endothelzellmarker CD31 und von-Willebrand-Faktor (vWF) überprüfen. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 4-19 dargestellt. Anhand der Braunfärbung aller Zellen bei der Färbung des Endothelzellmarkers CD31 (Abbildung 4-19A) ist erkennbar, dass die verwendeten Zellen die-

sen Marker durchgängig exprimierten. Die Färbung konzentrierte sich insbesondere auf die Zellmembranen. Eine Färbung des vWFs (Abbildung 4-19B) war bei allen Zellen punktförmig um den blau gefärbten Zellkern zu erkennen.

Die Funktionalität der HDMECs wurde wie in 3.4 beschrieben über die Aufnahme von acetyliertem *Low density Lipoprotein* (acLDL) getestet. In Abbildung 4-19C ist erkennbar, dass das durch die Markierung mit Alexa Fluor® 488 grün fluoreszierende acLDL punktförmig um die Zellkerne angeordnet ist und somit die verwendeten HDMECs acLDL über endothelzellspezifische Rezeptoren in die Zelle aufgenommen haben. Zusammen mit den immunocytochemischen Ergebnissen zeigte dies die endotheliale Identität und Funktionalität der isolierten Zellen.

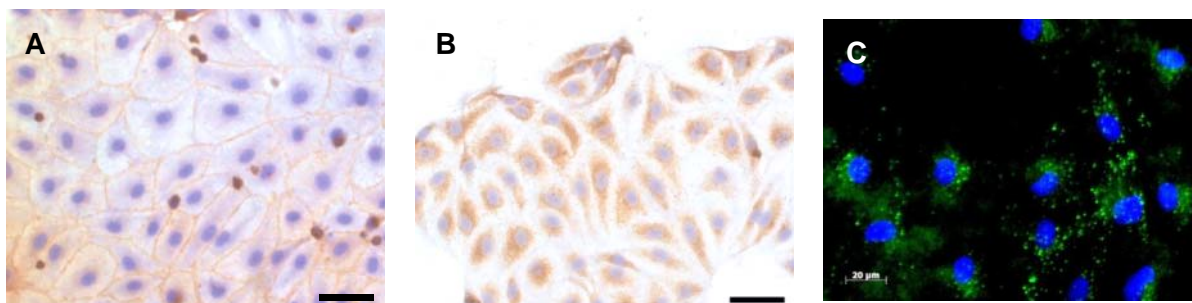


Abbildung 4-19: Charakterisierung der HDMECs auf Chamber Slides™. Über die Immunocytochemie der Marker CD31 (A) und vWF (B) sowie die Aufnahme von acLDL (C) war die endotheliale Identität und Funktionalität nachweisbar. (C): Zellkerne (DAPI-Färbung) = blau, acLDL-Alexa Fluor® 488 = grün. Maßstabsbalken A und B = 50 µm

Für die Co-Kultur wurden die HDMECs auf der Unterseite der SIS ausgesät und für zwei bis sieben Tage in ECGMmv vorkultiviert. Anschließend erfolgten die Zugabe von hKDCs auf der Oberseite und eine weitere Kultivierung für drei Wochen bei insgesamt acht Kulturversuchen. Für die dreiwöchige Co-Kultur wurde auf ECGMmv und REGM zu gleichen Anteilen gewechselt. Dieses Medium hatte sich in Vorversuchen als geeignet für das Wachstum beider Zelltypen, hKDCs und HDMECs erwiesen.

In der HE-Färbung ist erkennbar, dass sich auf beiden Seiten der SIS Zellen befanden. Auf der Unterseite sind in regelmäßigen Abständen nur blau gefärbte Zellkerne sichtbar (Abbildung 4-20A). Mittels der immunhistochemischen Färbung der Endothelzellmarker CD31 und vWF ließ sich anhand der durchgängig braun gefärbten dünnen Schicht nachweisen, dass es sich dabei um die HDMECs handelt und dass sie die gesamte Oberfläche bedeckten sowie eine sehr flache Morphologie aufwiesen (Abbildung 4-20B,D). Auf der Oberseite der SIS bildeten die hKDCs mit deutlich sichtbarem Cytoplasma eine durchgehende

Zellschicht (Abbildung 4-20A). Die Zellen waren etwas flacher und weniger uniform als in der hKDC-Monokultur.

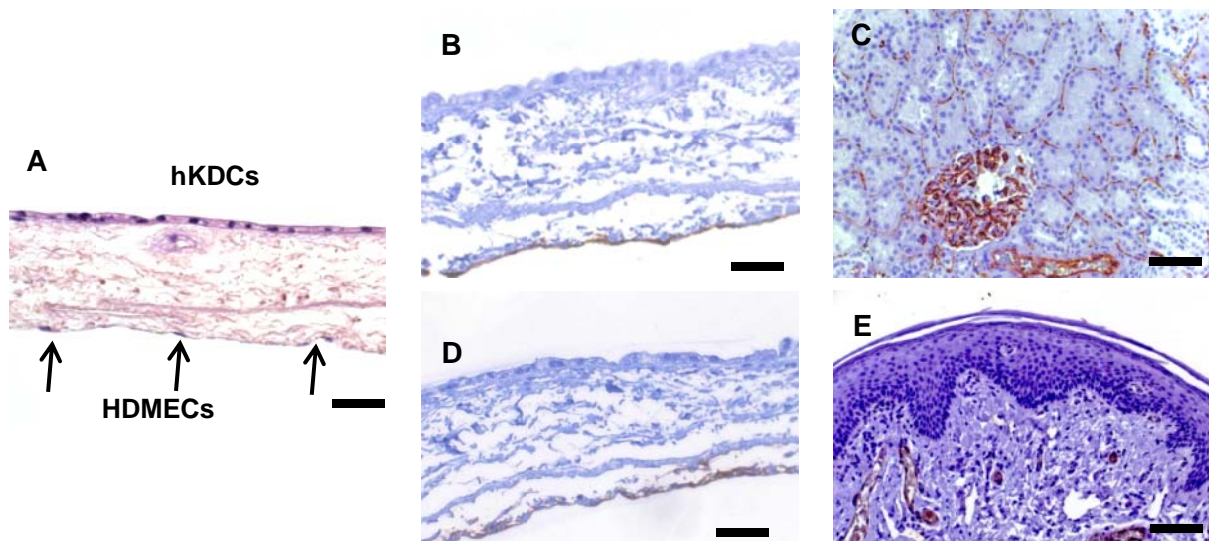


Abbildung 4-20: Co-Kultur von hKDCs und HDMECs auf der SIS. HE-Färbung (A) und immunhistochemische Färbung von CD31 auf der Co-Kultur (B) sowie auf nativem Nierengewebe (C) und vWF auf der Co-Kultur (D) sowie nativem Hautgewebe (E). Es waren konfluente Schichten beider Zelltypen nachweisbar auf der SIS. Maßstabsbalken A, B und D = 50 μ m, C und E = 100 μ m

Die hKDCs wurden nach der Co-Kultivierung ebenfalls immunhistochemisch untersucht, um mögliche Einflüsse der Co-Kultur mit HDMECs weiter zu untersuchen. Die N- und E-Cadherin-, Aquaporin-2-, Kollagen-Typ-IV- und Ki67-Expression waren vergleichbar zu den hKDC-Monokultur-Ergebnissen. Bei der Aquaporin-1-Immunhistochemie und den Lektinfärbungen waren Unterschiede zu verzeichnen. Die Ergebnisse dieser Färbungen sind in Abbildung 4-21 dargestellt. Es ist erkennbar, dass sich nur eine sehr geringe Zahl der hKDCs in der Aquaporin-1-Immunhistochemie braun sowie der LTL-Färbung rot anfärben ließ. Bei der Lektinfärbung mit dem DBA waren hingegen mehr hKDCs als bei der hKDC-Monokultur auf der SIS angefärbt.

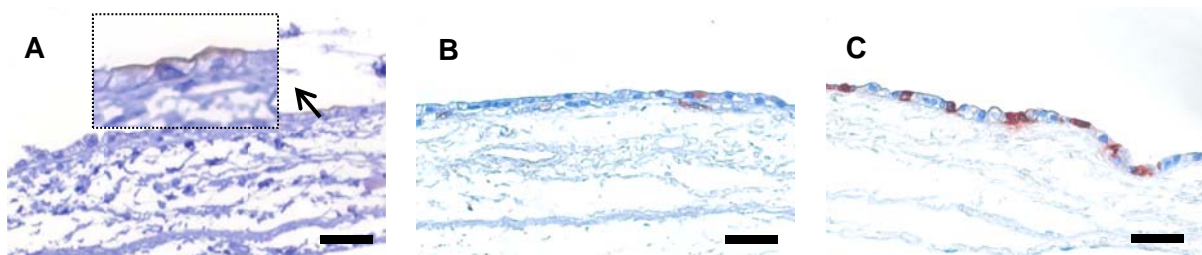


Abbildung 4-21: Co-Kultur von hKDCs und HDMECs auf der SIS. Immunhistochemische Färbung von Aquaporin-1 (A), Lektinfärbungen mit LTL (B) und DBA (C). Maßstabsbalken = 50 μ m

Die Ergebnisse zeigen, dass die Co-Kultur mit HDMECs aufgebaut werden konnte, jedoch nicht zu einer weiteren Verbesserung der Morphologie geführt hat und dass die proximale Differenzierung schwächer ausgeprägt war.

4.4 Kultur der HK-2-Zelllinie auf der SIS

Eine weitere Aufgabenstellung dieser Arbeit war der Vergleich der hKDCs mit einer bekannteren und häufig eingesetzten humanen Zellquelle. Dafür wurde die HK-2-Zelllinie ausgewählt, da es sich um eine proximale Tubulusepithelzelllinie aus adultem humanem Nierengewebe handelt. Sie ist über eine Transduktion mit humanen Papillomavirus Typ 16 E6/E7-Genen immortalisiert.

Die HK-2-Zellen wurden ebenfalls für drei Wochen auf der SIS kultiviert. In den HE-Färbungen (Abbildung 4-22) ist erkennbar, dass die Zellen innerhalb einer Woche im Gegensatz zu den hKDCs zum Teil mehrschichtig auf der Matrix wuchsen. Nach drei Wochen hatten sich deutlich mehrere Zellschichten gebildet. Die HK-2-Zellen waren zu diesem Zeitpunkt stark fragmentiert, was auf ein Absterben der Zellen hinweist.

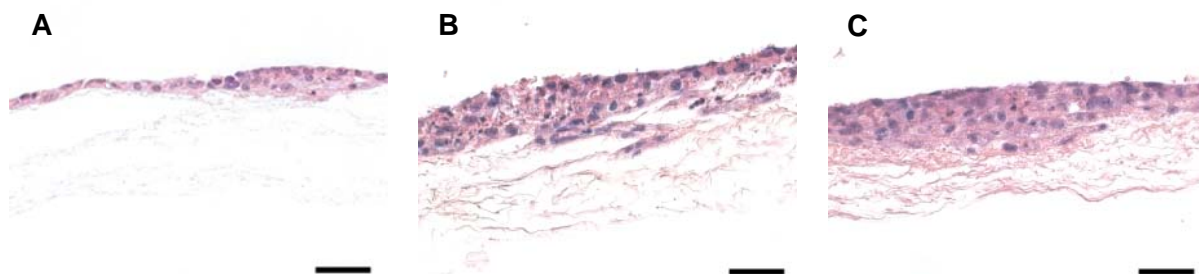


Abbildung 4-22: Die HE-Färbung von HK-2-Zellen auf der SIS nach 7 (A), 14 (B) und 21 Tagen (C) nach Aussaat zeigt mehrschichtiges Wachstum der Zellen sowie eine partielle Zellfragmentierung. Maßstabsbalken = 50 μ m

Zum weiteren Vergleich der HK-2-Zellen mit den hKDCs erfolgten immunhistochemische Analysen der Proben nach dreiwöchiger Kultur auf der SIS. In Abbildung 4-23A ist erkennbar, dass in allen Zellen N-Cadherin angefärbt werden konnte. Die Färbung konzentrierte sich zum Teil auf die Zellmembranen benachbarter Zellen. E-Cadherin sowie Aquaporin-1 waren bei der immunhistochemische Färbung nicht detektierbar (Abbildung 4-23B,C). Anhand der Ki67-positiven Zellkerne ist erkennbar, dass nach der dreiwöchigen Kultur in allen Zellschichten HK-2-Zellen noch proliferierten (Abbildung 4-23D). Kollagen Typ IV konnte punktuell zwischen den Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-23E).

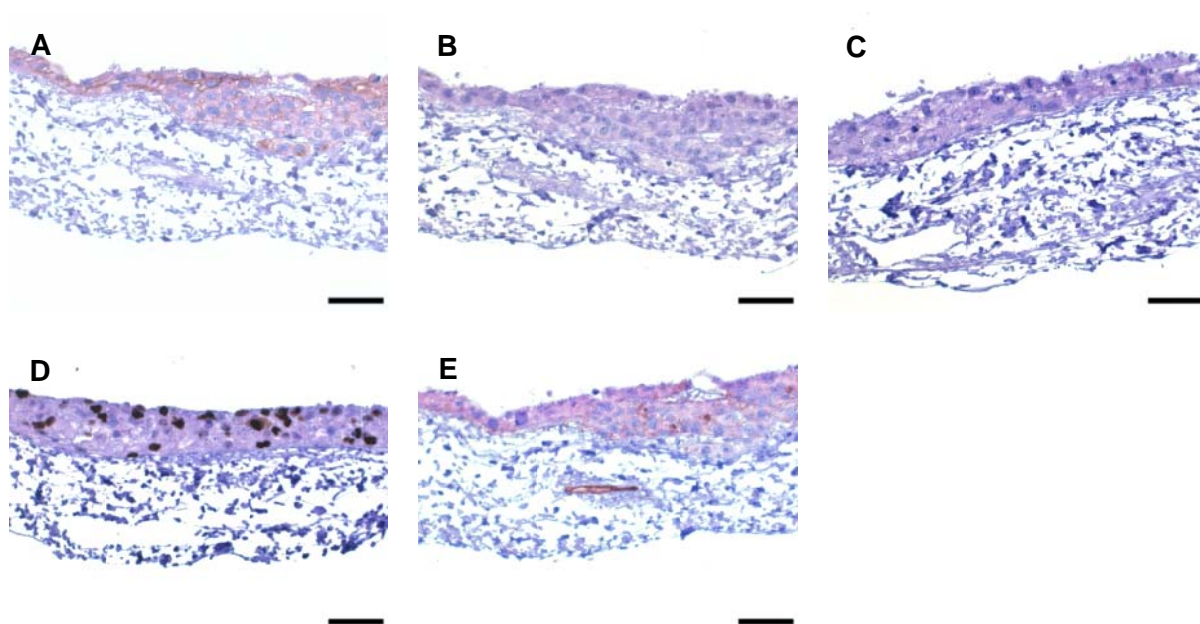


Abbildung 4-23: Immunhistochemische Färbung der HK-2-Zellen nach 3-wöchiger Kultur auf der SIS. N-Cadherin (A), E-Cadherin (B), Aquaporin-1 (C), Ki67 (D), Kollagen Typ IV (E). Maßstabsbalken = 50 μ m

Bei den Lektinfärbungen war nur in wenigen Bereichen sowohl durch das LTL als auch das DBA eine schwache, punktuelle Färbung erkennbar (Abbildung 4-24).

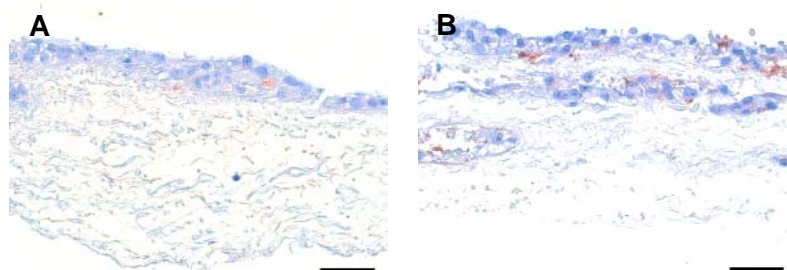


Abbildung 4-24: Lektinfärbungen der HK-2-Zellen nach dreiwöchiger Kultur auf der SIS. LTL-Färbung (A) und DBA-Färbung (B). Maßstabsbalken = 50 μ m

4.5 Dynamische Kultur der hKDCs in der BioVaSc (Biological Vascularized Scaffold)

Die BioVaSc (siehe Abbildung 4-25) ist eine natürliche Matrix, die aus porcinem Dünndarmgewebe (histologischer Schnitt in Abbildung 4-26A) gewonnen wird. Die Gefäßsystem-Matrix der BioVaSc kann zunächst mit Endothelzellen und die Darmwandmatrix anschließend mit

den hKDCs besiedelt werden. Das 3D-Konstrukt lässt sich mit Zellkulturmedium durch das Gefäßsystem mit einem physiologischen Druck von 120 zu 80 mmHg in einem regulierten Bioreaktorsystem perfundieren. Damit stellt es ein komplexes Modell dar, das der In-vivo-Situation sehr ähnelt.

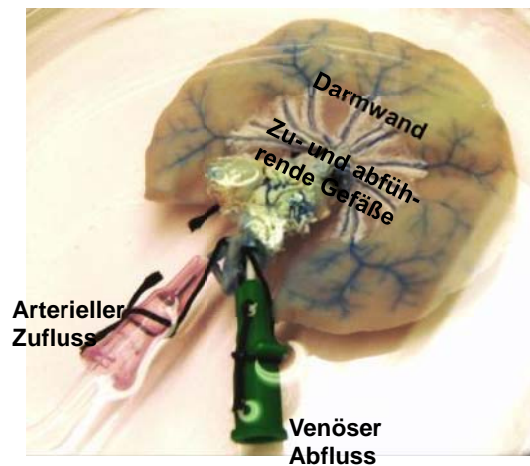


Abbildung 4-25: BioVaSc im Reaktor. Gefäße zur Visualisierung mit Trypanblau angefärbt.

Für die Herstellung der BioVaSc erfolgte die Präparation eines Darmsegments mit dem dazugehörigen Gefäßsystem und die anschließende arterielle und lumenale Perfusion wie in 3.5.2 beschrieben, um die porcinen Zellen zu entfernen. In Abbildung 4-26B,C ist die azellularisierte Matrix gezeigt. Es ist die ECM-Struktur des Dünndarms erkennbar. Intakte Zellen waren nicht mehr vorhanden. Ausschließlich in den Zottenstrukturen waren noch blau gefärbte DNA-Rückstände zu beobachten.

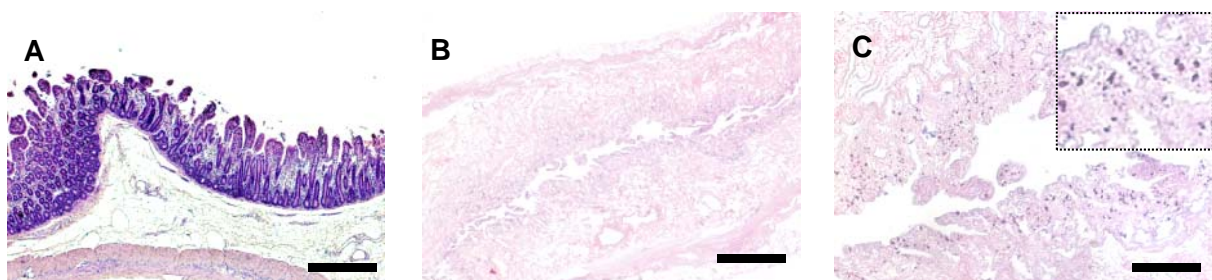


Abbildung 4-26: HE-Färbung des nativen porcinen Dünndarmgewebes (A) und der der azellularisierten BioVaSc (B,C). Maßstabsbalken = 500 µm

Es wurden insgesamt fünfzehn Versuche mit hKDCs in der BioVaSc unter dynamischer Kultivierung durchgeführt. Bei drei der Versuche wurde die Mucosa der BioVaSc zusätzlich entfernt und bei fünf Versuchen wurden die hKDCs mit HDMECs co-kultiviert. In Tabelle 4-1 sind die Versuche, auf die in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen wird, aufgeführt.

Tabelle 4-1: Übersicht der Versuche zur dynamischen Kultur der hKDCs in der BioVaSc

Ver-such	Zelltyp/ Passage	Zellzahl	Kultur- zeitraum	Besonderheiten	Allgemeines Ergebnis
BR1	hKDCs p4 HDMECs p4	$5.0 \cdot 10^6$ $6.0 \cdot 10^6$	21 Tage	hKDC-Aussaat in zwei Schritten (4 Stunden Zeitdifferenz, vor 2. Besiedlung Wenden der BioVaSc)	Erfolgreiche Besiedlung beider Seiten, jedoch nicht durchgängig
BR2	hKDCs p4 HDMECs p3	$1.0 \cdot 10^6$ $27 \cdot 10^6$	28 Tage	hKDC-Aussaat in zwei Schritten (24 Stunden Zeitdifferenz, vor 2. Besiedlung Wenden der BioVaSc)	Nur kleiner Bereich erfolgreich besiedelt, Zellaggregatbildung, Zellwachstum in mehreren Schichten
BR3	hKDCs p4	$5.0 \cdot 10^6$	23 Tage	hKDC-Aussaat in zwei Schritten (4 Stunden Zeitdifferenz, vor 2. Besiedlung Wenden der BioVaSc)	Homogene Besiedlung beider Seiten, aber keine durchgehende Zellschicht; Zellaggregatbildung, mehrere Zellschichten, inhomogene Morphologie
BR4	hKDC p4	$5.0 \cdot 10^6$	21 Tage	Kontrolle für BR5 (wie BR3)	Wie BR3
BR5	hKDCs p4	$2.5 \cdot 10^6$	23 Tage	Mucosa entfernt, Besiedlung wie BR4	Deutlich größere Zellaggregate als bei Kultur auf der Mucosa; Wachstum in mehreren Schichten im Wechsel mit einschichtigem Wachstum mit epithelialer Morphologie
BR6	hKDCs p5	$5.0 \cdot 10^6$	21 Tage	Wie BR3	Vergleichbar mit BR3, aber weniger Zellen
BR7	hKDCs p5 HDMECs p3	$5.0 \cdot 10^6$ $50 \cdot 10^6$	21 Tage	Einfluss der Co-Kultur mit HDMECs	Homogene Besiedlung beider Seiten, aber keine durchgehende Zellschicht; Zellaggregatbildung, mehrere Zellschichten, inhomogene Morphologie
BR8	hKDCs p5 HDMECs p3	$5.0 \cdot 10^6$ $20 \cdot 10^6$	21 Tage	Einfluss der Co-Kultur mit HDMECs	Keine HDMECs gefunden hKDCs: keine durchgehende Zellschicht; Zellaggregatbildung, mehrere Zellschichten abwechselnd mit einschichtigem Wachstum; inhomogene Morphologie

4.5.1 Besiedlung der Gefäßmatrix mit HDMECs

In einigen Versuchen wurde die Gefäßsystem-Matrix mit HDMECs rebesiedelt, wie in 3.6.2 beschrieben. Die Identität und Funktionalität der verwendeten Zellen ließ sich über die immunocytochemischen Färbungen von CD31 und vWF sowie dem Nachweis der acLDL-Aufnahme analog zu den Versuchen mit HDMECs auf der SIS (siehe 4.3.7) überprüfen.

Nach der Co-Kultivierung von HDMECs und hKDCs auf der BioVaSc wurden die HDMECs über ihre Marker CD31 und vWF immunhistochemisch in der Matrix nachgewiesen. Insbesondere im Bereich des Mesenteriums kleideten sie einige Gefäße aus (Abbildung 4-27). Bei den Querschnitten der Darmwand ist zu erkennen, dass sich dort ebenfalls HDMECs angesiedelt haben. Die größeren Gefäße waren mit einer dünnen Schicht Zellen ausgekleidet, die Lumina der kleineren Kapillaren waren komplett mit HDMECs ausgefüllt.

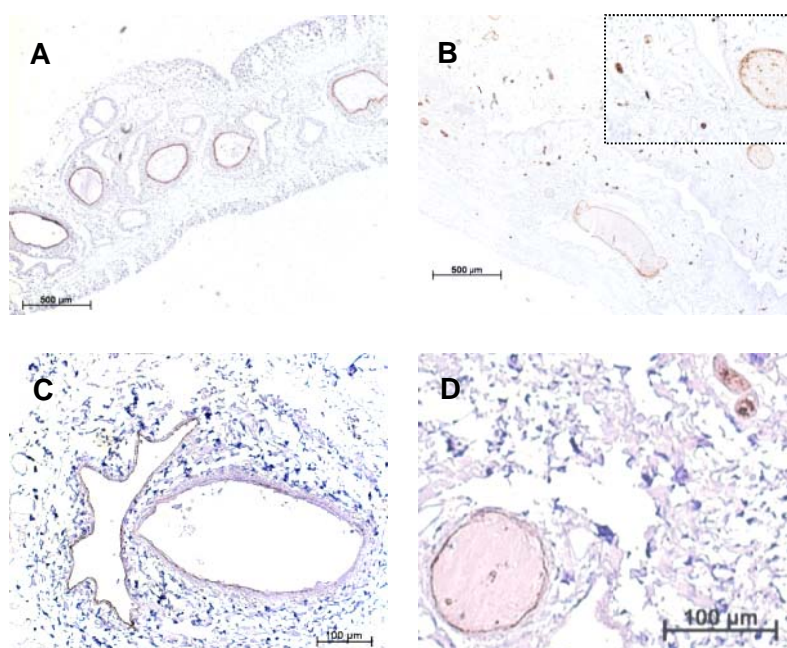


Abbildung 4-27: Immunhistochemie von CD31 (A,B) und vWF (C,D) von BR 7. Querschnitt des Mesenteriums (A,C), Querschnitt der Darmwand (B,D). Größere Gefäße werden von HDMECs ausgekleidet während kleinere Gefäße mit HDMECs ausgefüllt sind.

4.5.2 Überprüfung der Stoffwechselaktivität und der Besiedlungsdichte

Die histologischen Analysen dienen der Bewertung des Wachstums und der Morphologie bei Versuchsende. Für die Bewertung der Kultur während der Kultivierungszeit erfolgte die Messung von Stoffwechselfparametern. Des Weiteren wurden am Ende der Kultur ein MTT-Test

(siehe 3.8) sowie die Lebend-Tot-Färbung (siehe 3.9) eines Teilsegments der BioVaSc implementiert. Damit ließ sich die Besiedlungsdichte über einen größeren Bereich als bei der Histologie analysieren.

Die Stoffwechselfparameter Glucose, Laktat und Laktatdehydrogenase (LDH) konnten über entnommene Medienproben während die Kultivierungsphase wie in 3.7 beschrieben analysiert werden. Der Glucoseverbrauch sowie die Laktatfreisetzung korrelieren allgemein mit der Stoffwechselaktivität von Zellen. LDH hingegen ist ein intrazelluläres Enzym, das beim Absterben von Zellen ins Medium freigesetzt wird. In Abbildung 4-28A sind exemplarisch anhand von den Versuchen BR3, BR4 und BR6 die typischen Kurvenverläufe bei Kulturen mit vitalen, stoffwechselaktiven Zellen zu erkennen. Die Glucosekonzentration fiel zu Anfang sowie nach den Medienwechseln ab, d.h. Glucose wurde verbraucht. Die Laktatkonzentration verlief gegenläufig. Dies bestätigte die Stoffwechselaktivität der Zellen. Die LDH-Aktivität war zu Beginn der Kultur am höchsten.

Die Daten zeigen insgesamt, dass die Messung der Stoffwechselfparameter eine geeignete Inprozesskontrolle für die dynamische Kultur der hKDCs in der BioVaSc darstellt und dass die hKDCs über den gemessenen Zeitraum von 21 bis 23 Tagen in der BioVaSc stoffwechselaktiv blieben.

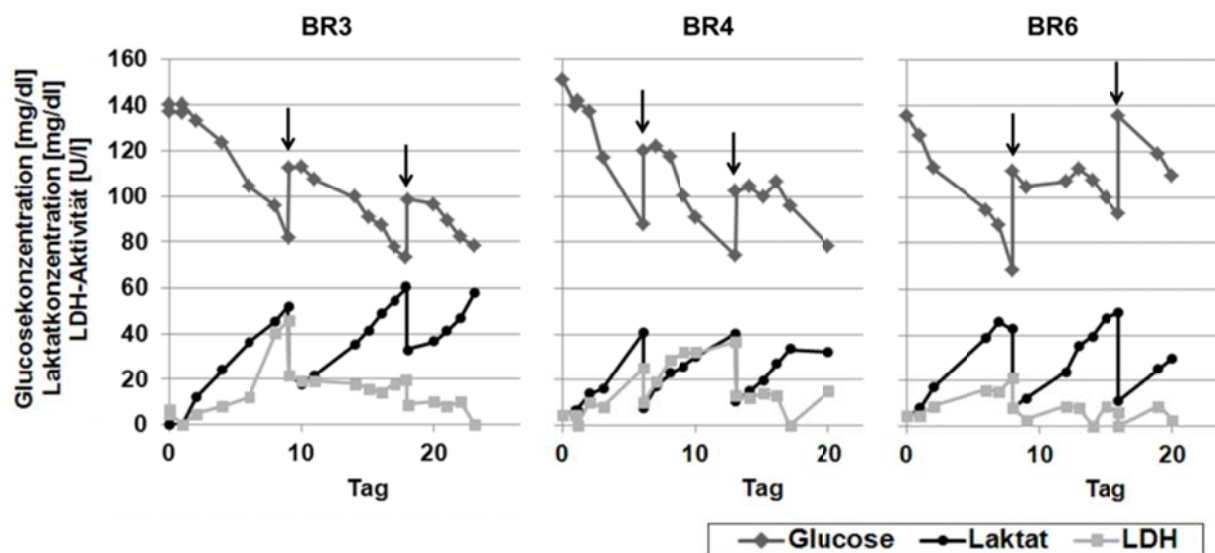


Abbildung 4-28: Verlauf der Stoffwechselfparameter Glucose, Laktat und Laktatdehydrogenase bei dynamischen hKDC-Kulturen in der BioVaSc über 21 bis 23 Tage (Versuche BR3, BR4 und BR6). Pfeile = Zeitpunkte der Medienwechsel

Zur Bewertung der Besiedlungsdichte über einen größeren Bereich als bei der histologischen Analyse wurde von jeder BioVaSc nach der Kultivierung ein Teilsegment (10-20 % der BioVaSc) in einer MTT-Lösung inkubiert. In Abbildung 4-29 ist beispielhaft ein MTT-Test ei-

nes Segments aus einer BioVaSc, die mit hKDCs und Endothelzellen besiedelt und dynamisch kultiviert wurde, dargestellt. Anhand der blauen Färbung ist erkennbar, dass ca. 80 % des Matrixlumens in diesem Segment mit Zellen ausgekleidet waren. In den Gefäßstrukturen, in die die Endothelzellen ausgesät wurden, war ebenfalls eine durchgängig blaue Färbung sichtbar. Dies zeigte, dass beide Zelltypen in der BioVaSc in Co-Kultur hohe Besiedlungsdichten erreichen konnten.

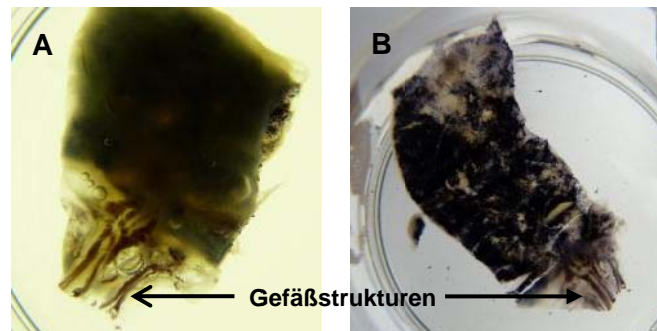


Abbildung 4-29: MTT-Test eines mit Endothelzellen und hKDCs besiedelten BioVaSc-Teilsegments nach der dynamischen Kultur im Bioreaktor. Geschlossenes Lumen (A) und aufgeschnittenes Lumen (B). Vitale Zellen waren in den Gefäßstrukturen und großflächig auf der Mucosamatrix nachweisbar.

Die Besiedlungsdichte ließ sich weiterhin über eine Lebend-Tot-Färbung, wie in 3.9 beschrieben, untersuchen. Dabei wurden vitale Zellen mit dem grün fluoreszierenden Fluoresceindiazetat und abgestorbene Zellen mit dem rot fluoreszierenden Propidiumiodid markiert. In Abbildung 4-30 ist eine Lebend-Tot-Färbung des Matrixlumens dargestellt. Es ist erkennbar, dass nur sehr wenige abgestorbene, rot fluoreszierende Zellen in der Matrix vorhanden waren. Die grün fluoreszierenden, vitalen hKDCs bedeckten die Zottenstrukturen der Mucosamatrix.

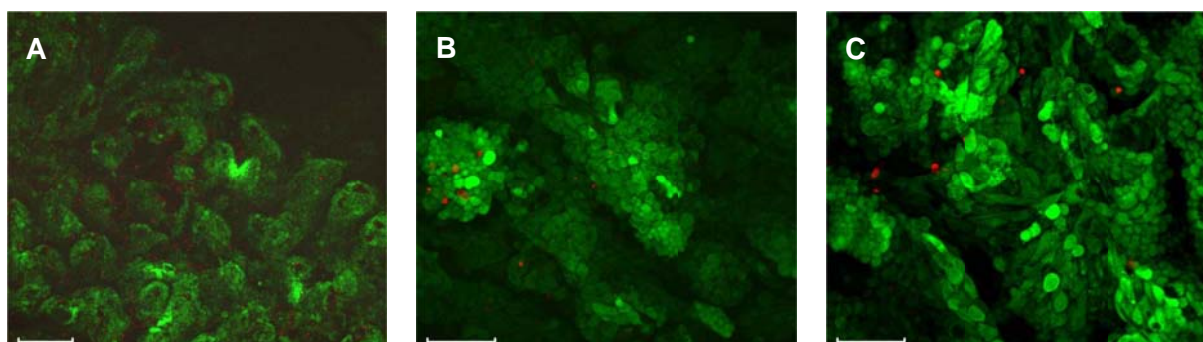


Abbildung 4-30: Lebend-Tot-Färbung der mit hKDCs besiedelten BioVaSc-Matrix (BR8). Vitale hKDCs bedeckten die Zottenstrukturen der Mucosamatrix; es waren nur wenige abgestorbene Zellen nachweisbar. Maßstabsbalken A = 200 µm, B und C = 100 µm. Fluoresceindiazetat (vitale Zellen) = grün, Propidiumiodid (tote Zellen) = rot

4.5.3 Morphologie und Markerexpression

Das Wachstum und die Morphologie der hKDCs auf der Mucosa-ECM unterschieden sich innerhalb verschiedener Regionen einer BioVaSc sowie zwischen den einzelnen BioVaSc-Versuchen. In einigen Bereichen war mehrschichtiges Wachstum mit sich ablösenden Zellaggregaten erkennbar (Abbildung 4-31A). In den Zellaggregaten waren die Zellen dicht beieinander und die Zellgrenzen schwer erkennbar. Daher konnte die Form der Zellen nicht eindeutig bestimmt werden. In anderen Regionen zeigten die Zellen ein einschichtiges Wachstum mit hochprismatischer Morphologie (Abbildung 4-31B). Ferner gab es Bereiche, in denen die Mucosamatrix nur lückenhaft durch die hKDCs bedeckt war (Abbildung 4-31C). Die Zellen hatten in diesen Bereichen eine rundliche Morphologie. Eindeutige Unterschiede in der Matrixbeschaffenheit zwischen den Bereichen mit unterschiedlichem Zellwachstum waren mikroskopisch nicht erkennbar.

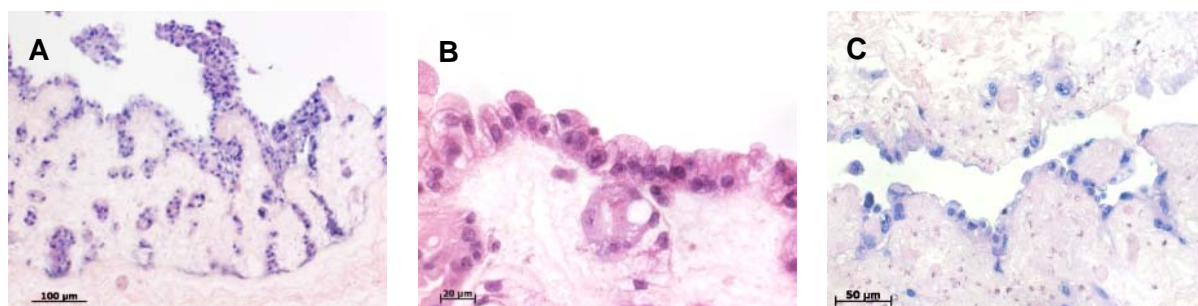


Abbildung 4-31: Unterschiedliches Wachstum der hKDCs in der BioVaSc nach dynamischer Kultivierung. Es war mehrschichtiges Wachstum mit sich ablösenden Zellaggregaten (A), einschichtiges Wachstum mit hochprismatischer Morphologie (B) sowie eine undurchgängige Zellschicht (C) in den HE-Färbungen erkennbar.

Die hKDCs in der BioVaSc wurden mittels Immunhistochemie und Lektinfärbungen weiter charakterisiert. N-Cadherin als Marker der Zell-Zell-Kontakte proximaler Tubuluszellen konnte bei den hKDCs aller Versuche unabhängig von den verschiedenen Kulturbedingungen durchgängig immunhistochemisch angefärbt werden (Abbildung 4-32A). Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von E-Cadherin als Marker späterer Nephronsegmente variierten stark zwischen den Experimenten (Abbildung 4-32B). In einigen Experimenten war kaum E-Cadherin detektierbar, in anderen Versuchen waren nahezu alle Zellen in der E-Cadherin-Immunhistochemie braun gefärbt.

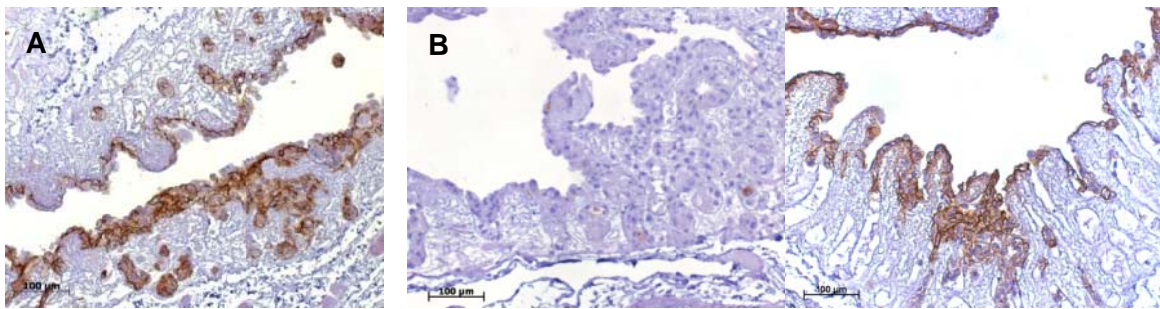


Abbildung 4-32: Immunhistochemische Färbung von N-Cadherin bei BR 8 (A) und E-Cadherin bei BR 2 (links) und BR 7 (rechts) (B)

Die Expression des proximalen Markers Aquaporin-1 unterschied sich ebenfalls zwischen den Versuchen (Abbildung 4-33A). In der Mehrzahl der Experimente ließ sich eine spezifische Färbung speziell an der apikalen Zellmembran von einem Teil der Zellen beobachten. Bei anderen Versuchen war Aquaporin-1 nur an vereinzelt Zellen detektierbar. Aquaporin-2 wurde von den hKDCs in der BioVaSc nicht exprimiert (Abbildung 4-33B).

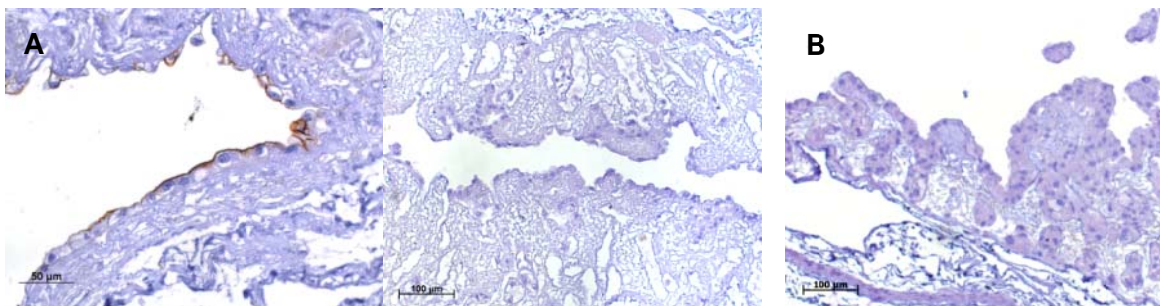


Abbildung 4-33: Immunhistochemische Färbung von Aquaporin-1 bei BR 1 (links) und BR 7 (rechts) (A) und Aquaporin-2 bei BR 2 (B)

In Abbildung 4-34A ist erkennbar, dass nach der dreiwöchigen Kultur noch Ki67-positive Zellen detektierbar waren. Die Färbung zeigte die Proliferaton der hKDCs auch in mehrschichtigen Bereichen.

Eine spezifische Kollagen-Typ-IV-Färbung war an der basalen Seite der hKDCs im Gegensatz zu azellulären Matrix (Abbildung 4-34C) an einigen Stellen, jedoch nicht durchgängig, vorhanden (Abbildung 4-34B). Dies zeigte die Kollagen-Typ-IV-Synthese durch einen Teil der hKDCs in der BioVaSc.

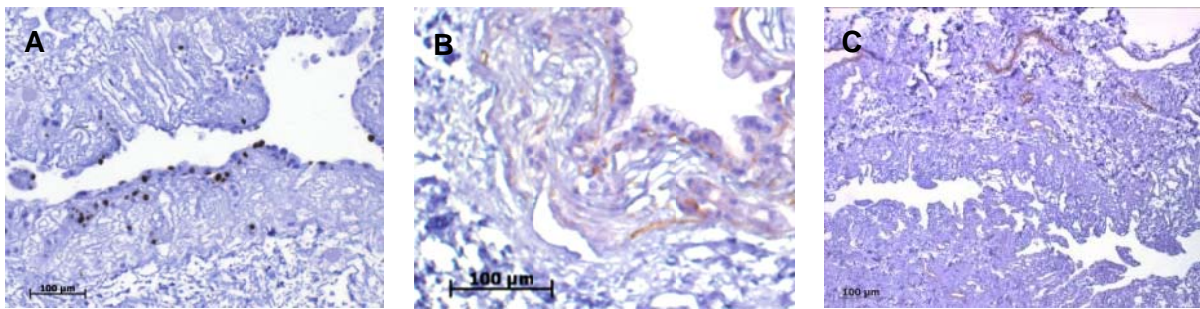


Abbildung 4-34: Immunhistochemische Färbung von Ki67 bei BR 3 (A) und Kollagen Typ IV bei BR 1 (B) und einer azellulären BioVaSc als Kontrolle (C)

In den meisten Kulturen konnten die hKDCs sowohl durch LTL, als auch DBA angefärbt werden. Es kam weiterhin vor, dass der Großteil der Zellen durch DBA und nur ein geringer Teil durch LTL anfärbbar waren (Abbildung 4-35).

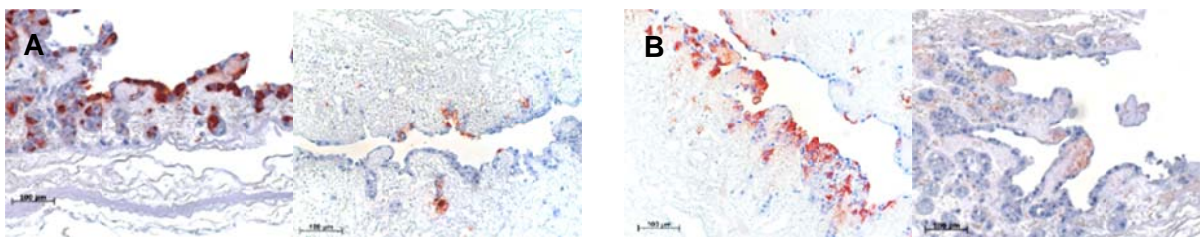


Abbildung 4-35: Lektinfärbung mit LTL bei BR 2 (links) und BR 7 (rechts) (A) und DBA bei BR 2 (links) und BR 7 (rechts) (B)

4.5.4 Kultur der hKDCs auf der Submucosa der BioVaSc

Die SIS-Versuche hatten bereits gezeigt, dass die Submucosa des porcinen Darms eine geeignete Matrix für die Ausbildung typischer Charakteristika renaler proximaler Tubuluszellen der hKDCs darstellt. Daher bestand ein Ansatz zur Optimierung des hKDC-Wachstums in der BioVaSc darin, die Mucosa auch bei dieser Matrix mechanisch zu entfernen und somit die hKDCs auf die Submucosa auszusäen.

Die HE-Färbungen der Matrix zeigten, dass die Mucosa weitgehend entfernt werden konnte, nur in wenigen Bereichen war die Mucosamatrix noch sichtbar (Abbildung 4-36).

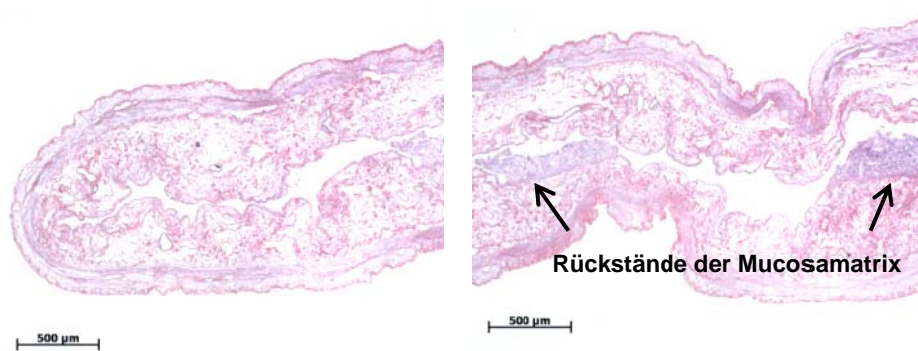


Abbildung 4-36: HE-Färbung der BioVaSc mit entfernter Mucosa. Für die Kultur der hKDCs auf der Submucosa der BioVaSc ließ sich die Mucosa bis auf einige Rückstände entfernen.

Die ausgesäte Zellzahl der hKDCs wurde aufgrund der geringeren Oberfläche der planaren Submucosa im Vergleich zur Zottenstruktur der Mucosa um 50 % reduziert. Wie in Abbildung 4-37A,B dargestellt, führte die Aussaat der hKDCs auf die Submucosamatrix der BioVaSc zu noch stärkerem mehrschichtigem Wachstum als auf der Mucosamatrix. Die ist insbesondere im direkten Vergleich von Bereichen mit erfolgreich entfernter Mucosamatrix zu Bereichen mit Mucosa-Rückständen zu erkennen. Alternierend mit den mehrschichtigen Bereichen war einschichtiges Wachstum zu erkennen (Abbildung 4-37C). In den einschichtigen Bereichen wiesen die Zellen eine hochprismatische Morphologie mit basal abgesenktem Zellkern auf.

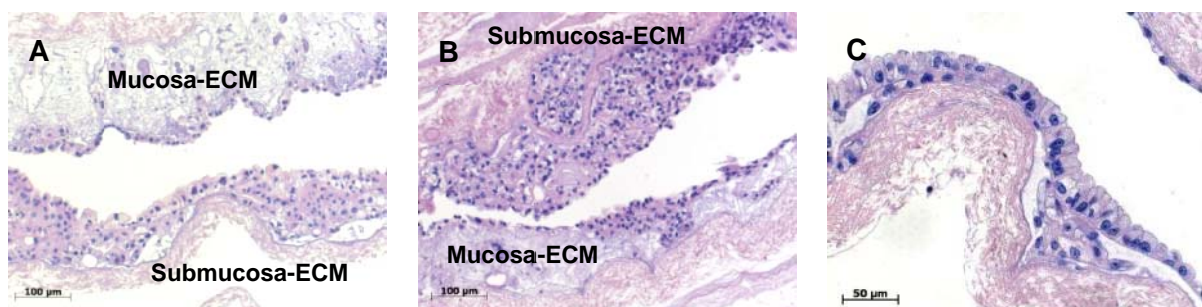


Abbildung 4-37: HE-Färbung der hKDCs in der BioVaSc mit entfernter Mucosa nach der dynamischen Kultivierung (BR5). Stark mehrschichtiges Wachstum der hKDCs auf der Submucosa im Vergleich zu geringerer Zelldichte auf Mucosa-ECM-Rückständen (A,B). Einschichtiges Wachstum mit hochprismatischer Morphologie (C).

In den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich, dass sowohl N- als auch E-Cadherin stark exprimiert wurden (Abbildung 4-38A,B). Aquaporin-1 war vor allem an den Zellgrenzen erkennbar. Des Weiteren waren runde Hohlräume innerhalb großer Zellanhäufungen von Aquaporin-1 umrandet (Abbildung 4-38C). Anhand der Ki67-Färbung (Abbildung 4-38D) war

die starke Proliferation der hKDCs innerhalb der Zellanhäufungen noch nachweisbar. Mit dem LTL konnten nur wenige Zellen angefärbt werden (Abbildung 4-38E). Die Färbung mit dem DBA war hingegen deutlich stärker (Abbildung 4-38F). Somit war die Ausbildung proximaler Marker nicht vorherrschend.

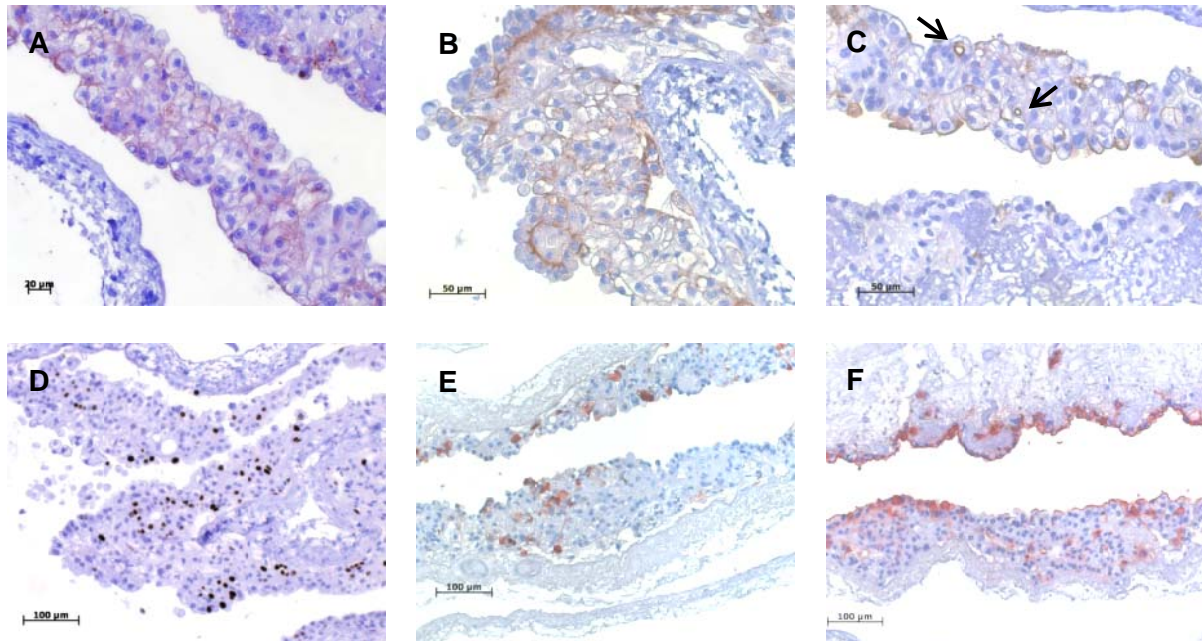


Abbildung 4-38: Immunhistochemische Färbung von N-Cadherin (A), E-Cadherin (B), Aquaporin-1 (C), Ki67 (D) und Lektinfärbung mit LTL (E) und DBA (F) bei BR 5

4.6 Übersicht der Markerexpression

In Tabelle 4-2 sind die Ergebnisse der Lektin- und Immunfärbungen über die verschiedenen Kultivierungsbedingungen zusammengefasst.

N-Cadherin als Marker proximaler Tubuluszellen wurde sowohl bei der Kultur in Chamber Slides™ als auch auf den natürlichen Matrices von allen hKDCs exprimiert. Aquaporin-1 ließ sich nur bei einem geringen Anteil der Ausgangszellen nachweisen. Die Kultur der hKDCs auf der SIS führte jedoch zu einem deutlichen Anstieg Aquaporin-1-exprimierender Zellen. In Co-Kultur mit HDMECs auf der SIS und bei Kultivierung in der BioVaSc ließ sich keine oder nur eine schwache Erhöhung der Aquaporin-1-Expression gegenüber den Ausgangszellen erzielen. Diese Tendenz spiegelte sich auch bei der LTL-Färbung wider.

E-Cadherin als Marker späterer Nephronabschnitte wurde von einem geringeren Anteil der hKDCs auf der SIS als der Ausgangszellen exprimiert. Bei Kultur in der BioVaSc variierten die Ergebnisse zwischen den Versuchen sehr stark. Aquaporin-2 war unter keiner der getesteten Kultivierungsbedingungen nachweisbar.

Die Färbung durch DBA war sowohl bei den Ausgangszellen als auch nach der Kultur auf der SIS nur bei einem geringen Anteil der hKDCs positiv. In Co-Kultur mit HDMECs auf der SIS und bei der Kultur in der BioVaSc ließ sich ein größerer Anteil der Zellen mit DBA anfärben, wobei die Ergebnisse der BioVaSc-Kultur wieder stark zwischen den verschiedenen Versuchen variierten.

Anhand der Ki67-Färbung ließ sich zeigen, dass nach der 21-tägigen Kultur auf der SIS nach Erreichen der Konfluenz keine oder nur vereinzelte hKDCs proliferierten. In der BioVaSc waren in einigen Bereichen noch vermehrt proliferierende Zellen nachweisbar.

Kollagen Typ IV wurde von den hKDCs auf der SIS und in der BioVaSc synthetisiert und basal sekretiert. Im Gegensatz zu der durchgängigen Schicht auf der SIS war Kollagen Typ IV in der BioVaSc jedoch nur punktuell nachweisbar.

Die HK-2-Zellen exprimierten auf der SIS N-Cadherin. E-Cadherin, Aquaporin-1 und -2 wurden hingegen nicht exprimiert. Weiterhin waren die LTL- und DBA-Färbung negativ. Am Ende der Kultur waren noch durchgehend proliferierende Zellen nachweisbar. Kollagen Typ IV ließ sich punktuell zwischen den Zellschichten anfärben. Die Ergebnisse zeigen, dass die HK-2-Zellen im Vergleich zu den hKDCs weniger proximale Marker und epitheliale Eigenschaften aufwiesen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Kultur der hKDCs auf der SIS die Expression proximaler Marker sowie die Ausbildung allgemeiner epithelialer Charakteristika wie die Kontakthinhibition und Basalmembranbildung von den getesteten Kulturmodellen am stärksten gefördert hat.

Tabelle 4-2: Übersicht der Markerexpression über die verschiedenen Kultivierungsbedingungen. - = 0 %, +/- = >0 % bis 10 %, + = >10 % bis 40 %, ++ = >40 % bis 70 %, +++ = >70 % bis 100 % der Zellen waren positiv für den untersuchten Marker. n.b. = nicht bestimmt

Substrat:	Chamber Slides™	SIS			BioVaSc	BioVaSc ohne Mucosa
		hKDCs	hKDCs	hKDCs + HDMECS		
N-Cadherin	+++	+++	+++	+++	+++	+++
E-Cadherin	++	+	+	-	+/- bis +++	+++
Aquaporin-1	+/-	+/**	+/-	-	+/-	+
Aquaporin-2	-	-	-	-	-	-
LTL	+	++	+	-	+/- bis ++	+
DBA	+/-	+/-	+	-	+/- bis +/**	+
Ki67	n.b.	Keine bzw. vereinzelte Zellen	Keine bzw. vereinzelte Zellen	+, homogene Verteilung	+/-, bereichsweise +	+/-, bereichsweise +
Kollagen Typ IV	n.b.	Basale, durchgängige Schicht	Basale, durchgängige Schicht	Punktuell zwischen den Zellschichten	Punktuell an der basalen Zellseite	n.b.

5 Diskussion

In-vitro-Gewebemodelle gewinnen sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der pharmakologischen Entwicklung und in klinischen Anwendungen an Bedeutung. Voraussetzung für die Relevanz der Modelle ist die Funktionalität der Zellen bzw. des Gewebes und damit verbunden die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Prozesse im analogen humanen Gewebe. Dabei spielt vor allem die Verfügbarkeit einer geeigneten Kombination aus Zellquelle, Matrices und Kulturbedingungen eine entscheidende Rolle [Griffith und Swartz, 2006; Justice *et al.*, 2009; Pampaloni *et al.*, 2007; Pampaloni und Stelzer, 2010].

In Hinblick auf den renalen proximalen Tubulus bestehen verschiedene Anwendungsbereiche, in denen Zell-Matrix-Konstrukte, die das In-vivo-Epithel imitieren, von großer Bedeutung sind. Dazu gehören die Grundlagenforschung, pharmakologische Testungen sowie die Entwicklung von bioartifiziellen Nierenersatzsystemen. Dies ist damit zu begründen, dass der renale proximale Tubulus eine Vielzahl lebenswichtiger endogener Funktionen ausübt, die vor allem die Rückresorption von nützlichen Substanzen aus dem Primärharn sowie die Sekretion von endogenen und exogenen Abfallprodukten in den Primärharn umfassen [Schmidt, 2010]. Bedingt durch die dafür nötigen Transportkapazitäten ist das proximale Tubulusepithel jedoch sehr empfindlich gegenüber der Toxizität durch diverse Fremdstoffe, wie Toxine und einige Arzneimittel [Jennings *et al.*, 2008]. Sie können über die diversen Transportproteine in die Zellen aufgenommen werden [Inui *et al.*, 2000; Launay-Vacher *et al.*, 2006], in ihnen akkumulieren und selbst oder über ihre Abbauprodukte die Epithelzellen schädigen. Sind größere Bereiche des Epithels davon betroffen, kann dies zu einer unter Umständen lebensgefährlichen Einschränkung der Nierenfunktion führen. Daher ist es erforderlich, die Toxizität neuer Arzneimittelkandidaten auf das renale proximale Tubulusepithel in präklinischen Studien zu untersuchen; diese Studien werden zumeist im Tier durchgeführt. Zu ihren Nachteilen gehören vor allem Spezies-spezifische Unterschiede, z.B. bezüglich der Expression von Transportproteinen und Enzymen. Dadurch können Nebenwirkungen, die im Menschen auftreten, im Tiermodell unerkant bleiben [Bleasby *et al.*, 2006; Knight, 2008; Perel *et al.*, 2007]. In-vitro-Modelle mit humanen Zellen bieten hier eine Alternative. Sie erlauben zudem Untersuchungen an einzelnen Zelltypen.

Für den Ausgleich der fehlenden Nierenfunktion bei Nierenschädigungen hat sich die Hämodialyse bewährt. Sie kann jedoch nur die glomeruläre Filtration zu einem gewissen Grad ersetzen, nicht aber die Rückresorption nützlicher Substanzen sowie regulatorische, metaboli-

sche und endokrine Funktionen. Daher gibt es Entwicklungen, das Dialysesystem um einen zellulären Anteil zu ergänzen [Ding und Humes, 2008; Humes *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 2011; Oo *et al.*, 2011; Tasnim *et al.*, 2010; Tumlin *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009]. Dabei kommen aufgrund der zuvor aufgeführten Funktionen insbesondere renale proximale Tubuluszellen zur Anwendung. Am intensivsten erforscht werden hierfür primäre Zellen humaner Herkunft, da die verfügbaren Zelllinien einen transformierten Phänotyp und damit eine oft eingeschränkte Funktionalität aufweisen und bei der Verwendung tierischer Zellen die Gefahr der Immunität und Virusübertragung in klinischen Anwendungen besteht. Eine große Herausforderung stellt die limitierte Verfügbarkeit primärer humaner Zellen dar, weshalb nach weiteren geeigneten Zellquellen, z.B. Stammzellen, gesucht wird. Neben der Zellquelle ist auch die Entwicklung geeigneter Matrices bedeutsam. Sie müssen die Bildung der Epithelschicht ermöglichen und zusätzlich hämokompatibel sowie praktisch anwendbar sein.

Bisher ist es nicht gelungen, ein renales proximales Epithel, das für die oben genannten Anwendungsbereiche umfassend geeignet ist, *in vitro* aufzubauen, zu erhalten und für nephrotoxische Untersuchungen einzusetzen. Es besteht ein Bedarf an geeigneten, ausreichend zur Verfügung stehenden Zellquellen sowie an Materialien und Kulturbedingungen, die die Ausbildung des charakteristischen Phänotyps der Zellen fördern. Bei bisherigen Arbeiten kamen sowohl humane und xenogene Primärzellen als auch Zelllinien zum Einsatz. Zelllinien sind jedoch in ihrem zellulären Verhalten stark gegenüber dem Ausgangszelltyp verändert; primäre Zellen verlieren hingegen ihre Funktionalität *in vitro* sehr schnell und sind nur begrenzt verfügbar und expandierbar.

Mit der Erkenntnis, dass Vorgänge zur Regeneration des proximalen Tubulusepithels *in vivo* stattfinden, folgte die Erforschung der Zellen, die zur Regeneration beitragen. Dabei zeigte sich, dass endogene Zellen der Niere eine zentrale Rolle im Regenerationsprozess spielen. Dabei kann es sich sowohl um dedifferenzierte Tubuluszellen als auch Progenitorzellen *per se* handeln [Benigni *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2006; Humphreys *et al.*, 2011; Humphreys *et al.*, 2008; Lindgren *et al.*, 2011; Oliver *et al.*, 2004]. Diese Zellen könnten eine interessante Zellquelle für *In-vitro*-Anwendungen darstellen, da sie ein erweitertes Proliferationspotential gegenüber primären Zellen aufweisen, im Gegensatz zu Zelllinien nicht genetisch verändert sind und somit unter geeigneten Kulturbedingungen noch die zellspezifischen Charakteristika ausbilden können. Zu diesen Zellen gehören auch die in dieser Arbeit verwendeten „Human Kidney-derived Cells“ (hKDCs). Sie weisen verschiedene allgemeine und nierenspezifische Stamm- bzw. Progenitorzellmarker auf [Colter *et al.*, 2008].

In Hinblick auf ein *In-vitro*-Gewebe-Modell spielt neben der Zellquelle das Kultursubstrat eine entscheidende Rolle für das Wachstum und die Differenzierung der Epithelzellen. Es hat sich

in bisherigen Studien gezeigt, dass Bestandteile der natürlichen ECM die Ausbildung zelltypischer Charakteristika am stärksten fördern [Guo *et al.*, 2008; Terryn *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009]. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit natürliche Matrices mit verschiedenen Komplexitätsgraden getestet. Dazu gehörten eine einfache Einkomponentenbeschichtung mit Kollagen Typ I sowie ein dreidimensionales Kollagen-Typ-I-Hydrogel, wie sie beide bereits für die Kultur renaler Tubuluszellen verwendet wurden. Weiterhin wurden die natürlichen porcinen Matrices „Small intestinal Submucosa“ (SIS) und Biological Vascularized Scaffold (BioVaSc) miteinbezogen. Im Gegensatz zu den bisher für die Kultur von renalen Tubuluszellen verwendeten einzelnen Matrixkomponenten oder Kombinationen bestehen diese beiden Matrices aus einer Vielzahl verschiedener Komponenten, wie Proteinen (z.B. Kollagen), Proteoglykanen und Wachstumsfaktoren [Brown-Etris *et al.*, 2002; Mertsching *et al.*, 2005; Schultheiss *et al.*, 2005].

In dieser Arbeit erfolgte zunächst die Charakterisierung der hKDCs hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials in extrarenale Zelltypen. In der Literatur ist die osteogene und adipogene Differenzierbarkeit für embryonale renale Progenitorzellen beschrieben [Lazzeri *et al.*, 2007]. Die Induktion der jeweiligen Differenzierung erfolgte über Medienzusätze und die Auswertung anhand histochemischer Färbungen. Es zeigte sich, dass hKDCs sich osteogen, jedoch nicht adipogen und chondrogen differenzieren lassen. Dies lässt auf eine, wenn auch eingeschränkte, Plastizität schließen. Sie bestätigt den Status der hKDCs als nicht final differenzierte Progenitorzellen.

Im Gegensatz zu Fibroblasten und MSCs wurden die hKDCs nach der Isolation durch ATRM nicht direkt in Stammzellmedium, sondern in einem Zellkulturmedium für renale Epithelzellen (REGM) kultiviert und kryokonserviert. Erst beim Auftauen der Zellen und der Expansion für die Differenzierungsversuche erfolgte die Kultur in den Stammzellmedien. Dies beeinflusste möglicherweise die Plastizität der hKDCs. Für weitere Differenzierungsversuche wären daher hKDCs, die direkt nach der Isolation in Stammzellmedien kultiviert werden, besser geeignet. Humane dermale Fibroblasten wurden als Negativkontrolle für die Differenzierungsversuche verwendet, da sie im Allgemeinen als final differenziert gelten. In den vorliegenden Versuchen ließen sich nach der Expansion in Stammzellmedium jedoch die adipogene sowie die chondrogene Differenzierung induzieren. Dies wurde von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls beobachtet [Junker *et al.*, 2010].

Zur Charakterisierung der Ausprägung renaler Tubulusmarker der hKDCs vor der Kultur auf den natürlichen Matrices erfolgten cytochemische Färbungen. Es wurden Marker des proximalen Tubulus als auch Marker späterer Tubulussegmente miteinbezogen. Dabei konnte N-Cadherin, das zur Ausbildung von Adhärenzverbindungen in renalen proximalen Tubuluszel-

len exprimiert wird [Prozialeck und Edwards, 2007], durchgängig in den hKDCs nachgewiesen werden. Aquaporin-1 als Kanalprotein für die Wasserresorption im renalen proximalen Tubulusepithel [Nielsen *et al.*, 2002] war nur bei vereinzelt hKDCs nachweisbar. Marker späterer Tubulusabschnitte waren deutlich schwächer als der analoge proximale Marker (E-Cadherin) bzw. nicht (Aquaporin-2) exprimiert. Dies zeigt, dass die hKDCs neben den Progenitorzeleigenschaften bereits einige proximale Marker aufweisen. Da N-Cadherin bei allen Zellen detektierbar war, E-Cadherin jedoch auch bei 20 bis 30 % der Zellen, zeigt die Co-Expression von N- und E-Cadherin in diesem Anteil der Zellen. Dies ließ sich auch beim Nierenzellkarzinom, das v.a. das proximale Tubulusepithel betrifft, beobachten [Tani *et al.*, 1995] und könnte daher auf einen veränderten Phänotyp eines Teils der hKDCs hinweisen.

Die immunocytochemischen Färbungen zeigten, dass eine inhomogene Zellpopulation vorlag. Dies wurde durch die Lektinfärbungen bestätigt. Es wäre zu klären, ob bereits bei der Isolation eine Inhomogenität der Zellpopulation besteht oder ob sich die Zellen während der Kultivierung unterschiedlich entwickeln.

Die hKDCs wurden in Zellkulturplatten, auf Zellkulturplatten-Inserts mit Kollagen-Typ-I-beschichteten PET-Membranen sowie in Kollagen-Typ-I-Hydrogelen bis zu drei Wochen kultiviert, um ihr Potential auf bzw. in konventionellen Kultursubstraten renaler Tubuluszellen zu untersuchen. Dabei war zu beobachten, dass hKDCs in Zellkulturplatten und auf Inserten in mehreren Schichten übereinander wuchsen und somit nicht kontakthinhibiert waren. In histologischen Querschnitten der hKDCs auf den PET-Membranen zeigte sich zudem, dass die Zellen eine flache Morphologie aufwiesen. Ein polarisierter Aufbau, der für die Transportfunktionen notwendig ist, war nicht erkennbar.

Im Gegensatz dazu bildeten hKDCs im Kollagen-Typ-I-Hydrogel zystische und tubuläre Epithelstrukturen. Da für die Beschichtung der Insertmembranen das gleiche Kollagen wie für die Hydrogele verwendet worden ist, lässt sich das unterschiedliche Zellverhalten auf die Dreidimensionalität bzw. Konsistenz des Hydrogels im Gegensatz zur zweidimensionalen Beschichtung des Inserts zurückführen. Damit konnte bestätigt werden, dass für die Induktion der physiologischen Zusammenlagerung und Morphogenese von renalen Zellen *in vitro* die Verwendung von ECM-Komponenten allein nicht ausreichend ist, sondern eine dreidimensionale Matrixstruktur erforderlich ist. Dies entspricht den Ergebnissen vorhergehender Studien mit anderen Zellquellen. MDCK-Zellen bilden z.B. nicht nur in, sondern auch auf einem dreidimensionalen Matrigel-Hydrogel epitheliale zystäre Strukturen. Auf einer zweidimensionalen Matrigel-Beschichtung bilden sie diese Strukturen hingegen nicht aus [Guo *et al.*, 2008].

Für Transportstudien und bioartifizielle Nierenersatzsysteme wird eine planare epitheliale Zellschicht mit polarisierten Zellen benötigt. Aus den Ergebnissen der hKDC-Kultur auf den Kollagen-Typ-I-beschichteten PET-Membranen war zu schließen, dass dieses Zell-Matrix-Konstrukt aufgrund der fehlenden Kontaktinhibition und der nicht erfolgten epithelialen Morphogenese sowie des Ablösens von Zellaggregaten für diese Anwendungen ungeeignet ist.

Die SIS wurde als Matrix herangezogen, um den Einfluss dreidimensionaler Matrices aus natürlichen ECM-Bestandteilen zu nutzen und gleichzeitig die Bildung einer planaren Epithelschicht zu ermöglichen. Es wurde angenommen, dass diese natürliche Matrix die Bildung einer typischen Epithelschicht fördert, da sie eine Vielzahl biochemischer und struktureller Eigenschaften aufweist, die die Zelladhäsion und -differenzierung verschiedener Zelltypen fördern [Brown-Etris *et al.*, 2002]. Die SIS kam bisher vor allem im klinischen Bereich zur Anwendung, z.B. zur Wundheilung [Badylak, 2007]. Es ließ sich aber ebenfalls zeigen, dass sie auch *in vitro* die Ausbildung zelltypischer Charakteristika fördert [Badylak *et al.*, 1998; Lindberg und Badylak, 2001; Voytik-Harbin *et al.*, 1998]. Für die Kultur renaler Tubuluszellen wurde sie zuvor jedoch noch nicht eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde die SIS-Matrix aus porcinem Dünndarm gewonnen. Die Mucosa ließ sich mechanisch und die Zellen der anderen Schichten chemisch mittels einer Natriumdesoxycholatlösung entfernen. Abschließend erfolgte die Sterilisation der azellulären SIS mittels Gammabestrahlung. Die Matrix wurde in Zellkronen eingespannt und mit hKDCs besiedelt. Es folgte eine dreiwöchige Kultivierungsphase. Anschließend konnten die Kulturen histologisch analysiert werden. Dabei zeigte sich ein starker Einfluss der SIS auf das Zellverhalten der hKDCs. Die Zellen bildeten eine einzelne kontaktinhibierte Zellschicht mit einer kuboidalen bis hochprismatischen Morphologie. Die Kontaktinhibition ließ sich über die Abnahme proliferierender Zellen im Kulturverlauf (Ki67-Färbung) bestätigen. In den histologischen Färbungen konnten in einigen Bereichen der Zellschicht an der apikalen Zellseite Bürstensaumstrukturen beobachtet werden, die sich mittels Rasterelektronenmikroskopie verifizieren ließen. Der Bürstensaum ist Teil der typischen Morphologie renaler proximaler Tubuluszellen und ermöglicht durch die starke Oberflächenvergrößerung die hohen Transportraten im renalen proximalen Tubulus [Zilles und Tillmann, 2010]. Die Bürstensaumbildung durch die hKDCs zeigt die proximale Differenzierung und epitheliale Polarisierung der Zellen auf der SIS. Diese ist notwendig für den gerichteten Transport von Substanzen und somit die Funktionalität der Zellen.

Ein weiteres Indiz für die Polarisierung der Zellen ist die Kollagen-Typ-IV-Synthese. Kollagen Typ IV ist das häufigste Kollagen der Basalmembran des renalen Tubulus [Miner, 1999]. Es konnte unterhalb der basalen Zellmembran der hKDCs auf der SIS immunhistochemisch

detektiert werden. Somit ließ sich die Synthese von Kollagen Typ IV und dessen gerichtete Sekretion an der basalen Zellseite nachweisen. Dieser Prozess wurde bereits mit der Regeneration des Tubulusepithels durch renale proximale Tubuluszellen nach einer sublethalen Schädigung assoziiert [Nony *et al.*, 2001]. Daher bilden die hKDCs das Kollagen Typ IV vermutlich, um die Bildung eines polarisierten Epithels zu ermöglichen, ähnlich zu Regenerationsprozessen *in vivo*. Die Kollagen-Typ-IV-Synthese bei Kultivierung auf der SIS ließ sich ebenfalls für epidermale Zellen nachweisen [Lindberg und Badylak, 2001] und unterstreicht den fördernden Einfluss der SIS auf die Bildung von epithelialen Strukturen *in vitro*. Es konnten außerdem Proteoglykane als weitere Bestandteile der Basalmembran unterhalb der basalen Zellseite histochemisch über eine Alcianblaufärbung nachgewiesen werden.

Sich ablösende Zellaggregate in den Multiwellplatten und Inserts weisen auf eine schwächere Zelladhäsion der hKDCs auf diesen Substraten im Vergleich zur SIS hin. Daraus lässt sich schließen, dass die SIS ein besseres Substrat für die Adhäsion der Zellen ist. Die Adhäsion wird vermutlich durch die Synthese von Basalmembrankomponenten durch die hKDCs noch weiter stabilisiert.

Die weitere Charakterisierung der hKDCs auf der SIS zeigte, dass die durchgängige Expression von N-Cadherin erhalten blieb, wohingegen E-Cadherin von einem geringeren Zellanteil als bei den Ausgangszellen exprimiert wurde. Der Anteil Aquaporin-1-exprimierender Zellen nahm von ca. 1 % bei den Ausgangszellen auf bis zu 40 % der hKDCs nach dreiwöchiger Kultur auf der SIS zu. Dabei war dieses Kanalprotein für die Wasserresorption besonders in den apikalen Bürstensaumstrukturen und der basalen Zellmembran lokalisiert. Dies zeigt den fördernden Einfluss der SIS auf die Ausbildung von Charakteristika des renalen proximalen Tubulusepithels. Der Anstieg der Aquaporin-1-Expression bei Kultur auf faserigen Substraten konnten ebenfalls durch Dankers *et al.* [Dankers *et al.*, 2010] gezeigt werden. Aquaporin-2, das nicht im proximalen Tubulus, sondern in Sammelrohren vorkommt, war auch bei der hKDC-Kultur auf der SIS nicht nachweisbar. Der Anteil von LTL-gefärbten Zellen stieg von ca. 25 % in den Chamber Slides™ auf ca. 45 % der Zellen auf der SIS an, der Anteil DBA-gefärbter Zellen blieb bei ca. 5 %.

Weiterhin sollte als Methode zum Nachweis der Veränderungen der molekularen Zusammensetzung der hKDCs auf der SIS exemplarisch die Raman-Spektroskopie getestet werden. Die Raman-Spektroskopie wird derzeit als nicht-invasive, markerfreie Analysemethode in zahlreichen Studien für die Zellanalyse getestet [Downes *et al.*, 2011; Pudlas *et al.*, 2011]. Da die SIS jedoch eine geringe Transluzenz aufweist und somit die darauf kultivierten Zellen nicht mikroskopisch lokalisiert werden können, waren die Zellen für die Messungen an verschiedenen Zeitpunkten von der SIS abzulösen. Dabei war zunächst eine Erhöhung des

Zelldurchmessers von 13 μm an Tag 1 auf 21 μm an Tag 21 zu beobachten. Dies korreliert mit der Änderung von einer flachen in eine kuboidale bis hochprismatische Morphologie. Unter Annahme einer kubischen Morphologie entspricht der Durchmesser von 21 μm einer Zellhöhe von ca. 19 μm . Wird eine hochprismatische Morphologie zu Grunde gelegt, wäre die apikal-basale Ausdehnung etwas größer. Dies entspricht der Größe von renalen proximalen Tubuluszellen *in vivo*. Sie sind 15 – 25 μm hoch [Wachtler, 2005]. Über die Ausbildung der Bürstensaumstrukturen kann trotzdem ein günstiges Oberflächen-Volumen-Verhältnis für die hohen Transportkapazitäten aufrechterhalten werden. Mit der Vergrößerung des Zellvolumens geht vermutlich auch eine vermehrte Bildung von Zellorganellen einher, die *in vivo* für die Funktionalität der Zellen notwendig sind.

Anhand der Messspektren konnte eine getrennte Gruppierung der Zellen nach 1-tägiger und 21-tägiger Kultivierung auf der SIS gezeigt werden. Der veränderte Differenzierungsstatus lässt sich dementsprechend auch über die Raman-Spektroskopie detektieren, wie es bereits für andere Zelltypen beschrieben worden ist [Downes *et al.*, 2011; Notingher *et al.*, 2005; Pudlas *et al.*, 2011]. Um das Potential der Raman-Spektroskopie als nicht-invasive Methode auszuschöpfen, könnten Experimente an der hKDC-Kultur auf der SIS selbst erfolgen. Dabei wären insbesondere Kulturen im fortgeschrittenen Kulturverlauf, z.B. ab Tag 14 relevant, da zu diesem Zeitpunkt die Substratfläche nahezu vollständig bewachsen ist und somit weitgehend sichergestellt ist, dass bei der Messung die Zellen erfasst werden. Weiterhin könnte diese Methode aber auch der nicht-invasiven Besiedlungskontrolle dienen, indem das Konstrukt mit einer definierten Zahl an Messpunkten abgerastert und im Score-Plot dargestellt wird. Dabei ist anzunehmen, dass sich durch die unterschiedliche biochemische Zusammensetzung von Zellen und extrazellulärer Matrix die Messpunkte zellfreier und zellbesiedelter SIS trennen lassen und sich somit aus deren Verhältnis eine Abschätzung der Besiedlungsdichte treffen ließe.

Als ein erster Funktionalitätsnachweis erfolgte die Untersuchung der Albumin-Aufnahme durch die hKDCs auf der SIS. Albumin ist ein wichtiges Plasmaprotein, das diverse Funktionen, z.B. die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Blut und den Transport einer Vielzahl von Substanzen (z.B. Vitamine, Fettsäuren, Arzneimittel), erfüllt [Birn und Christensen, 2006]. Im Fall einer glomerulären Filtration des Albumins muss es von den renalen proximalen Tubuluszellen reabsorbiert werden, um dessen Ausscheidung zu verhindern. Die Albuminaufnahme stellt demnach eine wichtige Funktion proximaler Tubuluszellen dar. Für den Aufnahmetest erfolgte die Inkubation der hKDCs auf der SIS mit FITC-markiertem bovinem Serumalbumin. Dabei zeigte sich bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse, dass ein Teil der hKDCs das FITC-BSA aufgenommen hatte und somit diese Funk-

tionalität aufwies. Es zeigte sich jedoch, wie auch bei den vorhergehenden Analysen, eine inhomogene Differenzierung der hKDCs. Dies war bereits bei den Ausgangszellen nachweisbar. Wie oben erwähnt, wäre zu klären, ob bei der Isolation eine inhomogene Zellpopulation gewonnen wird oder ob sich die Unterschiede durch die weitere Kultivierung bzw. Kryokonservierung der Zellen ausbilden. Für eine inhomogene Ausgangspopulation spricht, dass bei der Isolation keine Sortierung der Zellen über spezifische Marker erfolgte.

Auf der Unterseite der SIS lässt sich für Co-Kultur-Experimente ein weiterer Zelltyp kultivieren. Aufgrund der starken Interaktion zwischen Tubulusepithel und Kapillarnetzwerk *in vivo* sind dabei insbesondere Endothelzellen relevant. Es ließ sich bereits zeigen, dass renale proximale Tubulusepithelzellen in Co-Kultur mit Endothelzellen eine verbesserte Markerexpression, Enzymaktivität sowie Langzeitintegrität der Zellschicht aufweisen [Aydin *et al.*, 2008; Tasnim und Zink, 2012]. In dieser Arbeit erfolgte zum Aufbau der Co-Kultur zunächst die Aussaat humaner dermaler Endothelzellen (HDMECS) auf die Unterseite der SIS und deren einwöchige Kultivierung in endothelzellspezifischem Medium (ECGMmv). Anschließend wurden die hKDCs auf die Oberseite der SIS ausgesät und die beiden Zelltypen in Co-Kultur für bis zu drei Wochen in einem Medium aus gleichen Anteilen REGM und ECGMmv weiterkultiviert. Damit ließ sich die Co-Kultur der hKDCs mit den HDMECS erfolgreich aufbauen. Beide Seiten der SIS waren jeweils durchgängig mit dem entsprechenden Zelltyp besiedelt. Die HDMECS wiesen die endothelzelltypischen Marker CD31 und vWF auf. In Hinblick auf die hKDCs hat sich gezeigt, dass die Co-Kultur zu einer flacheren und weniger uniformen Morphologie sowie zu einer schwächer ausgeprägten proximalen Differenzierung führte. Dies war v.a. an der geringeren Expression von Aquaporin-1 erkennbar. Es konnte in Vorversuchen ausgeschlossen werden, dass dies durch die Verwendung des Kombinationsmediums aus REGM und ECGMmv hervorgerufen wurde. Eine Ursache könnte jedoch die Herkunft der Endothelzellen aus der Haut sein.

Endothelzellen verschiedener Gefäßtypen und Gewebe weisen eine strukturelle und funktionelle Heterogenität auf, so bilden z.B. die Endothelzellen der renalen peritubulären Kapillaren ein fenestriertes, die Endothelzellen der dermalen Kapillaren jedoch ein dichtes, nicht-fenestriertes Endothel [Aird, 2007]. Obwohl bei den Studien von Aydin *et al.* eine dermale Endothelzelllinie verwendet wurde und bei Tasnim und Zink keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Einfluss von humanen Nabelschnurendothelzellen und renalen glomerulären Endothelzellen auftraten, sollte eine alternative Endothelzellquelle mit renaler Herkunft für zukünftige Versuche in Betracht gezogen werden.

Für den Vergleich die Ergebnisse der hKDCs auf der SIS mit einer etablierten Zelllinie auf der SIS wurde zusätzlich die HK-2-Zelllinie getestet. Sie stammt ebenfalls aus adultem humanem Nierengewebe [Ryan *et al.*, 1994] und wird für Studien zu Vorgängen im proximalen Tubulus, z.B. zur Wirkungsweise toxischer Substanzen, eingesetzt [Gunness *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012]. Bei der Kultivierung auf der SIS begannen die Zellen jedoch bereits innerhalb der ersten Woche in mehreren Schichten zu wachsen. Anhand der Ki67-Färbung ließ sich noch an Tag 21 der Kultivierung die Proliferation eines Großteils der Zellen zeigen, obwohl bereits mehrere Zellschichten vorlagen. Die hohe Stoffwechselaktivität der hohen Zellzahl hat vermutlich zu einer Unterversorgung der Zellen geführt, was sich anhand von Zellfragmenten in der HE-Färbung zeigte.

Die hohe Stoffwechselaktivität war bereits in der 2D-Kultur in Zellkulturflaschen anhand des schnellen Farbumschlags des Phenolrots im Medium erkennbar, womit auch morphologische Veränderungen einhergingen. Durch die Verdopplung des Medienvolumens konnte in der 2D-Kultur jedoch eine ausreichende Versorgung gewährleistet werden. Die Erhöhung des Medienvolumens bei den SIS-Kulturen von 1,5 ml auf 5 ml pro Well führte jedoch nicht zu einer ausreichenden Versorgung. Somit ließ sich mit diesen Zellen unter den vorliegenden Kulturbedingungen keine epitheliale Einzelzellschicht generieren.

Die fehlende Kontaktinhibition ist auf die virale Transformation der Zelllinie mit den E6/E7-Genen des humanen Papillomavirus Typ 16 zurückzuführen. Mit der Transformation geht auch die Fähigkeit verloren, die Substrateigenschaften wahrzunehmen. Damit verbunden fehlt die Regulation des Zellwachstums über Stimuli der Matrix, wie es auch von Wang *et al.* in einer Studie zum Einfluss der Substratfestigkeit auf das Zellwachstum gezeigt wurde [Wang *et al.*, 2000]. In dieser Studie ließ sich nachweisen, dass das Wachstum und die Apoptose bei transformierten Zellen im Gegensatz zu normalen Zellen nicht über die Substratfestigkeit reguliert werden.

Im Gegensatz zu den hKDCs auf der SIS war bei den HK-2-Zellen keine Aquaporin-1-Expression nachweisbar. Ein weiterer Unterschied zur Kultur der hKDCs auf der SIS war die punktförmige Färbung von Kollagen Typ IV zwischen den Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass Kollagen Typ IV zwar synthetisieren können, es aber nicht gerichtet an der basalen Membran sekretieren und zu einer durchgängigen Schicht vernetzen können.

Das zelluläre Verhalten der HK-2-Zellen auf der SIS unterstreicht, dass transformierte Zelllinien keine adäquate Wahl für Anwendungen, wie z.B. bioartifizielle Nierenersatzsysteme, bei denen epitheliale Einzelzellschichten Voraussetzung für die Funktionalität sind, darstellt. Nicht-transformierte Zellen mit einem erweiterten Proliferationspotential wie die hKDCs könnten hingegen eine mögliche Zellquelle sein.

Als weitere natürliche Matrix, die komplexere Kulturbedingungen mit stärkerer Anlehnung an die In-vivo-Situation erlaubt, wurde die BioVaSc getestet. Sie ist ein Segment azellularisierten porcinen Dünndarms mit erhaltenem Gefäßsystem, das über einen arteriellen Zugang perfundiert werden kann. Das Gefäßsystem lässt sich mit Endothelzellen besiedeln, wohingegen im ursprünglichen Darmlumen ein zweiter Zelltyp kultiviert werden kann. Das Konstrukt lässt sich mit Nährmedium mit einem pulsatilen Druck von 120 zu 80 mmHg in einem Bioreaktorsystem perfundieren. Diese Kultivierungsbedingungen wurden bereits für die Co-Kultur von Hepatozyten mit Endothelzellen etabliert und zeigten einen positiven Einfluss auf die Erhaltung der Morphologie, Differenzierung und metabolischen Aktivität der Hepatozyten [Linke *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2010]. Das System lässt sich weiterhin um einen luminalen Medienkreislauf erweitern, wodurch ein Gefäßkompartiment und ein Tubuluskompartiment aufgebaut werden können, zwischen denen sich Transportprozesse untersuchen ließen.

Es wurden sowohl Versuche mit als auch ohne die Besiedlung der Gefäße mit HDMECs durchgeführt. Bei den Co-Kulturen mit HDMECS erfolgte deren Aussaat und einwöchige Vorkultivierung in der BioVaSc in Endothelzellmedium (ECGMmv), bevor die hKDCs ins Darmlumen ausgesät und auf das Nierenzellmedium (REGM) gewechselt wurde. Der Nachweis der HDMECs-Besiedlung erfolgte über die immunhistochemische Färbung der endothelzelltypischen Marker CD31 und vWF. Anhand der Färbungen war erkennbar, dass ein Teil der zuführenden Gefäße des Mesenteriums sowie der größeren Gefäße der Darmwand mit HDMECs ausgekleidet war. Die kleineren Kapillaren in der Darmwand waren häufig komplett mit HDMECs ausgefüllt, was auf deren Verschluss hinweist. Die Ursache dafür könnte die hohe Zelldichte der Zellsuspension während der Aussaat der HDMECs sein.

Die hKDCs wurden in Zellkulturmedium (REGM) ins Darmlumen ausgesät und für drei Wochen dynamisch kultiviert. Sie ließen sich erfolgreich auf der Mucosamatrix der BioVaSc ansiedeln. Der Erfolg der Besiedlung ließ sich während der Kultivierung über die Messung von Medienproben auf Glucose, Laktat und Laktatdehydrogenase kontrollieren. Am Ende der Kultivierung konnten der MTT-Test und die Lebend-Tot-Färbung einen Überblick über die Besiedlungsdichte eines Matrixsegments geben. Dabei zeigte sich, dass die Mucosamatrix mit hKDCs besiedelt war. In den HE-Färbungen war erkennbar, dass das Wachstum und die Morphologie der hKDCs stark variierten. Es war sowohl mehrschichtiges Wachstum mit sich ablösenden Zellaggregaten als auch einschichtiges Wachstum erkennbar. In einigen Bereichen war die Zellschicht zudem unterbrochen. Es trat sowohl eine rundliche Morphologie als auch die typische kuboidale bis hochprismatische Morphologie auf. Offensichtliche Unterschiede in der Matrixbeschaffenheit, die diese Inhomogenität ausgelöst haben könnten, wa-

ren mikroskopisch nicht erkennbar. Andere Ursachen könnten eine inhomogene Zellverteilung oder Nährstoffversorgung unter diesen Kulturbedingungen sein.

Die hKDCs in der BioVaSc wurden weiterhin immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die hKDCs auch in dieser Kulturform durchgängig N-Cadherin exprimierten. Im Unterschied zur SIS-Kultur variierte die E-Cadherin-Expression sehr stark zwischen verschiedenen Versuchen. Es trat sowohl eine schwache Expression, äquivalent zur SIS-Kultur, als auch eine starke Expression bei nahezu allen hKDCs in einige Bereichen bzw. Versuchen auf. Dies könnte auf eine stärkere Transformation der Zellen zurückzuführen sein, da wie oben beschrieben dies zu einer Co-Expression von N-Cadherin und E-Cadherin führen kann. Im Gegensatz zur SIS-Kultur waren in der BioVaSc nach der dreiwöchigen Kultivierung noch viele proliferierende Zellen detektierbar. Mit einer häufigen Teilung der Zellen steigt auch die Wahrscheinlichkeit der Transformation. Die Aquaporin-1-Expression variierte ebenfalls zwischen den verschiedenen Experimenten. Ursachen für die starken Variationen könnten in der Komplexität der Matrix und Kulturbedingungen zu finden sein. Der anatomische Verlauf der Gefäße und somit das Volumen des Medienzufusses ins Darmlumen ist z.B. bei jedem BioVaSc-Experiment unterschiedlich. Kollagen Typ IV war punktuell unterhalb der basalen Zellmembran nachweisbar, jedoch nicht als durchgängige Schicht wie bei der SIS-Kultur. Bürstensaumstrukturen waren nicht erkennbar.

Für die Unterschiede zur SIS könnten verschiedene Faktoren relevant sein, wie die Matrixstruktur, die dynamische Kultur und die ausgesäte Zellzahl. Die genaue Bestimmung der Besiedlungsfläche der BioVaScs und somit der Zelldichte bei der Aussaat gestaltet sich schwierig, da die BioVaScs jeweils in ihrer Größe variieren, bei der Besiedlung unterschiedlich hohe Zellverluste auftreten und die Matrixfläche insbesondere aufgrund der Zottenstrukturen nur annäherungsweise abgeschätzt werden kann. In Vorversuchen zur SIS-Kultur hatte sich gezeigt, dass eine Erhöhung der Aussaatdichte zu einer verminderten Expression proximaler Marker führt. Die verringerte Differenzierung bei höherer Aussaatdichte wurde auch schon bei anderen Zelltypen beobachtet [Lode *et al.*, 2008]. Die Aussaat-Zelldichte könnte bei der Kultur in der BioVaSc zu dem beobachteten Zellverhalten geführt haben. Damit ließe sich ebenfalls die Variabilität in der Markerexpression zwischen verschiedenen Experimenten erklären, da sich zwischen den eingesetzten BioVaScs das Verhältnis zwischen Zellmenge und Kulturfläche aufgrund der oben beschriebenen Varianzen unterschiedet. Besonders deutlich waren die Unterschiede beim Vergleich der Markerexpression zwischen den Versuchen BR4 und BR13 erkennbar. Bei BR4 wurden 1×10^6 hKDCs für die Aussaat verwendet, bei den anderen Versuchen (ausgenommen bei Besiedlung der Submucosa) einschließlich BR13 hingegen 5×10^6 hKDCs. Bei BR13 wurde weiterhin die höchste Zahl an Endothelzellen ver-

wendet. Im Gegensatz zu BR13 war die Markerexpression der hKDCs bei BR4 ähnlich zur SIS-Kultur. Dies bestätigt die Hypothese, dass die Aussaatdichte einen starken Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen haben kann und dass sie dementsprechend einen wichtigen Faktor bei der Etablierung von In-vitro-Gewebemodellen darstellt. Tendenziell wird mit einer geringeren Aussaatdichte eine stärker ausgeprägte Differenzierung erreicht.

Für die Optimierung der BioVaSc-Kultur, d.h. die Ermöglichung eines einschichtiges, epitheliales Wachstum der hKDCs, erfolgte die Entfernung der Mucosa zur Aussaat der Zellen auf die Submucosa der Darmmatrix, analog zur SIS-Kultur. Bei diesen Versuchen zeigte sich jedoch ein noch stärkeres mehrschichtiges Wachstum abwechselnd mit einschichtigen Bereichen, in denen die Zellen eine vergleichbare Morphologie wie auf der SIS aufwiesen. Dies zeigt die starke Stimulation der hKDCs durch die Submucosaoberfläche und weist auf einen starken Einfluss der Matrixstruktur und –zusammensetzung hin. Daher wäre eine Charakterisierung der Oberfläche der Submucosa- und Mucosamatrix hinsichtlich ihrer Zusammensetzung nach der Azellularisierung und Gammasterilisation interessant, um Faktoren für eine optimale Matrix zu eruieren. Die Ergebnisse verdeutlichen außerdem, dass noch weitere Faktoren die Morphologie und das Wachstum der hKDCs maßgeblich beeinflussen. Neben der oben erwähnten Aussaatdichte der Zellen ist ein wesentlicher Unterschied die Spannung der Matrix in den SIS-Kronen im Gegensatz zur BioVaSc im Bioreaktor. Bei der SIS-Kultur sind die Matrixfasern gestreckt, die Kulturfläche ist planar und die Matrix generell in ihrer Form stabilisiert. Die Stabilität bzw. Festigkeit führt voraussichtlich zu einem geringeren mechanischen Stress der Zellen als bei der BioVaSc, die ohne Fixierung im Medium schwimmt. Weiterhin hat die Festigkeit der Matrix einen entscheidenden Einfluss auf das Zellwachstum sowie die Zellmorphologie und -differenzierung. Auf Substraten mit geringer Festigkeit können fokale Adhäsionskontakte nicht stabil ausgebildet werden. Sie dienen nicht nur der Verankerung der Zellen auf der Matrix, die Zellen erhalten darüber auch Informationen über die Matrixbeschaffenheit. Über diese Signale wird das Zellverhalten beeinflusst [Discher *et al.*, 2005; Harunaga und Yamada, 2011; Pelham und Wang, 1997; Wang *et al.*, 2000].

Die immunhistochemische Analyse der hKDCs auf der Submucosa der BioVaSc zeigte eine durchgängige Co-Expression von N- und E-Cadherin, was erneut auf eine Transformation hinweisen könnte, die möglicherweise durch die starke Proliferation, welche sich auch nach der 21-tägigen Kultivierung über die Ki67-Färbung noch nachweisen ließ, verursacht wurde. Aquaporin-1 war insbesondere an Zellgrenzen nachweisbar, es umrandete einige runde Hohlräume innerhalb großer Zellanhäufungen. Dies spricht für eine Bildung tubulärer Strukturen.

Insgesamt zeigte sich eine sehr hohe Variabilität hinsichtlich Wachstum, Morphologie und Differenzierung der hKDCs in der BioVaSc, was unter anderem auf die Variabilität der Matrices und Kulturbedingungen selbst zurückzuführen ist. Der Vergleich der BioVaSc-Kultur mit der SIS-Kultur lieferte wichtige Erkenntnisse zu den Einflussfaktoren der Matrixstruktur und Kulturbedingungen auf die hKDCs.

Fazit

Es zeigte sich ein großer Einfluss der natürlichen, komplex aufgebauten Matrices auf das Wachstum und die Differenzierung der hKDCs. Dabei wurden verschiedene Einflüsse entdeckt, die sich auf das zelltypische Wachstum und die Differenzierung auswirken. Dazu gehörten die Matrixbeschaffenheit, die Aussaatdichte sowie die Co-Kultur mit Endothelzellen. Die SIS fördert im Gegensatz zu den häufig verwendeten Kollagen-beschichteten Inserts die Bildung einer polarisierten, epithelialen Einzelzellschicht, die proximale Marker, Bürstensaumstrukturen und eine Basalmembran aufweist. Weiterhin konnte die Albuminaufnahme nachgewiesen werden. Mit dieser Zell-Matrix-Kombination konnten somit wichtige Charakteristika des renalen proximalen Tubulus nachempfunden werden. Daraus lässt sich schließen, dass die in dieser Arbeit erstmals verwendete Kombination aus SIS und renalen Tubuluszellen, im Speziellen den hKDCs geeignet ist, um ein Modell des renalen proximalen Tubulusepithels aufzubauen. Mit der Zelllinie HK-2 war dies aufgrund der viralen Immortalisierung nicht möglich.

Die hKDCs konnten ebenfalls erfolgreich in der BioVaSc in Co-Kultur mit Endothelzellen dynamisch kultiviert werden, jedoch mit qualitativen Unterschieden zur SIS-Kultur. Die BioVaSc-Besiedlung bzw. -kultivierung müsste daher optimiert werden. Es wäre z.B. eine Besiedlung in mehr Schritten, dafür aber mit einer geringer konzentrierten Zellsuspension zu etablieren, um den Verschluss der kleinen Kapillaren durch die Endothelzellen und somit der Unterbrechung des Gefäßkreislaufes zu verhindern. Hinsichtlich der Kultivierung der hKDCs im Lumen der BioVaSc wären Optimierungen über die Variation der Zellzahl möglich, ggf. muss die Zellzahl je nach Größe der BioVaSc individuell angepasst werden. Weiterhin könnte die Darmmatrix äquivalent zur SIS-Kultur mechanisch gestreckt und fixiert werden, um ein charakteristischeres Zellverhalten zu erreichen. Dies könnte z.B. über eine Fixierung der Lumenenden und eine Perfusion des Lumens erzielt werden. Aufgrund der Komplexität, der Variabilität und des aufwändigen Versuchsaufbaus ist dieses Modell nicht für Hochdurchsatztests geeignet. Im Fall einer erfolgreichen Optimierung kann es jedoch für komplexere Studien in der Grundlagenforschung sowie zur Untersuchung einzelner Substanzen in präklinischen Studien der pharmakologischen Entwicklung dienen.

Die hKDCs selbst könnten geeignete Zellquelle für artifizielle Nierenersatzsysteme darstellen, da sie ein hohes Proliferationspotential aufweisen und nicht immortalisiert sind. Voraussetzung ist natürlich, dass sich eine umfangreiche Funktionalität nachweisen lässt.

Ausblick

Hinsichtlich der Kultur der hKDCs auf der SIS sind weitere Untersuchungen sind nötig, um die Ursachen für die zum Teil inhomogene Zellmorphologie und –differenzierung aufzuklären. Falls bereits bei der Isolation eine inhomogene Zellpopulation vorläge, wäre ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt, z.B. durch eine magnetische Zellseparation, denkbar [Kamihira und Kumar, 2007]. Weiterhin könnten zusätzliche Differenzierungsstimuli, z.B. durch Zytokine, zur SIS-Kultivierung hinzuzufügt werden, um eine einheitliche Differenzierung zu fördern.

Für die weitere Integration physiologischer Parameter wäre die Entwicklung unterschiedlicher Medien für das basale und apikale Kompartiment in Anlehnung an die In-vivo-Situation relevant. Dies könnte die Polarität der Zellen und die homogene Differenzierung weiter fördern [Minuth *et al.*, 2005]. Dafür wäre ggf. eine Anpassung des Kultursystems notwendig, da sich bei einer noch nicht durchgängigen Zellschicht die Medien durchmischen würden. Weiterhin können andere Endothelzellquellen und deren Einfluss auf die hKDCs getestet werden. Zusätzlich wäre es interessant, den Einfluss der SIS auf primäre humane proximale Tubuluszellen sowie die MDCK-Zelllinie, die häufig für Studien zur epithelialen Morphogenese herangezogen wird [Martin-Belmonte und Mostov, 2008; Pollack *et al.*, 1998], zu untersuchen.

Anschließend muss das System für die verschiedenen Anwendungsbereiche weiter charakterisiert und angepasst werden. Für die Anwendung in der pharmakologischen Entwicklung muss zunächst die Charakterisierung der Transportfunktionalität, des Fremdstoffmetabolismus und damit verbunden die Sensitivität gegenüber Toxinen anhand von Modellsubstanzen folgen. Über eine Miniaturisierung des Systems könnte ein höherer Durchsatz, z.B. zur parallelen Testung verschiedener Substanzen, erreicht werden.

In Hinblick auf die Entwicklung von bioartifiziellen Nierenersatzsystemen ist ebenfalls die Transportkapazität und Funktionalität der hKDCs auf der SIS zu charakterisieren. Als Zellsubstrat wurden bei bisherigen Studien zu bioartifiziellen Nierenersatzsystemen kommerziell erhältliche, synthetische Hohlfasermembranen verwendet, die auch in der konventionellen Dialyse eingesetzt werden [Humes *et al.*, 1999; Tasnim *et al.*, 2010; Tumlin *et al.*, 2008]. Bei der Entwicklung solcher Membranen für die herkömmliche Hämodialyse stehen Parameter wie Hämatokompatibilität und Antifouling im Vordergrund, daher ist die Cytokompatibilität auf

diesen synthetischen Materialien, wie den häufig angewandten Polysulfon-Polyvinylpyrrolidon-Membranen, eingeschränkt. Für Studien zu bioartifiziellen Nierenersatzsystemen wurden sie deshalb häufig mit Basalmembrankomponenten beschichtet, um die Zelladhäsion auf den zu verbessern [Zhang *et al.*, 2009]. Dabei hat sich herausgestellt, dass bei primären humanen proximalen Tubuluszellen (im Gegensatz zu Zelllinien wie MDCK und LLC-PK₁) das Zellverhalten hinsichtlich Adhäsion, Viabilität und Proliferation von den darunterliegenden Membranen trotz der Beschichtung negativ beeinflusst wird. Eine Verbesserung ließ sich durch die Verwendung einer Kombinationsbeschichtung aus 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin und Kollagen Typ IV erzielen [Ni *et al.*, 2011]. Es wäre zu überprüfen, ob eine Beschichtung von Hohlfasermembranen mit einem SIS-Lyophilisat einen ähnlichen Effekt auf die hKDCs hat wie die SIS in ihrer ursprünglichen Struktur. Positiv könnte sich die komplexe Zusammensetzung der SIS auswirken, negativ die fehlende Matrixstruktur und Dreidimensionalität. Da die Dreidimensionalität ein kritischer Punkt zu sein scheint, wie es in dieser und anderen Arbeiten [Guo *et al.*, 2008] beobachtet wurde, sollten generell auch andere Systeme als Hohlfasermembranen in Betracht gezogen werden. Es könnten Bioreaktoren, z.B. Plattenreaktoren, entwickelt werden, in denen sich 3D-Matrices wie die SIS einspannen lassen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Herstellung von Membranen aus natürlichen ECM-Komponenten mittels Electrospinning [Dankers *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2006]. Dabei ist zu beachten, dass für die Effektivität des Systems eine ausreichende Oberfläche von ca. 0,7 bis 1,0 m² zur Verfügung steht [Tasnim *et al.*, 2010]. Aufgrund der nötigen Fläche schienen Hohlfasermembranen bisher die beste Wahl zu sein. Ein möglicher Ansatz wäre daher, Hohlfasermembranen aus ECM-Bestandteilen über Electrospinning herzustellen.

6 Literaturverzeichnis

AIRD WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007 Feb 2;100(2):174-90.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Molekularbiologie der Zelle. 4. Aufl. Wiley-VCH. Weinheim 2004. ISBN 978-3-527-30492-4. S. 1265-1291.

ALLGROVE J. Physiology of calcium, phosphate and magnesium. *Endocr Dev*. 2009;16:8-31.

ATALA A. Engineering tissues, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Mar-Apr;1(2):83-96.

AYDIN S, SIGNORELLI S, LECHLEITNER T, JOANNIDIS M, PLEBAN C, PERCO P, PFALLER W *ET AL*. Influence of microvascular endothelial cells on transcriptional regulation of proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Feb;294(2):C543-54.

BADYLAK SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*. 2007 Sep;28(25):3587-93.

BADYLAK SF, RECORD R, LINDBERG K, HODDE J, PARK K. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9(8):863-78.

BAUMHOER D, STEINBRÜCK I, GÖTZ W. Kurzlehrbuch Histologie 2. Aufl. Urban & Fischer Verlag. München. 2003. ISBN 978-3-437-42231-6. S. 188-198.

BENIGNI A, MORIGI M, REMUZZI G. Kidney regeneration. *Lancet*. 2010 Apr 10;375(9722):1310-7.

BHADRIRAJU K, CHEN CS. Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov Today*. 2002 Jun 1;7(11):612-20.

BIRN H, CHRISTENSEN EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney international*. 2006 Feb;69(3):440-9.

BLEASBY K, CASTLE JC, ROBERTS CJ, CHENG C, BAILEY WJ, SINA JF, KULKARNI AV *ET AL*. Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica*. 2006 Oct-Nov;36(10-11):963-88.

BROWN-ETRIS M, CUTSHALL WD, HILES MC. A new biomaterial derived from small intestine submucosa and developed into a wound matrix device. *Wounds*. 2002 May;14(4):150-66.

CASTROP H, HOCHERL K, KURTZ A, SCHWEDA F, TODOROV V, WAGNER C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev.* 2010 Apr;90(2):607-73.

CHUNG IM, ENEMCHUKWU NO, KHAJA SD, MURTHY N, MANTALARIS A, GARCIA AJ. Bioadhesive hydrogel microenvironments to modulate epithelial morphogenesis. *Biomaterials.* 2008 Jun;29(17):2637-45.

COLQUITT RB, COLQUHOUN DA, THIELE RH. In silico modelling of physiologic systems. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2011 Dec;25(4):499-510.

COLTER DC, SEYDA A, BUENSUCESO CS, GOSIEWSKA A. Kidney-derived cells and methods of use in tissue repair and regeneration. *Ethicon, Inc (Somerville, NJ, US) 2008 US Patent 20080112939.* 2008.

DANKERS PY, BOOMKER JM, HUIZINGA-VAN DER VLAG A, SMEDTS FM, HARMSSEN MC, VAN LUYN MJ. The use of fibrous, supramolecular membranes and human tubular cells for renal epithelial tissue engineering: towards a suitable membrane for a bioartificial kidney. *Macromol Biosci.* 2010 Nov 10;10(11):1345-54.

DING F, HUMES HD. The bioartificial kidney and bioengineered membranes in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol.* 2008;109(4):e118-22.

DISCHER DE, JANMEY P, WANG YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science.* 2005 Nov 18;310(5751):1139-43.

DOWNES A, MOURAS R, BAGNANINCHI P, ELFICK A. Raman spectroscopy and CARS microscopy of stem cells and their derivatives. *J Raman Spectrosc.* 2011 Oct;42(10):1864-70.

FOTH H, HAYES A. Concept of REACH and impact on evaluation of chemicals. *Hum Exp Toxicol.* 2008 Jan;27(1):5-21.

FOX CF, SKALAK R. Tissue Engineering. *New York: Liss.* 1988:343 pp.

GARCIA-CARDENA G, COMANDER J, ANDERSON KR, BLACKMAN BR, GIMBRONE MA, JR. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 10;98(8):4478-85.

GAUSH CR, HARD WL, SMITH TF. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966 Jul;122(3):931-5.

GOMEZ-LECHON MJ, CASTELL JV, DONATO MT. Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem Biol Interact.* 2007 May 20;168(1):30-50.

GRIFFITH LG, SWARTZ MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Mar;7(3):211-24.

GUNNESS P, ALEKSA K, KOSUGE K, ITO S, KOREN G. Comparison of the novel HK-2 human renal proximal tubular cell line with the standard LLC-PK1 cell line in studying drug-induced nephrotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010 Apr;88(4):448-55.

GUO Q, XIA B, MOSHIACH S, XU C, JIANG Y, CHEN Y, SUN Y *ET AL.* The microenvironmental determinants for kidney epithelial cyst morphogenesis. *Eur J Cell Biol.* 2008 Apr;87(4):251-66.

GUPTA S, ROSENBERG ME. Do stem cells exist in the adult kidney? *Am J Nephrol.* 2008;28(4):607-13.

GUPTA S, VERFAILLIE C, CHMIELEWSKI D, KREN S, EIDMAN K, CONNAIRE J, HEREMANS Y *ET AL.* Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Nov;17(11):3028-40.

HALL HG, FARSON DA, BISSELL MJ. Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Aug;79(15):4672-6.

HARTUNG T. From alternative methods to a new toxicology. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011 Apr;77(3):338-49.

HARUNAGA JS, YAMADA KM. Cell-matrix adhesions in 3D. *Matrix Biol.* 2011 Sep;30(7-8):363-8.

HAYCOCK JW. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol.* 2011;695:1-15.

HENNIGAR RA, SCHULTE BA, SPICER SS. Heterogeneous distribution of glycoconjugates in human kidney tubules. *Anat Rec.* 1985 Apr;211(4):376-90.

HODDE J, JANIS A, HILES M. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part II. Bioactivity and matrix interaction. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Apr;18(4):545-50.

HODDE JP, BADYLAK SF, BRIGHTMAN AO, VOYTIK-HARBIN SL. Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement. *Tissue Eng.* 1996 Fall;2(3):209-17.

HODDE JP, RECORD RD, LIANG HA, BADYLAK SF. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium.* 2001;8(1):11-24.

HORN F, DOSPIL A, BORNEMANN S, HÜBNER H. Biochemie des Menschen. G. Thieme. 2009. ISBN 9783131308849. S. 563-574.

HULL RN, CHERRY WR, WEAVER GW. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro*. 1976 Oct;12(10):670-7.

HUMES HD, MACKAY SM, FUNKE AJ, BUFFINGTON DA. Tissue engineering of a bioartificial renal tubule assist device: in vitro transport and metabolic characteristics. *Kidney international*. 1999 Jun;55(6):2502-14.

HUMPHREYS BD, CZERNIAK S, DIROCCO DP, HASNAIN W, CHEEMA R, BONVENTRE JV. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 31;108(22):9226-31.

HUMPHREYS BD, VALERIUS MT, KOBAYASHI A, MUGFORD JW, SOEUNG S, DUFFIELD JS, MCMAHON AP *ET AL*. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell*. 2008 Mar 6;2(3):284-91.

HUPPELSBERG J, WALTER K. Kurzlehrbuch Physiologie 3. Aufl. Thieme Verlag. Stuttgart 2009. ISBN 978-3-13-136433-3. S. 175.

INUI KI, MASUDA S, SAITO H. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney international*. 2000 Sep;58(3):944-58.

JELKMANN W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol*. 2011 Mar 15;589(Pt 6):1251-8.

JENNINGS P, KOPPELSTÄTTER C, LECHNER J, PFALLER W. Renal cell culture models: Contribution to the understanding of nephrotoxic mechanisms. Aus: Clinical Nephrotoxins. Broe ME, Porter GA, Bennett WM, Deray G (Hrsg.). Springer US. 2008. ISBN 978-0-387-84843-3. S. 223-249.

JUNKER JP, SOMMAR P, SKOG M, JOHNSON H, KRATZ G. Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of clonally derived human dermal fibroblasts. *Cells Tissues Organs*. 2010;191(2):105-18.

JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J, GRATZL M. Histologie. Springer Verlag. 2004. ISBN 978-3-540-21965-1. S. 325-330.

JUSTICE BA, BADR NA, FELDER RA. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov Today*. 2009 Jan;14(1-2):102-7.

KAJI H, CAMCI-UNAL G, LANGER R, KHADEMHOSEINI A. Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Mar;1810(3):239-50.

KAMIHIRA M, KUMAR A. Development of separation technique for stem cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;106:173-93.

KANAI N, FUJITA Y, KAKUTA T, SAITO A. The effects of various extracellular matrices on renal cell attachment to polymer surfaces during the development of bioartificial renal tubules. *Artif Organs.* 1999 Jan;23(1):114-8.

KANDAROVA H, LETASIOVA S. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdiscip Toxicol.* 2011 Sep;4(3):107-13.

KLINKE R, BAUMAN R. Physiologie. Thieme Verlag. 2010. ISBN 978-3-137-96006-5. S. 330-358.

KNIGHT A. Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor contributions toward human healthcare. *Rev Recent Clin Trials.* 2008 May;3(2):89-96.

KOYAMA H, GOODPASTURE C, MILLER MM, TEPLITZ RL, RIGGS AD. Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro.* 1978 Mar;14(3):239-46.

KRIZ W, BANKIR L, BULGER RE, BURG MB, GONCHAREVSKAYA OA, IMAI M, KAISLING B ET AL. A standard nomenclature for structures of the kidney. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* 1988;411(1):113-20.

KRUEGEL J, MIOSGE N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Sep;67(17):2879-95.

LAUNAY-VACHER V, IZZEDINE H, KARIE S, HULOT JS, BAUMELOU A, DERAY G. Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol.* 2006;103(3):p97-106.

LAZZERI E, CRESCIOLI C, RONCONI E, MAZZINGHI B, SAGRINATI C, NETTI GS, ANGELOTTI ML ET AL. Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Dec;18(12):3128-38.

LIAO S, LI B, MA Z, WEI H, CHAN C, RAMAKRISHNA S. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomed Mater.* 2006 Sep;1(3):R45-53.

LINDBERG K, BADYLAK SF. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Burns.* 2001 May;27(3):254-66.

LINDGREN D, BOSTROM AK, NILSSON K, HANSSON J, SJOLUND J, MOLLER C, JIRSTROM K ET AL. Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *Am J Pathol.* 2011 Feb;178(2):828-37.

LINKE K, SCHANZ J, HANSMANN J, WALLEES T, BRUNNER H, MERTSCHING H. Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue Eng.* 2007 Nov;13(11):2699-707.

LIPS P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006 Sep;92(1):4-8.

LOCK EA, REED CJ. Xenobiotic metabolizing enzymes of the kidney. *Toxicol Pathol.* 1998 Jan-Feb;26(1):18-25.

LODE A, BERNHARDT A, GELINSKY M. Cultivation of human bone marrow stromal cells on three-dimensional scaffolds of mineralized collagen: influence of seeding density on colonization, proliferation and osteogenic differentiation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Oct;2(7):400-7.

MAHMOOD I. Interspecies scaling of renally secreted drugs. *Life Sci.* 1998;63(26):2365-71.

MALEK AM, IZUMO S. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci.* 1996 Apr;109 (Pt 4):713-26.

MARTIGNONI M, GROOTHUIS GMM, DE KANTER R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology.* 2006;2(6):875-94.

MARTIN-BELMONTE F, MOSTOV K. Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Apr;20(2):227-34.

MARTIN I, WENDT D, HEBERER M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004 Feb;22(2):80-6.

MAZZOLENI G, DI LORENZO D, STEIMBERG N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.* 2009 Mar;4(1):13-22.

MCDEVITT CA, WILDEY GM, CUTRONE RM. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Nov 1;67(2):637-40.

MENCHE N. Lehrbuch und Atlas des menschlichen Körpers: Anatomie, Physiologie, Krankheitsbilder. Komet Verlag GmbH. 2002. ISBN 9783898362252. S. 355.

MERTSCHING H, WALLEES T, HOFMANN M, SCHANZ J, KNAPP WH. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Nov;26(33):6610-7.

MINER JH. Renal basement membrane components. *Kidney international.* 1999 Dec;56(6):2016-24.

MINUTH WW. Zukunftstechnologie Tissue Engineering: von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Wiley-VCH. Weinheim. 2003. ISBN 978-3-527-30793-7. S. 38-58.

MINUTH WW, SCHUMACHER K, STREHL R. Renal epithelia in long term gradient culture for biomaterial testing and tissue engineering. *Biomed Mater Eng*. 2005;15(1-2):51-63.

MITRAKOU A. Kidney: its impact on glucose homeostasis and hormonal regulation. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93 Suppl 1:S66-72.

NADERI H, MATIN MM, BAHRAMI AR. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J Biomater Appl*. 2011 Nov;26(4):383-417.

NI M, TEO JC, IBRAHIM MS, ZHANG K, TASNIM F, CHOW PY, ZINK D ET AL. Characterization of membrane materials and membrane coatings for bioreactor units of bioartificial kidneys. *Biomaterials*. 2011 Feb;32(6):1465-76.

NIELSEN S, FROKIAER J, MARPLES D, KWON TH, AGRE P, KNEPPER MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):205-44.

NOLIN TD, HIMMELFARB J. Mechanisms of drug-induced nephrotoxicity. *Handb Exp Pharmacol*. 2010(196):111-30.

NONY PA, NOWAK G, SCHNELLMANN RG. Collagen IV promotes repair of renal cell physiological functions after toxicant injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Sep;281(3):F443-53.

NOTINGHER I, HENCH LL. Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells in vitro. *Expert Rev Med Devices*. 2006 Mar;3(2):215-34.

NOTINGHER I, JELL G, NOTINGHER PL, BISSON I, TSIGKOU O, POLAK JM, STEVENS MM ET AL. Multivariate analysis of Raman spectra for in vitro non-invasive studies of living cells. *Journal of Molecular Structure*. 2005;744-747(0):179-85.

NOWACK R. Dialyse und Nephrologie für Fachpersonal 3. Aufl. Springer Verlag. Heidelberg. 2009. ISBN 978-3-540-72322-6. S. 9-16.

O'BRIEN LE, ZEGERS MM, MOSTOV KE. Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Jul;3(7):531-7.

OLIVER JA, MAAROUF O, CHEEMA FH, MARTENS TP, AL-AWQATI Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Sep;114(6):795-804.

OLSON JL, ATALA A, YOO JJ. Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam Med J*. 2011 Apr;47(1):1-13.

OO ZY, DENG R, HU M, NI M, KANDASAMY K, BIN IBRAHIM MS, YING JY *ET AL*. The performance of primary human renal cells in hollow fiber bioreactors for bioartificial kidneys. *Biomaterials*. 2011 Aug 26.

PAMPALONI F, REYNAUD EG, STELZER EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Oct;8(10):839-45.

PAMPALONI F, STELZER E. Three-dimensional cell cultures in toxicology. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2010;26:117-38.

PANCRAZIO JJ, WANG F, KELLEY CA. Enabling tools for tissue engineering. *Biosens Bioelectron*. 2007 Jun 15;22(12):2803-11.

PELHAM RJ, JR., WANG Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13661-5.

PEREL P, ROBERTS I, SENA E, WHEBLE P, BRISCOE C, SANDERCOCK P, MACLEOD M *ET AL*. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ*. 2007 Jan 27;334(7586):197.

PERIN L, DA SACCO S, DE FILIPPO RE. Regenerative medicine of the kidney. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Apr 30;63(4-5):379-87.

PERRI D, ITO S, ROWSELL V, SHEAR NH. The kidney--the body's playground for drugs: an overview of renal drug handling with selected clinical correlates. *Can J Clin Pharmacol*. 2003 Spring;10(1):17-23.

PERWAD F, PORTALE AA. Vitamin D metabolism in the kidney: regulation by phosphorus and fibroblast growth factor 23. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Dec 5;347(1-2):17-24.

PFALLER W, GSTRAUNTHALER G. Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect*. 1998 Apr;106 Suppl 2:559-69.

POLLACK AL, RUNYAN RB, MOSTOV KE. Morphogenetic mechanisms of epithelial tubulogenesis: MDCK cell polarity is transiently rearranged without loss of cell-cell contact during scatter factor/hepatocyte growth factor-induced tubulogenesis. *Dev Biol*. 1998 Dec 1;204(1):64-79.

PRESTWICH GD. Simplifying the extracellular matrix for 3-D cell culture and tissue engineering: a pragmatic approach. *J Cell Biochem*. 2007 Aug 15;101(6):1370-83.

PROZIALECK WC, EDWARDS JR. Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. *Pharmacol Ther.* 2007 Apr;114(1):74-93.

PUDLAS M, KOCH S, BOLWIEN C, THUDE S, JENNE N, HIRTH T, WALLEES H *ET AL.* Raman spectroscopy: a noninvasive analysis tool for the discrimination of human skin cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011 Oct;17(10):1027-40.

RESNICK N, YAHAV H, SHAY-SALIT A, SHUSHY M, SCHUBERT S, ZILBERMAN LC, WOFOVITZ E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003 Apr;81(3):177-99.

RIHA GM, LIN PH, LUMSDEN AB, YAO Q, CHEN C. Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation. *Ann Biomed Eng.* 2005 Jun;33(6):772-9.

ROCH-RAMEL F, BROE M. Renal handling of drugs and xenobiotics. Aus: Clinical Nephrotoxins. Broe M, Porter G, Bennett W, Verpooten G (Hrsg.). Springer Netherlands. 2004. ISBN 978-1-4020-2586-0. S. 21-46.

ROHEN JW, LÜTJEN-DRECOLL E. Funktionelle Histologie 4. Aufl. Schattauer Verlag. Stuttgart. 2000. ISBN 978-3-7945-2044-0. S. 311-344.

ROHEN JW, LÜTJEN-DRECOLL E. Funktionelle Anatomie des Menschen. Schattauer Verlag. 2005. ISBN 978-3-794-52440-2. S. 204-213.

ROSSO F, GIORDANO A, BARBARISI M, BARBARISI A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2004 May;199(2):174-80.

RUSSELL WMS, BURCH RL. The principles of humane experimental technique. Methuen. London,. 1959. ISBN S.

RUSTAD KC, SORKIN M, LEVI B, LONGAKER MT, GURTNER GC. Strategies for organ level tissue engineering. *Organogenesis.* 2010 Jul-Sep;6(3):151-7.

RYAN MJ, JOHNSON G, KIRK J, FUERSTENBERG SM, ZAGER RA, TOROK-STORB B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney international.* 1994 Jan;45(1):48-57.

SCHANZ J, PUSCH J, HANSMANN J, WALLEES H. Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research. *J Biotechnol.* 2010 Jul 1;148(1):56-63.

SCHIEBLER TH, KORF H-W. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. 10. Aufl. Steinkopff Verlag. Heidelberg. 2007. ISBN 978-3-7985-1770-7. S. 388-397.

SCHMIDT RF. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. 31. Aufl. Springer-Medizin-Verl. Heidelberg. 2010. ISBN 978-3-642-01650-9. S. 629-663.

SCHMITZ S. Der Experimentator: Zellkultur. 1. Aufl. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl. München. 2007. ISBN 978-3-8274-1564-6. S. 65-81.

SCHULTHEISS D, GABOUEV AI, CEBOTARI S, TUDORACHE I, WALLES T, SCHLOTE N, WEFER J *ET AL*. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model. *J Urol*. 2005 Jan;173(1):276-80.

SHIN HC, KIM HR, CHO HJ, YI H, CHO SM, LEE DG, ABD EL-ATY AM *ET AL*. Comparative gene expression of intestinal metabolizing enzymes. *Biopharm Drug Dispos*. 2009 Nov;30(8):411-21.

SONG JW, MUNN LL. Fluid forces control endothelial sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 13;108(37):15342-7.

TANI T, LAITINEN L, KANGAS L, LEHTO VP, VIRTANEN I. Expression of E- and N-cadherin in renal cell carcinomas, in renal cell carcinoma cell lines in vitro and in their xenografts. *Int J Cancer*. 1995 Dec 20;64(6):407-14.

TASNIM F, DENG R, HU M, LIOUR S, LI Y, NI M, YING JY *ET AL*. Achievements and challenges in bioartificial kidney development. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2010;3:14.

TASNIM F, ZINK D. Cross-talk between primary human renal tubular cells and endothelial cells in co-cultures. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Feb 8.

TERRY S, JOURET F, VANDENABEELE F, SMOLDERS I, MOREELS M, DEVUYST O, STEELS P *ET AL*. A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Aug;293(2):F476-85.

THEWS G, VAUPEL P. Vegetative Physiologie. 5. Aufl. Springer Verlag. Heidelberg. 2005. ISBN 978-3-540-24070-5. S. 433-442.

TREBSDORF M. Biologie. Anatomie. Physiologie: Lehrbuch und Atlas. Europa Lehrmittel Verlag. 2011. ISBN 9783808567999. S. 316-317.

TRUONG LD, PHUNG VT, YOSHIKAWA Y, MATTIOLI CA. Glycoconjugates in normal human kidney. A histochemical study using 13 biotinylated lectins. *Histochemistry*. 1988;90(1):51-60.

TUMLIN J, WALI R, WILLIAMS W, MURRAY P, TOLWANI AJ, VINNIKOVA AK, SZERLIP HM *ET AL*. Efficacy and safety of renal tubule cell therapy for acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2008 May;19(5):1034-40.

TUSCHL G, LAUER B, MUELLER SO. Primary hepatocytes as a model to analyze species-specific toxicity and drug metabolism. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2008;4(7):855-70.

VALERIO LG, JR. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Dec 15;241(3):356-70.

VOYTIK-HARBIN SL, BRIGHTMAN AO, KRAINE MR, WAISNER B, BADYLAK SF. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem*. 1997 Dec 15;67(4):478-91.

VOYTIK-HARBIN SL, BRIGHTMAN AO, WAISNER BZ, ROBINSON JP, LAMAR CH. Small intestinal submucosa: A tissue-derived extracellular matrix that promotes tissue-specific growth and differentiation of cells in vitro. *Tissue Engineering*. 1998 Sum;4(2):157-74.

WACHTLER F. Histologie: Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Facultas-Univ.-Verl. 2005. ISBN 978-3-850-76681-4. S. 370.

WALTON K, DORNE JL, RENWICK AG. Species-specific uncertainty factors for compounds eliminated principally by renal excretion in humans. *Food Chem Toxicol*. 2004 Feb;42(2):261-74.

WANG AZ, OJAKIAN GK, NELSON WJ. Steps in the morphogenesis of a polarized epithelium. I. Uncoupling the roles of cell-cell and cell-substratum contact in establishing plasma membrane polarity in multicellular epithelial (MDCK) cysts. *J Cell Sci*. 1990 Jan;95 (Pt 1):137-51.

WANG HB, DEMBO M, WANG YL. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Nov;279(5):C1345-50.

WANG Q, GROZDANIC SD, HARPER MM, HAMOUCHE N, KECOVA H, LAZIC T, YU C. Exploring Raman spectroscopy for the evaluation of glaucomatous retinal changes. *J Biomed Opt*. 2011 Oct;16(10):107006.

WANG YF, SHYU HW, CHANG YC, TSENG WC, HUANG YL, LIN KH, CHOU MC *ET AL*. Nickel (II)-induced cytotoxicity and apoptosis in human proximal tubule cells through a ROS- and mitochondria-mediated pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Mar 1;259(2):177-86.

WENDT D, RIBOLDI SA, CIOFFI M, MARTIN I. Bioreactors in tissue engineering: scientific challenges and clinical perspectives. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009;112:1-27.

YANG B, ZHOU L, SUN Z, YANG R, CHEN Y, DAI Y. In vitro evaluation of the bioactive factors preserved in porcine small intestinal submucosa through cellular biological approaches. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Jun 1;93(3):1100-9.

ZHANG H, TASNIM F, YING JY, ZINK D. The impact of extracellular matrix coatings on the performance of human renal cells applied in bioartificial kidneys. *Biomaterials*. 2009 May;30(15):2899-911.

ZILLES K, TILLMANN BN. Anatomie. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. 2010. ISBN 978-3-540-69481-6. S. 504-517.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Prinzip des Tissue Engineering	9
Abbildung 1-2:	Nieren mit Nierenkapseln und Gefäßversorgung, aus [Trebsdorf, 2011]	11
Abbildung 1-3:	Makroskopische Anatomie der Niere, aus [Trebsdorf, 2011]	12
Abbildung 1-4:	Mikroskopische Anatomie der Niere: Nephron, Sammelrohr und Blutgefäße, aus [Menche, 2002] (modifiziert)	13
Abbildung 1-5:	Morphologie des proximalen Tubulusepithels. (A) Schematische Darstellung, aus [Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000] und (B) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme mit schematisch hervorgehobenen morphologischen Besonderheiten, aus [Klinke und Bauman, 2010]	15
Abbildung 3-1:	(A) Aufbau des pumpengesteuertes Bioreaktorsystem zur Azellularisierung und (B) BioVaSc im Glasreaktor	43
Abbildung 3-2:	Vorgehensweise zur Kultivierung von hKDCs bzw. HK-2-Zellen auf der SIS	46
Abbildung 3-3:	Vorgehensweise zur Co-Kultivierung von HDMECs und hKDCs auf der SIS	47
Abbildung 3-4:	Aufbau des Bioreaktors zur dynamischen Kultivierung von Zellen in der BioVaSc	48
Abbildung 4-1:	Anhand der Ölrot-O-Färbung ist erkennbar, dass sich die adipogene Differenzierung bei den humanen dermalen Fibroblasten (B) und den humanen MSCs (C) induzieren ließ. Die hKDCs (A) ließen sich nicht adipogen differenzieren. Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun.	62
Abbildung 4-2:	Anhand der Alizarinrot-S-Färbung ist erkennbar, dass sich die osteogene Differenzierung bei den hKDCs (A) und den humanen MSCs (C) induzieren ließ. Die humanen dermalen Fibroblasten (B) ließen sich nicht osteogen differenzieren.	63
Abbildung 4-3:	Anhand der Alcianblau (pH 1)-Färbung auf histologischen Schnitten der Pelletkulturen ist erkennbar, dass sich die chondrogene Differenzierung bei humanen dermalen Fibroblasten (B) und humanen MSCs (C) induzieren ließ. Die hKDCs (A) ließen sich nicht chondrogen differenzieren.	63
Abbildung 4-4:	Charakterisierung der hKDCs in Chamber Slides™. Die immuncytochemischen Färbungen zeigten die Expression von N-Cadherin (A), E-Cadherin (B) und Aquaporin-1. Aquaporin-2 wurde nicht exprimiert	

	(D). hKDCs waren mit den Lektinen LTL (E) und DBA (F) anfärbar. Maßstabsbalken = 100 µm	65
Abbildung 4-5:	Mikroskopische Aufnahmen der hKDCs in 24-Well-Platten an Tag 2 (A), 9 (B) und 21 (C) nach Aussaat. Die Zellen bilden mehrschichtige Bereiche. An Tag 21 sind abgelöste Zellegragte erkennbar (Pfeile). Maßstabsbalken = 200 µm.....	66
Abbildung 4-6:	HE-Färbung von hKDCs auf Kollagen-Typ-I-beschichteten PET-Membranen an Tag 7 (A) und Tag 21 (B) nach Aussaat. Die Zellen weisen eine flache Morphologie und ein mehrschichtiges Wachstum auf. Maßstabsbalken = 50 µm.....	67
Abbildung 4-7:	HE-Färbung von hKDCs in Kollagen-Typ-I-Hydrogel an Tag 14. Es sind tubuläre Strukturen (A) sowie diffuse Zellaggregate (B) erkennbar. Maßstabsbalken = 50 µm	68
Abbildung 4-8:	Qualitätskontrolle der SIS. In der HE-Färbung des nativen Dünndarms (A) sind die Mucosa (1), die Submucosa (2) und die Muscularis (3) noch erkennbar. Durch die Azellularisierung ließ sich die zellfreie Matrix der Submucosa (SIS) gewinnen (B). Die Adhäsion der hKDCs auf der SIS ließ sich nach 5-tägiger Kultur über einen MTT-Test nachweisen (C). Maßstabsbalken A = 500 µm, B = 100 µm	69
Abbildung 4-9:	HE-Färbung von hKDCs auf der SIS 7 (A,B) und 21 (C,D) Tage nach Aussaat sowie humanem nativem Nierengewebe (E). Die hKDCs bilden innerhalb von 21 Tagen eine konfluente Zellschicht aus kubisch bis hochprismatischen Zellen. Maßstabsbalken A und C = 500 µm, B und D = 50 µm.....	70
Abbildung 4-10:	Über die immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 konnte die Abnahme proliferierender hKDCs von Tag 7 (A) zu Tag 21 (B) nach Aussaat auf der SIS nachgewiesen werden. Maßstabsbalken = 100 µm.....	70
Abbildung 4-11:	Bürstensaumstrukturen bei hKDCs nach 21-tägiger Kultivierung auf der SIS. HE-Färbung (A, markierter Ausschnitt rechts vergrößert), Hämalaun-Färbung (B, markierter Ausschnitt rechts vergrößert), rasterlektronenmikroskopische Aufnahmen (C, Maßstabsbalken = 1 µm).....	71
Abbildung 4-12:	Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ IV bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (A), azellularisierter SIS (B) und auf nativem humanem Nierengewebe (C). Alcianblau (pH 2,5)-Färbung bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (D), azellularisierter SIS (E) und auf nativem humanem Nierengewebe (F). Es war die Synthese und basale Sekretion	

- von Basalmembranbestandteilen durch die hKDCs nachweisbar. Maßstabsbalken A, C-F = 50 μm , B = 200 μm 72
- Abbildung 4-13:** Immunhistochemische Färbung von Adhärenzproteinen. N-Cadherin bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (A, markierter Ausschnitt rechts vergrößert) und auf nativem humanem Nierengewebe (B). E-Cadherin bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (C markierter Ausschnitt rechts vergrößert) und auf nativem humanem Nierengewebe (D). Maßstabsbalken A = 100 μm , B = 20 μm , C = 100 μm , D = 50 μm 73
- Abbildung 4-14:** Immunhistochemische Färbung von Aquaporinen. Aquaporin-1 bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (A und B, markierter Ausschnitt rechts vergrößert) und auf nativem humanem Nierengewebe (C). Aquaporin-2 bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (markierter Ausschnitt rechts vergrößert) und auf (E) nativem humanem Nierengewebe. Aquaporin-1 war insbesondere in apikalen Bürstensaumstrukturen der hKDCs auf der SIS nachweisbar, Aquaporin-2 wurde nicht von den hKDCs exprimiert. Maßstabsbalken A-E = 50 μm , Ausschnitte von A, B und D = 20 μm 74
- Abbildung 4-15:** Lektinfärbungen. LTL bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (A,B) und auf nativem humanem Nierengewebe (C). DBA bei hKDCs auf der SIS 21 Tage nach Aussaat (D,E) und auf nativem humanem Nierengewebe (F). Maßstabsbalken A und D = 200 μm , B,C, E und F = 100 μm 75
- Abbildung 4-16:** Für die Raman-Spektroskopie abgelöste Zellen nach 1 Tag (A) und 21 Tagen (B) auf der SIS. Es ist die Vergrößerung des Zelldurchmessers von Tag 1 zu Tag 21 erkennbar. Maßstabsbalken = 20 μm 76
- Abbildung 4-17:** Score Plot der Hauptkomponentenanalyse von den Raman-Spektren. hKDCs vor der SIS-Kultur sowie nach 1- und 21-tägiger Kultivierung auf der SIS (A). hKDCs nach 1- und 21-tägiger Kultivierung auf der SIS (B). Die Trennung der Zellen nach 1- und 21-tägiger Kultivierung auf der SIS ist insbesondere in (B) erkennbar. PC = Principal Component (Hauptkomponente)..... 76
- Abbildung 4-18:** Albuminaufnahme durch die hKDCs nach 14-tägiger Kultur auf der SIS. Zellkerne = blau (DAPI-Färbung), FITC-markiertes bovines Serumalbumin = grün..... 77
- Abbildung 4-19:** Charakterisierung der HDMECs auf Chamber Slides™. Über die Immunocytochemie der Marker CD31 (A) und vWF (B) sowie die Aufnahme von acLDL (C) war die endotheliale Identität und Funktionalität nachweisbar. (C): Zellkerne (DAPI-Färbung) = blau, acLDL-Alexa Fluor® 488 = grün. Maßstabsbalken A und B = 50 μm 78

- Abbildung 4-20:** Co-Kultur von hKDCs und HDMECs auf der SIS. HE-Färbung (A) und immunhistochemische Färbung von CD31 auf der Co-Kultur (B) sowie auf nativem Nierengewebe (C) und vWF auf der Co-Kultur (D) sowie nativem Hautgewebe (E). Es waren konfluente Schichten beider Zelltypen nachweisbar auf der SIS. Maßstabsbalken A, B und D = 50 µm, C und E = 100 µm..... 79
- Abbildung 4-21:** Co-Kultur von hKDCs und HDMECs auf der SIS. Immunhistochemische Färbung von Aquaporin-1 (A), Lektinfärbungen mit LTL (B) und DBA (C). Maßstabsbalken = 50 µm 79
- Abbildung 4-22:** Die HE-Färbung von HK-2-Zellen auf der SIS nach 7 (A), 14 (B) und 21 Tagen (C) nach Aussaat zeigt mehrschichtiges Wachstum der Zellen sowie eine partielle Zellfragmentierung. Maßstabsbalken = 50 µm 80
- Abbildung 4-23:** Immunhistochemische Färbung der HK-2-Zellen nach 3-wöchiger Kultur auf der SIS. N-Cadherin (A), E-Cadherin (B), Aquaporin-1 (C), Ki67 (D), Kollagen Typ IV (E). Maßstabsbalken = 50 µm 81
- Abbildung 4-24:** Lektinfärbungen der HK-2-Zellen nach dreiwöchiger Kultur auf der SIS. LTL-Färbung (A) und DBA-Färbung (B). Maßstabsbalken = 50 µm..... 81
- Abbildung 4-25:** BioVaSc im Reaktor. Gefäße zur Visualisierung mit Trypanblau angefärbt. 82
- Abbildung 4-26:** HE-Färbung des nativen porcinen Dünndarmgewebes (A) und der der azellularisierten BioVaSc (B,C). Maßstabsbalken = 500 µm..... 82
- Abbildung 4-27:** Immunhistochemie von CD31 (A,B) und vWF (C,D) von BR 7. Querschnitt des Mesenteriums (A,C), Querschnitt der Darmwand (B,D). Größere Gefäße werden von HDMECs ausgekleidet während kleinere Gefäße mit HDMECs ausgefüllt sind..... 84
- Abbildung 4-28:** Verlauf der Stoffwechsellparameter Glucose, Laktat und Laktatdehydrogenase bei dynamischen hKDC-Kulturen in der BioVaSc über 21 bis 23 Tage (Versuche BR3, BR4 und BR6). Pfeile = Zeitpunkte der Medienwechsel 85
- Abbildung 4-29:** MTT-Test eines mit Endothelzellen und hKDCs besiedelten BioVaSc-Teilsegments nach der dynamischen Kultur im Bioreaktor. Geschlossenes Lumen (A) und aufgeschnittenes Lumen (B). Vitale Zellen waren in den Gefäßstrukturen und großflächig auf der Mucosamatrix nachweisbar..... 86
- Abbildung 4-30:** Lebend-Tot-Färbung der mit hKDCs besiedelten BioVaSc-Matrix (BR8). Vitale hKDCs bedeckten die Zottenstrukturen der Mucosamatrix; es waren nur wenige abgestorbene Zellen nachweisbar. Maßstabsbalken A = 200 µm,

	B und C = 100 µm. Fluoresceindiazetat (vitale Zellen) = grün, Propidiumiodid (tote Zellen) = rot	86
Abbildung 4-31:	Unterschiedliches Wachstum der hKDCs in der BioVaSc nach dynamischer Kultivierung. Es war mehrschichtiges Wachstum mit sich ablösenden Zellaggregaten (A), einschichtiges Wachstum mit hochprismatischer Morphologie (B) sowie eine undurchgängige Zellschicht (C) in den HE-Färbungen erkennbar.	87
Abbildung 4-32:	Immunhistochemische Färbung von N-Cadherin bei BR 8 (A) und E-Cadherin bei BR 2 (links) und BR 7 (rechts) (B)	88
Abbildung 4-33:	Immunhistochemische Färbung von Aquaporin-1 bei BR 1 (links) und BR 7 (rechts) (A) und Aquaporin-2 bei BR 2 (B).....	88
Abbildung 4-34:	Immunhistochemische Färbung von Ki67 bei BR 3 (A) und Kollagen Typ IV bei BR 1 (B) und einer azellulärem BioVaSc als Kontrolle (C).....	89
Abbildung 4-35:	Lektinfärbung mit LTL bei BR 2 (links) und BR 7 (rechts) (A) und DBA bei BR 2 (links) und BR 7 (rechts) (B).....	89
Abbildung 4-36:	HE-Färbung der BioVaSc mit entfernter Mucosa. Für die Kultur der hKDCs auf der Submucosa der BioVaSc ließ sich die Mucosa bis auf einige Rückstände entfernen.....	90
Abbildung 4-37:	HE-Färbung der hKDCs in der BioVaSc mit entfernter Mucosa nach der dynamischen Kultivierung (BR5). Stark mehrschichtiges Wachstum der hKDCs auf der Submucosa im Vergleich zu geringerer Zelldichte auf Mucosa-ECM-Rückständen (A,B). Einschichtiges Wachstum mit hochprismatischer Morphologie (C).....	90
Abbildung 4-38:	Immunhistochemische Färbung von N-Cadherin (A), E-Cadherin (B), Aquaporin-1 (C), Ki67 (D) und Lektinfärbung mit LTL (E) und DBA (F) bei BR 5.....	91

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1:	Übersicht der Versuche zur dynamischen Kultur der hKDCs in der BioVaSc.....	83
Tabelle 4-2:	Übersicht der Markerexpression über die verschiedenen Kultivierungsbedingungen. – = 0 %, +/- = >0 % bis 10 %, + = >10 % bis 40 %, ++ = >40 % bis 70 %, +++ = >70 % bis 100 % der Zellen waren positiv für den untersuchten Marker. n.b. = nicht bestimmt	93

9 Veröffentlichungen

Kongressbeiträge

Hoppensack A, Schanz J, Kazanecki C, Colter D, Walles H (2011): "Establishment of a human *in vitro* model of the renal proximal tubule". Annual meeting of the European Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) in Granada/Spainien (*Vortrag*)

Abstract veröffentlicht in: *Histology and Histopathology* Volume 26 (supplement 1), 2011

Hoppensack A, Schanz J, Kazanecki C, Colter D, Walles H (2011): "Human kidney-derived cells cultured on small intestinal submucosa to generate a renal proximal tubule model". World Conference on Regenerative Medicine (WCRM) in Leipzig (*Vortrag*)

Hoppensack A, Schanz J, Kazanecki C, Colter D, Walles H (2012): "An *in vitro* model of the renal proximal tubule composed of human kidney-derived cells and small intestinal submucosa". 3rd International Conference "Strategies in Tissue Engineering" in Würzburg (*Poster*)

Hoppensack A, Schanz J, Kazanecki C, Colter D, Walles H (2012): "Small intestinal submucosa (SIS) as a natural biomaterial that promotes the epithelial morphogenesis of renal tubular cells". Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien in Hamburg (*Vortrag*)

Hoppensack A, Schanz J, Kazanecki C, Colter D, Schenke-Layland K, Walles H (2013): "Epithelial morphogenesis of renal tubular cells on small intestinal submucosa". 17th Annual Hilton Head Workshop "Regenerative Medicine: Technologies Enabling Novel Therapies." in Hilton Head Island/USA (*als Poster angenommen*)

Beteiligung an Patenten

Kazanecki C, Colter DC, Schanz J, **Hoppensack A**, Hansmann J, Walles H: Bioartificial proximal tubule systems and methods of use. *Advanced Technologies And Regenerative Medicine, LLC (Raynham, MA, US) 2012 US Patent 20120301958*

10 Danksagung

Ich danke herzlichst Prof. Heike Walles für die Aufnahme als Doktorandin in ihre Abteilung, die Betreuung und Förderung sowie die Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Prof. Thomas Dandekar bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Thomas Hirth danke ich für die Möglichkeit, die Promotion am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik durchzuführen.

Ich möchte besonders Dr. Johanna Schanz für die tolle Betreuung, die Förderung und Inspiration danken; außerdem für die vielen Dinge, die ich von ihr gelernt habe sowie ihre positive Art, die mich immer motiviert hat.

Vielen Dank an die Firma *Advanced Technologies and Regenerative Medicine (ATRM), LLC, a Johnson & Johnson company* für die Finanzierung des Projekts und die Zurverfügungstellung der Zellen. Ein besonderer Dank gilt dabei Christian Kazanecki, PhD und David Colter, PhD für die tolle Zusammenarbeit und den interessanten Austausch.

Bei Dr. Hans-Ulrich Markmann möchte ich mich für die Bereitstellung von Nierengewebeproben bedanken.

Dr. Jacqueline Pusch und Dr. Jan Hansmann danke ich für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge.

Weiterhin danke ich Jasmin Kuttner für die engagierte Unterstützung, Brigitte Höhl für die Unterstützung in der Histologie, Eva Brauchle für die Ramanmessungen, Florian Groeber für die LSM-Aufnahmen und Dr. Dominique Tordy für die Explantation des porcinen Materials.

Ein großer Dank auch an die gesamte Abteilung Zellsysteme für die schöne Zeit, insbesondere Iris Dally, Katharina Reutlinger, Lena Schober und Nele Jenne.

Ein herzlicher Dank an meine Familie und meinen Freund für die Unterstützung und den Glauben an mich.