

# **Entwicklung eines bioartifiziellen Nierentubuluskonstruktes auf Basis humaner Nierenepithelzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe Universität  
in Frankfurt am Main

von  
David Luttrupp  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2009  
(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. V. Müller

Gutachter: Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn, Prof. Dr. H. Geiger

Datum der Disputation : .....



## **Danksagung**

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Dr. Reinhold Deppisch aussprechen, welcher mir die Fortsetzung meiner Arbeit bei der Gambro GmbH ermöglichte. Durch seine große, ihm ganz eigene Begeisterung für das Thema leistete er über die Projektleitung bei Gambro hinaus seinen ganz besonderen Beitrag zu meiner Arbeit und wusste es zu jedem Zeitpunkt neue motivierende Impulse zu setzen, Perspektiven zu verschieben und zu erweitern.

Sehr danken möchte ich Prof. Dr. Bereiter-Hahn, der mich als Doktorand in seiner Arbeitsgruppe aufnahm, mir alle notwendigen administrativen und technisch-methodischen Voraussetzungen bereitstellte, für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen und damit der Ermöglichung der vorliegenden Arbeit.

Dr. Patrick Baer danke ich für die unkomplizierte Bereitstellung der hierin verwendeten primären Tubulusepithelzellen, für die gute Zusammenarbeit, Hilfestellungen und anregenden Diskussionen in jedem Abschnitt meiner Arbeit.

Ich danke allen, die mir in den Belangen der praktischen Umsetzung der sehr anspruchsvollen Versuchsanordnungen halfen. Im besonderen seinen hierbei Maila Rossberg (Kinematische Zellforschung, Universität Frankfurt), Rose Speidel, Sandra Homeyer, Katrin Brodbeck, Verena Kieferle und Kathrin Hutzler (alle Gambro GmbH) genannt, welche sich, im Falle meiner Abwesenheit in aufopfernder Art und Weise um meine zum Teil eigensinnigen und anspruchsvollen Versuchsanordnungen kümmerten, die Pflege der hierbei verwendeten Zellen übernahmen und mit Rat und Tat beiseite standen.

Nicht zu verachten ist der wissenschaftliche und menschliche Beitrag von Radhan Ramadass, Chris Blase (Kinematische Zellforschung) und Dr. Markus Neubauer (Gambro GmbH) sowie aller weiteren Kollegen der Kinematischen Zellforschung und der Gambro GmbH zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Herzlichst danken möchte ich Alice Ludwig und meiner Tochter Luzie Ludwig. Ohne ihr Verständnis und ihre Geduld aber auch ohne ihre Ermutigungen und Ablenkungen wäre diese Arbeit wohl nicht fertig geworden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Wissenschaftlicher Hintergrund</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Einleitung</i> .....	1
1.2 <i>Tissue Engineering</i> .....	2
1.2.1 Zellen und Zellquellen.....	3
1.2.2 Matrix und Substrate.....	4
1.2.3 Medienformulierungen.....	5
1.2.4 Prozessführung und Reaktortechnik.....	6
1.3 <i>Epithelzellen</i> .....	7
1.3.1 Tight Junctions.....	8
1.3.2 Adherent-Junctions.....	8
1.4 <i>Überblick über die Nierenfunktion</i> .....	10
1.5 <i>Funktion der Nephronsegmente</i> .....	13
1.5.1 Glomerulus.....	13
1.5.2 Proximaler Tubulus (PT).....	15
1.5.3 Henle-Schleife.....	20
1.5.4 Distales Konvolut (DCT).....	22
1.5.5 Sammelrohr (CLD).....	22
1.6 <i>Endokrine Funktionen der Niere</i> .....	23
1.7 <i>Sauerstoffversorgung und Metabolismus der Niere</i> .....	23
1.8 <i>Nierenversagen</i> .....	25
1.8.1 Chronische Niereninsuffizienz.....	25
1.8.2 Akutes Nierenversagen.....	26
1.9 <i>Nierenersatztherapien</i> .....	30
1.10 <i>Hämodialyse</i> .....	31
1.10.1 Hämofiltration.....	31
1.10.2 Hämodiafiltration.....	32
1.10.3 Peritonealdialyse.....	32
1.10.4 Defizite der klinischen Verfahren.....	33
1.11 <i>Biotechnologische Nierenäquivalente</i> .....	33
1.12 <i>Ziel dieser Arbeit</i> .....	36
<b>2 Material</b> .....	<b>37</b>

2.1 Geräte.....	37
2.2 Software.....	38
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	39
2.4 Chemikalien.....	39
2.5 Antikörper, Farbstoffe & Testkits .....	40
2.6 Medien, Mediensupplemente und Reagenzien Zellkultur.....	40
2.7 Zellen.....	41
2.7.1 Zelllinie MDCK.....	41
2.7.2 Zelllinie HK2.....	41
2.7.3 Primäre Zellen aus Isolierungen.....	42
2.7.4 Kommerzielle primäre, proximale Tubulusepithelzellen „RPTEC“ .....	43
<b>3 Methoden.....</b>	<b>43</b>
3.1 Statistische Methoden.....	43
3.1.1 DOE – Medienoptimierung.....	44
3.2 Zellkulturmethoden.....	45
3.2.1 Kultursysteme.....	45
3.2.2 Subkultivierung.....	46
3.3 Modulmethoden.....	50
3.3.1 Perfusionssystem.....	50
3.3.2 Einsaatmethode.....	51
3.3.3 Modul Kultivierungsmethoden.....	53
3.3.4 Ermittlung funktionaler Parameter.....	54
3.3.5 Fixierung der Module.....	55
3.4 Mikroskopische Methoden.....	56
3.4.1 Fixierungen.....	56
3.4.2 Weiterbearbeitung fixierter Proben für die Mikroskopie.....	57
3.4.3 Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie.....	59
3.5 Analytische Methoden.....	60
3.5.1 Konzentrationsbestimmung von Elektrolyten und Metaboliten.....	60
3.5.2 CD133 Analyse mittels Durchflusszytometrie.....	60
3.5.3 TGF-β1 Bestimmung über Sandwich-ELISA.....	61
3.5.4 Zytokinbestimmung.....	61
3.5.5 Perfusionsrespirometrie.....	62
3.6 Medienoptimierung.....	70

<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>72</b>
4.1 <i>Membranscreening</i> .....	72
4.1.1 Unmodifizierte Standardmembran.....	72
4.1.2 Blend- und Plasmamodifikationen an PVP – PES Membranen.....	73
4.1.3 PEI-PAN Membranen.....	74
4.1.4 Epitheliale Feinstrukturen auf Membranen.....	75
4.1.5 Immunofluoreszenz spezifischer Marker auf PEI-PAN Inserts.....	78
4.1.6 Monolayerdichtigkeit auf PEI-PAN Inserts.....	79
4.1.7 Zusammenfassung der Membranversuche.....	80
4.2 <i>Perfusionsrespirometrie</i> .....	80
4.2.1 Basisatmung.....	81
4.2.2 Transportabhängiger Sauerstoffbedarf & Atmungskapazität.....	82
4.2.3 Sauerstoffabhängige Atmungsaktivität.....	83
4.2.4 Zusammenfassung der Sauerstoffverbrauchsmessungen.....	85
4.3 <i>Effekte der Medienformulierung</i> .....	85
4.3.1 TGF- $\beta$ 1.....	85
4.4 <i>Medienoptimierung</i> .....	88
4.4.1 Ergebnisse der Faktoren-Screenings.....	88
4.4.2 Zusammenfassung der Medienoptimierungen.....	90
4.4.3 Validierung der gefundenen Medienformulierung.....	91
4.5 <i>CD133 Expression verschiedener Tubulusepithelzellfraktionen</i> .....	99
4.6 <i>Strömungszustände der Perfusionskulturen</i> .....	100
4.6.1 Strömungszustände in der Perfusionskammer.....	102
4.6.2 Strömungszustände in der Kapillare.....	105
4.7 <i>Perfusionssystem</i> .....	109
4.7.1 Anforderungen und Parameter.....	109
4.7.2 Komponenten.....	110
4.7.3 Entwicklung der Modulkultivierungsmethoden.....	114
4.8 <i>Ergebnisse Modulperfusionen</i> .....	118
4.8.1 COOH-plasmafunktionalisierte Membrankapillaren.....	118
4.8.2 Kapillaren aus (PEI-) PAN.....	120
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>134</b>
5.1 <i>Materialscreening mittels Flachmembranen</i> .....	134
5.2 <i>Sauerstoffbedarf</i> .....	136

5.3 Medienformulierung.....	141
5.4 CD133+ Fraktionen primär isolierter Tubulusepithelien.....	146
5.5 Perfusionssystem.....	148
5.6 Zellquellen.....	151
5.7 Upscaling.....	155
<b>6 Fazit und Ausblick.....</b>	<b>156</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>160</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>168</b>
8.1 Patentanmeldungen, Konferenzen und Zitate.....	168
8.2 Abkürzungsverzeichnis.....	169
8.3 Lebenslauf.....	170

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung epithelialer Merkmale.....	10
Abbildung 2: Wichtigste Nephronabschnitte.....	13
Abbildung 3: Carrier- & Transportmodell proximaler Tubuluszellen der Ratte.....	20
Abbildung 4: Modell der Tubulusregeneration.....	30
Abbildung 5: Darstellung des HyTube - Systems.....	37
Abbildung 6: Transwell - Kultursystem.....	46
Abbildung 7: Darstellung der verschiedenen Perfusionsmodi.....	50
Abbildung 8: Schema des Einsaatprozesses.....	52
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Perfusionsrespirometers.....	64
Abbildung 10: Exemplarischer Rohdatenverlauf zur Bestimmung der Basisatmung.....	68
Abbildung 11: Exemplarischer Rohdatenverlauf zur Bestimmung der sauerstoffabhängigen Atmung.....	69
Abbildung 12: Adhäsionsversuche auf Standardmembranen.....	73
Abbildung 13: Kernfärbung von MDCK auf verschiedenen Membranmodifikationen.....	74
Abbildung 14: Phasenkontrastmikroskopie von Primärzellen auf (PEI)-PAN Membranen.....	75
Abbildung 15: REM von Primärzellen auf verschiedenen Membranmodifikationen.....	76
Abbildung 16: REM von Primärzellen auf (PEI)-PAN Membranen.....	77
Abbildung 17: CLSM (ZO1 & AQP1); Lokalisation bei hPTC auf PEI-PAN Flachmembranen.....	78
Abbildung 18: Dichtigkeit der Monolayer auf PEI-PAN gegenüber Phenolrot.....	79
Abbildung 19: Dichtigkeit der Monolayer auf PEI-PAN gegenüber FITC-Inulin.....	80
Abbildung 20: Basisatmung von hPTC & hDTC.....	82
Abbildung 21: Sauerstoffaufnahme von hPTC & hDTC unter verschiedenen Bedingungen.....	83
Abbildung 22: Sauerstoffaufnahme von hPTC & hDTC in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration.....	84
Abbildung 23: Morphologische Veränderungen der Zellen über die Kulturdauer.....	86
Abbildung 24: TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen verschiedener Überstände.....	87
Abbildung 25: DOE: Pareto-Diagramme der Effekte der untersuchten Faktoren.....	88
Abbildung 26: Vergleich von $T_d$ & Dichte in Kontrollmedien.....	90
Abbildung 27: Phasenkontrast Morphologievergleich: SFM+S und M199+F auf PEI-PAN.....	92
Abbildung 28: REM Morphologievergleich: SFM+S und M199+F auf PEI-PAN .....	93
Abbildung 29: CLSM (AQP1 & ZO1) Morphologievergleich: in SFM+S und M199+F auf -PEI-PAN.....	94
Abbildung 30: Vergleich der Monolayerdichtigkeit in SFK+S und M199+F auf PEI-PAN.....	95
Abbildung 31: Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 und proinflammatorischen Zytokinen in SFK+S und M199+F auf PEI-PAN.....	97
Abbildung 32: Vergleich der erreichten Dichte in SFK+S und M199+F auf PEI-PAN.....	98
Abbildung 33: FACS Screening; CD133 Expression der verschiedenen Zellfraktionen.....	100
Abbildung 34: Skizze Strömungsverlauf in der Perfusionskammer.....	102
Abbildung 35: Zeitreihe des Strömungsverlaufs in der Perfusionskammer.....	104
Abbildung 36: Laminare Rohrströmung.....	105

Abbildung 37: Laminare Rohrströmung in epithelialen Röhren mit dichten Mikrovillibesatz.....	106
Abbildung 38: Versuchsaufbau des Perfusionssystems.....	111
Abbildung 39: Modulares Schlauchsystem des Perfusionssystems.....	113
Abbildung 40: Schematische Darstellung der möglichen Einsaatverfahren.....	116
Abbildung 41: REM – Aufnahmen „erste Modulperfusionen“ (MDCK auf COOH-Plasmamod.).....	119
Abbildung 42: REM – Aufnahmen „erste Modulperfusionen“ (hTEC auf COOH-Plasmamod.).....	120
Abbildung 43: Initialer Perfusionsmodus; IC vs. EC Perfusion (MDCK auf PAN).....	122
Abbildung 44: REM – Aufnahmen Modulperfusion (MDCK auf PEI-PAN).....	123
Abbildung 45: CLSM (ECad) Modulperfusion; Übersicht der Monolayer (MDCK auf PAN).....	124
Abbildung 46: CLSM (ECad) Modulperfusion; Detaildarstellung der Monolayer (MDCK auf PAN).....	125
Abbildung 47: REM – Aufnahmen Modulperfusion (HK2 auf PAN).....	126
Abbildung 48: CLSM (ZO1) Modulperfusion; Übersicht der Monolayer (HK2 auf PAN).....	127
Abbildung 49: CLSM (ZO1) Modulperfusion; Detaildarstellung der Monolayer (HK2 auf PAN).....	128
Abbildung 50: REM – Aufnahmen Modulperfusion vor Medienoptimierung (hDTC auf PEI-PAN).....	129
Abbildung 51: REM – Aufnahmen Modulperfusion nach Medienoptimierung (hNF auf PEI-PAN).....	130
Abbildung 52: CLSM (ZO1) Modulperfusion; Übersicht der Monolayer (hNF auf PEI-PAN).....	131
Abbildung 53: CLSM (ZO1) Modulperfusion; Detaildarstellung der Monolayer (hDNeg auf PAN).....	132
Abbildung 54: CLSM (ZO1 & AQP1) Modulperfusion; Lokalisation (hDNeg auf PEI-PAN).....	133

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Überblick über die Nierenfunktionen.....	11
Tabelle 1.2: Abschnitte des Nephrons.....	11
Tabelle 1.3: Relative Menge vom proximalen Tubulus resorbierten Substanzen.....	15
Tabelle 1.4: Wichtige Transporter des proximalen Tubulus.....	19
Tabelle 1.5: Verlauf des chronischen Nierenversagens.....	25
Tabelle 1.6: Nachgewiesene Funktionen des RAD nach Humes et al.....	35
Tabelle 1.7: Zellen und Materialien verschiedener Gruppen.....	35
Tabelle 3.1: Lösungstypen von 2k-p Versuchsplänen und deren Vermengung.....	44
Tabelle 3.2: Verwendete Zellkultursysteme und Volumina.....	45
Tabelle 3.3: Spülvolumen und -geschwindigkeiten der Module.....	51
Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper und deren Verdünnungen.....	58
Tabelle 3.5: Verwendete Laser- / Filtereinstellungen für CLSM Untersuchungen.....	60
Tabelle 3.6: Adaptierte Michaelis-Menten-Parameter.....	67
Tabelle 3.7: Ermittelte Sauerstoffaufnahmen aus Rohdaten I.....	68
Tabelle 3.8: Ermittelte Sauerstoffaufnahmen aus Rohdaten II.....	69
Tabelle 3.9: DOE Faktoren, Kontrollen und Antwortgrößen.....	71
Tabelle 3.10: Vermengungen der 2fach Wechselwirkungen des Versuchsplans.....	71
Tabelle 4.1: Zusammenfassung des Membranscreenings.....	80
Tabelle 4.2: Basisatmung von hPTC und hDTC.....	81
Tabelle 4.3: Ermittelte Michaelis-Menten Parameter für hPTC & hDTC.....	84
Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Atmungsparameter.....	85
Tabelle 4.5: TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen in verschiedenen Überständen nach 3Tagen.....	87
Tabelle 4.6: Bewertung der ermittelten Effekte der untersuchten Supplemente.....	89
Tabelle 4.7: T-Test Verdopplungszeit und Zelldichten in den Kontrollmedien.....	89
Tabelle 4.8: Gewählte Supplemente und deren Konzentrationen für die serumarme Medienformulierung (SFM+S).....	91
Tabelle 4.9: T-Test FITC-Inulin Dichtigkeit nach 21Tagen (hNF P2).....	95
Tabelle 4.10: Konzentration von TGF- $\beta$ 1 und proinflammatorischen Zytokinen nach 24h Kultur in verschiedenen Medien hNF P2.....	96
Tabelle 4.11: Konzentration von TGF- $\beta$ 1 und proinflammatorischen Zytokinen nach 24h Kultur in verschiedenen Medien RPTEC P3.....	96
Tabelle 4.12: Erreichte RPTEC Zelldichten nach 30Tagen Kultur in verschiedenen Medien.....	98
Tabelle 4.13: T-Test RPTEC Zelldichten nach 30 Tagen Kultur in verschiedenen Medien.....	98
Tabelle 4.14: Übersicht Strömungsparameter Perfusionskammer.....	104
Tabelle 4.15: Vergleich der Strömungszustände im Nephron.....	108
Tabelle 4.16: Minimale und maximale Flussraten für Perfusionen des inneren Kompartimentes.....	109
Tabelle 4.17: Auswahl einiger Modulperforationsparameter.....	110



Tabelle 4.18: Verwendete Module und zugehörige geometrische Daten.....	112
Tabelle 4.19: Segmente des Schlauchsatzes.....	113
Tabelle 4.20: Parameter der Modulbefüllung.....	114
Tabelle 4.21.: Einsaatverfahren und deren Vor- und Nachteile.....	115
Tabelle 4.22.: Weitere Optimierungen der Moduleinsaat.....	116
Tabelle 5.1: Vergleich Sauerstoffbedarf proximaler Zellen.....	139
Tabelle 5.2: Vergleich Sauerstoffbedarf distaler Zellen.....	139

## Verzeichnis der verwendeten Formelzeichen

<i>Zeichen</i>	<i>Größe</i>	<i>Einheit</i>
a	Breite	mm
A	Fläche	mm <sup>2</sup>
A <sub>q</sub>	Durchströmte Fläche	mm <sup>2</sup>
d	Durchmesser	mm
F, Q	Fluss	ml h <sup>-1</sup>
F <sub>τ</sub>	Scherkraft	N
G <sub>p</sub>	Druckgradient	N mm <sup>-1</sup>
h	Höhe	m
K <sub>m</sub> =pO <sub>2(50)</sub>	Michaeliskonstante	%pO <sub>2</sub>
l	Länge	M; mm
L	Microvillilänge	mm
m	Steigung der Sauerstoffelektrode	mmol V <sup>-1</sup>
n; N	Anzahl	l
OUR	Sauerstoffbedarf	mmol 10 <sup>-6</sup> Zellen h <sup>-1</sup>
P	Druck	N m <sup>-2</sup> ; dyn; mmHG
r	Radius	mm
Re	Reynoldszahl	
T	Temperatur	°C
U	Spannung	V
v	Strömungsgeschwindigkeit (Vektor)	m s <sup>-1</sup>
w	Strömungsgeschwindigkeit	m s <sup>-1</sup>
x	x Koordinate	m
y	y Koordinate	m
z	z Koordinate	m
τ	Scherstress	dyn cm <sup>-2</sup> ; N m <sup>-2</sup>
η	dynamische Viskosität	N s m <sup>-2</sup>
ν	kinematische Viskosität	m <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup>
ρ	Dichte	kg·m <sup>-3</sup>

# 1 Wissenschaftlicher Hintergrund

## 1.1 Einleitung

Bei einem chronischen oder akuten Ausfall der Niere und damit auch der für den Körper lebenswichtigen Homöostase von Wasser, Elektrolyten, Säure-Basen und der Entfernung toxischer Metaboliten stehen im klinischen Alltag extrakorporale Nierenersatzverfahren, wie die Hämodialyse, Hämofiltration und Hämodiafiltration, zur Verfügung. Dennoch zeigt sich gerade im Falle des akuten Nierenversagens kaum eine Verminderung der immer noch hohen Mortalität seit der Routinierung der klinischen Verfahren. Patienten mit terminalem Nierenversagen überleben den Ausfall der Nierenfunktion nur mit schlechter Lebensqualität und multiplen Folgeschäden. Selbst nach Jahren der Forschung und Optimierung wie z.B. der Entwicklung biokompatibler, synthetischer Membranen, können die oben genannten medizinischen Verfahren nur die physikalischen Prinzipien des Glomerulus nachahmen. Im besonderen die weitergehenden, komplexen, physiologischen Funktionen des renalen Tubulussystems, welche über eine reine Stofftrennung hinausgehen, können hierbei nicht nachgebildet werden. Die mit dem Ausfall der Nierenfunktion verbundenen metabolischen und endokrinen Störungen werden nicht ausreichend korrigiert und sind Ursache der hohen Morbidität und Mortalität dieser Patientengruppe durch kardio-vaskuläre sowie inflammatorische Komplikationen. Patienten mit akutem Nierenversagen bzw. eingeschränkter Nierenfunktion haben weiterhin unter intensivmedizinischen Behandlungen ein stark erhöhtes Risiko zu versterben bzw. nachfolgend durch schwerwiegende Nachwirkungen behandlungsbedürftig zu bleiben.

Mit dem Tissue Engineering, der Integration von Zellen bzw. Geweben und deren biologischer Funktionen in form- und funktionsgebende Substrate stehen Methoden zur Verfügung, die fehlenden biologischen Funktionen der Tubulusepithelien der Niere in die bereits vorhandenen, modernen Nierenersatztherapien zu integrieren und so den Patienten zur Verfügung zu stellen. Dabei werden isolierte, humane Tubulusepithelzellen (TECs) so in die porösen Kapillaren kommerzieller Hohlfasermodule eingebracht, dass diese *in vitro* zu einem geschlossenen Epithel proliferieren und nach Ausbildung von Polarität, spezifischer Differenzierung und *in vivo* Funktionen, ein bioartifizielles Tubuluskonstrukt (BTK) bilden. Die Membrankapillaren dienen nicht nur als

strukturgebende Matrix, sondern auch als immunologische Barriere im klinischen Einsatz am Patienten. Die Verwendung kommerzieller Hohlfasermodule, in denen solche Membrankapillaren bereits zur Maximierung der verfügbaren Fläche gebündelt werden, vereinfacht die spätere Integration in vorhandene technische Systeme.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Voraussetzungen, Membranmaterialien und Medienformulierungen identifiziert, sowie Systeme und Methoden entwickelt, die es ermöglichen, ein BTK mit primären, humanen Tubuluszellen zu bilden und über mikroskopische Methoden den Differenzierungsstatus der Zellen innerhalb der Membrankapillaren zu erfassen.

## **1.2 Tissue Engineering**

In der heutigen Medizin zählen die Behandlungen von Patienten mit Organausfall bzw. Organversagen zu den kostenintensivsten Therapien. Hierzu gehören der künstliche Ersatz u.a. von Herzklappen, Gelenken (z.B. Hüfte, Knie), Nieren- und Leberersatztherapien, aber auch die vollständige Transplantation von Spenderorganen wie Herz, Leber und Niere. Dabei stellen einerseits die künstlichen Implantate und Therapien trotz immenser Fortschritte nur die optimalste Behandlung zum momentanen Stand der Technik dar und bieten in keinem Falle einen vollen Funktionsersatz der komplexen biologischen Funktionen des substituierten Organs. Vollständige Transplantate andererseits begründen nicht nur ethische Probleme, sondern auch das Problem der hohen Nachfrage bei mangelndem Angebot, sowie kostenintensive Folgetherapien u.a. in Form von Immunsuppressiva und der medizinischen Nachsorge im allgemeinen.

Neue Möglichkeiten zeigen die interdisziplinären Strategien des Tissue Engineerings auf, mit denen es im optimalsten Falle gelingt, geschädigte Organe bzw. Gewebe durch patienteneigenes Gewebe (autolog), nach *in vitro* Prozessierung zu ersetzen. Unter Tissue Engineering werden Methoden zusammengefasst, mit deren Hilfe es ermöglicht wird, funktionelle biologische Eigenschaften von Zellen und Geweben durch *in vitro* Techniken therapeutisch nutzbar zu machen. Allgemein beinhaltet dies die Spezifizierung der benötigten biologischen Funktionen, die Identifizierung der zu verwendenden Zellen bzw. Gewebe sowie deren spezifische Isolation aus einer adäquaten Quelle, die *in vitro* Prozessierung und die anschließende therapeutische Anwendung am Patienten. Im einfachsten Falle bedeutet dies die Zellexpansion als *in vitro* Prozessierungsschritt und die Reimplantation als therapeutische Anwendung. Ein Beispiel hierfür stellt z.B. die autologe

Hauttransplantation nach *in vitro* Expansion bei Verbrennungsverletzungen dar. In komplexeren Anwendungen ist dies die Ansiedelung und Expansion der Zellen auf speziellen, formgebenden Matrices mit dem Ziel der dreidimensionalen Nachbildung ganzer Organe inklusive ihrer Funktion, wie dies z.B. für Knorpel des Kniegelenkes bereits praktiziert wird. Dabei ist die Nachbildung von Organen, deren Funktion aus der komplexen Interaktion verschiedener Gewebe im dreidimensionalen Kontext hervorgeht, wohl die größte Herausforderung des Tissue-Engineerings.

Zellen, Matrix, Medium und die entsprechende Prozessführung inklusive Reaktortechnik bilden die technisch-wissenschaftlichen Herausforderungen für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung des Tissue Engineering und beinhalten das interdisziplinäre Zusammenspiel von Zellbiologie, Materialwissenschaften, Biotechnologie und Medizin bzw. Physiologie. [1][2][3][4]

### **1.2.1 Zellen und Zellquellen**

Ausgangspunkt von auf Tissue Engineering basierenden Therapien sind Zellen bzw. Gewebe mit gewünschten therapeutischen biologischen Eigenschaften. Für eine therapeutische Anwendung müssen die Zellen einerseits gut charakterisiert, in anwendbaren Größenordnungen aus adäquaten Quellen zur Verfügung stehen, andererseits müssen die *in vitro* Bedingungen (Matrix, Medium) so beschaffen sein, dass die Zellen in gewünschter Weise expandieren und abschließend differenzieren bzw. die Differenzierung des Ursprungsgewebes nicht verlieren. Mögliche Quellen für eine Isolierung des Gewebes bzw. der Zellen mit den gewünschten Funktionen in präferierter Reihenfolge stellt patienteneigenes (autologes), von Spendern stammendes (allogenes) oder spezie fremdes (xenogenes) Gewebe dar. Es muss aber je nach Anwendung evaluiert werden, welche dieser Zellquellen überhaupt für den Fall der spezifischen Anwendung in Frage kommen kann. Generell gelten dabei in allen Fällen folgende Anforderungen: keine Pathogenität, keine Kanzerogenität, keine Allergentität, sowie ausreichende Expansionskapazität und Erhaltung der Differenzierung.

Gerade postmitotische, enddifferenzierte Zellen, die in ihrem *in vivo* Gewebekontext das volle spezifische Funktionsprofil erreicht haben, sind in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzykluses arretiert, lassen sich, wenn überhaupt, nur bedingt und unter Verlust der spezifischen Differenzierung *in vitro* wieder zur Teilung anregen. Da mit der Wiederaufnahme mitotischer Aktivitäten zwangsweise der Verlust der spezifischen Differenzierung einhergeht, muss diese im Anschluss an die Expansion über verschiedene Faktoren

wieder hergestellt und für eine therapeutische Anwendung gezeigt werden. Diese Problematik stellt hohe Herausforderungen an die Medienformulierungen und Kultivierungsbedingungen für eine Kultivierung isolierter Zellen aus enddifferenzierten Geweben dar. Unter den gängigen Standardbedingungen der Zellkultur, wie der statischen Kultivierung von Zellen in Petrischalen bzw. Zellkulturflaschen in Nährmedien mit hohen Serumkonzentrationen, ist dies für therapeutische Anwendungen nicht zu erreichen.

Neue Möglichkeiten eröffnen sich durch die Entdeckung, Isolierung und Charakterisierung von embryonalen, pluripotenten und somatischen (adulten), multipotenten Stammzellen. Während die Verwendung embryonaler Stammzellen eine Vielzahl ethischer, eng mit der Verfügbarkeit verknüpfte Fragestellungen aufwirft, zeigen somatische Stammzellen bevorzugte Eigenschaften für Anwendungen des Tissue Engineerings. Sie sind von den ethischen Problemen der embryonalen Stammzellen befreit, in jedem Individuum *in vivo* für die Regeneration vielerlei spezifischer Gewebe vorhanden und bieten somit Möglichkeiten autologer Therapieformen. In den letzten Jahren wurden für verschiedene Gewebe adulte Stammzellen nachgewiesen, die sich *in vitro* nach Expansion in spezifische Gewebe differenzieren ließen. Zwar stellen diese Zellen vergleichbar hohe Anforderungen an die Kultivierungsbedingungen, zeigen aber eine deutlich höhere Expansionsfähigkeit und -kapazität im Vergleich zu enddifferenzierten Zellen und lassen sich im Idealfall nach Expansion, je nach Gewebeherkunft (allgemeiner Keimblattabstammung) durch verschiedene Faktoren in eine Mehrzahl spezifischer Gewebe differenzieren.

Unabhängig davon, ob somatische Stamm- oder terminal ausdifferenzierte Zellen für eine klinische Anwendung in Frage kommen, müssen einerseits möglichst sämtliche Faktoren bekannt sein, die die Proliferation und Differenzierung dieser beeinflussen, und es müssen Charakterisierungsdaten vorliegen, anhand welcher die Spezifität der Zellen vor der Anwendung gezeigt werden kann. [1][2][3][4]

### **1.2.2 Matrix und Substrate**

Zur Matrix zählen die strukturgebenden, synthetischen oder biologischen Substrate (Matrix, Scaffolds), auf bzw. in welchen die Zellen des Zielgewebes erfolgreich adhären, proliferieren und schließlich funktional differenzieren sollen. Hierbei müssen die Materialien allerdings nicht nur im Bezug auf die Zellen entsprechend adäquate Eigenschaften aufweisen, sondern auch für die Anwendung z.B. speziellen mechanischen Ansprüchen genügen. Grundsätzlich wird einerseits zwischen biologischen und

synthetischen, andererseits zwischen stabilen und abbaubaren Materialien unterschieden. Zum Einsatz kommen verschiedenste Materialien, von synthetischen wie Keramik, Glas, verschiedene Metalle, synthetische Polymere bis hin zu biologischen Polymeren wie Kollagen, Alginat oder Matrigel. Die Vorteile biologischer Materialien liegen eindeutig in der erhöhten Biokompatibilität bei der Besiedelung von Zellen und beim Einsatz im Patienten, wobei auf der anderen Seite mangelnde mechanische Belastbarkeit, aber auch Bedenken im Einsatz am Patienten bezüglich möglicher Pathogenitäten vorliegen. Synthetische Materialien zeigen hohe mechanische Belastbarkeit werfen aber auch Probleme in Bezug auf die Auslösung von Immunreaktionen und Vernarbungen im Falle von Implantationen auf. Aus diesen Gründen werden bei Anwendungen, in denen das Substrat nur initialer Formgebung und keiner weiteren Funktion wie z.B. einer immunologischen Barriere dient, abbaubare Substrate bevorzugt. Hierbei wird das Substrat z.B. im Falle von Polylaktid von den Zellen verstoffwechselt.

Um den Zellen als ein adäquates Substrat zu dienen, sind vor allem Form, Porosität, Zytotoxizität und Polarität wichtige Parameter. Eine gängige Praxis in der Herstellung bzw. Vorbereitung für eine Steigerung der Biokompatibilität, im besonderen von synthetischen stabilen Materialien ist der Einbau oder die Beschichtung mit biologisch aktiven Komponenten wie z.B. Komponenten der Extra-Zellulären-Matrix, Fibrin, Kollagen, Laminin, Fibronectin, Gelatine, Plasmalektine, Integrine, RGD-Peptiden, autologem Plasma, Blut oder Serum. Auch hier gelten bei nicht-autologer Substrataktivierung die Bedenken der möglichen Pathogenität biologischer Agentien bei der Anwendung, und werden wenn möglich weitestgehend vermieden. [1][2][3][4]

### **1.2.3 Medienformulierungen**

Eine besondere Herausforderung im Tissue Engineering stellt die adäquate Formulierung des Kulturmediums an das Zielgewebe dar. Die Formulierung der Nährmedien muss möglichst das entsprechende *in vivo* Milieu der verwendeten Zellen *in vitro* in der entsprechenden Phase (Proliferation, Differenzierung, Funktion) nachbilden. Dazu gehören vor allem physiologischen Konzentrationen von Elektrolyten, metabolischen Substraten sowie physikalische Faktoren wie Sauerstoffsättigung und pH-Wert. Eine große Rolle spielen in diesem Falle Wachstumsfaktoren und Zytokine, sie sind potente Faktoren bei der Beeinflussung des Wachstumsverhaltens und vermögen sehr effektiv auf die Differenzierung der Zellen einzuwirken. In herkömmlichen Zellkulturen werden diese über eine Supplementierung des Nährmediums mit hohen Konzentrationen an Serum (z.B.

FCS) den Zellen verfügbar gemacht. Allerdings spiegelt die Zusammensetzung des Serums sozusagen einen Mittelwert aller Wachstumsfaktoren des Quellorganismus wider, der in keinem Falle der Zusammensetzung der wirksamen Wachstumsfaktoren in einem lokalen Gewebe entspricht. So muss aus der Kenntnis der Wirksamkeit spezifischer Wachstumsfaktoren auf die spezifischen Zellen eine abgestimmte Zusammensetzung der Faktoren gebildet werden.

Hierbei muss die Zusammensetzung des Mediums nicht nur auf den spezifischen Zelltyp abgestimmt sein, sondern im komplexesten Falle auch auf jede einzelne der verschiedenen Phasen, wie Adhäsions-, Proliferations-, Differenzierungsphase und bei extrakorporalen Verfahren der funktionellen Phase, d.h. Erhaltung der Differenzierung. [1][2][3][4]

#### **1.2.4 Prozessführung und Reaktortechnik**

Primär isolierte, terminal differenzierte Zellen zeigen eine sehr begrenzte Proliferationskapazität und haben unter Standardkulturbedingungen die starke Ausprägung zu dedifferenzieren. Gründe hierfür liegen in der statischen Kultur mit ihren intermittierenden Medienwechseln. Hierbei kommt es über die Kulturdauer zu Veränderungen des Kulturmilieus wie einem hypoxischen Milieu, dadurch zu veränderten metabolischen Funktionen, aber auch zu veränderten Expressionsmustern. Abgestimmte Medienformulierungen wie in 1.2.3 erläutert, können diesen Vorgängen zwar entgegenwirken, sind hierbei aber nicht die einzigen Parameter. So bilden mechanische Stimuli, wie Pulsation, Scherstress oder aber auch stabile Konzentrationsgradienten wichtige Faktoren bei der Erhaltung der Differenzierung. Für eine konstante Aufrechterhaltung des Milieus in Bezug auf gleichmäßige Konzentrationen der Medienbestandteile, der Sauerstoffsättigung und des pH-Wertes ist generell eine Perfusionskultur mit entsprechender Messtechnik (pH, pO<sub>2</sub>) anzustreben. [1][3]

### 1.3 Epithelzellen

Epithelgewebe bilden im allgemeinen die Grenze zum Körperäußeren, wie z.B. im Darm, in der Lunge oder im Nephron und zeigen spezifische, hochdifferenzierte Eigenschaften, mit der sie in der Lage sind, über die Abgrenzungsaufgaben hinaus selektive, vektorielle Transport- und Sezernierungsaufgaben zu erfüllen. Diese Funktionen erfordern eine hochgradige Polarisierung durch Bildung einer apikalen sowie basolateralen Zellmembran, die sich nur im Gewebekontext entwickeln kann. Die Polarisierung zeichnet sich durch morphologische Eigenschaften wie z.B. apikale Mikrovilli und Einzelzilien, Tight-Junctions (TJ) und die spezifische Lokalisierung von intrazellulären Organellen wie Mitochondrien, sowie des Zytoskelettes aus, aber auch durch die gezielte, asymmetrische Lokalisierung von Membranproteinen wie Transportern, Carriern, Kanälen entweder in der apikalen oder basolateralen Zellmembran (Abb. 1A). So zeigen stark transportierende Epithelien hohe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivitäten, die ausschließlich basolateral lokalisiert sind, auch die hierfür notwendigen Mitochondrien liegen möglichst nahe am basalen Pol (Querstreifung). Für eine Vergrößerung der effektiven Transportfläche weisen die Zellen typischerweise apikale Mikrovilli und basale Einstülpungen auf. Zusammen mit der asymmetrischen Verteilung von Transportproteinen gelingt es den Zellen hierdurch, Gradienten für den vektoriellen Transport aufzubauen.

Die Entstehung epithelialer Polarisierung ist ein komplexer Vorgang, der unter anderem die Ausbildung von Adherent-Junctions (AJ), TJ, aber auch den gezielten Transport von Membranproteinen und -lipiden beinhaltet. Die Ausbildung kann durch viele Faktoren *in vitro* beeinflusst werden. Dazu gehören u.a. die Zusammensetzung der apikalen und basolateralen Medien, im besonderen  $\text{Ca}^{2+}$ - sowie Serumkonzentrationen, elektrisches Potential und das Kultursubstrat (porös, nicht porös) [5]. So zeigen z.B. auf nicht porösen Substraten kultivierte, konfluente, transportierende Epithelzellen Ablösungserscheinungen (Domebildung), verursacht durch den vektoriellen Transport. Auf porösen Substraten kultivierte Epithelien zeichnen sich im allgemeinen durch eine bessere Differenzierung aus, hervorgerufen durch einen besseren Zugang von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren an die basolaterale Seite.

Da Differenzierung und funktionelle Eigenschaften strikt mit morphologischen Merkmalen verknüpft sind, wurden in dieser Arbeit die verwendeten Nierenepithelzellen über Raster-



Elektronen- und konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie auf Flachmembranen und in Hohlfasern verschiedener Materialien anhand der ausgeprägten Morphologien bewertet.

### **1.3.1 Tight Junctions**

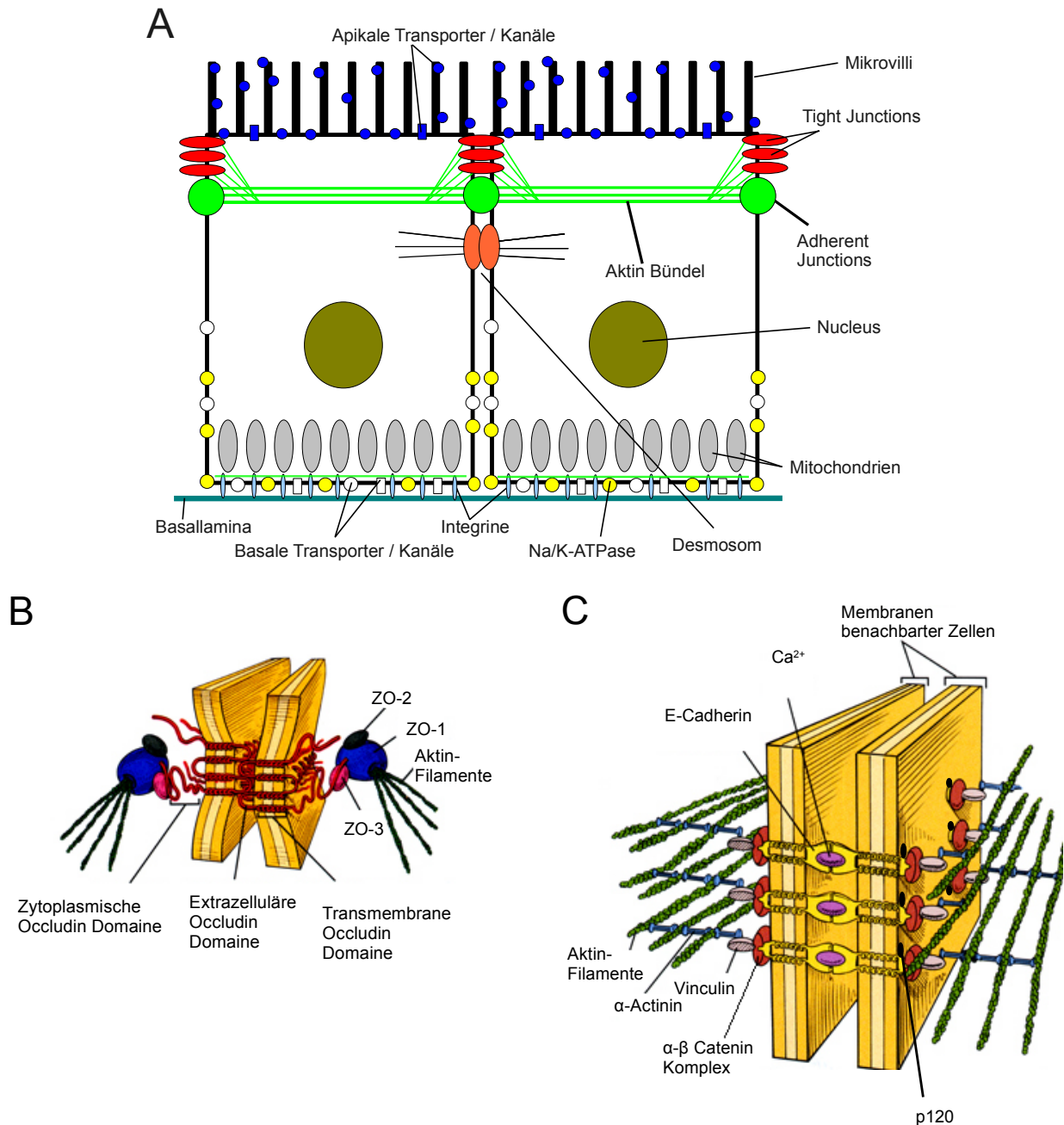
Die für die Erhaltung der Polarität interzellulär aufgebauten, epitheltypischen Organellen, Tight-Junctions (TJ), bilden die Abgrenzung von apikaler und basolateraler Zellmembran und verhindern ein Übertreten von Membranproteinen zwischen diesen. TJ bilden nicht nur eine feste Verbindung zwischen den Epithelzellen, sondern stellen vielmehr auch fein regulierbare, interzelluläre Barrieren zwischen dem apikalen und basolateralen Kompartiment dar, durch welche selektiv, je nach Durchlässigkeit Substanzen durchtreten können. Dabei werden „lecke“ und „dichte“ Epithelien unterschieden, nachweisbar durch Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstands und verursacht durch unterschiedlich dichte TJ. Der TJ bildende Multiproteinkomplex (TJ-Komplex) besteht vereinfacht aus einem transmembranen Teil, gebildet durch Proteine der Occludin, Claudin und Junctional Adhesion Molecule (JAM) -Familien und einem intrazellulären Proteinkomplex der Zona-Occludens-Familie (ZO1, ZO2, ZO3, Cingulin) von peripheren Proteinen (Abb. 1B). Der periphere Proteinkomplex dient der Verankerung der Transmembranproteine am Aktin-Zytoskelett. ZO1 sowie Cingulin u.a. spielen als vom TJ-Komplex dissoziierte Faktoren zusätzlich zusammen mit weiteren Faktoren (ZONEAB, RAB13, u.a.) wichtige Rollen bei der Kontrolle der Zellzyklusphasen und der Proliferation der Zellen [6][7][8]. Somit ergibt sich ein komplexes Zusammenspiel des TJ-Komplexes mit der Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen. Gut ausgebildete TJ sind als Resultat hochgradiger Polarisierung, unabhängig von deren Durchlässigkeit [9], ein klassischer Marker für eine gute Polarisierung und hochgradige Differenzierung von Epithelzellen und dienten in dieser Arbeit als Nachweis dieser innerhalb von Hohlfasern und Flachmembranen.

### **1.3.2 Adherent-Junctions**

Eine weitere typisch epitheliale, interzelluläre Organelle bilden AJ. Diese  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen, extrazellulären, homodimären Verbindungen zwischen benachbarten Zellen sind unter anderen am Prozess der TJ Bildung beteiligt, in dem sie für den Aufbau dieser in einem vorhergehenden Schritt gebildet sein müssen [8][9]. Analog zu den TJ werden AJ von einem Multiproteinkomplex bestehend aus Transmembranproteinen (Cadherinen) und peripheren, am Zytoskelett verankernden, intrazellulären Proteinen ( $\alpha$ -,  $\beta$ -Catenin, p120)

(Abb. 1C) gebildet. Die Familie der Cadherine zählt zur Zeit 80 verschiedene Mitglieder, die spezifisch in unterschiedlichen Geweben gebildet werden [10], im Falle von Epithelien sind dies hauptsächlich die E-Cadherine.

$\beta$ -Catenin spielt als löslicher, vom AJ-Komplex ungebundener Kofaktor eine wichtige Rolle im Zusammenspiel mit dem extrazellulären wnt-Signal bei der Genexpression während Entwicklungsvorgängen und der Regulation des Zellzykluses. Nicht an AJ gebundenes  $\beta$ -Catenin wird nach Phosphorylierung und Bildung eines Multiproteinkomplexes und ( $\beta$ -Catenin-GSK3 $\beta$ -APC-Axin (=beta-catenin-destruction-complex)), deaktiviert und anschließend ubiquitiniert. Extrazelluläres wnt hemmt über den Frizzle-Rezeptor die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch GSK3 $\beta$ . Das so stabilisierte  $\beta$ -Catenin kann im Zellkern als Transkriptionsfaktor verschiedene Zielgene wie z.B. c-myc und Cyklin-D1 aktivieren und somit u.a. in den Zellzyklus und in die Organogenese eingreifen. Auch hier ergibt sich, ähnlich wie bei den TJ ein wichtiger Zusammenhang zwischen ausgebildeten Junctions, Proliferation und Differenzierung.



**Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung epithelialer Merkmale (A). Tight-Junction- (B) und Adherent-Junction Komplex (C) (B&C nach [11])

## 1.4 Überblick über die Nierenfunktion

Die Nieren werden mit bis zu 25% des Herzzeitvolumens an Blut durchströmt [12] und bezogen auf den Massenanteil des Körpergewichtes beider Nieren von maximal 0,5% stellt dies eine enorme Durchblutung dar. Zu den Hauptaufgaben der Niere zählen neben der Exkretion harnpflichtiger Substanzen, der Homöostase (geregelter Resorption & Exkretion), der Blutdruckregulation und metabolischen Funktionen auch die

Hormonbildung, -antworten und immunoregulatorische Funktionen. Diese Funktionen erfüllen als kleinste funktionelle Untereinheiten die 1-1,5mio Nephronen je Niere, die diese strahlenförmig vom Cortex (Nierenrinde) hin zur Medulla (Nierenmark) durchziehen. Hier finden die funktionellen Prozesse durch spezialisierte, hochdifferenzierte Zellen statt. Aufgrund der vielfältigen, lebenswichtigen Funktionen der Niere führt ein Ausfall dieses Organs zu weitreichenden Konsequenzen für die Betroffenen.

*Tabelle 1.1: Überblick über die Nierenfunktionen*

<b>Funktion</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Ort</b>
Homöostase	rückgekoppelte Resorption / Sezernierung von Wasser, Elektrolyten, H <sup>+</sup> , HCO <sub>3</sub> , organischen Säuren für die Aufrechterhaltung des Elektrolyt-, Säuren- und Basengleichgewichts	entlang des gesamten Tubulus
Exkretion harnpflichtiger Substanzen	Exkretion von Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Toxinen, Medikamenten	entlang des gesamten Tubulus; hauptsächlich proximaler, distaler Tubulus, aufsteigender Ast, Sammelrohr
Hormonbildungen, -ziel	Erythropoetin (EPO), Calcitriol (aktives Vitamin D <sub>3</sub> ), ADH, PTH	EPO (Nierencortex), Calcitriol (PTC), ADH (AQP2-Sammelrohr), PTH (PTC ↓PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> DTC ↑Ca <sup>2+</sup> )
Metabolismus	vollständige Resorption von Aminosäuren, Proteinen, Peptidhormonen, Glukose u.a. Bildung von Glukose durch Glukoneogenese	Proximaler Tubulus
Blutdruckregulation	Renin	Macula Densa; Juxtaglomerulärer Apparat
Immunomodulation	Zytokinproduktion, LPS-Abbau, Defensine, Antigenpräsentation	entlang des gesamten Tubulus

Das Nephron, gebildet aus Nierenkörperchen, im speziellen der Glomerulus und der Tubulus, sind die funktionelle Untereinheit der Niere. Der Tubulus gliedert sich in die in Tabelle 1.2 aufgeführten Abschnitte mit verschiedenen Funktionen und Morphologien.

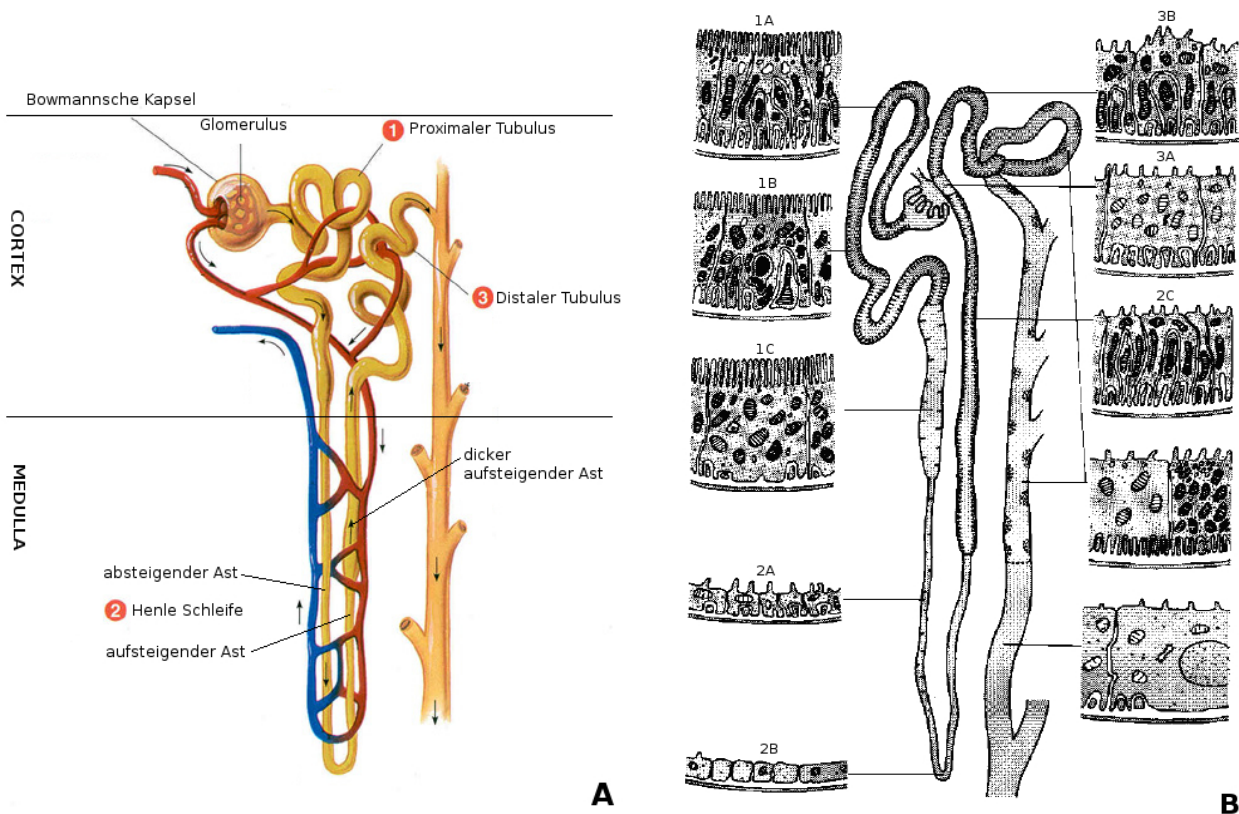
*Tabelle 1.2: Abschnitte des Nephrons*

Proximaler Tubulus (PT)	Pars konvoluta (S1) Pars recta (S2 und S3)
Henle-Schleife	dünner absteigender Ast (TDL) Henle-Schleife dünner aufsteigender Ast (ATL)
Distaler Tubulus (DT)	dicker aufsteigender Ast (TAL) (pars recta) Distales Konvolut (DCT) (pars konvoluta) Verbindungsstück (CNT)

Der letzte Abschnitt des Nephrons, das Verbindungsstück (CNT) mündet schließlich ins Sammelrohr (CLD) und dieses in die Harnblase.

Der Glomerulus bildet ein Primärfiltrat, welches nur noch gelöste, niedermolekulare, Substanzen in wässriger Phase in Plasmakonzentration enthält. Zelluläre Bestandteile und Makromoleküle des Blutes können den Glomerulusfilter nicht passieren. Das entstandene Primärfiltrat wird anschließend im Tubulussystem des Nephrons von dessen Epithelzellen prozessiert. Mittels vielfältiger Transportsysteme werden dem Primärharn selektiv, unter hormoneller Regulation und Energieaufwand wichtige Elektrolyte, Aminosäuren, Glukose und Wasser entzogen, während filtrierte Toxine und harnpflichtige Substanzen in den Primärharn sezerniert und dort aufkonzentriert werden. Abschließend verlässt der so prozessierte Primärharn das Tubulussystem als Urin in die Blase.

Die selektiven Transportprozesse für eine Vielzahl von Substanzen im Tubulussystem werden weitgehend von einem  $\text{Na}^+$ -Ionengradienten ermöglicht, angetrieben durch die basalständige  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase der aktiven Tubulussegmente proximaler Tubulus (PT), aufsteigender Ast der Henle-Schleife (TAL) und des distalen Konvolutes (DCT). Der von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufgebaute  $\text{Na}^+$ -Gradient treibt hierbei Natriumionen durch eine Vielzahl von Ko- und Antiportern weg vom Tubuluslumen in und damit weitere wichtige Substanzen durch die Tubuluszellen. Voraussetzung für ein solch funktionelles und spezialisiertes Transportsystem ist die hochgradige Polarisierung und Differenzierung der Epithelzellen, die sich einerseits durch eine strikte Lokalisierung der funktionalen Proteinkomplexe wie Transporter und Integrine im entsprechenden apikalen oder basolateralen Membranabschnitt, aber auch durch die Ausbildung spezifischer morphologischer Eigenschaften auszeichnet. Dabei zeigen die Zellen jedes Nephronabschnittes eine ganz spezielle Ausstattung an Transportern, Kanälen, Aktivität metabolischer Enzyme und an morphologischen Merkmalen. Um zu verdeutlichen welche physiologischen Leistungen die Nephronen erbringen, werden im folgenden die Aufgaben und Eigenschaften der aktiven Nephronsegmente *in vivo* näher beschrieben.



**Abbildung 2:** Wichtigste Nephronabschnitte (A) (nach [12]) und zugehörige Zellmorphologie (B) (nach [13]). Proximaler Tubulus (PT) mit S1(1A), S2 (1B) und S3 (1C) Segment; absteigender Ast (2A), Henle-Schleife (2B); dicker aufsteigender Ast TAL (2C) und Distaler Tubulus mit Macula Densa (3A) und distalem Konvolut (3B)

## 1.5 Funktion der Nephronsegmente

### 1.5.1 Glomerulus

Der Glomerulus bildet zusammen mit der Bowmanschen Kapsel das Nierenkörperchen und dient als Ultrafiltrationseinheit der Niere. Er bildet aus Blut der ihn anströmenden afferenten Arteriolen mit Hilfe des effektiven Filtrationsdruckes ein Ultrafiltrat, den Primärharn. Der effektive Filtrationsdruck  $P_{\text{eff}}$  von ca. 10 mmHg, ist die treibende Kraft der Ultrafiltration und des Volumenstromes des Primärharns durch den folgenden Tubulus. Der Volumenstrom des Primärharns aller Glomeruli der Nieren, die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) beider Nieren  $\sim 125 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  entspricht 20% des wässrigen Anteils des renalen Blutflusses (RBF) = renaler Plasmafluss (=RBF/(1-Hämatokrit)). Die im Glomerulus als Filter und Blut-Harn-Schranke dienende Struktur setzt sich aus 3 Schichten zusammen, denen dem Kapillarraum zugewandten fenestrierenden Endothelien (Porendurchmesser

d=50-100nm), dem Tubulussystem und Bowmanschen Kapselraum zugewandten epithelialen Podozyten und der dazwischenliegenden aus Komponenten extrazellulärer Matrix wie Kollagen IV, Fibronectin und Laminin bestehenden Basalmembran. Der sich daraus ergebende effektive Porenradius beträgt ca. 1,5-4,5 nm und scheidet Moleküle bis zu einem Gewicht von 5 kDa ab. Begünstigt durch die negative Ladung der Proteoglykanen der Basalmembran und der Podozytenfortsätze erfolgt zusätzlich zu der Filtration nach Größe eine Filtration nach Ladung, ein Passieren von Molekülen mit negativer Ladung wird erschwert.

Der renale Plasmafluss und damit die glomeruläre Filtrationsrate kann und muss für eine kontinuierliche Nierenleistung über einen weiten systemischen Blutdruckbereich (ca. 80-170 mmHg) konstant gehalten werden. Dieses geschieht über mehrere Regulationsmechanismen der tubulo-glomerulären Rückkopplung, realisiert durch den juxtaglomerulären Apparat, welcher den Filtrationsfluss des einzelnen Glomerulus (SNGFR = single nephron glomerular filtration rate) über zwei verschiedene Mechanismen reguliert. Die Bestandteile dieses Rückkopplungsmechanismus sind TECs im Übergang des dicken aufsteigenden Asts zum distalen Tubulus (Macula-Densa), die basal im direkten Kontakt mit extraglomerulären Mesangiumzellen des eigenen Glomerulus stehen, und Endothelzellen der glomerulären afferenten Arteriolen im direkten Kontakt zu juxtaglomerulären Zellen. Veränderungen der NaCl-Konzentration im Primärharn führen im Falle einer Erhöhung dieser aufgrund z.B. einer erhöhten GFR durch gestiegenen Blutdruck zu einer Freisetzung von ATP durch die extraglomerulären Mesangiumzellen im Bereich der Macula Densa. Die afferenten Arteriolen reagieren daraufhin durch Vasokonstriktion mit einer Reduzierung ihres Innendurchmessers und es kommt somit zu einer Verminderung des Blutvolumenstromes hin zum glomerulären System mit einer reduzierten GFR als Konsequenz. Im Falle einer Blutdruckreduktion und dem damit verbundenen reduzierten GFR reagiert der juxtaglomeruläre Apparat mit einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systemes durch eine erhöhte Ausschüttung von Renin. Dieses führt über eine Kaskadenreaktion zu einer vermehrten Aktivierung von Angiotensin II, und resultiert generell in einem erhöhten arteriellen Blutdruck. In der Niere führt dies speziell zu einer Vasokonstriktion der efferenten Arteriolen und somit zu einer Erhöhung der GFR durch den resultierenden gesteigerten Filtrationsdruck. Durch diese zwei synergistisch wirkenden Mechanismen, nämlich durch den direkten Einfluss auf den Innendurchmesser der afferenten Arteriolen und über die indirekte Einflussnahme mittels des Renin-

Angiotensin-Systems auf die efferenten Arteriolen gelingt es dem juxtaglomerulären Apparat die GFR auf einem konstanten Niveau zu halten. [14][15][16]

### 1.5.2 Proximaler Tubulus (PT)

Der erste Abschnitt des sich harnseitig über den Bowmanschen Kapselraum an den Glomerulus anschließenden Tubulus ist das proximale Konvolut, ein stark gewundener Abschnitt des proximalen Tubulus (pars convoluta=p. c.), welchem der gerade absteigende folgt (pars recta=p. r.) folgt. Die 3 Segmente des PT, S1 (p. c.), S2, S3 (p. r.) liegen auf diesen beiden Abschnitten und unterscheiden sich sowohl in ihren Transporteigenschaften als auch in ihrer Morphologie. Im PT findet aufgrund der vielfältigen Ausstattung an asymmetrisch lokalisierten, spezialisierten Na<sup>+</sup>-Gradienten getriebenen Transportsystemen und Kanälen eine weitgehend isoosmolare Massenresorption für ein breites Spektrum an Substanzen statt. Hierbei ist sowohl die basolaterale und apikale Membran der Zellen reich mit Aquaporin-Wasserkanälen (AQP1) ausgestattet und zusammen mit den lecken TJ des PT gestatten sie dem Wasser den Salzbewegungen in das Interstitium zu folgen. Tabelle 1.3 gibt Aufschluss über die relative Menge einiger vom proximalen Tubulus resorbierten Substanzen in Bezug auf die gesamte vom Glomerulus filtrierte Menge der Substanz.

Das Epithel des proximalen Tubulus zeichnet sich durch einen hohen kubischen Zelltyp aus, der mit Nachbarzellen verzahnte basale Einstülpungen aufweist. Die Mitochondrien sind basalständig, vertikal angeordnet und führen zu einer typischen basalen Streifung. Apikal zeigen die Zellen des proximalen Tubulus einen stark ausgeprägten Bürstensaum (Mikrovilli). Durch diese und die basalen Einstülpungen besitzen diese Zellen eine stark vergrößerte effektive Oberfläche und somit eine erhöhte Transportfähigkeit pro Zelle dieses Gewebes.

Die Zellen dieses Tubulusabschnitts übernehmen weiterhin Sezernierungsaufgaben, Regulationen des Säure-Basen Haushaltes und der Glukosehomöostase über Glukoneogenese sowie die Aktivierung von Vitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol).

*Tabelle 1.3: Relative Menge vom proximalen Tubulus resorbierten Substanzen (nach [14])*

<i>Stoff</i>	<i>H<sub>2</sub>O</i>	<i>Na<sup>+</sup></i>	<i>K<sup>+</sup></i>	<i>Ca<sup>2+</sup></i>	<i>Mg<sup>2+</sup></i>	<i>Cl</i>	<i>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></i>	<i>Phosphat</i>	<i>Glukose</i>	<i>Harnstoff</i>	<i>Kreatinin</i>
Resorption [%]	65	65	65	50	15	55	93	65	96	50	0
TF/P	-	1	1	1,1	2,5	1,3	0,2	1	0,1	1,4	2,9



### **1.5.2.1 Transzellulärer Na<sup>+</sup>-gekoppelter, vektorieller Transport**

Die Triebkraft aller Transportprozesse im renalen Tubulussystem liefert die in der basolateralen Membran lokalisierte Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Unter Energieaufwand durch Hydrolyse von ATP zu ADP transportiert diese 3xNa<sup>+</sup> über die basolaterale Membran aus dem und 2xK<sup>+</sup> in das Zytoplasma der Epithelzellen. Die K<sup>+</sup>-Ionen diffundieren weiter durch apikale K<sup>+</sup>-Kanäle in das Tubuluslumen. Über das Ungleichgewicht der gepumpten Na<sup>+</sup>-Ionen innerhalb und außerhalb der Zellen entsteht sowohl ein chemisches- als auch über die Diffusion der Kaliumionen in das Tubuluslumen ein elektrisches Membranpotential über die Zellen mit positiver Ladung hin zum Lumen. Dieses elektrochemische Potential ist die Triebkraft für alle weiteren sekundären Sym- und Antiportsysteme, an denen die apikal in die Zelle getriebenen Natriumionen beteiligt sind. Zusätzlich zu den unten näher beschriebenen quantitativ wichtigsten Transportmechanismen im PT sind für folgende Substanzen Na<sup>+</sup>-gekoppelte Transportsysteme beschrieben, u.a. Phosphat, Aminosäuren, Lactat, Citrat über verschiedene Transporter.

#### **Na<sup>+</sup>-gekoppelte HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Resorption**

Die Nieren spielen bei der Aufrechterhaltung des pH-Milieus des Körpers eine wichtige Rolle. Dies geschieht unter anderem über die Sezernierung von Protonen über den NHE3 Antiporter und die Resorption von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> für das Hydrogencarbonat – Puffersystem des Organismus. Der größte Teil der im PT resorbierten Natriumionen treibt dabei den Protonenaustauscher an [17][18][19] und bis zu 93% des filtrierte HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> werden im PT resorbiert [14]. Hauptmechanismus für diese Leistung ist der Na<sup>+</sup>- getriebene Antiport von Protonen in das Tubuluslumen mittels des NHE3-Antiporter und die damit verbundene Titration des luminalen Hydrogencarbonates zu Kohlensäure. Während der NHE3– Antiporter im frühen Segment des PT den größten Anteil am Protonentransport leistet, spielt in spätproximalen Abschnitten eine Natriumionen-unabhängige H<sup>+</sup>-ATPase eine weitere Rolle. Die apikal membranständige Carboanhydrase IV katalysiert das Produkt der Titration zu Wasser und CO<sub>2</sub>, welche die apikale Zellmembran leicht in das Zytoplasma passieren kann, wo es unter Einwirkung der Carboanhydrase II zur Bildung von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und Protonen kommt. Die hierbei entstandenen Protonen stehen nun wieder für einen weiteren Zyklus der tubulären HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Titration zur Verfügung, während das in der Zelle gebildete HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> über den basalen [Na<sup>+</sup>(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sub>3</sub>] – Kotransporter aus der Zelle transportiert wird. Bei diesen Prozessen fällt der pH-Wert des Primärfiltrates im Tubulus von pH 7,4 auf bis zu 6,8 - 6,5 [14].

### ***Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glukose-Resorption***

96% Prozent der filtrierten Glukose werden im PT über die apikalen Phlorizin-sensitiven, Natrium-Glukose-Kotransporter SGLT1 und SGLT2 resorbiert. Diese unterscheiden sich sowohl in Ihrer Verteilung entlang des proximalen Tubulus, als auch in Ihrer Kapazität [14][15][20][21]. SGLT2 lokalisiert in den S1 und S2 Abschnitten, ist ein niedrig affiner Carrier ( $K_M = 1,6$ ) [22] hoher Kapazität mit einem Transportverhältnis Glukose zu Natriumionen von 1:1 [14][15][21]. Dagegen ist SGLT1 im S3 Segment ein hoch affiner ( $K_M=0,1 - 0,8$ ) [22] niedrig-kapazitärer Carrier mit einem Transportverhältnis von 1:2 [14][15][21]. Die erhöhte Affinität des SGLT1 trägt den niedrigen Glukosekonzentrationen im späten proximalen Segment Rechnung, da ein Großteil der Glukose bereits frühproximal aus dem Primärharn entfernt wird. Vom Konzentrationsgradienten angetrieben verlässt die Glukose basolateral die Zellen über den GLUT2 Glukose Uniporter, den auch Galaktose über SGLT1 und Fruktose über GLUT5 nach lumenseitigem Einstrom basal passieren können [14][15][20].

#### ***1.5.2.2 Gradientengetriebene trans- und parazelluläre Transportprozesse***

Das in frühen proximalen Abschnitten aufgebaute, transepitheliale, elektrochemische Potential treibt weitere Transportvorgänge an. Hierzu zählen transzelluläre Diffusionen über selektive Membrankanäle und weniger selektive Vorgänge über die lecken Schlussleisten der proximalen Epithelzellen. Durch den Stofftransport weg vom Lumen entsteht ein osmotischer Gradient über die Monolayer der Epithelzellen, dem das Wasser aus dem Primärharn folgt. Dieses geschieht quantitativ hauptsächlich transzellulär über die stark exprimierten Aquaporine in der apikalen und basolateralen Membran der proximalen Epithelzellen. Beim parazellulären Transport durch die Schlussleisten reißt das Wasser weitere gelöste Ionen mit auf die interstitielle Seite des Tubulus (=solvent drag), dazu zählen u.a.  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ , wie auch Harnstoff. In spätproximalen Abschnitten treibt dabei das durch die  $K^+$ -Ionen aufgebaute positive Potential des Lumens oben genannte Kationen zusätzlich an. Durch das genannte Nachfolgen von Wasser ergibt sich ein isoosmolarer Massentransport einiger gelöster Substanzen entlang des PT, wie das der Quotient aus Tubulus- und Plasmakonzentration in Tabelle 1.3 wiedergibt.

#### ***1.5.2.3 Sekretion von organischen Anionen und Kationen***

Die Exkretion von Toxinen ist ein weiterer im PT der Niere lokalisierter systemischer Prozess. Der PT weist für ein breites Spektrum dieser als organische Anionen und

Kationen vorliegenden, endogenen sowie exogenen Toxine [23] polyspezifische Transportsysteme auf [15], die diese in das Tubuluslumen sezernieren. Für die Anionen-Sekretion wurden bisher folgende Transporterfamilien identifiziert: die organischen Anionen Transporter (OAT), organische Anionen transportierende Polypeptide (OATP) und die Multidrogen-Resistenz assoziierten Proteine (MRP) [24]. Das Substratspektrum dieser Transporterfamilien ist sehr breit und aufgrund der negativen Ladung der organischen Anionen ist der basolaterale Transport in die negativ geladene Tubulusepithelzelle nur unter Energieaufwendung möglich. Als erste Substrate wurden sehr früh Phenolsulfonphthalein (Phenolrot) und p-aminohippurate (PAH) identifiziert und gerade Phenolrot lieferte hierbei durch eine Aufkonzentrierung im proximalen Konvolut erste Hinweise auf eine aktive Sekretion [23]. PAH dient seither nicht nur der Erforschung der OATs, sondern wird auch in der Nierendiagnostik für die Ermittlung des renalen Plasmaflusses eingesetzt, da dieser Stoff bei entsprechender Plasmakonzentration innerhalb eines Nierendurchgangs komplett sezerniert wird. Mit seiner Hilfe konnte basal OAT1 identifiziert werden. Zu den OAT-Substraten zählen u.a. PAH, Phenolrot, Urat, Hippurat, Methotrexat, Penicillin, Furosemeide, Anti-HIV Medikamente uva.

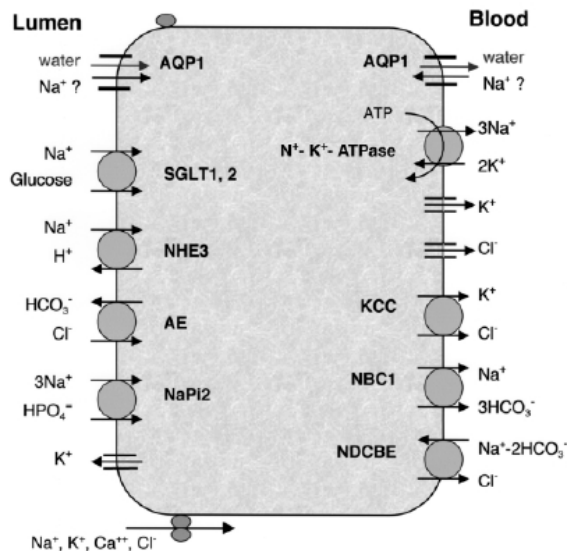
#### **1.5.2.4 Resorption von Peptiden und Proteinen**

Für die Resorption von Aminosäuren, Di- und Tripeptiden besitzen proximale Epithelzellen diverse Carriersysteme. Diese zeigen ein breites Ligandenspektrum, vor allem die PEPT1/2 Transporter akzeptieren nahezu alle möglichen Kombinationen von Di- und Tripeptiden als Ligand [25]. Durch die luminale Ausstattung des proximalen Bürstensaums mit vielfältigen Peptidasen wie z.B. Aminopeptidasen und Endopeptidasen [14], können längere lineare Peptide hydrolysiert und für die oben genannten Carrier als Substrat nutzbar gemacht werden. Auch größere nichtlineare Polypeptide wie z.B. Insulin,  $\beta$ -Mikroglobulin und sehr viel größere Proteine wie Albumin können trotz des niedrigen Cutoffs die glomeruläre Filterbarriere passieren. Bei gesunder Nierenfunktion können im Urin kleine Mengen Albumin ( $<100 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ), direkt nach dem Glomerulus Konzentrationen von ca.  $22\text{-}32 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  im Primärharn nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Plasmakonzentration von  $\sim 45 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  eine sehr kleine Konzentration, allerdings bezogen auf eine GFR von ca.  $150\text{-}180 \text{ l}\cdot\text{d}^{-1}$  ergibt dies eine  $3300\text{-}5760 \text{ mg}$  bzw.  $\sim 4\%$  des gesamten Plasmaalbumins [26]. Die dennoch mit dem Urin nur sehr kleine ausgeschiedene gesamte Menge verdeutlicht das Vorliegen aktiver Resorptionsprozesse im Tubulussystem. Diese sind im PT lokalisiert [14][26]. Verantwortlich für diesen Prozess ist hier die Megalin–

Cubilin-Rezeptoren vermittelte clatherinabhängige Endozytose und der anschließende lysosomale Abbau der Proteine in ihre bestehenden Aminosäuren [26][27][28]. Dieses Endozytose-System spielt weitere wichtige physiologischen Rollen, über dieses werden metabolische und endokrine Substanzen in die Zellen gebracht, wie z.B. Vitamin-bindende Proteine (Vitamin-D-bindendes Protein (DBP), Retinol-bindendes Protein (RBP)), Hämoglobin, Transferrine, Peptidhormone, Vitamine und PTH aber auch  $\text{Ca}^{2+}$  [26][27][28]. Die Interaktion zwischen Albumin und proximalen Zellen geht allerdings über die reine Endozytose hinaus. Erhöhte Albuminkonzentrationen im Primärharn durch geschädigte Glomerulusfunktionen (u.a. Glomerulonephritis) wirken proinflammatorisch, profibrotisch und führen bei proximalen Tubuluszellen zur Ausschüttung proinflammatorischer Faktoren von u.a. Endothelin-1, IL-6, RANTES, MCP-1, TNF- $\alpha$ . [26]

*Tabelle 1.4: Wichtige Transporter des proximalen Tubulus*

<i>Name</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Funktion</i>	<i>Typ</i>	<i>Triebkraft</i>
NHE3	apikal	$\text{Na}^+ / \text{H}^+$ Antiport	Sekundärer Transporter	$\text{Na}^+$ -Gradient
SGLT1/2	apikal	$\text{Na}^+$ / Glukose Symport	Sekundärer Transporter	$\text{Na}^+$ Gradient
Glut2	basal	Glukose Uniport	Kanal	Glukosegradient
Glut5	apikal	Glukose / Fruktose / Galaktose Uniport	Kanal	Glukosegradient
$\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase	basal	$\text{Na}^+ / \text{K}^+$ Antiporter	Primärer Transporter	ATP Hydrolyse
AQP1	apikal / basal	$\text{H}_2\text{O}$ Uniport	Kanal	Osmotischer Gradient
PEPT1/2	apikal	Di-Tri-Peptide / $\text{H}^+$ - Symport	Sekundärer Transporter	$\text{H}^+$ -Gradient
NaPi	apikal	Na-P Kotransport	Sekundärer Transporter	$\text{Na}^+$ -Gradient



**Abbildung 3:** Modell einiger Carrier und Transporter bei proximalen Tubuluszellen der Ratte nach [29]

### 1.5.3 Henle-Schleife

Dem PT folgt die sich bis tief ins Nierenmark ziehende U-förmige Henle-Schleife mit ihrem absteigenden dünnen Ast, der Henle-Schleife an sich, und ihrem dünnen und dicken, bereits als fröhdistal bezeichneten aufsteigenden Ast (TAL). In diesem System finden verschiedene harnkonzentrierende und -verdünnende Prozesse statt, deren Triebkraft die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase des respiratorisch hoch aktiven TAL herstellt. Physiologisch relevant sind hier nicht alleine weitere Na<sup>+</sup> Sym- und Antiporter, sondern vielmehr der, von diesen aufgebaute osmotische Gradient im Interstitium des Nierenmarks. Dieser erreicht seinen größten Betrag im Bereich der Henle-Schleife. Aufgrund dieser physiologischen Aspekte und die daran gekoppelte Funktionsweise der Harnkonzentrierung wird hier der TAL im Kontext der Henle-Schleife vor dem dünnen absteigenden und aufsteigenden Ast beschrieben.

#### 1.5.3.1 Dicker aufsteigender Ast (TAL)

Der dicke aufsteigende Ast schließt tief in der Medulla an den dünnen aufsteigenden Ast an und zieht sich bis in den Cortex, wo er unmittelbar an der Macula Densa in das distale Konvolut übergeht. Der TAL kann in den tieferen Bereich des Nierenmarks mTAL (= medullärer TAL) und in Bereiche der Nierenrinde unterteilt werden cTAL (corticaler TAL). Morphologisch zeichnen sich die Zellen des TAL ähnlich wie die Zellen des proximalen Tubulus durch einen hohen Besatz von Mitochondrien und die daraus resultierende basale Streifung aus. Andererseits besitzen die TAL-Epithelien sehr dichte, wasserimpermeable

Schlussleisten und einen weniger ausgeprägten Bürstensaum. Die wichtigsten Transportproteine in diesem Abschnitt sind der apikale elektrogen neutrale NCCK-Transporter (BSC1 = Bumetanid-Sensitive-Carrier-1), der apikale ROM-K K<sup>+</sup> Kaliumkanal, der basale CLC-Kb Cl<sup>-</sup>-Kanal und die basale Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Über letztere wird ein Na<sup>+</sup>-Gradient aufgebaut, mit dessen Hilfe Na<sup>+</sup>, 2xCl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> über den sekundären NCCK Carrier apikal in die Zelle gebracht wird. Die Kaliumionen können über den ROM-K<sup>+</sup> Kaliumkanal die Zelle wieder apikal, das Chlorid über den basalen CLC-Kb Kanal und das Natrium basal über die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase verlassen. Es resultiert im Betrag ein NaCl-Transport in das Interstitium, dem Wasser aufgrund fehlender Aquaporine und wasserimpermeabler Schlussleisten nicht folgen kann. In der Konsequenz wird hierbei der verbliebene Primärharn hypoton und im Interstitium bildet sich ein osmotischer Gradient vom Nierenmark zur Nierenrinde, welcher der Harnkonzentrierung (= Wasseraufnahme) im dünnen absteigenden Ast und dem Sammelrohr dient. BSC1 akzeptiert anstelle von K<sup>+</sup> auch NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, welches hauptsächlich aus dem Stoffwechsel der proximalen Zellen von aus der Leber gebildetem Glutamin stammt. Das so im Nierenmark akkumulierte NH<sub>4</sub><sup>+</sup> verlässt die Niere abschließend über das hierfür durchlässige Sammelrohr in den Urin.

Auch im TAL wird mittels der in das Lumen getriebenen K<sup>+</sup>-Ionen und der aus dem Lumen getriebenen Cl<sup>-</sup>-Ionen über die Zellen ein zum Lumen hin positiver elektrochemischer Gradient aufgebaut, der weitere positiv geladene Ionen wie Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> parazellulär in das Interstitium unter physiologischer Regelung treibt. Dabei spielt eine Veränderung der Permeabilität der Schlussleisten (Paracelin-1) für diese Kationen sowie ein Einfluss auf das lumenpositive Potential des TAL über PTH, Calcitonin u.a. eine regulative Rolle. [14] [15][16]

### **1.5.3.2 Dünner absteigender Ast (DTL)**

Der dünne absteigende Abschnitt zieht sich im Anschluss an den proximalen Tubulus bis ins Nierenmark und wird von einem flachen Epithel ausgekleidet. Diese Epithelzellen zeigen kaum Mikrovilli, keine basale Streifung, besitzen kaum spezialisierte Transporter und fallen nicht durch eine übermäßige Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität auf. Die apikalen und basolateralen Membranen dieser Zellen sind aber reich mit dem Wasserkanal Aquaporin 1 (AQP1) bestückt, welches die Zellen für Wasser aber nicht für Ionen permeabel macht.

Die Aufgabe des dünnen absteigenden Asts ist die Harnkonzentrierung. Durch das vom aufsteigenden Ast aufgebaute sogenannte Gegenstrom-Multiplikationssystem steigt die interstitielle Osmolalität der Medulla mit zunehmendem Abstand vom Cortex bis auf 1200

mosm·kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O an der tiefsten Stelle des U-förmigen Nephronverlaufs, der Henle-Schleife. Der hierdurch entstehende osmotische Gradient vom Tubuluslumen zum Interstitium treibt Wasser ohne Elektrolyte aus dem Primärharn durch die Aquaporine, stellt somit die Osmolalität des Primärharns über osmotische Vorgänge auf die Osmolalität des Nierenmarks ein und somit wird in diesem Abschnitt ein hypertoner Primärharn hergestellt. [14][15][16]

### **1.5.3.3 Dünner aufsteigender Ast (ATL)**

Nach Erreichen des Scheitelpunktes beginnt der dünne wasserimpermeable, aufsteigende Ast der Schleife, in welchem passiver parazellulärer Na<sup>+</sup>- und transzellulärer Cl<sup>-</sup>-Transport über apikale und basolaterale Cl<sup>-</sup>-Kanäle in den Zellen (CLC-Ka) stattfindet. Getrieben wird dieser Transport von dem starken Konzentrationsgradienten zwischen hypertonem Primärharn und Interstitium.

### **1.5.4 Distales Konvolut (DCT)**

Das kubische Epithel des distalen Konvolutes zeigt ähnlich wie die Zellen des TAL einen wenig ausgeprägten Bürstensaum, wasserimpermeable Schlussleisten und auch eine basale Streifung aufgrund zahlreicher basolateraler Mitochondrien. Im distalen Konvolut findet die elektroneutrale, apikale Aufnahme von NaCl mittels des thiazidsensiblen Kotransporters (TSC) statt. Dieser Transport wird, wie schon in den vorherigen stark transportierenden Segmenten, über den von der basolateralen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aufgebauten Na<sup>+</sup>-Konzentrationsgradienten angetrieben. K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> verlassen die Zellen basolateral sowohl über einen K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Symport, als auch passiv über spezifische Kanäle. Durch das lumenpositive elektrische Potential und vorhandene Konzentrationsgradienten werden Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> durch apikale Kanäle in die Zellen getrieben und verlassen diese basolateral über 3xNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> bzw. 3xNa<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> Antiporter. Diese Resorption findet dabei wie bereits im TAL unter hormoneller Regulation u.a. durch PTH, Calcitriol und Calcitonin statt. Aufgrund der Wasserimpermeabilität der Schlussleisten und nicht vorhandener Aquaporine findet keine Wasserverschiebung statt und es kommt zur Bildung eines hypotonen Primärharns. [14][15][16]

### **1.5.5 Sammelrohr (CLD)**

Das Sammelrohr bildet für ca. 3000 Nephronen die Verbindung zur Harnblase und prozessiert hierbei den bereits konzentrierten Harn weiter. Gebildet von zwei

verschiedenen Zelltypen, den Haupt- und Schaltzellen, ist das Sammelrohr der Ort der  $\text{NH}_4^+$ -Exkretion, abschließender Harnkonzentrierung und Säure-Basenregulation des ausgeschiedenen Urins. Die Hauptzellen zeichnen sich hierbei durch luminale  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ - Kanäle aus, und sorgen für einen Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{K}^+$ . Die Schaltzellen dienen einerseits der  $\text{H}^+$  - (Typ A) oder einer  $\text{HCO}_3^-$  - (Typ B) Sekretion und können somit je nach Stoffwechsellage (Azidose, Alkalose) regulativ auf den Säure-Basenhaushalt einwirken. Eine weitere wichtige Eigenschaft der Hauptzellen ist der ADH-induzierte apikale Einbau von Aquaporinen des Typs 2. Die hierdurch erhöhte apikale Wasserpermeabilität der Zellen erlaubt die regulierte Wasseraufnahme entlang des interstitiellen Konzentrationsgradienten. [14][15][16]

## **1.6 Endokrine Funktionen der Niere**

Um die Aufgaben der Homöostase zu gewährleisten, unterliegen oben genannte Transportprozesse einmal der bereits erwähnten intrarenalen und des Weiteren einer strengen nervösen (sympatischen) und endokrinen Regelung.

Zu den wichtigen von der Niere gebildeten Hormonen zählen einerseits das Erythropoetin, das aus der Vorstufe 2,5OH-Vitamin D<sub>3</sub> gebildete aktive 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> sowie das bereits in 1.5.1 angesprochene Renin. Die Niere ist als Bildner verschiedener pro- und antiinflammatorischen Zytokinen an wichtigen Vorgängen in inflammatorischen Prozessen beteiligt.

Aus dem Hypothalamus stammendes Antidiuretisches Hormon (ADH) interagiert mit Sammelrohrzellen und sorgt für den vermehrten Einbau von AQP2 in die Zellmembran und somit zu einer vermehrten Rückresorption von Wasser in diesem Bereich des Nephrons.

Die Niere bildet im großen Maße EGF. Lokalisiert ist diese Bildung im distalen Teil des Nephrons (mTAL, cTAL und DCT). Hierbei handelt es sich einerseits um eine auto- sowie parakrine Stimulation; distalen Abschnitte aber auch Glomeruli sowie der proximale Tubulus weisen EGF-Rezeptoren auf [30].

## **1.7 Sauerstoffversorgung und Metabolismus der Niere**

Aufgrund der hohen Durchblutung der Niere wird diese prinzipiell als ganzes mit ausreichend Sauerstoff versorgt. Obgleich die Sauerstoffbilanzierung über die zu- und abführenden Blutgefäße eine ausreichende Versorgung ausweist, zeigt die Niere eine starke Heterogenität der intrarenalen Blut- und damit der Sauerstoffversorgung [31]. Diese



Heterogenität zeichnet sich durch eine intrarenale Gradientenbildung der Sauerstoffsättigung aus, mit einem Maximum im Cortex hin zu einem Minimum in der Papilla. Begünstigt wird die Bildung dieses Gradienten nicht nur durch die geminderte Blutversorgung der Medulla, hinzu kommt es gerade in den tieferen Regionen der Medulla zu einem gewissen „Sauerstoffshunting“, bei dem Sauerstoff aus den renalen Arteriolen in die venösen Blutgefäße übertritt. Dem Umstand der heterogenen intrarenalen Sauerstoffverteilung tragen die Zellen in den verschiedenen Regionen der Niere durch einen sehr heterogenen Metabolismus, den dadurch bedingten unterschiedlichen Substratbedarf und stark variierenden Transportfunktionen Rechnung. So liegen die sich durch starke Transportaktivitäten auszeichnenden Segmente wie der PT, der cTAL und das DCT im gut durchbluteten Cortex. Dagegen befinden sich die Segmente der überwiegend passiven Transportprozesse in der weniger mit Sauerstoff versorgten Medulla. Eine Ausnahme hiervon ist der medulläre Teil des TALs (mTAL), welcher trotz seiner Lage im weniger oxygenierten Bereich der Niere hohe Transportaktivitäten aufweist. Aktivitätsmessungen der glykolytischen Enzyme Hexokinase, Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase entlang des Nephrons zeigen eine Dominanz in den späten Abschnitten des Nephrons, während sie im proximalen Tubulus eine sehr geringe Rolle spielen [32]. Hier dominieren im Gegensatz die Enzyme der Glukoneogenese Glukose-6-Phosphatase, Fruktose-1,6-diphosphatase und Phosphoenolpyruvat-carboxylase [32][33]. Die Niere ist aufgrund dieser Ausstattung der proximalen Zellen zusammen mit der Leber das einzige Organ, welches zur Glukoneogenese fähig ist, und somit eine wichtige Rolle bei der Glukosehomöostase im Organismus übernimmt. Besonders im Fall einer Acidose trägt die Niere bis zu 55% der Glukoneogeneseleistung des Körpers bei, gerade in diesem Falle wird die Glukosebildungsleistung der Leber eher gehemmt [34]. Aufgrund der Enzymaktivität hin zur Neubildung von Glukose, können proximale Zellen nur sehr schlecht Pyruvat als Ausgangssubstrat für den Citratzyklus aus Glukose gewinnen, tatsächlich wird nur rund 1% der filtrierte Glukose von diesen Zellen metabolisiert [35]. Für den hohen Energiebedarf der benötigt wird, um den  $\text{Na}^+$ -Ionen Gradienten über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zu bilden, sind diese daher auf alternative, hoch energetische Verbindungen angewiesen. Zu diesen Verbindungen zählen außer Zwischenprodukten des Citratzykluses in der bevorzugten Reihenfolge Fettsäuren, Ketonkörper, Laktat und Glutamin [33][35]. Diese Substratpräferenzen wurden in Studien, die Transportfunktionen der Zellen in Bezug zu den einzelnen Substraten setzten, bestätigt [35]. Die Verwendung der spezifischen Substrate hängt von deren Konzentrationsverhältnis, dem Säure-Basen-

Status und von parakrinen Faktoren ab. Generell überwiegt die Aufnahme aller Substrate dem Bedarf und je nach den vorliegenden Konzentrationsverhältnissen wird das bevorzugte Substrat metabolisiert. Die weniger bevorzugten werden anstatt für die Umbildung bzw. den Aufbau von höher energetischen Verbindungen verwendet, um diese wieder dem Kreislauf zuzuführen wie z.B. Glukose aus Laktat und Glutamin sowie Triglyceride aus Fettsäuren, Ketonen und Glyzerin [35].

Bedingt durch die niedrige Sauerstoffsättigung in den tieferen Bereichen des Nierenmarks steht den Epithelzellen im absteigenden Ast und medullären TAL nicht oder nur beschränkt die Möglichkeit der sauerstoffabhängigen ATP-Gewinnung durch den Citratzyklus und die Endoxidation zur Verfügung. Folglich decken diese Zellen ihren Energiebedarf rein anhand über Glykolyse von Glukose unter Laktatbildung. Auch die sehr aktiven Zellen des mTAL, cTAL und des DT zeigen sehr hohe Laktatbildungsraten, selbst wenn diese eine sehr hohe Mitochondriendichte aufweisen und die beiden letzteren im Cortex angesiedelt sind [33].

## 1.8 Nierenversagen

### 1.8.1 Chronische Niereninsuffizienz

Ein chronisches Nierenversagen liegt vor, wenn über Monate und Jahre die Nierenfunktion eingeschränkt ist und diese Einschränkung bis zum völligen Verlust der Nierenfunktion fortschreitet. (=terminales Nierenversagen). Die Ursachen einer chronischen Niereninsuffizienz liegen meist in entzündlichen Prozessen in der Niere, Diabetes (mellitus), Bluthochdruck und Schädigung durch Medikamente. Der Verlauf wird dabei in fünf Phasen untergliedert (Tab. 1.5).

*Tabelle 1.5: Verlauf des chronischen Nierenversagens*

<i>Stadium</i>	<i>GFR [<math>ml\ min^{-1}</math>] <math>1,73m^2</math></i>
1	$\geq 90$
2	60-89
3	30-59
4	15-29
5	$< 15$
Akutes Nierenversagen	$< 10$

## 1.8.2 Akutes Nierenversagen

Akutes Nierenversagen (ARF = **A**cute **R**enal **F**ailure) wird je nach Ursache in drei Kategorien unterteilt: prärenales, intrarenales und postrenales Nierenversagen [36][37]. Alle Fälle des akuten Nierenversagens führen aufgrund unterschiedlicher Ursachen zu einer GFR von unter  $10\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  [38]. Im Falle des prärenalen Nierenversagens liegt eine nicht in der Niere verursachte Durchblutungsstörung der Niere vor, wie z.B. großer Volumenverlust (Verletzungen, Diarrhoe), Kreislaufstörungen (Herzinsuffizienz, Herzinfarkt), anaphylaktischer Schock oder Sepsis. Werden die auslösenden Ursachen innerhalb einer angemessenen Zeit beseitigt und somit die Durchblutung der Niere wieder hergestellt, ist die prärenale Form des akuten Nierenversagens meist ohne weitere Konsequenzen für die betroffenen Patienten. Bei einem postrenalen akuten Nierenversagen liegt die Ursache der verminderten GFR im der Niere nachfolgenden Harnsystem, wie z.B. an Nierensteinen und nicht in einer verminderten Durchblutung und wird hier nur der Vollständigkeit halber genannt, da dieses nicht unmittelbar zu einer Schädigung des Tubulusepithels führt [36][37].

Die häufigsten Ursachen eines intrarenalen Nierenversagens liegen, neben direkt auf Tubuluszellen toxisch wirkenden Substanzen, wie z.B. Antibiotika, Anästhetika, Kontrastmittel u.v.a.m., im Zusammenhang mit einem prärenalen Nierenversagen. Im besonderen durch Auftreten der sogenannten „Schockniere“ als Konsequenz kardiovaskulärer Schockzustände, ausgelöst vor allem durch SIRS (**S**ystemisches **I**nflammatorisches **R**esponse-**S**yndrom) der darauffolgenden Sepsis oder einen anaphylaktischen Schock. Hierbei kommt es unter anderem zu einem gravierenden Abfall des Blutdruckes, somit zu einer Blut- und Sauerstoffunterversorgung der Niere (Ischämie) [37]. Bei dieser sind die Nephronen direkt betroffen und selbst nach vollständiger Wiederherstellung der Durchblutung der Niere, bleibt die GFR auf unter  $10\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Da Glomeruli dabei selbst keine Schädigungen aufweisen [38][39] ist der Grund der sich einstellenden dramatisch beschränkten GFR im nachfolgenden Tubulussystem zu suchen. Der in diesem Zusammenhang verwendete Begriff ATN (= **A**cute **T**ubule **N**ecrosis) deutet auf zelluläre Funktionsstörungen im Tubulus hin und wurde durch mit dem Urin ausgespülte Tubuluszellen bei Patienten geprägt. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Mehrzahl dieser Zellen *in vitro* weiter kultiviert werden können und daher der allgemeinere Begriff AKI (= **A**kute **K**idney **I**njury) für das intrarenale Nierenversagen eingeführt wurde. Einblicke in die komplexen Vorgänge während des ischämischen, intrarenalen Nierenversagens geben nicht nur klinische Beobachtungen, sondern auch

experimentelle Tiermodelle, wie das Ischämie-/Reperusionsmodell. Hier wird durch „Abklemmen“ der Nierenarterie eine Ischämie der Niere für eine gewisse Zeit herbeigeführt und anschließend die Blutversorgung der Niere wieder hergestellt (Reperfusion). Bei diesen Experimenten konnten als Grund der verminderten GFR zahlreiche zelluläre Schädigungen und Vorgänge im epithelialen Gewebe des Tubulus ausgemacht werden, primär in den Bereichen der höchsten  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Aktivität, dem PT (S3 Segment) und mTAL [38][40]. Analog zur klinischen Beobachtung der akuten Nervenverletzung manifestieren sich im Ischämie-/Reperusions-Modell die hervorgerufenen Schäden bei der Reperfusion letztlich hauptsächlich durch ein Entgleisen des TGF mit der charakteristischen dramatisch geringen GFR. Der zeitliche Ablauf der ischämischen Nierenverletzung lässt sich in frühe Ereignisse während der Ischämie (Initiationsphase) und späte Ereignisse (Expansions-, Erhaltungs- und Erholungsphase) innerhalb der Reperfusion gliedern. [39][40]

Je nach Schwere und Auslöser des akuten Nierenversagens entfalten die Zellen des renalen Tubulus ein großes Regenerationspotential und können das Tubulussystem wieder Vollständig regenerieren. In dieser Zeit ist der Patient aber aufgrund der eingeschränkten Nierenfunktionen auf Nierenersatztherapien angewiesen.

### **1.8.2.1 Ereignisse in der frühen Phase (Ischämiephase)**

Die Unterversorgung mit Sauerstoff innerhalb der Initationsphase führt zu einem extremen Mangel an ATP, einer dramatischen Proteindephosphorylierung, einem Anstieg von Reaktiven Oxygen Spezies (ROS), der Aktivierung von Entzündungsprozessen und in der Konsequenz zur Depolarisierung, zum Auslösen von Apoptose bzw. Nekrose und dem Ablösen der betroffenen Epithel- und Endothelzellen [37][38][39][40][41]. Molekulare Auslöser dieser Ereignisse sind der extreme Verlust an ATP und eine erhöhte ROS Konzentration innerhalb der Zellen. Diese führen zu einer Zerstörung des Aktinzytoskelettes, dem Verlust aller Junctions zwischen den Zellen, zu einer Verlagerung der basalen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase sowie Integrinen in die apikale Membran und somit zum Verlust der starken, funktionswichtigen Polarisierung der Nierentubulusepithelzellen sowie ganzer Zellen [37][38][39][40][41]. Hierbei zeigen sich Unterschiede im Grad der Schädigung zwischen PT und DT in Abhängigkeit der Ischämiedauer. Über die von der Ischämie am stärksten betroffenen Bereiche wird seit langem diskutiert, trotz der unterschiedlichen Ergebnisse und Meinungen kristallisieren sich zwei Nephronsegmente und Details ihrer Schädigungen heraus, das S3 Segment des PT und der mTAL im

distalen Ast [42]. Im S3 Segment des PT manifestieren sich zelluläre Schäden bereits früh, während der mTAL erst bei länger andauernden Ischämien nachweisbare Schädigungen aufweist. Der PT reagiert mit einem weitaus größeren Zellverlust durch Nekrose, demgegenüber erleidet das Epithel des mTAL weniger schwere Schädigungen während dieser Phase und reagiert mit einem geordneteren Rückzug der Zellen durch Apoptose. Diese Unterschiede lassen sich auf dessen Anpassung an ein Milieu mit niedriger Sauerstoffsättigung zurückführen. Die Zellen des DT haben einerseits die Fähigkeit ATP über glykolytische Wege zu gewinnen aber scheinbar auch besser entwickelte Schutzmechanismen gegen Hypoxie und ROS über die anti-apoptotisch wirksamen Polypeptide BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>. Weiteren Effekt in diesem Zusammenhang haben mit Sicherheit die autokrine Stimulation über EGF und der höhere basale Level der Heat-Shock-Proteine (HSP) / Chaperones 27,70,110 im DT. [43]

### ***1.8.2.2 Ereignisse in der Reperfusionphase I***

In der darauf folgenden Expansionsphase während der Reperfusion führt der Verlust der Junctions (TJ, AJ, Gap Junctions), die Depolarisierung und das Ablösen ganzer Zellen entlang des Tubulusepithels zu einem Rückfluss des Primärharns in das Interstitium. Dieser Rückfluss wird durch Obstruktionen abgelöster Zellen bzw. Fragmenten der Tubuli gesteigert [37][38][39][40][41]. Die Depolarisierung der proximalen Zellen und der sich hieraus ergebende Verlust des vektorialen Transportes hat zur Folge, dass eine höhere Na<sup>+</sup>-Ladung an die sensorischen Zellen der Macula Densa gelangt und diese durch den tubuloglomerulären Feedback eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen auslösen. Zusammen mit weiteren blutflussmindernden Effekten des geschädigten mikrovaskulären Systems ergibt sich eine stark geminderte Blutversorgung der Niere. Diese und der im Tubulus auftretende Rückfluss von Primärharn führen zur stark geminderten GFR, die ein akutes Nierenversagen kennzeichnet. [37][38][39][40][41]

### ***1.8.2.3 Zelluläre Ereignisse in der Reperfusionphase II***

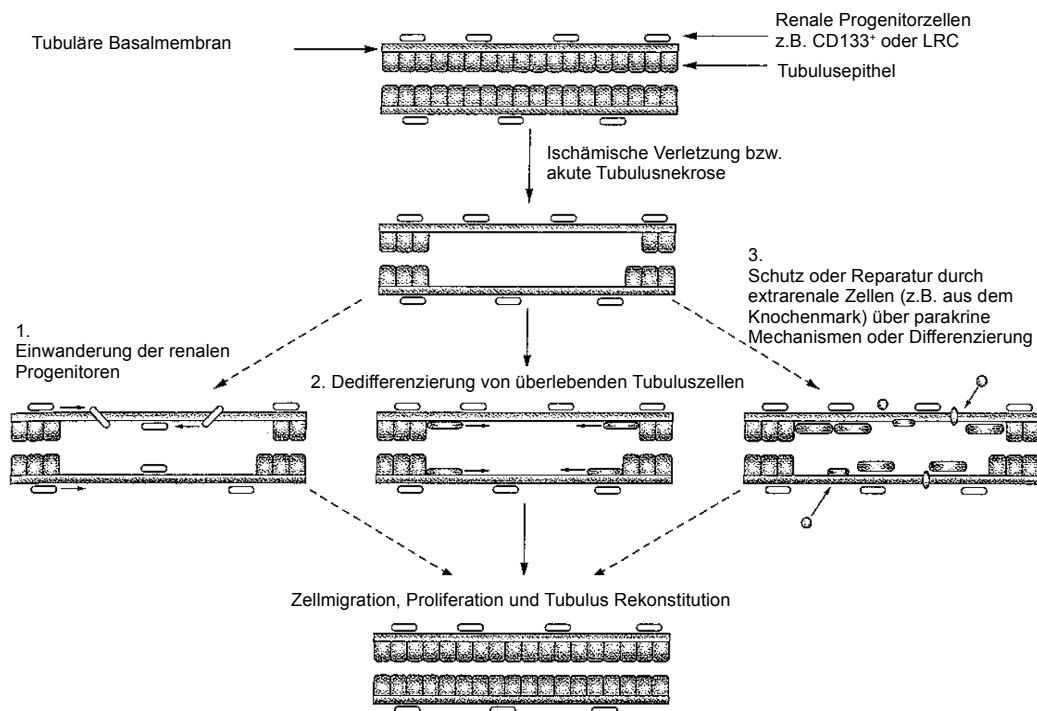
Die sich anschließende Erhaltungsphase ist gekennzeichnet durch eine weiter sinkende GFR und beginnende Regeneration des zerstörten Tubulusepithels. Es wird angenommen, dass sich in dieser Phase das Absterben massiv geschädigter Zellen und die Neubildung von Epithelzellen durch Proliferation die Waage halten. Das Tubulusepithel besitzt eine hohe Regenerationskapazität [39], im besonderen das S3 Segment des PT [44]. Die immer noch vorherrschende Theorie über die Regeneration des Tubulus geht von

der Dedifferenzierung der überlebenden, hochdifferenzierten Zellen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp mit anschließender Migration und Proliferation in den geschädigten Bereichen aus. Die Zellen verlieren hierbei ihre starke Polarität, exprimieren epithel-untypische Marker (z.B. Vimentin,  $\alpha$ -SMA) und entwickeln hohe Proliferationsaktivitäten. Durch Redifferenzierung und Wiederausbildung der Polarität entsteht im Abschluss an den Proliferationsprozess ein regeneriertes, funktionelles Epithel [39][40][41][45].

Dieser Prozess baut unter anderem auf einem „Cross Talk“ zwischen proximalen- und distalen Tubulusabschnitten auf. Letztere, die das ischämische Trauma besser überstehenden Zellen des distalen Abschnitts bilden hierbei auto-, sowie zusammen mit interstitiellen Zellen parakrine, auf den proximalen Abschnitt zielende Aktivitäten aus. In ungeschädigten Nieren exprimieren diese Abschnitte unter normalen Bedingungen EGF, IGF1 (mTAL, CLD) sowie HGF (Interstitium). Die Expression bzw. die Ausschüttung der aktiven Form dieser Wachstumsfaktoren wird im Falle eines akuten, ischämischen Nierenversagens gesteigert, begleitet von einer erhöhten Expression der zugehörigen Rezeptoren im PT [40][46][43]. Die Verabreichung von HGF, EGF und IGF1 führten in Ischämie-/Reperfusionmodellen eindeutig zu beschleunigten Tubulusregenerationen und in zahlreichen *in vitro* Studien konnte die stark mitogene Wirkung von EGF und HGF auf geschädigte Tubulusepithelien gezeigt werden [46][47][48][49][50][51]. Für IGF1 liegen zumindest für *in vitro*-Versuche sich widersprechende Ergebnisse vor [46][43].

Die Regenerationstheorie des Tubulussystems wurde in den letzten Jahren um Komponenten adulter Stammzellen erweitert (Abb. 4), deren Beteiligung sowie Mechanismen an der Regeneration bleiben aber bisher weitgehend ungeklärt. Drei Theorien werden dabei zur Zeit diskutiert [52]: Die Einwanderung von zirkulierenden, mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (BM-MSC) mit 1.) anschließender Transdifferenzierung zu renalen Epithelzellen, 2.) parakriner Beteiligung ohne Transdifferenzierung und 3.) die Beteiligung von intrarenalen, adulten Stammzellen am Regenerationsprozess. Gestützt werden diese Theorien durch die sich teils widersprechenden Ergebnisse verschiedener Gruppen. Einerseits konnte nachgewiesen werden, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (BM-MSCs) in das geschädigte Nierengewebe einwandern und dort entweder durch direkte Differenzierung [53][54] oder parakrine Stimulationen [55][56][57] an den Regenerationsprozessen mitwirken. Andere Gruppen konnten anhand von Markern verschiedene Zellpopulationen im adulten Nierengewebe nachweisen, wie z.B. CD133<sup>+</sup>/PAX2<sup>+</sup> Epithelzellen [58] oder

„slow-cycling, Label-Retaining-Cells“ (LRC) [59], die sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in verschiedene Zelltypen inkl. Epithelzellen differenzieren ließen.



**Abbildung 4:** Modell der Tubulusregeneration unter Beteiligung möglicher, verschiedener Populationen adulter Stammzellen nach [52].

## 1.9 Nierenersatztherapien

Durch die Einschränkung oder den Ausfall der Nierenfunktion kommt es im Körper des Patienten zu einer Akkumulation von Wasser, toxischen metabolischen Produkten (Harnstoff, Kreatinin) und zu Störungen des Elektrolyt- (Hyperkaliämie) sowie des Säure-Basen-Haushaltes (metabolische Azidose).

Neben dem langfristigen Ziel der Transplantation vollständiger Nieren von Spendern im Falle des chronischen Nierenversagens, stehen im klinischen Alltag verschiedene Therapieformen zur Verfügung, um den Ausfall der Nierenfunktion kurzfristig zu kompensieren (ANV) oder sogar, wie bei Vorliegen eines chronischen Nierenversagens, über einen längeren Zeitraum zu ersetzen. Hierbei stehen das Entfernen des überschüssigen Wassers, der metabolischen Produkte, die Stabilisierung der Elektrolytkonzentrationen und des Säure-Basen-Haushalts im Vordergrund. Die hierfür entwickelten extrakorporalen Verfahren Hämodialyse, Hämofiltration und die Hämodiafiltration sind membranbasierende Verfahren, die durch die Auswahl von Porengröße und Betriebsmodus eine Abtrennung von Blutkomponenten nach Größe

vornehmen. Die verschiedenen Verfahren unterscheiden sich im physikalischen Prinzip (Osmose, Konvektion) als auch in deren Betriebsmodi (kontinuierlich, intermittierend). Eine weitere Therapieform, die Peritonealdialyse, bei der die Dialyse über das patienteneigene Bauchfell stattfindet, bietet sich unter bestimmten Umständen, besonders in Fällen des chronischen Nierenversagens, an und kann vom Patienten zu Hause durchgeführt werden.

## **1.10 Hämodialyse**

Bei der Hämodialyse kommt die Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten von Substanzen zum Einsatz. Durch eine semipermeable Membran definierter Porengröße voneinander getrennt, strömen Patientenblut und Dialyselösung im Gegenstromprinzip aneinander vorbei. Dabei kommt es zu einem diffusiven Fluss von Substanzen über die Membran von einem Kompartiment in das andere auf Grund von Konzentrationsgefällen. Die Porengröße bzw. der spezifische Siebkoeffizient der Membran bestimmt hier, welche Substanzen die Membran passieren können. Makromoleküle und zelluläre Bestandteile werden in allen Fällen von der Membran zurückgehalten. Durch die Zusammensetzung der Dialyselösung können die Konzentrationen verschiedener niedermolekularer Stoffe wie Elektrolyte, Harnstoff und Toxine aber auch Vitamine des Patientenblutes eingestellt und zugeführt werden. Zusätzlich lässt sich dem Körper über die Osmolalität der Dialyselösung und durch Aufbringen eines definierten Transmembrandruckes entsprechend Wasser entziehen, um somit die Osmolalität des Blutes und den Wassergehalt des Patienten auf das physiologisch normale Niveau zu bringen. Die Hämodialyse wird intermittierend eingesetzt, ist für eine kurze Behandlungszeit von 3-6h Stunden ausgelegt, eignet sich gut für die Elimination von niedermolekularen Substanzen (<15kD) und dient einem schnellen Normalisieren der entgleisten Patientenparameter. Hierdurch bedingt sind allerdings auch Komplikationen, die sich aus der schnellen Veränderung des Wasserhaushaltes und der Blutzusammensetzung ergeben, wie Kreislaufinstabilität und Dysäquilibriums-Syndrom. [60][61]

### **1.10.1 Hämofiltration**

Bei der Hämofiltration wird dem Vollblut des Patienten über eine Membran mit definierter Porengröße mittels Druckdifferenz Wasser und durch Konvektion darin gelöste Substanzen abgepresst ähnlich der Funktion des Glomerulus der Niere. Es findet kein Stoffaustausch durch Diffusion wie bei der Dialyse statt. Das verlorene abfiltrierte Volumen



wird anschließend durch gepufferte, physiologische Elektrolytlösung so substituiert, dass sich im Körper des Patienten wieder physiologische Bedingungen einstellen. Die Substitutionslösung kann durch Variieren der Zusammensetzung individuell auf den Patienten angepasst werden. Durch die kontinuierliche (24h) Anwendung findet das Normalisieren der Patientenwerte in einem größeren Zeitfenster statt, somit schonender und unter Vermeidung von Kreislaufinstabilitäten. Die Volumenbilanzierung kann hier exakter erfolgen. Allerdings werden typischerweise mehr Antikoagulanzen (Heparin, Zitrat) benötigt, es kommt zu Erythro-, Thrombozytenverlust und die Behandlung ist kostenintensiver. Im Vergleich zur Hämodialyse eignet sich die Hämofiltration besser für die Entfernung höhermolekularer Substanzen (<50kD). [60][61]

### **1.10.2 Hämodiafiltration**

Eine Kombination der beiden oben dargestellten Verfahren stellt die Hämodiafiltration dar. Mit diesem kontinuierlichen Verfahren gelingt durch das Anwenden von Diffusion und Konvektion die Elimination nieder- und mittelmolekularer Substanzen. Dennoch, durch Wechselwirkungen beider Verfahren ergibt sich nicht die Effizienz als Summe der Einzelverfahren und es stehen aber ein höherer technischer Aufwand und dementsprechend höhere Kosten gegenüber [61].

### **1.10.3 Peritonealdialyse**

Bei der Peritonealdialyse als intrakorporales Verfahren bildet das patienteneigene Bauchfell (Peritoneum) die Dialysemembran. Hierbei wird die Dialyselösung über einen Katheter in den Bauchraum des Patienten eingebracht und sorgt für eine kontinuierliche und damit schonende Entgiftung (mehrmaliges Wechseln der Dialyselösung). Triebkräfte für den Stofftransport der harnpflichtigen Substanzen bilden hier hauptsächlich die Diffusion, aber auch Osmose (Wasserelimination) und die sich hierdurch ergebende Konvektion. Die osmotischen Triebkräfte für die nötige Wasserelimination werden durch hohe Glukosekonzentrationen in der Dialyselösung aufgebracht. Die Peritonealdialyse ist weniger effektiv als die extrakorporalen Verfahren und kann Komplikationen wie Bauchfellentzündungen hervorrufen, bringt dem Patienten allerdings einiges an Lebensqualität, da diese auch bei entsprechender Schulung zu Hause durchgeführt werden kann. Die Patienten unterliegen in diesem Fall auch weniger strikten Ernährungsregeln, wie diese mit den extrakorporalen Verfahren einhergehen.

#### **1.10.4 Defizite der klinischen Verfahren**

Trotz der angesprochenen klinisch relevanten Verfahren, überleben Patienten mit terminalem Nierenversagen (heute weltweit > 1 Million Patienten mit ca. 4 – 6% jährlichem Zuwachs) den Ausfall der Nierenfunktion nur mit schlechter Lebensqualität und multiplen Folgeschäden. Mit den heute verfügbaren, technologisch wie klinisch weitgehend ausgereiften Dialyseverfahren kann nur ein Ausgleich des Salz- und Wasserhaushaltes und die partielle Entfernung von toxischen Eiweißabbauprodukten erreicht werden. Weiterführende metabolische und endokrine Störungen, die mit dem Ausfall der Nierenfunktion verbunden sind, werden nicht ausreichend korrigiert und sind die Ursache der hohen Morbidität und Mortalität dieser Patientengruppe durch kardio-vaskuläre sowie inflammatorische Komplikationen. Weiterhin haben Patienten mit akutem Nierenversagen bzw. eingeschränkter Nierenfunktion unter intensivmedizinischen Behandlungen ein stark erhöhtes Risiko zu versterben bzw. nachfolgend durch schwerwiegende Nachwirkungen behandlungsbedürftig zu bleiben. Gründe hierfür liegen dabei im erhöhten oxidativen Stress, denen diese Patientengruppe ausgesetzt ist. Die fehlende Selektivität der Membranverfahren führt zu einer Entfernung lebenswichtiger, niedermolekularer Substanzen aus dem Blut wie Aminosäuren, Peptiden, Vitaminen und Spurenelementen. Besonders betroffen scheinen Komponenten des antioxidativen Systems für die Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu sein, wie Glutathion, Vitamin C, E und Selen. Andererseits unterliegen die Patienten durch den Ausfall der Nierenfunktion auch mangelhafter endokriner Funktionen, wie die Bildung von Erythropoetin, Calcitriol (Vitamin-D3), Renin und den damit verbunden Konsequenzen wie Anämien, Vitamin-D3 Mangel und einer eingeschränkten Blutdruckregulation. Zusätzlich spielt die mangelnde Immunmodulation der Niere als Zytokinbildner eine weitere Rolle, die besonders im Falle von akutem Nierenversagen durch Sepsis eine Rolle spielt.

#### **1.11 Biotechnologische Nierenäquivalente**

Wie in 1.10.4 dargestellt, können die heute klinisch relevanten Verfahren zwar helfen, den Ausfall von Nierenfunktionen zu kompensieren, zeichnen sich dabei allerdings durch die unphysiologischen Bedingungen aus, unter denen sie dies erreichen. Eine denkbare Möglichkeit diese Defizite zu beseitigen, ist die Erweiterung der bestehenden, die Funktionen des Glomerulus abbildenden, extrakorporalen Verfahren um eine die Aufgaben des Nierentubulus übernehmende Einheit. Die Realisierung dieser zusätzlichen Einheit



haben sich allerdings alleine PES bzw. PES-Blends. Aufgrund seiner inerten Eigenschaften zeigen diese aber schlechte Eigenschaften für eine Anheftung von Zellen, sodass in allen Fällen eine Aktivierung der Oberfläche über verschiedene EZM Moleküle stattfinden muss. Tabelle 1.7 fasst die verwendeten Materialien der verschiedenen Gruppen zusammen.

*Tabelle 1.6: Nachgewiesene Funktionen des RAD nach Humes et al.*

<b>Funktion</b>	<b>Zelltyp</b>	<b>Versuch</b>	<b>Literaturquelle</b>
Volumen- und Glukosetransport, PAH Sekretion, NH <sub>3</sub> -Bildung, Glutathion Metabolismus, Vit.D3 Aktivierung	Primäre, porkine proximale Tubuluszellen	Laborversuche	[72]
Glukose, K <sup>+</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Transport, NH <sub>3</sub> -Bildung, Vit-D3 Aktivierung, IL-10 Ausschüttung, Erhöhung der Überlebenszeit, Kreislaufstabilisierung	Primäre, porkine proximale Tubuluszellen	Versuche an urämischen Hunden bzw. an urämischen Hunden nach septischem Schock	[73], [74], [75]
NH <sub>3</sub> -Bildung, Glutathion Metabolismus, Vit-D3 Aktivierung, Kreislaufstabilisierung	Primäre, humane proximale TECs	Versuche an urämischen Hunden	[76]
Kreislaufstabilisierung, Erhöhung der Überlebenszeit, Verminderung der IL6, INF- $\gamma$ Konzentrationen	Primäre, porkine proximale Tubuluszellen	Versuche an urämischen Schweinen nach septischem Schock	[77]
Allgemeine Verbesserung, Steigerung Urinbildung, Verringerung von G-CSF, IL-6, IL-10	Primäre, humane proximale TECs	Kritische Patienten auf Intensivstation mit ARF und Multi-Organ-Versagen nach 24h Behandlung	[69], [70], [71]

*Tabelle 1.7: Zellen und Materialien verschiedener Gruppen*

<b>Membranmaterial</b>	<b>Beschichtung</b>	<b>Zellen</b>	<b>Gruppe</b>	<b>Literaturquelle</b>
Cellulose, PAN, PES	-	MDCK, LLC-PK1	Aebischer et al.	[62], [63], [64]
PAN, PAN-NVP, PES, PES-PVP	-	MDCK	Fay-Lamprecht et. al	[78], [79]
PES	Laminin, ProNectin L <sup>TM</sup>	MDCK, primäre porkine & humane	Humes et. al	[72]
PES, Cellulose	Collagen I, Collagen IV, ProNectin F	MDCK, LLC-PK1, JTC12	Saito et. al	[80], [67]
PES	Laminin	Primäre humane	Huijuan et. al	[81]
PEI, PES, EVAL	-	HK-2	Saito et. al	[67]

## **1.12 Ziel dieser Arbeit**

Diese Arbeit entstand im Kontext des BMBF geförderten Verbundprojektes „HyTube“ (Förderkennzeichen: 0312826) mit dem Ziel der Entwicklung eines biotechnologischen Nierenäquivalents. Hierbei verteilten sich die Aufgaben auf die Entwicklung bzw. Bereitstellung zellkompatibler Membranen und Module durch die Gambro GmbH, Hechingen, der hochspezifischen Isolierung humaner, proximaler sowie distaler TECs durch Dr. PC. Baer (Prof. Dr. H. Geiger, Nephrologie, Universitätsklinikum Frankfurt) aus Nephrektomien und repräsentiert durch diese Arbeit, die Entwicklung des Perfusionssystems durch die Kinematische Zellforschung (Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn, Universität Frankfurt). Verglichen mit den in 1.11 erwähnten Arbeiten unterschied sich der Ansatz der Verbundpartner konzeptionell in drei Punkten.

1. Als Ziel wurde die Entwicklung eines zweistufigen Systems, durch die Reihenschaltung einer proximalen und distalen Einheit verfolgt (Abb. 5). Hierdurch sollten zusätzlich die sich positiv auf die Tubulusregeneration auswirkenden parakrinen Aktivitäten des distalen Tubulus therapeutisch integriert werden.
2. Es sollte grundsätzlich auf eine vorausgehende Bioaktivierung des Membranmaterials durch Beschichtung mittels Serum, Bestandteile der Extrazellulären-Matrix bzw. RGD-Peptiden verzichtet werden, um spätere Zulassungs-, Lizenzierungs- oder Patentproblematiken zu vermeiden.
3. Ausgehend von der vergleichbar geringen Ausgangszellmenge, isoliert aus für Forschungszwecke freigegebenen Organen aus Nephrektomien, musste eine effiziente Proliferationsstrategie innerhalb der Kapillaren verfolgt werden.

Ziel dieser, in das Verbundprojekt eingebetteten Arbeit war die Entwicklung des Perfusionssystems für die Kultivierung der TECs in Kapillaren von Hohlfasermodule inklusive der zugehörigen Protokolle. Hierfür galt es, zunächst verschiedene Membranmaterialien auf deren adhäsions-, proliferations- und differenzierungsförderliche Eigenschaften zu testen. Voraussetzungen wie Sauerstoffbedarf, Perfusionsgeschwindigkeiten und Medienzusammensetzungen für die Auslegung der Kultivierungsbedingungen der Zellen und Betriebsparameter der Module sollten ermittelt werden. Weiterhin mussten mikroskopische Methoden entwickelt werden, mit denen die

Ausbildung des Tubulusepithels innerhalb der Modulkapillaren nachgewiesen werden konnte.

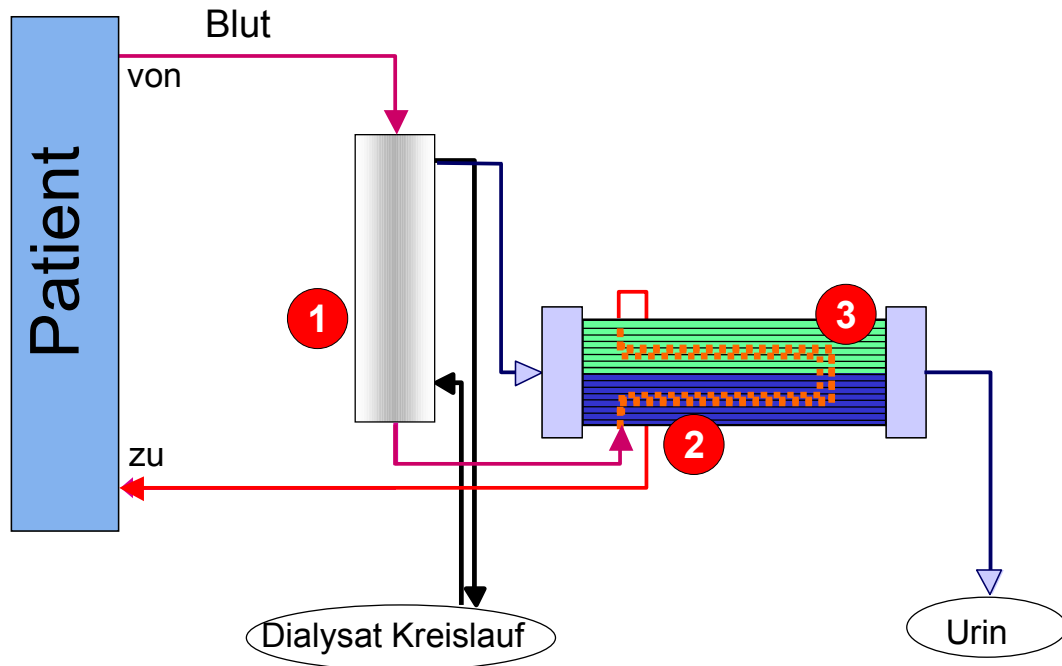


Abbildung 5: HyTube Ansatz bestehend aus Hämofilter (1), proximaler- (2) und distaler Einheit (3) aus [82]

## 2 Material

### 2.1 Geräte

#### Sauerstoffrespirometer

Analog-Digital-Wandler	LabJack U12	LabJack
Sauerstoffanalyse-Gerät	OXI-3000	WTW
Sauerstoffelektroden	YSI-5331	YSI

#### Modulperfusionssystem

Blutanalysegerät	NOVA stat Profile M	NOVA Biomedical
Pumpen	REGLO Digital MS-4/12 IPC 4	Ismatec
Sauerstoffelektroden	Flow-Through-Cell	Presens

#### Mikroskopie

Binokular		Zeiss
-----------	--	-------

Digitalkamera		Nikon, Olympus
Kameras	SensiCam AxioCam MRM	PCO Zeiss
Konfokale Lasermikroskope	CLSM 510 Meta TCS SP5	Zeiss Leica
Phasenkontrastmikroskope		Leica, Leitz, Zeiss, Hund, Nikon, Will
REM	S-4500	Hitachi
Fluoreszenzmikroskopie		Zeiss, Leica

### **Allgemeine Laborgeräte**

Cellcounter	CASY® TTC	Schaerfe Systems
Freezing Container	Nalgene® Mr. Frosty	Nalgene
Vakuumpumpe		IBS Integra
Vortex		IKA Labortechnik
Waagen		Mettler, Sartorius
Zentrifugen		Heraeus, Hermle
Sterilwerkbanken		BDK, CleanAir
FACS	FACSCalibur™	BD
Begasungsbrutschränke		Heraeus
Pipettierhilfe		IBS Integra
Neubauer-Zählkammer		Roth, VWR
Ultraschallbad		
Wasserbad		Bioblock Scientific
Plattenphotometer		BIO-TEK EL808
Plattenfluometer		FluoStar Optima
Stativmaterial		Roth, VWR

## **2.2 Software**

Bildbearbeitung	GIMP, ImageJ, XnView	
FACS	CellQuest WinMDI V2.8	BD
Messsoftware, Logging	Labview KC4	National Instruments
Mikroskopie	Axio-Vision V4.5 Camware Leica LAS AF LSM510 Zeiss LSM Image Browser Imaris	Zeiss PCO Leica Zeiss Zeiss BitPlane
Office Software	Excel, Word, PowerPoint, OpenOffice	Microsoft, OpenOffice
Sauerstoff Messung	Oxystat, LabJack Datalogger	Presens, LabJack
Statistik-Software	Statistica V6.0	StatSoft

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

Edelstahl-Kopfstücke mit 2 und 3 Durchführungen für Schott GL45	Sartorius
Glasflaschen (25 / 50 / 100 / 250 / 500 / 1000ml)	Schott
Luer Schlauchverbinder PP	VWR
Luer Stopfen	Bbraun
Pharmed®-Schläuche	Ismatec
Pharmed®-Pumpenschläuche	Ismatec
Silikonschläuche Pharmagrade	Roth
Y-Luer Schlauchverbinder PP	Fisher Scientific
Zentrifugenröhrchen (15 / 50ml)	BD Falcon
Zellkulturflaschen (T25 / T75)	BD Falcon / Greiner /Nunc
Multiwellplatten (6 / 24 / 96 Wells)	BD Falcon / Greiner /Nunc
Petrischalen für Zellkultur	BD Falcon / Greiner /Nunc
Pipettenspitzen	Eppendorf / Gilson
Serologische Einwegpipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50ml)	BD Falcon
Einwegspritzen (1, 2, 5, 10, 20, 50ml)	BBraun
Pasteurpipetten (Glas & PE)	VWR International

## 2.4 Chemikalien

7X	MP Biomedicals
CO <sub>2</sub>	Merkel
COOH	Merck KGaA
Cyclohexanon	Merck KGaA
DMSO	Sigma
EDTA	Merck KGaA
Essigsäure/Eisessig	Merck KGaA
Ethanol	Merck KGaA
Glutardialdehyd	Roth
HCl	Merck KGaA
Hexamethyldisilazane	Sigma
Isopropanol	Merck KGaA
Methanol	Merck KGaA
Methylenblau	Merck KGaA
Mowiol	Hoechst
N <sub>2</sub>	Messer-Griesheim
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Riedel de Haen
NaOH	Merck KGaA
Paraformaldehyd	Merck KGaA



## **2.5 Antikörper, Farbstoffe & Testkits**

CY-2-Goat-Anti-Rabbit	Dianova / Jackson ImmunoResearch
CY-3-Goat-Anti-Mouse	Dianova / Jackson ImmunoResearch
CY-3-Goat-Anti-Rat	Dianova / Jackson ImmunoResearch
DAPI-Staining Solution	Partec
Hoechst33528	Molecular Probes
Mouse-Anti-Human-ZO1	BD Pharmingen
PE-Mouse-Anti-Human-CD133	Miltenyi Biotec
PE-Mouse-Isotyp-Kontrolle-IGG	BD Pharmingen
Rabbit-Anti-Human-AQP1	Abcam
Rat-Anti-Canine-ECad	AK Genetik und Zellbiologie des Säugers, Zellbiologie & Neurowissenschaft, Universität Frankfurt am Main
TGF-β1 ELISA	R&D Systems
CB Assay – Proinfl. Zytokine	BD Pharmingen

## **2.6 Medien, Mediensupplemente und Reagenzien Zellkultur**

0,9% NaCl	DS, Deutschland
Accutase	PAA Laboratories
BSA	Fluka
CaCl	Merck KGaA
CCCP	Sigma
EGF	R&D Systems
FCS	HYClone, Perbio
FITC-Inulin	Sigma
HBSS	Invitrogen
HGF	R&D Systems
IGF1	R&D Systems
KCl	Merck KGaA
M199	Sigma
Meropenem	Astra Zeneca
Ouabain	Sigma
PBS	Bio Witthaker, Cambrex
Phlorizin	Sigma
SFK	Invitrogen
Trypsin / EDTA	Gibco
CASYTon	Schaerfe Systems

## **2.7 Zellen**

In dieser Arbeit kamen verschiedene renale Tubulusepithelzelllinien, sowie kommerziell erhältliche primäre, humane TECs und solche aus Isolierungen von Nephrektomien zum Einsatz. Aufgrund der durch primäre Zellen gegebenen Limitationen wie begrenzter Verfügbarkeit und Expansionsfähigkeit durch Seneszenz, wurden für die Etablierung von Methoden und Systemen in erster Linie Zelllinien verwendet. Anschließend wurden diese mit primären Zellen validiert, bzw. an deren Bedürfnisse angepasst.

### **2.7.1 Zelllinie MDCK**

Die MDCK (Madin Darby Canine Kidney / ATCC#CCL-34) Zelllinie ist eine seit 1958 etablierte Nierenepithelzelllinie aus dem Hund. Sie zeigt typische Eigenschaften von Epithelzellen im allgemeinen wie AJ, TJ, Ausbildung von Polarität, Mikrovilli und Zilien aber auch Charakteristika von Epithelien des TALs bzw. distalem Konvolut [83]. Die Linie diente historisch als epitheliales Modell bei der Aufklärung einer Vielzahl von epithelialen Vorgängen wie der Epithelbildung, Polarisierung sowie der Ausbildung von AJ und TJ. Die Zellen sind aufgrund ihrer hohen Proliferationskapazität und der relativ niedrigen Ansprüche an die Kulturbedingungen einfach in der Handhabung. Aufgrund der genannten Eigenschaften und ihrer hohen Verfügbarkeit, wurden sie in dieser Arbeit bevorzugt für die Etablierung von Modulmethoden (Einsaat, Perfusion, mikroskopische Vorbereitung) und bei Membranversuchen verwendet.

### **2.7.2 Zelllinie HK2**

Die Zelllinie HK-2 (Human-Kidney 2/CRL#2190) ist eine durch virale Transfektion immortalisierte, humane Zelllinie proximaler TECs. Die Zellen zeigen typische morphologische Merkmale von transportierenden Epithelien wie TJ, starke Polaritätsausbildung, Mikrovilli, Zilien und Domebildung. Durch histochemische, immunzytochemische und funktionale Charakterisierung konnte ein, mit primären proximalen Tubulusepithelien übereinstimmender Phänotyp nachgewiesen werden. Über die morphologischen Merkmale hinaus zeigen die Zellen die Expression typischer Marker, die Fähigkeit zur Glukoneogenese und zum Phlorizin-sensitiven, natriumabhängigen Glukosetransport. [84]

### 2.7.3 Primäre Zellen aus Isolierungen

Primäre Tubuluszellen aus Nephrektomien wurden im Labor von Dr. PC Baer isoliert und für Versuche bereitgestellt. Das Verfahren ist in [65] und [85] ausführlich beschrieben. Kurz dargestellt erfolgte die Isolierung wie folgt:

1. Mechanisches Zerkleinern von humanem Nierengewebe mit Skalpell
2. Verdau mit Kollagenase/Dispase (45 min; 37°C)
3. Drücken durch Analysensieb (106 µm)
4. Verdau mit Kollagenase IV/DNAse (30-45 min; 37°C)
5. Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (30 min; 27000g)
6. Absättigen mit Immunglobulin G (20 min; 4°C)
7. Primärantikörper (15 min; 4°C)
8. Mikrobead-gekoppelter Sekundärantikörper (20 min; 4°C)
9. Zellisolierung über Separationssäule (MACS)

Dabei wurden proximale (hPTC), distale (hDTC) TECs zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aufreinigung erfolgte über mAb gegen das charakteristische hPTC Antigen Aminopeptidase M (CD13) und das Antigen Tamm-Horsfall Glykoprotein (THG), einem typischen Marker des TAL und des frühen distalen Konvoluts. Die hochspezifisch aufgereinigten hPTC und hDTC Fraktionen sind in mehreren Publikationen ([65][85][86][87]) und im Kontext des gemeinsam durchgeführten BMBF-Verbundprojektes charakterisiert worden [82]. Sie zeigen typische, epitheliale Morphologien des zugehörigen Tubulussegments und exprimieren die hierfür typischen Marker wie Gamma-Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT), alkalische Phosphatase (AP) und Dipeptidylpeptidase IV (CD26=DPPIV) für hPTC und (THG) für hDTC.

In späteren Phasen dieser Arbeit wurden einerseits aus Gründen der Verfügbarkeit, aber auch aufgrund Überlegungen bezüglich der Zellquelle, Zellen aus Schritt 5 (hNF) bzw. die jeweiligen Negativfraktionen aus Schritt 9 des Isolierungsprotokolls verwendet (hDNeg/hPNeg). Diese Mischpopulationen enthalten entweder hPTC & hDTC nach Percollzentrifugation (hNF) oder hDTC (=hPNeg) bzw. hPTC (=hDNeg) vermengt mit weiteren Zellen des Nierengewebes.

Die Zusammensetzung der Negativfraktionen ist dabei wie folgt gegeben:

$$hDNeg+hDTC=hPNeg+hPTC$$

$$\rightarrow hPNeg=hDNeg+hDTC-hPTC \rightarrow (++)hDTC)$$

$$\rightarrow hDNeg=hPNeg+hPTC-hDTC \rightarrow (++)hPTC)$$

$$hNF = hPNeg+hDNeg$$

Die Reinheit der oben dargestellten Mischpopulationen entspricht Isolationstechniken ohne immunomagnetische Separation von renalen TECs, wie diese z.B. in [88] & [89] beschrieben sind.

#### **2.7.4 Kommerzielle primäre, proximale Tubulusepithelzellen „RPTEC“**

Eine zuverlässige Versorgung für Versuche mit den in 2.7.3 beschriebenen primären, proximalen TECs war aufgrund der bereits dargelegten Limitationen nicht gewährleistet. Um dennoch Versuche mit Primärzellen (z.B. Medienoptimierungen, Membranversuche) in Phasen mangelnder Verfügbarkeit durchführen zu können, kamen kommerziell erhältliche, humane, proximale Primärzellen der Firma Lonza/Clonetics (RPTEC = **R**enal **P**roximal **T**ubule **C**ells (CC-2553)) zum Einsatz. Laut Datenblatt [90] exprimieren diese PTCs typische Marker wie Gamma-Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT), alkalische Phosphatase (AP) und sind in der Lage unter bestimmten Bedingungen polarisierte Epithelien inklusive morphologischer Merkmale, wie Mikrovilli bis hin zu nephronartigen Strukturen zu bilden (Tubeformation).

Dennoch unterliegen diese Zellen den primärzelltypischen Restriktionen wie Seneszenz und kamen zusätzlich aufgrund der hohen Kosten nicht für eine Routinenutzung in Frage.

### **3 Methoden**

#### **3.1 Statistische Methoden**

Alle statistischen Methoden und Auswertungen, wie die statistische Versuchsplanung (DOE), Varianzanalyse, Regressionen und T-Tests wurden mit der Software Statistica V6.0 durchgeführt. Dabei galt für alle Entscheidungskriterien die Signifikanzgrenze von  $p < 5\%$ .

### 3.1.1 DOE – Medienoptimierung

In der in 4.4 durchgeführten Herleitung bzw. Optimierung eines serumfreien bzw -armen Mediums für die Kultur primärer Zellen kamen Methoden der statistischen Versuchsplanung zum Einsatz. Die Methoden haben das Ziel bei einer verminderten Versuchsanzahl in Aufgabenstellungen mit vielen Parametern, aber reduzierten Ressourcen, aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Diese basieren auf Kombinatorik, Randomisierung, Verändern mehrerer Einstellparameter gleichzeitig, Blockbildung, Regression und der Varianzanalyse. Durch das Vermengen von Haupteffekten (HE) und Wechselwirkungen (FWE) höherer Ordnung der Einflussfaktoren untereinander, kann eine Reduktion der Versuchsanzahl erreicht werden. Je nach Grad der Reduzierung lassen sich hierbei allerdings die vermengten Wirkungen der Einstellparameter nicht mehr voneinander trennen mit Informationsverlust als Folge. Vor allem Screening-Versuche und die Optimierung von bereits ermittelten, primären Einstellgrößen können mit diesen Methoden zeit- und ressourcensparend durchgeführt werden. Dabei dienen  $2^{k-p}$  Versuchspläne häufig dem Auffinden primärer Faktoren, bei denen Einstellfaktoren gleichzeitig, zwischen zwei verschiedenen Einstellungen miteinander variiert werden. (z.B. Supplement vorhanden/nicht vorhanden). Diese Versuchspläne werden aufgrund ihrer Vermengungen und der damit noch unterscheidbaren Effekte unterschieden (Tab. 3.1).

*Tabelle 3.1: Lösungstypen von  $2^{k-p}$  Versuchsplänen und deren Vermengung nach [91]*

<i>Lösungstyp</i>	<i>getrennt</i>	<i>getrennt Ermittelbar</i>	<i>vernachlässigt</i>	<i>vermengt</i>
III	HE von HE	HE	2FWE und höher	HE mit 2FWE
IV	HE von 2FWE	HE	3FWE und höher	HE mit 3FWE 2FWE mit 2FWE
V	2FWE von 2 FWE	HE, 2FWE	3FWE und höher	HE mit 4FWE 2FWE mit 3FWE
VI	2FWE von 3FWE	HE, 2FWE	4FWE und höher	HE mit 5FWE 2FWE mit 4FWE 3FWE mit 3FWE
VII	3FWE von 3FWE	HE, 2FWE, 3FWE	4FWE und höher	HE mit 6FWE 2FWE mit 5FWE 3FWE mit 4FWE

## 3.2 Zellkulturmethoden

In den folgenden Zellkulturmethoden wurden, soweit nicht anders angegeben,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -freie Salz- (PBS, HBSS) sowie sterile auf 37°C vorgewärmte Lösungen verwendet.

### 3.2.1 Kultursysteme

In Tabelle 3.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Kultursysteme und die darin verwendeten Medien- und die Volumen der enzymatischen Lösungen zusammengefasst. Hauptsächlich kamen Standardzellkulturflaschen (T25/T75) für die Expansion und Stammhaltung, Multiwellplatten (6, 24 Wells) für Versuche mit einer Vielzahl von Versuchspunkten und Glas-Chamberslides (8 Kammern) für die Optimierung von Immunfluoreszenzfärbungen zum Einsatz. Die Systeme für die Evaluierung verschiedener Membranmaterialien werden in 3.2.1.1 und 3.2.1.2 erläutert. Die Inkubation der Zellen fand in einem begasten Inkubator bei 5%  $\text{CO}_2$ , 95% hum., 37°C und falls möglich auf einer elektronischen Wippe statt.

Tabelle 3.2: Verwendete Zellkultursysteme und Volumina

<i>Kultursystem</i>	<i>Kulturfläche [mm<sup>2</sup>]</i>	<i>Medienvolumen [ml]</i>	<i>Trypsinvolumen [ml]</i>	<i>Accutasevolumen [ml]</i>
T25	2500	4	1	4
T75	7500	12	4	12
6 Well	962	3	-	-
24 Well	200	0,5	-	-
Membran (d=44mm)	1385	4	-	-
Deckgläser (d=44mm)	1385	4	-	-
Transwell-Inserts Apikal	450	1,5	0,5	1,5
Transwell-Inserts Basal	-	5	-	-
Chamberslides	80	0,2	-	-

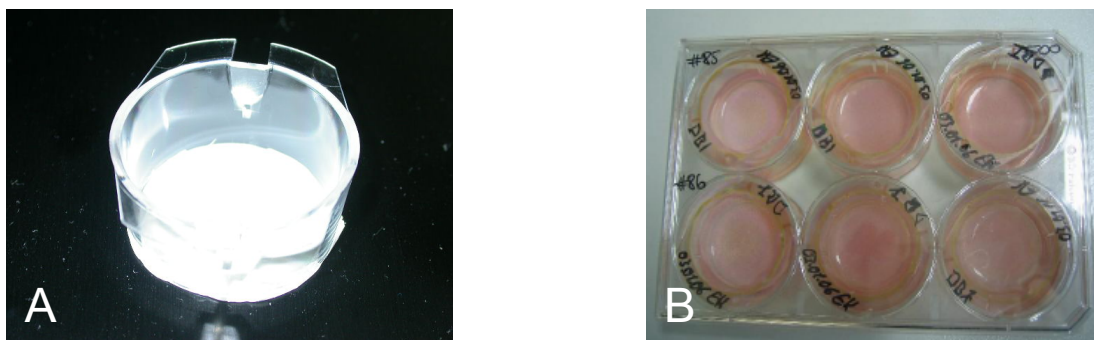
#### 3.2.1.1 Flachmembranen

Verschiedene Membranmaterialien wurden auf deren Adhäsions-, Proliferationskapazität und differenzierungsfördernde Eigenschaften getestet. Dazu kamen anfangs Flachmembranen zum Einsatz. Aus sterilen DIN A5 großen Membranfolien wurden unter sterilen Bedingungen runde Membranproben (d=44mm) ausgestanzt, in Zellkulturpetrischalen (60mm) eingebracht und mit Aluminiumringen (d=38mm) fixiert. Die Zellen wurden gleichmäßig über die gesamte Fläche der Petrischale ausgesät und die Versuche zu verschiedenen Zeitpunkten durch Karnovski- oder Methanol-Eisessig (3+1) Fixierung abgebrochen. Als Auswertung erfolgten Hoechst333528 Färbungen für eine

qualitative Zellzahlbestimmung auf der Membran bzw. Einschätzungen der epithelialen Morphologie am REM für eine Beurteilung der Differenzierung der Zellen. Als Kontrolle diente hierzu die Zellkulturfläche der Petrischale.

### 3.2.1.2 Transwell Inserts

Im späteren Verlauf wurde ein Transwell-Insert System eingeführt, welches die Arbeit unter einheitlicheren Bedingungen in 6Well Multiwell Systemen mit Membranproben ermöglichte. Dadurch wurde die kontinuierliche Kultivierung der Epithelzellen in einem Zwei-Kompartimente-System ermöglicht.



**Abbildung 6:** Transwell-Zwei-Kompartimente-Kultursystem für Membranscreenings und Dichtigkeitsuntersuchungen

## 3.2.2 Subkultivierung

### 3.2.2.1 Subkultivierung der Zellen mit Trypsin-EDTA

Für eine Subkultivierung der Zellen wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen kurz mit gleichem Volumen (T25=4ml / T75=12ml) PBS-EDTA gewaschen und die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,25% für MDCK, 0,05% alle übrigen Zellen) überschichtet. Die Behandlungszeit (gewippt bei 37°C) zwischen 5-10min richtete sich über mikroskopische Einschätzung nach dem Ablösungs- bzw. Vereinzelnungsgrad der Zellen innerhalb der Kulturgefäße. Durch leichtes Klopfen wurden restlich anheftende Zellen vom Flaschenboden entfernt.

### 3.2.2.2 Subkultivierung der Zellen mittels Accutase

Accutase wird als eine schonende Alternative zu der sonst üblichen Subkultivierung der Zellen mittels Trypsin-EDTA beschrieben. Für eine Subkultivierung der Zellen wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und Accutase in die Flasche gegeben (4,5ml für T75, 1,5ml

für T25). Die Behandlungszeit (gewippt bei 37°C) zwischen 10-20min richtete sich über mikroskopische Einschätzung nach dem Ablösungs- bzw. Vereinzelnungsgrad der Zellen innerhalb der Kulturflaschen. Durch leichtes Klopfen wurden restlich anheftende Zellen vom Flaschenboden entfernt.

### **3.2.2.3 Resuspension abgelöster Zellen**

Für Versuche mit definierten Zelldichten wurden Zellen in PBS+3%FCS resuspendiert (Abstoppen der Enzymreaktion), die Zellkonzentration ( $\text{ml}^{-1}$ ) per Neubauer-Zählkammer oder CASY-Cellcounter bestimmt, zentrifugiert (200g/10min) und im Anschluss in einem definierten Volumen PBS resuspendiert. Das entsprechende Volumen der Suspension wurde in Kulturmedium so verdünnt, dass sich die gewünschte Zielkonzentration [ $\text{mm}^{-2}$ ] auf der Kultivierungsfläche einstellte. Für eine Subkultivierung zur Weitervermehrung der Zellen wurde durch direktes Resuspendieren dieser in Kulturmedium die enzymatische Reaktion abgestoppt und die Zellen 1:2 – 1:4 verdünnt.

### **3.2.2.4 Ermittlung der Zelldichte mittels Neubauer Zählkammer [ $\text{ml}^{-1}$ ]**

Die Zellsuspension wurde so auf eine zusammengesetzte „Neubauer-Improved“-Zählkammer gegeben, dass das Volumen zwischen Deckglas und Neubauerkammer vollständig gefüllt war. Ausgezählt wurden so viele vollständige Gruppenquadrate des zentralen Zählfeldes, bis möglichst mindestens 100 Zellen gezählt wurden. Nach Wiederholung der Messung und Mittelwertbildung, ergab sich die Zellkonzentration in der Suspension über Anwendung von Formel 1.

$$C_{\text{Zellen}}^{-} = \left( \frac{n_{\text{Zellen}}}{N_{\text{Gruppenq.}}} \right) \cdot 25 \cdot 10^4 \left[ \frac{1}{\text{ml}} \right] \quad \text{Formel (1)}$$

### **3.2.2.5 Ermittlung der Zelldichte mittels CASY Cellcounter [ $\text{ml}^{-1}$ ]**

Die Verwendung eines elektronischen Zellzählers hat den Vorteil der schnelleren Messung und der durch die erhöhte Ereigniszahl erhöhten Präzision. Hierzu wurde in 10ml gepufferte isotonische Salzlösung (CASYTon) ein definiertes Volumen der zu messenden Zellsuspension gegeben und anschließend mittels des Gerätes vollautomatisch gemessen. Das Gerät zeichnet eine Größenverteilung der detektierten Ereignisse auf und ermittelt über die Verdünnung die Zellkonzentration in der Suspension. Über die ermittelte Größenverteilung ließ sich der Anteil vitaler Zellen sowie möglicherweise vorhandener Aggregate bestimmen.



### **3.2.2.6 Ermittlung der Zelldichte über Okularzählfeld [ $\text{mm}^{-2}$ ]**

Für die Bestimmung der Zelldichte auf mikroskopierbaren Flächen wie Deckgläsern, transparenten Membranen (Inserts) und Zellkulturflaschen wurde ein Phasenkontrastmikroskop mit zentralem Okularzählfeld verwendet. An vier zufällig ausgewählten Stellen wurden alle Zellen innerhalb des Zählfeldes gezählt, auf die vom Zählfeld bei gewählter Vergrößerung abgedeckte Fläche bezogen und der Mittelwert gebildet. Die Kantenlänge bei der verwendeten Vergrößerung (10x), bestimmt mit einem Mikrometer, betrug 0,96mm, somit ergab sich eine Zählfläche von  $0,92\text{mm}^2$ . Über die Multiplikation der ermittelten Zelldichte mit der Kultivierungsfläche wurde die Gesamtzellzahl ermittelt.

### **3.2.2.7 Kryokonservierung von Zellen**

Für eine kontinuierliche Versorgung mit Zellen wurden Zellen kryokonserviert. Dazu wurden Zellen in präkonfluenter Phase enzymatisch (Methoden 3.2.2.1 oder 3.2.2.2) abgelöst, in PBS+3%FCS resuspendiert und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Zellsuspension im Kryomedium (63% Kulturmedium ohne Supplemente +30%FCS +7%DMSO) wurde nach vorausgehender Zentrifugation bei 200g/10min auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$  eingestellt und in Kryoröhrchen (1,5ml) aliquotiert. Die so aliquotierten Zellen wurden mit Hilfe eines Isopropanol-Kryo-Systems für mindestens 24h bei  $-70^\circ\text{C}$  herunter gekühlt ( $1^\circ\text{C} \cdot \text{h}^{-1}$ ) und anschließend möglichst schnell in flüssigen Stickstoff (min  $-196^\circ\text{C}$ /max  $-120^\circ\text{C}$ ) überführt und dort gelagert.

### **3.2.2.8 Auftauen von kryokonservierten Zellen**

Kryokonservierte Zellen enthaltende Kryoröhrchen wurden nach dem Entnehmen aus flüssigem Stickstoff möglichst schnell bei Raumtemperatur aufgetaut, in  $4^\circ\text{C}$  Kulturmedium (15ml) durch Resuspendieren und anschließendes Zentrifugieren (200g/10min) gewaschen und erneut so in  $4^\circ\text{C}$  Kulturmedium aufgenommen, dass sich auf der Kultivierungsfläche (T25/T75) mindestens eine Zelldichte von  $200 \text{ mm}^{-2}$  einstellte. Nach 24h Inkubation unter Standardbedingungen erfolgte ein Medienwechsel.

### **3.2.2.9 Medienwechsel**

Der routinemäßige Wechsel des Kulturmediums der Zellen erfolgte dreimal wöchentlich. Dazu wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und durch neues Kulturmedium ersetzt.

### 3.2.2.10 Ermittlung der Monolayerdichtigkeit

Die Ermittlung der Dichtigkeit der von den Zellen gebildeten, epithelialen Monolayer auf Inserts wurde über zwei verschiedene Methoden durchgeführt.

#### **Phenolrot**

Vor der Medienoptimierung in 4.4 wurde für die Standardkultur M199+10%FCS mit einem hohen Gehalt an Phenolrot verwendet. Dieses eignete sich gut für eine Ermittlung der Dichtigkeit. Die Zellen wurden hierzu apikal mit einer Salzlösung (HBSS+Ca<sup>2+</sup>+Mg<sup>2+</sup> ohne Phenolrot) und basal mit Standardmedium kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte ein Medienwechsel. 100µl Probe der jeweiligen Kompartimente wurden anschließend, nach Alkalisierung durch 50µl 1M NaOH bei 550nm photometrisch gemessen. Der Phenolrotübertritt in das apikale Kompartiment wurde in % nach Formel 2 dargestellt. Als Kontrolle dienten unbewachsene Inserts.

$$\text{Übertritt} = \frac{(E_{550\text{nm}} \text{ apikal})}{(E_{550\text{nm}} \text{ basal})} \quad [\%] \quad \text{Formel (2)}$$

#### **FITC-Inulin**

Aufgrund zu geringer Phenolrotkonzentrationen im optimierten, serumarmen Medium konnte die oben beschriebene, relativ einfache Methode nicht mehr durchgeführt werden. Ein weiterer Grund war die mögliche Expression von OATs bei RPTEC, HK2, hNF, hDNeg und hPTC, die einen aktiven Transport von Phenolrot bedingen könnten. Somit erfolgte die Bestimmung der Dichtigkeit über den Durchtritt von FITC-Inulin. Inulin wird *in vivo* weder von den Zellen aktiv transportiert, noch kann es das Nephron passiv passieren. Dabei wurde den apikalen Medien bzw. Salzlösungen 1:50 2,5% FITC-Inulin in 0,9% NaCl zugegeben und nach Ablauf der Messzeit die Konzentrationen beider Kompartimente durch fluometrische Messung einer 100µl Probe ermittelt. (Anregung 485nm/Emission 520nm). Der Übertritt in [%] von FITC-Inulin in das basale Kompartiment wurde nach Formel 3 dargestellt. Als Kontrolle dienten unbewachsene Inserts.

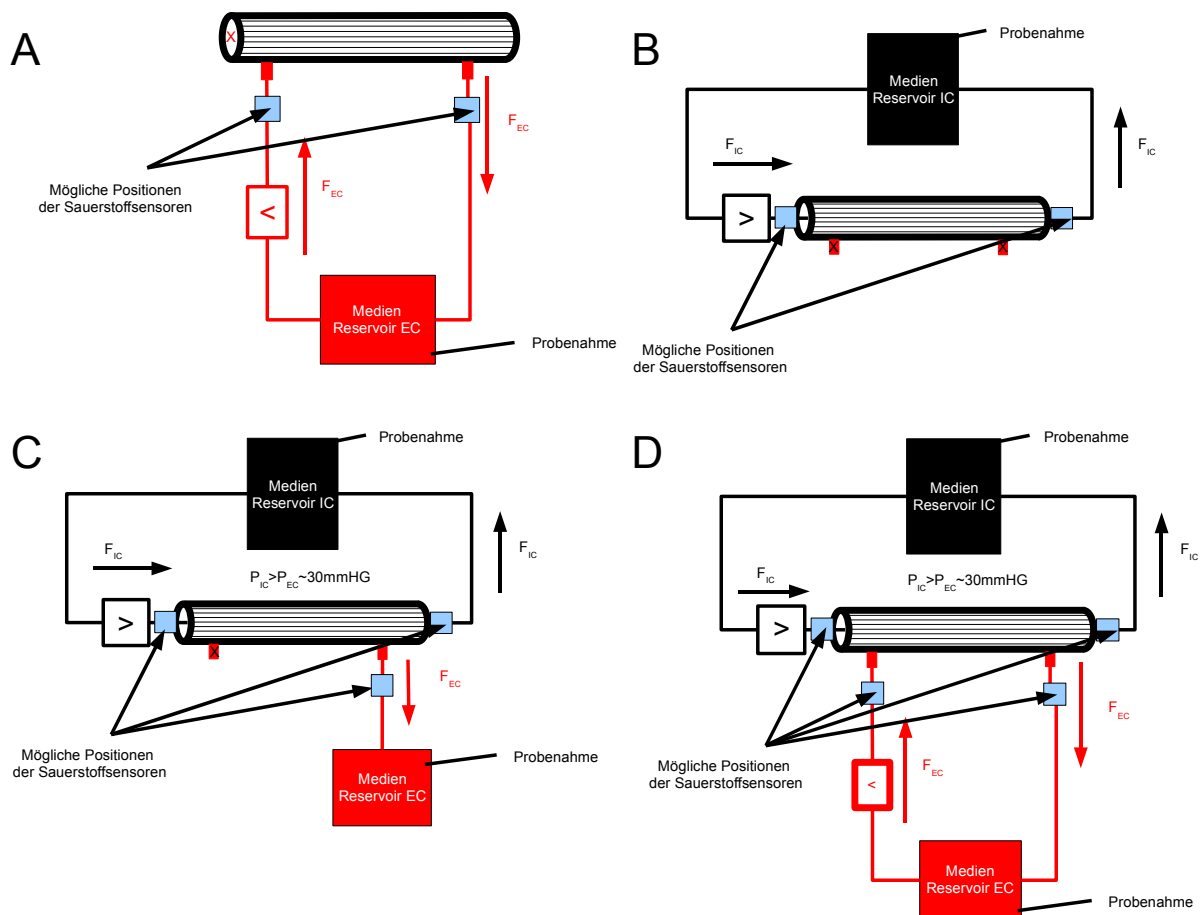
(2,5% FITC-Inulin in 0,9% NaCl Stammlösung, hergestellt durch Erwärmung von 20ml 0,9% NaCl Lösung auf 70°C und hinzufügen von 1g FITC-Inulin unter ständigem Rühren. Aliquotierte Lagerung vor Licht geschützt bei 4°C).

$$\text{Übertritt} = \frac{(RFU \text{ basal})}{(RFU \text{ apikal})} \quad [\%] \quad \text{Formel (3)}$$

### 3.3 Modulmethoden

#### 3.3.1 Perfusionssystem

Für eine kontinuierliche Versorgung der Zellen mit Metaboliten, Wachstumsfaktoren, Sauerstoff sowie für einen Abtransport metabolischer Produkte bei der Kultivierung von Zellen innerhalb von Hohlfasermodulen, wurde ein Perfusionssystem entwickelt. Dieses sollte folgende Bedingungen erfüllen: Sterilität und möglichst geringe Zytotoxizität der verwendeten Komponenten über lange Kulturperioden (>4 Wochen), möglichst pulsationsfreie Perfusion, einfache Handhabung und Verwendbarkeit von Standardlabormaterial (z.B. Flaschen, Filter, Spritzen). Die Entwicklung des Systems wird in 4.7 im Detail beschrieben. Die hier dargestellten Methoden stellen die, während dieser Arbeit entwickelten, optimalsten Methoden dar.



**Abbildung 7:** Schema der verschiedenen Modulperfusionsmodi. (A) nur äußere Perfusion, (B) nur innere Perfusion, (C) nur Innere Perfusion im Filtrationsmodus und (D) Ko-Perfusion beider Kompartimente.

### 3.3.2 Einsaatmethode

#### 3.3.2.1 Spülen der Module

Vor Verwendung der Module für eine Kultivierung von Zellen innerhalb der Hohlfasern, wurden diese für eine Entfernung von Luftblasen, Produktionsrückständen und des sich zur Verhinderung von Austrocknungen innerhalb der porösen Strukturen befindliche Glycerin (PAN/PEI-PAN), gespült. Dazu wurde das äußere Kompartiment (EC) mittels entgaster 0,9% NaCl Lösung dreimal gewaschen (vollständiger Volumenwechsel). Anschließend wurde das EC mit 0,9% NaCl Lösung befüllt und steril verschlossen. Der sterile Schlauchsatz wurde nun luftblasenfrei über einen Sterilfilter an das innere Kompartiment (IC) angeschlossen, um dieses mit 0,9% NaCl Lösung zu durchspülen. Um möglichst jeden Rest des intramembranen Glycerins zu entfernen, wurden in einem nachfolgenden Schritt die Module filtrierend über die Kapillarmembran gespült. Dazu wurde der Ausgang IC steril verschlossen, an den Ausgang EC ein steriler Silikonschlauch angeschlossen und anschließend die Pumpe gestartet. Abschließend wurden die Module steril verschlossen bei 4°C bis zur Einsaat der Zellen gelagert.

Tabelle 3.3: Spülvolumen und -geschwindigkeiten der Module

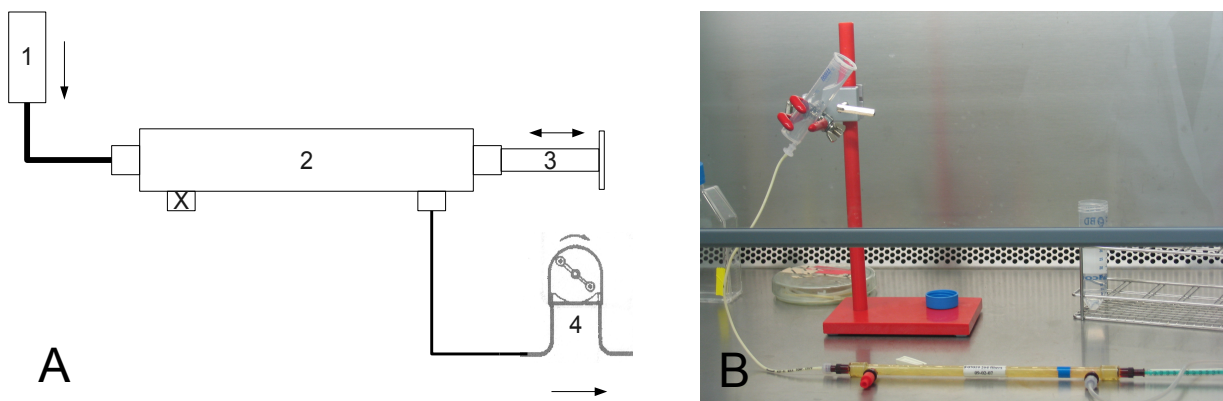
<i>Faserzahl</i>	<i>IC – Geschwindigkeit</i>	<i>IC - Spülvolumen</i>	<i>Filtriergeschwindigkeit</i>	<i>Filtriervolumen</i>
264	10	150	5	75
64	2,5	50	1,25	25
32	1,25	20	0,5	10

#### 3.3.2.2 Ablösen der Zellen

Die Zellen für die Einsaat wurden nach einmaligem Waschen mit PBS, enzymatisch abgelöst. Dabei bestimmte der Zelltyp die Verwendung der enzymatischen Lösung nach Methode 3.2.2.1 oder 3.2.2.2. 0,25% Trypsin-EDTA kam bei MDCK-Zellen zur Anwendung, während alle übrigen Zellen mittels Accutase abgelöst und vereinzelt wurden. Die Einwirkzeit richtete sich nach dem Fortschritt der mikroskopisch verfolgten Ablösung bzw. Vereinzlung. Die Zellen wurden anschließend in ein steriles 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und dieses auf 50ml mit PBS+5% FCS (RT) aufgefüllt. Von der Suspension wurde vor der folgenden Zentrifugation (200g, 10min, 4°C) eine Probe für die Zellzahlbestimmung mittels CASY (Verdünnung 1:101) genommen. Abschließend wurde eine Einsaatkonzentration von 0,5-1 Mio Zellen·ml<sup>-1</sup> mittels 4°C PBS eingestellt.

### 3.3.2.3 Vorbereitung der Module

Die Einsaat der Zellen in die Module erfolgte filtrierend, saugseitig IC (Abb. 8). Vorbereitend dafür wurde der Pumpenschlauch über einen Silikonschlauch mit dem äußeren Kompartiment verbunden, während der zweite EC Anschluss steril verschlossen blieb. Über einen sterilen Pharmed®-Schlauch wurde das Einsaatreservoir (sterile Einwegspritze ohne Kolben) mit einem der IC Anschlüsse verbunden und am gegenüberliegenden Anschluss eine sterile, bereits mit 4°C PBS vorgefüllte 1ml Spritze angeschlossen. Mit deren Hilfe konnte eine luftblasenfreie Befüllung des Einsaatreservoirs und eine weitere Verteilung der Zellen innerhalb des Moduls während der Einsaat gewährleistet werden. Nachdem alle IC-Komponenten des Einsaatreservoirs abschließend über die 1ml Spritze mit 4°C PBS luftblasenfrei befüllt waren, standen die so vorbereiteten Module für die Einsaat bereit.



**Abbildung 8:** Schema Modulbefüllung. Das System bestand aus 1. Einsaatreservoir, 2. Hohlfasermodule, 3. Ausgleichs- und Verteilungsspritze und 4. Pumpe für die Befüllung.

### 3.3.2.4 Einsaat der Zellen

Die Einsaat der Zellen erfolgte über das Transferieren der vorbereiteten Zellsuspension in das mit dem Modul verbundene Reservoirgefäß und dem anschließenden Starten der Pumpe (max.  $5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  bei 264Kapillaren). Durch ständiges, langsames Drehen um die eigene Achse, leichtes Wippen der Module und vorsichtiges Klopfen auf deren Gehäuse während der Befüllung, sollte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der Module gewährleistet werden. Zusätzlich konnte über ein langsames Befüllen und Entleeren der Ausgleichsspritze auf der Gegenseite des Einsaatanschlusses für eine weitere Verteilung gesorgt werden. Die Befüllung galt als beendet, wenn das gesamte Volumen der Zellsuspension in die Module eingebracht war. Beide IC Anschlüsse wurden

nach Entfernung der Schläuche und Spritzen steril verschlossen, das Schlauchsystem für eine äußere Perfusion angeschlossen (Abb. 7A) und die Perfusion im Umlaufmodus gestartet. Alle 20min für 2h wurden die Module um ca. 90° gedreht und für mindestens 12h auf diese Art perfundiert, um den Zellen Zeit für die Adhäsion zu geben. Ein Ausspülen nicht angehefteter Zellen erfolgte nach Ablauf dieser Adhäsionsphase durch vorsichtiges Durchspülen des inneren Kompartimentes für 10min (max 2ml·min<sup>-1</sup> bei 264Kapillaren) mit Kulturmedium. Das gesamte Spülvolumen wurde aufgefangen und die Anzahl der ausgespülten Zellen bestimmt. Für mindestens 10 Tage wurden die Module nun im Umlauf nur EC perfundiert, bevor ein Anschluss eines Perfusionskreislaufs an das innere Kompartiment erfolgte.

### **3.3.3 Modul Kultivierungsmethoden**

#### ***3.3.3.1 Initiale Perfusion in der Proliferationsphase***

Die ersten 10 Tage nach Einsaat der Zellen (Proliferationsphase) fand eine Perfusion der Module nur im äußeren Kompartiment (Abb. 7A) statt, das innere Kompartiment blieb dabei verschlossen. Da die Zellen durch die Membran der Kapillare vor Scherkräften geschützt werden, konnte in diesem Modus mit hohen Flüssen (>8ml·min<sup>-1</sup> bei 264 Kapillaren) gearbeitet werden. Dies stellte die ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff sicher.

#### ***3.3.3.2 Perfusion in der konfluenten Phase***

Nach der initialen Perfusion nur im äußeren Kompartiment während der ersten 10 Tage, fand zusätzlich zur EC Perfusion, eine IC Perfusion anfangs intermittierend mit steigender Flussrate und daraufhin nur noch im inneren Kompartiment der Module, der apikalen Seite der Zellen statt. Um ein Eindringen von Luft in das innere Kompartiment durch Leerlaufen der Reservoirflasche zu vermeiden, bestimmte die Ultrafiltrationsrate (Volumenfluss von IC nach EC), ob eine Perfusion im nichtfiltrierenden (Abb. 7B), im filtrierenden Modus (Abb. 7C) oder im Ko-Perfusionsmodus (7D) stattfand. Die Ultrafiltrationsrate nahm mit zunehmender Kulturdauer und Konfluenz ab.

### **3.3.3.3 Medienwechsel an Perfusionenkulturen**

#### **Medienwechsel EC**

Für den Wechsel wurde ein definiertes Volumen des entsprechenden Mediums in sterile Glasflaschen pipettiert und im Brutschrank (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchte) auf 37°C gebracht und dabei gasäquilibriert. Das Modul wurde aus dem Brutschrank entnommen, alle Schlauchclips geschlossen und dieses vertikal in ein Stativ unter der Cleanbench eingespannt. Die das alte EC Perfusionsmedium enthaltende Reservoirflasche wurde gegen die neue vorbereitete Flasche ausgetauscht. Um IC nicht angeheftete und tote Zellen auszuspülen, wurde der zuführende Schlauchsatz des äußeren Perfusionskreislaufs an den Eingang des inneren Kompartiments angeschlossen, ein steriles Zentrifugenröhrchen unter den geöffneten Ausgang des inneren Kompartiments gestellt und eine Spülperfusion (max. 2ml·min<sup>-1</sup> bei 264 Kapillaren) mit frischem Kulturmedium gestartet. Nach Abschluss des Spülens wurde der Schlauchsatz wieder an den Zufluss des äußeren Kompartiments transferiert, alle Anschlüsse des inneren Kompartiments steril verschlossen und die Perfusion im Brutschrank wieder aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Anzahl ausgespülter Zellen im Spülvolumen, des Volumens und der Metaboliten im alten Perfusionsmedium.

#### **Medienwechsel IC**

Der Medienwechsel am inneren Kompartiment gestaltete sich im Vorgehen prinzipiell analog zu dem Wechsel für den äußeren Kreislauf. Da bei laufender, inneren Perfusion bereits ein permanenter Fluss in diesem Kompartiment stattfand, erübrigte sich ein entsprechendes ausspülen toter, bzw. angehefteter Zellen durch einen extra Spülschritt. Dadurch reduzierte sich der Aufwand auf den oben angesprochenen Flaschenwechsel und einen eventuell nötigen Austausch von Schlauchsegmenten.

### **3.3.4 Ermittlung funktionaler Parameter**

#### **3.3.4.1 Ermittlung der Monolayerdichtigkeit**

Die Ermittlung der Monolayerdichtigkeit innerhalb von Hohlfasermodulen erfolgte äquivalent der in 3.2.2.10 beschriebenen Methoden für Inserts. Proben der aufgefangenen Lösungen nach Moduldurchtritt wurden je nach Verfahren (Phenolrot/FITC-Inulin) photometrisch respektive fluometrisch gemessen und somit der Übertritt des verwendeten Markers bestimmt.

### **3.3.4.2 Sauerstoffmessungen**

Für die Ermittlung der Sauerstoffsättigung im Modulperfusionssystem kamen spezielle Durchfluss-Sauerstoffsensoren der Firma Presens GmbH, Regensburg zum Einsatz. Die auf einem optischen Prinzip basierenden Sensoren sind besonders für einen Einsatz in sterilen Perfusions- und Durchflusssystemen durch LuerLock Anschlüsse ausgelegt und Dampf- sowie EtO-sterilisierbar. Zur Verfügung standen insgesamt zwei Sensoren, deren Messungen über einen Messwandler direkt digital aufgezeichnet werden konnten. Vor einem Einsatz am Modulperfusionssystem mussten die Sensoren kalibriert und dampfsterilisiert werden.

Die Kalibration erfolgte über  $1\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$  in Wasser für den Nullpunkt und über sauerstoffgesättigtes Wasser für 100%  $\text{pO}_2$ . Das System führte automatisch eine Temperatur- und Luftdruckkompensation durch Eingabe der Werte bei Kalibration durch.

Nach ausgiebigem Spülen der Elektroden konnten diese nach Dampfsterilisation, in das Modulperfusionssystem eingebracht werden. Dabei erfolgte die Integration in zwei verschiedenen Konfigurationen. Für eine Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs wurden die Sensoren jeweils an den Ein- und Ausgang des perfundierten Kompartiments eingebracht. Für eine standardmäßige Überwachung der Sauerstoffsättigung des Mediums nach Moduldurchgang wurde auf eine Messung der Zufluss-Sauerstoffsättigung verzichtet und nur die Sauerstoffsättigung beim Verlassen der Module aufgezeichnet. Somit konnten die Zellaktivitäten zweier Module parallel erfasst werden.

### **3.3.5 Fixierung der Module**

Vor Fixieren der Zellen innerhalb der Kapillaren, wurden die Module mittels HBSS  $+\text{Ca}^{2+}$   $+\text{Mg}^{2+}$  3x EC gewaschen und IC 10min gespült (bei max.  $4\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  für 264 Kapillaren). Für Module deren Kapillaren über REM untersucht werden sollten, fand eine Karnovski-Fixierung für 20min statt. Sollten die Zellen innerhalb der Kapillaren dagegen über Immunofluoreszenzfärbungen analysiert werden, erfolgte eine Fixierung der Zellen mittels  $-20^\circ\text{C}$  Methanol für 6min. Das Fixiermittel wurde in allen Fällen in beiden Kompartimenten angewendet, wobei dieses zuerst möglichst schnell in das, nach dem Spülen des inneren, entleerte äußere Kompartiment gepumpt wurde. Anschließend wurde das innere Kompartiment mit dem Fixiermittel für mindestens 5min perfundiert (bei Methanolfixierung die gesamte Fixierzeit). Nach dem Ablauf der Fixierzeit wurde EC dreimal mit 0,9% NaCl gewaschen und anschließend IC für ca. 20min gespült (max.  $4\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  bei 264 Kapillaren).



Abschließend wurden alle Anschlüsse der Module verschlossen und diese bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

### **3.4 Mikroskopische Methoden**

#### **3.4.1 Fixierungen**

##### **3.4.1.1 Karnovski-Fixierung**

Zellen auf Flachmembranen, Transwell-Inserts und Membrankapillaren wurden für REM Untersuchungen mittels Karnovski-Fixierung fixiert. Dazu wurde die Fixierlösung unmittelbar vor der Anwendung wie folgt angesetzt (für 12,5ml Fixierlösung):

1. 500mg PFA (Paraformaldehyd) in 6,25ml A.-Bidest unter Rühren auf 72°C erhitzen
2. mit einem Tropfen 1N NaOH die Lösung klären
3. auf RT abkühlen lassen
4. 125µl GDA (Glutardialdehyd) (frisch aufgetaut) hinzugeben
5. mit PBS auf 12,5ml auffüllen
6. kurz vor der Anwendung pH auf 6,9 einstellen

Die Fixierung an sich wurde wie folgt durchgeführt:

1. Zellen 3x mit HBSS +Ca<sup>2+</sup> +Mg<sup>2+</sup> waschen
2. mittels Karnovski, Zellen 25min. fixieren
3. fixierte Zellen 3x mit 0,9% NaCl (oder PBS) waschen, 0,9% NaCl (bzw. PBS) das letzte Mal nicht entfernen
4. Fixierte Zellen bei 4°C lagern

##### **3.4.1.2 Glutardialdehyd-Fixierung**

Für eine schnelle Fixierung von Zellen auf Glas und Zellkulturplastik für Transport, Lagerung und anschließende phasenkontrastmikroskopische Betrachtung wurden diese mit 2,5% Glutardialdehyd in reinem Wasser nach dreimaligen Waschen mit HBSS +Ca<sup>2+</sup> +Mg<sup>2+</sup> fixiert. Abschließend erfolgten drei weitere Waschschrirte, mit einer nachfolgenden Überschichtung von PBS bzw. 0,9% NaCl und Versiegelung mit Laborfolie für die Lagerung bei 4°C.

### **3.4.1.3 Methanolfixierung**

Für eine Fixierung als Vorbereitung für Immunofluoreszenzfärbungen von Zellen auf Glas und Zellkulturplastik wurden die Zellen mittels  $-20^{\circ}\text{C}$  Methanol für 6min nach dreimaligem Waschen mit HBSS  $+\text{Ca}^{2+} +\text{Mg}^{2+}$  fixiert. Abschließend erfolgten drei weitere Waschschrte, mit einer nachfolgenden Überschichtung von PBS bzw. 0,9% NaCl und Versiegelung mit Laborfolie für die Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zur Durchführung der Immunofluoreszenzfärbungen.

### **3.4.1.4 Methanol-Eisessigfixierung**

Für eine Fixierung als Vorbereitung für alleinige Hoechst33528/DAPI-Kernfärbungen, wie diese z.B. bei optisch nicht transparenten Membranen erfolgten, wurden die Zellen mittels Methanol-Eisessigfixierung (3+1) bei RT nach dreimaligem Waschen mit HBSS  $+\text{Ca}^{2+} +\text{Mg}^{2+}$  fixiert. Abschließend erfolgten drei weitere Waschschrte, mit einer nachfolgenden Überschichtung von PBS bzw. 0,9% NaCl. Hiernach erfolgte entweder eine direkte Durchführung der Kernfärbung oder eine Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zur Durchführung dieser.

## **3.4.2 Weiterbearbeitung fixierter Proben für die Mikroskopie**

### **3.4.2.1 Vorbereitung von fixierten Modulen**

Für erste Einschätzungen und die Ermittlung der Verteilung der Zellen über und innerhalb der Kapillaren wurden diese einzeln mittels eines Phasenkontrastmikroskops begutachtet. Dazu mussten die Module mittels einer Säge geöffnet, und einzelne Kapillaren heraus präpariert werden, ohne dass diese austrockneten oder Luft in den Intrakapillarraum eintrat. Die einzelnen Kapillaren wurden dafür auf runden Deckgläsern ( $d=44\text{mm}$ ) aufgewickelt, anschließend mittels Silikonfett zwischen dem Deckglas auf einer Plastikpetrischale fixiert und diese mit PBS befüllt. Somit konnte die gesamte Länge einzelner Kapillaren auf Zellverteilung, -morphologie untersucht und geeignete Proben für weitere eingehende Untersuchungen mittels fortgeschrittener mikroskopischer Methoden ausgewählt werden. Ausgewählte Kapillaren wurden in kurze Stücke segmentiert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  in PBS+1%NaAzid bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### **3.4.2.2 Trocknung für REM**

Karnovski -bzw. Glutardialdehyd-fixierte Proben wurden mittels einer Ethanolreihe in 10Vol % Schritten für mindestens 10min pro Schritt von 10 bis 70Vol% entwässert. Im Falle von segmentierten Kapillaren aus Modulen erfolgte eine Präparation mithilfe eines Binokular in

70Vol%, die eine REM Untersuchung ermöglichte. Dazu wurden Kapillarenden mit Rasierklingen schräg an- und Kapillaren entlang der Längsachse aufgeschnitten. Nach der Bearbeitung einer ausreichenden Anzahl von Proben, wurde an diesen, wie auch an Flachmembranproben die Trockungsreihe in 5% Schritten bis 100% Ethanol fortgesetzt. Als letzten Schritt dieser Reihe wurden die Proben mit 100% abs. Ethanol für 10min und darauf folgend mit Hexamethyldisilazane (HMDS) unter dem Abzug 10min behandelt. Überschüssiges HMDS wurde abgesaugt und die noch feuchten Proben in einen Exsikkator überführt. Dieser wurde bis zum weiteren Bearbeiten der Proben vaccuminiert und bei 4°C gelagert.

Kurz vor der REM-Betrachtung wurden die Proben mittels Kohlekleber auf REM-Probeteller fixiert und in einem Sputterapparat mit Gold besputtert. Die so vorbereiteten Proben waren nun bereit für die REM.

### 3.4.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Karnovski-fixierte Proben wurden mit -20°C Methanol für 6min permeabilisiert. Bereits Methanol-fixierte Proben konnten direkt weiter verarbeitet werden. Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörpern an die Proben zu verhindern wurden diese 30min mit Block- und Verdünnungspuffer (PBS+3%FCS) behandelt.

Die Gesamtanzahl der Kapillarsegmente bzw. Flachmembranproben wurde in Subgruppen für die Verwendung von Negativkontrollen aufgeteilt. Dabei wurden die Negativkontrollen anstelle mit primären Antikörper nur mit Verdünnungspuffer inkubiert, anschließend erfolgte eine normale Inkubation mit Sekundärantikörpern.

Primäre Antikörper (60min) und sekundäre Antikörper (45min) wurden nacheinander entsprechend der Herstellerangaben (siehe Tabelle) in Verdünnungspuffer verdünnt auf die Proben gegeben und bei Raumtemperatur geschüttelt inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für 10min in DAPI. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden die Proben dreimal in Verdünnungspuffer für je mindestens 10min gewaschen. Abschließend wurden die Proben in Mowiol zwischen einem Objektträger und einem Deckglas eingedeckelt.

Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper und deren Verdünnungen

<i>Primär Antikörper</i>			<i>Sekundär Antikörper</i>			
<i>Ziel</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Ziel</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>
Human-AQP1	Rabbit	1:500	Anti-Rabbit	CY-2	Goat	1:140
Human ZO1	Mouse	1:70	Anti-Mouse	CY-3	Goat	1:200
Canine-ECad	Rat	1:500	Anti-Rat	CY-3	Goat	1:400

Färbeschema:

1. Permeabilisierung von Karnovski-fixierten Proben 6min -20°C Methanol
2. Blocken mittels Färbepuffer
3. geschüttelte Inkubation mit primären Antikörpern 60min bei RT
4. 3x Waschen mit Puffer (mind. 10min RT)
5. geschüttelte Inkubation mit sekundären Antikörpern 45min bei RT
6. 3x Waschen mit Puffer (mind. 10min RT)
7. 10min Inkubation mit DAPI (siehe 3.4.2.4)
8. 3x Waschen mit PBS (mind. 10min RT)
9. Eindeckeln mit Mowiol

#### **3.4.2.4 Hoechst33528 / DAPI Kernfärbung**

Eine Färbung der Zellkerne erfolgte nach Fixierung und Permeabilisierung durch 1:201 Hoechst33528 Stammlösung (0,5mg ml<sup>-1</sup> in 70%Ethanol) in PBS bzw. unverdünnte Partec DAPI Staining Solution als letzter Färbeschritt für 10min bei RT gefolgt von drei Waschschritten für je mindestens 10 Minuten.

#### **3.4.3 Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie**

Vorbereitete, in Mowiol eingebettete Proben wurden nach Aushärten mithilfe von CLS-Mikroskopen untersucht. Dabei wurden Bildstapel (in z Richtung aufeinanderfolgende X/Y-Ebenen) der Proben erzeugt. Bei Kapillarproben war es aufgrund technischer Limitationen nicht möglich, den gesamten Querschnitt (Z-Tiefe) einer Kapillarprobe in einem Stapel aufzunehmen, daher konnten maximal  $\frac{3}{4}$  bis  $\frac{1}{4}$  des Querschnitts aufgenommen werden. Die Proben wurden mit drei Lasern angeregt, um die drei verwendeten Fluorophore (Hoechst33528/DAPI, CY2, CY3) aufzunehmen. Dabei erfolgte die Aufnahme im „Sequential“-Modus, hierbei wird in einem X/Y- Durchgang nur eine Laser/Detektor-Kombination aktiviert, so das pro X/Y-Ebene drei Durchgänge nötig sind, um die Verteilung aller Farbstoffe aufzunehmen. Die Verstärkungen der Photomultiplier bzw. Intensitäten der Laser wurden zu Beginn der Untersuchung an Einzel-/Doppel-/Negativproben eingestellt und gespeichert. Diese gespeicherten Einstellungen wurden dann für die Aufnahme sämtlicher Bilderstapel einer Probenpräparation verwendet. Die dabei verwendeten Laser und Filtereinstellungen sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Die erhaltenen Bilderstapel wurden anschließend mittels ImageJ bearbeitet. Die einzelnen Kanäle wurden hierzu einer Kontrast/Helligkeitsoptimierung unterzogen und anschließend wieder zu RGB-Bilderstapeln zusammengesetzt. Bei TJ Visualisierungen war es nötig, mehrere Ebenen eines Bilderstapels in einer „Max-Intensity“-Projektion („All-Max“) zusammenzufassen, da diese über mehrere X/Y-Ebenen verlaufen.

*Tabelle 3.5: Verwendete Laser- / Filtereinstellungen für CLSM Untersuchungen*

<i>Laser</i>	<i>λ Ex. [nm]</i>	<i>Filterbereich λ Em. [nm]</i>	<i>Farbstoff</i>	<i>Ziel</i>
Diode	405	408-485	Hoechst33528/DAPI	Nucleii
Argon	488	490-554	CY2	AQP1
DPSS	561	563-652	CY3	ECad, ZO1

### **3.5 Analytische Methoden**

#### **3.5.1 Konzentrationsbestimmung von Elektrolyten und Metaboliten**

Für die Bestimmung der Metabolite Glukose [ $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ ], Laktat [ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], Harnstoff [ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ], der Elektrolytkonzentrationen [ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , der berechneten Osmolarität [ $\text{mosm}\cdot\text{l}^{-1}$ ] und des pH-Wertes der verwendeten Kulturlösungen wurde ein vollautomatisches klinisches Blutanalysegerät Nova-Stat M5 verwendet. Hierzu wurden vom Analyt mindestens 500 $\mu\text{l}$  in ein Reaktionsgefäß für die Messungen im Gerät gegeben. Nach Ablauf der Analysezeit erstellte das Blutanalysegerät einen Ausdruck mit den Ergebnissen der Analyse. Die Kalibration erfolgte vollautomatisch in zyklischen Abständen bzw. konnte manuell veranlasst werden. Eine Qualitätskontrolle mittels vom Hersteller angebotener Qualitätsstandards erfolgte in regelmäßigen Abständen.

#### **3.5.2 CD133 Analyse mittels Durchflusszytometrie**

Lösungen:

Wasch / Verdünnungspuffer (2,5g Albumin in PBS+2mM EDTA)

Blockpuffer (10% HSA in PBS)

Für die Bestimmung des Anteils CD133<sup>+</sup> Zellen innerhalb einer Population, wurden diese vorsichtig entsprechend Methode 3.2.2.2 abgelöst, die Zelldichte bestimmt, zentrifugiert (300g/5min) und anschließend in PBS+10%HSA resuspendiert, um unspezifische Bindungsstellen zu Blocken. Nach Bildung von drei Aliquots und erneuter Zentrifugation

erfolgte die Inkubation der Proben 15min bei 4°C mit Maus-Anti-human-CD133-PE, Maus-IGG1-PE und Färbepuffer als Isotypkontrollen respektive Kontrolle ungefärbter Zellen. Nach abschließendem Waschen der Proben in Waschpuffer und Einrichten des FACSCalibur™ erfolgte die Messung mit möglichst 15000Counts pro Messung.

### **3.5.3 TGF-β1 Bestimmung über Sandwich-ELISA**

Die Bestimmung von TGF-β1 erfolgte über ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit. Die Durchführung wurde gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die zellfreien, bei -70°C gelagerten Proben (Zellkulturüberstände, Kulturmedien) wurden dafür möglichst schnell aufgetaut. Eine Aktivierung des latenten TGF-β1 in die immunoreaktive Form erfolgte durch 10min Inkubation bei Raumtemperatur in saurem Milieu (Aktivierungspuffer). Nach Neutralisation des Aktivierungspuffers wurden die Proben sofort, gemäß ELISA-Protokoll des Herstellers (s.u.) prozessiert.

1. Inkubation 2h/RT der Proben und Standardreihen
2. 4x Waschen mit Waschpuffer
3. Inkubation 2h/RT der Proben mit konjugiertem Antikörper
4. 4x Waschen mit Waschpuffer
5. Inkubation 30min mit Substratlösung
6. Abstoppen der Enzymreaktion mit Stopplösung
7. Bestimmung der korrigierten OD 450-550nm

Nach Bildung einer Regressionsgleichung mit Hilfe der TGF-β1-Standardreihe (1:2), wurden die TGF- β1 Konzentrationen [ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] der Proben bestimmt.

### **3.5.4 Zytokinbestimmung**

Die gleichzeitige, quantitative Bestimmung von sechs proinflammatorischen Zytokinen erfolgte durch Anwendung eines kommerziell erhältlichen Cytometric Bead Array (CBA) von BD über ein BD FACSCalibur™ Flowzytometer. Die Konzentrationen von IL12p70, TNF-α, IL10, IL6, IL1-1β, IL-8 [ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] werden hierbei durch sechs verschiedene Populationen an Beads mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten, Immunreaktivitäten und Größen ermittelt. Dazu wurden die zellfreien, bei -70°C gelagerten Proben (Zellkulturüberstände sowie –Medien als Kontrolle) möglichst schnell auf Raumtemperatur gebracht und entsprechend des Assay Protokolls (s.u.) gemessen.

1. Einrichten der Parameter des BD FACSCalibur™ mittels Software und Beads
2. Inkubation der 6Beads Mixtur 3h/RT in den Proben und Standardreihen
3. Waschen der Proben mit Waschpuffer, abzentrifugieren der Beads
4. Messen der Proben mit BD FACSCalibur™ Flowzytometer
5. Auswertung der Fluoreszenzwerte mittels spezieller BD-Makros (Excel)

### **3.5.5 Perfusionsrespirometrie**

#### **3.5.5.1 Perfusionsrespirometer**

Um den Sauerstoffbedarf von Zellen zu ermitteln, wurde ein etabliertes Perfusionsrespirometer [92] (Abb. 9) verwendet. Die Differenzen in der Sauerstoffsättigung zwischen Medien, welche eine Perfusionskammer mit auf Deckgläsern kultivierten Zellen passierten bzw. über einen Referenzweg direkt zu einer Sauerstoffelektrode gelangten, dienten hier der Bestimmung des Sauerstoffbedarfs. Hauptbestandteile dieses Systems sind eine, Zellen auf Deckgläsern enthaltende, Perfusionskammer, eine  $pO_2$ -Sauerstoffelektrode nach Clark, Glasspritzen angetrieben von einem Spritzenschlitten und ein Edelstahlkapillarsystem für die Verbindung der Komponenten. Dabei sind alle Komponenten gasdicht und waren in einem temperierbaren ( $37^\circ C$ ) Gehäuse untergebracht. Über das Kapillarsystem gelangte Medium aus Glasspritzen über die Perfusionskammer, bzw. durch Umleitung mittels Drei-Wege-Hahn direkt über einen Referenzweg, zur Sauerstoffelektrode. Durch einen weiteren Drei-Wege-Hahn konnte zwischen zwei, in den Spritzenschlitten eingelegte Glasspritzen umgeschaltet werden und dies gestattete ein einfaches Wechseln zwischen den Versuchspunkten. Die Spannungswerte zwischen 0-10V des an die  $pO_2$ -Elektrode angeschlossenen Messverstärkers repräsentierten hierbei die Sauerstoffsättigungen des jeweiligen Mediums und wurden parallel zur Ausgabe am X/Y-Schreiber über einen A/D Wandler digital mittels Computer aufgezeichnet.

Durch Differenzbildung zwischen den Spannungswerten von Referenz- und Kammerdurchgang konnte somit unter Einbeziehung der Flussrate, die aufgenommene absolute Sauerstoffmenge der Zellen in der Kammer ermittelt werden. Durch die Bestimmung der Zellzahl auf den Deckgläsern nach Methode 3.2.2.6 wurde abschließend über Formel 4 die Atmung der Einzelzellen bestimmt.

$$OUR = \frac{(U_{Ref} - U_{Kammer}) \cdot m_{elektrode} \cdot F_{Kammer} \cdot 10^6 \text{ Zellen}}{N_{Zellen}}$$

Formel (4)

mit

Sauerstoffaufnahme

$$OUR \left[ \frac{\text{mmol}}{(h \cdot 10^6 \text{ Zellen})} \right]$$

Elektrodensteigung

$$m_{elektrode} \left[ \frac{\text{mmol}}{V} \right]$$

Referenzspannung

$$U_{Ref} [V]$$

Kammerspannung

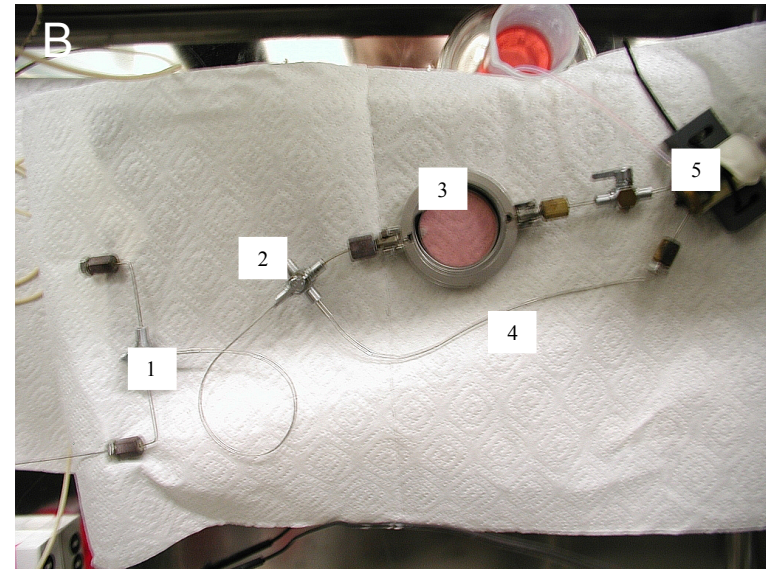
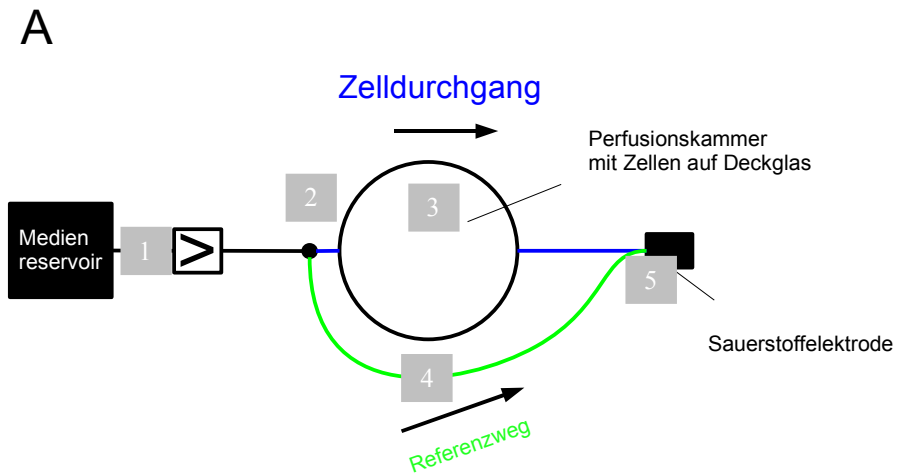
$$U_{Kammer} [V]$$

Kammerfluss

$$F_{Kammer} \left[ \frac{\text{ml}}{h} \right]$$



## Perfusionsrespirometer



**Abbildung 9:** Komponenten des Perfusionsrespirometers: Mit 1) 3-Wegehahn für die Spritzenwahl, 2) 3-Wegehahn Referenz-/Kammerdurchgang, 3) Perfusionskammer mit Zellen auf Deckgläsern, 4) Referenzweg, 5) Sauerstoffelektrode

### **3.5.5.2 Ermittlung der Perfusionsparameter**

Für die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme  $OUR$  über Formel 4 müssen die Elektrodensteigung  $m_{\text{elektrode}}$  und der Kammerfluss  $F_{\text{Kammer}}$  vor respektive während der Perfusion bestimmt werden. Für die Ermittlung der Elektrodensteigung wurde das Messsystem (Elektrode und Messverstärker) vor Perfusion mittels die Elektrode anströmenden  $CO_2$  auf 0%  $pO_2$  bzw. 0V eingestellt. Über Nacht im Brutschrank bei  $37^\circ C$  und 5%  $CO_2$  äquilibriertes Medium wurde als gesättigtes d.h. 100%  $pO_2$  angesehen und der sich während der Perfusion einstellende Referenzspannungswert dieses Mediums wurde als zweiter Kalibrationspunkt zur Ermittlung der Elektrodensteigung herangezogen. Die molare Konzentration an Sauerstoff in diesem äquilibrierten, gesättigten Medium wurde mittels eines weiteren Sauerstoffmesssystems (WTW) bestimmt und betrug übereinstimmend mit [93]  $0,22 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $7,04 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Die Ermittlung der Flussrate pro Versuchspunkt erfolgte durch Auffangen von Probevolumen über eine Zeit von 10min, jeweils für den Referenzwert und den Kammerwert. Gewicht und Dichte der Proben wurden bestimmt, unter Einbeziehung der Messzeit der Fluss in  $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$  ermittelt und für die Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate verwendet.

### **3.5.5.3 Durchführung Perfusionen**

Alle Teile des Perfusionsrespirometers wurden im Autoklav unter Standardbedingungen ( $121^\circ C$ , 1bar, 20min) sterilisiert. Tags zuvor wurde ein adäquates Medienvolumen in den Brutschrank überführt, sodass für die Perfusion ein auf 5%  $CO_2$  äquilibriertes Medium vorlag. Vor dem Zusammensetzen des Kapillarsystems sowie der Perfusionskammer wurde das Gehäuse, in denen die Perfusionen durchgeführt wurden, auf  $37^\circ C$  temperiert und wie in 3.5.5.2 beschrieben, der Nullpunkt der Elektronik justiert. Nach Bestimmung der Zellzahl durch Methode 3.2.2.6 wurden unter der sterilen Arbeitsbank mit Zellen kultivierte Deckgläser in die Perfusionskammer eingebracht und diese anschließend zusammengesetzt. Die Kammer und das Kapillarsystem wurden mit äquilibriertem Medium luftblasenfrei vorsichtig befüllt, daraufhin miteinander und der Glasspritze verbunden, abschließend in das Perfusionsgehäuse eingebracht und die Perfusion gestartet.

### **3.5.5.4 Ermittlung der Basisatmung**

Für eine Ermittlung der Basisatmung der primären, humanen Epithelzellen erfolgten Perfusionen unter Normbedingungen, ohne Zugabe von Entkopplern oder spezifischen

Inhibitoren mit gesättigtem Medium. Da eine Abhängigkeit der Atmung von der Zelldichte zu erwarten war [92], wurden die Werte gegen die Zelldichte aufgetragen.

Die Ermittlung der Basisatmung aus den Rohdaten ist exemplarisch auf Seite 68 dargestellt.

### **3.5.5.5 *Transportabhängiger Sauerstoffbedarf & Atmungskapazität***

Messungen der transportabhängigen Atmung und die Ermittlung der maximalen Atmungskapazität von hPTC und hDTC wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Schade M. [94] durchgeführt. Hierbei wurden Zellen mit 50µM Ouabain respektive mit Na<sup>+</sup>-freiem Medium perfundiert. In beiden Fällen werden hierbei die basale Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und somit alle von dieser angetriebenen Transportprozesse gehemmt. Dies geschieht einerseits durch die, von Ouabain spezifisch blockierten, extrazellulären K<sup>+</sup>-Bindungsstellen, andererseits durch einen Mangel an den, für den Aufbau eines Konzentrationsgradienten und die damit gekoppelten Transportprozesse elementaren Na<sup>+</sup>-Ionen. Das hierdurch verringerte, intrazelluläre ADP/ATP-Verhältnis sorgt für einen dem Energiebedarf der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase proportionalen Rückgang der mitochondriellen Atmung und somit zu einem reduzierten Bedarf an Sauerstoff.

Die Ermittlung der maximalen Atmungskapazität erfolgte durch Entkoppeln der Atmungskette der Mitochondrien mittels des Entkopplers CCCP (5µM). Dieser wird im Intermembranraum der Mitochondrien von den, durch die Atmungskette gepumpten, Protonen protoniert und kann in diesem Zustand als Ionophor die innere Mitochondrienmembran in die Matrix hinein passieren. Die Folge ist ein Zusammenbrechen des Membranpotentials, eine dadurch inaktivierte ATP-Synthase und in der Konsequenz eine drastische Erhöhung des ADP/ATP Verhältnisses. Die somit außer Kraft gesetzten Rückkopplungsmechanismen versetzten die Atmungskette in einen „entkoppelten“ Status, der eine maximale Aktivität dieser zur Folge hat.

### **3.5.5.6 *Sauerstoffaufnahme in Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung***

Die Kenntnis der Atmungsaktivität in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung spiegelt ein sauerstoffabhängiges Leistungsprofil der Zellen wider und ist somit ein wichtiger Parameter für die Auslegung der Perfusionsgeschwindigkeiten BTKs. Hierfür wurden Messungen im Sauerstoffrespirometer durchgeführt, bei denen die Sauerstoffsättigung des zuvor über Nacht im Brutschrank äquilibrierten Mediums mittels N<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> aktiv eingestellt wurde. Dabei wurde das Medium in ein steriles Glasgefäß eingebracht und eine

Sauerstoff- und pH-Elektrode in das Medium eingeführt. Durch eine Glasfritte wurde nun N<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> so in das Medium geblasen, dass sich ein verminderter pO<sub>2</sub>-Wert bei gleichbleibendem pH einstellte. Maximal konnten vier Versuchspunkte (vier Spritzen) inklusive der normgesättigten Atmung pro Tag ermittelt werden. Die nach Formel 4 bestimmten Sauerstoffverbrauchswerte wurden auf die normgesättigte Aufnahme (1. Messpunkt) normalisiert, um Einflüsse der individuellen Perfusion wie Zelldichte und Passage zu eliminieren.

Aus den so erhaltenen Werten wurden, anhand der Michaelis-Menten-Kinetik in Formel 5, jeweils für proximale und distale TECs über numerische Regression die Werte der Sauerstoffsättigung des relativen, halbmaximalen (pO<sub>2(50)</sub>) sowie des theoretischen, maximalen relativen Sauerstoffbedarfs (max. OUR<sub>rel</sub>) ermittelt.

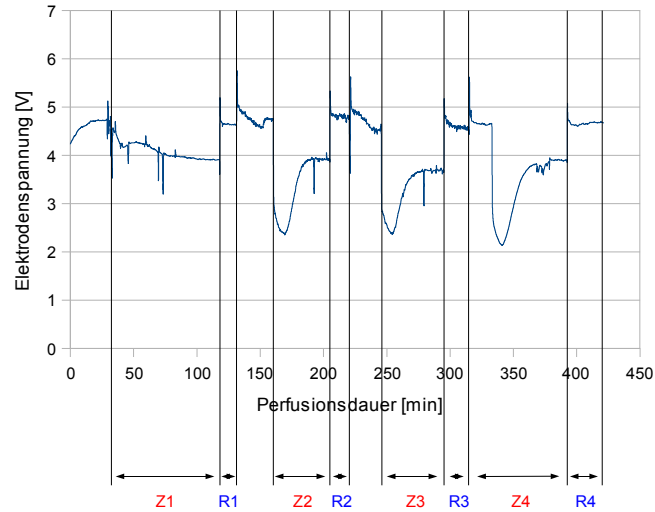
Auf Seite 69 ist die Methodik exemplarisch dargestellt.

$$v = \frac{(v_{max} \cdot [S])}{(K_m + [S])} \quad \text{Formel (5)}$$

*Tabelle 3.6: Adaptierte Michaelis-Menten-Parameter*

<b>MM-Parameter</b>	<b>Sauerstoffbedarfsparameter</b>	<b>Beschreibung</b>
v	OUR <sub>rel</sub>	relativer Sauerstoffbedarf (normiert auf OUR <sub>(pO<sub>2</sub>=100%)</sub> )
v <sub>max</sub>	max. OUR <sub>rel</sub>	theoretischer, maximaler, relativer Sauerstoffbedarf
S	pO <sub>2</sub>	Sauerstoffkonzentration
K <sub>M</sub>	pO <sub>2(50)</sub>	Sauerstoffkonzentration bei der OUR <sub>rel</sub> =0,5 max OUR <sub>rel</sub>

### Ermittlung der Basisatmung



$$\bar{O\ddot{U}R} = 6,43 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mmol}}{(\text{h} \cdot 10^6 \text{ Zellen})} \pm 5,7\%$$

$$N_{\text{Zellen}} = 3,34\text{E}+005$$

Abbildung 10: Exemplarischer Rohdatenverlauf einer Perfusion zur Bestimmung der Basisatmung

Tabelle 3.7: Ermittelte Sauerstoffaufnahmen aus Rohdaten I

Messpunkt	Flow	Messbereich	$U_{\text{Ref}} [V]$	$U_{\text{Kammer}} [V]$	$pO_2$ Referenz	$pO_2$ Kammer	OUR [ $\text{mmol h}^{-1} \cdot 10^6 \text{ Zellen}$ ]
1	5,58	100	4,7	3,9	97,9%	81,3%	6,13E-004
2	5,44	100	4,8	3,9	100,00%	81,3%	6,72E-004
3	5,48	100	4,6	3,7	95,8%	77,1%	6,77E-004
4	5,53	100	4,7	3,9	97,9%	81,2%	6,10E-004

## Ermittlung der Abhängigkeit des Sauerstoffbedarfs von der Sauerstoffsättigung

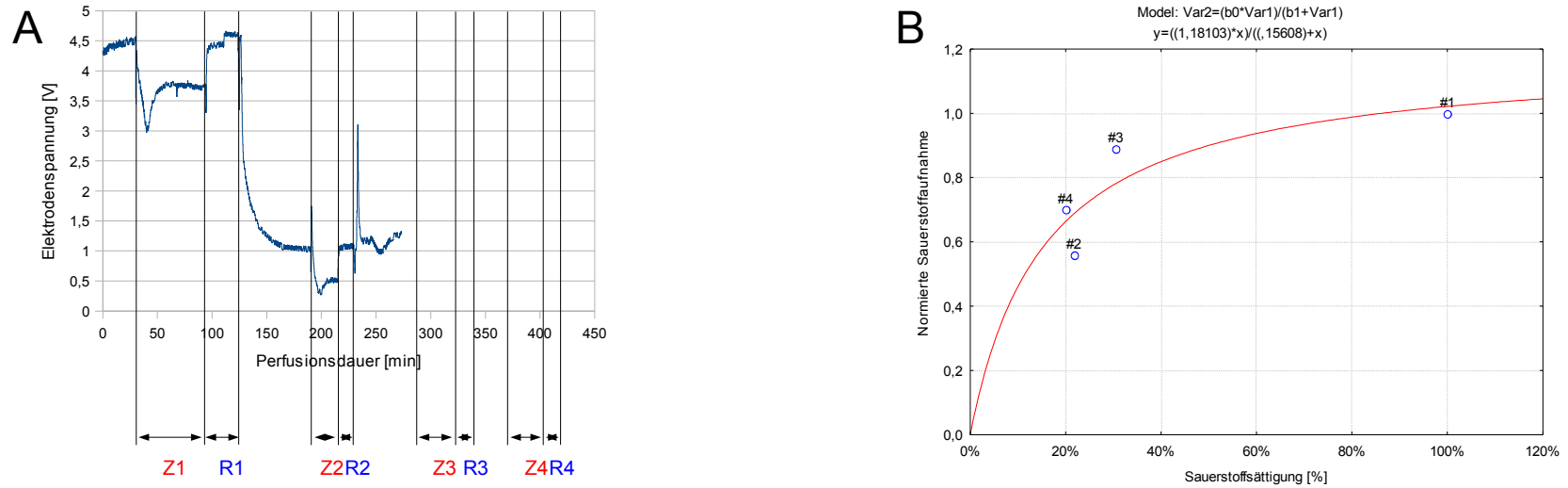


Abbildung 11: (A) Rohdaten "Ermittlung der Zellatmung in Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung" und (B) Anpassung auf Michaelis-Menten-Kinetik

Tabelle 3.8: Ermittelte Sauerstoffaufnahmen aus Rohdaten II

Messpunkt	Flow	Messbereich	$U_{Ref}$ [V]	$U_{Kammer}$ [V]	$pO_2$ Referenz	$pO_2$ Kammer	OUR [ $mmol \cdot h^{-1} \cdot 10^6$ Zellen]	normiert
1	5,7	100	4,6	3,7	100%	80,4%	6,846E-004	1
2	5,78	100	1,0	0,5	22,7%	10,9%	3,857E-004	0,56
3	5,73	100	1,4	0,6	30,4%	13%	6,117E-004	0,89
4	5,86	200	2,7	1,5	20,%	6,6%	4,817E-004	0,70

### 3.6 Medienoptimierung

Für eine reproduzierbare Qualität in Hinsicht auf Proliferation und Differenzierung der primären, humanen TECs wurde die Verwendung eines serumfreien Mediums bzw. eines Mediums mit stark reduziertem Serumgehalt angestrebt. Weitere Gründe für die Verwendung eines solchen Mediums lagen in den hohen Basiskonzentrationen von TGF- $\beta$ 1 durch die Supplementierung von FCS, wie in Kapitel 4.3.1 gezeigt wird, als auch in den Bestrebungen hin zu einer, für den klinischen Einsatz nötigen, definierten Zusammensetzung des Kulturmediums. Als Basismedium wurde die, von der Firma Invitrogen erhältliche, serumfreie Medienformulierung "SFK - Keratinozyten Medium" mit den Supplementen BPE (= **B**ovine **P**ituitary **E**xtract "Rinderhypophysenextrakt" und EGF) verwendet. Um die Effektivität des EGFs und die Notwendigkeit weiterer Supplemente zu testen wurde ein statistischer, randomisierter  $2^{6-2}$  Versuchsplan des Lösungstyps IV entwickelt. Mit diesem sollte ermittelt werden, welche der Supplemente EGF, HGF, IGF1,  $\text{Ca}^{2+}$ , FCS und Ouabain einen signifikant positiven Effekt auf die Proliferation und Differenzierung der primären, humanen TECs zeigen. Die verwendete Medienformulierung von Invitrogen enthält standardmäßig nur eine Konzentration von ca.  $0,09 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ . Somit konnte auch  $\text{Ca}^{2+}$  als Parameter mit in den Versuchsplan aufgenommen werden, um zu untersuchen, ob eine erniedrigte Konzentration die Proliferationsphase der Gesamtpopulation verlängert. Tabelle 3.9 gibt Aufschluss über die verschiedenen Versuchspunkte des Versuchsplanes und die untersuchten Antwortgrößen (unterstrichen). Die 16 Versuchskombinationen wurden, ergänzt durch 2 Zentralpunkte (0,5x alle Supplemente), 3 zusätzliche Kontrollmedien, einmal repliziert. (n=42)

Für die Gewährleistung einer vergleichbaren Durchführbarkeit und um den durch die Primärzellen gegebenen Limitationen gerecht zu werden, wurde ein Box-Hunter,  $2^{6-2}$  Versuchsplan des Typs IV gewählt. Mit diesem lassen sich Haupteffekte getrennt von den bereits vermengten Wechselwirkungen der verwendeten Supplemente ermitteln. Die hierdurch bedingten Vermengungen der HE mit FWE höherer Ordnung sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Die Aussaat der Zellen (hPTC P5;  $93 \text{ mm}^{-2}$ ) erfolgte für eine gleichmäßige Adhäsion aller Versuchspunkte in SFK+BPE+ $\text{Ca}^{2+}$ . Dieses Adhäsionsmedium wurde nach 2h durch das jeweilige Testmedium ersetzt.

Tabelle 3.9: DOE Faktoren, Kontrollen und Antwortgrößen

<b>Faktoren</b>	<b>Konz</b>
(1) EGF	20ng ml <sup>-1</sup>
(2) HGF	20ng ml <sup>-1</sup>
(3) IGF1	10ng ml <sup>-1</sup>
(4) Ca <sup>2+</sup>	1,2mmol l <sup>-1</sup>
(5) Ouabain	5nM
(6) FCS	1% (v/v)
<i>K1</i>	<i>M199+5%FCS</i>
<i>K2</i>	<i>SFM+BPE+EGF-Ca<sup>2+</sup></i>
<i>K3</i>	<i>SFM+BPE+EGF+Ca<sup>2+</sup>+3%FCS</i>
<u><i>Td</i></u>	<u><i>Verdopplungszeit</i></u>
<u><i>Dmax</i></u>	<u><i>Zelldichte</i></u>
<u><i>Verteilung</i></u>	<u><i>Verteilung der Zellen</i></u> <u><i>(mikroskopisch beurteilt; Schulnoten 1-6)</i></u>
<u><i>Morphologie</i></u>	<u><i>Morphologie der Zellen</i></u> <u><i>(mikroskopisch beurteilt; Schulnoten 1-6)</i></u>
<u><i>Allgemein</i></u>	<u><i>Allgemeiner Zustand der Zellen</i></u> <u><i>(mikroskopisch beurteilt; Schulnoten 1-6)</i></u>

Tabelle 3.10: Vermengungen der 2fach Wechselwirkungen des Versuchsplans

	<b>Vermengt 1</b>	<b>Vermengt 2</b>
1x2	3x5	-
1x3	2x5	-
1x4	5x6	-
1x5	2x3	4x6
1x6	4x5	-
2x4	3x6	-
2x6	3x4	-

Insgesamt wurden 6x24 Wellplatten für 3 Versuchsabbrüche (4, 8 & 14 Tage) angesetzt und je Versuchsabbruch bei zwei zufällig ausgewählten Platten (Replik A&B) die Zellen mit Trypsin abgelöst, die Zellzahl und hierüber die Verdopplungszeit bestimmt. Weiterhin wurde die Morphologie, Verteilung und der optische Allgemeinzustand der Zellen mikroskopisch beurteilt und mit Schulnoten von 1 - 6 bewertet.



## 4 Ergebnisse

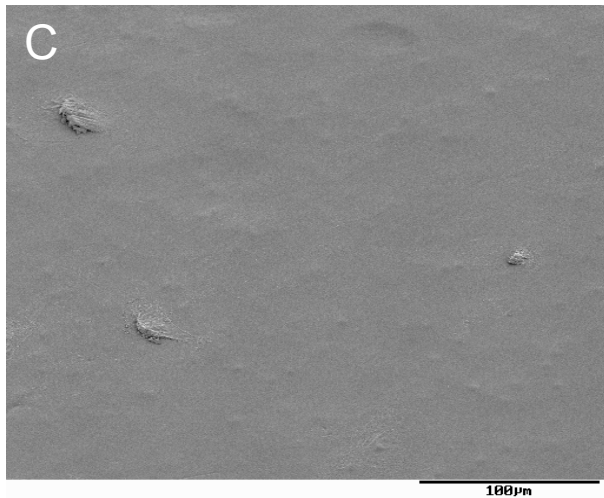
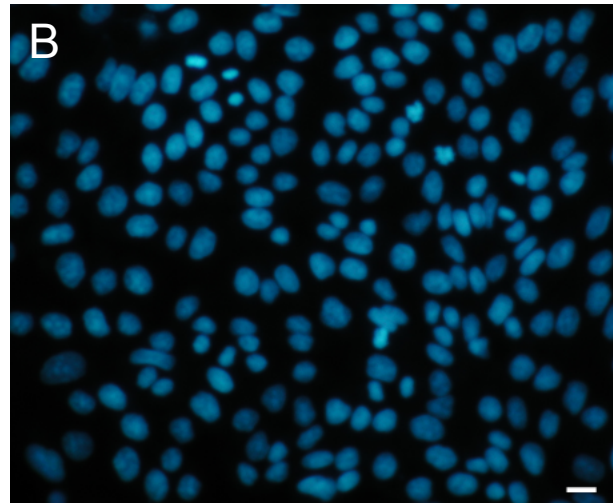
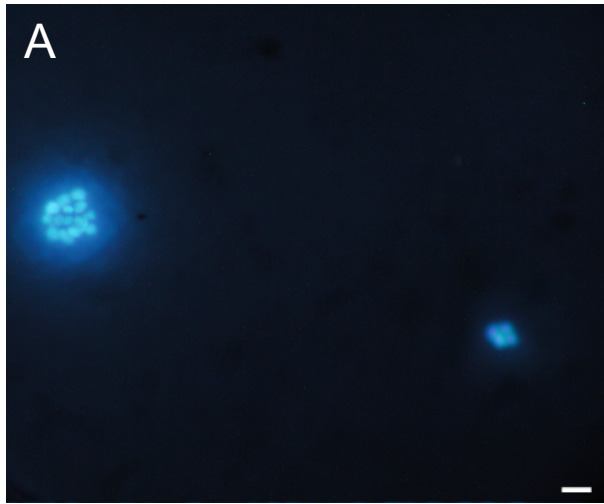
### 4.1 Membranscreening

Von Gambro aus verschiedenen Rezepturen hergestellte Membranen, wurden qualitativ auf deren adhäsions-, proliferations- und differenzierungsfördernde Eigenschaften mit verschiedenen Nierenepithelzelltypen getestet. Ziel war es hierbei, Membranen zu finden, die ohne vorhergehende Aktivierung der Oberfläche durch biologische Komponenten wie EZM oder Serum, allein aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Oberflächeneigenschaften den Zellen ein adäquates Substrat boten. Dazu wurden Zellen auf Membranproben (3.2.1.1) oder Inserts (3.2.1.2) kultiviert und anschließend je nach folgender mikroskopischer Methode entsprechend fixiert. Aufgrund der optischen Eigenschaften der Membranen erfolgte größtenteils eine Methanol-Eisessig-Fixierung (3.4.1.4) mit anschließender Hoechst33528 Kernfärbung (3.4.2.4) für eine Betrachtung der Proben mittels Fluoreszenzmikroskop.

Eine qualitative Einschätzung des Differenzierungsstatus anhand epithelialer Morphologien wurde über REM-Untersuchungen nach Karnovski-Fixierung (3.4.1.1) und entsprechender Probenvorbereitung, wie in 3.4.2.2 beschrieben, durchgeführt.

#### 4.1.1 Unmodifizierte Standardmembran

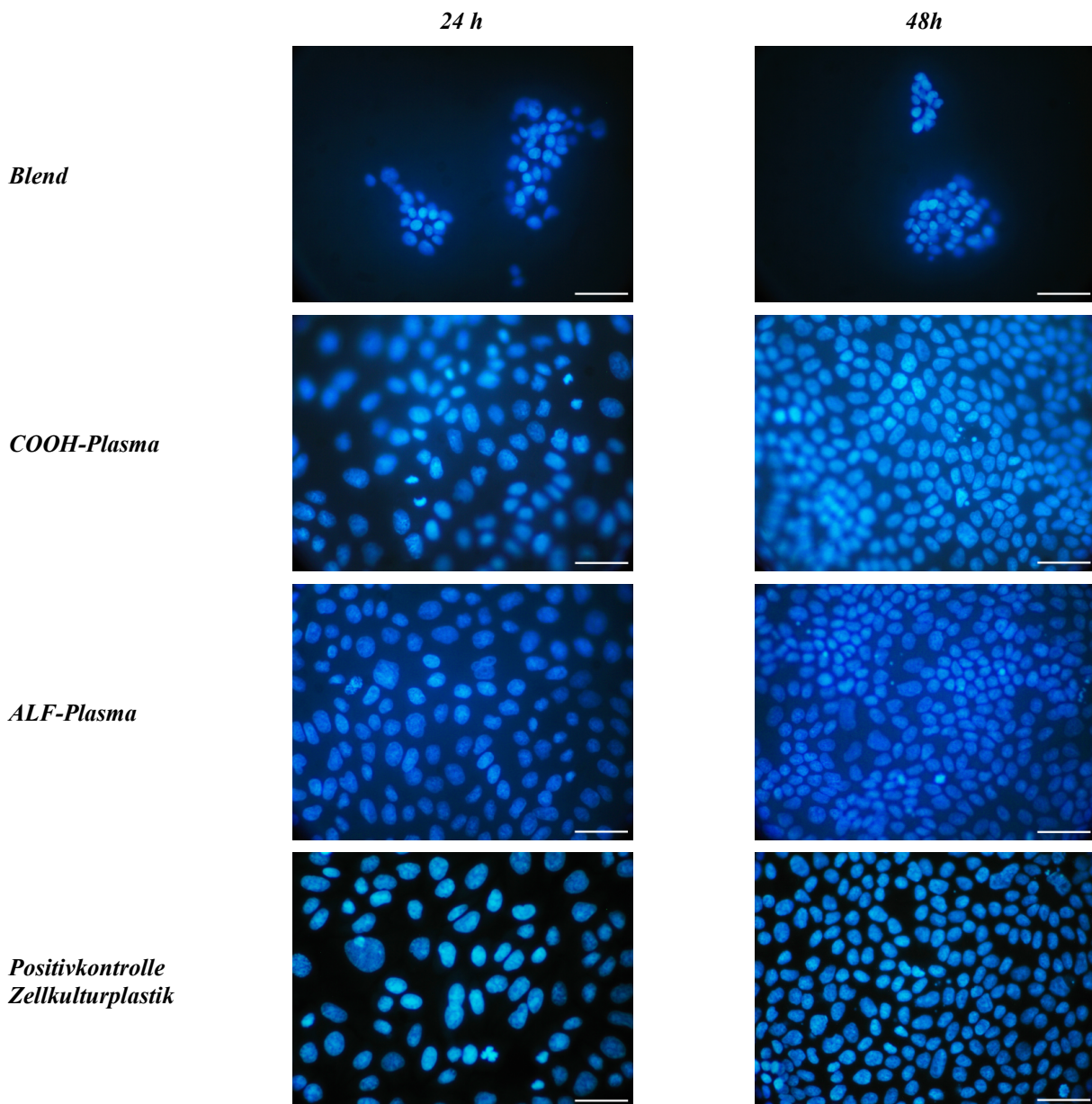
Ausgangspunkt der Membranuntersuchungen war die Gambro "Polyflux™" Membran, einem PES-Blend aus Polyamid, Polyarylethersulfon (PES) und Polyvinylpyrrolidon (PVP). Diese Membran wurde für minimale Komplementaktivierung und Mikroinflammationen durch möglichst geringe Blutproteininteraktion entwickelt. Somit war zu erwarten, dass hier äußerst schlechte Eigenschaften für eine Kultivierung von Zellen vorlagen. (Abb. 12A&C).



**Abbildung 12:** Kernfärbung von MDCK Zellen nach 24h Kultur auf unmodifizierter Standardmembran (A) und Kontrolle Zellkulturpetrischale (B) (Maßstab 20 $\mu$ m). (C) REM von MDCK-Zellen nach 96h auf Standardmembran.

#### 4.1.2 Blend- und Plasmamodifikationen an PVP – PES Membranen

Gambro verfolgte für die Gewährleistung der Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen auf PES/PVP-Membranen zwei verschiedene Strategien der Membranfunktionalisierung. Einerseits durch das Variieren der Polymerrezeptur bei der Herstellung der Membranen (Blending), andererseits durch das asymmetrische, intraluminale Aktivieren der Oberfläche durch Aufbringen von polaren Gruppen (COOH, NH<sub>2</sub>) unter Energieeinwirkung (Plasmabehandlung). Abbildung 13 zeigt die repräsentativen Ergebnisse von Screening-Versuchen durchgeführt mit MDCK Zellen auf Membranen mit Blend- sowie Modifikationen der Oberfläche durch Plasma-Behandlung. Diese Ergebnisse konnten mit Primärzellen bestätigt werden, wie in den REM Aufnahmen (Abb. 15) gezeigt.



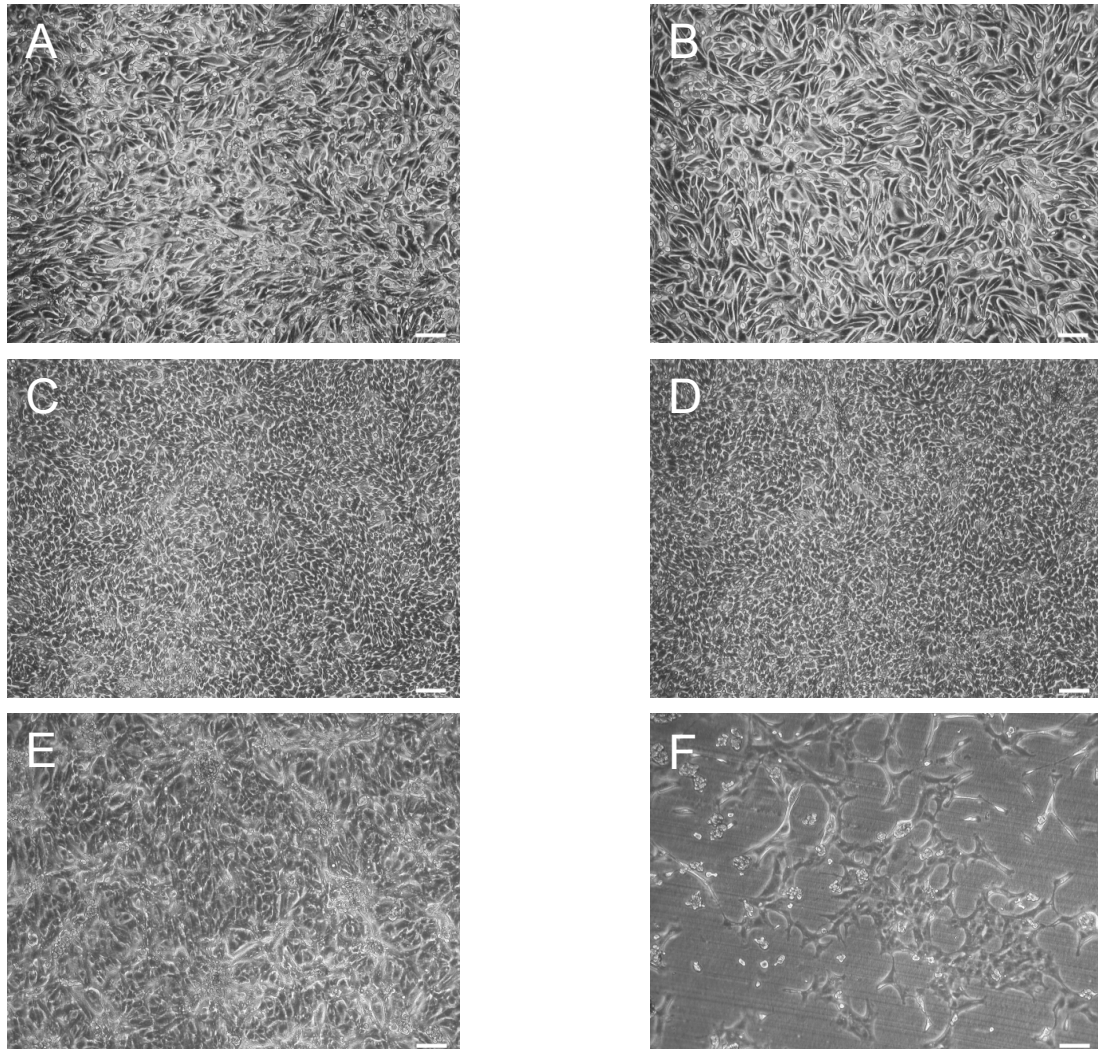
**Abbildung 13:** Kernfärbung von MDCK Zellen nach unterschiedlicher Kulturdauer auf verschiedenen Oberflächen. (Maßstab 40µm)

Die aus Abbildung 13 hervorgehenden, schlechten Ergebnisse der Blendmodifikation ergaben sich für alle weiteren getesteten Blendmodifikationen und werden hier repräsentativ für diese dargestellt.

#### 4.1.3 PEI-PAN Membranen

Die guten Ergebnisse der plasmamodifizierten Membranen bezüglich Adhäsion und Proliferation, konnten ebenfalls an transparenten, Polyethylenimine (PEI) beschichteten Membranen aus Polyacrylnitril-Methallylsulfonate Kopolymeren (PAN) gezeigt werden

(Abb. 14). Durch die optischen Eigenschaften dieses Materials waren hier phasenkontrastmikroskopische Betrachtungen während der Kultivierung sowie nach Glutardialdehyd-Fixierung (3.4.1.2) möglich.



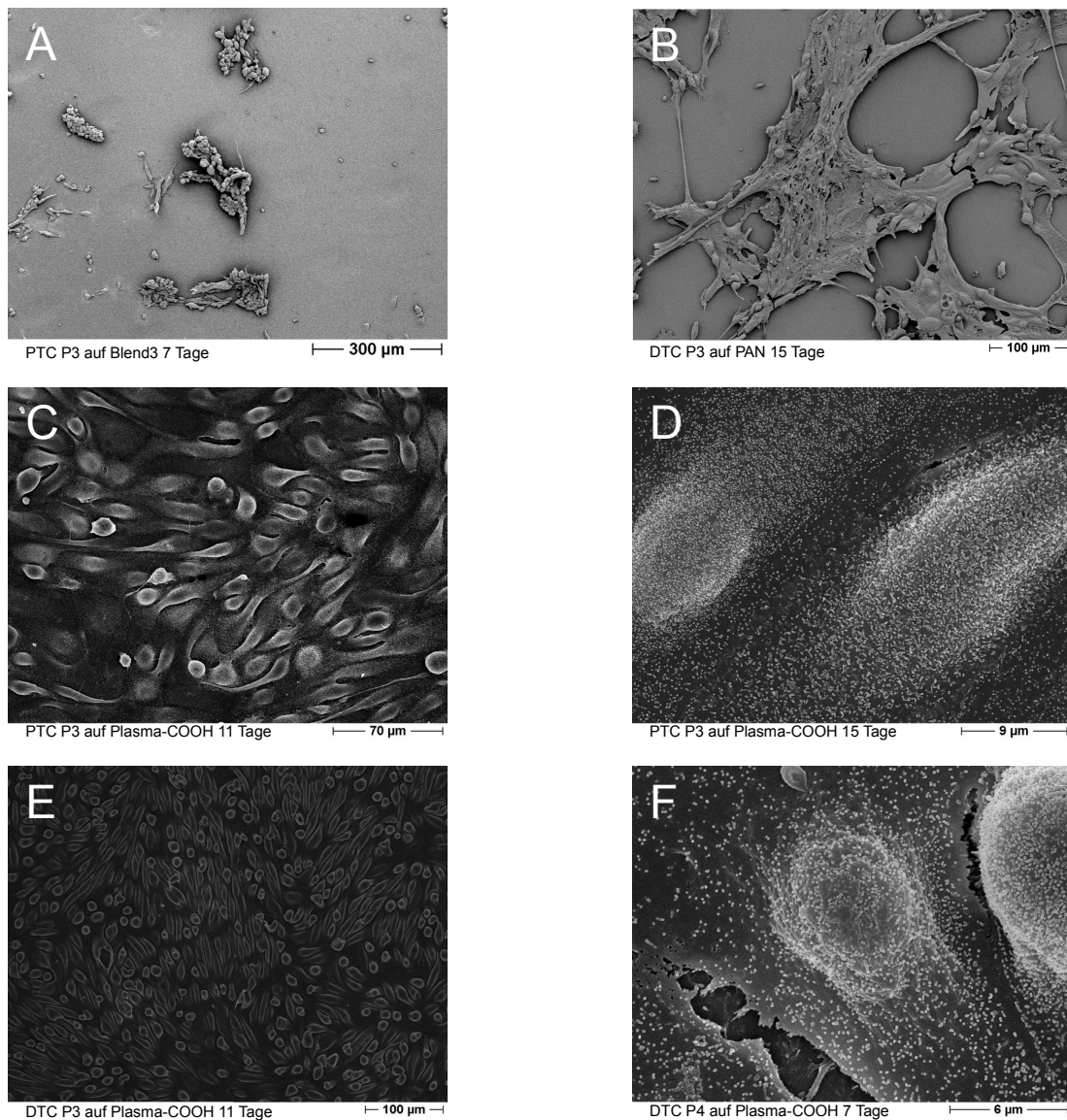
**Abbildung 14:** Phasenkontrastaufnahmen verschiedener Fraktionen primärer, humaner Nierentubulusepithelzellen, hPTC (A), hDTC (B), hPNeg (C) und hDNeg (D) alle Passage 2 nach 14 Tagen auf PEI beschichteten PAN-Membranen. Die Notwendigkeit der PEI Beschichtung zeiggt an PTC P5 nach 14 Tagen geht aus (E) und (F) hervor. Auf der unbeschichteten PAN Membran (F) kommt es zu mangelhaftem Wachstum im Vergleich zur PAN-PEI Kontrolle (E). Auffällig sind die um einiges dichteren und durch kleinere Zellen charakterisierten Negativfraktionen in (C) und (D). (Maßstab 100µm)

#### 4.1.4 Epitheliale Feinstrukturen auf Membranen

Um den Status der Zellen auf den verschiedenen Membrantypen besser beurteilen zu können, wurden REM Untersuchungen von Membrankulturen durchgeführt. Dazu wurden definierte Zellzahlen auf Membranproben aufgebracht und die Kulturen zu

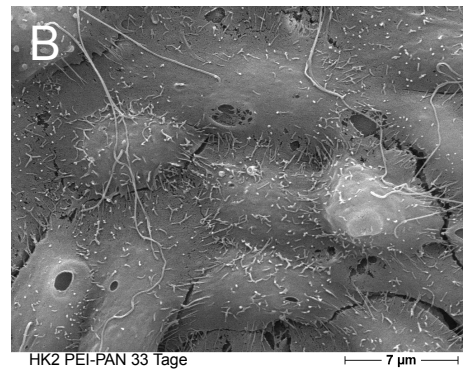
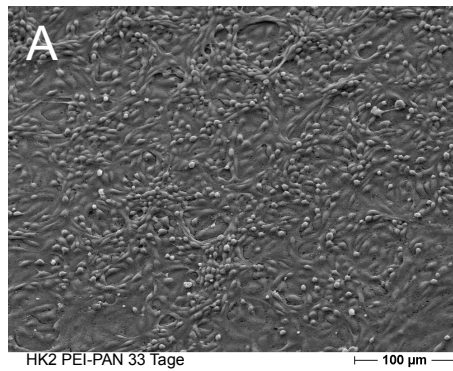


unterschiedlichen Zeiten durch Fixierung abgebrochen. Im Vordergrund dieser Untersuchungen stand der Einfluss der Membranmaterialien (Blend, Plasma, PAN, PEI-PAN) auf die Ausbildung epitheltypischer, morphologischer Merkmale der Zellen auf verschiedenen den Membranproben.

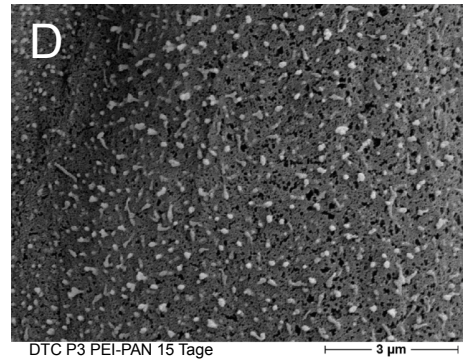
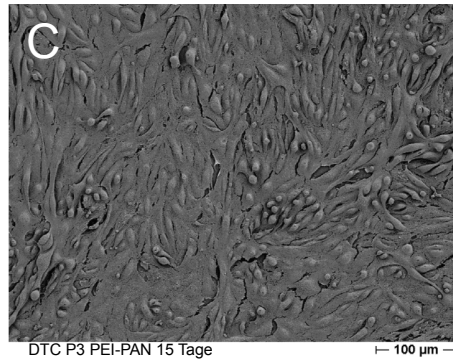


**Abbildung 15:** REM Aufnahmen verschiedener Nierentubulusepithelzellen auf unterschiedlichen Membranen. Auf COOH-Plasma funktionalisierten Membranen (C-F) proliferieren die Zellen zu gewünschten Monolayern und bilden apikale Mikrovilli. Auf Blend (A) und PAN (ohne PEI Beschichtung) (B) zeigen die Zellen kaum Wachstum und neigen zu Clusterbildungen.

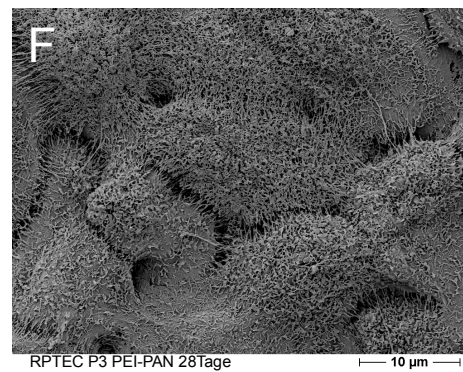
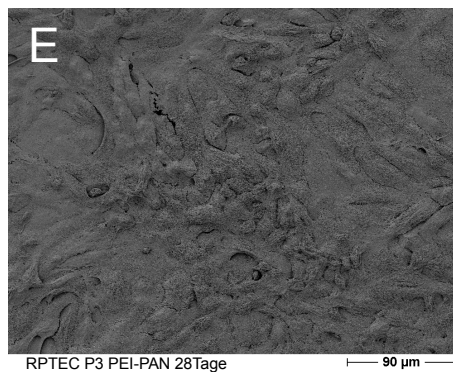
Zelllinie HK2



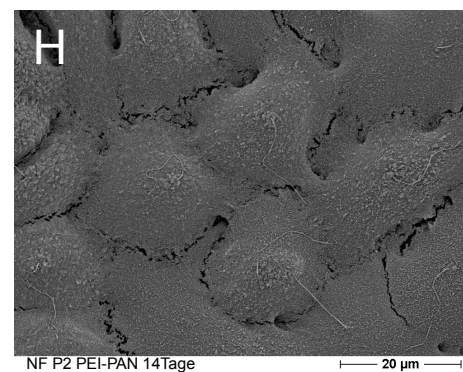
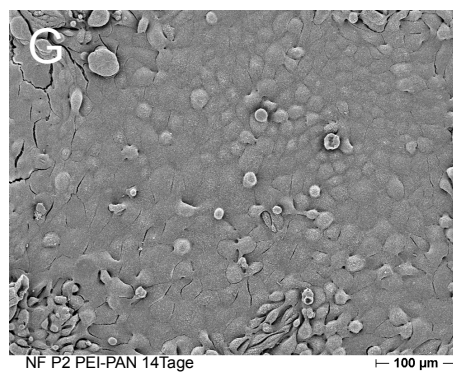
Isolierte,  
primäre hDTC



Kommerzielle,  
primäre,  
humane RPTEC



Isolierte  
primäre hNF

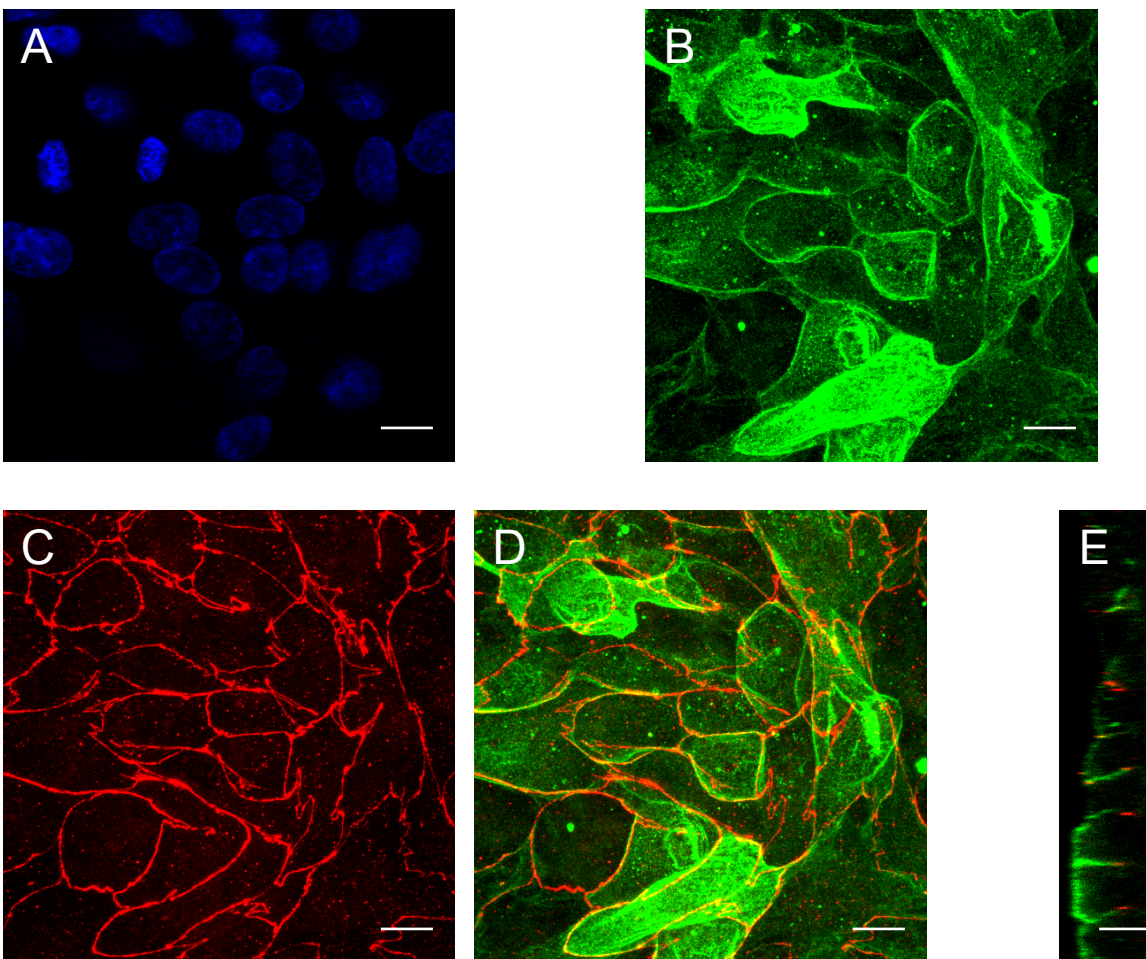


**Abbildung 16:** REM Aufnahmen verschiedener humaner Nierentubulusepithelzellen auf PEI funktionalisierten PAN Membranen. Zellen proliferieren zu konfluenten Monolayern (A,C,E,G) und zeigen typische Differenzierungsmerkmale wie Mikrovilli und Einzelzilien. Die Primärzellen in E-H wurden hierbei in dem in 4.4 entwickelten serumarmen Medium kultiviert.



#### 4.1.5 Immunofluoreszenz spezifischer Marker auf PEI-PAN Inserts

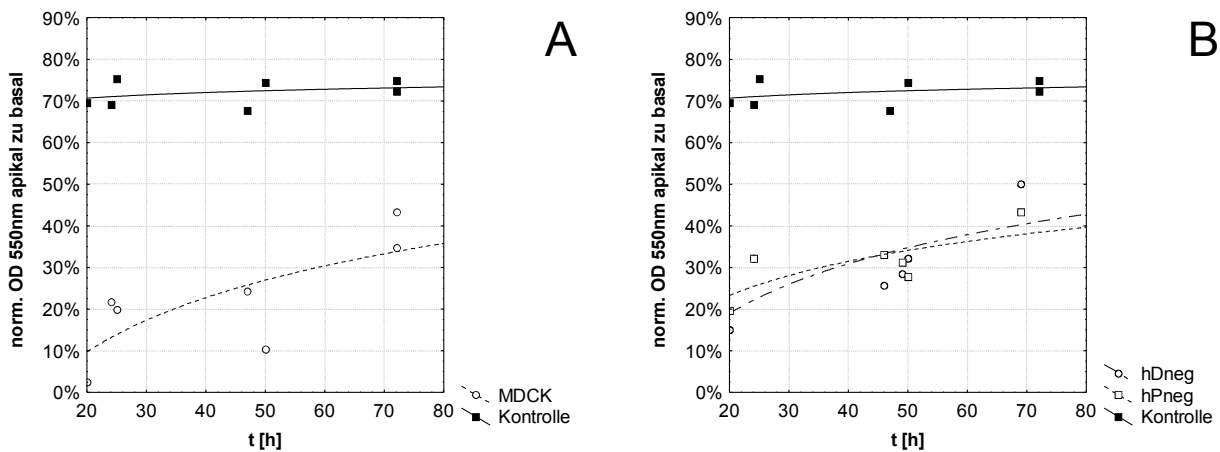
Ein weiterer Nachweis der gewünschten Differenzierung auf PEI-PAN Flachmembranen wurde mittels Immunfluoreszenztechniken nach Methanolfixierung und Visualisierung durch die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) geführt. Abbildung 17 zeigt die Expression von ZO1 und AQP1 in RPTEC P3 Zellen nach 28 Tagen auf PEI-PAN-Inserts. Der membranständige Wasserkanal AQP1 lokalisiert ebenso wie das TJ-assoziierte Protein ZO1 in für Epithelzellen des PT erwarteten Regionen: AQP1 in der apikalen- sowie basolateralen Membran, ZO1 nahe den Zellgrenzen in einem schmalen Bereich der apikalen Membran (Abb. 17E).



**Abbildung 17:** Primäre RPTEC P3 nach 28 Tagen auf PEI-PAN Flachmembranen; Immunfluoreszenzfärbungen visualisiert via CLSM. (A) Kernfärbung DAPI (blau), (B) All-Max-Projektion AQP1 (grün), (C) All-Max-Projektion ZO1 (rot), (D) Überlagerung von C&D (E) Y/Z-Schnitt von D. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im 4.4 optimierten Medium. (Maßstab 10µm)

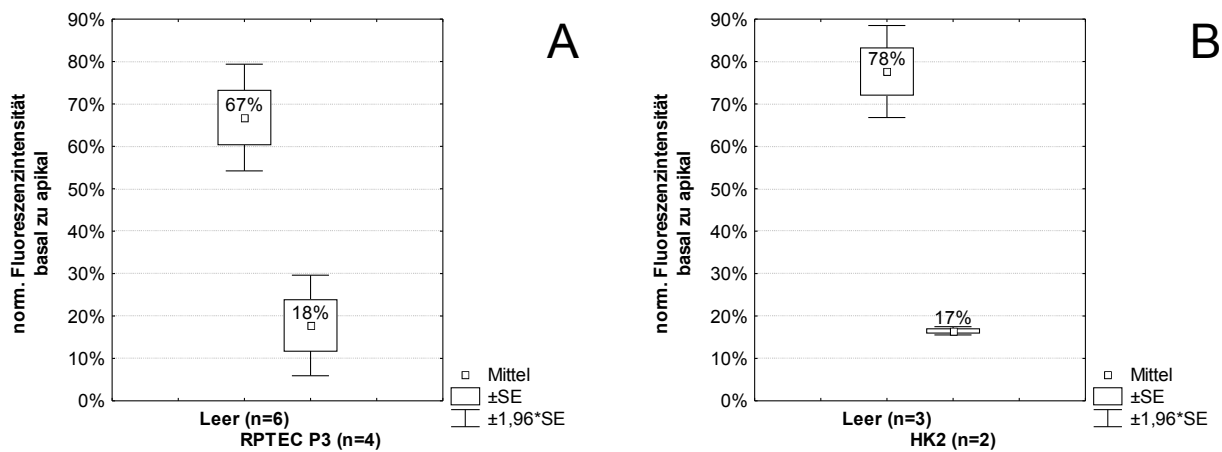
#### 4.1.6 Monolayerdichtigkeit auf PEI-PAN Inserts

Die Ermittlung der Monolayerdichtigkeit erfolgte über die in 3.2.2.10 beschriebenen Methoden. Abbildung 18 zeigt den zeitlichen Verlauf des Phenolrotübertritts in das apikale Kompartiment von gewippten Kulturen. Die Dichtigkeit humaner, primärer bzw. permanenter, proximaler Tubuluszellen gegenüber FITC-Inulin im Vergleich zu unbesiedelten Inserts nach ca. 20h gewippter Inkubation sind in Abbildung 19 dargestellt. Es zeigt sich eine vergleichbare Phenolrot- bzw. FITC-Inulinresistenz der Monolayer zwischen Zelllinien (MDCK, HK2) und primären Zellen. Der weiterhin in den Abbildungen ersichtliche Übertritt des Markerfarbstoffs lässt sich durch herstellungsbedingte, unbesiedelte Randbereiche der Inserts erklären.



**Abbildung 18:** Dichtigkeit der Monolayer gegenüber Phenolrot ( $n=2$ ) aus dem basalen Medium von **(A)** MDCK Zellen und **(B)** hDNeg und hPNeg (P2) nach 14 Tagen Kultur. Aufgetragen ist die Extinktion bei 550nm der apikalen Salzlösung (HBSS+Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup>) bezogen auf die des basalen Mediums (M199+10%FCS) nach  $t$  Stunden Kultur. Als Kontrolle dienten leere Inserts ohne Zellen.





**Abbildung 19:** Dichtigkeit der Monolayer auf PEI-PAN Membranen. (A) Basaler Inulindurchtritt über 18h bei RPTEC P3 nach 14Tagen Kultur und HK2 Zellen (B) über 21h nach 19Tagen.

#### 4.1.7 Zusammenfassung der Membranversuche

Tabelle 4.1: Zusammenfassung des Membranscreenings

Membran / Modifikation	Ergebnis
Standard Low Flux	keine bzw. nur sehr geringe Adhäsion feststellbar
COOH Low Flux (Plasma) verschiedene Konzentrationen	Adhäsion, Proliferation, Monolayerbildung und gewünschte epitheliale Morphologien bei Primärzellen mikroskopisch nachgewiesen
ALF Low Flux (Plasma) verschiedene Konzentrationen	Adhäsion, Proliferation, Monolayerbildung und gewünschte epitheliale Morphologien bei Primärzellen mikroskopisch nachgewiesen
verschiedene Blind Membranen	schlechte Anheftung, Clusterbildung, mangelhaftes Wachstum
PAN-Membranen	Gute Proliferation von MDCK in [79] nachgewiesen. Hier in Kapitel 4.8.2.2 mit MDCK und in 4.8.2.3 mit HK2 in Kapillaren validiert. Schlechte Anheftung, Clusterbildung und mangelnde Proliferation bei primären, humanen Zellen.
PEI - PAN-Membranen	Adhäsion, Proliferation, Monolayerbildung und gewünschte epitheliale Morphologien mikroskopisch bei Primärzellen nachgewiesen; Monolayerdichtigkeit durch Markerfarbstoff gezeigt.

#### 4.2 Perfusionsrespirometrie

Für die Ermittlung des Sauerstoffbedarfs primärer humaner, proximaler und distaler TECs unterschiedlicher Passagen, Isolierungen und unter verschiedenen Bedingungen wurden Perfusionen in speziellen Messkammern auf Deckgläsern nach den in 3.5.5 beschriebenen Methoden durchgeführt. Zu den durch die Perfusionsrespirometrie

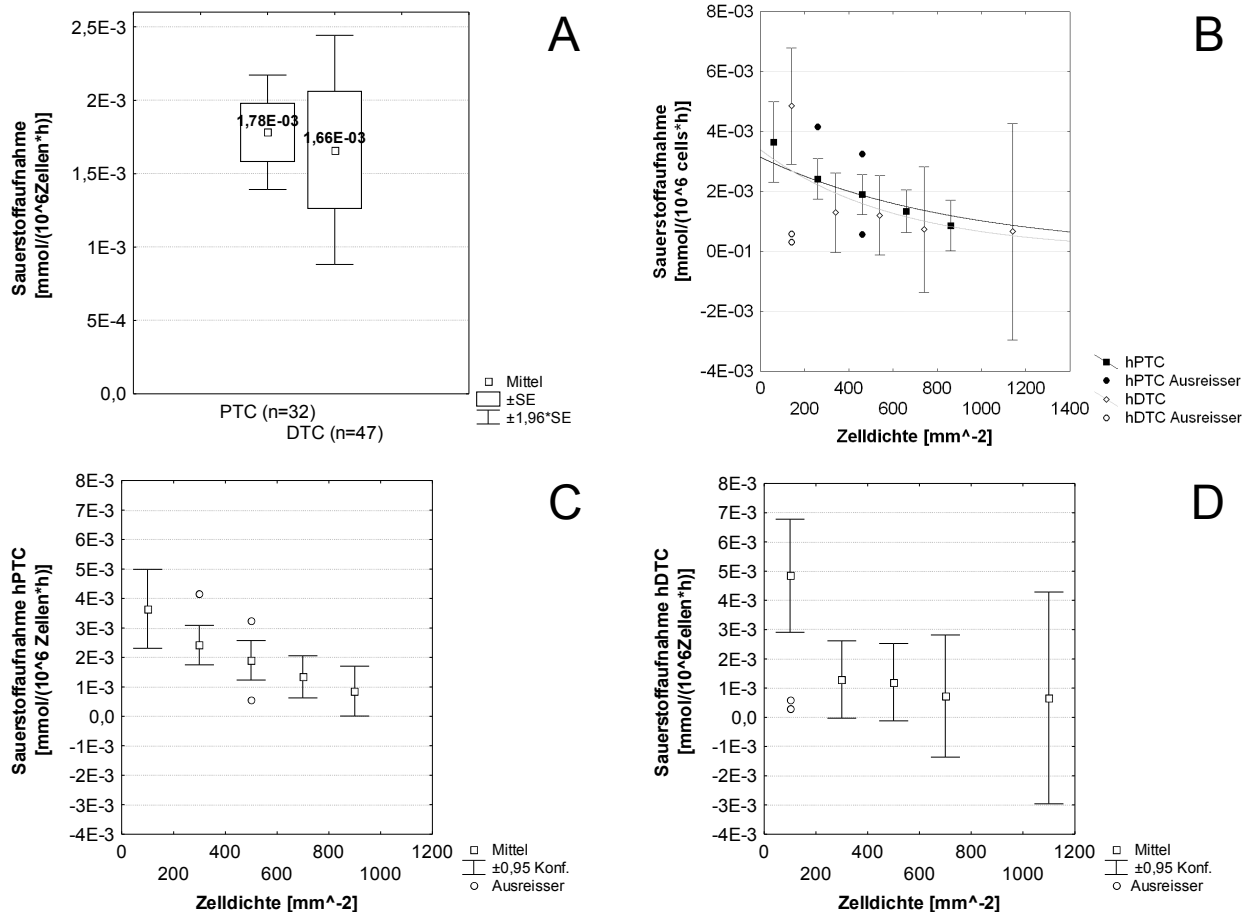
ermittelten Parametern zählen die Basisatmung, der transportabhängige Sauerstoffbedarf, die Atmungsreserve über Ouabain sowie unter Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen, die maximale Atmung über CCCP und die Abhängigkeit der Atmung vom Sauerstoffgehalt des Perfusionsmediums.

#### 4.2.1 Basisatmung

Aus den ermittelten Werten der Basisatmung von hPTC und hDTC auf Deckgläsern bei gesättigtem pO<sub>2</sub> ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen finden (Abb. 20A; T-Test zu p<5%). Es zeigt sich allerdings bei beiden Zelltypen eine signifikante Abhängigkeit (p<5%) der Atmung pro Zelle von der Zelldichte (Abb. 20B-D), jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den Zelltypen. (Abb. 20B).

*Tabelle 4.2: Basisatmung von hPTC und hDTC*

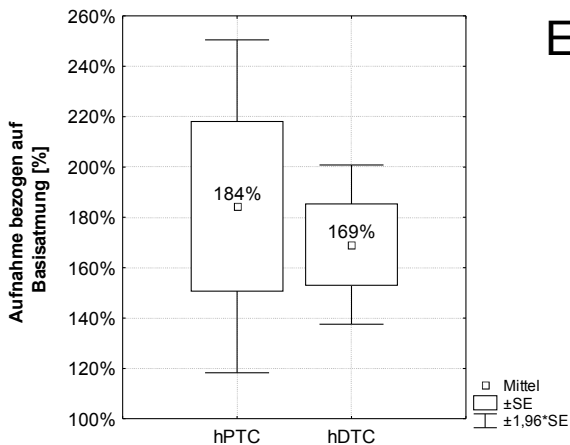
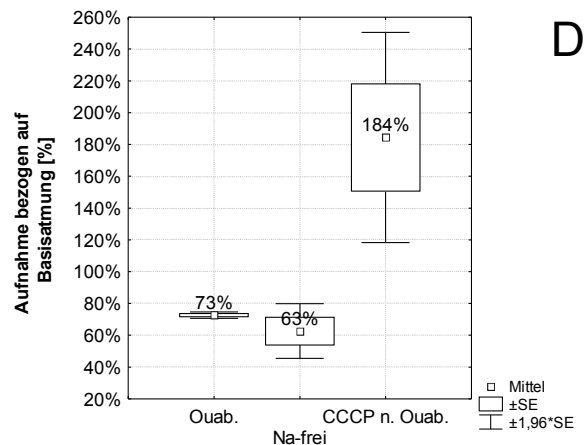
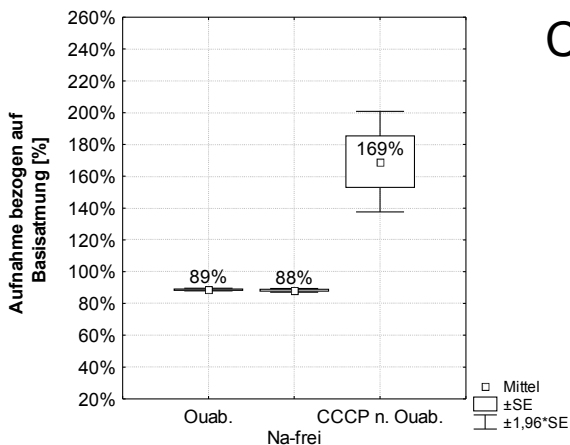
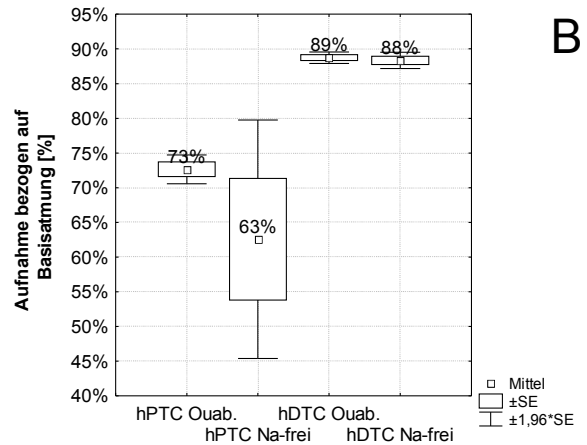
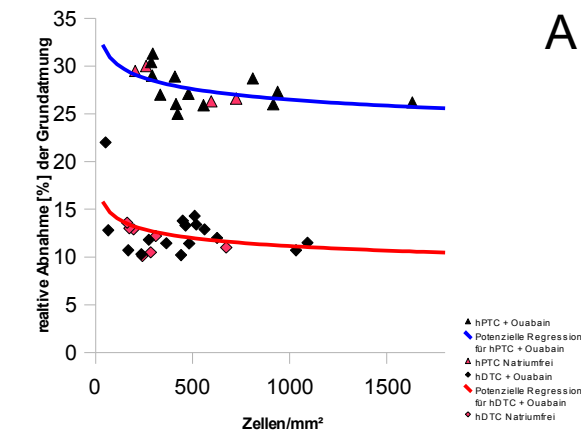
	<i>OUR gemittelt [mmol 10<sup>6</sup> Zellen h<sup>-1</sup>]</i>
hPTC (n=32)	1,78 10 <sup>-3</sup>
hDTC (n=47)	1,66 10 <sup>-3</sup>



**Abbildung 20:** Ergebnisse der Bestimmung der Basisatmung von hPTC und hDTC. Mittelwerte (A), Abhängigkeit der Atmung von der Zelldichte beider Zelltypen (B) sowie die der hPTC (C) und hDTC (D). Aufgrund der großen Abweichungen der Einzelmessungen ergeben sich bei hDTC in D extreme Schwankungen, die statistisch in theoretisch negativen Basisatmungen resultieren.

#### 4.2.2 Transportabhängiger Sauerstoffbedarf & Atmungskapazität

Die Ergebnisse der Versuchsreihen zur Ermittlung des durch den Energiebedarf der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase hervorgerufenen und damit transportabhängigen Sauerstoffbedarfs sind in Abbildung 21 zusammengefasst. Dieser liegt wie in 21A dargestellt bei hPTC mit maximal ~30% mehr als doppelt so hoch wie der der hDTC bei max. ~12%. Diese Unterschiede sind signifikant zu p<5% (Abb. 21B). Zwischen den, über die verschiedenen Inhibitionsmethoden (Ouabain sowie Na<sup>+</sup>-frei) der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP hervorgerufenen, verbleibenden Atmungsaktivitäten konnten keine Unterschiede innerhalb der Zelltypen gefunden werden (Abb. 21B-D). Weiterhin zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Zelltypen bei den ermittelten maximalen Atmungskapazitäten (Abb. 21E).



**E**

**Abbildung 21:** Relative Abnahme der Normatmung **A** bei Ouabainbehandlung / Na<sup>+</sup>-freier Perfusion in Abhängigkeit der Zelldichte nach [94], und **B** verbleibende normierte Atmungsaktivität von hPTC und hDTC nach Inhibition der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP über verschiedene Methoden. Sich einstellende normierte Atmungsaktivität von hDTC (**C**), hPTC (**D**) nach entsprechender Behandlung. **E** maximale Atmungsaktivität von hPTC sowie hDTC nach CCCP Perfusion.

### 4.2.3 Sauerstoffabhängige Atmungsaktivität

Wie aus Abbildung 22A&B ersichtlich, ließ sich eine sehr gute Michaelis-Menten-Beziehung zwischen der Sauerstoffsättigung und der normierten Sauerstoffaufnahme für hPTCs ermitteln. Der über numerische Regression ermittelte Verlauf der Aktivitätskurve korreliert gut den den Einzelmessungen. Eine ähnlich offensichtliche Korrelation lässt sich aus Abbildung 22C&D für hDTCs nicht erkennen. Zwar liefert die numerische Regression auch hier zu P<5% signifikante Michaelis-Menten Parameter, das Model zeigt aber große

Diskrepanzen mit den Einzelwerten, ersichtlich an den großen Abweichungen der abschnittswisen Mittelwertbildung in 22D.

Tabelle 4.3: Ermittelte Michaelis-Menten Parameter für hPTC & hDTC

Zelltyp	Parameter	ermittelt	Konfidenzintervall	Michaelis-Menten-Beziehung
hPTC (n=52)	Vmax	1,28	1,17 – 1,38	$our_{norm} = \frac{1,28 \cdot pO_2}{(25,8 + pO_2)}$
	pO <sub>2</sub> 50	25,8% 5,4kPa 41mmHg	19,3-32,2% 4-6,8 kPa 31-51mmHg	
hDTC (n=52)	Vmax	1,12	0,89 – 1,35	$our_{norm} = \frac{1,12 \cdot pO_2}{(18,8 + pO_2)}$
	pO <sub>2</sub> 50	18,8% 3,9kPa 30mmHg	5,3-32,4% 1,1-6,8kPa 8,5-52mmHg	

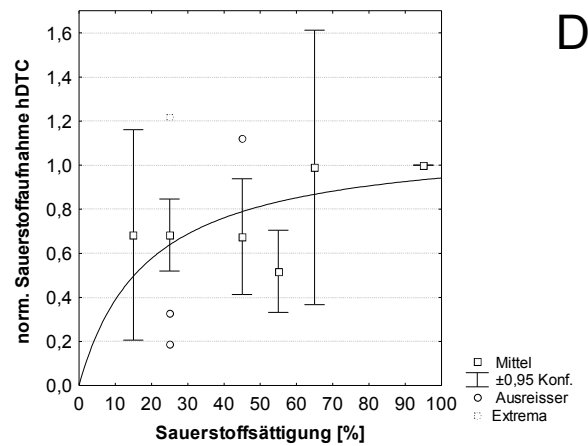
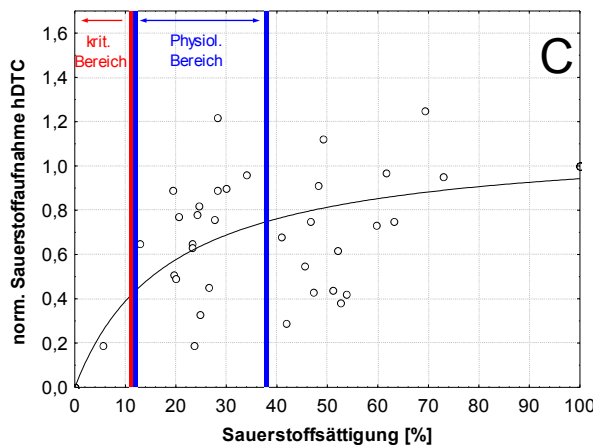
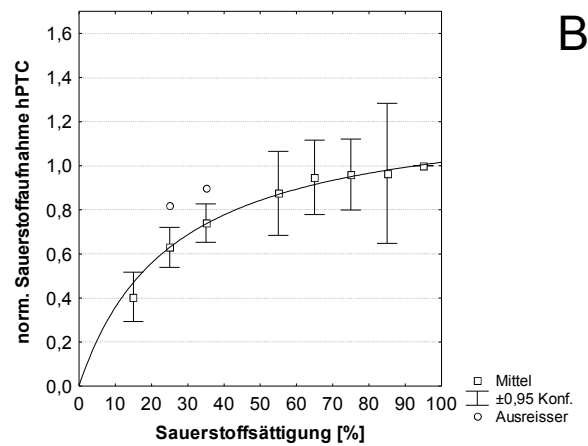
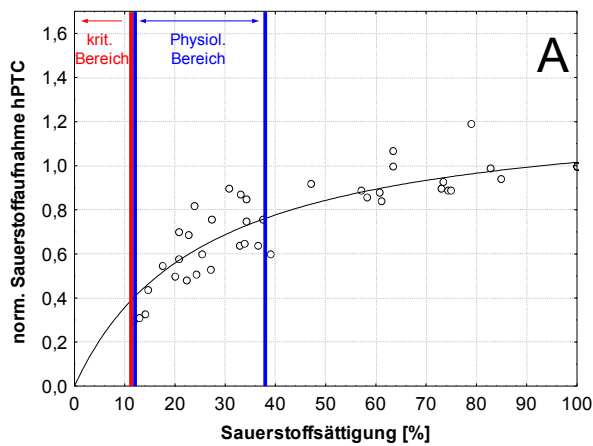


Abbildung 22: Normierte Sauerstoffaufnahme hPTC (A&B) und hDTC (C&D) bei verschiedenen Sauerstoffsättigungen mit ermittelter MM-Kinetik (je Zelltyp n=52). In A und C sind die physiologischen (blau) (20-60mmHg) und kritischen (rot) Sauerstoffsättigungsbereiche des Nierencortex angegeben. [31]

## 4.2.4 Zusammenfassung der Sauerstoffverbrauchsmessungen

Die Einzelergebnisse des letzten Kapitels werden hier noch einmal tabellarisch gegenübergestellt.

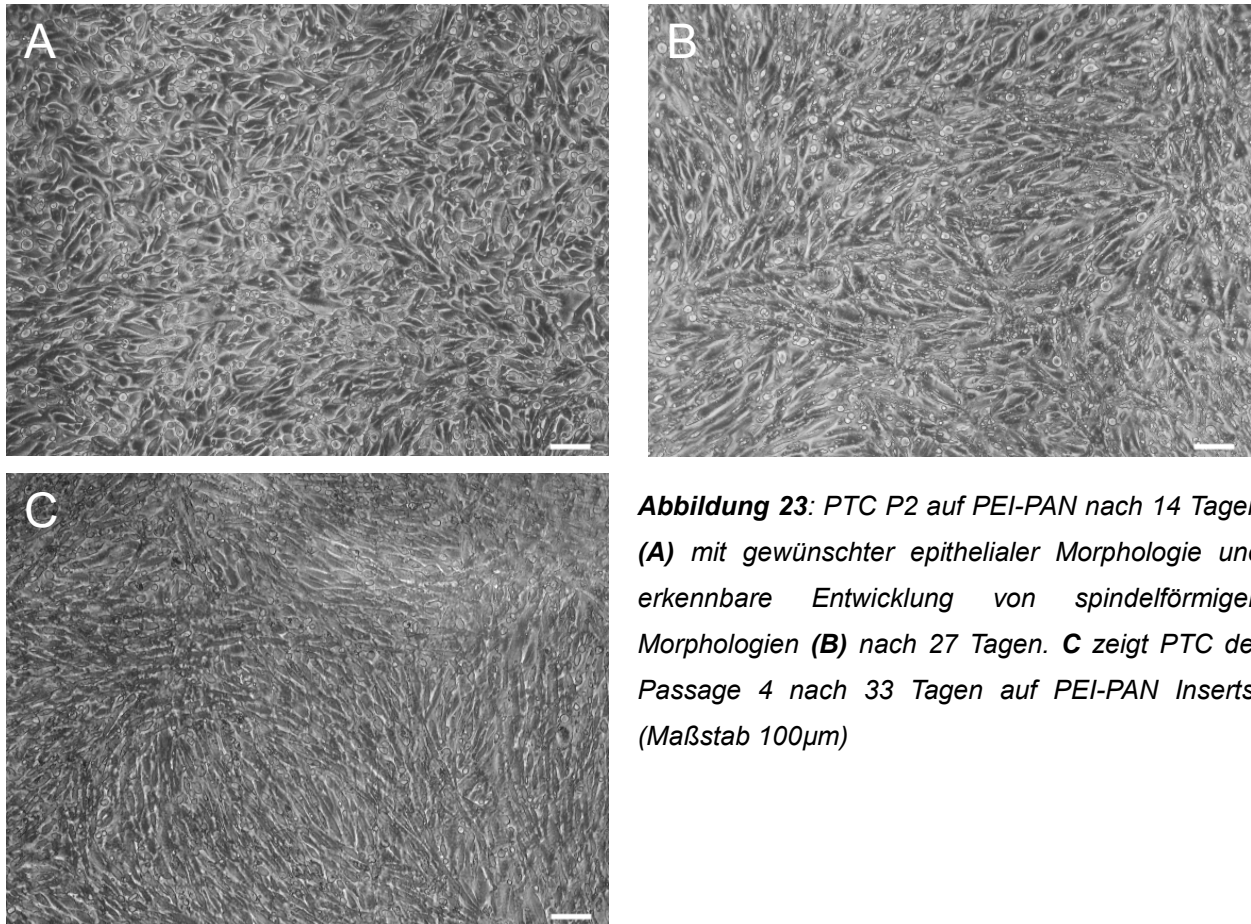
Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Atmungsparameter

Zelltyp	Grundatmung [mmol $10^6$ Zellen $h^{-1}$ ]	transportabhängige Atmung	Atmungskapazität	pO <sub>2</sub> 50	V <sub>max</sub>
hPTC	1,78e-3	Max. 28%*	Max. 184%	26%	1,28
hDTC	1,66e-3	Max 12%	Max 169%	19%	1,12

## 4.3 Effekte der Medienformulierung

### 4.3.1 TGF- $\beta$ 1

Unzureichende Proliferationskapazität und auftretende morphologische Veränderungen (Abb. 23) während der Standardkultur von primären hTECs auf diversen Flächen waren der Anlass, die Verwendung des Standardmediums M199+10%FCS [85] zu überdenken und dieses auf dessen TGF- $\beta$ 1 Konzentration zu untersuchen. Die morphologischen Veränderungen konnten mit wachsender Kulturdauer der Zellen beobachtet werden und bestanden aus einem Übergang der gewünschten epithelialen, isodiametrischen Zellform (Abb. 23A) hin zu einem spindelförmigen Typ (Abb. 23B und C). Der zeitliche Rahmen dieser Veränderungen war abhängig von Kulturdauer, Proliferationsstress, Isolation sowie Passagennummer und manifestierte sich nach 1-3 Wochen in allen proliferierten Subkulturen einer Isolation. Es galt zu untersuchen, ob diese Veränderungen Resultat einer TGF- $\beta$ 1 induzierten Epithelialen-Mesenchymalen-Transdifferenzierung (EMT) der Zellen waren.



**Abbildung 23:** PTC P2 auf PEI-PAN nach 14 Tagen (A) mit gewünschter epithelialer Morphologie und erkennbare Entwicklung von spindelförmigen Morphologien (B) nach 27 Tagen. C zeigt PTC der Passage 4 nach 33 Tagen auf PEI-PAN Inserts. (Maßstab 100µm)

Für eine Bestätigung der angestellten Vermutung wurden zunächst verschiedene Zellkulturüberstände, das Basismedium M199 sowie das vollständig supplementierte Standardkulturmedium auf deren TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen getestet. Somit sollte ermittelt werden, ob eventuell vorhandenes TGF- $\beta$ 1 endogener Herkunft oder aus der Supplementierung des Mediums mit FCS stammt. Um eine mögliche endogene TGF- $\beta$ 1 Bildung zu ermitteln, wurden 2 verschiedene primäre TEC-Typen (hPNeg (250 mm<sup>-2</sup>), hDNeg (230 mm<sup>-2</sup>)) in 24 Well Platten eingebracht und in verschiedenen Medienformulierungen kultiviert. Eine Überdeckung der endogenen TGF- $\beta$ 1 Bildung durch mögliches TGF- $\beta$ 1 des mit FCS supplementierten Standardmediums wurde durch die Durchführung von Versuchspunkten mit serumfreien Medienformulierungen erreicht. Die Zellen wurden 2 Tage nach Aussaat 3 Tage mit dem entsprechenden Medium kultiviert.

Tabelle 4.5: TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen in verschiedenen Überständen nach 3Tagen

Versuchspunkt	Probe (n=2)	Konzentrationen [pg ml <sup>-1</sup> ]	Fehler +/- [pg ml <sup>-1</sup> ]
1	hPNeg+M199+10%FCS	217	22
2	hPNeg+M199	27	10
3	hPNeg+M199+EGF+HGF+IGF1	30	6
4	hDNeg+M199+10%FCS	274	7
5	hDNeg+M199	20	3
6	hDNeg+M199+EGF+HGF+IGF1	81	0
7	M199+10%FCS	864	54
8	M199	0	66

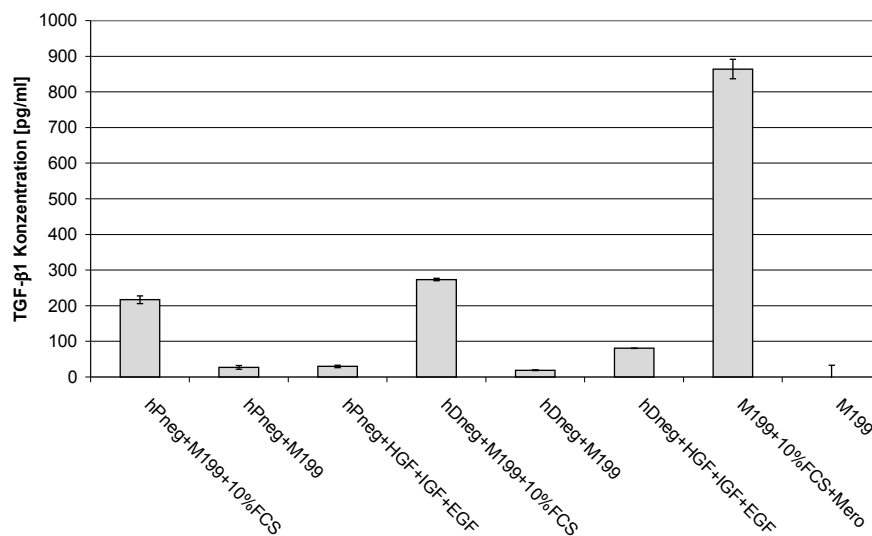


Abbildung 24: TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen in verschiedenen Überständen nach 3 Tagen Kultur

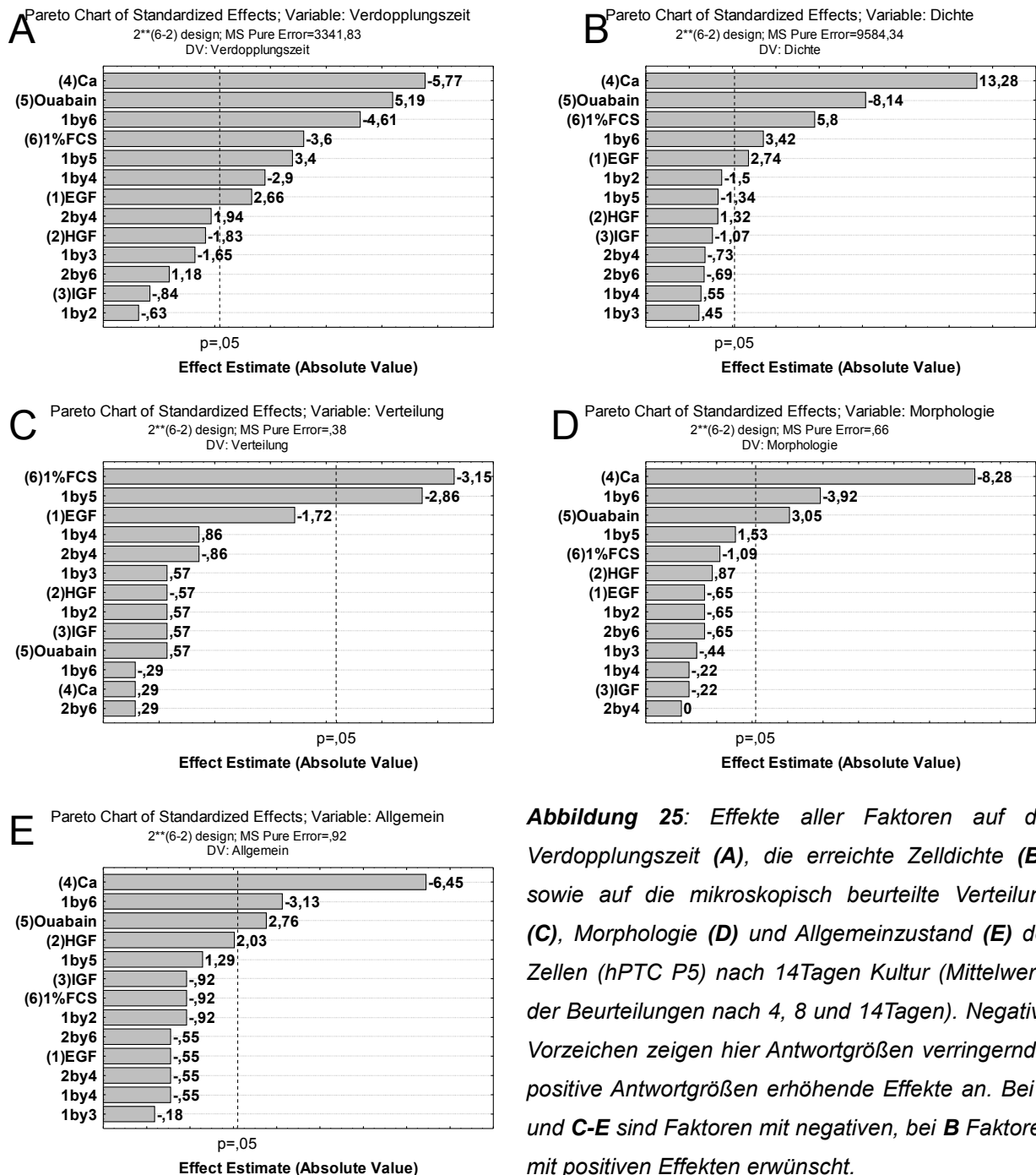
Aus Werten in Tabelle 4.5 und Abbildung 24 geht hervor, dass es in diesem Versuch zu keiner bzw. zu einer nicht erfassbaren, endogenen Bildung von TGF- $\beta$ 1 durch die Zellen gekommen ist. Die Vermutung, dass das Kulturmedium hohe Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 aufgrund der Supplementierung durch FCS aufweist, konnte jedoch bestätigt werden (vgl. Versuchspunkt 7). Die Konzentration von  $\sim 860$  pg ml<sup>-1</sup> verringert sich bei diesem Versuch bei der Kultur mit Zellen auf  $\frac{1}{4}$  der ursprünglichen Konzentration (Versuchspunkt 1, 4 und 7).



## 4.4 Medienoptimierung

Als Basismedium für eine serumarme, definierte Zusammensetzung des Kulturmediums wurden verschiedene Supplemente (EGF, HGF, IGF1, Ca<sup>2+</sup>, Ouabain und FCS) auf deren Effektivität in der Anwendung mit Primärzellen anhand eines statistischen Versuchsplans, nach der in 3.6 dargestellten Methode gescreent.

### 4.4.1 Ergebnisse der Faktoren-Screenings



**Abbildung 25:** Effekte aller Faktoren auf die Verdopplungszeit (A), die erreichte Zelldichte (B), sowie auf die mikroskopisch beurteilte Verteilung (C), Morphologie (D) und Allgemeinzustand (E) der Zellen (hPTC P5) nach 14 Tagen Kultur (Mittelwerte der Beurteilungen nach 4, 8 und 14 Tagen). Negative Vorzeichen zeigen hier Antwortgrößen verringernde, positive Antwortgrößen erhöhende Effekte an. Bei A und C-E sind Faktoren mit negativen, bei B Faktoren mit positiven Effekten erwünscht.

Anhand der Effektmatrix in Tabelle 4.6 wurden die Effekte der verwendeten Supplemente bewertet.

Tabelle 4.6: Bewertung der ermittelten Effekte der untersuchten Supplemente

Faktornr.	Supplement	Td	Dichte	Verteilung	Morphologie	Allgemein	Bewertung
1	EGF	-	+	o	o	o	+
4	Ca <sup>2+</sup>	+	+	o	+	+	+
5	Ouabain	-	-	o	-	-	-
6	FCS	+	+	+	o	o	+
<b>1x6</b> 4x5	EGFxFCS Ca <sup>2+</sup> xOuabain	+	+	o	+	+	+
<b>1x5</b> 2x3 4x6	EGFxOuabain HGFxIGF1 Ca <sup>2+</sup> xFCS	-	o	+	o	o	<b>o</b>
<b>1x4</b> 5x6	EGFxCa <sup>2+</sup> OuabainxFCS	+	o	o	o	o	<b>o</b>

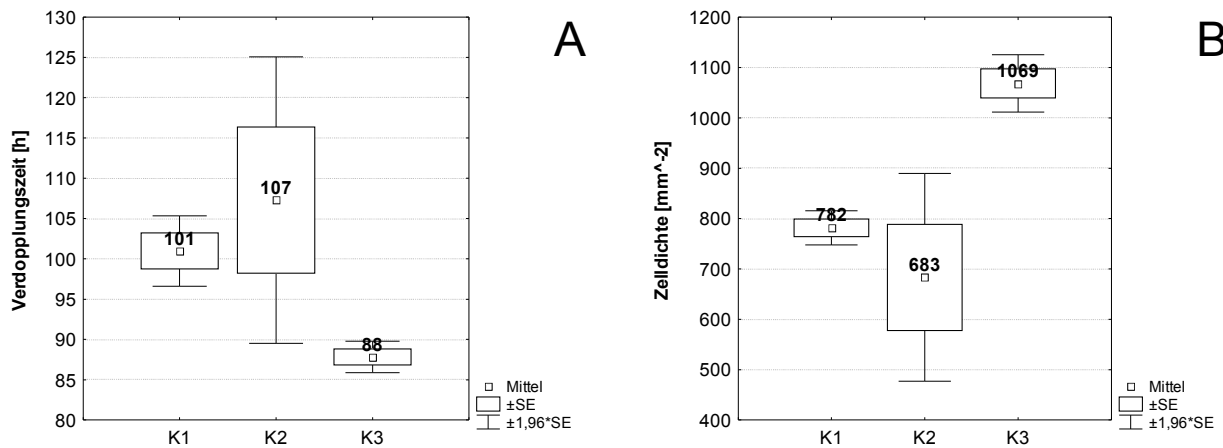
(Effekte und Bewertung der Supplemente im Sinne der untersuchten, geforderten Auswirkungen (min. T<sub>d</sub>, max. Dichte, max. Verteilung unter Beibehaltung spezifischer Morphologien : „+“ sich positiv auswirkender Effekt, „-“ sich negativ auswirkender Effekt, „o“ nicht relevanter Effekt)

#### 4.4.1.1 Vergleich der verwendeten Kontrollmedien

Die Diagramme 26A&B und der T-Test in Tabelle 4.7 zeigen den Vergleich der proliferativen Effekte der verwendeten Kontrollmedien K1 (M199+5%FCS), K2 (SFM+BPE+EGF) und K3 (SFM+BPE+EGF+Ca<sup>2+</sup>+3%FCS), dargestellt durch Verdopplungszeit und erreichte Zelldichte nach 14 Tagen. Hierbei stellt K3 die optimalste Medienformulierung dar.

Tabelle 4.7: T-Test Verdopplungszeit und Zelldichten in den Kontrollmedien

	Mittel 1	Mittel 2	T-Wert	df	p-wert
K1 TD vs. K2 TD	101	107	-0,678	2	0,5678
<b>K1 TD vs. K3 TD*</b>	<b>101</b>	<b>88</b>	<b>5,374</b>	<b>2</b>	<b>0,0329</b>
K3 TD vs. K2 TD	88	107	-2,135	2	0,166
K1 Dens vs. K2 Dens	782	683	0,9236	2	0,453
<b>K1 Dens vs. K3 Dens*</b>	<b>782</b>	<b>1069</b>	<b>-8,498</b>	<b>2</b>	<b>0,014</b>
K3 Dens vs. K2 Dens	1069	683	3,529	2	0,072



**Abbildung 26:** Verdopplungszeit (A) und erreichte Zelldichte (B) in den Kontrollmedien (hPTC P5) dargestellt durch Mittelwert, Standardfehler und  $p < 5\%$  Grenzwert (T-Test  $n \rightarrow \infty$ )

Die Verdopplungszeiten und Zelldichten von K1 zu K3, unterscheiden sich signifikant (T-Test zu  $p < 5\%$ ) voneinander. Keine signifikanten Unterschiede lassen sich allerdings zu K2 finden.

#### 4.4.2 Zusammenfassung der Medienoptimierungen

Aus der Effektmatrix in Tabelle 4.6 ergeben sich folgende Schlussfolgerungen für die Formulierung eines optimierten Mediums:

- Keine signifikanten Effekte von HGF und IGF1 auf keinen der untersuchten Parameter
- Ouabain zeigt in allen Fällen, außer in der beurteilten Verteilung, signifikant hohe unerwünschte Effekte
- EGF wirkt zwar wie in Abb. 25A dargestellt, verdopplungszeitverlängernd, führt aber andererseits auch zu höheren Zelldichten (Abb. 25 B)
- FCS zeigt erwünschte Effekte im Falle der Verdopplungszeit (Abb. 25A), der max. Zelldichte (Abb. 25B) und der beurteilten Verteilung (Abb. 25C)
- $\text{Ca}^{2+}$  zeigt in allen Fällen, außer bei der beurteilten Verteilung, gewünschte Effekte

Die stark positiven Effekte der niedrigen Serumkonzentration waren der Anlass, eine serumarme einer völlig serumfreien Medienformulierung vorzuziehen. Es wurde die in Tabelle 4.8 aufgeführte Supplementierung auf Basis des SFK-Mediums für die Kultur der Primärzellen gewählt. Die in Tabelle 4.6 dargestellten signifikanten Effekte der vermengten

Faktorenwechselwirkungen EGFxFCS (Ca<sup>2+</sup>xOuabain), EGFxOuabain (HGFxIGF1, Ca<sup>2+</sup>xFCS) und EGFxCa<sup>2+</sup> (OuabainxFCS) wurden dabei berücksichtigt ohne die Vermengung durch weitere Versuchsreihen aufzulösen. Die negativen Effekte von Ouabain, die fehlenden primären Effekte von HGF und IGF1 waren der Anlass, auf diese Supplemente zu verzichten.

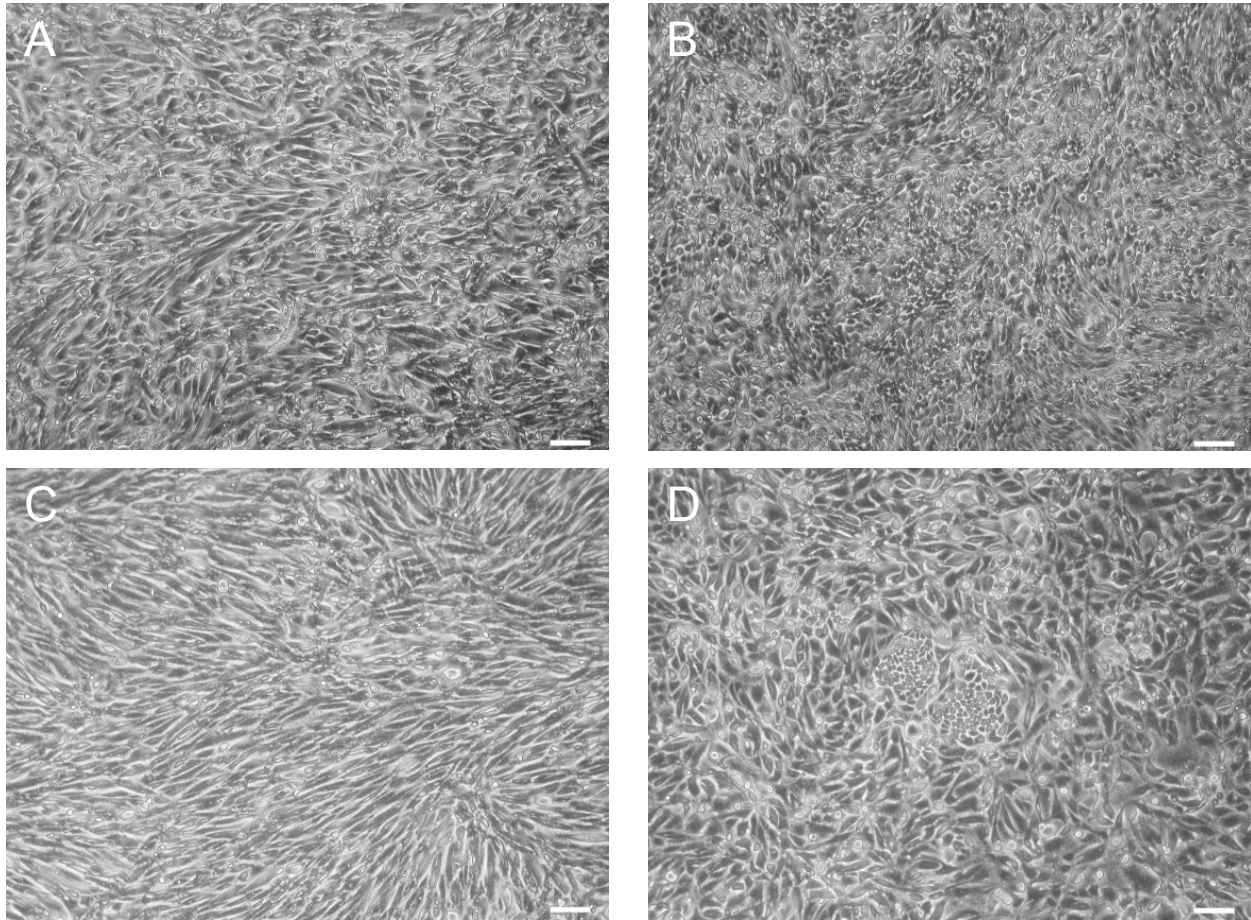
*Tabelle 4.8: Gewählte Supplemente und deren Konzentrationen für die serumarme Medienformulierung (SFM+S)*

<i>Supplement</i>	<i>Konzentration</i>
BPE	20-30 µg ml <sup>-1</sup>
EGF	5 ng ml <sup>-1</sup>
Ca <sup>2+</sup>	1,2 mmol l <sup>-1</sup>
FCS	1%

#### **4.4.3 Validierung der gefundenen Medienformulierung**

In weiteren Versuchsreihen mit zwei primären Zelltypen sollte abschließend gezeigt werden, dass die neue Medienformulierung im allgemeinen und in der Differenzierung Vorteile gegenüber der alten Standardformulierung bietet. Dazu wurden Morphologie über Phasenkontrast- und Raster-Elektronen-Mikroskopie sowie TGF-β1 Konzentrationen und der inflammatorische Status der Zellen bestimmt. Hierfür erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der proinflammatorischen Zytokine IL12p70, TNF-α, IL10, IL6, IL1b, und IL8. hNF-Zellen der Passage 2 (400 mm<sup>2</sup>) und RPTEC der Passage 3 (200 mm<sup>2</sup>) wurden dazu in zwei verschiedenen Versuchsreihen gewippt auf PEI-PAN Inserts und über einen längeren Zeitraum in der neuen Medienformulierung (SFM+S) sowie im alten Standardmedium (M199+10%FCS) als Negativkontrolle kultiviert.

#### 4.4.3.1 Mikroskopische Beurteilung

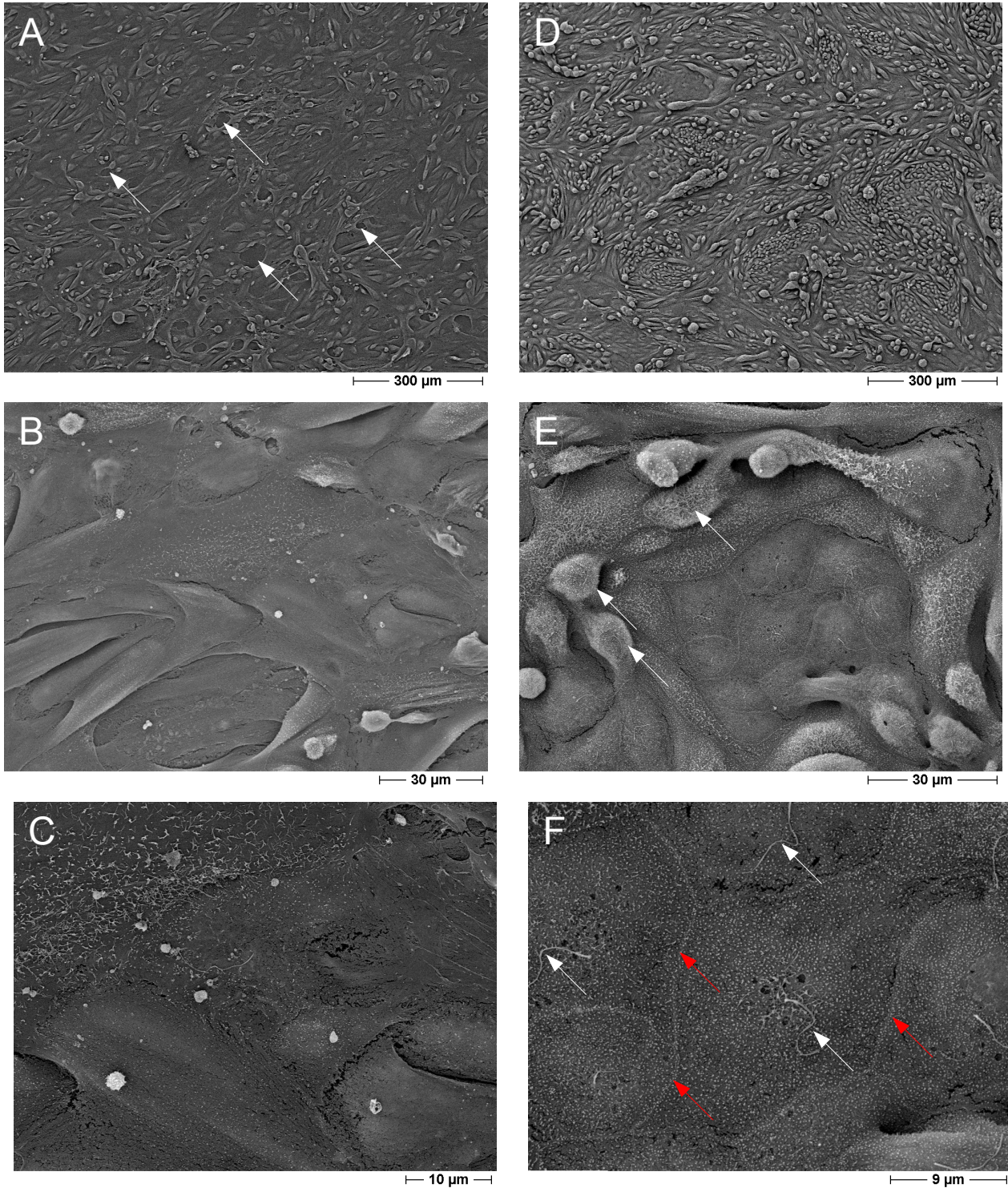


**Abbildung 27:** hNF P2 (A, B) und RPTEC P3 (C,D) auf PEI-PAN nach 7 Tagen in Standard-Medium M199+10%FCS (A,C) und SFM+S (B,D). In M199+10%FCS kultivierte Zellen zeigen eine spindelförmige Morphologie, während Zellen in SFM+S gewünschte, epitheliale isodiametrische Morphologien ausbilden. (Maßstab 100µm)

Wie aus Abbildung 27A und C hervorgeht, weisen die in M199+10% FCS kultivierten Zellen einen erkennbar langgestreckten Zelltyp auf. Dagegen zeigen die in SFM+S kultivierten Zellen die gewünschte, isodiametrische, epitheliale Morphologie (Abb. 27 C&D). Der durch die verschiedenen Medienformulierungen hervorgerufene morphologische Unterschied ist bei RPTEC Zellen zwar ausgeprägter als bei hNF Zellen, dennoch sind die morphologischen Veränderungen bereits nach 7 Tagen im Phasenkontrast erkennbar.

Abbildung 28 zeigt die Ausprägung morphologischer Feinstrukturen von hNF-Zellen im REM nach 7 Tagen Kultur auf PEI-PAN Inserts in beiden Medien. Die Proben wurden für die Raster-Elektronen-Mikroskopie nach Methode 3.4.1.1 Karnovski-fixiert und mittels Methode 3.4.2.2 entwässert.



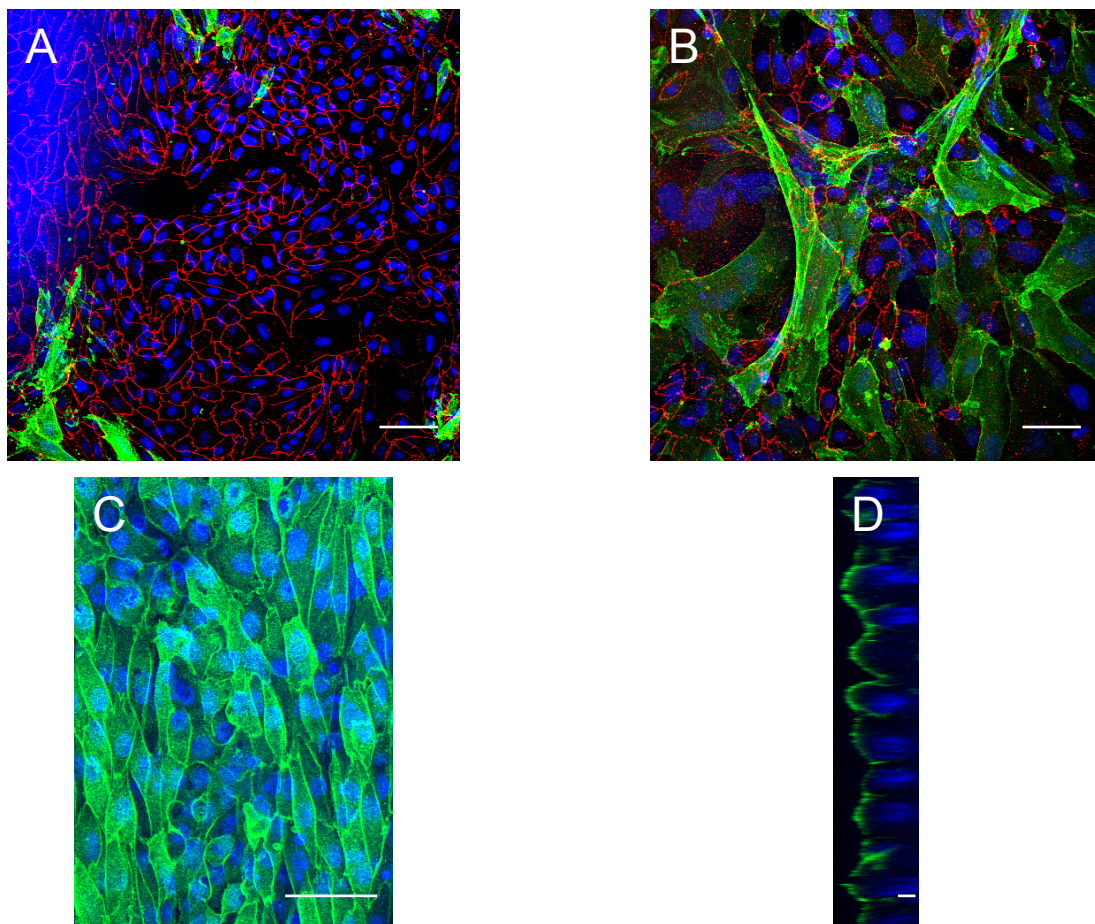


**Abbildung 28:** hNF P2 Zellen nach 7 Tagen Kultur auf PEI-PAN in M199+10%FCS (A, B, C) und in SFM+S (D, E, F). In F zeigen die Zellen sehr gut ausgeprägte, epitheliale, morphologische Merkmale wie Einzelzilien und Schlussleisten.

Wie bereits in Abbildung 27A-D gezeigt, ergeben sich gravierende morphologische Unterschiede aufgrund der verwendeten Medienformulierung. Die in M199+10% FCS



kultivierten Zellen (Abb. 28A-C) zeigen einen flachen, langgestreckten Zelltyp, kaum ausgeprägte epitheliale Differenzierungsmerkmale, wie prägnante Schlussleisten, Mikrovilli oder Einzelzilien und weisen eine nicht mindere Zahl von Defektstellen in der Monolayer auf (Abb. 28A). Demgegenüber steht die auffällig sehr gut ausgeprägte Differenzierung der in SFM+S kultivierten Zellen (Abb. 28D-F). Weiterhin ist bei dieser, mit hNF-P2 durchgeführten Versuchsreihe anzumerken, dass es sich hierbei um eine Mischpopulation von Nierenzellen einer Isolation handelt. Die unterschiedlichen Populationen dieser Mischkultur sind in der Übersicht (Abb. 28D) anhand deren Morphologie gut erkennbar, während dies in Abbildung 28F Fehler: Referenz nicht gefundenA nicht mehr möglich ist. Hier ist nur noch eine morphologisch identische Zellpopulation vorherrschend.

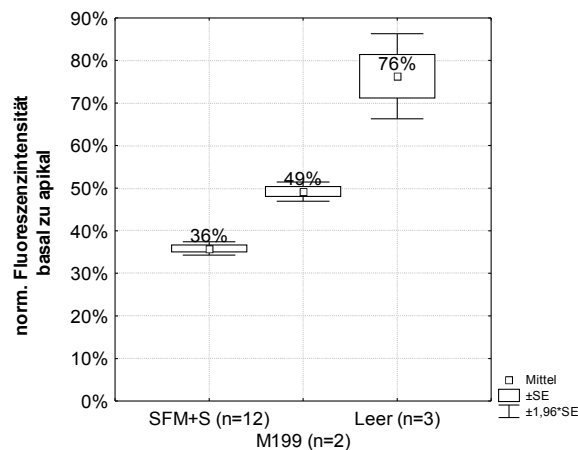


**Abbildung 29:** Immunofluoreszenzfärbungen von ZO1 (rot), AQP1 (grün) und Nucleii (blau) visualisiert durch CLSM an NF P2 nach 14 Tagen Kultur in SFM+S (A,C,D) und in M199+10% FCS (B). In C und D (Y/Z-Schnitt von C) wurden nur AQP1 und Nucleii angefärbt. (Maßstab A,B,C 50µm; D 10µm)

Die Darstellungen in Abbildung 29 komplettieren die mikroskopischen Untersuchungen zwischen den verschiedenen Medien. In 29A&B sind klare epitheliale Strukturen erkennbar, welches für die in M199+10%FCS kultivierten Zellen nicht zutrifft (Abb. 29B). Die Zellen hier sind um einiges größer, in manchen Abschnitten ist kein ZO1 zwischen den Zellen nachweisbar. Zwar können hier AQP1 positive Zellen nachgewiesen werden, was für eine proximale Differenzierung dieser Zellen spricht, aber die Morphologie ist in keiner Weise vergleichbar mit den Strukturen in 29C&D. Die bereits im Phasenkontrast- sowie durch REM dokumentierte Heterogenität der hNF-Fraktion zeigt sich auch hier. Während in 29A kaum AQP1-positive Zellen nachzuweisen sind, konnte an einer anderen Stelle eine überaus homogene AQP1 positive Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 29C&D). 29B repräsentiert den Zustand für in M199+10%FCS kultivierte Zellen.

#### 4.4.3.2 Einfluss der Medienformulierungen auf die Inulin-Dichtigkeit

Die Dichtigkeit der Monolayer von in verschiedenen Medien kultivierten NF-P2 Zellen wurde nach 21 Tagen ermittelt.



**Abbildung 30:** Dichtigkeit der von NF-P2 gebildeten Monolayer nach 21 Tagen Kultur in verschiedenen Medien. Dargestellt ist die norm. Fluoreszenzintensität des basalen bezogen auf die des apikalen Kompartimentes nach ca. 20h.

Tabelle 4.9: T-Test FITC-Inulin Dichtigkeit nach 21Tagen (hNF P2)

	Mittel 1	Mittel 2	T-Wert	df	p-wert
SFM+S vs. M199+10%FCS*	36%	49%	-6,497	12	0,000029
SFM+S vs. leer*	36%	76%	-14,557	13	0,000000
M199+10%FCS vs. leer*	49%	76%	-4,073	3	0,026711



#### 4.4.3.3 Einfluss der Medienformulierung auf den Zytokinstatus

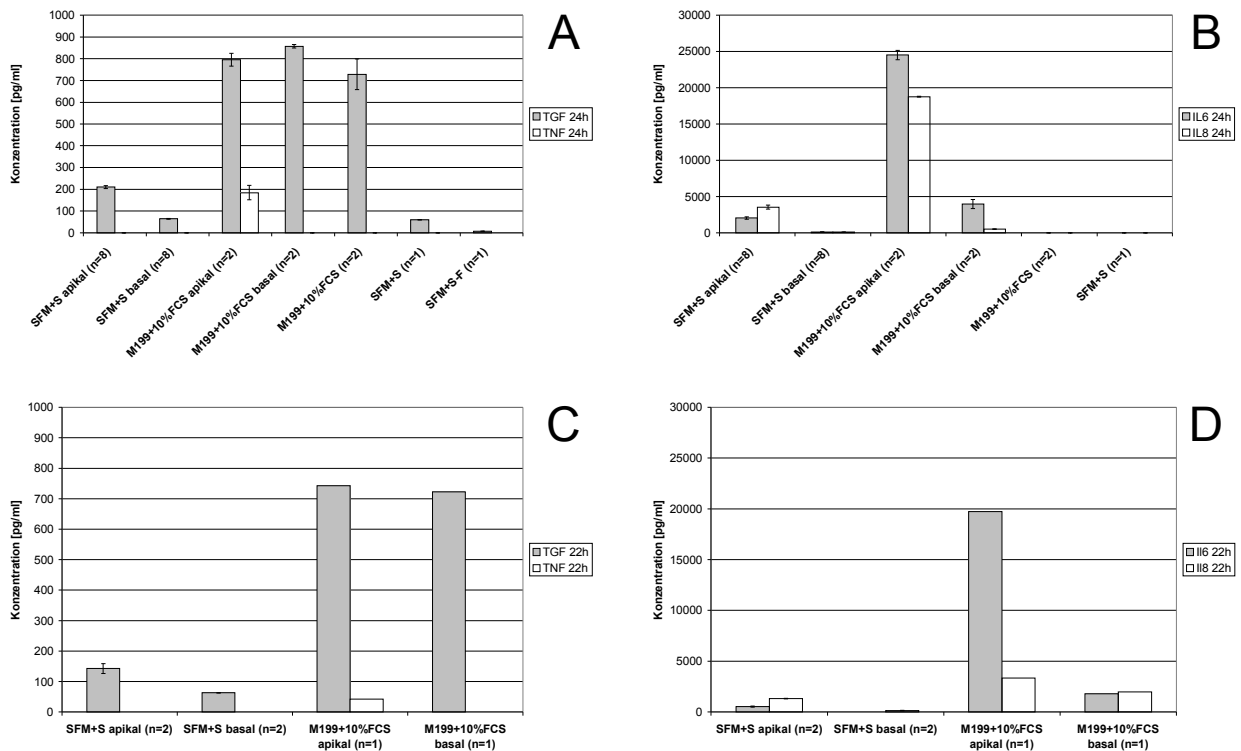
Überstände für eine Bestimmung der Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 und proinflammatorischer Zytokine wurden nach 7 (NF P2), respektive 30 Tagen (RPTEC P3) Kultur auf PEI-PAN Inserts im entsprechenden Medium genommen und nach den Methoden 3.5.3 und 3.5.4 bestimmt. Dazu wurden Proben des apikalen und basalen Kompartimentes beider Medienformulierungen nach ca. 24h Kultur für die Konzentrationsbestimmungen verwendet.

Tabelle 4.10: Konzentration von TGF- $\beta$ 1 und proinflammatorischen Zytokinen nach 24h Kultur in verschiedenen Medien hNF P2

Probename		Konzentration [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]							
		TGF- $\beta$ 1	$\Delta$	TNF- $\alpha$	$\Delta$	IL-6	$\Delta$	IL-8	$\Delta$
SFM+S NF P2 (n=8)	apikal	210	14	<20		2034	324	3258	546
	basal	64	3	<20		97	60	77	13
M199+10%FCS (n=2)	apikal	795	59	184	66	24511	1272	18770	122
	basal	857	16	<20		3976	1265	498	47
Medium M199+10%FCS (n=2)		728	141	<20		<20		<20	
Medium SFM+S(n=1)		60	3	<20		<20		<20	
Medium SFM+S-FCS(n=1)		6	1	<20		<20		<20	

Tabelle 4.11: Konzentration von TGF- $\beta$ 1 und proinflammatorischen Zytokinen nach 24h Kultur in verschiedenen Medien RPTEC P3

Probename		Konzentration [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]							
		TGF- $\beta$ 1	$\Delta$	TNF- $\alpha$	$\Delta$	IL-6	$\Delta$	IL-8	$\Delta$
RPTEC P3 SFM+S (n=2)	apikal	143	22	<20		536	124	1329	55
	basal	63	1	<20		<20		<20	
RPTEC P3 M199+10%FCS (n=1)	apikal	743		42		19725		3336	
	basal	722		<20		1798		1986	
Medium M199+10%FCS (n=2)		728	141	<20		<20		<20	
Medium SFM+S (n=1)		60	3	<20		<20		<20	
Medium SFM+S-FCS (n=1)		6	1	<20		<20		<20	



**Abbildung 31:** Apikale und basolaterale Konzentrationen von TGF-β1 (A,C) sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF-A (A,C), IL-6 und IL-8 (B,D) nach ca. 24h Kultur in den verwendeten Medien. A und B zeigen die Konzentrationen in 7 Tage alten NF-P2 Kulturen, C und D diese in 30Tage alten RPTEC-Kulturen.

Die in Tabelle 4.10, 4.11 und Abbildung 31 dargestellten Unterschiede der TGF-β1 Konzentrationen zwischen den jeweiligen Kompartimenten der unterschiedlichen Medienformulierungen sind signifikant, auch die Differenz von apikaler zu basaler Konzentration von in SFM+S kultivierten NF-Zellen. Lediglich zwischen den Konzentrationen des apikalen, basalen Kompartimentes und der Medienkontrolle von in M199+10%FCS kultivierten Zellen ließ sich keine signifikante Differenz nachweisen. Hierbei ist davon auszugehen, dass die hier gemessenen Werte aus der TGF-β1 Konzentration des Mediums resultieren. Eine signifikante Zunahme ( $p < 5\%$ ) der apikalen TGF-β1 Konzentration aufgrund endogener Bildung in SFM+S bei NF-Zellen ( $210$  vs.  $60 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) sowie RPTEC ( $123$  vs.  $60 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) konnte hier gezeigt werden.

Das M199+10%FCS Medium löst bei den verwendeten Zellen eine inflammatorische Reaktion aus, gezeigt durch die von den Zellen gebildeten, hohen Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8. Es zeigen sich signifikante Abweichungen sowohl zwischen den Kompartimenten, als auch im Vergleich der jeweiligen Kompartimente zwischen den verschiedenen Medienformulierungen. Besonders

hervorzuheben ist der Faktor der Konzentrationen zwischen den Medienformulierungen. So liegt die IL8 Konzentration in M199+10% fast das 6- (NF-P2) bzw. 3fache (RPTEC P3) über der in SFM+S, die von IL6 fast um das 10- (NF-P2) bzw. 40fache (RPTEC P3).

#### 4.4.3.4 Einfluss auf die maximale Zelldichte bei RPTEC- Zellen

Nach Abnahme der Überstände für die Ermittlung der Zytokinkonzentrationen in 4.4.3.3 am Tag 30 der Kultivierung, wurden die Zellen nach Methode 3.2.2.1 von PEI-PAN Inserts abgelöst und die erreichte Zellzahl der RPTECs in den verschiedenen Medien bestimmt.

Tabelle 4.12: Erreichte RPTEC Zelldichten nach 30 Tagen Kultur in verschiedenen Medien

Medium	n	Zellzahl	Zelldichte [mm <sup>-2</sup> ]
SFM+S	4	8,8 · 10 <sup>5</sup>	1956
M199+10%FCS	2	4,9 · 10 <sup>5</sup>	1088

Tabelle 4.13: T-Test RPTEC Zelldichten nach 30 Tagen Kultur in verschiedenen Medien

	Mittel 1	Mittel 2	T-Wert	df	p-Wert
SFM+S vs. M199	8,83E+005	4,94E+005	2,731641	4	0,052354

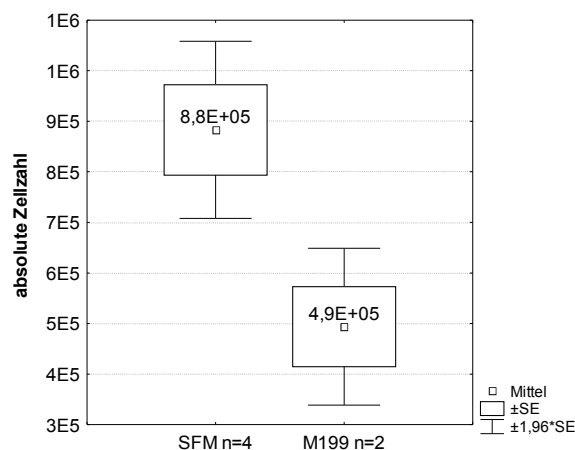


Abbildung 32: Max. erreichte Zellzahlen von RPTEC P3 nach 30 Tagen in verschiedenen Medien auf PEI-PAN Inserts

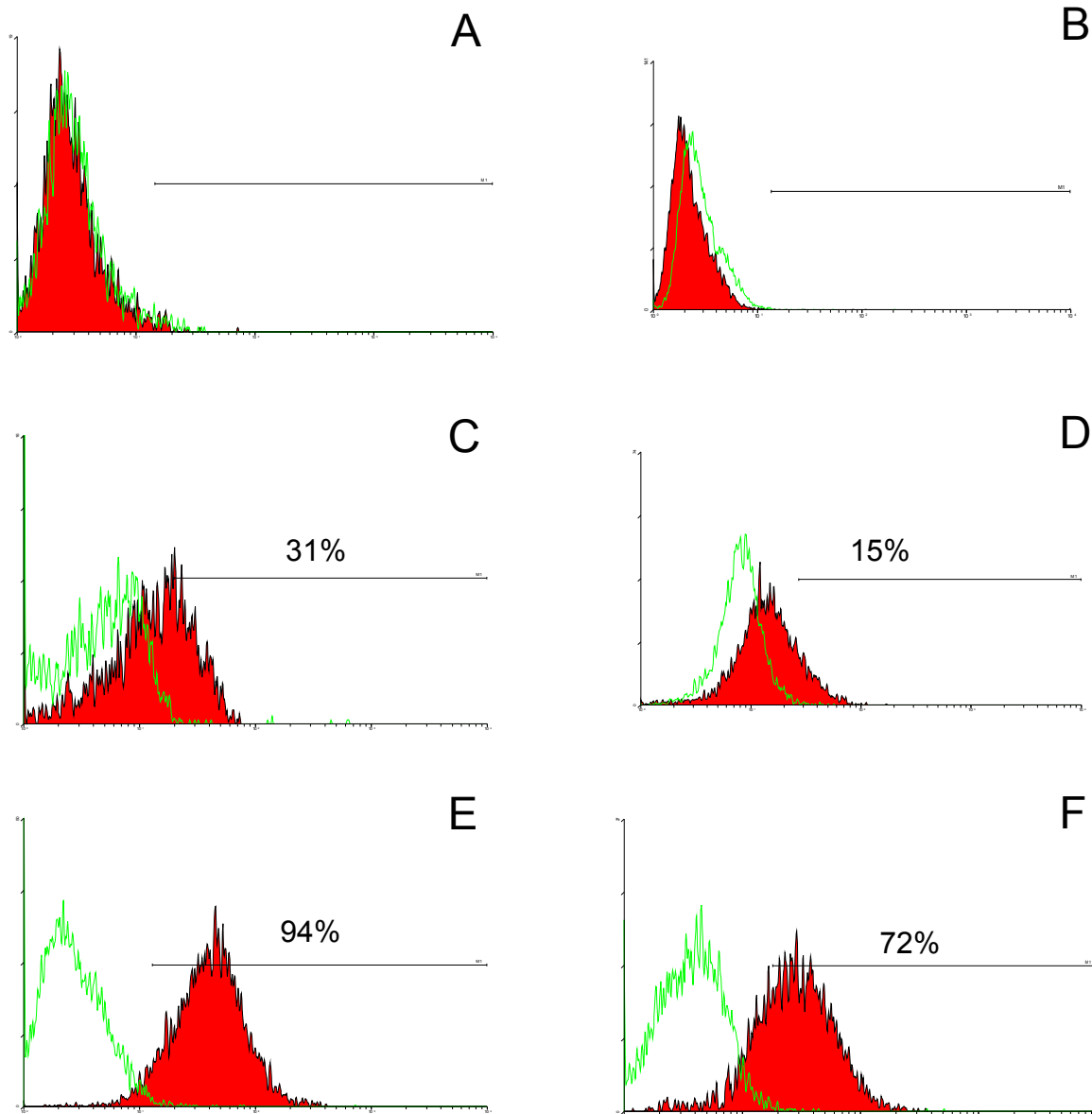
Wie in Tabelle 4.12 und Abbildung 32 dargestellt, konnte in M199+10%FCS nach 30 Tagen Kultur nur 50% der Zellzahl wie unter serumarmen Bedingungen auf PEI-PAN Inserts erreicht werden. Allerdings ist zu beachten, dass bei dem in dieser Arbeit sonst angewendeten Signifikanzniveau von  $p < 5\%$ , sich in diesem Falle keine Signifikanz

nachweisen lässt, da der p-Wert des durchgeführten T-Testes bei 5,2% liegt. Zusammen mit den Ergebnissen aus 4.4.1.1 kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die serumarme Medienformulierung zu einer deutlich höheren Zelldichte führt.

In Anbetracht der absoluten Zellzahlen ergibt sich hierbei aber ein ganz anderes Bild bezüglich der Ergebnisse aus 4.4.3.3. Die dort beschriebenen, sehr hohen Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in M199+10% FCS werden nur von ca. der Hälfte der Zellen erreicht.

#### **4.5 CD133 Expression verschiedener Tubulusepithelzellfraktionen**

In [58] konnte eine CD133<sup>+</sup>/PAX2<sup>+</sup> Epithelzellfraktion aus dem Nierencortex isoliert werden. Diese zeichnete sich durch erhöhte Proliferationskapazitäten aus, ließ sich aber vor allen Dingen *in vitro* und *in vivo* in Epithel- sowie Endothelzellen differenzieren. Ausgehend von diesen Daten vermuten die Autoren, dass es sich bei CD133<sup>+</sup> Nierenepithelzellen um niereneigene, somatische Stammzellen handelt. Es stellte sich somit die Frage, wie hoch dieser Anteil in den verschiedenen Fraktionen der in dieser Arbeit verwendeten, primär isolierten Zellen ist, und ob zwischen den verschiedenen Fraktionen Unterschiede existieren. Zur Klärung wurden die verschiedenen Fraktionen einer Isolierung hPTC, hDTC, hPNeg, hDNeg in der Passage 2 auf mögliche Populationen CD133<sup>+</sup> Zellen untersucht, und deren Anteil bestimmt. Hierbei diente die Zelllinie HK2 und primäre, humane BM-MSC der Passage 4 als Negativkontrolle. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt. Es zeigt sich ein hoher Anteil (72-94%) CD133<sup>+</sup> positiver Zellen in den Negativfraktionen (hPNeg, hDNeg) der Isolierungen und ein vergleichbar geringerer Anteil (15-31%) dieser in den hochreinen Fraktionen (hPTC, hDTC). Die Ergebnisse zeigen, dass durch eine Isolation der Zellen anhand spezifischer Marker gegen hPTC und hDTC CD133<sup>+</sup> Zellen diskriminiert werden. Aufgrund der Verfügbarkeitsprobleme jeweils alle Fraktionen einer Isolierung zu erhalten, konnte nur ein einzelnes, vergleichendes Screening aller Fraktionen einer Isolierung durchgeführt werden (Abb. 33). Getrennte Untersuchungen verschiedener Isolierungen wiesen aber wiederholt höhere CD133<sup>+</sup> Anteile in den negativen, verglichen mit den hochreinen Fraktionen auf.



**Abbildung 33** FACS Screening an verschiedenen Nierentubuluszellen. Humane BM-MSCs (**A**) sowie die Zelllinie HK2 (**B**) als Negativkontrolle (grünes Histogramm=Isotypkontrolle; rotes Histogramm=CD133<sup>+</sup>). Die unterschiedlichen Fraktionen der Aufreinigung einer Isolierung nach Dr. PC. Baer: hPTC (**C**), hDTC (**D**), hPNeg (**E**) und hDNeg (**F**) weisen alle CD133<sup>+</sup> Populationen unterschiedlicher Verhältnisse auf. hPNeg (**E**) und hDNeg (**F**) weisen einen sehr viel größeren Anteil CD133<sup>+</sup> positiver Zellen auf, als die hochreinen Fraktionen in **C** und **D**.

#### 4.6 Strömungszustände der Perfusionskulturen

Für die Auslegung der experimentellen Parameter der Modulperfusionen, Perfusionsmodus (intrakapilläre vs. extrakapilläre Perfusion) und Perfusionsfluss wurden theoretische Strömungsbetrachtungen durchgeführt. Hierbei galt es *in vivo* Bedingungen

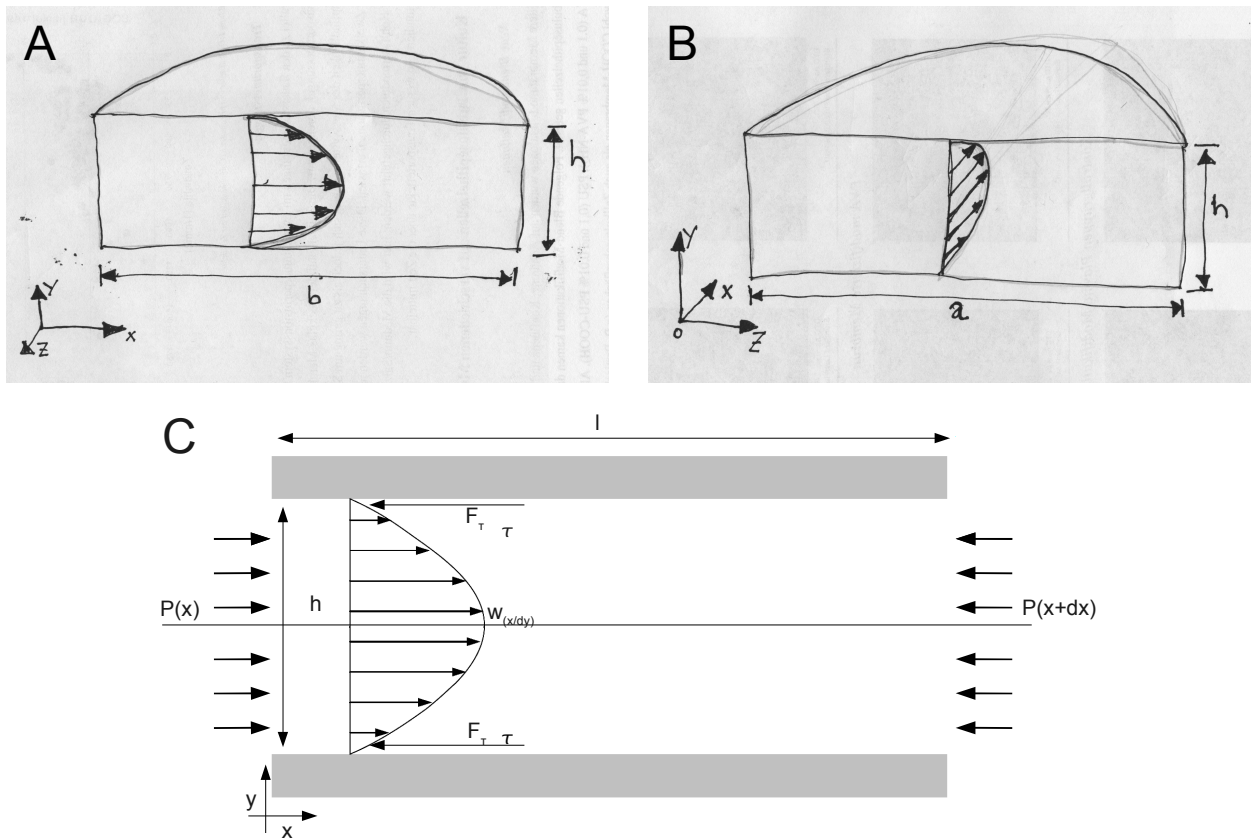
zu ermitteln, um diese auf die *in vitro* Bedingungen der BTKs zu übertragen. Die wichtigsten strömungstechnischen Parameter innerhalb einer Kapillare sind die mittlere Strömungsgeschwindigkeit  $w$  [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ], der Durchmesser  $d$  [ $\mu\text{m}$ ] und die sich daraus ableitenden Größen des Flusses  $Q$  [ $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$ ], der Reynoldszahl  $Re$  und der auf die Zellen wirkende Scherstress  $\tau$  [ $\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]. Zusammen mit der Kenntnis des Sauerstoffbedarfes  $OUR$  [ $\text{mmol}\cdot 10^{-6}$  Zellen $\cdot\text{h}^{-1}$ ] lässt sich ein Rahmen für die Perfusionsflüsse der Module ableiten.

Dabei bilden zwei Zellparameter, kritische Sauerstoffkonzentration und maximal tolerierbare tangentielle Kräfte die Randbedingungen für den Volumenstrom  $Q$  des Perfusionsmediums. Der Volumenstrom  $Q$  muss einerseits so groß sein, um den Sauerstoffbedarf der Zellen zu decken, darf aber um ein Abscheren der Zellen vom Substrat zu verhindern, andererseits eine kritische Strömungsgeschwindigkeit  $w_{\text{krit}}$  nicht übersteigen. Letzteres spielt dann eine Rolle, wenn eine Perfusion der Module im intrakapillären Kompartiment (IC), der apikalen Seite der Zellen stattfindet. Wird eine Perfusion über das extrakapilläre (extrazelluläre) Kompartiment (EC) durchgeführt, sind die Zellen durch die Kapillarwände der porösen Membranen vor diesen Kräften geschützt, lediglich schnelle und im Betrag große Druckänderungen rufen hier Schädigungen der Zellen hervor. Eine apikale Anströmung ist allerdings nicht nur von der generellen Funktionsweise des Tubuluskonstruktes gefordert, sondern stellt einen wichtigen Zellparameter dar. Der mechanische Stimulus der durch die apikale Strömung hervorgerufenen Kräfte wirkt sich auf den Differenzierungsstatus aus [85] und ist für die Ausbildung geforderter morphologischer ([95][96]), als auch funktioneller Eigenschaften der Zellen und deren Regelung essentiell ([97][98]).

Allgemein werden alle Strömungszustände durch die Differentialgleichung von Navier-Stokes beschrieben. Nur in wenigen Ausnahmefällen und unter definierten Randbedingungen lässt sich aus dieser eine exakte analytische Lösung der Strömungsparameter ableiten. Zwei dieser Fälle bilden einerseits die „ebene Poiseuille-Strömung zwischen zwei Platten mit Druckgradient“ und die „laminare Strömung von inkompressiblen Medien in Röhren“ nach Hagen-Poiseuille. Erstere dient in dieser Arbeit der Ermittlung der Strömungszustände in der Perfusionskammer des Perfusionsrespirometers, letztere der Ermittlung dieser in Kapillaren der Hohlfasermodule.

### 4.6.1 Strömungszustände in der Perfusionskammer

Im folgenden werden die wirkenden Scherkräfte für die Kammer des Perfusionsrespirometers hergeleitet. Wie aus Abbildung 34 hervorgeht, handelt es sich hierbei vereinfacht um eine ebene Poiseuille-Strömung zwischen zwei Platten mit Druckgradient, aufgebracht durch den Spritzenmotor des Spritzenschlittens. Es wird von einer laminaren Strömung ausgegangen, somit gilt für die y sowie z Komponenten der Strömungsgeschwindigkeit  $w_{(y)}$  und  $w_{(z)}$ ,  $w_{(y)}=w_{(z)}=0$ . Der Druckabfall sei linear  $dP/dx=\text{konst.}$  entlang der Strecke  $x=l$  mit den Drücken  $P_{(x)}>P_{(x+dx)}$ , die max. Strömungsgeschwindigkeit in Richtung  $w_{(x)\text{max}}=dw/dy$  bei  $y=h/2$  und die Geschwindigkeiten  $w_{(x)}$  an den Wandgrenzen  $y=0$  und  $y=h$ ,  $w_{(x)}=dw/dy_{(y=0)}=dw/dy_{(y=h)}=0$ . Der Ansatz erfolgt über das Kräftegleichgewicht des Impulssatzes.



**Abbildung 34:** Skizze der Strömungen in der Perfusionskammer im X/Y Schnitt (A), im Z/Y-Schnitt (B) und vereinfacht dargestellt als Ebene Poiseuille Strömung zwischen 2 Platten mit Druckgradient (C)

Ausgehend von Kräftegleichgewicht  $F_P = F_T$

$$\frac{dP}{dx} \Delta x \Delta y = d \frac{\tau}{dy} \Delta x \Delta y \quad \text{bzw.} \quad \frac{dP}{dx} = d \frac{\tau}{dy} \quad \text{Formel (6)}$$

Durch Einsetzen des Newtonschen Scherstress für  $\tau$  in Gleichung 6

$$\tau = \eta \frac{dw}{dy} \quad \text{Formel (7)}$$

ergibt sich die Geschwindigkeitsverteilung zwischen den Platten

$$\eta \frac{(d^2 w)}{(d y^2)} = \frac{dP}{dx} \quad \text{Formel (8)}$$

Mit den Randbedingungen  $w_{(y)}=w_{(z)}=0$ ,  $dw_{(x)}/dy_{(y=0)}=dw_{(x)}/dy_{(y=h)}=0$  und  $y=h$   $G_p = \left(\frac{dP}{dx}\right)$  folgt nach Integration die Geschwindigkeitsverteilung über die Höhe  $h$ :

$$w = \frac{-G_p}{(2\eta)} * y(h-y) \quad \text{Formel (9)}$$

Durch Einsetzen von Formel 9 in 7 ergibt sich für den, auf die Wand ( $y=0$ ) wirkenden, gesuchten Scherstress durch Differenzierung an der Stelle  $y=0$

$$\tau = \eta \frac{(\delta w)}{(\delta y)_{y=0}} = -G_p \eta \frac{(h)}{(2\eta)} = -G_p \frac{h}{2} \quad \text{Formel (10)}$$

Für die Ermittlung des Durchflusses und damit des Druckgradienten  $G_p$  wird folgender Ansatz verwendet:  $Q = wA = \iint w dy dz = \bar{w}A = \bar{w}ah$ . Die Integration von 9 zwischen den Grenzen für  $y[0..h]$  und für  $z[0..a]$  liefert

$$G_p = \frac{(12\eta\bar{w})}{h^2} \quad \text{Formel (11)}$$

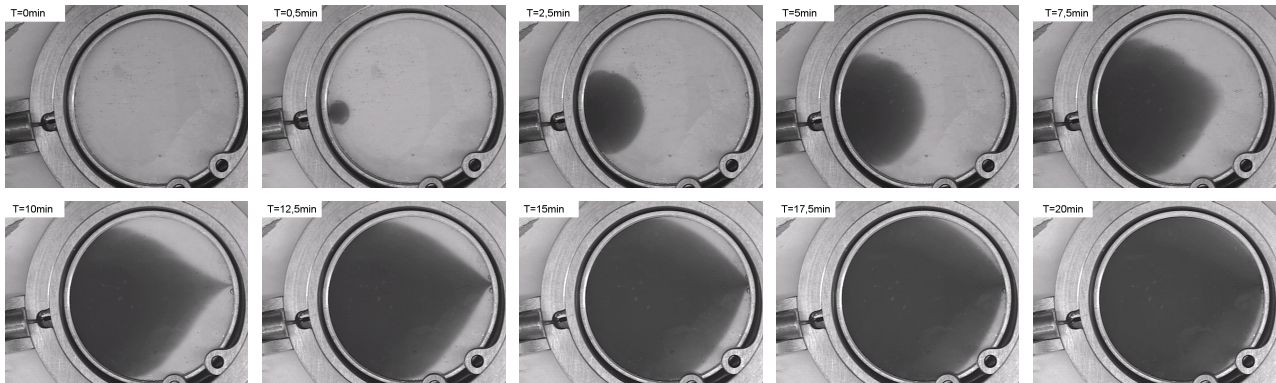
Durch Kombination der Formeln 10 und 11 ergibt sich der Scherstress auf die Zellen im Perfusionsrespirometer zu

$$\tau = \frac{(6\bar{w}\eta)}{h} \quad \text{oder} \quad \tau = \frac{(6Q\eta)}{(h^2 a)} \quad \text{Formel (12)}$$



#### 4.6.1.1 Strömungsverlauf in der Kammer

Die Strömungsform innerhalb der Kammer des Perfusionsrespirometers wurde mittels wässriger Methylenblaulösung visualisiert. Dazu wurde die bereits mit Wasser befüllte Kammer unter Standardbedingungen ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ,  $Q=5,8\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ ) mit der Farblösung perfundiert und alle 30s automatisch ein Bild genommen. Abbildung 35 zeigt den Verlauf des Strömungsbildes innerhalb von 20min.



**Abbildung 35:** Strömungsverlauf über Zeit in der Kammer des Perfusionsrespirometers

Aus Abbildung 35 geht hervor, dass am Ein- und Ausgang der Kammer keine „ebene Poiseuille-Strömung“ vorliegt. Es ist eher davon auszugehen, dass sich in den Übergangsbereichen aufgrund der angeschlossenen Kapillaren, eine röhrenförmige Strömung ausbildet. Somit kann der Scherstress in der Kammer an zwei Stellen und somit in Grenzen für Maximum (Eingang bzw. Ausgang) und Minimum (Kammermitte) berechnet werden. Dabei gelten für Eingang und Ausgang die Formeln der laminaren Rohrströmung (siehe 4.6.2) mit Durchmesser  $d=0,8\text{mm}$  der Kapillare und in der Mitte der Kammer die Gleichungen der „ebenen Poiseuille-Strömung“.

#### 4.6.1.2 Ergebnisse „Strömungszustände Perfusionsrespirometer“

Tabelle 4.14: Übersicht Strömungsparameter Perfusionskammer

Berechnungsort	Breite $a$ [mm]	Höhe $h$ [mm]	$A_q$ [mm <sup>2</sup> ]	$Q$ [ $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	$w$ [mm·s <sup>-1</sup> ]	$Re$	$\tau$ [dyn·cm <sup>-2</sup> ]
Kammermitte $\tau_{\min}$	37,1	1	37,1	100	0,045	0,07	0,002
Übergang Kapillare/Kammer $\tau_{\max}$	0,8	---	0,5	100	3,316	2,41	0,23

## 4.6.2 Strömungszustände in der Kapillare

Im Falle einer laminaren Strömung (Reynoldszahl  $Re < 2300$ ) innerhalb einer Kapillare kann von einer Hagen-Poiseuille Strömung ausgegangen werden. Hier sind die auftretenden Widerstandskräfte, damit der Druckabfall sowie die auf die Kapillarwände bzw. Zellen wirkenden Scherkräfte einzig und allein von der Viskosität, der inneren Reibung des strömenden Mediums, abhängig. Die folgende Betrachtung gilt im Falle von Newtonschen Flüssigkeiten  $\eta = const.$ ;  $\rho = const.$  und laminarer Strömung

$$Re = \frac{(\rho \bar{w} d)}{\eta} < 2300 \quad \tau = \eta \frac{dw}{dy} = const. .$$

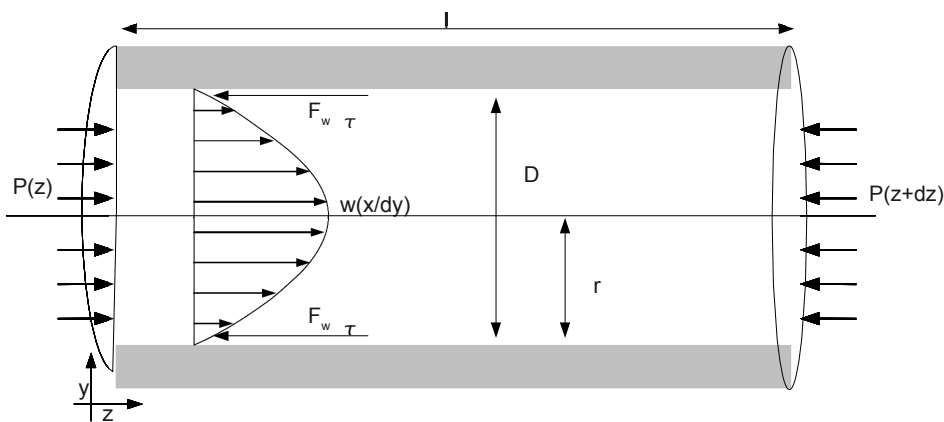


Abbildung 36: Laminare Rohrströmung nach Hagen-Poiseuille

Ausgehend von der Kräftebilanz der Strömung, Druckabfall gleich Reibungsverluste über Kapillarlänge, ergibt sich:

$$\frac{dP}{dz} \pi r^2 = F_w A \quad \text{Formel (13)}$$

oder mit  $F_w = \tau A_{wand}$   $\tau = \eta \frac{dw}{dy}$   $A_{wand} = 2 \pi r l$

$$\frac{dw}{dy} = \frac{dP}{dz} \frac{1}{(2 \eta)} r \quad \text{Formel (14)}$$

Durch  $A_q = \pi r^2$ ,  $\bar{w} = \frac{Q}{A_q}$  und Formel 14 ergibt sich mit den Randbedingungen

$w_{(d/2)} = \max$  und  $w_{(0)} = 0$  der Fluss Q:

$$Q = \int w \, dA_q = \bar{w} A_q = \frac{-dP}{dz} \frac{\pi}{(8\eta)} \cdot r^4 \quad \text{Formel (15)}$$

Durch Einsetzen von  $\frac{dP}{dz} = 8Q \frac{\eta}{(\pi r^4)}$  aus Formel 15 in Formel 13

$$F_w = 8Q\eta l \frac{r^2}{r^4} = \tau A_{wand} \quad \text{Formel (16)}$$

oder

$$\tau_{wand} = 8\eta \left( \frac{\bar{w}}{d} \right) \quad \text{Formel (17)}$$

#### 4.6.2.1 Scherstress auf Zellen mit ausgeprägtem Bürstensaum

Zellen des proximalen Tubulus bilden *in vivo* einen ausgeprägten Bürstensaum. In dem von diesen gebildeten Bereich kann davon ausgegangen werden, dass die auftretenden Strömungsgeschwindigkeiten und Scherkräfte zu vernachlässigen sind ([99][100]).

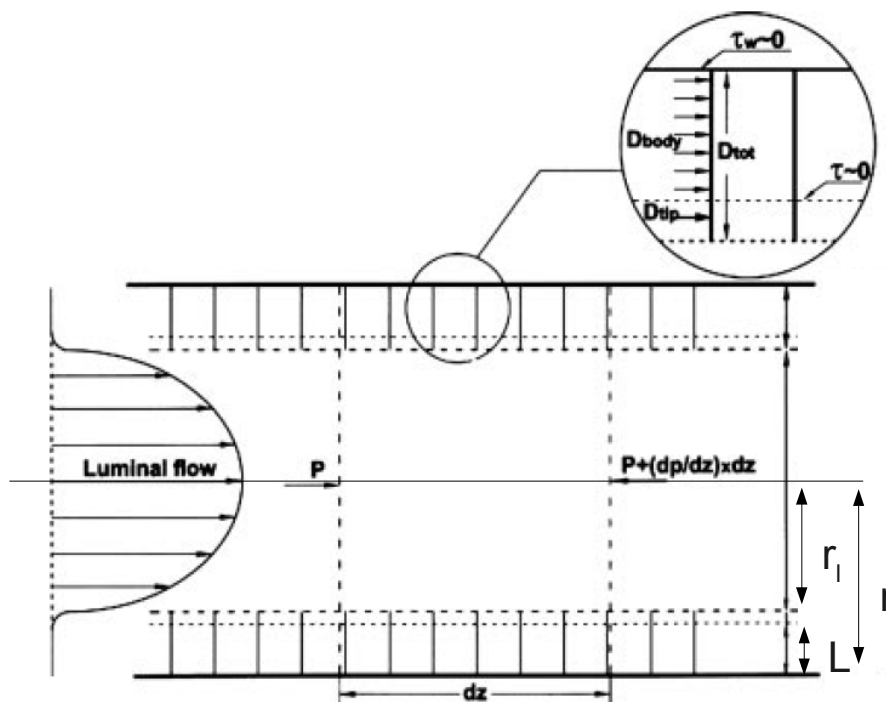


Abbildung 37: Strömung in Nephron mit Mikrovillobesatz nach [100]

Ausgehend von der in [100] vereinfachten Form der Berechnung aus [99] wurde Formel 16 in 4.6.2 in die folgende Form gebracht, um dichten Mikrovillibusatz bei der Ermittlung der Scherkräfte zu berücksichtigen und die hierbei auf die Mikrovillispitzen auftretenden Scherkräfte zu ermitteln. Dabei wird aus Formel 16:

$$F_w = 8Ql\eta \frac{(r_l + L)^2}{r_l^4} = \tau A_{wand} \quad \text{Formel (18)}$$

Hierbei bezeichnet L die Mikrovillillänge,  $r_l$  den Radius des offenen Lumens und  $r=r_l+L$  den Gesamtradius der Kapillare.

#### 4.6.2.2 Physiologische Strömungsparameter

Eine Ermittlung der *in vivo*-Parameter Q [nl·min<sup>-1</sup>], d [µm], die sich daraus ergebenden Größen w [mm·s<sup>-1</sup>], τ [dyn·cm<sup>-2</sup>] und damit die genaue Kenntnis der Strömungszustände innerhalb des Nephrons gestaltet sich als schwierig. Einerseits hängen d und Q nicht nur voneinander ab ([101][102]), sondern sind auch abhängig von vielen weiteren Parametern, wie z.B. dem Intrakapillardruck (Blutdruck), der Salzkonzentration des Primärharnes (TGF), dem Körpergewicht uvm. Weiterhin verändert sich entlang des Nephrons der Durchmesser d, als auch der Fluss Q. In [102] konnte allerdings gezeigt werden, dass zumindest die Strömungsgeschwindigkeit w entlang des proximalen Tubulus als konstant angesehen werden kann. Dadurch kommen für eine Abschätzung der notwendigen Parameter lediglich die Bedingungen am Anfang des Nephrons in Betracht, ableitbar aus der „single-nephron-glomerulus-filtration-rate“ (SNGFR) und dem dazugehörigen Durchmesser des proximalen Tubulusabschnitts direkt im Anschluss des Glomerulus. Für *in vivo* Messungen an der Ratte konnten hierzu Literaturquellen gefunden werden, in denen entweder die SNGFR oder der Durchmesser der Tubuli bestimmt wurden, wenige Quellen existieren dagegen allerdings, in denen beide Parameter (siehe Tab. 4.15) angegeben werden.

Für die Zustände in von Endothelien gebildeten Blutgefäßen existieren allerdings einige Angaben. Der hier auftretende mittlere Scherstress liegt zwischen 5-50 dyn·cm<sup>-2</sup> in Arteriolen und 3-5 dyn·cm<sup>-2</sup> in den größeren Gefäßen [103]. Diese Werte lassen sich aber aufgrund des fehlenden Bürstensaumes nur bedingt, wie in 4.6.2.1 dargestellt, auf die Epithelien des Nephrons übertragen. Allerdings wäre zu erwarten, dass im Falle eines nicht vorhandenen Bürstensaums der auftretende Scherstress etwa in einem Bereich von 1-5 dyn·cm<sup>-2</sup> liegen würde [99].

In Tabelle 4.15 sind Literaturwerte aus dem Nephron der Ratte dargestellt. Weitere hier aufgelistete Werte sind theoretische Betrachtungen und veröffentlichte Daten anderer BTKs. Weiterhin wurde anhand folgender Werte eine Überschlagsrechnung für die menschlichen Nephronen angestellt (GFR=120ml·min<sup>-1</sup>; n=2,5mio Nephronen; d<sub>n</sub>=40-60µm). Die fett und unterstrichen dargestellten Daten zeigen berechnete Daten gemäß der theoretischen Überlegungen in 4.6.2 mit folgenden Annahmen:

- Laminare „Rohrströmung“ durch den Tubulus Re<2300
- Viskosität und Dichte des Primärharnes ~ physiologischer Salzlösung bei 37°C:
  - η=6,84·10<sup>-4</sup> Pas; ρ=991kg·m<sup>-3</sup>

Tabelle 4.15: Vergleich der Strömungszustände im Nephron

Quelle	Scherstress [dyn cm <sup>-2</sup> ]	Messort	w [mm s <sup>-1</sup> ]	Q [nl min <sup>-1</sup> ]	d [m]	Re	Spezies	Was
[104]		P.T.;D.T.		33,9~36,7			Ratte	<i>in vivo</i> - Tubuli
[102]	<u>1-1,33</u>	P.T.	0,51	11-19	21-28	<u>0,016-0,021</u>	Ratte	<i>in vivo</i> - Tubuli
[105]		P.T.,D.T.		29,5-37				<i>in vivo</i> - Tubuli
[106]		P.T.		29,2-34,4			Ratte	<i>in vivo</i> - Tubuli
[101]		P.T.		26,5			Ratte	<i>in vivo</i> - Tubuli
	<u>2,26</u>	P.T.	<u>1</u>	<u>29</u>	<u>24,5</u>	<u>0,036</u>	Ratte	<b>Mittelwert</b>
[99]	1,96-3,14	P.T.	<u>0,37-0,96</u>	4 - 45	17-31,6	<u>0,009-0,044</u>	Ratte	<i>in vitro</i> - Tubuli; Theoretische Betrachtungen
[100]	<u>3,36-5,42</u>	P.T.	<u>0,74-1,7</u>	5 - 25	10-17,5	<u>0,013-0,044</u>	Maus	<i>in vitro</i> - Tubuli
[107]	<u>2,61</u>	P.T.	<u>0,96</u>	18	20	<u>0,028</u>	Ratte	Theoretische Betrachtung
[97]	<u>2,15</u>	P.T.	0,55	5	14	<u>0,011</u>	Ratte	„Annahmen in der Diskussion“
[72]	<u>2,27-4,54</u>		<u>8-16</u>	15625 - 31250	200	<u>2,4-4,8</u>		Humes-Modul
errechnet	<u>0,16-0,91</u>		<u>0,18-0,66</u>	<u>30-50</u>	<u>40-60</u>	<u>0,015-0,038</u>	Mensch	abgeschätzt

(**Fett** gedruckte Werte stellen angenommene Werte dar. **Fett und unterstrichene** Werte wurden aus den vorhandenen Werten der entsprechenden Zeile berechnet)

Wie aus Tabelle 4.15 zu entnehmen, ergibt sich in allen Fällen eine Reynoldszahl <<2300 und ein maximaler Scherstress von 5,42 dyn·cm<sup>-2</sup>, allerdings nur aus einem *in vitro* Versuch. Aufgrund der vorliegenden Daten wurde als maximaler Scherstress für Modulperfusionen ein Wert von 5 dyn·cm<sup>-2</sup> ausgewählt und die entsprechenden Perfusionsgeschwindigkeiten abgeleitet.

In Tabelle 4.16 sind die sich daraus ergebenden maximalen Flüsse für das innere Kompartiment dargestellt, sowie die minimalen nötigen Flüsse aufgrund des in 4.2 ermittelten Sauerstoffbedarfs. Bei den Berechnungen wurden folgende Annahmen gemacht:  $\eta=6,84 \cdot 10^{-4}$  Pas, maximale Zelldichte  $2000 \text{mm}^{-2}$ , Sauerstoffsättigung des Mediums  $0,22 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} = 7,04 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , Dichte des Mediums  $991 \text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ , Sauerstoffbedarf  $1,78 \cdot 10^{-3} \text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-6}$  Zellen, Länge der Mikrovilli  $2,5 \mu\text{m}$  und Höhe der Zellen  $10 \mu\text{m}$ .

Tabelle 4.16: Minimale und maximale Flussraten für Perfusionen des inneren Kompartimentes

Modultyp	n	d [ $\mu\text{m}$ ]	l [mm]	A [ $\text{mm}^2$ ]	Zellzahl [Mio]	$Q_{\text{max}1}$ [ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ] nach Formel 15	$Q_{\text{max}2}$ [ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ] nach Formel 16	$Q_{\text{OUR}}$ [ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ]
COOH-Plasma	50	100	150	2356	4,7	0,11	0,09	0,6
Miniflow 32	32	210	245	5172	10,3	0,95	0,87	1,4
Miniflow 64	64	210	245	10345	20,7	1,89	1,74	2,8
Miniflow 264	264	210	245	42672	85,3	7,8	7,2	11,5

## 4.7 Perfusionssystem

Zentraler Punkt dieser Arbeit war die Erstellung des Systems für die Durchführung von Perfusionsexperimenten mit in Hohlfasermodulen gebündelten Membrankapillaren. Mit diesen sollten bereits positiv bewertete Materialien in Kapillargeometrie mit Zellen getestet werden, der Umgang mit zellbesiedelten Modulen erlernt und Erkenntnisse hieraus auf die Systementwicklung angewendet werden.

### 4.7.1 Anforderungen und Parameter

An das System für Perfusionen für eine adhärente Kultur der Zellen auf der Innenfläche von Kapillaren wurden folgende Anforderungen gestellt:

- Sterile bzw. sterilisierbare Komponenten des Schlauchsystems und dessen Verbinder
- Keine zytotoxische Aktivität der Komponenten über den gesamten Perfusionszeitraum (2-8 Wochen)
- Möglichst einfaches Systemdesign und Handling
- Möglichkeit der späteren Automatisierung (Upscaling)

Darüber hinaus galt es eine Vielzahl von Parametern während der Einsaat und des Betriebs der Module zu beachten. In Tabelle 4.17 ist eine Auswahl dieser aufgeführt.

Allerdings war aufgrund experimenteller Limitationen, wie z.B. Platz im Brutschrank, Anzahl der Pumpen, Verfügbarkeit der Zellen, eine systematische Ermittlung der optimalen Zustände nur bedingt möglich.

*Tabelle 4.17: Auswahl einiger Modulperfusionsparameter*

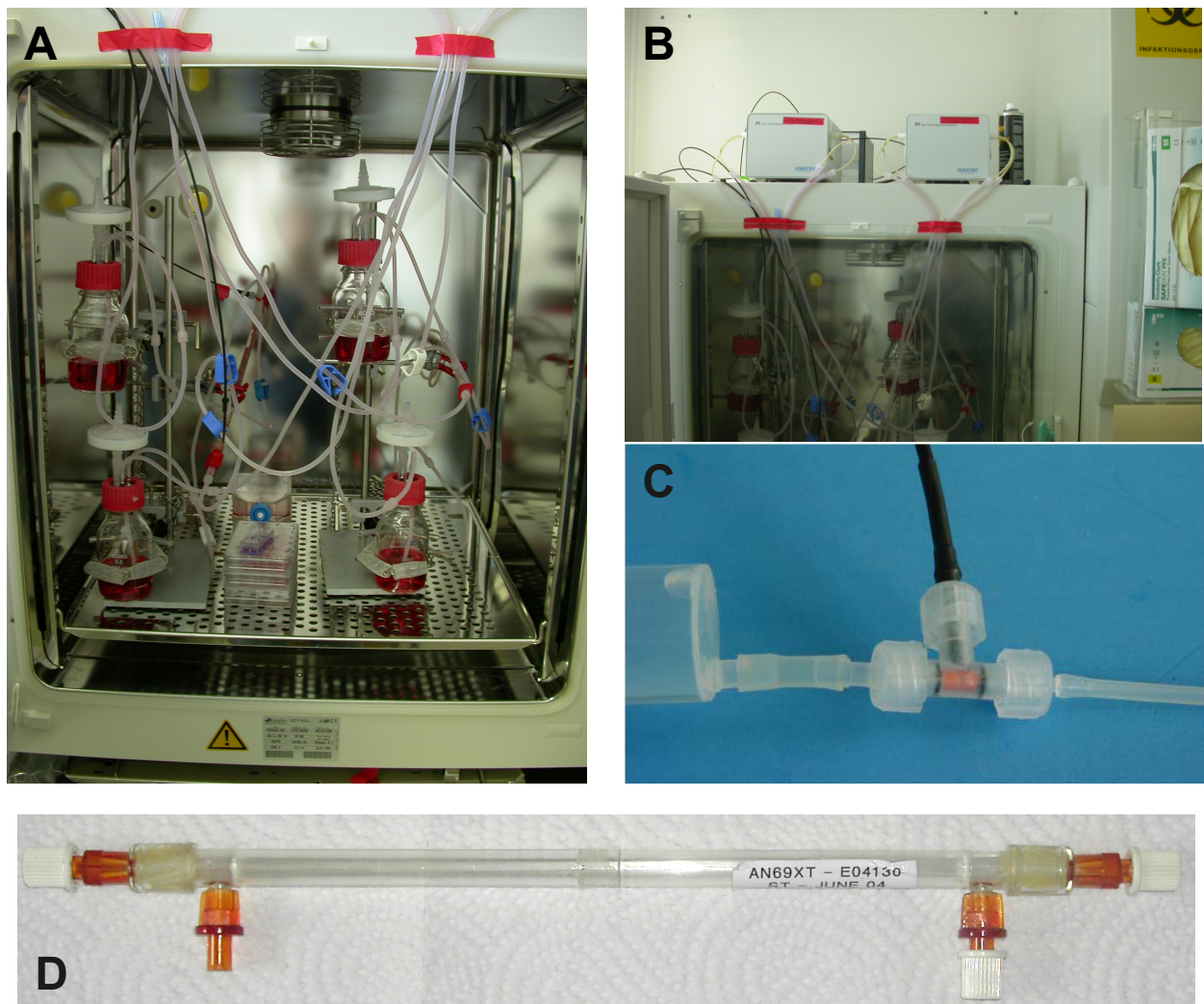
<i>Parameter Quelle</i>	<i>Parameter</i>	<i>Beeinflussbarkeit</i>
Einsaat	Einsaatgeschwindigkeit	+
Einsaat	Einsaatmodus	+
Einsaat	Anzahl der Einsaaten	+
Einsaat	Adhäsionszeit / Dauer der Phase	+
Einsaat / Zellquelle	Konzentration der Zellsuspension	o
Einsaat / Zellquelle	Einsaatdichte	o
Perfusion	Beginn IC Perfusion	+
Perfusion	Single Pass, Cycling	+
Perfusion	Schlauchmaterial	+
Perfusion	Reservoirvolumen	+
Perfusion	Modus nach Einsaat (innen vs. außen)	+
Perfusion	Perfusionsgeschwindigkeit	+
Perfusion	Druckdifferenz	+
Perfusion	Dauer der Proliferationsphase	o
Perfusion / Zellquelle	Verwendete Medien (IC vs. EC)	+
Zellquelle	Zelltyp	o
Zellquelle	Passage der Zellen	-

#### **4.7.2 Komponenten**

Das aus den oben genannten Anforderungen über den Versuchszeitraum dieser Arbeit entwickelte und optimierte System (Abb. 38) bestand im wesentlichen aus folgenden Komponenten:

- Hohlfasermodule (verschiedene Membranmaterialien)
- Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub> & 95% hum.)
- 4 Kanal – 12 Rollen Schlauchpumpe
- Stative (Befestigung des Moduls & der Reservoirflaschen)
- Schläuche (Silikon & Pharmed®)
- Luer(Lock) Verbinder aus Polypropylen
- Sauerstoffsensoren





**Abbildung 38:** Perfusionssystem: **(A)** 2 Module mit IC und EC Reservoirflaschen im Brutschrank. **(B)** Perfusionspumpen auf dem Brutschrank. **(C)** Miniatur-Sauerstoffsensoren der Firma Presens; **(D)** Mini-Hohlfasermodule mit 64 PEI-PAN Kapillaren

#### 4.7.2.1 Hohlfasermodule

Aus Membranmaterialien, die nach den Ergebnissen des Membranscreenings in 4.1 für eine Kultivierung in Frage kamen, wurden Kapillaren hergestellt, in Hohlfasermodule gebündelt (Abb. 38D) und bei Perfusionsexperimenten getestet. Eine Übersicht der in Perfusionen verwendeten Module, deren Membrantypen und geometrischen Daten im Vergleich zu Standard-Zellkulturflaschen (kursiv) sind in Tabelle 4.18 dargestellt.

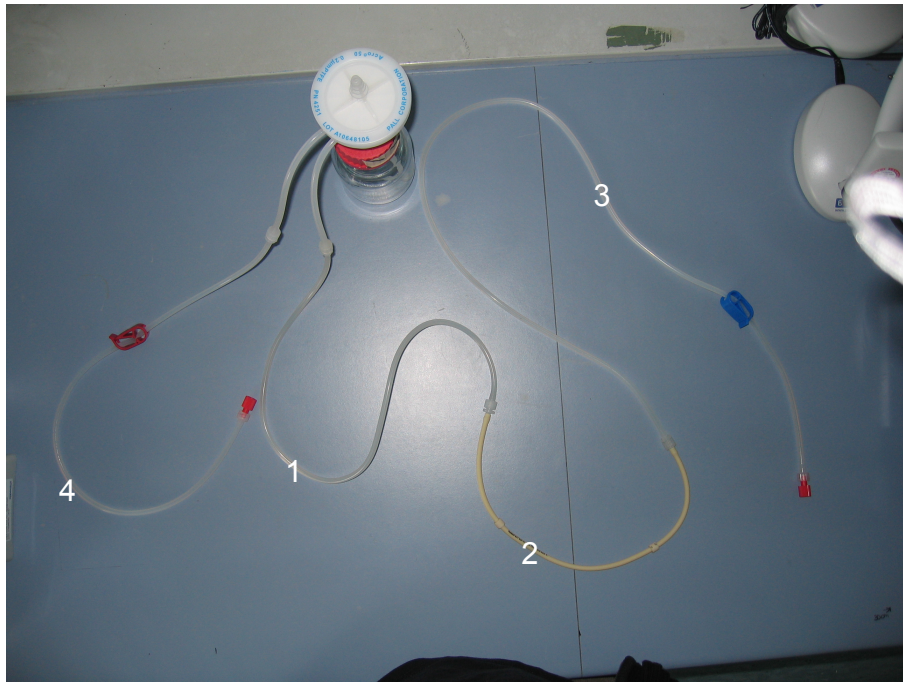


Tabelle 4.18: Verwendete Module und zugehörige geometrische Daten

<i>Membrantyp</i>	$N_{kapp}$	$d [\mu m]$	$l [mm]$	$A [mm^2]$	<i>Zellzahl [Mio] bei 2000mm<sup>2</sup></i>	<i>Kapillarovolumen [ml]</i>	$V/A [m \cdot 10^{-5}]$
Plasma-COOH	50	100	150	~2360	4,7	0,06	2,5
PEI-PAN	32	210	245	~5170	10,3	0,27	5,25
PEI-PAN	64	210	245	~10300	20,7	0,54	5,25
(PEI)-PAN	264	210	245	~42700	85,3	2,24	5,25
T25				2500	5	4	160
T75				7500	15	12	160

#### 4.7.2.2 Schlauchsystem

Das segmentierte Schlauchsystem für Perfusionen bestehend aus Reservoirflasche und den in Tabelle 4.19 aufgeführten Segmenten ist in Abbildung 39 dargestellt. Für je ein Modul kamen hiervon zwei Sätze zum Einsatz; einer pro Kompartiment. Während in ersten Perfusionen komplette, nicht segmentierte Schlauchsätze sterilisiert und an den Modulen zum Einsatz kamen, standen am Ende der Optimierung des Schlauchsystems segmentierte, mit PP-Luerverbinder ausgestattete Schlauchsätze. Die Schlauchsätze und Reservoirflaschen wurden vor Einsatz an Modulen dampfsterilisiert und erst unmittelbar vor Gebrauch unter sterilen Bedingungen zusammengefügt. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, einzelne Segmente wie z.B. den Pumpenschlauch gegen neue auszutauschen. Darüber hinaus konnten so Sauerstoffsensoren bei Bedarf an frei wählbaren Stellen in das Schlauchsystem eingefügt werden. Um eine möglichst geringe Zytotoxizität zu gewährleisten, kamen nur FDA-zertifizierte Silikon- und Pharmed® Schlauchmaterialien zum Einsatz. Bei längeren Perfusionszeiträumen wurden die Segmente in regelmäßigen Abständen durch neue ersetzt. Hauptaugenmerk lag hierbei auf dem Pumpenschlauch, welcher den stärksten mechanischen Belastungen unterlag.



**Abbildung 39:** Modulare Schlauchsätze für Modulperfusion mit den in Tabelle 4.19 aufgeführten Segmenten. Je einer dieser Sätze wird für jedes Kompartiment eines Modules verwendet.

*Tabelle 4.19: Segmente des Schlauchsatzes*

<i>Segment</i>	<i>Segmentbeschreibung</i>
1	Verbindung Reservoirflasche zu Pumpenschlauch
2	Pharmed® Pumpenschlauch
3	Verbindung Pumpenschlauch zu Eingang Modul
4	Verbindung Modul zu Reservoirflasche

#### **4.7.2.3 Pumpen**

Die verwendeten Pumpen sollten für eine möglichst pulsationsfreie und gleichmäßige Perfusion sorgen. Die Wahl fiel hierbei auf 4 Kanal-Schlauchpumpen mit 12 über ein Planetengetriebe angetriebenen Rollen. Durch Variation der Pumpendrehzahl und des -schlauchdurchmessers wurden unterschiedliche Perfusionsflüsse erreicht, um dem Sauerstoffbedarf bei unterschiedlichen Modulgeometrien (Anzahl der Kapillaren) aber auch Zelltypen (Zelllinie, Primärzellen) gerecht zu werden. Aufgrund technischer Eigenschaften der Pumpen konnten diese nicht direkt im Brutschrank eingesetzt werden, sondern mussten außerhalb des Brutschrankes positioniert werden (Abb.38B).

## 4.7.3 Entwicklung der Modulkultivierungsmethoden

### 4.7.3.1 Einsaatmethode

Das Befüllungsverfahren bildete den kritischsten Punkt der Modulperfusionen. Das Verfahren musste in seinen Einstellgrößen (Tabelle 4.20) so gewählt werden, dass eine größtmögliche Verteilung der Zellen entlang und über die Gesamtheit der Kapillaren gewährleistet war, ohne dass es zu Bildungen von Okklusionen oder leeren Kapillaren kam. Der zeitliche Rahmen sowie die mechanischen Belastungen mussten möglichst gering gehalten werden, um eine maximale Viabilität der eingesäten Zellen zu erreichen. Des Weiteren musste vermieden werden, dass in die bereits gespülten und Flüssigkeit enthaltenden Kapillaren während der Einbringung der Zellen Luftblasen in diese eingespült werden, da diese einzelne Kapillaren sehr effektiv blocken können.

Tabelle 4.20: Parameter der Modulbefüllung

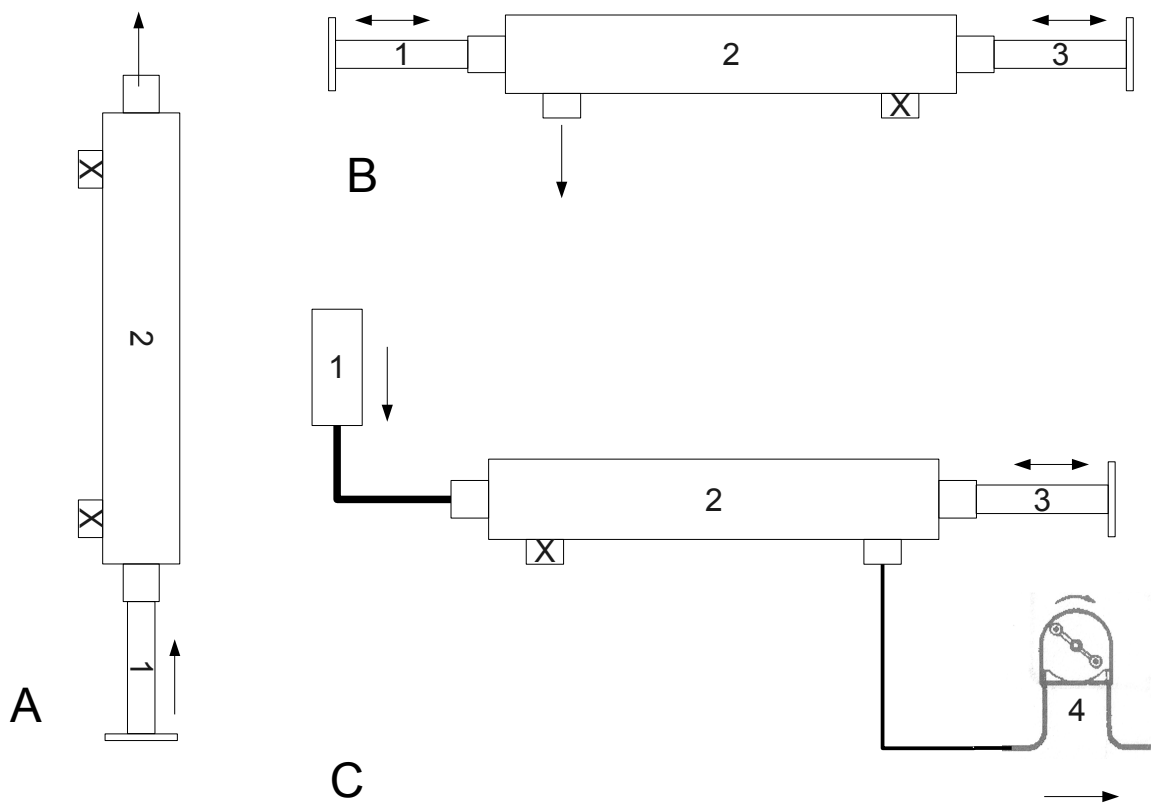
Parameter	Einstellgrößen
<ul style="list-style-type: none"><li>• Verteilung entlang der Kapillare</li><li>• Verteilung über die Gesamtkapillaren</li><li>• Viabilität der Zellen</li><li>• Zielzelldichte [<math>\text{mm}^{-2}</math>]</li><li>• Okklusionbildung</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Zelldichte in der Zellsuspension</li><li>• Volumen der Zellsuspension</li><li>• Medium der Zellsuspension</li><li>• Art der Befüllung</li><li>• Grad der Vereinzlung</li><li>• Zeitlicher Rahmen</li></ul>

Prinzipiell sind verschiedene Methoden für das Einbringen der Zellen in die Module denkbar (Tab. 4.21 und Abb. 40), wie z.B. ein Einbringen über sterile Spritzen oder Umpumpen der Zellsuspension durch das Modul. Problematisch sind dabei das Volumen/Fläche-Verhältnis innerhalb der Kapillaren (siehe Tab. 4.18) und die mechanische Belastung der Zellen in der Suspension. Das Kapillarvolumen ist sehr klein in Bezug auf die von diesem gebildete Fläche und im Vergleich zu den in Zellkulturflaschen verwendeten Volumina um den Faktor 32-64 kleiner. Somit ergibt sich eine sehr hohe Zelldichte im Suspensionsvolumen der Einsaat, wenn alleine mit dem Kapillarvolumen gearbeitet wird. Ein höheres Suspensionsvolumen ist zwar einerseits wünschenswert, um einer Bildung von Okklusionen vorzubeugen sowie eine bessere Verteilung innerhalb der Kapillaren z.B. durch Umpumpen zu erreichen, führt aber andererseits zu einer Verminderung der Effektivität der Einsaat, da von der Gesamtzellzahl je nach Verdünnung nur ein Bruchteil der Zellen innerhalb der Module verbleibt.

Abhilfe bei dieser Problematik bringt ein filtrierendes Einbringen der Zellen in die Module wie in Methode 3.3.2 beschrieben. Hierbei wird die verdünnte Zellsuspension filtrierend in die Module eingebracht, d.h. das Suspensionsvolumen wird innerhalb der Module über die Kapillarmembranen reduziert. Um dabei für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu sorgen und die Möglichkeit zu haben Luftblasen auszutreiben, wurde am inneren Kompartiment eine mit kalziumfreier Salzlösung (PBS/HBSS) gefüllte Spritze angebracht.

*Tabelle 4.21.: Einsaatverfahren und deren Vor- und Nachteile*

<b>Verfahren</b>	<b>Vorteile / Nachteile</b>
Einbringen der Zellsuspension durch Spritze; Volumen = Kapillarovolumen + Totvolumen der Endkappen und Anschlüsse (Abb. 40A)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• + schnelles und in der Ausführung einfaches Verfahren</li> <li>• - sehr hohe Zelldichte der Zellsuspension = Okklusionsbildung (siehe Abb. 41B)</li> <li>• - schlechte Verteilung</li> <li>• - evtl. Auftreten von hohen Drücken und mechanischen Belastungen durch manuelles Applizieren</li> </ul>
Einbringen einer verdünnten Zellsuspension durch Spritzen; Volumenreduktion und Verteilung der Zellen über hin- und hertransferieren der Zellsuspension zwischen den Spritzen (Abb. 40B)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• + Möglichkeit mit verdünnteren Zellsuspensionen zu arbeiten</li> <li>• - begrenzte Volumina eingeschränkt durch Spritzenvolumen</li> <li>• - hohe mechanische Belastungen der Zellen durch manuelles Applizieren</li> <li>• - Hantierbarkeit</li> <li>• - längere Bearbeitungszeit</li> </ul>
Einbringen und tangentielle Filtration über Pumpe, zusätzliche Spritze am inneren Kompartiment für eine gleichmäßigere Verteilung (Abb. 40C)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• + Möglichkeit mit verdünnteren Zellsuspensionen zu arbeiten</li> <li>• + begrenzte mechanische Beanspruchung der Zellen durch definierten Filtrationsstrom (Pumpe)</li> <li>• + bessere Hantierbarkeit</li> <li>• + bessere Verteilung</li> <li>• + Automatisierbar über Drucksensoren</li> <li>• - längere Bearbeitungszeit</li> </ul>



**Abbildung 40:** Verschiedene Einsaatverfahren **(A)** Befüllung über Spritze: (1) Befüllungsspritze, (2) Modul. **(B)** Befüllung über 2 Spritzen mit Volumenreduktion: (1) Befüllungsspritze, (2) Modul, (3) 2. Befüllungsspritze. **(C)** Befüllung und Volumenreduktion über Pumpe: (1) Zellsuspensionsreservoir, (2) Modul, (3) Spritze für Verteilungsoptimierung, (4) Schlauchpumpe

Die Anwendung der in 3.3.2 beschriebenen und Abb. 40C dargestellten Methode wurde durch die in Tabelle 4.22 aufgeführten Maßnahmen ergänzt, um die Effizienz der Einsaat zu steigern.

*Tabelle 4.22.: Weitere Optimierungen der Moduleinsaat*

Maßnahme	Erwünschter Effekt
Schonendere Vereinzelnung (Accutase statt Trypsin)	Viabilität
Verwendung von Ca <sup>2+</sup> freie Suspensionslösungen	reduzierte Bildung von Okklusionen
Herunterkühlen (4°C) der Zellsuspension bei Zentrifugation und Verwendung vorgekühlter Lösungen	Viabilität
Rotierend-, schwenkendes Befüllen	Verteilung
Nach Befüllung alle 20 min. schwenken und anschließendes Drehen der Module im Brutschrank um 90°	Verteilung

#### **4.7.3.2 Perfusion in der proliferativen und konfluenten Phase**

Die Perfusion in der proliferativen Phase der Zellen erfolgte in den ersten 10 Tagen aufgrund der Ergebnisse in 4.8.2.1 nur EC. Eine angestrebte permanente Perfusion beider Kompartimente kam aufgrund der vorhandenen Ultrafiltration und dem damit vorhandenen Volumenverlust im inneren Kompartiment nur bedingt in Frage. Hierbei spielte die Permeabilität der von den Zellen gebildeten Monolayer eine wichtige Rolle. Um dennoch die Differenzierung der Zellen durch den mechanischen Reiz der Strömung zu unterstützen erfolgte nach 10-14 Tagen zusätzlich zur EC Perfusion eine IC Perfusion, anfangs intermittierend mit steigender Flussrate und daraufhin weitgehend im inneren Kompartiment der Module.

#### **4.7.3.3 Analytik und Sensorik**

Aufgrund mangelnder visueller Anhaltspunkte während der Perfusionen wurden folgende analytische Methoden angewendet, um auf den Zustand der Zellen innerhalb der Kapillaren zu schließen:

- Ermittlung der Glukoseaufnahme
- Ermittlung der Laktatbildung
- Ermittlung der ausgespülten Zellen
- Ermittlung der Dichtigkeit gegenüber Farbstoffen (Phenolrot bzw. FITC-Inulin)
- Ermittlung der Ultrafiltration

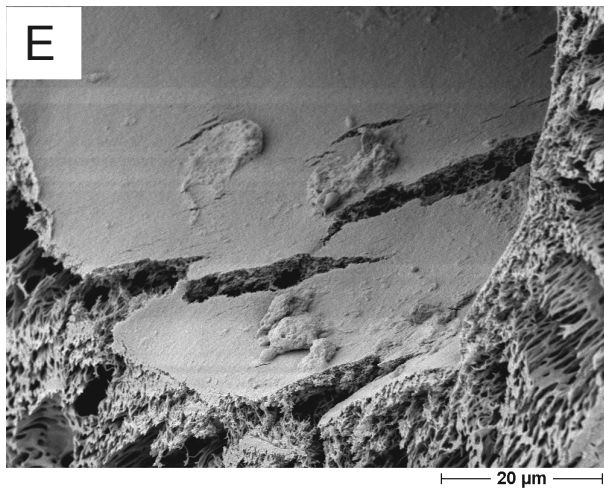
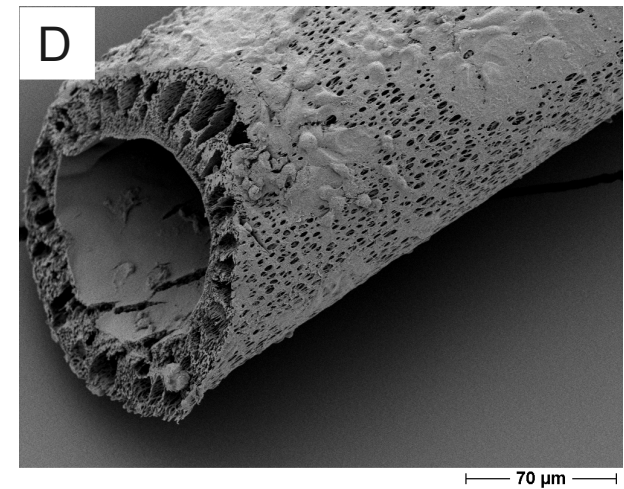
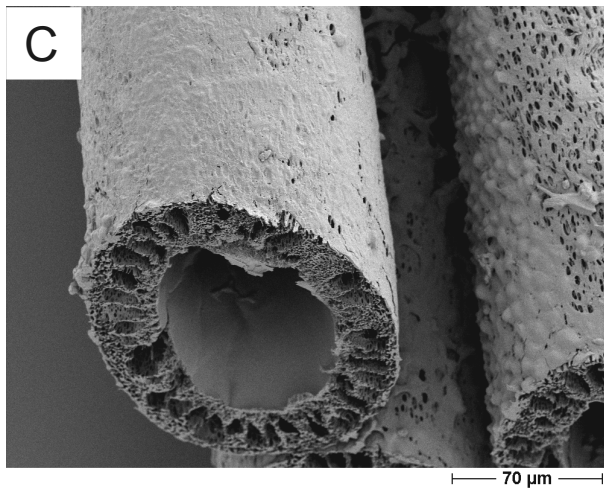
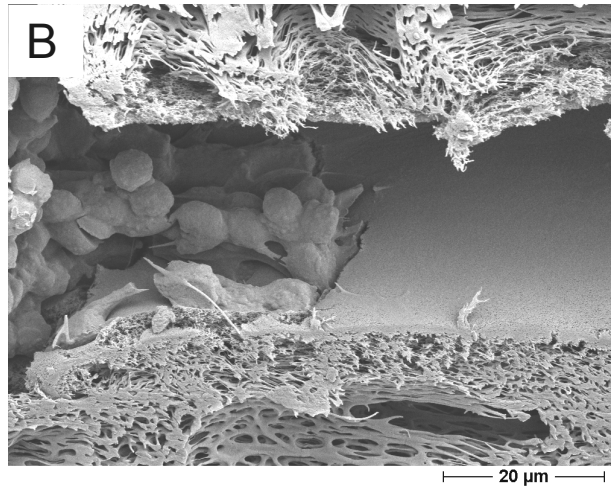
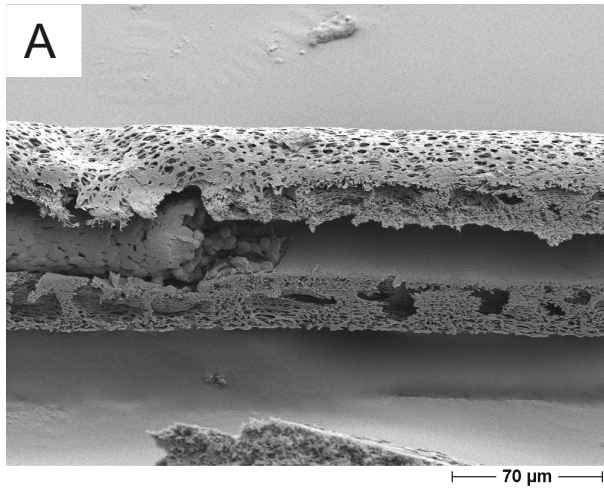
Bei späteren Perfusionen standen sterilisierbare Sauerstoffsensoren zur Verfügung, die in das Schlauchsystem der Perfusion eingebracht werden konnten. Aufgrund mangelnder mechanischer Belastbarkeit war es allerdings nicht möglich, diese Sensoren über den gesamten Zeitraum der Perfusion im Schlauchsatz zu belassen. Diese konnten nur in Intervallen in die Schlauchsätze eingebracht werden.

## **4.8 Ergebnisse Modulperfusionen**

### **4.8.1 COOH-plasmafunktionalisierte Membrankapillaren**

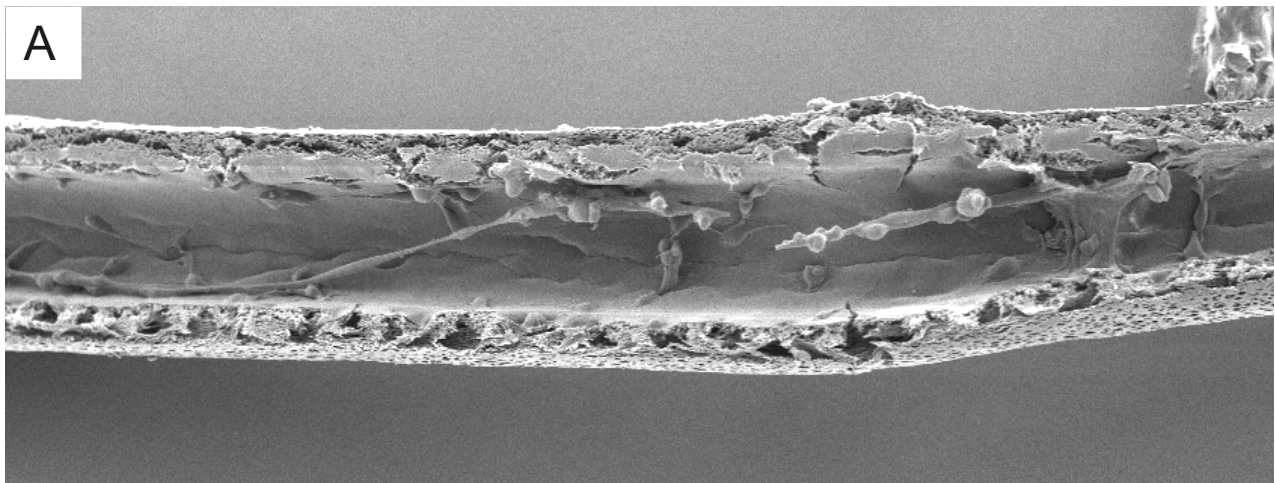
In ersten Modulperfusionen kamen COOH-plasmafunktionalisierte Membranen zur Anwendung. Einerseits sollte bei diesen Versuchen der Erfolg der Plasmamodifikation der Kapillarmembranen mit Zellen überprüft werden, andererseits galt es, erste Befüllungs- und Perfusionstechniken zu erproben. Mehrere Perfusionen unterschiedlicher Laufzeit wurden mit MDCK und primären, humanen Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dabei über die in Abb. 40A und 40B beschriebenen Methoden in die Module eingebracht. Nach Abschluss der Perfusionen wurden die Module nach Methode 3.4.1.1 und 3.4.2.2 für REM-Untersuchungen präpariert und zufällig ausgewählte Segmente mit dem REM abgesucht und dokumentiert. Abbildungen 41 und 42 zeigen repräsentative Einzelbilder verschiedener Perfusionen mit plasmamodifizierten Membranen. Ersichtlich werden hierbei Probleme während der Einsaat sowie Probleme mit dem Membranmaterial.

Keine der verwendeten Zelltypen adhärirt in gewünschter Weise an das Material. Abbildungen 41A&B zeigen eine scharfe Abgrenzung zwischen leerer unbewachsener Membran und gebildeter Okklusion. Noch eindeutiger nachgewiesen wurden die mangelnden adhäsionsfördernden Eigenschaften des Membranmaterials in Abbildung 42A-D mit primären Zellen. Diese adhärirten kaum an das verwendete Material, haften nur an wenigen Stellen an und präferieren eine Bindung an Zellen, ähnlich der Ergebnisse in 4.1 auf Blendmembranen. Im Gegensatz dazu scheinen die gewünschten Eigenschaften des Materials auf der Außenseite der Kapillaren vorzuliegen (Abb. 41C&D). Ausgehend von diesen Ergebnissen, wurden weitere Versuche mit plasmafunktionalisierten Membrankapillaren eingestellt und das Einsaatverfahren nach Abb. 40C entwickelt.

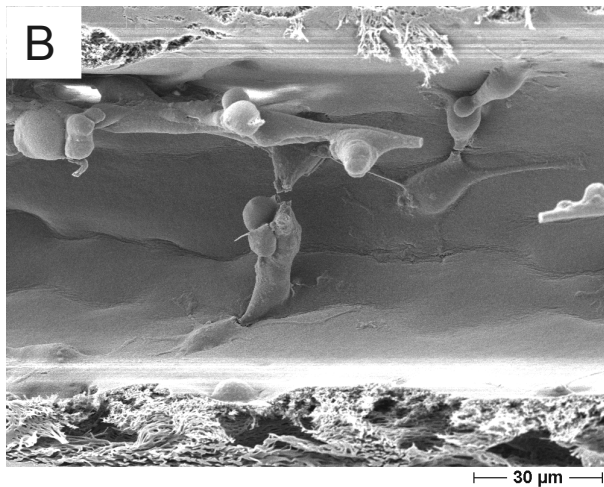


**Abbildung 41:** Auswahl repräsentativer REM-Bilder erster Befüllungs- und Perfusionsstudien mit MDCK-Zellen in COOH – plasmamodifizierten Membrankapillaren; in **A** und **B** sind Okklusionbildung und mangelhafte Adhäsion der Zellen im davorliegenden Bereich ersichtlich; **C**, **D** und **E**: Starkes Zellwachstum auf der Außenseite der Kapillaren, kaum Adhärenz und Wachstum innerhalb der Kapillaren.

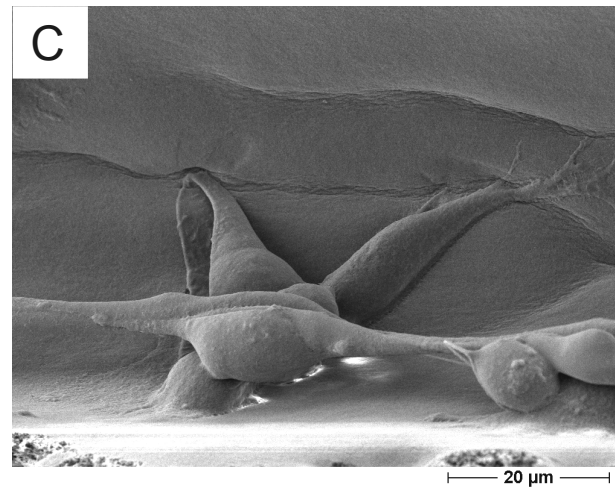




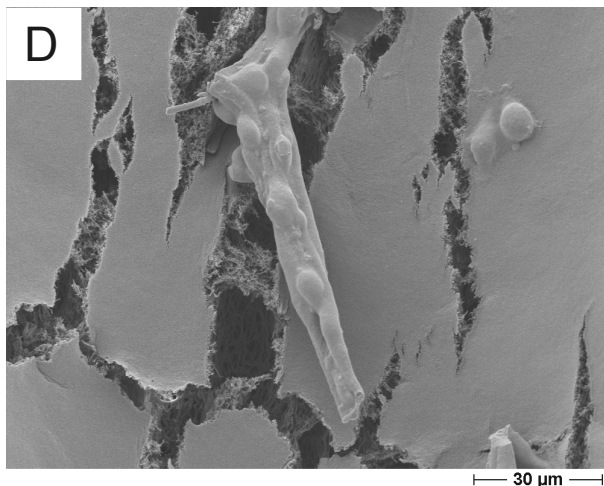
200 µm



30 µm



20 µm



30 µm

**Abbildung 42:** Auswahl repräsentativer REM-Bilder mit den Ergebnissen erster Befüllungs- und Perfusionsstudien mit primären, humanen-Nierene epithelzellen in COOH – plasmamodifizierten Membrankapillaren; die Zellen zeigen durchweg sehr schlechte Adhäsion auf dem verwendeten Membranmaterial.

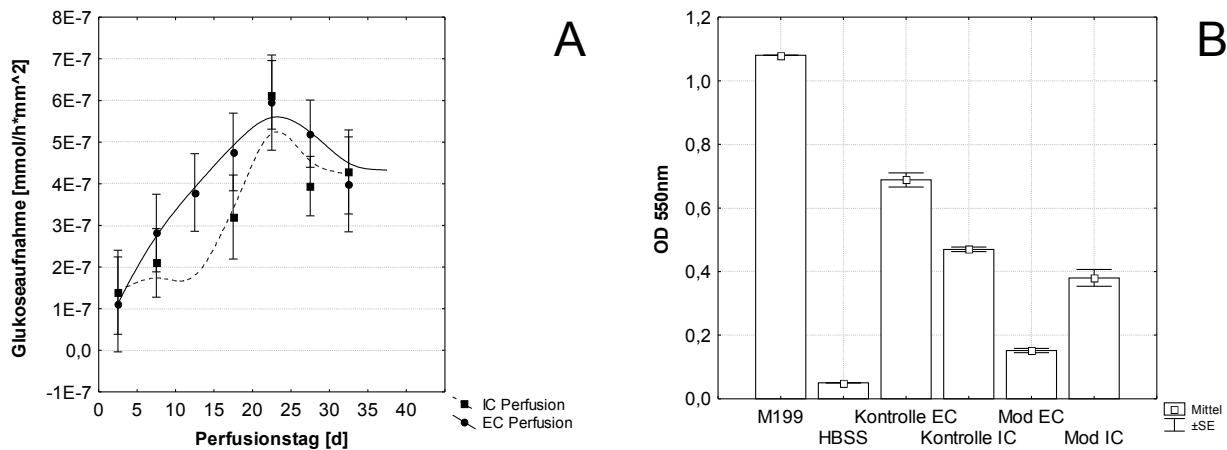
#### 4.8.2 Kapillaren aus (PEI-) PAN

Durch die Verwendung von Modulen mit asymmetrisch funktionalisierten PEI-PAN Membrankapillaren konnte das neu entwickelte Einsaatverfahren angewendet und weitere Perfusionsparameter optimiert werden. Bei diesem industriell gefertigten Material konnte davon ausgegangen werden, dass dessen in 4.1 gezeigten positiven Eigenschaften auch

in der Kapillargeometrie vorlagen. Somit waren Probleme bei Adhäsion und Proliferation nicht auf das Membranmaterial zurückzuführen, sondern auf Parameter der Perfusionsdurchführung oder Zellen wie z.B. Einsaat, Perfusionsmodus sowie Medienzusammensetzung oder mangelnde Proliferationskapazität durch Seneszenz. Hilfreich für die weiteren Versuche war die optisch transparente Eigenschaft des Materials. Somit konnten für die Beurteilung des Zustandes der epithelialen Monolayer und des Differenzierungsstatus der Zellen über REM-Beurteilungen hinaus, Phasenkontrastmikroskopie und Immunofluoreszenzverfahren, wie in Kapitel 3.4.2.3 dargestellt, zur Anwendung kommen. Die Versuche wurden aus Gründen der Verfügbarkeit sowie Hantierbarkeit einerseits mit den Zelllinien MDCK und HK2 durchgeführt, andererseits wurden in diesen Versuchen Module mit Membrankapillaren aus PAN ohne luminale PEI Beschichtung verwendet.

#### **4.8.2.1 Perfusionsstrategie nach Einsaat**

Mittels MDCK Zellen in Modulen mit PAN Kapillaren wurde ermittelt, inwieweit eine frühe Perfusion (ab Tag 2 nach Einsaat) des inneren Kompartiments die Proliferation der Zellen und Monolayerdichtigkeit nach 8 Tagen Perfusion beeinflusst. Dazu wurden in zwei Module (264 Kapillaren) jeweils ~30mio Zellen nach Einsaatmethode in 3.3.2 eingebracht. Ab Tag 2 wurde eines der Module ausschließlich IC, das andere weiter EC perfundiert. Für eine Ermittlung der Proliferation wurde die absolut aufgenommene Glukosemenge [ $\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}$ ] der Module ermittelt und auf die Fläche der Module ( $40200 \text{ mm}^2$ ) bezogen.

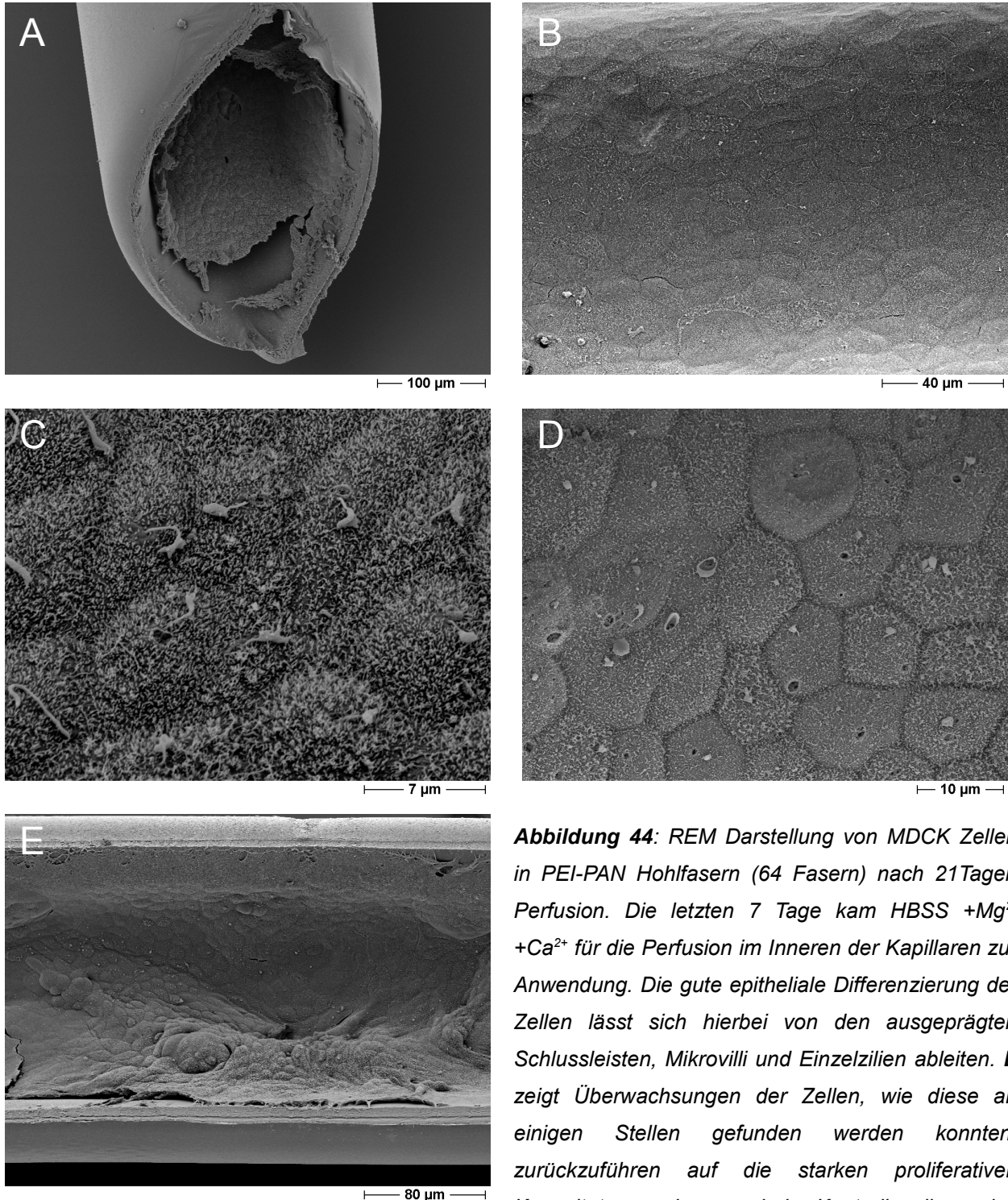


**Abbildung 43:** (A) Glukoseaufnahme als Proliferationsnachweis (5 Tage Mittelwerte). Die gestrichelte Linie zeigt hierbei die Glukoseaufnahme in [mmol·h<sup>-1</sup>·mm<sup>-2</sup>] eines MDCK-Modules mit IC Perfusion ab Tag 2-8. Im Vergleich dazu, die durchgängige Linie eines in diesem Zeitraum ausschließlich EC perfundierten Modules. In beide Module (n=264 Kapillaren) wurde die gleiche Zellzahl eingebracht [~30mio Zellen=730 mm<sup>2</sup>]. (B) Dichtigkeit der Monolayer beider Module anhand des IC-Übertritts von Phenolrot am Tag 8 nach Einsaat im Vergleich zu Kulturmedium M199, HBSS Salzlösung und Kontrollen eines unbesiedelten Modules.

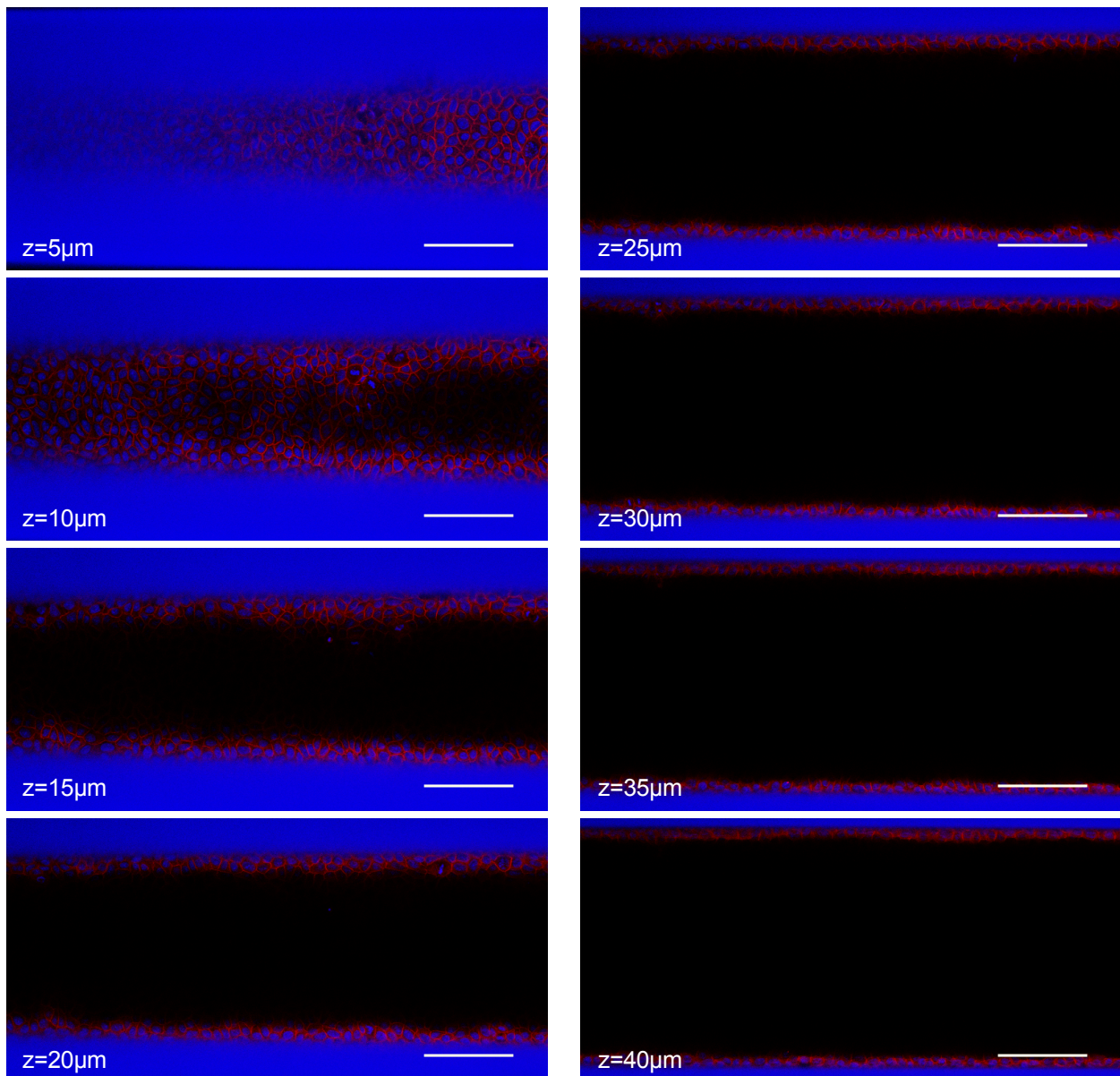
Aus Abbildung 43 geht hervor, dass eine direkte innere Perfusion einen negativen Einfluss auf das indirekt gemessene Proliferationsverhalten und die Monolayerdichtigkeit nach 8 Tagen hat. Das nur EC perfundierte Modul zeigt bereits nach ~10 Tagen eine fast dreifache Glukoseaufnahme bezogen auf den Ausgangswert, während das IC perfundierte Modul nur eine schwache Steigerung der Aufnahme aufweist. Trotz eines Wechsels auf eine ausschließliche EC Perfusion dieses Modules ab Tag 9 wurde eine entsprechende Aktivität des Schwestermoduls im Perfusionsverlauf nicht erreicht. Es zeigt sich zusätzlich eine sehr lange lag-Phase (Tag 5-13) ohne weiteren Anstieg der Aufnahme bis nach Tag 4 des Wechsels auf den EC-Perfusionsmodus. Am Tag 8 dieses Versuches wurden Dichtigkeitsmessungen der Module durchgeführt. Hierfür wurden beide Module IC mit HBSS und EC mit M199+10%FCS perfundiert. Das IC-Medium wurde nach Moduldurchgang aufgefangen und die Phenolrot-Extinktion nach Methode 3.2.2.10 ermittelt. Als Kontrolle diente ein unbesiedeltes Modul. Die in 43 abgebildeten Ergebnisse waren der Anlass für einen Wechsel des ausschließlich IC perfundierten Moduls auf eine EC-Perfusion und die Anpassung der Perfusionsprotokolle auf eine ausschließliche EC-Perfusion von 10-14Tagen nach Einsaat.

#### 4.8.2.2 Ergebnisse MDCK

Im folgenden sind die Ergebnisse verschiedener Perfusionen von MDCK Zellen in Modulen mit Kapillaren aus PAN sowie PEI-PAN dargestellt. Hierbei kamen die optimierten Einsaat- und Perfusionsmethoden zum Einsatz.

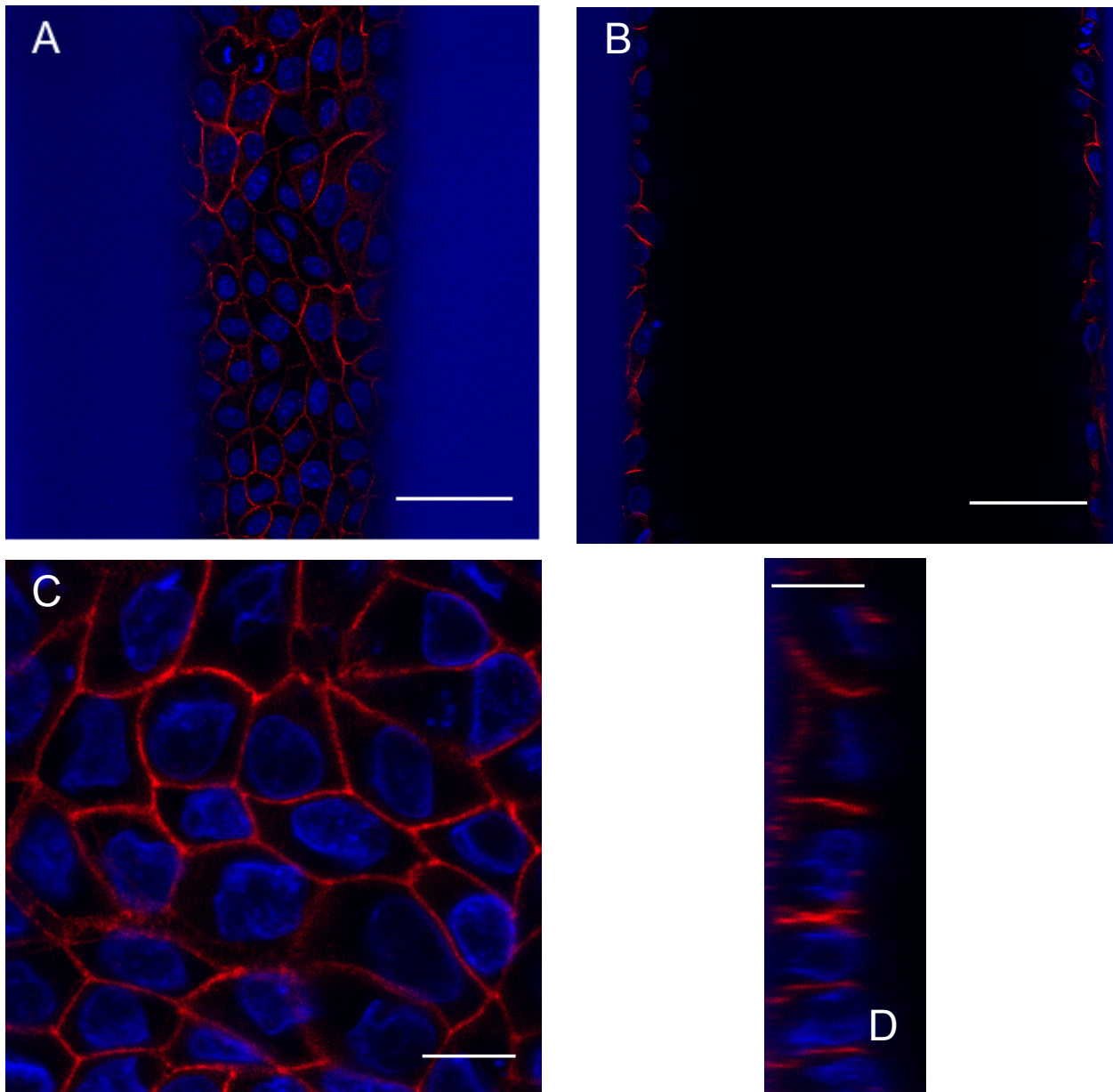


**Abbildung 44:** REM Darstellung von MDCK Zellen in PEI-PAN Hohlfasern (64 Fasern) nach 21 Tagen Perfusion. Die letzten 7 Tage kam HBSS +Mg<sup>2+</sup> +Ca<sup>2+</sup> für die Perfusion im Inneren der Kapillaren zur Anwendung. Die gute epitheliale Differenzierung der Zellen lässt sich hierbei von den ausgeprägten Schlussleisten, Mikrovilli und Einzelzilien ableiten. **E** zeigt Überwachungen der Zellen, wie diese an einigen Stellen gefunden werden konnten, zurückzuführen auf die starken proliferativen Kapazitäten und mangelnde Kontrolle dieser bei Zelllinien.



**Abbildung 45:** Konfokale Darstellung von MDCK-Zellen in PAN Kapillaren (264 Fasern) nach 28 Tagen (blau Nucleii, rot E-Cadherine) in verschiedenen z-Ebenen. Aus dem, in der Abbildung ersichtlichen, gut ausgebildeten Adhesion-Belt geht hervor, dass die Zellen eine komplett geschlossene, epitheliale Monolayer innerhalb der Kapillare bilden. Maßstab: 100µm

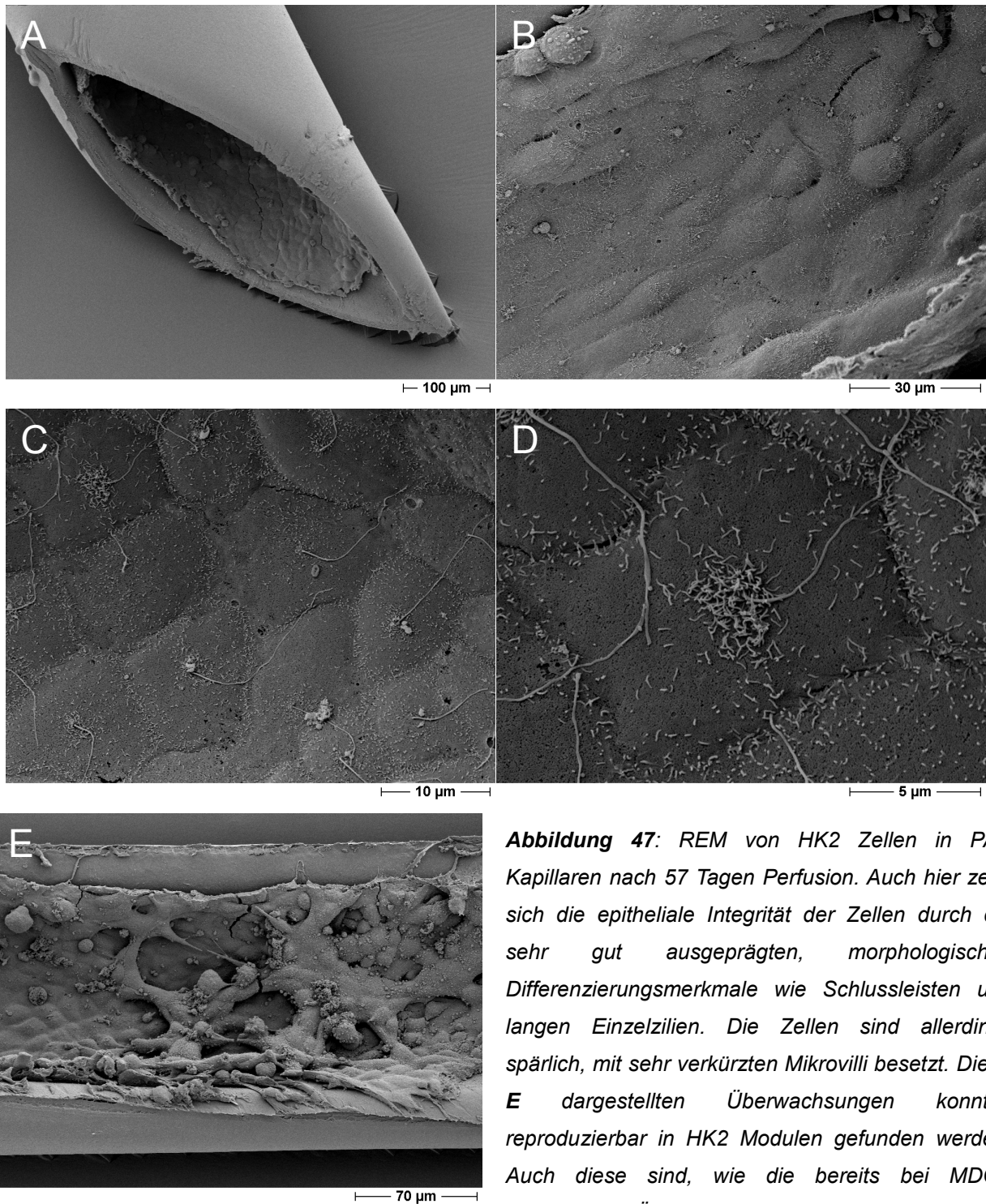




**Abbildung 46:** Konfokale Darstellung von MDCK-Zellen in PAN Kapillaren (264 Fasern) nach 28 Tagen (blau Nucleii, rot E-Cadherine). In (A) MDCK-Monolayer direkt unter der Membrandecke, (B) auch in tieferen Bereichen der Kapillare liegt Konfluenz vor. (C) Vergrößerter Abschnitt des gebildeten Epithels mit Y/Z-Schnitt in (D) Stark ausgeprägter Adhesion-Belt und E-Cadherin Lokalisierung zwischen den Zellen. Maßstab: (A&B) 50µm, (C&D) 10µm.

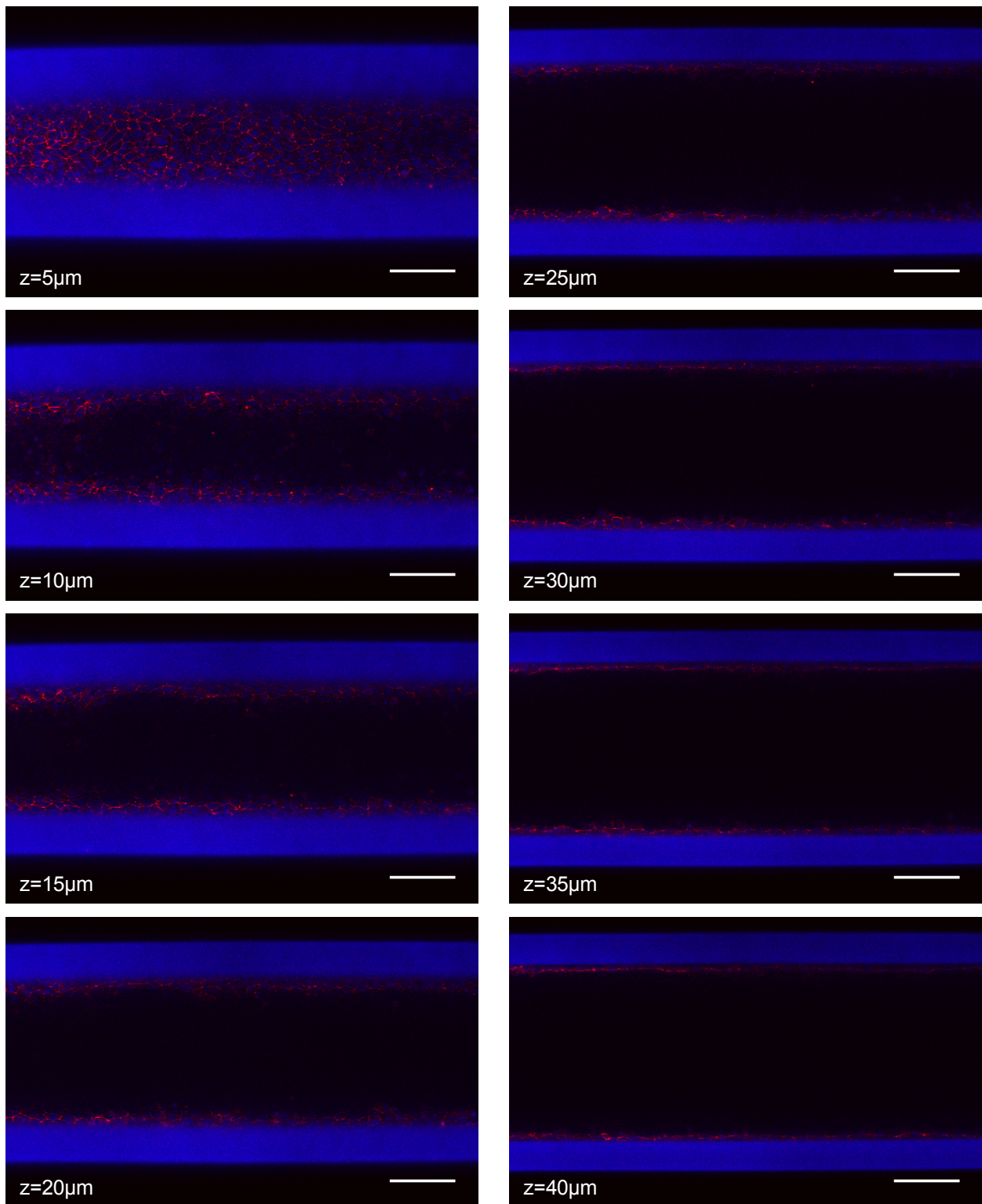
#### 4.8.2.3 Ergebnisse HK2

In Folgeversuchen wurden die positiven Ergebnisse der MDCK - Besiedelungsversuche mit der humanen, proximalen, Tubulusepithelzelllinie HK2 unter Verwendung der gleichen Methoden validiert. Auch die HK2 Zellen neigten in den Modulperfusionen bei länger Kultivierungsdauer zu Überwachsungen und der Bildung mehrerer übereinander gewachsenen Zellschichten (Abb. 47E).



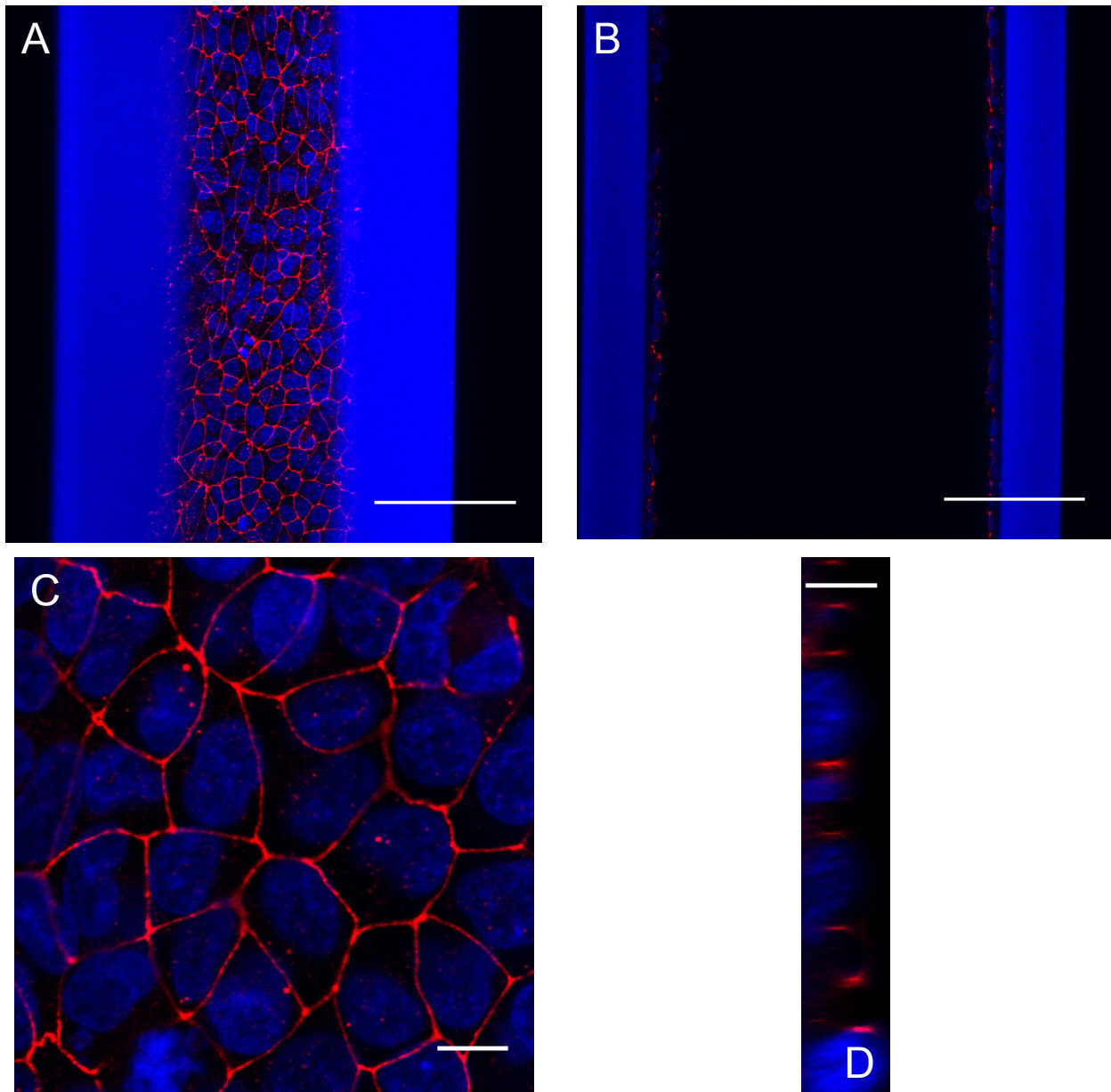
**Abbildung 47:** REM von HK2 Zellen in PAN Kapillaren nach 57 Tagen Perfusion. Auch hier zeigt sich die epitheliale Integrität der Zellen durch die sehr gut ausgeprägten, morphologischen Differenzierungsmerkmale wie Schlussleisten und langen Einzelzilien. Die Zellen sind allerdings spärlich, mit sehr verkürzten Mikrovilli besetzt. Die in E dargestellten Überwachungen konnten reproduzierbar in HK2 Modulen gefunden werden. Auch diese sind, wie die bereits bei MDCK gefundenen Überwachungen auf die mangelnde Proliferationskontrolle von Zelllinien zurückzuführen





**Abbildung 48:** HK2 Zellen in konfokaler Darstellung (blau Nucleii, rot ZO1) nach 15 Tagen in PAN-Kapillaren. Wie bereits bei den Perfusionen mit MDCK, bilden auch HK2-Zellen eine kapillarweite Konfluenz. (Maßstab 100µm). Ersichtlich aus der gut ausgeprägten Bildung von TJ zwischen den Zellen, die Ausbildung eines geschlossenen Epithels. Maßstab: 100µm



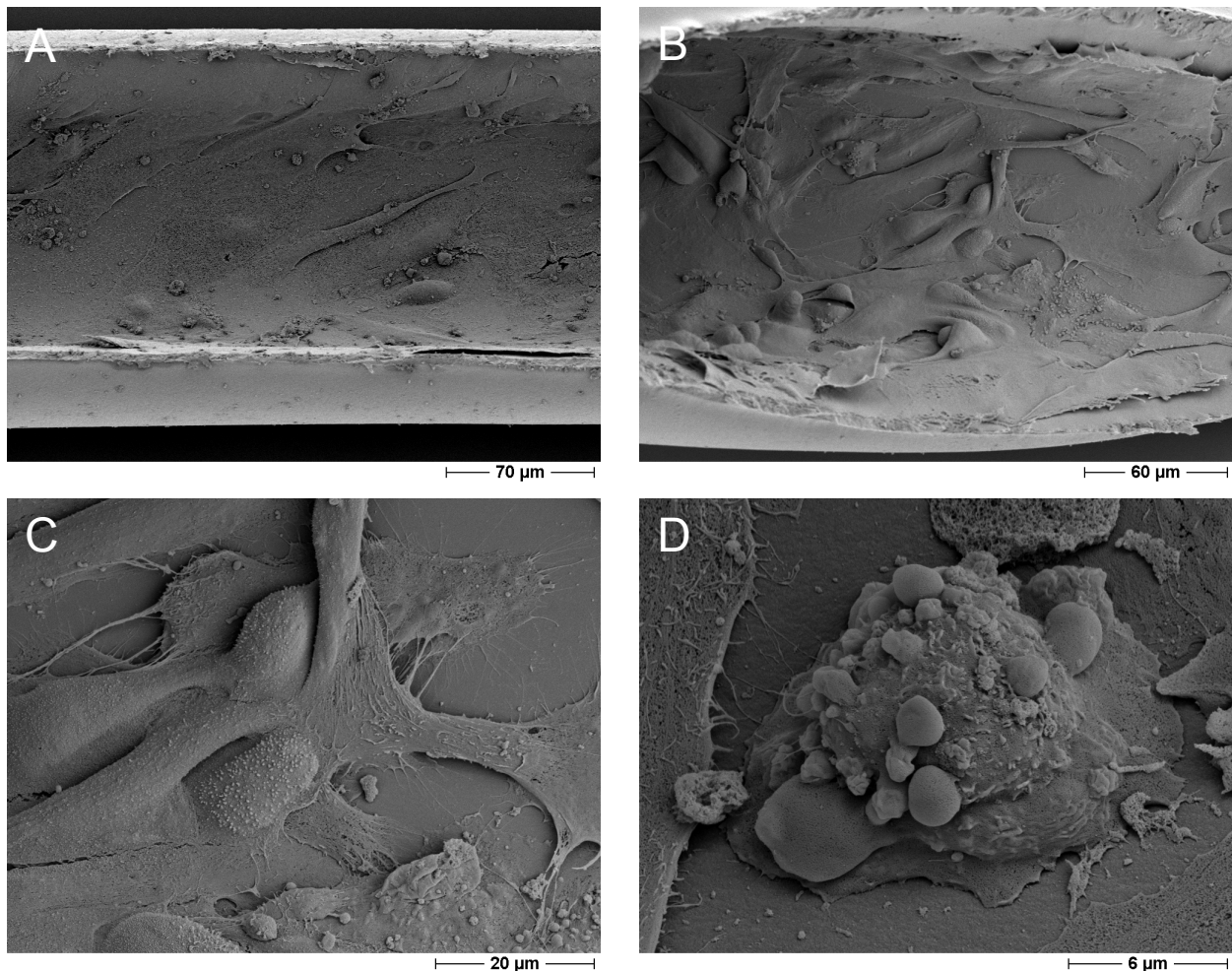


**Abbildung 49:** HK2 Zellen in konfokaler Darstellung (blau Nucleii, rot ZO1) nach 15 Tagen in PAN-Kapillaren. In (A) All-Max-Projektion der konfokalen Schnitte direkt unter der Membrandecke. (B) Auch in tieferen Bereichen der Kapillare liegt Konfluenz vor. (C) vergrößerter Abschnitt des gebildeten Epithels mit Y/Z-Schnitt in D. ZO1 ist nur im schmalen apikalen Bereich lateral zwischen den Zellen lokalisiert. Maßstab: (A&B) 50µm, (C&D) 10µm

#### 4.8.2.4 Ergebnisse Primärzellen vor Medienoptimierung

Die Ergebnisse der Modulperfusionen mit den Zelllinien (MDCK, HK2) zeigten den Zelltyp-unabhängigen Erfolg der angewendeten Methoden und des entwickelten Perfusionssystems. Dennoch ließen sich vergleichbare und erfolgreiche Kulturen von Primärzellen (hPTC, hDTC, hDNeg, hPNeg, hNF, RPTEC) in Hohlfasern unabhängig dieser Erfolge nicht erreichen. In einer Vielzahl von reproduzierbaren Versuchen zeigten

Primärzellen innerhalb der Module, trotz unveränderten Methoden und einem unverändertem Perfusionssystem, eine kaum messbare Proliferation, nachgewiesen durch sehr geringe metabolische Zellaktivitäten. In REM-Untersuchungen offenbarten die Zellen zwar eine gleichmäßige Verteilung und zufriedenstellende Adhärenz aber zeigten eine durchweg schlechte Morphologie (siehe Abb. 50).

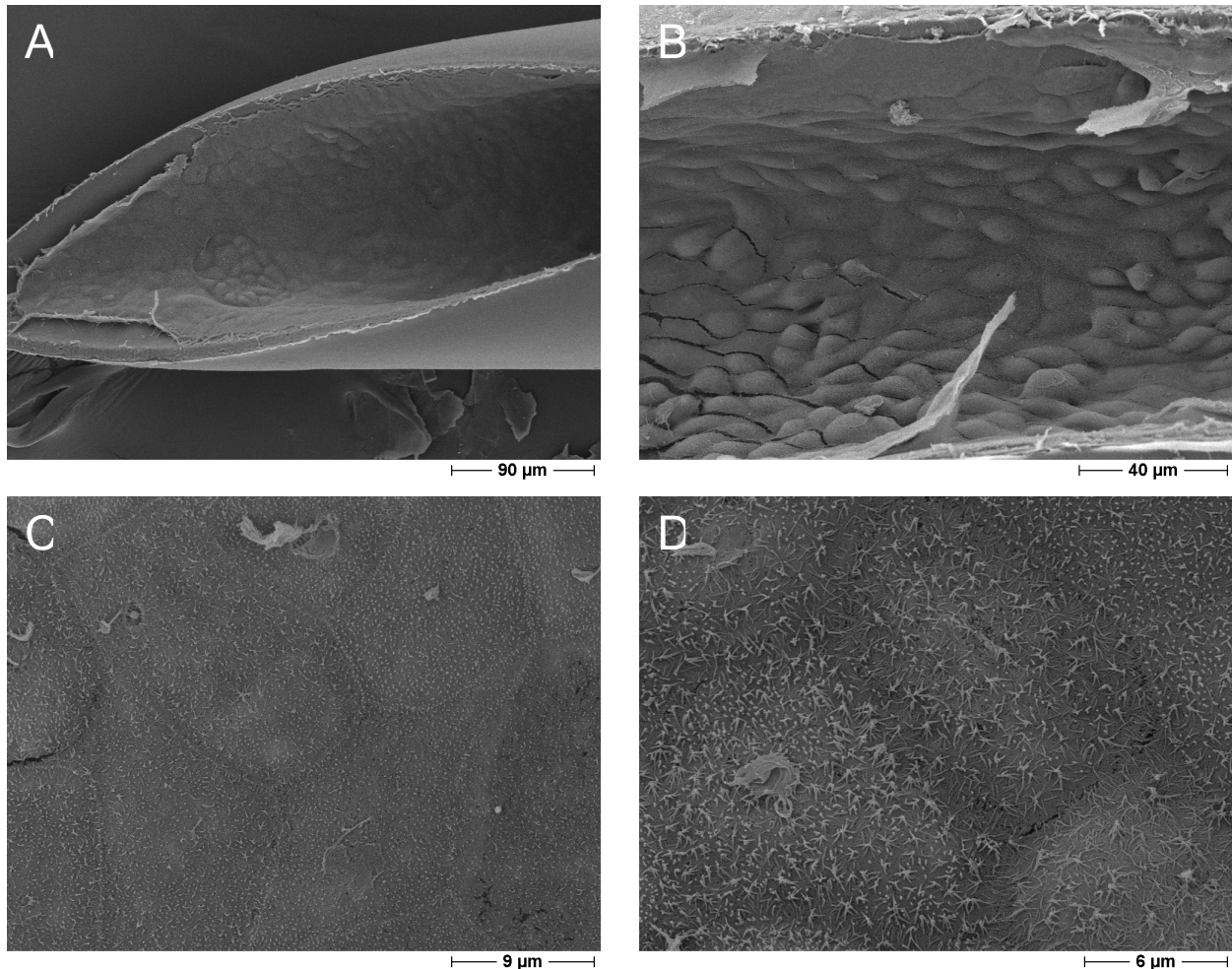


**Abbildung 50:** REM Darstellung von hDTC-P2 nach 11 Tagen in PEI-PAN Membrankapillaren (64 Fasern). Die hierbei dargestellte, schlechte Morphologie ist repräsentativ für eine Vielzahl durchgeführter Modulperfusionen mit verschiedenen Primärzelltypen. Trotz der hier verwendeten frühen Passage (P2) konnten bei diesem Modul nur schwache proliferative Aktivitäten nachgewiesen werden. Die von den Zellen durchwegs gezeigte, langgestreckte, spindelförmige und flache Morphologie lässt auf unzureichende Kulturbedingungen schließen.

#### 4.8.2.5 Ergebnisse Primärzellen nach Medienoptimierung

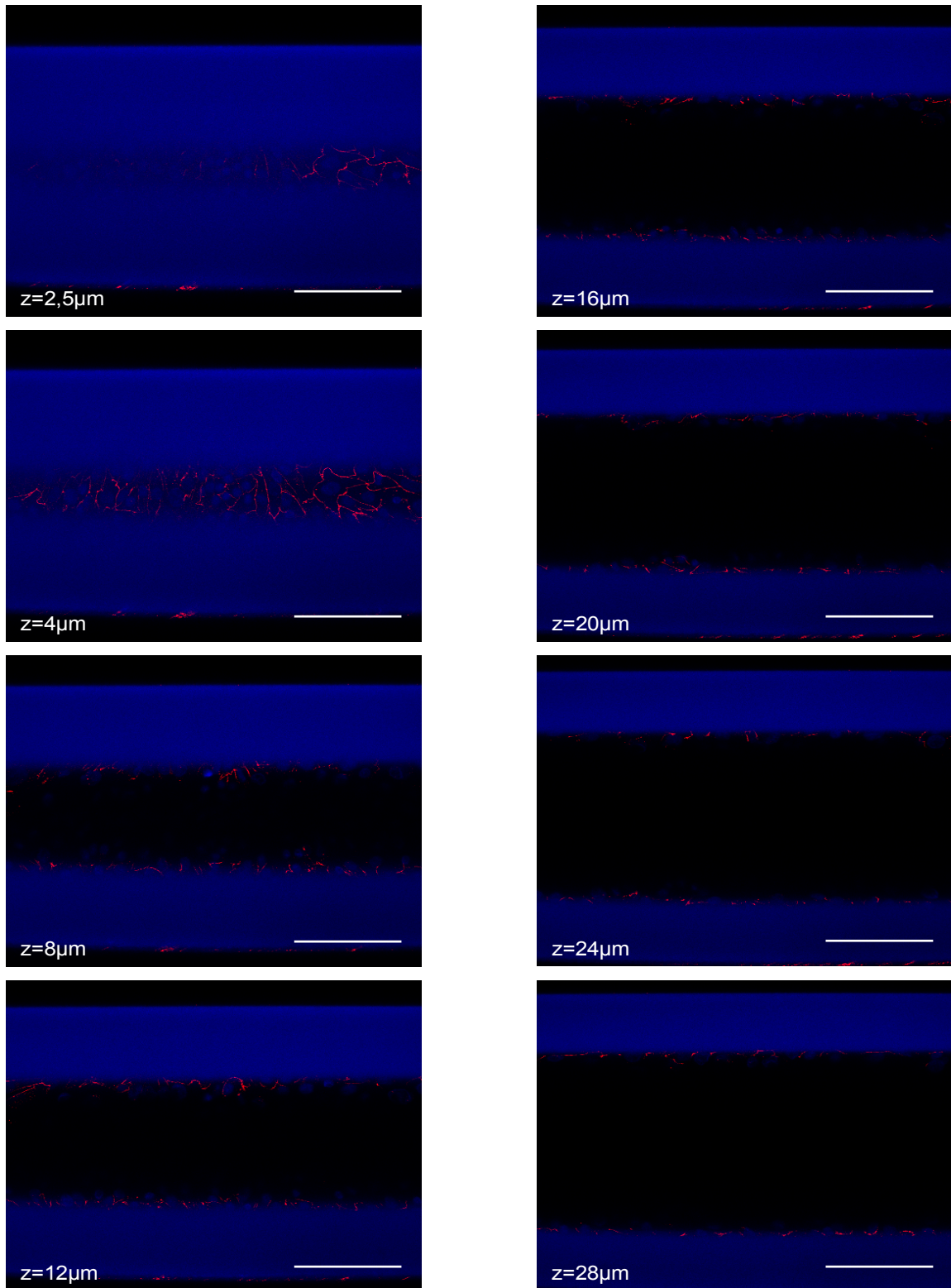
Erst durch die Verwendung des in 4.4 entwickelten, serumarmen Mediums gelang es, die Zellen innerhalb der Module erfolgreich proliferieren zu lassen. Die zuvor entwickelten

Protokolle für Einsaat und Perfusion ließen sich nun ohne weitere Modifikation auf die Primärkulturen in Hohlfasermodulen mit PEI-PAN Kapillaren anwenden. Die in den Versuchen mit MDCK und HK2 beobachteten Überwachungen der Zellen bzw. die Eigenschaft in mehreren Schichten übereinander zu wachsen, konnte in keinem mit Primärzellen durchgeführten Perfusionsversuch beobachtet werden.

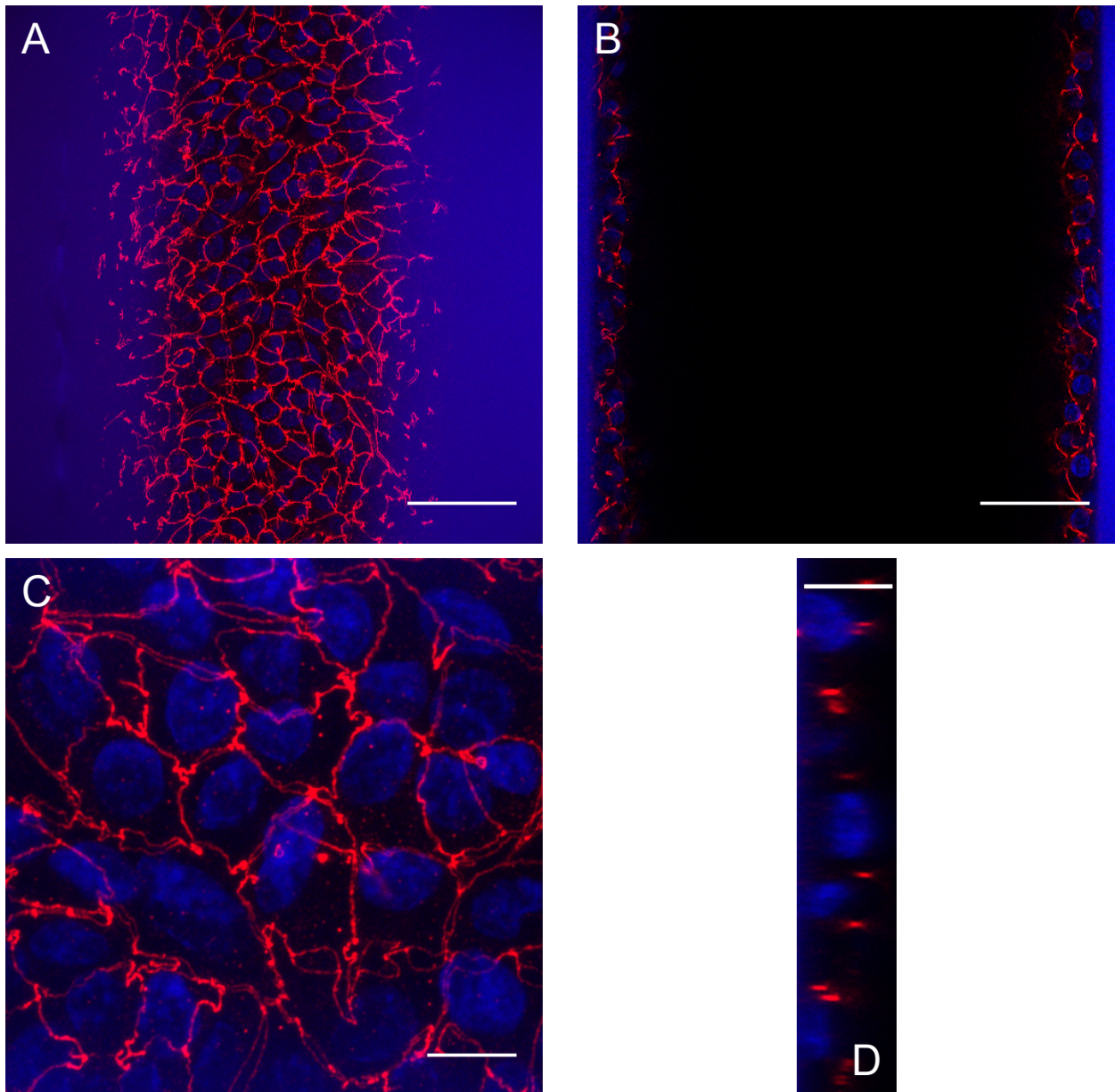


**Abbildung 51:** REM-Darstellung primärer, humaner, NF-Zellen (Passage 1) innerhalb von PEI-PAN Hohlfasern (64 Fasern) nach 14 Tagen Perfusion. Die gute epitheliale Differenzierung der Zellen lässt sich hierbei von den ausgeprägten Schlussleisten, Mikrovilli und Einzelzilien ableiten. Allerdings zeigen die Mikrovilli nicht die erwartete Länge. (Perfusion mit optimiertem Medium nach 4.4).

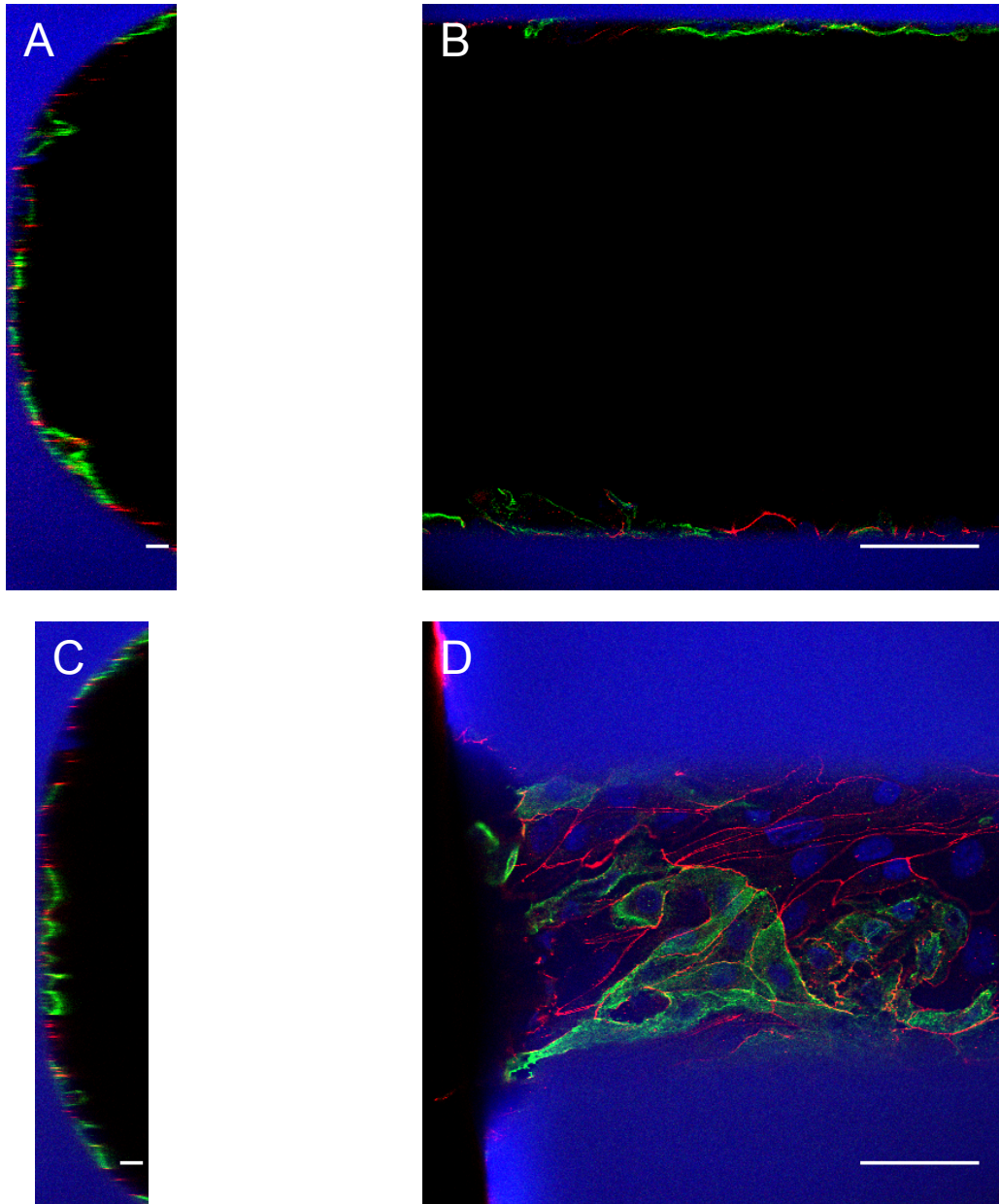




**Abbildung 52:** Primäre humane NF Zellen (Passage 1) in konfokaler Darstellung nach 14 Tagen auf PEI-PAN Membranen (264 Kapillaren) (blau Nucleii, rot ZO1). Wie bereits bei den Perfusionen mit MDCK und HK2, bilden auch die primären Zellen eine kapillarweite Konfluenz. Ersichtlich aus der gut ausgeprägten Bildung von TJ zwischen den Zellen, die Ausbildung eines geschlossenen Epithels. Maßstab 100µm



**Abbildung 53:** Primäre, hDNeg Zellen (Passage 1) in konfokaler Darstellung nach 14 Tagen auf PEI-PAN Membranen (264 Kapillaren) (blau Nucleii, rot ZO1). In **(A)** All-Max-Projektion der konfokalen Schnitte direkt unter der Membrandecke. **(B)** Auch in tieferen Bereichen der Kapillare liegt Konfluenz vor. **(C)** vergrößerter Abschnitt des gebildeten Epithels mit Y/Z-Schnitt in **D**. ZO1 ist nur im schmalen apikalen Bereich lateral zwischen den Zellen lokalisiert Maßstab **(A&B)** 50µm, **(C&D)** 10µm



**Abbildung 54:** hDNeg P1 in PEI-PAN Kapillaren (n=264) nach 21 Tagen Kultur. Immunofluoreszenzfärbung von AQP1 (grün), ZO1 (rot) und Nucleii (blau) visualisiert durch CLSM. Dargestellt sind zwei verschiedene Kapillarabschnitte eines Modules in Y/Z Schnitt (**A&C**; Maßstab 10 $\mu$ m) und eine X/Y Ebene (**B&D**; Maßstab 50 $\mu$ m). Die Zellen der Monolayer zeigen eine gute Differenzierung, nachgewiesen durch die Lokalisierung von ZO1 in einem schmalen Band nahe der Zellgrenzen und AQP1 in der apikalen und basolateralen Membran.



## 5 Diskussion

### 5.1 Materialscreening mittels Flachmembranen

#### **Standardmembran (PES/PVP)**

Das Materialscreening in 4.1 bestätigt die Vermutung der schlechten Adhäsions- und proliferationsunterstützenden Eigenschaften unmodifizierter bzw. nicht aktivierter Oberflächen von PES/PVP bzw. PES/PVP-Blendmembranen. Biokompatibilität in Bezug auf Membranen von Dialysatoren sowie Hämofiltern ist durch möglichst geringe Interaktion mit Blutkomponenten charakterisiert. Somit überraschen die negativen Ergebnisse der hierfür optimierten Standardmembranen nicht. Eine Projektvorgabe war das Erreichen der benötigten Adhäsions- und Proliferationscharakteristika ohne die von anderen Gruppen (Tab. 1.7) üblicherweise angewendete *in situ* Bioaktivierung der Membranoberflächen z.B. durch Serum-, Matrixbestandteile oder RGD-Peptide. Hierfür mussten andere Wege während bzw. nach der Membranherstellung gefunden werden. Die Ergebnisse aus 4.1 zeigen deutlich, dass ein simples Modifizieren der Polymerrezeptur in keinem Fall zur Ausbildung bzw. Verbesserung förderlicher Oberflächencharakteristika führt. Auch ein Blending mit COOH-, NH<sub>2</sub>-Gruppen oder PEI, wie dieses bei asymmetrischen Verfahren z.B. der Plasmafunktionalisierung und der PEI Beschichtung bei PAN Membranen zu guten Ergebnissen führte, änderte an den schlechten Ergebnissen nichts.

#### **Asymmetrische Plasmafunktionalisierung**

Im Gegensatz zu der in der Ausführung einfachen Rezepturmodifikation, wird eine gewünschte Oberflächenaktivierung jedoch durch asymmetrische Funktionalisierungen nach Membranherstellung erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde dies von Gambro, durch das Aufbringen geladener Gruppen (COOH, NH<sub>2</sub>) unter Energieaufwand (Plasmafunktionalisierung) auf die Membranoberfläche, durchgeführt. Dieses Verfahren führt bei verschiedenen PES/PVP-Blends sowohl bei Zelllinien (MDCK) (Abb. 13) als auch bei Primärzellen (hPTC, hDTC) (Abb. 15C-E) des Nierentubulusepithels nicht nur zu Adhäsion und Proliferation auf den Membranen, sondern weiterhin zur Ausbildung von geschlossenen Monolayern mit epitheltypischen Morphologien (Abb. 15C-F). Langzeitversuche, durchgeführt von im Labor von Dr. Baer, zeigten weitere positive Eigenschaften dieser Membranen. Auf diesen konnten hPTC und hDTC über 84 Tage unter Beibehaltung morphologischer Feinstrukturen und einer stabileren Expression

spezifischer Marker (FACS Analyse CD26, CD13  $\gamma$ -GT) gegenüber Vergleichskulturen kultiviert werden. Diese Vergleichskulturen auf Zellkulturplastik und kommerziellen Nunc®-Inserts waren während dieser Versuchsdauer inzwischen abgestorben bzw. die spezifischen Marker konnten in FACS Analysen nicht mehr nachgewiesen werden [82].

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden allerdings Probleme bei der Übertragung des Plasmafunktionalisierungsverfahrens auf die Kapillargeometrie 4.8.1 offensichtlich. Die im frühen Stadium der Modulperfusionen erlangten Ergebnisse zeigen zwar einerseits Fehler im Umgang mit den Modulen und bei der Einsaat auf, wie Bildung von Okklusionen (= zu hohe Zelleinsaatkonzentration) und das Vorhandensein von Zellen im äußeren Kompartiment, aber gerade letzteres zusammen mit der mangelhaften Adhäsion der Zellen an die innere Membranfläche lassen hier auf eine fehlerhafte Funktionalisierung im Inneren der Kapillaren schließen. Die Ursache hierfür lässt sich in der Übertragung des bei Flachmembranen relativ einfach durchzuführenden Verfahrens auf die Kapillargeometrie finden. Die Schwierigkeiten scheinen in der Gasverteilung und der gleichmäßigen Zündung des Plasmas innerhalb der Kapillaren zu liegen, es kommt stattdessen zu einer überwiegenden Funktionalisierung der Außenseite der Kapillaren. Laut Gambro ist eine zuverlässige Umsetzung der gängigen Plasmatechnologie für eine lumenseitige Funktionalisierung von Faserbündeln technisch sehr schwierig und kostspielig [82]. Somit kommen plasmamodifizierte Membrankapillaren den geforderten Voraussetzungen nicht nach und wurden aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse nicht für weitere Versuche eingesetzt. Als Konsequenz hieraus mussten neue Membranmaterialien bzw. Funktionalisierungsmethoden gefunden werden.

### **(PEI)-PAN**

Die gleichsam vielversprechenden Ergebnisse der plasmamodifizierten PES/PVP Flachmembranen lassen sich auch mit (PEI)-PAN Membranen erreichen. PAN-Membranen konnten bereits in [78] und [79] als gutes Substrat für eine Kultivierung von permanenten Zelllinien (MDCK) identifiziert werden. Die Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit an Modulversuchen in der Kapillargeometrie einerseits mit MDCK (4.8.2.3) bestätigt und weitergehend mit HK2 (4.8.2.3) validiert. Übereinstimmend konnten hierbei Adhäsion, Proliferation und epitheliale Monolayerbildung von Zelllinien auf PAN-Membranen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten mit PEI beschichtete PAN-Membranen als optimales Substrat für die verwendeten Zelllinien identifiziert werden, ohne Unterschiede zu der unbeschichteten Membran in den wesentlichen Punkten. Die



asymmetrisch mit PEI funktionalisierte PAN-Membran zeichnet sich durch ein geringeres, negatives Zeta-Potential auf der beschichteten, luminalen Seite im Vergleich zur stark negativ geladenen Oberfläche der unbeschichteten PAN-Membran aus. Ebenso wie die PAN-Membran ist die PEI-PAN-Membran eine kommerziell in Dialysatoren verwendete und klinisch zugelassene Membran dessen Beschichtung ab Werk erfolgt. Auch bei PEI-PAN Membranen zeigten Versuche von Dr. PC Baer wiederum eine stabile Monolayer und die Expression der spezifischen Marker über einen Zeitraum von 83 Tagen, während Vergleichskulturen auf Plastik und kommerziellen Nunc®-Inserts bereits abgestorben waren [82].

Zwischen PAN und PEI-PAN Membranen ließen sich anhand von Kultivierungsversuchen mit Primärzellen Unterschiede finden. Kulturversuche auf Flachmembranen zeigen, dass sich unbeschichtete PAN-Membranen für eine Kultur mit primären TECs nicht eignen (Abb. 14&15). Hier neigen diese zu „Inselbildung“, zeigen mangelnde Proliferation und es kommt nicht zur Ausbildung einer vollständigen Monolayer. Mit Zelllinien vergleichbare Ergebnisse lassen sich für primäre Zellen nur auf PEI-PAN-Membranen erreichen. Die Beschichtung der PAN-Membran mit PEI erhöht das Adhäsionsverhalten und macht diese zu einem idealen Substrat für die Kultivierung von primären Tubulusepithelien. Dabei werden nicht nur die erwünschten epithelialen Monolayermorphologien erzielt, sondern auch mit Zelllinien vergleichbare Dichtigkeiten dieser gegenüber FITC-Inulin bzw. Phenolrot (Abb. 18&19). Diese Versuchsreihen dokumentieren sehr gut, dass von Zelllinien erhaltene Ergebnisse nur bedingt auf primäre Kulturen übertragbar sind.

Adhäsions- und proliferationsfördernde Eigenschaften von PEI sind nicht nur auf primäre TECs beschränkt, andere Gruppen konnten PEI als Beschichtungsmittel für eine erfolgreiche Primärkultur von Endothelien [108] bzw. neuronalen Zellen [109] auf Sensoren einsetzen.

## **5.2 Sauerstoffbedarf**

Die Versuchsreihen für die Bestimmungen des Sauerstoffbedarfs in 4.2 wurden in Ermangelung von *in vitro* Literaturwerten für die Auslegung der benötigten, minimalen Perfusionsgeschwindigkeiten in Hohlfasermodulen durchgeführt. Hierzu wurde neben der Bestimmung der spontanen Atmungsrate ein Leistungsprofil in Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung, eine Ermittlung des transportabhängigen Anteils des Sauerstoffbedarfs und der maximalen Atmungskapazität (=maximale mitochondriale

Leistungsreserve) durchgeführt. Letztere diene einerseits der Bestimmung des Stresszustandes der verwendeten Primärzellen, andererseits der Abschätzung der möglichen stimulierbaren Transportleistung und des metabolischen Status der Zellen.

In Bezug auf absolute Sauerstoffbedarfswerte der hoch aktiven Tubulusepithelien des proximalen und distalen Tubulus existieren wenige *in vitro* Untersuchungen die die nötigen Abschätzungen ermöglicht hätten. Vorhandene Messreihen wurden meist in den 80er Jahren an Zell- bzw. Tubulussuspensionen vorgenommen, allerdings keine davon an humanen Primärzellen. Studien wurden an Isolaten aus Kaninchen ([110][111]), Ratten [88] oder Schweinen [112] durchgeführt. Tabelle 5.1 und 5.2 stellen die in 4.2.1 und 4.2.2 erhaltenen Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen der genannten Publikationen dar. Alle Werte wurden zum Zwecke der Vergleichbarkeit in die Einheit  $\text{nmol} \cdot 10^{-6} \text{Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$  umgerechnet. Verglichen mit den Werten der anderen Gruppen, erscheinen die in dieser Arbeit gemessenen absoluten, über alle Zelldichten gemittelten Werte der Grundatmung mit 29,7 und 27,7  $\text{nmol} \cdot 10^{-6} \text{Zellen} \cdot \text{min}^{-1}$  für hPTC respektive hDTC plausibel. Zusammen mit den Ergebnissen der maximalen Atmungskapazität (169-184%) ist davon auszugehen, dass die untersuchten Zellen trotz Subkultivierung ihren stark aeroben Metabolismus aufrecht erhalten haben und auch nicht am Limit ihrer Leistungsfähigkeit arbeiten. Renale Zelllinien reagieren dagegen relativ empfindlich auf die Kultur unter Standardbedingungen, wie der statischen Kultur in ZK-Flaschen und Petrischalen mit einem überwiegend glykolytischen Stoffwechsel, wie dies in [93] gezeigt wurde. Um diesem Wechsel der metabolischen Aktivität vorzubeugen wurden sämtliche Kulturen während der Standardkultur möglichst geschwenkt inkubiert, um den Eintrag von Sauerstoff in das Kulturmedium zu erhöhen und große Sauerstoffgradienten innerhalb der Medienschicht über den Zellen zu vermeiden.

Der Sauerstoffbedarf der in dieser Arbeit untersuchten Epithelzellfraktionen ist abhängig von der Zelldichte, wie dies bereits in [92] für Fibroblasten gezeigt werden konnte, diese lässt sich durch den höheren Energiebedarf pro Zelle während der mitotischen Aktivitäten präkonfluenter Kulturen ableiten. Zwischen den Fraktionen konnte kein signifikanter Unterschied in der, über alle Zelldichten gemittelten Grundatmung und der maximalen Atmungskapazität gefunden werden. Deutliche Unterschiede ließen sich nur beim transportabhängigen Sauerstoffbedarf zwischen hPTC und hDTC nachweisen. Dieser, über zwei verschiedene Methoden [94] ermittelte Bedarf, liegt bei hPTC auf einem nahezu zweifach höheren anteiligen Niveau als der der untersuchten hDTC. Dies kann mit höheren Transportleistungen dieser unter den angewandten experimentellen Bedingungen

korreliert werden. Die Ergebnisse stehen dabei im Widerspruch zu den Ergebnissen aus [88] und [110] bzw. [111]. Hierin werden fast zwei- ([110][111]) bzw. dreifache [88] spontane Verbrauchsrate an Sauerstoff von mTAL/DTC zu PTC, sowie ein höherer ouabainsensitiver Anteil der mTAL/DTC beschrieben und auf eine höhere Transportleistung der mTAL bzw. DTC Zellen zurückgeführt. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen solcherlei Rückschlüsse nicht zu, vielmehr zeigt sich, ganz im Gegenteil, ein höherer ouabainsensitiver Anteil des Sauerstoffbedarfs der hPTC. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus 4.2 abseits der spontanen Atmungsrate und zwischen den Zellfraktionen mit den genannten Publikationen ist ohnehin nur bedingt gegeben. Gründe hierfür liegen einerseits in der Reinheit bzw. Art der Zellfraktionen, der untersuchten Spezies sowie in den unterschiedlichen Messmethoden. Die Ergebnisse der erwähnten Publikationen wurden durch Versuche an primären Fraktionen bzw. Tubulussegmenten aus Ratten respektive Kaninchen erhalten. In beiden Fällen wurde der Sauerstoffbedarf unter den verschiedenen Bedingungen direkt an den entsprechenden Primärisolaten ohne vorherige Subkultivierung durchgeführt. In [88] erfolgten die Messungen an gerührten Einzelzellsuspensionen und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, an subkultivierten Monolayerkulturen. Aufgrund des verlorenen Gewebeverbandes und dem damit verbundenen Verlust epithelialer Transporteigenschaften und Rückkopplungsmechanismen ist ein Zusammenhang zwischen Transportleistung und Sauerstoffbedarf nur sehr begrenzt, wenn überhaupt, herstellbar. Ähnlich einzuschätzen sind die Messungen aus [112], diese wurden an Suspension mit auf Beads kultivierten Zellen durchgeführt, allerdings leiten die Autoren hieraus auch keine Einschätzung des transportabhängigen Atmungsanteils ab. Die Ergebnisse aus 4.2 stellen eine weitergehende Ausnahme da, da diese unter Bedingungen eines konstanten Flusses durchgeführt wurden, in keiner anderen der genannten Arbeiten wurde so ein experimenteller Aufbau verwendet.

Tabelle 5.1: Vergleich Sauerstoffbedarf proximaler Zellen

Quelle	Spezies	Zellsystem	Basis [nmol 10 <sup>-6</sup> Zellen min <sup>-1</sup> ]	Ouabain normiert	CCCP normiert
[112]	Schwein	Zellen auf Beads	2,29	-	155%
[88]	Ratte	Einzelzellsuspensionen	12,4	63%	137%
[111]	Kaninchen	Tubulifragmente	9,9*	50%	-
[110]	Kaninchen	Tubulifragmente	14*	56%	-
	hPTC	Subkultivierte Monolayerkulturen	29,7	73%	184%

\* Proteinbezogene Werte wurden anhand von in der Quelle angegebenen Protein/Zelle-Konzentrationen in zellbezogene Werte umgerechnet

Tabelle 5.2: Vergleich Sauerstoffbedarf distaler Zellen

Quelle	Spezies	Zellsystem	Basis [nmol 10 <sup>-6</sup> Zellen min <sup>-1</sup> ]	Ouabain normiert	CCCP normiert
[88]	Ratte [distal]	Einzelzellsuspensionen	35,3	49%	120%
[111]	K a n i n c h e n [mTAL]	Tubulifragmente	21,6*	58%	208%
	hDTC	Subkultivierte Monolayerkulturen	27,7	89%	169%

\* Proteinbezogene Werte wurden anhand von in der Quelle angegebenen Protein/Zelle-Konzentrationen in zellbezogene Werte umgerechnet

Äußerst interessant sind die Ergebnisse der sauerstoffabhängigen Atmungsaktivität in 4.2.3. Die hPTCs zeigen eine ausgeprägte Michaelis-Menten-Abhängigkeit der Atmung von der Sauerstoffsättigung, und zwar in einem relativ hohen Konzentrationsbereich. Der ermittelte pO<sub>2</sub>50 von 25,8% (5,4kPa, 41mmHg) liegt im Bereich der Cortexsättigung der Niere. Die gezeigte Reduktion der Atmungsaktivitäten lässt sich, auch unter Berücksichtigung von Diffusionsstrecken nicht mit einer Substratlimitierung des Sauerstoffs erklären, wie ein Vergleich mit den in [113] dargestellten Werten für isolierte Mitochondrien (pO<sub>2</sub>50=0,035kPa bzw. 0,266mmHg) und Skelettmuskelfasern der Ratte (pO<sub>2</sub>50=4,2kPa bzw. 32mmHg) zeigt. Offensichtlich liegen bei dem in dieser Arbeit verwendeten System (Monolayer auf Deckgläsern) keine größeren Diffusionsbarrieren als in Skelettmuskelfasern vor. Vielmehr sind die hier erhaltenen pO<sub>2</sub>50 Werte als Ergebnis einer aktiven Anpassung des Zellmetabolismus auf das Sauerstoffangebot zu sehen, denn als Ergebnis einer Substratlimitierung der Mitochondrien. Bei Hepatozyten sind solche Vorgänge nach Konditionierung in einem sauerstoffärmeren Milieu bekannt, wenn die Zellen die Möglichkeit haben sich an eine hypoxische Situation anzupassen. Hier reduzieren die Zellen reversibel ihre spontane Atmungsrate, im Gegensatz zum Fall einer

plötzlich eintretenden, akuten Ischämie, in der die Zellen ihre spontane Atmungsrate bis zum Erreichen der Substratlimitierung beibehalten [114]. Im Falle von renalen Zellen, könnte eine solche Anpassung über HIFs (hypoxia-induced-factors) hervorgerufen werden, die im Falle einer Vorkonditionierung vermehrt gebildet und den Zellschaden bei einem durch Ischämie ausgelösten akuten Nierenversagens begrenzen können [115]. In denen in 4.2.3 durchgeführten Versuchen fanden keine bewusst durchgeführten Vorkonditionierungen statt, diese sind im Messverfahren bzw. dem Aufbau des Perfusionsrespirometers zu finden. Während der Ermittlung der Sauerstoffsättigung über den Referenzweg findet keine Perfusion der Kammer statt. Die Zellen verbrauchen in dieser Zeit den im Kammervolumen enthaltenen Sauerstoff bis zum Start der Kammerperfusion, in welcher ein langsamer Austausch des Perfusionsmedium stattfindet (Abb. 11&35). Hierdurch und durch die wiederholende Durchführung des Vorganges könnte eine solche Konditionierung stattgefunden haben.

Weniger deutlich, aber von ähnlicher Natur zeigt sich diese Anpassung bei den hDTCs mit einem  $pO_250$  von 18,8% (3,9kPa, 30mmHg). Zwar lassen sich auch hier über numerische Regression theoretische Michaelis-Menten-Parameter ermitteln, dennoch scheinen bei dieser Fraktion andere, nicht untersuchte Faktoren einen größeren Einfluss auf die Atmungsrate auszuüben, ersichtlich an der großen Streubreite über den gesamten Sauerstoffsättigungsbereich. Der Einfluss anderer gewichtiger Faktoren auf die Atmungsrate der hDTCs zeigte sich bereits bei der Ermittlung der spontanen Atmungsrate unter Normalbedingungen durch die im Vergleich zu den hPTC großen Schwankungen (Abb. 20A). Prinzipiell aber überraschen aufgrund der Herkunft der Fraktionen diese Ergebnisse nicht. Epithelzellen des proximalen Tubulus stammen aus dem Nierencortex mit hoher Sauerstoffsättigung (40-50mmHg) und sind aufgrund fehlender glykolytischer Enzyme strikt auf Sauerstoff angewiesen, während Zellen des mTAL/DT aufgrund der *in vivo* Situation vielmehr an die sauerstoffärmere Situation (15-30mmHG) im Bereich des aufsteigenden Astes der Henle-Schleife (Medulla) adaptiert sind und über die dafür nötige Enzymausstattung verfügen. Tendenziell, wenn auch nicht signifikant, lässt sich dies anhand des niedrigeren  $pO_250$ -Wertes der hDTC (18,8% vs. 25,8%) ablesen und der somit höheren Sauerstoffaffinität.

Bei der Betrachtung der theoretischen Michaelis-Menten-Parameter bzw. der dargestellten Kurven beider Zellen fällt auf, dass die in der Literatur beschriebenen Sättigungswerte des Nierencortex in etwa im Bereich des  $pO_250$ -Wertes liegen. Die Zellen zeigen somit *in vitro* nach Subkultivierung laut den in 4.2.3 dargestellten Ergebnisse in der physiologischen

Situation nur etwa 50% der maximal möglichen *in vitro* Atmung. Aufgrund methodischer Limitationen war es nicht möglich, die Sauerstoffkonzentration so weit zu senken, dass diese innerhalb des in der Literatur beschriebenen kritischen Bereiches lag. Untersuchungen in [116] an mTAL-Zellen aus Ratten konnten mit einer anderen Methode kritische Konzentrationen von 7,5 bzw. 24,8 mmHg identifizieren. Diese Messungen wurden in gerührten Zellsuspensionen in einem abgeschlossenen Gefäß mit vorhandener Sauerstoffelektrode durchgeführt. Als kritische Sauerstoffkonzentration ist dort die Konzentration definiert, ab welcher die Sauerstoffkonzentration nicht mehr linear abnimmt. Die unterschiedlichen Werte der genannten Publikation kommen durch verschiedene Diäteeinstellungen der untersuchten Ratten zustande. Bei Ratten, die einer proteinarmen Ernährung unterlagen, sinkt die kritische Sauerstoffkonzentration bis auf 7,5mmHg, während diese bei einer proteinreichen Diät bei 24,8 mmHg liegt. Dies zeigt, unabhängig von einer Plausibilitätsprüfung der Werte aus 4.2.3, weitere Gründe für die starken Varianzen in den Atmungsaktivitäten, die in der vorliegenden Arbeit aus einer Vielzahl von Isolierungen verschiedener Patienten gewonnen wurden und durch die vorgenommene Normalisierung der Werte nicht korrigiert werden können.

### **5.3 Medienformulierung**

Für eine biotechnologische Integration von renalen Tubulusepithelien in Hohlfasermodule wird ein Medium benötigt, welches die renalen Primärzellen möglichst stark zur Proliferation anregt und dabei eine spezifische Differenzierung der Zellen nach Abschluss der proliferativen Phase gewährleistet. Die Unzulänglichkeiten eines simplen, mit FCS supplementierten Vollmediums auf die primären Zellen konnte sehr anschaulich in 4.3 sowie während der Medienoptimierung in 4.4 gezeigt werden. Das Supplementieren mit FCS führt durch dessen unspezifische Zusammensetzung im vorliegenden Fall zu einer Verhinderung der Proliferation und fördert den Verlust der spezifischen Differenzierung, die sich auch nach Abschluss der proliferativen Phase nicht mehr einstellt. Als Konsequenz bilden die Zellen keine Monolayer mehr aus, verlieren ihre epitheltypischen Morphologien und reagieren mit inflammatorischen Reaktionen wie der in 4.4.3.3 gezeigten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Die Ursachen dieser inflammatorischen Aktivitäten können vielfältig sein, die Hauptursache wird aber in der, durch die FCS-Supplementierung bedingten, hohen Proteinkonzentration (Albumin) liegen. Wie in [26] beschrieben, reagieren PTC empfindlich auf hohe Albuminkonzentration, unter anderem

mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Der FCS Supplementierung können weitere negative Auswirkungen zugeschrieben werden, die in Faktoren liegen, wie dies exemplarisch anhand der hohen TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen nachgewiesen wurde. Dessen negativen Effekte auf Tubulusepithelien, wie das Auslösen von Dedifferenzierung (EMT), Fibrose, Apoptose und antiproliferative Wirkungen, konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden ([117][118][119][120][121][122][123][124]). In [124] lösten bereits Konzentrationen von  $0,06 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  metabolische Veränderungen aus und Konzentrationen ab  $0,2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  verhinderten die Wiederausbildung der Monolayer primärer Kaninchen PTCs nach oxidativen Schädigungen [123]. Die in 4.3.1 gefundenen Konzentrationen liegen somit mindestens um einen Faktor vier höher als die beschriebenen wirksamen Konzentrationen. Es kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden dass weitere im FCS enthaltene Faktoren ähnlich negative Auswirkungen auf die Primärzellen entfalten. Eine Identifizierung dieser im FCS enthaltenen, möglichen weiteren Faktoren gestaltet sich durch die Vielzahl der Kandidaten, bekannt wie unbekannt, im Rahmen dieser Arbeit als zu aufwendig. In der Konsequenz wurde der Fokus auf eine Reduzierung von FCS und ein Screening sich positiv auf Proliferation und Differenzierung wirkende Faktoren gelegt. Zwar wurde diese Fokussierung durch die Anforderungen, wie Pathogenitätsfreiheit und definierte Zusammensetzung für eine spätere klinische Anwendung, bestärkt, prinzipiell sollte allerdings ein angemesseneres Medium für die Kultur der primären humanen TECs für den Labormaßstab gefunden werden. Die Basis hierfür stellt die kommerziell erhältliche, serumfreie Medienformulierung „SFK“ von Invitrogen, standardmäßig, wie vom Hersteller empfohlen mit Rinderhypophysenextrakt (BPE) supplementiert. Als weitere Supplemente kamen Faktoren in Frage, deren positiven Auswirkungen auf Nierenepithelien bereits beschrieben sind, wie EGF, HGF, IGF1, Ouabain,  $\text{Ca}^{2+}$ , sowie einer reduzierten FCS-Konzentration.

Der Vergleich des in 4.4 entwickelten SFM+S (SFM+BPE+EGF+ $\text{Ca}^{2+}$ +1%FCS) und des zuvor verwendeten Mediums (M199+10%FCS) zeigt in sehr deutlicher Weise die gravierenden Mängel und Unzulänglichkeiten des M199+10%FCS Mediums. Hiervon betroffen sind nicht nur proliferative Charakteristika wie Verdopplungszeit und erreichte Zelldichte, sondern auch die, für eine Anwendung unabdingbare Differenzierung, nachgewiesen durch epitheltypische Morphologien. Letztlich konnte darüber hinaus auch die Ausschüttung der untersuchten proinflammatorischen Zytokine durch die Anwendung des serumarmen Mediums, minimiert werden.

Erst durch die Verwendung des in 4.4 entwickelten Mediums gelang eine erfolgreiche, dauerhafte Kultur der Primärzellen ohne Verlust der epitheltypischen Morphologien über mehrere Passagen hinweg und ermöglichte so überhaupt die Bildung von epithelialer Monolayern innerhalb von Kapillaren aus PEI-PAN. Dabei zeigt sich, dass das Mithilfe von hPTC entwickelte Medium seine positiven Effekte bei allen verwendeten primären Zellfraktionen, hPTC, hDTC, hPNeg, hDNeg, hNF sowie den kommerziellen RPTEC entfaltet. Das verwendete Basismedium und die durch das Faktorenscreening gefundenen Supplemente sollen hierbei nicht den Endpunkt der Medienentwicklung für eine klinisch, therapeutische Umsetzung des HyTube Systems darstellen, sondern vielmehr einen Ausgangspunkt zu einem vollständig definierten, serumfreien Mediums. Ziel muss es dabei sein, die undefinierten Zusätze BPE und FCS zu ersetzen. Möglicherweise entfalten die hier getesteten Supplemente, im speziellen die Wachstumsfaktoren und Ouabain erst dann ihre volle Wirkung mit den entsprechenden signifikanten Effekten.

Im folgenden werden die während der Optimierung verwendeten Supplemente im einzelnen diskutiert.

### **Wachstumsfaktoren**

Die Auswahl der Wachstumsfaktoren in 4.4 geht auf Ergebnisse verschiedener *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zurück. Aufgrund der Ähnlichkeit der Vorgänge können *in vivo* und *in vitro* Erkenntnisse der Tubulusregeneration auf die Besiedlung von Membrankapillaren abgeleitet werden. Bei diesen Regenerationsvorgängen spielen besonders die Wachstumsfaktoren HGF, EGF und IGF1 eine wichtige Rolle. Diese bzw. deren zugehörige Rezeptoren zeigen erhöhte Aktivitäten in den regenerativen Phasen eines akuten Nierenversagens [47]. In zahlreichen Studien über deren therapeutischen Nutzen konnte die stark mitogene Wirkung von EGF und HGF auf geschädigte Tubulusepithelien gezeigt werden ([48][49][46][50][51]). Für IGF1 liegen zumindest für *in vitro* Versuche sich widersprechende Ergebnisse vor ([48][49]). HGF zeigt über mitogene Stimulationen hinaus auch starke, positiv auf die Differenzierung der Zellen wirksame Effekte, wie z.B. die Bildung dichter und längerer Mikrovilli [49], entfaltet antiapoptotische ([125][126][127]), antagonistische Wirkungen zu TGF- $\beta$ 1 ([128][129][130]) und erhöht die Zellmotilität („Scatterfactor“) auch bei proximalen TECs [49].

Erstaunlicher Weise konnten in den durchgeführten Screeningversuchen, außer für EGF, für keinen weiteren der oben genannten Wachstumsfaktoren ein signifikanter Einfluss auf die hier bestimmten Parameter ermittelt werden. Auch die eigentlich erwarteten



synergistischen Wirkungen der Wachstumsfaktoren miteinander, repräsentiert durch die zweifach FWEs 1x2 (EGF x HGF), 2x3 (HGF x IGF1) wie sie in [49] beschrieben sind, konnten in den Screeningversuchen nicht gefunden werden. Auch die dort beschriebene potentere Wirkung von HGF gegenüber EGF zeigt sich in den Screeningversuchen nicht. EGF zeigt im Faktorenscreening verdopplungszeitverlängernde Effekte, führt aber zu signifikant höheren Zelldichten. In [48] konnte die epitheliale Monolayer von PTCs nach Schädigung nur durch das Supplementieren mit mindestens  $10\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  EGF nicht aber mit IGF1 wieder hergestellt werden. In [85] konnte nur ein schwacher konzentrationsabhängiger proliferationssteigernder Effekt auf die in dieser Arbeit verwendeten Zellen nachgewiesen werden.

Mögliche Gründe dafür, dass HGF und IGF1 keine ermittelbaren und weiterhin EGF nicht die erwarteten Effekte auf die Primärzellen zeigten, sind im folgenden dargestellt:

- Die verwendeten Konzentrationen lagen unter der Einflusschwelle
- Die Streuung der Screeningversuche war zu hoch bzw. der Einfluss der Faktoren zu klein
- Das dem SFK beiliegende und auch während der Screeningversuche verwendete Rinderhypophysenextrakt (BPE) enthält bereits die maximal wirksamen Konzentrationen von EGF, HGF und IGF1
- Die Zusammensetzung des verwendenden Basismediums ist bereits so optimal, dass ein exogenes Zusetzen von HGF und IGF1 keine weitere „Performance“-Steigerung bringt.

Aufgrund der anwendungsorientierten Ausrichtung des Faktorenscreenings, des Testens der ermittelbaren Notwendigkeit und nicht der wiederholten Bestätigung bzw. Widerlegung von Effekten auf primäre Tubuluszellen, sind diese Ergebnisse durchaus positiv zu bewerten. Es zeigt sich, dass auf die in den Kosten sehr gewichtigen Wachstumsfaktoren HGF und IGF1 für die hier abgezielte Anwendung verzichtet werden kann, und somit eine Kultivierung der Primärzellen kostengünstiger bei gleichbleibender „Performance“ gewährleistet wird.

### ***Ouabain***

Ouabain ist im mikromolaren Bereich als zuverlässiger Inhibitor der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  bekannt und wird als solcher, wie auch in dieser Arbeit, dafür verwendet. Weitere Interaktionen, die

über die genannte Inhibition hinausgehen, scheinen sich im besonderen auf Tubulusepithelien bei nanomolaren Konzentrationen zu entfalten. Die Ergebnisse aus [131] und [132], in welchen diese Konzentrationen bei Nierenepithelzellen *in vitro*, antiapoptotische und mitogene Eigenschaften nach Serumentzug entfalteteten, wurden dabei im Faktorenscreening aufgegriffen, um dessen Verwendbarkeit als kostengünstiger Faktor für eine serumarme Kultur zu evaluieren. Die in den genannten Publikationen dargestellten Effekte konnten hierbei nicht bestätigt werden. Vielmehr entfaltet Ouabain auch in der verwendeten nanomolaren Konzentration (5nM), signifikant, negative Effekte auf nahezu alle untersuchten Parameter. Die FWE EGFxFCS (FWE 1x6) und FWE Ca<sup>2+</sup>xOuabain (FWE 4x5) sind aufgrund des Versuchsplan miteinander vermengt. Diese Faktorenkombination zeigt im Pareto-Diagramm (Abb. 25) signifikant positive Effekte auf die Verdopplungszeit (Abb. 25A), Zelldichte (Abb. 25B), die Morphologie (Abb. 25D) und den mikroskopisch beurteilten Allgemeinzustand (Abb. 25E). Zwar scheinen diese Effekte durch den vermuteten Signalweg der Proliferationsstimulation basierend auf beobachteten Kalziumoszillationen [133] plausibel, können allerdings aufgrund der Vermengung nicht allein der Ca<sup>2+</sup>xOuabain FWE zugeschrieben werden. Zusätzlich sind die im Pareto-Diagramm ersichtlichen, negativen Effekte von Ouabain allein vergleichbar größer und eine Abwägung dieser Effekte führte zu der Entscheidung, auf Ouabain als Supplement zu verzichten.

### **Kalzium**

Ausgangspunkt für den Einsatz vermindelter Kalziumkonzentrationen ist die Übertragung der „Calcium Switch“-Technik, wie sie bei der Kultur von Keratinozyten ([134][135][136]) und der Erforschung von AJ/TJ Komplexen zum Einsatz kommt [137], auf die konkrete Anwendung in dieser Arbeit. Mit der fortschreitenden Bildung einer epithelialen Monolayer kommt es zur Verminderung der mitogenen Zellaktivität (= Kontaktinhibition) und dem Beginn der Differenzierung. Hierbei beteiligt und für eine Polarisierung der Zellen zwingend notwendig, ist die Ausbildung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen AJ. Durch die verminderte Kalziumkonzentration wird eine im Sinne dieser Arbeit, frühzeitige Ausbildung von AJ, somit die der TJ verhindert. Dabei resultieren theoretisch längere Proliferationsphasen und die spätere Einleitung der terminalen Differenzierung. Für ZO1 ist eine Interaktion mit der CDK4 Kinase nachgewiesen und steuert so unter anderem die Proliferation als eine Art Zelldichte-Sensor ([6][7]). Ein Verhindern dieser Ausbildung durch verminderte Kalziumkonzentrationen und das gezielte Anheben deren [1,2-1,8mM] zu einem

definierten Zeitpunkt, könnte die zeitliche Steuerung der erwähnten Schritte ermöglichen. Theoretisch sollte der Effekt von HGF als „Scatterfactor“, wie dies z.B. in [49] für immortalisierte, proximale Tubuluszellen aus Kaninchen dokumentiert ist, in Kombination mit den verringerten Kalziumkonzentrationen zu einer erhöhten Verteilung der Zellen führen.

Die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in den Screeningplan wurde durch die niedrigen, unphysiologischen Kalziumkonzentrationen ( $\sim 0,09\text{mM}$ ) der SFK-Formulierung begünstigt und ermöglichte die Berücksichtigung von Kalzium als Faktor. Allerdings zeigte die Anwesenheit von Kalzium im Faktorenscreening ganz im Gegensatz zu den erwarteten Auswirkungen, einen großen positiven Effekt auf die Proliferation und im besonderen auf die maximale Dichte der Zellen. Zu erwarten wäre eine höhere Dichte und größere Verteilung der Zellen bei einer Kultur in den niedrigen Konzentrationen, sollten z.B. die Vorhersagen des in [136] angewendeten Computermodells zutreffen. Auch für die erwartete FWE 2x4 ( $\text{Ca}^{2+}\times\text{HGF}$ ) kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden.

### **FCS**

Selbst wenn für eine klinische Anwendung der BTKs ein vollständig definiertes Medium und pathogenfreies Medium gefordert wird, wurde für die Durchführung der Perfusionsexperimente im Labormaßstab die Wirksamkeit einer geringen FCS Konzentration getestet. Hierbei stand die Überlegung im Vordergrund, dass bei einer geringeren FCS Konzentration dessen positive Effekte überwiegen. In der Tat konnte in den Screeningexperimenten bei einer FCS Konzentration von 1% in den meisten Parametern ein signifikant positiver Effekt nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, muss dennoch in weiteren Schritten der Medienoptimierung die Supplementierung dieses ebenso wie des BPE in Hinblick auf eine therapeutische Anwendung entfallen, und durch entsprechend kompensierende, definierte Supplemente ersetzt werden.

## **5.4 CD133<sup>+</sup> Fraktionen primär isolierter Tubulusepithelien**

Die in 4.5 durchgeführten Untersuchungen fanden aufgrund der Entwicklungen hinsichtlich des Oberflächenmarkers CD133 (Prominin-1, AC133) statt. CD133<sup>+</sup> wurde als Marker für haematopoetische Stammzellen beschrieben ([138][139]) und konnte darauffolgend auch auf der apikalen Zellmembran von Epithelzellen identifiziert werden, darunter auch auf embryonalen Nierenepithelien [140]. Dies macht CD133<sup>+</sup> Zellen aus adulten Nierenepithelien zu möglichen Kandidaten einer renalen, an der Tubulusregeneration

beteiligten somatischen Stammzellfraktion. In [58] konnte eine CD133<sup>+</sup>/PAX2<sup>+</sup> Fraktion isoliert werden, die sich durch erhöhte Proliferationskapazitäten auszeichnet und sich *in vitro* und *in vivo* in Epithel- sowie Endothelzellen differenzieren lässt. Diese Ergebnisse führten zu den in 4.5 durchgeführten CD133<sup>+</sup> Screenings. Unter der genannten Annahme und sollte mit einer höheren Differenzierung bei aus diesen Zellen hervorgehenden Tochterzellen eine Verringerung der CD133<sup>+</sup> Expression mit der Abnahme der proliferativen Aktivität einhergehen, hätte dies Konsequenzen für die verwendeten Zellfraktionen. In der Konsequenz würde durch die hochspezifische Aufreinigung von hPTC und hDTC, eine Fraktion von TECs isoliert, denen die proliferativen Kapazitäten bzw. Stammzellcharakteristika der CD133<sup>+</sup> Fraktionen fehlen würde. In der Standardkultur der verschiedenen Nierenzellfraktionen konnte immer wieder beobachtet werden, dass im Vergleich zur jeweiligen reinen Zellfraktion (hPTC, hDTC), die Negativfraktionen (hDNeg, hPNeg, hNF) schneller und dichter proliferierten. Dies ist repräsentativ in Bild 14 dargestellt. Bei der Untersuchung der jeweiligen Fraktionen auf CD133<sup>+</sup> zeigte sich ein erhöhter Anteil der CD133<sup>+</sup> Fraktionen in den Negativfraktionen. Dies bestärkt die Vermutung, dass durch die hochspezifische Isolierung der hPTC und hDTC der überwiegende Anteil dieser potentiell wichtigen Fraktion nicht erfasst wird.

Neuere Untersuchungen konnten weitere Zusammenhänge zwischen der Tubulusregeneration sowie der proliferativen Aktivität von CD133<sup>+</sup> TECs herstellen ([141][142]) und stellen CD133<sup>+</sup> Populationen immer weiter in die engere Auswahl von Kandidaten für mögliche adulte renale Stammzellen ([58][141][142][143]). Diese Entwicklungen und die Ergebnisse aus dem CD133 Screening der verschiedenen Fraktionen in 4.5 aufgegriffen, führten zu dem Entschluss die Verwendung der hoch aufgereinigten Zellfraktionen für die Bildung von BTKs für die Anwendung im kommerziellen Maßstab zu überdenken. Sollten sich die Vermutungen hinsichtlich der CD133<sup>+</sup>/PAX2<sup>+</sup> Zellen weiter zuverlässig zu verdichten, scheint es für die Zukunft denkbar, diese Fraktion als Basis für BTKs zu verwenden und durch verschiedene, noch zu identifizierende Faktoren in entsprechende Tubulusabschnitte differenzieren zu lassen, um so ein mehrstufiges System zu erstellen.

In [143] wurde eine durch CD133<sup>+</sup>/PAX2<sup>+</sup> gekennzeichnete fötale Nierenzellfraktion in Ca<sup>2+</sup> freien Medium kultiviert. Dabei konnten über 60 Populationsverdopplungen erreicht werden, ohne dass es zu einer frühzeitigen Differenzierung oder einem Verlust der untersuchten Marker kam. Wie in 5.3 diskutiert, waren Überlegungen in diese Richtung, Grundlage für eine Untersuchung des Einflusses reduzierter Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen. Im

Faktorenscreening resultierte hieraus jedoch ein proliferationshemmender Effekt auf die verwendete adulte Zellfraktion. Ein Grund könnte darin liegen, dass im Supplementscreening eine reine hPTC Fraktion verwendet wurde. Auch wenn diese einen gewissen Anteil von CD133<sup>+</sup> Zellen aufweist, besteht die Möglichkeit das hier parakrine Faktoren von hPTC auf die CD133<sup>+</sup> Zellen den Ca<sup>2+</sup> Effekt überdecken. Um dies eindeutig zu bestätigen müssen Medienoptimierungen mit reinen CD133<sup>+</sup> Kulturen durchgeführt werden, dabei könnten z.B. Analysen der Zellzyklusphasen und CD133<sup>+</sup> Anteile an unterschiedlich dichten Kulturen und Passagen den Einfluss der Ca<sup>2+</sup> Konzentration und durch hPTC konditionierte Medien ermitteln.

## **5.5 Perfusionssystem**

Den größten Themenkomplex, theoretisch, praktisch sowie zeitlich beanspruchte die Entwicklung des Systems und der entsprechenden Protokolle für die Perfusion von zellbesiedelten Modulen. Diese gestaltete sich aufgrund der Vielzahl der möglichen Parameter während Einsaat und Perfusion als besonders heikel. Aufgrund vielerlei Gründe, primär aber aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit primärer Zellen und anderer Ressourcen wie Platz im Brutschrank, wurde eine vergleichende Analyse der optimierten Methoden verhindert. Das letztendlich verwendete System entstand dabei aus praktischen Erfahrungen heraus und entwickelte sich „evolutionär“. Die standardmäßige Analyse der Medienparameter Glukose, Laktat und BUN, die Ermittlung ausgespülter Zellen, Dichtigkeit der Monolayer und der zeitweise Einsatz von Sauerstoff- sowie Drucksensoren lieferten wertvolle Rückschlüsse auf den Status der Zellaktivität innerhalb der Module und ermöglichten somit die Optimierung der entsprechenden Protokolle. Die Komplexität des optimierten Perfusionssystems ist dennoch nicht zu unterschätzen und erfordert erhebliche Sorgsamkeit im Anwenden der Protokolle. Die in 4.8 dargestellten Ergebnisse erbringen für den Erfolg der Systementwicklung den entsprechenden Beweis. Es gewährleistete mit den zugehörigen Protokollen erfolgreich, zellbesiedelte, konfluente Module zu bilden und über einen Zeitraum von mehr als 28 Tagen zu perfundieren.

An einem vollverbundenen Modul befinden sich vier Schläuche, zwei Schlauchsätze inkl. Schlauchklemmen und Pumpenschläuche sowie bis zu vier Reservoirflaschen. Allein diese Standardausstattung birgt eine Vielzahl von möglichen Fehlbedienungen. Diese Komplexität (Abb. 38A&B) verhinderte auch den standardmäßigen Einsatz von Online Sensoren. Das Hinzufügen von Sensoren, im wünschenswertesten Fall, je einen Druck-

und Sauerstoffsensoren an jedem der vier Modulanschlüsse, erweitert das System um weitere acht Kabelstrecken und um alle damit verbundenen Probleme im Laboralltag. Eine zuverlässige, routinemäßige Handhabung ist in einem solchen Fall nicht mehr möglich. Im Hinblick auf diese Problematik wurde auf eine Standardausstattung mit den angesprochenen Sensoren verzichtet und diese nur zu gewählten Zeitpunkten in das modular aufgebaute System eingesetzt. Die Modularität des Schlauchsystems erwies sich als essentiell für eine erfolgreiche Kultur innerhalb der Hohlfasermodule. Erst hierdurch wurde es möglich den über lange Kultivierungszeiträume notwendigen Austausch von Schlauchsegmenten oder die erwähnte Integration von Sensoren in das Perfusionssystem zu gewährleisten.

Die Ergebnisse des Sauerstoffbedarfs in 4.2 und die Strömungsparameteranalyse in 4.6.2, zusammengefasst in Tabelle 4.16 ermöglichten die Ableitung des primären Perfusionsparameters, der Perfusionsgeschwindigkeit und machten diesen überhaupt als Pumpengeschwindigkeit fass- und einstellbar. Dabei konnten unter Berücksichtigung der Modulgeometrie und Anzahl der Kapillaren der maximale Fluss für die Intrakapillarperfusion sowie aus dem Sauerstoffbedarf der Zellen der minimal nötige additive Medienfluss (EC+IC) ermittelt werden. Ausgehend von den Werten in Tabelle 4.16 ergibt sich eine Diskrepanz zwischen den für den Sauerstoffbedarf der Zellen benötigten minimalen Fluss und dem durch die maximalen Scherkräfte begrenzten maximalen Fluss für die intrakapillaren Perfusion. Diese kann und wurde in dieser Arbeit durch eine Perfusion im äußeren Kompartiment kompensiert.

Zu der Systementwicklung werden in dieser Arbeit auch die Strategien und Protokolle für die Einsaat der zu perfundierenden Module gezählt. Im Gegensatz zu der Strategie anderer Gruppen, drei intermittierende Einsaaten durchzuführen ([72][67][81]), wurde ein Protokoll entwickelt, welches mit einer einmaligen Einsaat auskommt. Allgemein bestanden die Problematiken der Einsaat in der Zeitdauer der Prozedur und dem Erreichen einer optimalen Verteilung der Zellen innerhalb und über die Gesamtheit der Kapillaren eines Moduls. Letztendlich gewährleistete dies nur die in Abbildung 40C dargestellte und in 3.3.2 beschriebene Methode. Zusätzlich stellten sich Modulgeometrien als wichtige Stellgrößen heraus, wie z.B. das Design der Modulendkappen und die Anzahl der Kapillaren. Die Endkappen, welche sich links und rechts an den Modulen befinden und den Anschluss des inneren Kompartimentes der Faserbündel gewährleisten, zeigten zu Beginn der Befüllungs- und Perfusionsversuche ein relativ großes Totvolumen (~1ml je Endkappe bei 0,06-2,27ml Kapillarvolumen) und waren im Innenquerschnitt rechteckig

gefertigt. Für eine Reduzierung des Totvolumens und für eine optimierte Verteilung der Zellen während der Einsaat, wurden mit Gambro im Innenquerschnitt konisch gefertigte Endkappen entwickelt. Dies war insbesondere bei Modulen mit geringer Faseranzahl (32/50/64) aufgrund des niedrigen Kapillarinenvolumens notwendig. Das Problem des Totvolumens der Endkappen reduziert sich somit mit der Anzahl der Kapillaren und sollte bei großen, mit z.B. 6000 Fasern ausgestatteten Modulen nicht mehr so ins Gewicht fallen. Dennoch zeigt dieser Punkt, dass existierende Modulbauweisen eventuell an die Bedürfnisse für eine Zellbesiedelung angepasst und neue Modulgeometrien entwickelt werden müssen um die Effizienz auch im größeren Maßstab zu erhöhen.

Der letzte Punkt der Systementwicklung bestand in der Entwicklung der entsprechenden Protokolle für die mikroskopischen Untersuchungsverfahren, um den Erfolg der Einsaat und Perfusionsstrategien abseits von Stoffwechseledukten, -produkten und Farbstoffübertritten sichtbar zu machen. Erst hierdurch konnten Probleme mit dem Material, wie z.B. in Abbildung 41 dargestellt, sichtbar gemacht und identifiziert werden. Die entwickelten Protokolle für die Anwendung der konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) ermöglichten es erstmals, die Differenzierung der verwendeten Nierenepithelzellen innerhalb der Kapillaren nach Perfusion über die Ausbildung und Lokalisierung der AJ, TJ sowie AQP1 durch Immunofluoreszenztechniken nachzuweisen. Die hierdurch erlangten Bilder zeigen in beeindruckender Weise die gute Ausbildung von AJ, TJs und somit die hochgradig gute Differenzierung der Zellen innerhalb der Kapillaren. Abbildung 46 zeigt die gute Lokalisierung von E-Cadherinen bei MDCK Zellen, wie bei gut polarisierten Zellen zu erwarten, sind diese nur zwischen den Zellen lokalisiert. ZO1, nachgewiesen bei der humanen Zelllinien HK2 sowie den primären humanen Zellfraktionen lokalisiert nur in einem schmalen Bereich am apikalen Pol der basolateralen Membran, dem Bereich in dem die Bildung der TJ Junctions zu erwarten ist. Darüber hinaus zeigen immunofluoreszenzfärbungen in Abbildung 29C&D auf Flachmembranen und 54 in Kapillaren den Nachweis von AQP1 bei den dort verwendeten Mischzellfraktionen (hNF, hDNeg) und somit eines funktionellen Membranproteins proximaler TECs.

Die hier vorgestellten Immunofluoreszenztechniken in Verbindung mit dem verwendeten Membranmaterial ermöglichen es prinzipiell, weitere wichtige Marker von Interesse, wie z.B. Transporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, SGLTs oder metabolische Enzyme und endokrine Vorgänge sowie deren Lokalisierung innerhalb der in PEI-PAN Kapillaren kultivierten Zellen nachzuweisen und somit die funktionelle Charakterisierung von TECs in

Kapillarkulturen voranzutreiben. Die Anwendung der REM diente dem Nachweis und der Dokumentation morphologischer Feinstrukturen der Zellen innerhalb der Kapillaren. Zwar konnten Saito et al. bereits verschiedene REM Aufnahmen unterschiedlicher Zelllinien (MDCK, LLCPK1, HK2) in Hohlfasern verschiedenster Materialien präsentieren ([67][144][145][146][147]), jedoch bis auf [144] (MDCK) und [67] (LLC-PK1) in nicht vergleichbarer Qualität und Erfolg bezüglich der Perfusionskultur und Präparation. In diesen REM-Aufnahmen werden entweder Probleme mit den Membranmaterialien unter Verwendung verschiedener Beschichtungsmethoden in der Hohlfaserkultur sichtbar oder Probleme von Überwachungen mit den verwendeten Zelllinien. Diese Überwachungen konnten auch in den Modulperfusionen mit MDCK (Abb. 44E) und HK2 (Abb. 47E) validiert werden und dokumentieren die fehlende Proliferationskontrolle immortalisierter Zelllinien.

Die in der hier vorliegenden Arbeit präsentierten Aufnahmen stellen die nach Durchsicht der relevanten Literatur ersten Aufnahmen von primären, humanen TECs dar, mit denen die erfolgreiche Kultur innerhalb von Hohlfasern, ohne vorhergehende Bioaktivierung des Membranmaterials, dokumentiert wurde. Dies trifft in selbigen Maße auch für die präsentierten CLSM-Visualisierungen zu. Keiner weiteren Gruppe ist es bisher gelungen, die Ausbildung von epitheltypischen (ZO1, E-Cad) oder TEC Markern (AQP1) in der Hohlfaser unabhängig von den verwendeten Zellen, erfolgreich zu dokumentieren. Das hierin verwendete Material ist für solche Untersuchungen ideal, es stellt nicht nur ein optimales poröses Substrat für die Perfusionskultur von Epithelzellen dar, sondern ermöglicht auch die Anwendung von optischen, somit auch von auf Immunofluoreszenz basierenden Verfahren. Dies ermöglicht die Charakterisierung der Hohlfaserkulturen anhand von spezifischen Markern und durch Beurteilung der Lokalisierung, wie im vorliegenden Falle eine Beurteilung der Differenzierung bzw. mögliche Charakterisierung des vorhandenen Zelltyps.

## **5.6 Zellquellen**

Für die Realisierung von BTKs als klinische Therapieform können und müssen immortalisierte Zelllinien ausgeschlossen werden, einerseits aus Gründen möglicher Pathogen- und Allergenitäten der Zellen in Hinblick auf die Sicherheit der Patienten, andererseits aufgrund der Auswirkungen der mangelhaften Proliferationskontrolle dieser Zellen, den dadurch resultierenden Überwachungen innerhalb der Kapillaren, (Abb. 44E



und 47E) und der damit verbundenen Konsequenzen auf die Funktionsweise von BTKs. Eine ernsthafte Entwicklung muss daher auf Primärisolaten basieren.

Eines der definierten Ziele des Verbundprojektes war die Entwicklung eines zweistufigen Systems, bestehend aus einer proximalen sowie distalen Einheit [82]. Dabei sollten zusätzlich zu den transport- und metabolischen Funktionen der proximalen, die parakrinen Funktionen der distalen Zellen für eine therapeutische Anwendung verfügbar gemacht werden. Die Möglichkeit, diese Einheiten aus aufgereinigten Zellfraktionen von Primärisolaten zu erreichen, schien zu diesem Zeitpunkt als prinzipiell realisierbar. In der Laufzeit des Projektes zeigte sich allerdings immer stärker, dass die Verfügbarkeit an Spendergewebe für eine beabsichtigte industrielle Fertigung nicht ausreicht. Diese Problematik manifestierte sich bereits für die im Labormaßstab durchzuführenden Versuche, in welchen als Gewebequellen Nieren aus durchgeführten Nephrektomien in Frankfurter Kliniken bzw. aus dem Frankfurter Umland zum Einsatz kamen. Dies zeigt sich in den hier verwendeten, verschiedenen Zellsystemen. Es kam immer wieder zu einem Mangel an Gewebe für eine Isolation der entsprechenden Zelltypen, sodass vergleichende Versuche zwischen den Zellfraktionen kaum durchzuführen waren. Erschwert wurde der Umstand durch unzureichende proliferativen Kapazitäten der Zellen. Zwar konnten diese durch die Entwicklung eines optimierten Mediums und dem Einsatz der Negativfraktionen (hNF, hPNeg, hDNeg) verbessert und somit der Durchbruch im Labormaßstab ermöglicht werden, aber an der Verfügbarkeit des Spendergewebes konnte dies nichts ändern. Alternativquellen für humane Spendergewebe sind begrenzt und könnten in abgestoßenen Transplantaten, Leichenorganen oder Transplantaten, die nach Entnahme nicht rechtzeitig einen neuen Empfänger erreicht haben, liegen. Selbst unter Einbeziehung, dieser zum Teil ethisch problematischen Gewebequellen scheint es nicht realisierbar, eine adäquate Anzahl an BTKs zu produzieren. Abseits des akademischen Interesses stellt die Zellquelle somit die größte Hürde für BTKs auf dem Weg zu einer im großen Maßstab verfügbaren Therapieform dar. Im folgenden soll dies in Form von Zahlen verdeutlicht werden.

Die Populationshäufigkeit des akuten Nierenversagens liegt bei 2000-3000 Fällen pro Million Einwohner/Jahr [148]. Der Anteil der Patienten auf Intensivstationen, die aufgrund eines schweren akuten Nierenversagens eine Nierenersatztherapie erhalten, liegt bei ca. 4 % ([148][149]), dies entspricht einer Populationshäufigkeit von ca. 300 Fällen pro Million Einwohnern/Jahr [148]. Die Anwendung eines biohybriden Therapieverfahrens nur für diese Fälle würde eine Anzahl von ca 25000 vorbereiteter BTKs in der Bundesrepublik Deutschland erfordern.

Im Jahr 2007 konnten in Deutschland laut [150] ~3000 Nieren an wartende Empfänger verpflanzt werden. 2331 dieser Transplantate stammten von verstorbenen [151] und rund 500 von lebenden Spendern [150]. Insgesamt standen 2007 2620 Nieren verstorbener Spender zur Verfügung von denen 2597 durch Eurotransplant freigegeben und letztendlich 2331 transplantiert wurden. Die Liste der in Deutschland wartenden Empfänger umfasst zum 31.12.2007 rund 8000 Patienten.

Einerseits verdeutlichen diese Zahlen den gravierenden Mangel an Spenderorganen, andererseits wird auch klar, welche großen ethischen Probleme humane Spendernieren als Gewebequellen für BTKs aufwerfen würden. Die Zahlen zeigen weiterhin, dass von insgesamt 2620 verfügbaren Nieren, 289 aufgrund nicht aufgeführter Gründe in Deutschland 2007 nicht für eine Transplantation in Frage kamen. Analog zu Humes et al. in den USA [71], könnten diese Nieren eine mögliche Gewebequelle darstellen, wenn entsprechende logistische und möglicherweise bestehende rechtliche Hürden beseitigt werden. Es erscheint aber eher unwahrscheinlich, den oben genannten Bedarf von 25000 benötigter BTKs allein aus enddifferenzierten Zellen dieser Nieren zu decken. In [85] konnten pro g Niere  $3,2 \cdot 10^4$  hDTC und  $1,8 \cdot 10^4$  hPTC isoliert werden. Ausgehend von einem Maximalgewicht von 200g [12] stünden pro Niere  $6,4 \cdot 10^6$  hDTC respektive  $3,6 \cdot 10^6$  hPTC für eine Besiedlung von Hohlfasermodule zur Verfügung. Die Fläche kommerzieller Hohlfasermodule beträgt mindestens  $1\text{m}^2$ , übersetzt in absolute Zellzahlen ergibt dies, bei einer Dichte von  $2000 \text{ Zellen} \cdot \text{mm}^{-2}$ , ungefähr  $2 \cdot 10^9$  Zellen insgesamt pro Modul. Die benötigte Einsaatdichte von  $\sim 400 \text{ Zellen} \cdot \text{mm}^{-2}$  könnte ausgehend von der Grundmenge isolierter Zellen pro Niere bei konsequenten Passagieren innerhalb von 8-10 Teilungen/Generationen und 5 Passagen in herkömmlichen T75 ZK-Flaschen erreicht werden. Auch wenn dies im Bereich des Möglichen liegt, ist eine 1:1 Situation, in welcher die isolierten Zellen einer Niere zur Erstellung nur eines BTK führen als unbefriedigend anzusehen.

Bereits während der Laufzeit des HyTube Projektes wurde diese Problematik aufgegriffen [82] und führte zum Überdenken des gesamten Konzeptes. Grundsätzlich liegen die Möglichkeiten diese Hürde zu überwinden in der Anwendung von Stammzellen und hängen somit von den Forschungsfortschritten auf diesem Gebiet ab. In Frage kommen hierbei adulte Stammzellen der Niere, die an der Regeneration geschädigter Tubulusabschnitte, entweder durch direkte Interaktion durch Teilung und Differenzierung oder durch indirekte, parakrine Modulation beteiligt sind. Wie in 1.8.2.3 dargelegt, ist es aber bisher nicht überzeugend gelungen, entsprechende Stammzellpopulationen des

Tubulusepithels zu isolieren bzw. zu identifizieren. Als erfolgversprechende Kandidaten kristallisieren sich derzeit CD133<sup>+</sup>/PAX2<sup>+</sup> Zellen der Niere heraus. Aber auch MSCs aus dem Knochenmark und aus dem Fettgewebe könnten an der Regeneration durch Transdifferenzierung oder über parakrine Wege beteiligt sein. Die Identifizierung der hieran beteiligten Zellen und Faktoren, die es ermöglichen würden, diese hin zu den entsprechenden Zelltypen zu differenzieren, stellen dabei die kritischsten Schritte dar. Durch den Aufbau eines integrierten Kokultursystems wäre es dennoch vorstellbar, die mögliche noch zu identifizierende, parakrine Modulation verschiedener Zellarten untereinander nutzbar zu machen.

Die Ergebnisse aus 4.5 könnten weiterhin eine Erklärung für die mangelhafte Proliferationskapazität der hoch reinen Epithelzellfraktion bieten und dabei einen grundsätzlichen Fehlansatz des HyTube-Projektes aufweisen. Sollte sich in zukünftigen Studien CD133 als Marker für adulte, renale Progenitorzellen weiter herausstellen, wäre gerade durch die Verwendung der hochreinen Fraktionen diese Progenitorfraktion und deren wichtiger Beitrag ausgeschlossen worden. Diese Möglichkeit wurde bei der vermehrten Verwendung der Negativfraktionen für Perfusionsversuche aufgegriffen. In Abbildung 54 konnte neben dem TJ assoziierten ZO1 weiterhin AQP1, ein Marker für proximale TECs, in Hohlfaserkulturen dieser Fraktion und somit ein Beweis für die prinzipielle Verwendbarkeit dieser nachgewiesen werden.

Das Identifizieren renaler Stamm- bzw. adulter Stammzellen und der entsprechenden differenzierungsrichtenden Faktoren hätte für den Anwendungsfall des chronischen Nierenversagens weitere Vorteile. Eine auf autologen Zellquellen basierende therapeutische Anwendung erscheint aufgrund des spontanen Eintretens eines akuten Nierenversagens unwahrscheinlich, könnte aber durch den vorhersehbaren Verlauf im Falle des chronischen Nierenversagens eine durchaus vielversprechende Option darstellen. Vorausgesetzt, eine entsprechende adulte Stammzellfraktion sei identifiziert und entsprechende klinische Isolations- und Expansionsprotokolle würden vorliegen, könnte eine entsprechende autologe Therapie in der Isolation, Expansion mit anschließender Differenzierung patienteneigener renaler Zellen und der Herstellung abgestimmter BTKs liegen. Es scheint sogar vorstellbar diese Konstrukte, die Ideen von Saito et al [152] aufgegriffen, als tragbare Einheiten für diese Patientengruppe zu konzipieren.

## 5.7 Upscaling

Die möglichen therapeutischen Anwendungen von BTKs liegen in der Behandlung des akuten sowie chronischen Nierenversagens. Die produktionstechnischen Unterschiede und Ansprüche zwischen diesen beiden Anwendungsfällen liegen einerseits in der zeitnahen Verfügbarkeit aber auch in der Wahl der verfügbaren und anwendbaren Zellquelle. Im Falle des akuten Nierenversagens ist aufgrund des unvorhersehbaren Eintretens und gravierenden Ausmasses für die Betroffenen ein schnelles Handeln und eine hohe Verfügbarkeit anzustreben, die eine hohe Vorhaltung vorbereiteter Module erfordert und letztendlich diese mit dem Erfolg der Therapieform verknüpft. Um eine therapeutische Versorgung in der Größenordnung eines kommerziellen Produktes zu gewährleisten muss eine adäquate Menge an verfügbaren Modulen für den Einsatz an Patienten bereitgestellt werden können. Ein auf autologen Zellquellen basierendes Verfahren kann ausgeschlossen werden. Anders ist eine mögliche Anwendung im Falle des chronischen Nierenversagens zu beurteilen, der vorhersehbare Verlauf und der dadurch gegebene Zeithorizont könnte eine auf den Patienten abgestimmte Therapieform auf autologer Basis ermöglichen.

Eine Vorhaltung einer entsprechenden Anzahl Module auf Lager führt zu verschiedenen Problemen, einerseits muss auf Seite der Zellen für eine stabile Differenzierung auch über längere Zeiträume gesorgt werden, andererseits müssen aufgrund wirtschaftlicher Überlegungen Wege gefunden werden, die es ermöglichen, eine solche Lagerhaltung unter einem Minimum an Medienverbrauch, Personal und gerätetechnischem Aufwand zu garantieren. Äußerst kritisch ist dabei die ausreichende Versorgung der Module mit Sauerstoff, ausgehend von den Werten in 4.16 benötigt ein Modul mit einer Kulturfläche von  $1\text{m}^2$  für die Deckung des Sauerstoffbedarfs einen Medienfluss von ungefähr  $270\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Eine denkbare Methode, diesen Wert über den Vorhalte- und Transportzeitraum zu senken, besteht in der Konditionierung der Zellen an ein Milieu herabgesenkter Sauerstoffkonzentrationen, hierbei kann, wie in 4.2.3 gezeigt der Sauerstoffbedarf um bis zu 50% gesenkt werden. Dieser Bedarf könnte durch verringerte Kultivierungstemperaturen und der damit verbundenen weiteren Senkung der metabolischen Aktivitäten der Zellen noch weiter reduziert werden. In Vorversuchen von Dr. Baer konnten TEC-Monolayerkulturen über einen Zeitraum von 10 Tagen bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und anschließend weiter kultiviert werden ohne sichtbare Schädigungen der Monolayer [82].

Die in dieser Arbeit entwickelten Protokolle stellen den Ausgangspunkt der nötigen Schritte für einen Upscalingprozess hin zu einem Therapieverfahren dar. Äußerst wichtig erscheint hierbei die Entwicklung eines geschlossenen Systems, welches alle nötigen Sensoren in sich vereint und weitgehend autonom die Expansion und Kultur hin zu klinisch anwendbaren BTKs, ohne weitere direkte, manuelle Interaktion mit den Zellen ermöglicht. Mittels einer über Sensoren und entsprechende Software gesteuerten automatischen Prozessführung kann eine gleichbleibende, im einzelnen nach GLP und GMP/GCP protokollierte Qualität gewährleistet und somit das spätere Zulassungsverfahren vereinfacht werden. Im günstigsten Fall leistet das System die entsprechende Isolierung der gewünschten Fraktionen, z.B. durch homogen aufgebrauchte Antikörper gegen Oberflächenmarker der gewünschten Zellfraktion auf die Membran. Denkbar wären weiterhin mehrstufige bzw. kreisgeführte Systeme für eine Konditionierung des Kulturmediums, um dadurch parakrine Effekte verschiedener Zellfraktionen aufeinander nutzbar zu machen. Im speziellen Fall auf die Hohlfaserkultur von TECs z.B. durch MSCs, sollten sich deren parakrine Effekte in nutzbarer Qualität zeigen oder um differenzierungsfördernde Effekte durch von TECs konditionierte Medien auf somatische Stammzellen in einer geschlossenen Perfusionskultur nutzbar zu machen.

Mit den in dieser Arbeit ermittelten Parametern, Protokollen und durch die gezeigte, prinzipielle Umsetzung im Labormaßstab stehen für einen automatisierten Prozess und für das Upscaling wertvolle Ausgangsdaten zur Verfügung, die zusammen mit dem momentanen Stand der Technik ein solch geschlossenes, integriertes System als realisierbar erscheinen lassen. Haupthindernis für ein Upscaling ist eine zuverlässige Zellquelle mit hoher Verfügbarkeit wie dies in 5.6 diskutiert wurde.

## **6 Fazit und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit stellt die integrierte, biotechnologische Entwicklung eines biohybriden, renalen Tubuluskonstrukts im Labormaßstab als Ausgangspunkt für einen späteren klinischen Einsatz dar und weist alle Facetten des Tissue Engineerings auf. Von Grund auf standen in den durchzuführenden Schritten, wie im Falle des Materialscreenings, der Parameterermittlung, der Methodenentwicklung, der Medienentwicklung und der Bewertung der Zellquellen, die spätere Übertragung auf den Upscalingprozess hin zu einer späteren klinischen Anwendung als Produkt in therapeutischen Verfahren im Vordergrund. Mögliche, bereits in frühen Projektphasen

absehbare Probleme im späteren Upscaling- und Zulassungsverfahren sollten bereits in diesen Stadien identifiziert und vermieden werden. Hierzu zählt exemplarisch die Vermeidung der Bioaktivierung des Membransubstrats für die Kultivierung von Zellen, welche die Grundlage der Ansätze von Humes et al., Saito et al. und auch Huijuan et. al., mittels des kommerziellen, biosynthetischen Produkts ProNectin F darstellt. Unabhängig von den Lizenzkosten und der durch die biologische Herkunft dieses Agens gegebenen Zulassungsproblematik in Hinsicht auf die Realisierung eines späteren Therapieverfahrens, steht und fällt das gesamte Konzept mit der Verfügbarkeit bzw. der Unbedenklichkeit dessen oder anderen Matrixkomponenten die hierfür in Betracht kommen. Das im HyTube-Projekt identifizierte PEI-PAN Kopolymer dagegen ist ein seit Jahren in therapeutischen Verfahren zugelassenes und angewendetes Material, und weist bereits nach der Herstellung ohne weitere Modifikationen für die Kultivierung von primären TECs optimale Substrateigenschaften auf, sodass mit den angesprochenen Problemen nicht zu rechnen ist.

Für eine industrielle Herstellung von BTKs müssen die primären Systemparameter bekannt sein, die eine erfolgreiche Produktion dieser gewährleisten, hierzu zählen die minimalen und maximalen Perfusionsgeschwindigkeiten. Im Kontext dieser Arbeit wurden diese wichtigen Faktoren in Zahlen fassbar gemacht. Es konnten erstmals die *in vitro*-Sauerstoffbedarfsparameter primärer, hochspezifisch aufgereinigter TECs des proximalen und distalen Tubulusabschnitts unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert werden. Zusammen mit den anhand simplifizierter Annahmen hergeleiteten theoretischen Strömungsparameter können daraus die benötigten Betriebsparameter abgeleitet werden. Durch die Verwendung statistischer Methoden konnte ein serumarmes Medium definiert werden, mithilfe dessen eine erfolgreiche Kultur der primären TECs gewährleistet wird. Dieses ermöglicht die weitere Arbeit mit Primärisolaten im Labormaßstab und stellt eine Basis für die Entwicklung eines definierten, serumfreien Mediums für den Übertragungsprozess auf eine therapeutische Anwendung dar.

Unter Berücksichtigung der oben dargestellten Ergebnisse, der Entwicklung eines adäquaten Perfusionssystems und der methodischen Protokolle, konnte durch die Anwendung moderner Mikroskopietechniken wie REM und CLSM die Ausbildung der geforderten epithelialen Morphologien der Tubulusepithelmonolayer in synthetischen Hohlfasern dokumentiert werden. Die in dieser Arbeit präsentierten Bilder stellen die ersten REM Aufnahmen von primären, humanen TEC Monolayern und die ersten über Immunfluoreszenztechniken mittels CLSM visualisierten TECs in Hohlfasern dar. Es

gelang somit zum ersten Mal, die Differenzierung primärer, humaner TECs anhand typischer Merkmale, wie AQP1 und ZO1 nach Perfusionszeiträumen von 28Tage über ein mikroskopisches Verfahren innerhalb der Kapillaren nachzuweisen.

Dennoch werfen die Ergebnisse dieser Arbeit grundsätzlich die bereits in 5.6 diskutierten, nicht gelösten Fragen in Bezug auf die Zellquelle auf, die auch weitere auf diesem Gebiet tätige Gruppen betrifft. Aufgrund der Zellquellfrage, erscheinen die Ansätze von Saito et al., welche als Zellquelle nicht nur permanente Zelllinien vorsehen, sondern auch Ansätze der genetischen Manipulation dieser, um z.B. LLC-PK1 Zellen mit AQP1 auszustatten [66] zwar verständlich, sind dabei aber in Hinblick auf ein späteres Zulassungsverfahren mit besonderer Vorsicht zu bewerten. Auch die Gruppe von Humes et al. wird unabhängig vom akademischen Interesse und den Erfolgen in klinischen Studien bei der Umsetzung des RAD-Konzeptes auf eine kommerzielle, therapeutische Anwendung diese Frage klären müssen. Auch der grundsätzlichen Vorgehensweise dieser Gruppen bezüglich einer Bioaktivierung der Membranoberflächen durch Material biologischen Ursprungs sollte in Bezug auf klinische Zulassungsverfahren und eventueller Pathogenitäten kritisch gegenüber gestanden werden. Die jüngsten Ergebnisse der Humes Gruppe in klinischen Phase 2 Studien [153] zeigen dennoch, dass die Idee der BTKs und das damit verbundene Verfahren über den Labormaßstab hinaus auch im klinischen Einsatz sicher Anzuwenden ist und den therapeutischen Nutzen bringt. In dieser Studie erhielten 40 von 58 Patienten mit akuten Nierenversagen und schlechter Prognose eine bis zu 72h andauernde RAD Behandlung. Als Kontrolle dienten 18 über konventionelle Therapien behandelte Patienten. Dabei wurden die Langzeiteffekte nach 28 und 180 Tagen evaluiert und resultierten in einer um ca. 30% reduzierten Mortalität nach 28 Tagen (nicht signifikant) und einer signifikanten reduzierten Mortalität nach 180Tagen. Dies zeigt welche vielversprechende Möglichkeiten BTKs darstellen die klassischen Verfahren nach Lösung der Zellquellfrage zu ersetzen und zu verbessern.

Die Anwendungsfälle von BTKs sind in der Anwendung bei akuten und chronischen Nierenversagen zu sehen, wobei diese sich nicht nur in der Wahl der Zellquellen und des Produktionsablaufs unterscheiden, sondern auch wesentlich in der Nutzung der zu erwartenden, therapeutischen Effekte. Liegen diese bei einem akutem Nierenversagen primär in der schnellen und im Vergleich zu den klassische Verfahren schonenderen und geregelten Wiederherstellung des Wasser-, Salz- und Säure- Basenhaushaltes und der regenerativen Unterstützung des patienteneigenen Organs durch parakrine Faktoren, kann das Verfahren helfen Patienten mit einem chronischen Versagen den Zeitraum bis

zum Erhalt eines Spenderorgans unter erhöhter Lebensqualität zu überbrücken. Hierbei könnten die BTKs über die erwähnten Transportaufgaben hinaus durch ihre metabolischen und immunoregulatorischen Effekte, wie der Glukosehomeostase und der Vitamin-D3-Aktivierung beitragen.

Durch die in dieser Arbeit dokumentierten Ergebnisse können einige der kritischen Punkte der BTK Entwicklung gelöst werden, wie die fehlende Charakterisierung innerhalb der Hohlfasern, das hinfällige *in situ* Aktivieren der Membranen und die Abschätzung der für ein Upscaling notwendigen Schritte. Die Frage nach der Zellquelle bleibt aber weiterhin offen, und ist auf zukünftige Entwicklungen der Stammzellforschung angewiesen, um eine Realisierung der BTKs als klinische Therapieform zu ermöglichen.



## 7 Literaturverzeichnis

- 1: Teebken OE, Kofidis T, Akhyari P, Haverich A.: "Tissue engineering: in vitro creation of tissue substitutes", Zentralbl Chir. 132(3): 236-246., 2007
- 2: Ikada Y.: "Challenges in tissue engineering.", J R Soc Interface. 3(10): 589-601., 2006
- 3: Minuth WW, Sittinger M, Kloth S.: "Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications.", Cell Tissue Res. 291(1): 1-11., 1998
- 4: Lavik E, Langer R.: "Tissue engineering: current state and perspectives.", Appl Microbiol Biotechnol. 65(1): 1-8., 2004
- 5: Handler JS.: "Overview of epithelial polarity.", Annu Rev Physiol. 51: 729-740, 1989
- 6: Schneeberger EE, Lynch RD.: "The tight junction: a multifunctional complex.", Am J Physiol Cell Physiol. 286(6): C1213-1228., 2004
- 7: Balda MS, Garrett MD, Matter K.: "The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density.", J Cell Biol. 160(3): 423-432., 2003
- 8: Shin K, Fogg VC, Margolis B.: "Tight junctions and cell polarity.", Annu Rev Cell Dev Biol. 22: 207-235, 2006
- 9: Cerejido M, Shoshani L, Contreras RG.: "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity.", Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 279(3): G477-G482, 2000
- 10: Gooding JM, Yap KL, Ikura M.: "The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures.", Bioessays. 26(5): 497-511, 2004
- 11: M.H. Ross, W. Pawlina: "Histology: A Text And Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology", 5. Auflage 2006, Lippincott Williams and Wilkins, ISBN: 0781767903
- 12: Campell, Reece: "Biologie", 6. Auflage 2003, Spektrum Akademischer Verlag, S. 1132-1144, ISBN: 3-8274-1352-4
- 13: Keidel, W.: "Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie", 5. Auflage 1979, Georg Thieme Verlag Stuttgart, ISBN: 313358605X
- 14: Klinke, Pape, Silbernagl: "Physiologie", 5. Auflage 2005, Thieme, S. 326-376, ISBN: 3-13-796005-3
- 15: Löffler, Petrides, Heinrich, Peter: "Biochemie & Pathobiochemie", 8. Auflage 2007, Springer Medizin Verlag, S. 895-950, ISBN: 978-3-540-32680-9
- 16: Schwegler: "Der Mensch, Anatomie und Physiologie", 4. Auflage 2006, Georg Thieme Verlag, S. 212-229, ISBN: 3131001542
- 17: Wang T.: "Flow-activated transport events along the nephron.", Curr Opin Nephrol Hypertens. 15(5): 530-536, 2006
- 18: Matsubara M.: "Renal sodium handling for body fluid maintenance and blood pressure regulation.", Yakugaku Zasshi. 124(6): 301-309, 2004
- 19: Greger R.: "Physiology of renal sodium transport.", Am J Med Sci. 319(1): 51-62, 2000
- 20: Wright EM.: "Renal Na(+)-glucose cotransporters.", Am J Physiol Renal Physiol. 280(1): F10-F18, 2001
- 21: Lee WS, Kanai Y, Wells RG, Hediger MA.: "The high affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression.", J Biol Chem. 269(16): 12032-12039, 1994

- 22: The Consortium of Glycobiology Editors, Essentials of Glycobiology, 1999,  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=sglt&rid=glyco.table.403>, Zugriff 20.08.2007
- 23: Anzai N, Kanai Y, Endou H.: "Organic anion transporter family: current knowledge.", J Pharmacol Sci. 100(5): 411-426, 2006
- 24: Lee W, Kim RB.: "Transporters and renal drug elimination.", Annu Rev Pharmacol Toxicol. 44: 137-166, 2004
- 25: Daniel H, Rubio-Aliaga I.: "An update on renal peptide transporters.", Am J Physiol Renal Physiol. 284(5): F885-892, 2003
- 26: Gekle M.: "Renal tubule albumin transport.", Annu Rev Physiol. 67: 573-594, 2005
- 27: Christensen EI, Birn H.: "Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule.", Am J Physiol Renal Physiol. 280(4): F562-573, 2001
- 28: Verroust PJ, Christensen EI.: "Megalin and cubilin - the story of two multipurpose receptors unfolds.", Nephrol Dial Transplant. 17(11): 1867-1871, 2002
- 29: Yool AJ, Weinstein AM.: "New roles for old holes: ion channel function in aquaporin-1.", News Physiol Sci. 17: 68-72, 2002
- 30: Fisher DA, Salido EC, Barajas L.: "Epidermal growth factor and the kidney.", Annu Rev Physiol. 51: 67-80., 1989
- 31: O'Connor PM.: "Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand.", Clin Exp Pharmacol Physiol. 33(10): 961-967, 2006
- 32: Guder WG, Ross BD.: "Enzyme distribution along the nephron.", Kidney Int. 26(2): 101-111., 1984
- 33: Guder WG, Wagner S, Wirthensohn G.: "Metabolic fuels along the nephron: pathways and intracellular mechanisms of interaction.", Kidney Int. 29(1): 41-45, 1986
- 34: Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, Stumvoll M.: "Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis.", Diabetes Care. 24(2): 382-391, 2001
- 35: Mandel LJ.: "Metabolic substrates, cellular energy production, and the regulation of proximal tubular transport.", Annu Rev Physiol. 47: 85-101, 1985
- 36: Fernando Liaño: "Atlas of Diseases of the Kidney", Online Ausgabe 1999, Blackwell Publishing, S. 8.1-8.16, ISBN: 0632043857
- 37: Haller M, Schelling G.: "Acute kidney failure. Physiopathology - clinical diagnosis - therapy", Anaesthesist. (49) 4: 349-352., 2000
- 38: Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A.: "Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy.", J Clin Invest. 114(1): 5-14, 2004
- 39: Devarajan P.: "Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury.", J Am Soc Nephrol. 17(6): 1503-1520, 2006
- 40: Weinberg JM.: "The cell biology of ischemic renal injury.", Kidney Int. 39(3): 476-500, 1991
- 41: Bonventre JV, Weinberg JM.: "Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure.", J Am Soc Nephrol. 14(8): 2199-2210, 2003
- 42: Lieberthal W, Nigam SK. : "Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury.", Am J Physiol. 275(5 Pt 2): F623-F631, 1998
- 43: Gobe GC, Johnson DW.: "Distal tubular epithelial cells of the kidney: Potential support for proximal tubular cell survival after renal injury.", Int J Biochem Cell Biol. 39(9): 1551-1561., 2007
- 44: Witzgall R.: "The proximal tubule phenotype and its disruption in acute renal failure and polycystic kidney disease.", Exp Nephrol. 7(1): 15-19, 1999

- 45: Gobé G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z.: "Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury.", *Kidney Int.* 56(4): 1299-1304, 1999
- 46: Hammerman MR, Miller SB.: "Therapeutic use of growth factors in renal failure.", *J Am Soc Nephrol.* 5(1): 1-11., 1994
- 47: Wang S, Hirschberg R.: "Role of growth factors in acute renal failure.", *Nephrol Dial Transplant.* 12(8): 1560-1563., 1997
- 48: Kays SE, Schnellmann RG.: "Regeneration of renal proximal tubule cells in primary culture following toxicant injury: response to growth factors.", *Toxicol Appl Pharmacol.* 132(2): 273-280, 1995
- 49: Ernst F, Hetzel S, Stracke S, Czock D, Vargas G, Lutz MP, Keller F, Jehle PM.: "Renal proximal tubular cell growth and differentiation are differentially modulated by renotropic growth factors and tyrosine kinase inhibitors.", *Eur J Clin Invest.* 31(12): 1029-1039, 2001
- 50: Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C.: "Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure.", *J Clin Invest.* 84(6): 1757-1761., 1989
- 51: Nowak G, Schnellmann RG.: "Integrative effects of EGF on metabolism and proliferation in renal proximal tubular cells.", *Am J Physiol.* 269(5 Pt 1): C1317-1325, 1995
- 52: Cantley LG.: "Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule.", *Nat Clin Pract Nephrol.* 1(1): 22-32., 2005
- 53: Poulsom R et al.: "Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration.", *J Pathol.* 195(2): 229-235., 2001
- 54: Morigi M et al.: "Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure.", *J Am Soc Nephrol.* 15(7): 1794-1804, 2004
- 55: Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV.: "Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells.", *J Clin Invest.* 115(7): 1743-1755., 2005
- 56: Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C.: "Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms.", *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(1): F31-42., 2005
- 57: Lange C, Tögel F, Ittrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR, Westenfelder C.: "Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats.", *Kidney Int.* 68(4): 1613-1617., 2005
- 58: Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, Camussi G.: "Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney.", *Am J Pathol.* 166(2): 545-555., 2005
- 59: Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q.: "The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells.", *J Clin Invest.* 114(6): 795-804., 2004
- 60: Sator-Katzenschlager S., Weinstabl C.: "Akutelle Nierenersatztherapie", *European Surgery* 30(1): 59-60, 1998
- 61: Morath C, Miftari N, Dikow R, Hainer C, Zeier M, Schwenger V, Weigand MA.: "Nierenersatztherapie auf der Intensivstation", *Der Anaesthesist* 55(8): 901-913, 2006
- 62: Aebischer P, Ip TK, Panol G, Galletti PM.: "The bioartificial kidney: progress towards an ultrafiltration device with renal epithelial cells processing", *Life Support Syst.* 5(2): 159-168, 1987

- 63: Aebischer P, Ip TK, Miracoli L, Galletti PM.: "Renal epithelial cells grown on semipermeable hollow fibers as a potential ultrafiltrate processor.", *ASAIO Trans.* 33(2): 96-102, 1987
- 64: Ip TK, Aebischer P.: "Renal epithelial-cell-controlled solute transport across permeable membranes as the foundation for a bioartificial kidney.", *Artif Organs.* 13(1): 58-65., 1989
- 65: Baer PC, Nockher WA, Haase W, Scherberich JE.: "Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note.", *Kidney Int.* 52(5): 1321-1331, 1997
- 66: Fujita Y, Terashima M, Kakuta T, Itoh J, Tokimasa T, Brown D, Saito A.: "Transcellular water transport and stability of expression in aquaporin1-transfected LLC-PK1 cells in the development of a portable bioartificial renal tubule device.", *Tissue Eng.* 10(5-6): 711-722, 2004
- 67: Saito A, Aung T, Sekiguchi K, Sato Y, Vu DM, Inagaki M, Kanai G, Tanaka R, Suzuki H, Kakuta T.: "Present status and perspectives of bioartificial kidneys.", *J Artif Organs.* 9(3): 130-135, 2006
- 68: Inagaki M, Yokoyama TA, Sawada K, Duc VM, Kanai G, Lu J, Kakuta T, Saito A.: "Prevention of LLC-PK(1) cell overgrowth in a bioartificial renal tubule device using a MEK inhibitor, U0126.", *J Biotechnol.* 132(1): 57-64, 2007
- 69: Humes HD, Weitzel WF, Bartlett RH, Swaniker FC, Paganini EP.: "Renal cell therapy is associated with dynamic and individualized responses in patients with acute renal failure.", *Blood Purif.* 21(1): 64-71, 2003
- 70: Humes HD, Weitzel WF, Fissell WH.: "Renal cell therapy in the treatment of patients with acute and chronic renal failure.", *Blood Purif.* 22(1): 60-72, 2004
- 71: Humes HD, Weitzel WF, Bartlett RH, Swaniker FC, Paganini EP, Luderer JR, Sobota J.: "Initial clinical results of the bioartificial kidney containing human cells in ICU patients with acute renal failure.", *Kidney Int.* 66(4): 1578-1588, 2004
- 72: Humes HD, MacKay SM, Funke AJ, Buffington DA.: "Tissue engineering of a bioartificial renal tubule assist device: in vitro transport and metabolic characteristics.", *Kidney Int.* 55(6): 2502-2514., 1999
- 73: Humes HD, Buffington DA, MacKay SM, Funke AJ, Weitzel WF.: "Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney.", *Nat Biotechnol.* 17(5): 451-455, 1999
- 74: Fissell WH, Dyke DB, Weitzel WF, Buffington DA, Westover AJ, MacKay SM, Gutierrez JM, Humes HD.: "Bioartificial kidney alters cytokine response and hemodynamics in endotoxin-challenged uremic animals.", *Blood Purif.* 20(1): 55-60, 2002
- 75: Fissell WH, Lou L, Abrishami S, Buffington DA, Humes HD.: "Bioartificial kidney ameliorates gram-negative bacteria-induced septic shock in uremic animals.", *J Am Soc Nephrol.* 14(2): 454-461, 2003
- 76: Humes HD, Fissell WH, Weitzel WF, Buffington DA, Westover AJ, MacKay SM, Gutierrez JM.: "Metabolic replacement of kidney function in uremic animals with a bioartificial kidney containing human cells.", *Am J Kidney Dis.* 39(5): 1078-1087., 2002
- 77: Humes HD, Buffington DA, Lou L, Abrishami S, Wang M, Xia J, Fissell WH.: "Cell therapy with a tissue-engineered kidney reduces the multiple-organ consequences of septic shock.", *Crit Care Med.* 31(10): 2421-2428., 2003
- 78: Fey-Lamprecht F, Albrecht W, Groth T, Weigel T, Gross U.: "Morphological studies on the culture of kidney epithelial cells in a fiber-in-fiber bioreactor design with hollow fiber membranes.", *J Biomed Mater Res A.* 65(2): 144-157., 2003
- 79: Fey-Lamprecht F, Gross U, Groth TH, Albrecht W, Paul D, Fromm M, Gitter AH.: "Functionality of MDCK kidney tubular cells on flat polymer membranes for biohybrid kidney.", *J Mater Sci Mater Med.* 9(12): 711-715., 1998

- 80: Terashima M, Saito A. et al.: "Evaluation of water and electrolyte transport of tubular epithelial cells under osmotic and hydraulic pressure for development of bioartificial tubules.", *Artif Organs*. 25(3): 209-212., 2001
- 81: Huijuan M, Xiaoyun W, Xumin Y, Hengjin W, Xia S.: "Effect of continuous bioartificial kidney therapy on porcine multiple organ dysfunction syndrome with acute renal failure.", *ASAIO J*. 53(3): 329-334, 2007
- 82: Gambro Dialysatoren GmbH, Hechingen, "Biotechnologische Entwicklung eines Nierenersatzmodells auf Basis humaner Nierenzellen für Patienten mit chronischem Nierenversagen", BMBF Abschlussbericht, Förderkennzeichen 0312826, 2006
- 83: Herzlinger DA, Easton TG, Ojakian GK.: "The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule.", *J Cell Biol*. 93(2): 269-277., 1982
- 84: 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 Int*. 45(1): 48-57, 1994
- 85: Baer PC., "Isolierung und Charakterisierung humaner renaler proximaler und distaler Tubuluszellen: Etablierung eines in vitro-Modells", Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 1999
- 86: Baer PC, Tunn UW, Nunez G, Scherberich JE, Geiger H.: "Transdifferentiation of distal but not proximal tubular epithelial cells from human kidney in culture.", *Exp Nephrol*. 7(4): 306-313., 1999
- 87: Baer PC, Bereiter-Hahn J, Schubert R, Geiger H.: "Differentiation status of human renal proximal and distal tubular epithelial cells in vitro: Differential expression of characteristic markers.", *Cells Tissues Organs*. 184(1): 16-22, 2006
- 88: Lash LH, Tokarz JJ.: "Isolation of two distinct populations of cells from rat kidney cortex and their use in the study of chemical-induced toxicity.", *Anal Biochem*. 182(2): 271-279, 1989
- 89: Trifillis AL, Regec AL, Trump BF.: "Isolation, culture and characterization of human renal tubular cells.", *J Urol*. 133(2): 324-329, 1985
- 90: Clonetics / Lonza, Clonetics® Renal Cells RPTEC CC-2553, 2006, <http://www.lonza.com>, Zugriff:05.03.2006
- 91: Eberhardt Scheffler: "Statistische Versuchsplanung und -auswertung", 3. Auflage 1997, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Stuttgart, ISBN: 3-342-00366-9
- 92: Bereiter-Hahn J, Münnich A, Woiteneck P.: "Dependence of energy metabolism on the density of cells in culture.", *Cell Struct Funct*. 23(2): 85-93, 1998
- 93: Gstraunthaler G, Seppi T, Pfaller W.: "Impact of culture conditions, culture media volumes, and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures. Are renal cells in tissue culture hypoxic?", *Cell Physiol Biochem* 9(3): 150-172., 1999
- 94: Schade, M., "O<sub>2</sub>-Verbrauchsmessungen an humanen Nierenzellen in Abhängigkeit vom Ionenangebot", Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2003
- 95: Maunsbach AB, Giebisch GH, Stanton BA.: "Effects of flow rate on proximal tubule ultrastructure.", *Am J Physiol*. 253(3 Pt 2): F582-587., 1987
- 96: Essig M, Friedlander G.: "Tubular shear stress and phenotype of renal proximal tubular cells.", *J Am Soc Nephrol*. 14 Suppl 1: S33-S35., 2003
- 97: Essig M, Friedlander G.: "Shear-stress-responsive signal transduction mechanisms in renal proximal tubule cells.", *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 12(1): 31-34, 2003
- 98: Essig M, Terzi F, Burtin M, Friedlander G.: "Mechanical strains induced by tubular flow affect the phenotype of proximal tubular cells.", *Am J Physiol Renal Physiol*. 281(4): F751-F762., 2001

- 99: Guo P, Weinstein AM, Weinbaum S.: "A hydrodynamic mechanosensory hypothesis for brush border microvilli.", *Am J Physiol Renal Physiol.* 279(4): F698-6712., 2000
- 100: Du Z, Duan Y, Yan Q, Weinstein AM, Weinbaum S, Wang T.: "Mechanosensory function of microvilli of the kidney proximal tubule.", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(35): 13068-13073, 2004
- 101: Seiller W, Gertz KH.: "Single nephron filtration, luminal flow and tubular fluid reabsorption along the proximal convolution and the pars recta of the rat kidney as influenced by luminal pressure changes.", *Pflugers Arch.* 371(3): 235-243., 1977
- 102: Bonvalet JP, de Rouffignac C.: "Distribution of ferrocyanide along the proximal tubular lumen of the rat kidney: its implications upon hydrodynamics.", *J Physiol.* 318: 85-98., 1981
- 103: Reneman RS, Arts T, Hoeks AP.: "Wall shear stress - an important determinant of endothelial cell function and structure in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory.", *J Vasc Res.* 43(3): 251-269., 2006
- 104: Romano G, Favret G, Federico E, Bartoli E.: "The validity of the recollection technique in micropuncture experiments on the rat kidney.", *Exp Physiol.* 82(1): 161-169., 1997
- 105: Slomowitz LA, Deng A, Hammes JS, Gabbai F, Thomson SC.: "Glomerulotubular balance, dietary protein, and the renal response to glycine in diabetic rats.", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282(4): R1096-1103., 2002
- 106: Bishop JH, Green R, Thomas S.: "Free-flow reabsorption of glucose, sodium, osmoles and water in rat proximal convoluted tubule.", *J Physiol.* 288: 331-351., 1979
- 107: Marshall EA, Trowbridge EA.: "Flow of a newtonian fluid through a permeable tube: the application to the proximal renal tubule.", *Bull Math Biol.* 36(5-6): 457-476., 1974
- 108: Tzoneva R, Seifert B, Albrecht W, Richau K, Lendlein A, Groth T.: "Poly(ether imide) membranes: studies on the effect of surface modification and protein pre-adsorption on endothelial cell adhesion, growth and function.", *J Biomater Sci Polym Ed.* 19(7): 837-852, 2008
- 109: Lakard S, Herlem G, Valles-Villareal N, Michel G, Propper A, Gharbi T, Fahys B.: "Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications.", *Biosens Bioelectron.* 20(10): 1946-1954., 2005
- 110: Mandel LJ.: "Primary active sodium transport, oxygen consumption, and ATP: coupling and regulation.", *Kidney Int.* 29(1): 3-9., 1986
- 111: Chamberlin ME, LeFurgey A, Mandel LJ.: "Suspension of medullary thick ascending limb tubules from the rabbit kidney.", *Am J Physiol.* 247(6 Pt 2): F955-964., 1984
- 112: Nikolovski J, Gulari E, Humes HD.: "Design engineering of a bioartificial renal tubule cell therapy device.", *Cell Transplant.* 8(4): 351-364, 1999
- 113: Gnaiger E.: "Oxygen conformance of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology.", *Adv Exp Med Biol.* 543: 39-55, 2003
- 114: Subramanian RM, Chandel N, Budinger GR, Schumacker PT.: "Hypoxic conformance of metabolism in primary rat hepatocytes: a model of hepatic hibernation.", *Hepatology.* 45(2): 455-464, 2007
- 115: Bernhardt WM, Eckardt KU. et al: "Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure.", *J Am Soc Nephrol.* 17(7): 1970-1978, 2006
- 116: Epstein FH.: "Oxygen and renal metabolism.", *Kidney Int.* 51(2): 381-385, 1997
- 117: Böttinger EP, Bitzer M.: "TGF-beta signaling in renal disease.", *J Am Soc Nephrol.* 13(10): 2600-2610., 2002
- 118: Okada H, Inoue T, Suzuki H, Strutz F, Neilson EG.: "Epithelial-mesenchymal transformation of renal tubular epithelial cells in vitro and in vivo.", *Nephrol Dial Transplant. Suppl* 6: 44-46, 2000

- 119: Tian YC, Fraser D, Attisano L, Phillips AO.: "TGF-beta1-mediated alterations of renal proximal tubular epithelial cell phenotype.", *Am J Physiol Renal Physiol.* 285(1): F130-142, 2003
- 120: Zavadil J, Böttinger EP.: "TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions.", *Oncogene* 24(37): 5764-5774., 2005
- 121: Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY.: "Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro.", *Kidney Int.* 56(4): 1455-1467, 1999
- 122: Lan HY.: "Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells.", *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 12(1): 25-29, 2003
- 123: Kays SE, Nowak G, Schnellmann RG.: "Transforming growth factor-beta 1 inhibits regeneration of renal proximal tubular cells after oxidant exposure.", *J Biochem Toxicol.* 11(2): 79-84, 1996
- 124: Nowak G, Schnellmann RG.: "Autocrine production and TGF-beta 1-mediated effects on metabolism and viability in renal cells", *Am J Physiol.* 271(3 Pt 2): F689-697, 1996
- 125: Liu Y, Sun AM, Dworkin LD.: "Hepatocyte growth factor protects renal epithelial cells from apoptotic cell death.", *Biochem Biophys Res Commun.* 246(3): 821-826., 1998
- 126: Vargas GA, Hoeflich A, Jehle PM.: "Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality.", *Kidney Int.* 57(4): 1426-1436., 2000
- 127: Vijayan A, Martin DR, Sadow JL, Kissane J, Miller SB.: "Hepatocyte growth factor inhibits apoptosis after ischemic renal injury in rats.", *Am J Kidney Dis.* 38(2): 274-278., 2001
- 128: Yang J, Dai C, Liu Y.: "A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition.", *J Am Soc Nephrol.* 16(1): 68-78, 2005
- 129: Liu Y.: "Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action.", *Am J Physiol Renal Physiol.* 287(1): F7-16, 2004
- 130: Dai C, Liu Y.: "Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-beta1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF.", *J Am Soc Nephrol.* 15(6): 1402-1412., 2004
- 131: Li J, Zelenin S, Aperia A, Aizman O.: "Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-kappaB.", *J Am Soc Nephrol.* 17(7): 1848-1857, 2006
- 132: Khundmiri SJ, Metzler MA, Ameen M, Amin V, Rane MJ, Delamere NA.: "Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells.", *Am J Physiol Cell Physiol.* 291(6): C1247-1257, 2006
- 133: Harwood S, Yaqoob MM.: "Ouabain-induced cell signaling.", *Front Biosci.* 10: 2011-2017, 2005
- 134: Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH.: "Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture.", *Cell* 19(1): 245-254, 1980
- 135: Elgjo K, Hennings H, Clausen OP.: "Altered growth kinetics precede calcium-induced differentiation in mouse epidermal cells.", *In Vitro Cell Dev Biol.* 22(6): 332-336, 1986
- 136: D. C. Walker, J. Southgate, G. Hill, M. Holcombe, D. R. Hose, S. M. Wood, S. Mac Neil and R. H. Sma: "The Epitheliome: agent-based modelling of the social behaviour of cells", *Biosystems* 76(1-3): 89-100, 2004
- 137: Denker BM, Nigam SK.: "Molecular structure and assembly of the tight junction.", *Am J Physiol.* 274(1 Pt 2): F1-9., 1998
- 138: Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW.: "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.", *Blood* 90(12): 5002-5012, 1997

- 139: Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW.: "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning.", *Blood* 90(12): 5013-5021, 1997
- 140: Corbeil D, Buck DW, Huttner WB. et al: "The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions.", *J Biol Chem.* 275(8): 5512-5520, 2000
- 141: Loverre A, Capobianco C, Ditunno P, Battaglia M, Grandaliano G, Schena FP.: "Increase of proliferating renal progenitor cells in acute tubular necrosis underlying delayed graft function.", *Transplantation.* 85(8): 1112-1119, 2008
- 142: Bao J, Tu Z, Sun H, Luo G, Yang L, Song J, Qin M, Shi Y, Bu H, Li Y.: "R2: Identification of renal potential progenitor/stem cells that participate in the renal regeneration processes of kidney allograft fibrosis.", *Nephrology (Carlton)*, 2008
- 143: Loo D, Beltejar C, Hooley J, Xu X.: "Primary and multipassage culture of human fetal kidney epithelial progenitor cells.", *Methods Cell Biol.* 86: 241-255, 2008
- 144: Akira Saito, Hideaki Suzuki, Karol Bomszyk, Suhail Ahmad: "Regeneration of peritoneal effluent by Madin-Darby canine kidney cells-lined hollow fibers", *Materials science & engineering. C* 6: 221-226, 1998
- 145: Saito A, Aung T, Sekiguchi K, Sato Y.: "Present status and perspective of the development of a bioartificial kidney for chronic renal failure patients.", *Ther Apher Dial.* 10(4): 342-347, 2006
- 146: Ozgen N, Terashima M, Aung T, Sato Y, Isoe C, Kakuta T, Saito A.: "Evaluation of long-term transport ability of a bioartificial renal tubule device using LLC-PK1 cells.", *Nephrol Dial Transplant.* 19(9): 2198-2207, 2004
- 147: Saito A.: "Development of bioartificial kidneys.", *Nephrology (Carlton)* 8: S10-S15, 2003
- 148: Hoste EA, Schurgers M.: "Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem?", *Crit Care Med.* 36(4 Suppl): S146-151., 2008
- 149: Uchino S.: "The epidemiology of acute renal failure in the world.", *Curr Opin Crit Care.* 12(6): 538-543., 2006
- 150: Deutsche Stiftung Organtransplantation, Neuanmeldungen und Nierentransplantationen 2007, 2008, <http://www.dso.de/grafiken/g31.html>, Zugriff 08.11.2008
- 151: Eurotransplant International Foundation, "Annual Report 2007", Zugriff 08.11.2008
- 152: Saito A.: "Research into the development of a wearable bioartificial kidney with a continuous hemofilter and a bioartificial tubule device using tubular epithelial cells.", *Artif Organs.* 28(1): 58-63., 2004
- 153: Tumlin J, Humes HD. et al: "Efficacy and safety of renal tubule cell therapy for acute renal failure.", *J Am Soc Nephrol.* 19(5): 1034-1040, 2008



## 8 Anhang

### 8.1 Patentanmeldungen, Konferenzen und Zitate

#### Patentanmeldungen

<i>Anmeldedatum</i>	<i>Patentnummer</i>	<i>Titel</i>	<i>Gemeldete Erfinder bei Anmeldung des Prioritätsdatums</i>
25.09.2008	EP08016812.3	„Device for Renal Cell Expansion“	Deppisch Reinhold, Luttrupp David, Neubauer Markus
25.09.2008	EP0816833.9	„Hybrid Bioartificial Kidney“	Deppisch Reinhold, Luttrupp David, Krause Bernd, Neubauer Markus, Schnell Andrea

#### Konferenzen

<i>Datum</i>		<i>Titel</i>	<i>Autoren</i>
June 6, 2007 (Vortrag)	ASAIO, First Annual Innovation Conference, Chicago	Cell based Extracorporeal Therapies Functionality and Technology for Cell-Based Renal Function Replacement	Markus Neubauer, David Luttrupp, Jürgen Bereiter-Hahn, Bernd Krause, Andrea Schnell, Hermann Goehl, Reinhold Deppisch
September 2007 (Abstract)	NanoBioEurope, Münster	Convergence of nanostructuring of medical device surfaces and biological elements to new and enhanced functionality	Reinhold Deppisch, Markus Neubauer, David Luttrupp, Ruth Dietrich, Sylvia Hagg, Werner Beck, Markus Storr, Bernd Krause, Andrea Schnell, Thomas Ertl, Hermann Goehl
18.-19. Oktober 2005 (Vortrag)	2. BMBF-Symposium, Nanobiotechnologie, Hannover	Biotechnologische Entwicklung eines Nierenersatzmodells auf der Basis von humanen renalen Tubuluszellkulturen für Patienten mit akutem oder chronischem Nierenversagen	Reinhold Deppisch, Andrea Schnell, Markus Neubauer, Bernd Krause, Herman Göhl, Patrick Baer, Helmut Geiger, David Luttrupp, Jürgen Bereiter-Hahn

#### Zitate

Info Broschüre des PTJ – BMBF Reihe „InfoBiotechnologie“ 02.2007	<i>Bildmaterial verwendet:</i> Tissue Engineering / Regenerationstechnologien für die Medizin „Ersatzteile“ aus körpereigenen Zellen <a href="http://www.fz-juelich.de/ptj/index.php/ptj/index.php?path=publikationen%2Fbio%2Finfobiotechnologie_dt&amp;file=102">http://www.fz-juelich.de/ptj/index.php/ptj/index.php?path=publikationen%2Fbio%2Finfobiotechnologie_dt&amp;file=102</a> (Verfügbarkeit 02.01.2009 geprüft)
Webseite des PTJ	<i>Bildmaterial verwendet:</i> <a href="http://www.fz-juelich.de/ptj/regenerative-technologien/">http://www.fz-juelich.de/ptj/regenerative-technologien/</a> (Verfügbarkeit 02.01.2009 geprüft)

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

<b>ADH</b>	Antidiuretisches Hormon	<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor	<b>RBF</b>	Renal Blood Flow
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat	<b>HIF</b>	Hypoxia-Inducible Factors	<b>RBP</b>	Retinolbindendes Protein
<b>AJ</b>	Adherent Junctions	<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus	<b>REM</b>	Raster Elektronen Mikroskop / -Mikroskopie
<b>AK/EC</b>	Äußeres Kompartiment	<b>HK</b>	Hämatokrit	<b>RGD</b>	Arg-Gly-Asp - Aminosäuresequenzen
<b>AKI</b>	Acute Kidney Injury	<b>HK-2</b>	Permanente, humane proximale Tubulusepithelzelllinie	<b>ROMK</b>	Renal Outer Medullary Potassium Channel
<b>ALF</b>	Amino-Low-Flux	<b>hNF,hNeg</b>	Negativfraktion der Aufreinigung primärer, humaner Nierenzellen	<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>ARF / ANV</b>	Acute Renal Failure / Akutes Nierenversagen	<b>hPNeg</b>	Negativfraktion der Aufreinigung primärer, humaner,proximaler Tubulusepithelzellen	<b>RPTEC</b>	Renal proximal tubule cell
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase	<b>hPTC</b>	Primäre humane proximale Tubulusepithelzellen	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>AQP</b>	Aquaporin	<b>HSA</b>	Human Serum Albumin	<b>SE</b>	Standarderror
<b>ATL</b>	Ascending Thin Limb	<b>HSP</b>	Heat Shock Proteins	<b>SFK</b>	Serumfreies- Keratinozyten Medium
<b>ATN</b>	Acute Tubular Necrosis	<b>IK / IC</b>	Inneres Modulkompartiment	<b>SFM</b>	Serumfreies Medium
<b>ATP</b>	Adenosintrphosphat	<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Faktor	<b>SFM+S</b>	Serumfreies Medium mit Supplementen
<b>BCL-(2)/(XL)</b>	B-Cell Lymphoma – Protein Familie	<b>IGG</b>	Immunglobulin G	<b>SGLT</b>	sodium-dependent glucose cotransporter
<b>BM-MSC</b>	Bone-Marrow Mesencymal Stem Cells	<b>IL</b>	Interleukin	<b>SIRS</b>	Systemic Imflammatory Response Syndrom
<b>BPE</b>	Bovine Pitutary Extract	<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gamma	<b>SNGFR</b>	Single nephron glomerular filtration rate
<b>BSC</b>	Bumetanid Sensitive Carrier	<b>JAM</b>	Junctional Adhesion Molecules	<b>TAL</b>	Thick ascending limb
<b>BTK</b>	Bioartifizielles Tubuluskonstrukt	<b>JTC-12</b>	Permanente Tubulusepithelzelllinie aus Affen	<b>TDL</b>	Thin descending limb
<b>CCCP</b>	Carbonylcyanide 3-chlorophenylhydrazone	<b>LLC-PK1</b>	Permanente Tubulusepithelzelllinie aus Schweinen	<b>TE</b>	Tissue Engineering
<b>CLC-K(a/b)</b>	Chloride Channel K(a/b)	<b>LRC</b>	Label Retaining Cells	<b>TEC</b>	Tubulusepithelzellen
<b>CLD</b>	Collecting Duct	<b>mAb</b>	monoclonal Antibody	<b>TF/P</b>	Quotient Tubulusfluid/Plasma
<b>CLSM</b>	Confocal LASER Scanning Microscopy (Microscope)	<b>MCP</b>	Monocyte Chemoattractant Protein	<b>TGF</b>	Tubuloglomerular feedback
<b>CNT</b>	Connecting Tubule	<b>MDCK</b>	Permanente Tubulusepithelzelllinie aus Hunden	<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	transforming growth factor-beta
<b>cTAL</b>	Cortical Thick Ascending Limb	<b>MRP</b>	Multidrug-Resistance-Associated Proteins	<b>THG</b>	Tamm-Horsfall glycoprotein
<b>CY2</b>	Cyanine -2 (grün)	<b>mTAL</b>	Medullary Thick Ascending Limb	<b>TJ</b>	Tight junctions
<b>CY3</b>	Cyanine -3 (gelb-orange)	<b>NaPi</b>	Sodium-Phosphate-Transporters	<b>TNF</b>	tumor necrosis factor
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindol	<b>NCCK</b>	Natrium-2Chlorid-Kalium-Kotransporter	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor – alpha
<b>DBP</b>	Vitamine D-Binding Protein	<b>NHE3</b>	Na/H-Exchanger 3	<b>TSC</b>	thiazide-sensitive cotransporter
<b>DCT</b>	Distal Convolutet Tubule	<b>NVP</b>	N-Vinylpyrrolidone	<b>ZO1</b>	zona occludens-1
<b>DOE</b>	Design Of Experiments	<b>OAT</b>	Organic Anion Transporters	<b><math>\alpha</math>-KG</b>	$\alpha$ -Ketoglutarate
<b>DPPIV</b>	Dipeptidylpeptidase IV	<b>OATP</b>	Organic Anion Transporter Polypeptides	<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ - smooth muscle actin
<b>DT</b>	Distaler Tubulus	<b>OCT</b>	Organic Cation Transporters	<b><math>\gamma</math>-GT</b>	$\gamma$ - glutamyltranspeptiase
<b>ECM / EZM</b>	Extra Cellular Matrix / Extra Zelluläre Matrix	<b>OD</b>	Optische Dichte		
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor	<b>OUR</b>	Oxygen Uptake Rate		
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	<b>p.c.</b>	pars convoluta		
<b>EMT</b>	Epithelial-Mesenchymal-Transition / -Transdifferentiation	<b>p.r.</b>	pars recta		
<b>EPO</b>	Erythropoietin	<b>PAH</b>	p-aminohippurate		
<b>EVAL</b>	Ethylene-Co-Vinyl Alcohol	<b>PAN</b>	Polyacrylonitrile		
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum	<b>PAX2</b>	Paired box homeotic gene 2		
<b>FITC</b>	Fluorescein Isothiocyanate	<b>PBS</b>	Phosphat Buffered Salina		
<b>FWE</b>	Faktoren Wechsel Wirkung	<b>PE</b>	Phycoerythrin		
<b>G-CSF</b>	Granulozyten-Colonie Stimulating Factor	<b>PEI</b>	Polyethyleneimine		
<b>GFR</b>	Glomeruläre Filtrationsrate	<b>PES</b>	polyethersulfone		
<b>GLUT</b>	Glucose Transporter	<b>PFA</b>	Paraformaldehyde		
<b>HBSS</b>	Hank's Buffered Salt Solution	<b>PP</b>	Polypropylene		
<b>HDMS</b>	Hexamethyldisilazane	<b>PSU</b>	Polysulfone		
<b>hDNeg</b>	Negativfraktion der Aufreinigung primärer, humaner, distaler Tubulusepithelzellen	<b>PT</b>	Proximaler Tubulus		
<b>hDTC</b>	Primäre humane distale Tubulusepithelzellen	<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone		
<b>HE</b>	Haupteffekte	<b>RAD</b>	Renal Assist Device		

### 8.3 Lebenslauf

Name:	David Luttrupp
Geboren:	06.04.1973
in:	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit:	deutsch
06.1993	Schulabschluss, Allgemeine Hochschulreife
09.1993 – 02.1994	Ingenieursstudien vorbereitendes Grundpraktikum <i>Deutsche Bundesbahn (DB/DBAG)</i>
03.1994 – 08.2000	Studium Biotechnologie, FH Gießen-Friedberg <i>Schwerpunkte: Bioreaktortechnik, Zellkulturtechnik, Immunologie &amp; Serologie, Enzymtechnik</i>
09.1998 – 09.1999	Praktikum & Diplomarbeit; Merck KGaA Darmstadt <i>Titel: Statistische Versuchsplanung in der Zellkultur mit der Software Cornerstone V2.4</i> <i>Betreuung: Prof. Dr. J. Hemberger, FH-Gießen-Friedberg</i>
07.2000	Diplomprüfung: <i>Dipl. Ing. (FH) Biotechnologie</i> <i>FH-Gießen-Friedberg</i>
04.2002 – 09.2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, <i>Kinematische Zellforschung,</i> <i>Prof. Dr. Bereiter-Hahn,</i> <i>Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main</i>
08.2004	Annahme als Doktorand an der JWG Universität Frankfurt in der <i>Kinematische Zellforschung,</i> <i>Prof. Dr. Bereiter-Hahn</i>
09.2005 – 07.2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Gambro Dialysatoren GmbH, Hechingen