

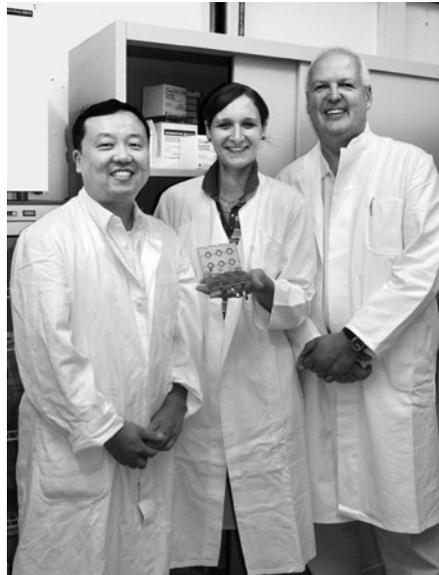
# Kontrolliertes Environment für Stammzellen

## Generierung renaler Tubuli in chemisch definiertem Kulturmedium

Erstmals wird gezeigt, wie sich Stammzellen der Niere unter exakt kontrollierbaren Bedingungen zu dreidimensional strukturierten Tubuli entwickeln. Da für diese Arbeiten konventionelle Kulturmethode nicht leistungsfähig genug waren, musste eine gänzlich neue Technologie entwickelt werden. Dabei werden renale Stammzellen in einem Perfusionscontainer an der Grenze zu einem artifiziellem Interstitium gehalten.

Eine Beschichtung mit extrazellulären Matrixproteinen ist nicht nötig. Die Perfusionskulturen werden ausschließlich mit chemisch definiertem Kulturmedium (IMDM) durchgeführt. Im Verlauf der Arbeiten wurde entdeckt, dass die Zugabe des Steroidhormons Aldosteron zu IMDM die Bildung renaler Tubuli induziert. Die vorgestellte Technologie eröffnet zukünftig sicherlich auch für viele andere Arten von Stammzellen die Generierung zu funktionellen Geweben unter kontrollierten *in vitro* Bedingungen.

Mit unseren Versuchen wollen wir klären, ob erkranktes Parenchym der Niere mit neuen Verfahren des Tissue engineering zur Regeneration angeregt werden kann. Um Informationen zur Entstehung von Tubulusstrukturen zu erhalten, benötigt man ein leistungsfähiges Kultursystem. Die Technik muss geeignet sein, die Entstehung und Aufrechterhaltung von Gewebe über Wochen zu gewährleisten. Unsere Arbeiten zeigen erstmals, dass dies möglich ist, wenn renale Stammzellen an der Grenze zu einem artifiziellem Interstitium gehalten werden. Hierbei handelt es sich um eine neue Technologie, die von uns in den letzten Jahren konzipiert und technisch realisiert wurde.



Dr. Kanghong Hu, Wissenschaftlicher Mitarbeiter; Lucia Denk, Med. Tech. Assistentin; Prof. Dr. Will W. Minuth, Arbeitsgruppenleiter; Universität Regensburg

### Interstitieller Raum zur Herstellung von Gewebe- und Organkulturen

Lange Zeit haben wir gerätselt, warum renale Stammzellen unter konventionellen Kulturtechniken keine Tubulusstrukturen ausbilden. Ohne jeden Erfolg testeten wir viele serumhaltige Kulturmedien, zahlreiche Wachstumsfaktoren und unterschiedliche Beschichtungen mit extrazellulären Matrixproteinen. Ohne ein positives Ergebnis verliefen auch zahlreiche Experimente mit unterschiedlichen Kulturgefäßen. Schließlich analysierten wir das geometrische und rheologische Mikromilieu in den jeweiligen Kulturbehältern. Wir beobachteten, dass bei der Reduktion des Totraumvolumens mit jedem Verkleinerungsschritt

des Kulturcontainers eine andere Qualität der Gewebeentwicklung entstand. Um diese Effekte auszugleichen, haben wir zwischen die Innenwand eines Perfusionscontainers und des darin befindlichen Gewebes ein Vlies aus Polyester als ein artifizielles Interstitium eingelegt. Um für das reifende Gewebe einen gleichmäßigen Flüssigkeitsaustausch zu gewährleisten, muss das Vlies ausreichend große Räume zwischen seinen Fasern aufweisen. Das Kulturmedium kann somit wie in einem natürlichen Kapillarbereich das reifende Gewebe umströmen und sorgt dadurch für eine bemerkenswerte und bisher unbekannte Milieukonstanz. Optimale Ergebnisse erreichten wir mit einem Vlies aus Polyester (Walraf, Grevenbroich).

### Vermeidung von Gasblasen während des langsamen Transports von Kulturmedium

Bei der Anwendung eines artifiziellem Interstitiums in einem Perfusionscontainer bereiten Luftblasen ein unerwartet großes Problem. Gasblasen werden beim langsamen Transport (1ml/h) von Medium in den Kulturcontainer eingebracht. Sie entstehen nicht vorhersehbar und werden hauptsächlich an Materialübergängen wie z. B. an den Verbindungsstellen zwischen Schläuchen und Steckern sichtbar. Mit zunehmender Kulturdauer werden diese durch Fusion immer größer, was jedoch fatale Folgen für die Versorgung des reifenden Gewebes hat. Die Blasen setzen sich im Strömungsraum des artifiziellem Interstitiums fest, führen zu Veränderungen des Strömungsdrucks und verhindern dadurch einen gleichmäßigen Austausch des Kulturmediums. Zur Vermeidung von Gasblasen während des Transports von Kulturmedium mußten deshalb spezielle Schlauchleitungen und Verschlusskappen für Mediumflaschen entwickelt werden (Abb. 1A).

### Eliminierung von vorhandenen Gasblasen

Beim langsamen Transport von Kulturmedium kann es trotz vorsichtiger Zuleitung zu weiterer Bildung von Gasblasen kommen, die jedoch das artifiziellem Interstitium innerhalb eines Kulturcontainers nicht erreichen dürfen. Aus diesem Grund wurde ein Gasexpandermodul

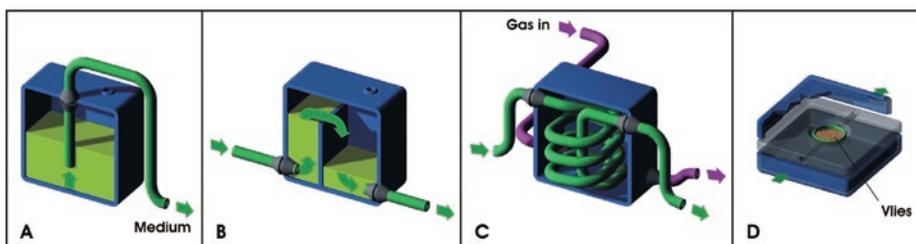


Abb. 1 A–D: Schematische Darstellung von Zubehör, welches zum gasblasenfreien Transport von Medium und zur Kultur von renalen Stammzellen an der Grenze eines artifiziellem Interstitiums benötigt wird. A) Schraubkappen für Flaschen, bei denen das Kulturmedium nicht mit dem Material der Kappe in Kontakt kommt. B) Gasexpandermodul zur kontinuierlichen Eliminierung von Gasblasen. C) Modul zum Austausch von Atemgas ohne Entstehung von Gasblasen. D) Kulturcontainer, in dem das Gewebe von einem artifiziellem Interstitium umgeben ist.

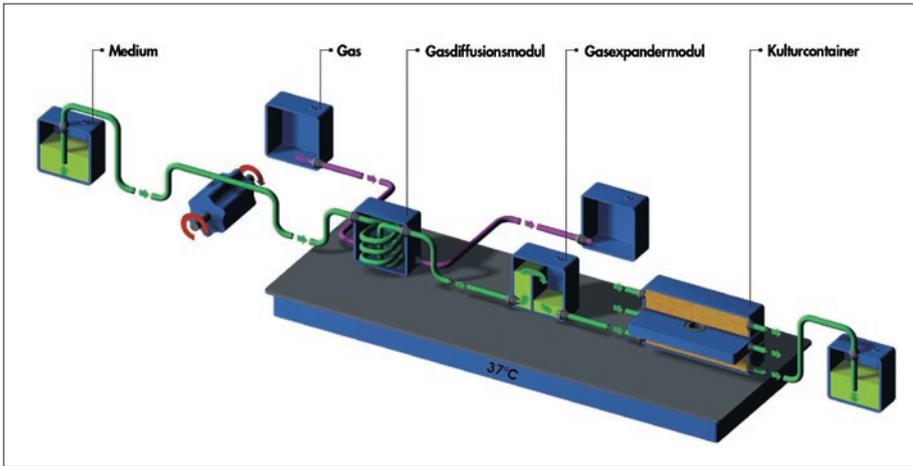


Abb. 2: Illustration des kompletten Kultursystems, welches unter atmosphärischer Luft auf einem Labortisch für beliebig lange Zeit betrieben wird.

Quelle: Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland, www.minucells.de

entwickelt, welches unmittelbar vor einem Perfusionskulturcontainer eingesetzt wird (Abb. 1B). Innerhalb dieses Moduls überschreitet das Kulturmedium eine Barriere, an der Gasblasen von der Flüssigkeitsphase separiert werden. Messungen mit einem speziell dafür entwickelten Sensor zeigen, dass sich mit dieser Methode beim langsamen Transport von Medium effektiv Gasblasen entfernen lassen, ohne dass sich der Gehalt an gelöstem Sauerstoff messbar verringert.

### Atemgaskonditionierung von Geweben

Wird generiertes Gewebe implantiert, so ist es meist einem Environment mit fehlender Vaskularisierung und damit einem minimalen Sauerstoffgehalt ausgesetzt. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft, das Gewebe vor der Implantation auf dieses sauerstoffarme Milieu zu konditionieren. Eine Modulation des Sauerstoffgehaltes in Kulturmedium wird bisher meist durch Injektion von Atemgas (Bubbletechnik) durchgeführt. Wir dagegen nutzen die Diffusion über spezielle gaspermeable Schläuche und erreichen damit eine Modulation des Sauerstoffgehaltes. Speziell dafür wurde ein Begasungsmodul entwickelt, welches variable Konzentrationen an Atemgas im Medium ohne eine Blasenbildung schafft (Abb. 1C).

### Entwicklung eines Perfusionscontainers mit einem artifiziellem Interstitium

Für die Kultur von Stammzellen an einem artifiziellem Interstitium mußte ein spezieller Perfusionscontainer konstruiert werden. Er besteht aus einem Boden-

und Deckelteil (Abb. 1D). In seinem Innenraum können je nach Bedarf unterschiedliche Lagen Polyestervlies eingelegt werden, dazwischen befindet sich das reifende Gewebe. Permanent wird frisches, chemisch definiertes Kulturmedium eingeströmt, das verbrauchte Medium wird nicht rezirkuliert. Zum Transport des Kulturmediums wird eine Peristaltikpumpe (IPC-N8, ISMATEC, Wertheim, Deutschland) verwendet. Für die notwendige Temperierung sorgt eine Wärmeplatte (ME 12501, MEDAX, Kiel, Deutschland) mit abnehmbarem Deckel. Die Oxygenierung des Mediums erfolgt über atmosphärische Luft per Diffusion durch gaspermeable Silikonschläuche. Durch Zugabe eines biologischen Puffers wie HEPES oder Bufferall erreicht man eine dauerhafte pH-Konstanz im Medium. Die gesamte Technik ist inzwischen serienreif entwickelt und kommerziell erhältlich (Abb. 2).

### Generierung renaler Tubuli an der Grenzfläche eines artifiziellem Interstitiums

Im Rahmen dieser Experimente wurde festgestellt, dass das Steroidhormon Aldosteron eine bisher nicht gekannte morphogene Wirkung auf die Entwicklung von renalen Stammzellen ausübt (Abb. 3A–C). Wird Aldosteron ( $1 \times 10^{-7}$  M) appliziert, so entstehen aus Stammzellen nach 14 Tagen eine Vielzahl an Tubuli (Abb. 3 C, B), die z. B. mit SBA-Lektin nachgewiesen werden können. Weitere Versuchsreihen ergaben, dass die Wirkung des Steroidhormons konzentrationsabhängig ist und dass sie nach Applikation von Antagonisten wie Spironolacton und Canrenoat völlig ge-

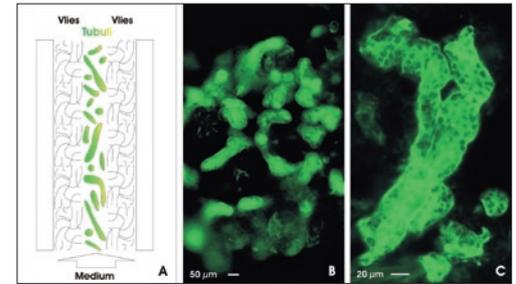


Abb. 3A–C: Generierung von renalen Tubuli an der Grenzfläche eines artifiziellem Interstitiums. A) Schematische Darstellung von renalen Tubuli an der Grenzfläche eines artifiziellem Interstitiums (Polyestervlies). B) SBA-markierte Tubuli, die innerhalb von 14 Tagen Kultur mit IMDM + Aldosteron ( $1 \times 10^{-7}$  M) entstanden sind. Die Besonderheit ist, dass das Gewebe nicht ins Vlies eingewächst, sondern im Spaltrum zwischen zwei Lagen entsteht = artifiziellem Interstitium. C) Gefrierschnitt von SBA-markierten Tubuli nach 14 Tagen in Kultur. Basalmembran und Lumen sind deutlich zu erkennen.

hemmt wird. Der morphogene Effekt von Aldosteron lässt sich mit Dexamethason nicht auslösen, obwohl das Glukokortikoidhormon ebenfalls an den Aldosteronrezeptor bindet. Die Differenzierung der mit Aldosteron induzierten Tubuli ist bemerkenswert. Immunhistochemische Markierung mit anti-Laminin  $\gamma 1$  zeigt die Bildung einer Basalmembran, anti-Occludin illustriert die Ausbildung von Tight junctions und anti-Na/K ATPase ergibt eine intensive Reaktion an der basolateralen Plasmamembran der Tubuluszellen. All dies sind eindeutige Kriterien für eine funktionelle Polarisierung der Tubuli, die sich für Wochen in Kultur halten lassen. Bisher kann jedoch nur darüber spekuliert werden, welche Faktoren an der Grenzfläche des artifiziellem Interstitiums die Entstehung der dreidimensionalen Tubulusstrukturen unterstützen. Wahrscheinlich handelt es sich um bisher unbekannte biophysikalische Einflüsse. Hier eröffnet sich ein gänzlich neues Forschungsfeld.

Referenzen direkt bei den Autoren.

Kontakt:

Prof. Dr. Will W. Minuth

Dr. Kanghong Hu

Lucia Denk

Institut für Zelluläre und Molekulare Anatomie

Universität Regensburg

Tel: +49 941 943 2876

Fax: +49 941 943 2868

will.minuth@vkl.uni-regensburg.de