

Von der renalen Stammzellnische zum funktionellen Tubulus

Will W. Minuth, Karl Schumacher¹

ZUSAMMENFASSUNG

□ Beschrieben wird ein modulares System, mit dem künstliche Gewebe unter optimalen Perfusionsbedingungen hergestellt werden können. Das Mikromilieu in den Kulturcontainern kann so gewählt werden, dass es auf die physiologischen Bedürfnisse des jeweiligen Gewebes abgestimmt ist. Ein optimales physiologisches Environment wird geschaffen, indem einerseits die Flüssigkeitsphase moduliert wird und andererseits die Umgebung des wachsenden Konstrukts mit einem künstlichen Interstitium versehen wird. Als Beispiel wird erstmals die Generierung von Tubuli unter In-vitro-Bedingungen gezeigt, die aus renalen Stammzellen entstanden sind.

Schlüsselwörter: Stammzellen · Niere · Epithelien · Sammelrohr · Entwicklung · Perfusionskultur · Tissue-Engineering

Med Klin 2003;98:Suppl II:31–5

ABSTRACT

From the Renal Stem Cell Niche to Functional Tubule

□ In the present paper, a modular system to generate artificial tissues under optimal perfusion culture conditions is described. The microenvironment within the culture containers can be fine-tuned to meet the physiologic needs of individual tissues. An optimal physiologic environment is created by modulating a

Die Vielzahl von Patienten mit einer chronischen oder akuten Niereninsuffizienz zeigt, dass die Nieren nur eine sehr eingeschränkte Fähigkeit zur funktionellen Regeneration besitzen. Vor diesem sehr ernsten klinischen Hintergrund stellt sich die wissenschaftliche Frage, warum in der erwachsenen Niere die Regenerationsfähigkeit erloschen ist und wie die Fähigkeit zur Regeneration zellbiologisch supprimiert wird. Eine ideale Therapieform wäre, wenn Regenerationsvorgänge in der Niere induziert werden könnten. Vorstellbar ist, dass dabei die Neubildung von Parenchym über zwei ganz unterschiedliche Wege erfolgt [1, 5]. Zum einen könnten sich im Organ vorhandene Parenchymzellen teilen und damit erkranktes Gewebe erneuern. Zum anderen könnten gewebespezifische Stammzellen aktiviert werden, die dann durch asymme-

¹ Institut für molekulare und zelluläre Anatomie, Universität Regensburg.

liquid phase as well as an artificial interstitium surrounding the growing construct. For example, the generation of tubular structures derived from renal stems cells under in vitro conditions is shown for the first time.

Key Words: Stem cells · Kidney · Epithelia · Collecting duct · Development · Perfusion culture · Tissue engineering

Med Klin 2003;98:Suppl II:31-5

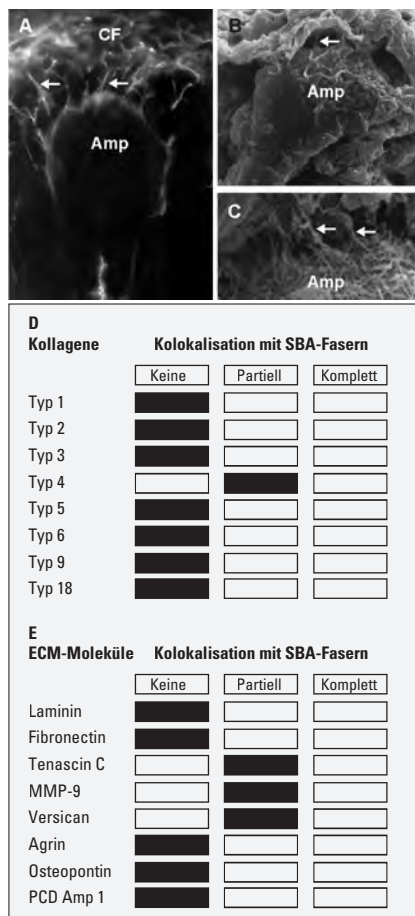
trische Zellteilungen zu Parenchymzellen werden und damit eine Regeneration des erkrankten Gewebes bewirken.

Renale Stammzellnische

Im Fokus unserer wissenschaftlichen Arbeiten stehen die Stammzellen der Niere. Um diese speziellen Stammzellpopulationen möglicherweise therapeutisch nutzen zu können, untersuchen wir das extrazelluläre Milieu ihres Lebensraums. Zudem erarbeiten wir die experimentellen Voraussetzungen, wie

unter In-vitro-Bedingungen funktionelle renale Tubuli entstehen. Die Besonderheit der Nierenentwicklung ist darin zu sehen, dass dieses komplexe Organ aus zwei ganz unterschiedlichen Stammzellpopulationen entsteht. Dazu gehören einerseits die epithelialen Stammzellen der Sammelrohrampulle und andererseits die nephrogenen mesenchymalen Stammzellen [1, 4]. Vor kurzem konnten wir zeigen, dass beide Stammzellpopulationen eine unerwartet enge strukturelle Beziehung zueinander haben (Abbildungen 1A bis 1C).

Histochemische Markierungsexperimente mit dem Lektin Soybean-Agglutinin (SBA) zeigen, dass Mikrofasern am basalen Aspekt der Sammelrohrampulle ihren Ursprung haben, durch die mesenchymale Stammzellpopulation ziehen und an der Organkapsel enden [6, 8]. Immunhistochemische Markierungsexperimente mit Antikörpern gegen die verschiedensten interstitiellen Proteine zeigen, dass die Mikrofasern nicht identisch mit bisher bekannten Strukturelementen oder Proteinen der extrazellulären Matrix sind (Abbildungen 1D und 1E). Zudem zeigen die



Abbildungen 1A bis 1E. Stammzellnische in der embryonalen Niere von Kaninchen: A) Markierung mit Soybean-Agglutinin (SBA) zeigt Mikrofasern, die vom basalen Aspekt der Sammelrohrampulle (Amp) durch das nephrogene Mesenchym (Pfeile) zur Organkapsel (CF) ziehen. Mit den Mikrofasern wird die renale Stammzellnische dreidimensional strukturiert. B, C) Darstellung der Mikrofasern mit dem Rasterelektronenmikroskop. D) Kokalisation der SBA-positiven Fasern mit Kollagen. E) Kokalisation der SBA-positiven Fasern mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM). Gelegentlich ist eine partielle Kokalisation zu erkennen, in keinem Fall findet eine komplette Kokalisation statt. Demnach handelt es sich bei den SBA-positiven Fasern um neue interstitielle Strukturen.

Markierungsexperimente, dass die epithelialen und mesenchymalen Stammzellen der Niere in einer dreidimensionalen und damit speziell strukturierten Nische untergebracht sind.

Gewebekultur mit Stammzellen

Ziel unserer Arbeit ist, funktionelle Tubulusstrukturen aus renalen Stammzellen zu generieren. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Gewebekonstrukte nicht automatisch nach der Applikation eines einzelnen Wachstumsfaktors entstehen. Vielmehr hängt die komplexe Entwicklung von Geweben von ganz unterschiedlichen Faktoren ab und wird deshalb auch auf ganz unterschiedlichen zellbiologischen Ebenen gesteuert (Abbildung 2) [3].

Zuerst müssen einzelne Zellen der jeweiligen Stammzellpopulation durch ein Morphogen in eine bestimmte Entwicklungsrichtung gelenkt werden. Ein spezieller Wachstumsfaktor sorgt dann dafür, dass sich die Zellen ausreichend vermehren. Im Anschluss daran bilden sie sozial agierende Zellverbände in einer engen Interaktion mit einer gewebetypischen extrazellulären Matrix. Von entscheidender Bedeutung für die weitere Gewebeentwicklung sind das Elektrolytmilieu, ein spezielles Nährstoffangebot, ein gewebetypischer Sauerstoffgehalt und ein geeigneter pH. Hinzu kommen natürlich vorkommende Einflüsse wie rheologischer Stress und hydrostatischer Druck. Diese Umgebungsparameter sind in einer Petri-Schale nicht zu erzeugen. Aus diesem Grund werden funktionelle Gewebekonstrukte mit innovativen Perfusionskulturen hergestellt (Abbildung 3).

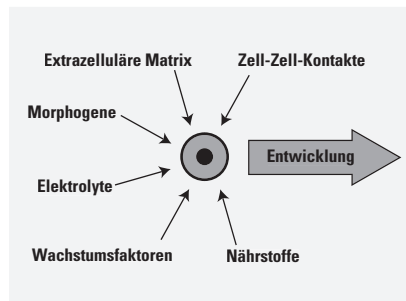
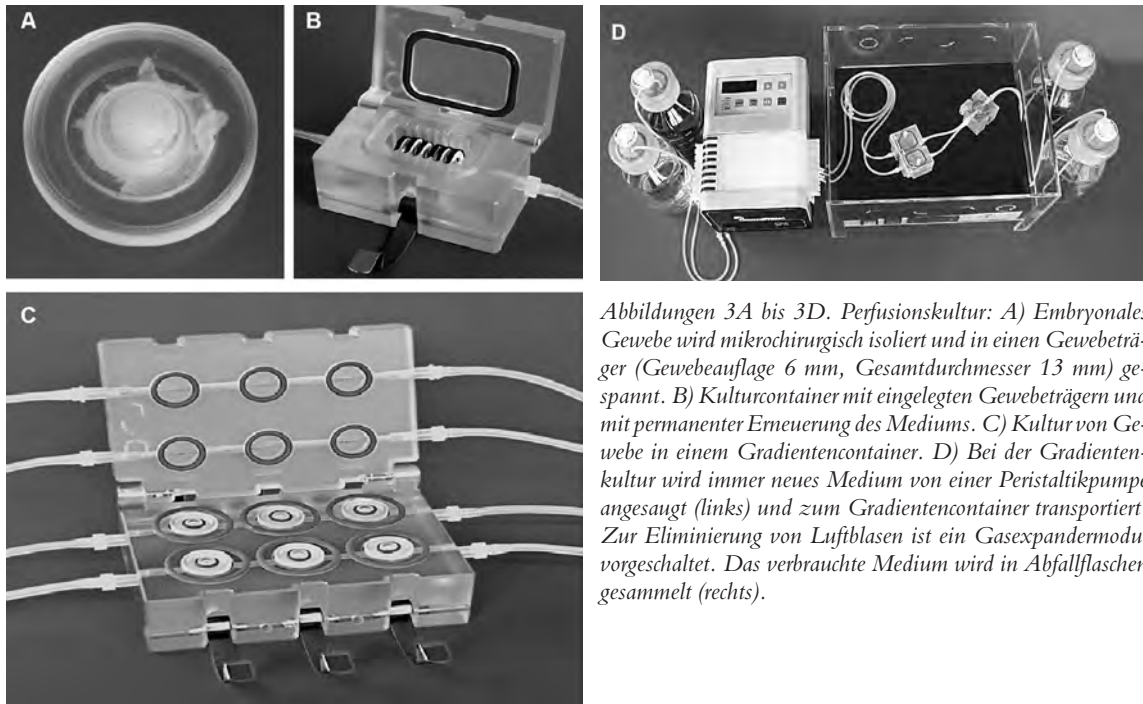
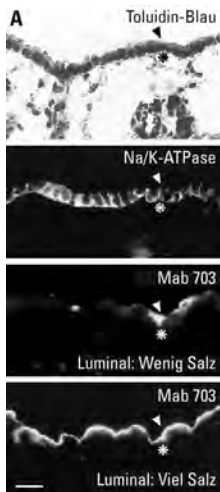


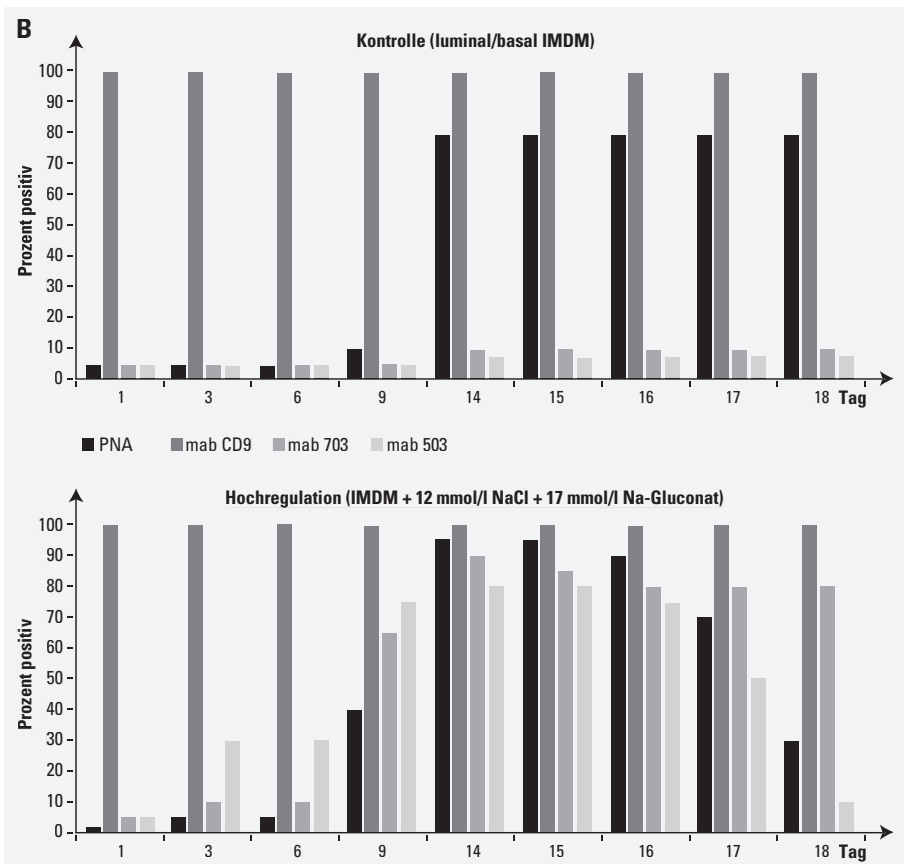
Abbildung 2. Die Entwicklung von funktionellen Geweben wird durch ganz unterschiedliche Einflüsse gesteuert.

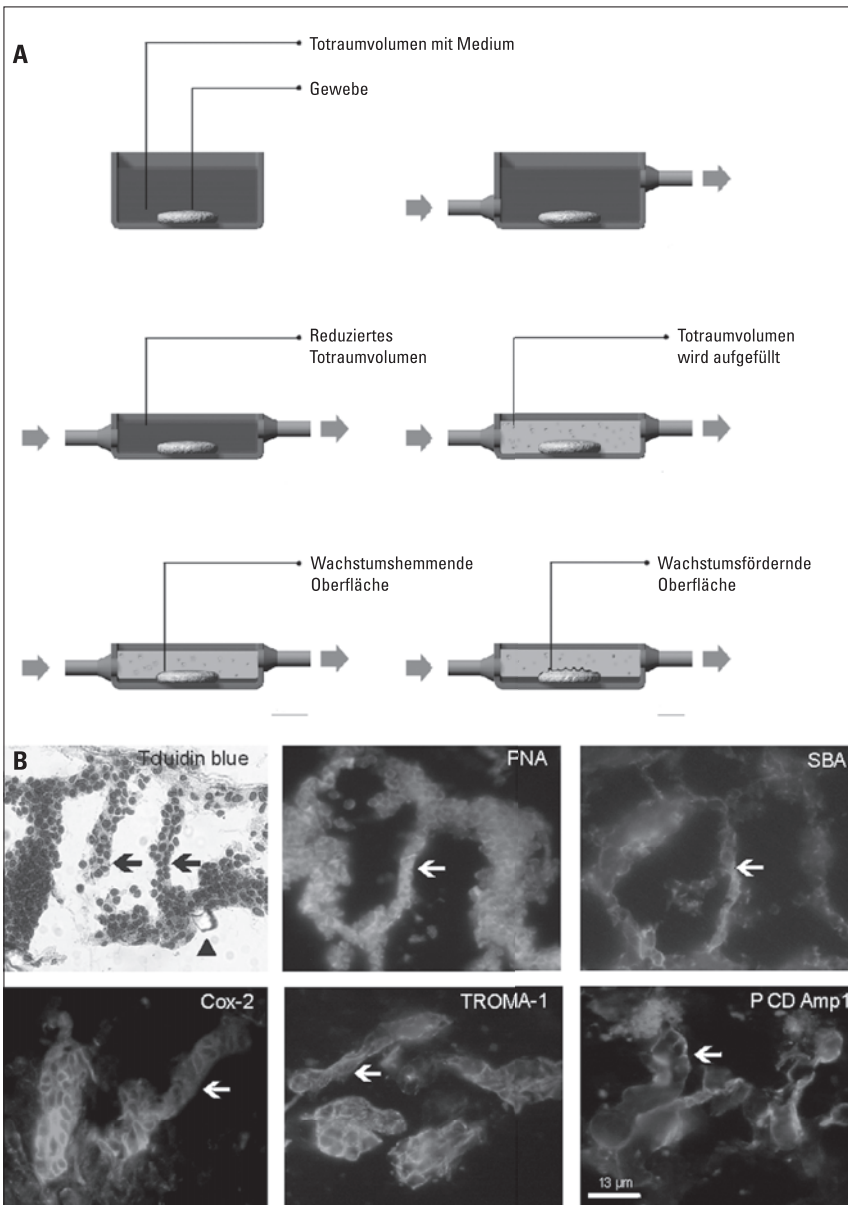


Abbildungen 3A bis 3D. Perfusionkultur: A) Embryonales Gewebe wird mikrochirurgisch isoliert und in einen Gewebeträger (Gewebeauflage 6 mm, Gesamtdurchmesser 13 mm) gespannt. B) Kulturcontainer mit eingelegten Gewebeträgern und mit permanenter Erneuerung des Mediums. C) Kultur von Gewebe in einem Gradientencontainer. D) Bei der Gradientenkultur wird immer neues Medium von einer Peristaltikpumpe angesaugt (links) und zum Gradientencontainer transportiert. Zur Eliminierung von Luftblasen ist ein Gasexpandermodul vorgeschaltet. Das verbrauchte Medium wird in Abfallflaschen gesammelt (rechts).



Abbildungen 4A und 4B. Modulation der Differenzierung in einem renalen Sammelrohrenepithel nach Gradientenkultur: A) Epithelien entwickeln bei unterschiedlicher Salzbelastung unterschiedliche Differenzierungsprofile. B) Ausbildung von unterschiedlichen Differenzierungseigenschaften.





Abbildungen 5A und 5B. Kultur von Gewebe in Kulturcontainern mit einem künstlichen Interstitium: A) Reduzierung des Totraumvolumens und Einsetzen eines künstlichen Interstitiums. B) Generierung von Tubulusstrukturen aus renalen Stammzellen, Markierung mit Lektinen und Antikörpern.

Stammzellpopulationen gewinnen wir aus der Niere von neugeborenen Kaninchen. Im Vergleich zu anderen Spezies hat dies den Vorteil, dass für Gewebekulturen sowie für zellbiologische und biochemische Experimente Material in genügender Menge gewonnen werden kann. Dazu wird die Organkapsel mit anhaftendem embryonalem Gewebe mikrochirurgisch isoliert [2]. Das

Häutchenpräparat wird dann auf einen Gewebeträger mit einem Durchmesser von 6 mm aufgespannt (Abbildung 3A). Optimale Ernährungsbedingungen für das embryonale Gewebe werden erzeugt, indem die Gewebeträger in einen Perfusionskulturcontainer eingesetzt werden, der kontinuierlich mit immer frischem Kulturmedium durchströmt wird (Abbildung 3B). Die Kultur für

Epithelien wie unter natürlichen Bedingungen kann erzeugt werden, indem die Gewebeträger in eine Gradientenkammer eingelegt werden (Abbildung 3C) [7]. Nach Schließen des Deckels können die Kulturen mit unterschiedlichen Medien auf der luminalen und basalen Seite durchströmt werden. Das gesamte Kultursystem wird auf einem Labortisch betrieben (Abbildung 3D). In den verwendeten gaspermeablen Siliconschläuchen erfolgt die Oxygenierung des Kulturmediums, dementsprechend ist das Medium gegen atmosphärische Luft äquilibriert. Eine Peristaltikpumpe transportiert das Kulturmedium mit 1 ml/h, und eine Wärmeplatte mit Abdeckung liefert die richtige Temperatur. Eventuell entstehende Luftblasen werden in einem Gasexpandermodul eliminiert, bevor das Medium den Kulturcontainer erreicht. Dabei wird der Sauerstoffgehalt des Mediums nicht negativ beeinflusst. Das verbrauchte Medium wird dann in Flaschen gesammelt und nicht wieder zirkuliert. Auf diese Weise lassen sich unter sehr reproduzierbaren Bedingungen Gewebekulturen für viele Wochen serumfrei und unter optimalen Bedingungen generieren.

Modulation der Gewebedifferenzierung

Völlig neu war die Erfahrung, wie sensitiv embryonale Sammelrohrepithelien auf Umgebungsveränderungen reagieren (Abbildung 4). Werden z.B. die Epithelien für 14 Tage auf der luminalen und basalen Seite mit serumfreiem IMDM in einer Gradientenkammer gehalten, so zeigen nur wenige Zellen Reaktion mit einem Antikörper, der die darin enthaltenen Hauptzellen („principal cells“) erkennt (Abbildungen 4A und 4B; luminal wenig NaCl). Werden dagegen dem luminalen IMDM 12 mmol/l NaCl zugegeben, so verändert sich das Differenzierungsprofil drastisch (Abbildungen 4A und B; luminal viel NaCl). Fast alle Zellen werden jetzt von dem Antikörper markiert. Wird am 15. Tag NaCl wieder reduziert, so ist zu erkennen, dass einzelne Eigenschaften erhalten bleiben, während andere im Laufe von Tagen verloren gehen (Abbildung 4B).

Die Resultate der Gradientenkultur zeigen, dass das Elektrolytmilieu einer-

seits einzelne Differenzierungseigenschaften zu induzieren vermag und andererseits spezielle Eigenschaften aufrechterhält. Überträgt man diese Ergebnisse auf die Auswahl bzw. Verwendung von Kulturmedien, so wird deutlich, dass geeignete Medien für die Gewebekultur zukünftig entwickelt werden müssen, da diese im Handel bisher nicht erhältlich sind.

Interstitium für Gewebekonstrukte

Aus Stammzellen entstehen zuerst Gewebe mit embryonalen, später dann mit funktionellen Eigenschaften. Durch Anpassung des extrazellulären Raumes versuchen wir zusätzlich die Eigenschaften von Gewebekonstrukten zu verbessern. Dabei muss das Mikromilieu zwischen dem reifenden Gewebe und dem in den Kulturcontainer einströmenden Medium entscheidend verbessert werden (Abbildung 5A).

Normalerweise umgibt ein Gewebekonstrukt in einer Kulturschale oder in einem Perfusionscontainer viel Medium, d.h., es ist ein großes Totraumvolumen vorhanden (Abbildung 5A). Durch Reduktion der Kammergeometrie lässt sich das Totraumvolumen verkleinern, aber nicht minimalisieren. Aus diesem Grund werden von uns Polyesterfolie als künstliches Interstitium in das restliche Totraumvolumen des Kulturcontainers eingelegt. Mit dieser Methode können die Fließeigenschaften

des Mediums entscheidend verbessert werden. Durch die Auswahl von unterschiedlichen Vliesen lassen sich zudem inhibitorische und wachstumsfördernde Effekte auf das benachbart wachsende Gewebe ausüben. Kulturexperimente mit renalen Stammzellpopulationen zeigen erstmals, dass sich mit dieser Methode Tubulusstrukturen generieren lassen. Das Differenzierungsprofil der Tubuli kann mit Antikörpern oder Lektinen analysiert werden. Funktionelle Zellen können mit PNA, SBA, Cox-2 und TROMA-1 nachgewiesen werden (Abbildung 5B). Markierung mit PCD Amp1 dagegen zeigt, dass neben adulten auch noch embryonale Eigenschaften in den Konstrukten enthalten sind [8].

Ausblick

Sehr viel ist bisher über hämatopoetische Stammzellen und deren Reifung bekannt, viel weniger wissen wir über die adulten Stammzellen in den einzelnen Geweben und Organen. Beim Arbeiten mit Stammzellen lernen wir, dass die beiden Zellpopulationen der Niere in einer sehr speziell strukturierten Nische vorkommen. Histochemische Markierung mit SBA zeigt, dass hier eine besondere extrazelluläre Matrix ausgebildet ist, die die Entwicklung der Stammzellen beeinflusst. Mit Hilfe innovativer Kulturtechniken wollen wir zukünftig erarbeiten, wie ein optimales Umgebungsmilieu für die Entwicklung

der renalen Stammzellen zusammengesetzt ist und wie die Differenzierung sicher gesteuert werden kann.

Anmerkung: Informationen zum Kultursystem unter www.minucells.de

Literatur

1. Al-Awqati Q, Oliver JA. Stem cells in the kidney. *Kidney Int* 2002;61:387–95.
2. Minuth WW. Neonatal rabbit kidney cortex in culture as tool for the study of collecting duct formation and nephron differentiation. *Differentiation* 1987;36:12–22.
3. Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. Zukunftstechnologie Tissue engineering – von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.
4. Sariola H. Nephron induction revisited: from caps to condensate. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:17–21.
5. Saxen L. Organogenesis of the kidney. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.
6. Schumacher K, Strehl R, de Vries U, et al. SBA-positive fibers between the CD ampulla, mesenchyme, and renal capsule. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2446–53.
7. Schumacher K, Strehl R, de Vries U, et al. Advanced technique for long term culture of epithelia in a continuous luminal – basal medium gradient. *Biomaterials* 2002;23:805–15.
8. Strehl R, Kloth S, Aigner J, et al. PCD Amp1, a new antigen at the interface of the embryonic collecting duct epithelium and the nephrogenic mesenchym. *Kidney Int* 1997;52:1469–77.

Korrespondenzanschrift

Prof. Dr. Will W. Minuth
Institut für molekulare
und zelluläre Anatomie
Universität Regensburg
Universitätsstraße 31
93053 Regensburg
Telefon (+49/941) 943-2876
Fax -2868
E-Mail: will.minuth@vkl.uni-regensburg.de