

Kontrolliertes Environment für die Entwicklung von Stammzellen zu renalen Tubuli

Will W. Minuth, Lucia Denk, Kanghong Hu

■ Zusammenfassung:

Stammzellen sollen therapeutisch erkrankte Gewebe- und Organstrukturen erneuern. Wie diese Regenerationsvorgänge ablaufen, ist jedoch kaum bekannt. In diesem Zusammenhang zeigen wir erstmals, wie sich Stammzellen der Niere unter exakt kontrollierbaren Bedingungen zu dreidimensional strukturierten Tubuli entwickeln. Da für diese Arbeiten konventionelle Kulturmethoden nicht leistungsfähig genug waren, musste eine neue Technologie entwickelt werden. Dabei werden Stammzellen in einem Perfusionscontainer mit chemisch definiertem Kulturmedium (IMDM) an der Grenze zu einem artifiziellen Interstitium gehalten. Erstmals gelang damit die Generierung von renalem Parenchym. Im Verlauf dieser Arbeiten wurde entdeckt, dass das Steroidhormon Aldosteron bisher unbekannte morphogene Eigenschaften besitzt. Die vorgestellte Technologie eröffnet zukünftig sicherlich für viele Arten von Stammzellen die kontrollierte Entwicklung zu funktionellen Geweben unter in-vitro Bedingungen. Dies wiederum ermöglicht die genaue Analyse von Entwicklungsvorgängen und weist neue Wege bei der Therapie mit Stammzellen.

■ Klinischer Hintergrund

Erleidet ein Mensch ein chronisches oder akutes Nierenversagen, so muss er sich entweder für eine Art der Dialyse oder eine Transplantation entscheiden [1,2,3]. Beide Formen der Behandlung sind für den Patienten jedoch mit Risiken und Einschränkungen verbunden, darüber hinaus verursachen sie jährlich enorme Kosten für das Gesundheitswesen. Die Dialyse kann zudem nur für eine begrenzte Dauer an Jahren angewendet werden und für eine notwendige Transplantation stehen viel zu wenig Organe zur Verfügung [4]. Glück haben diejenigen Patienten, die mit der Dialyse eine Wartezeit überbrücken können und auf einem vorderen Platz der Warteliste für eine Transplantation stehen.

Es ist ungeklärt, durch welche molekularen Faktoren ein Nierenversagen ausgelöst wird und wie über Jahre hinweg die damit verbundenen degenerativen Prozesse im Organ ablaufen [2]. Vor diesem recht düsteren klinischen Hintergrund stellt sich die Frage, ob verloren gegangene Funktionen der Niere durch neue Verfahren der Regenerativen Medizin wieder erlangt werden können. In den Fokus des biomedizinischen Interesses sind Stammzellen gelangt, die für die Erneuerung des renalen Parenchyms

genutzt werden sollen [5,6] und schon bei anderen Organen wie Gehirn [7], Pankreas [8] und Herz [9] mit ganz unterschiedlichen Erfolgen angewendet wurden.

Bei einer Therapie werden Stammzellen bisher entweder über die Gefäße infundiert oder direkt in das erkrankte Parenchym eingespritzt. Für die Niere konnte gezeigt werden, dass sich Stammzellen nach einer Implantation innerhalb des Parenchyms ansiedeln [10]. Eine durch Stammzellen bedingte de-novo Synthese von Nephronen wurde bisher jedoch nicht nachgewiesen. Verständlicherweise trat deshalb nach einer anfänglichen Phase der Forschungseuphorie eine gewisse Ernüchterung ein, die Stammzelltherapie für renale Erkrankungen schon binnen weniger Jahre effektiv anwenden zu können. Im Gegensatz dazu werden Stammzellen bei schweren Herzinfarkten heute schon fast routinemäßig und mit zunehmendem Erfolg appliziert [9]. Der Grund für die unterschiedlichen Reaktionen der einzelnen Organen auf die Applikation von Stammzellen, ist bislang unbekannt. Ungeklärt ist auch, auf welche Weise die Stammzellen am Ort einer akuten oder chronischen Erkrankung wirken und wie sie neues Gewebe aufbauen.

Entwicklungswege von Stammzellen

Therapeutisches Ziel in der Regenerativen Medizin ist die Aktivierung von Entwicklungsschritten mit Stammzellen. Dieser Vorgang umfasst die komplette Entstehung einer Stammzelle über Zwischenstadien zu einem funktionellen Gewebe. Um Informationen darüber zu erhalten, werden häufig Mäuse als lebende Modellinkubatoren verwendet [10]. Dazu werden in eine Maus die jeweiligen Stammzellen eingespritzt und dann das Ergebnis abgewartet. Was sich in dieser Zeit im Tier tut, bleibt jedoch meist unbekannt. Somit ist das Versuchstier nach der Applikation von Stammzellen eine „Black box“. Sichtbar wird nur der Endpunkt der Entstehung, während die einzelnen Schritte, die zu diesem Ergebnis geführt haben, unerkannt bleiben.

Komplexe Entstehung von Geweben

In Zusammenhang mit der Differenzierung von Stammzellen denkt man häufig zuerst an die seit vielen Jahren bekannte Entwicklung von Blutzellen. Ihr Entwicklungsweg läuft über verschiedene Stadien von Vorläufer- bzw. Progenitorzellen ab und endet bei einzelnen isoliert vorliegenden Zellen, die schließlich im peripheren Blut nachgewiesen werden. Ihre Entwicklungsfähigkeiten wurden hauptsächlich durch die Kultur von Knochenmarkszellen aufgeklärt. Dabei erkannte man, dass die einzelnen Entwicklungsschritte dieser Art von Stammzellen durch humorale Faktoren wie Morphogene, Wachstumsfaktoren und Interleukine ausgelöst werden [11].

Die Entwicklung von Parenchym aus Stammzellen wird anfänglich auch bei hämatopoietischen Stammzellen durch humorale Faktoren gesteuert. Zuerst entstehen aus einzelnen Zellen Cluster, die einen sozial agierenden Zellverband bilden, der

später dann z. B. zu einem funktionellen Tubulus der Niere reift [12,13]. Im Gegensatz zum hämatopoetischen System werden diese Entwicklungsvorgänge jedoch durch eine Vielzahl von ganz unterschiedlichen Einflüssen gesteuert. Dazu gehören neben speziellen Morphogenen, Wachstumsfaktoren und Hormonen spezielle Beziehungen der Zellen untereinander, ebenso die Interaktionen zur extrazellulären Matrix, dem umgebenden Elektrolytenenvironment, dem Sauerstoffgehalt, nutritiven Substanzen, sowie hydrostatischen und rheologischen Milieubedingungen. Viele dieser Entwicklungsschritte sind bis heute nicht geklärt [14].

Ungeklärtes Organwachstum

Das Wissen zur Entwicklung der Niere ist lückenhaft. Rein morphologisch wurden Entwicklungsvorgänge in der Niere schon seit langem untersucht [15]. Ziemlich viel weiß man inzwischen über die molekularen Vorgänge bei der Entstehung der Nierenanlagen [16,17,18]. Im Gegensatz dazu kennt man jedoch nur ganz wenig über die Steuerung des dreidimensionalen Organwachstums. Relativ gut sind wiederum adaptive Phänomene der adulten Niere untersucht worden [19,20]. Beispielsweise nehmen im Laufe einer Schwangerschaft die Nieren an Volumen zu, nach der Geburt bildet sich jedoch das Organ wieder auf seine ursprüngliche Größe zurück. Nach Entfernung einer Niere ist zu beobachten, dass das verbleibende Organ an Größe zunimmt [21]. Bei diesen Vorgängen sind sowohl der Insuline-like growth factor (IGF), der Epidermal growth factor (EGF) sowie der Transforming growth factor- β (TGF- β) beteiligt. Wie diese Faktoren jedoch das dreidimensionale Wachstum steuern und ob sie im Rahmen der Regenerativen Medizin und in Verbindung mit Stammzellen genutzt werden können, ist unbekannt [22].

Tubulusentwicklung mit transparenten Modellsystemen

Betrachtet man das Nephron mit seinem komplexen Aufbau als kleinste funktionelle Einheit der Niere, so wird deutlich, dass alle die oben angeschnittenen Fragen allein durch die Injektion von Stammzellen nicht geklärt werden können [23–25]. Der Entwicklungsweg einer Stammzelle zu einem dreidimensional strukturierten Tubulus ist ungeklärt, kompliziert und in seinen Einzelschritten bisher nicht verstanden [12,13]. Er beginnt mit wenigen Stammzellen, die zahlreiche Vorläufer von Epithelzellen bilden. Daraus entsteht eine dreidimensionale Tubulusstruktur mit einer definierten Länge, einer apiko-basalen Polarisierung sowie einem konstanten Innen- und Außendurchmesser. Zudem wird festgelegt, ob es zu einem geradlinigen oder geschlängelten Längenwachstum der jeweiligen Struktur kommt.

Bisher ist keine Arbeit erschienen, die reproduzierbar die Generierung eines kompletten Nephrons aus embryonalem Gewebe gezeigt hat. Aus ungeklärten Gründen ist es trotz aller Bemühungen bisher auch nicht gelungen, aus einem S-shaped body die einzelnen Segmente des Nephrons zu gewinnen [15]. Trotz einer 50-jährigen Forschungsgeschichte ist es bisher auch nur in wenigen Fällen gelungen, Organanlagen der Niere für wenige Tage in Kultur zu halten und dabei ihre teilweise Entwicklung zu untersuchen [14,26]. Verwendet wurden meist Nierenanlagen von Maus- und Rattenembryonen, die in serumhaltigem Kulturmedium gehalten wurden. Auch aus dem Urin des Menschen angereicherte Zellen [27] und Zelllinien wie MDCK [28] wurden für die Herstellung von Tubulusstrukturen verwendet.

Nutzbare Zellquelle und Vermeidung von Risiken

Für die eigenen Versuche wurden Stammzellen verwendet, die aus der Niere von neonatalen Kaninchen stammen [30,31]. Im Gegensatz zu Versuchen mit embryonalen Mäusen und Ratten muss dabei das Muttertier nicht geopfert werden. Bei Verwendung von neonatalen Kaninchen stehen zudem für die Kultur als auch für die notwendigen zellbiologischen und biochemischen Experimente immer eine genügende Menge an biologischem Material zur Verfügung. Die später geschilderten Versuche hätten wegen der minimalen Zellausbeute in einem vertretbaren Rahmen mit embryonalem Gewebe von Mäusen oder Ratten nicht durchgeführt werden können. Aufgrund des Embryonenschutzgesetzes und aus ethischen Gründen können in Deutschland humane embryonale Zellen für diese Art von Experimenten nicht verwendet werden [4,23–25].

Literaturdaten zeigen, dass bei der Kultur von renalem Gewebe bisher immer eine Ummantelung mit ganz unterschiedlichen Materialien durchgeführt wurde. Dabei handelt es sich beispielsweise um Agar, Agarose oder Kollagen [26–29,32,33]. Immer häufiger wird jedoch das von Tumorzellen gebildete Matrigel verwendet [29]. In den meisten Fällen wurde dem Medium zudem fötales Rinderserum hinzugefügt. Arbeitet man aber in Hinblick auf eine zukünftige Therapie für den Menschen, so dürfen von einem Implantat keine Risiken ausgehen. Wegen der möglichen Infektionsgefahr kann ein Gewebe, welches Kontakt mit Rinderserum (Prionen, BSE) oder der ECM aus Tumormaterial hatte, deshalb nicht in einen Patienten implantiert werden. Aus diesen Gründen wurde für die eigene Forschung entschieden, dass die gesamten experimentellen Arbeiten ausschließlich mit chemisch definierten, also komplett serumfreien Medien und ohne eine

Beschichtung mit ECM-Bestandteilen durchgeführt werden.

Innovative in-vitro-Technik

Um die Entstehung und funktionelle Reifung von Tubulusstrukturen experimentell untersuchen zu können, benötigt man ein leistungsfähiges Kultursystem. Da die Entwicklung von Stammzellen über Zwischenstadien zu einem funktionellen Parenchym unerwartet lange Zeit benötigt, muss die Kulturtechnik geeignet sein, sowohl die Entstehung als auch die Aufrechterhaltung von Tubulusstrukturen in einem organotypischen Differenzierungsgrad über Zeiträume von Wochen zu gewährleisten. Unsere Arbeiten zeigten erstmals, dass dies möglich ist, wenn renale Stammzellen an der Grenze eines artifiziellen Interstitiums gehalten werden [30,31]. Hierbei handelt es sich um eine gänzlich neue Technologie, die die Entwicklung von Stammzellen zu Tubulusstrukturen unter absolut kontrollierbaren in-vitro-Bedingungen zugänglich macht.

Der Durchbruch gelang erst nach viel technischer sowie zellbiologischer Entwicklungsarbeit [34,35]. Zuerst wurde von uns analysiert, warum renale Stammzellen unter konventionellen Kulturtechniken keine oder nur unzulängliche Tubulusstrukturen ausbilden. Wie in der Literatur beschrieben, wurden z. B. zahlreiche Wachstumsfaktoren ohne einen erkennbaren Erfolg getestet [31]. Ohne ein positives Ergebnis verlief auch die Kultur in unterschiedlichen Kulturgefäßen. Schließlich wurde das Mikromilieu in den jeweiligen Kulturbehältern analysiert [35]. Dabei fanden wir heraus, dass bei allen Kulturtechniken das Volumen des verwendeten Kulturmediums um ein Vielfaches größer ist als das Volumen des kultivierten Gewebes (Abb. 1 a, 1 b). Zudem variiert je nach Versuchsansatz dieses Verhältnis sehr stark. Ganz auffallend war, dass ein solch diskrepantes Mengenverhältnis in einem Organismus nicht vorkommt.

Realisierung eines artifiziellen Interstitiums

Bei der Entwicklung einer verbesserten Kulturmethode für die Generierung renaler Tubuli ging es um die Frage, wie viel Medium ein Gewebe für eine erfolgreiche Kultur benötigt und welche Oberflächenphänomene die Entwicklung des reifenden Gewebes begünstigen. Wird Gewebe in einer Kulturschale z. B. nur mit wenig Medium benetzt, so führt dies nach kurzer Zeit zur Mangelernährung, einer zu starken Sauerstoffversorgung und wegen der Verdunstung zu kaum berechenbaren Veränderungen der Oberflächenspannung. Wird das Gewebe in einem geschlossenen Container kultiviert, so muss die Beschaffenheit seiner Innenwand, die Lage des kultivierten Gewebes und der Raum des dazwischen fließenden Mediums berücksichtigt werden (Abb. 1 c). Es mußte deshalb nach einer technischen Lösung gesucht werden, bei der diese ganz unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften zur Deckung gebracht und für eine optimale Entwicklung des Gewebes genutzt werden konnten.

Als technische Lösung wurde zwischen die Innenwand eines Perfusionscontainers und das darin befindliche Gewebe ein Vlies aus Polyester als ein artifizielles Interstitium eingelegt (Abb. 1 d). Um einen gleichmäßigen Flüssigkeitsaustausch zu gewährleisten, muss das Vlies ausreichend große Räume zwischen seinen Fasern aufweisen. Auf diese Weise kann das Kulturmedium wie in einem Kapillarbereich hindurchströmen und sorgt damit für eine bemerkenswerte und bisher unbekannte Milieukonstanz.

Bis ein geeignetes artifizielles Interstitium gefunden war, musste eine Vielzahl von Materialien getestet werden. Verlangt war eine optimale Bioverträglichkeit, eine ausreichend hygrophile Oberfläche für das Kulturmedium und eine notwendige elastische Deformierbarkeit (Abb. 1 e, 1 f). Alle prinzipiell geeigneten rigi-

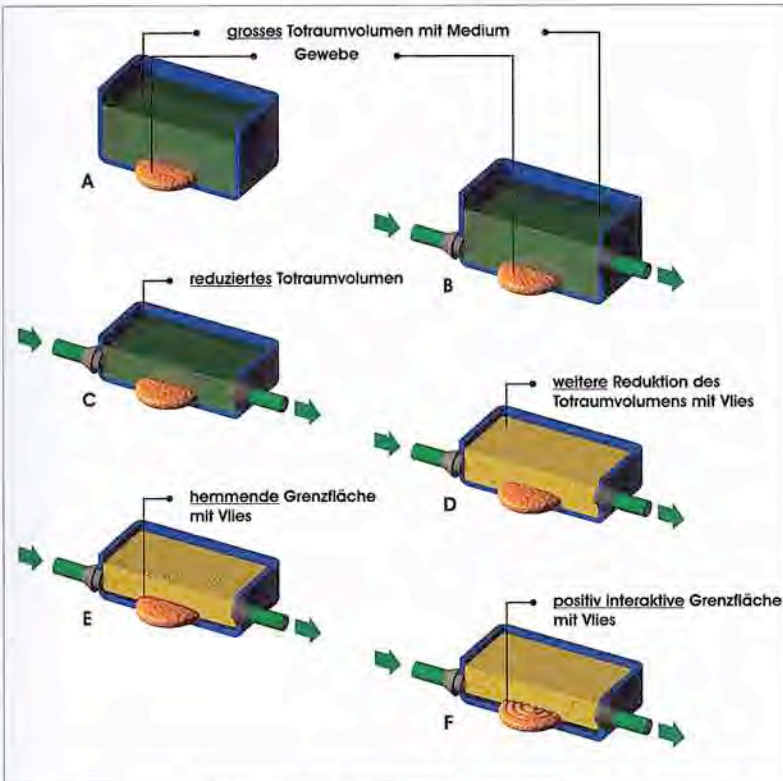


Abbildung 1: A-F. Reduktion des Totraumvolumens in einem Perfusionskulturcontainer zur Generierung renaler Tubuli an der Grenzfläche zu einem artifiziellem Interstitium. A) Eine Kulturschale enthält normalerweise viel Medium im Verhältnis zur Zell- bzw. Gewebemenge. B) Auch ein Perfusionskulturcontainer enthält viel Totraumvolumen. C) Durch geometrische Reduktion kann das Totraumvolumen verringert werden. D) Eine weitere Verkleinerung des Totraumvolumens findet durch das Einsetzen eines artifiziellem Interstitiums statt. E) Die Grenzfläche zum artifiziellem Interstitium kann sich hemmend auf die Entwicklung auswirken. F) Eine positiv interaktive Grenzfläche lässt jedoch renale Tubuli aus Stammzellen entstehen.

den Materialien schieden somit aus. Übrig blieb nur eine relativ kleine Auswahl an Kollagenschwämmen und Vliesen. Optimale Versuchsergebnisse hatten wir mit einem Vlies aus Polyester (Firma WALRAF, Grevembroich, Deutschland), welches sonst als Stützmaterial für Teichfolien, als Tischdecke, als Dämmmaterial bei der Autoindustrie oder auch als Wischtuch verwendet wird.

Reduktion von Gasblasen beim langsamen Transport von Kulturmedium

Bei der Anwendung eines artifiziellem Interstitiums in einem Perfusionsystem bereiten Luftblasen ein unerwartet großes Problem (Abb. 2).

Gasblasen werden durch den langsamen Transport (1 ml/h) von Medium in einen Kulturcontainer eingebracht. Dies hat jedoch fatale Folgen für die Versorgung des reifenden Gewebes. Sie setzen sich zufällig im Strömungsraum des artifiziellem Interstitiums fest, verhindern dadurch einen gleichmäßigen Austausch des Kulturmediums und führen damit zu Veränderungen der Strömungsrichtung und des Strömungsdruckes.

Für die Vermeidung von Gasblasen beim langsamen Transport von Kulturmedium mußten spezielle Schlauchleitungen und Verschlusskappen für Mediumflaschen entwickelt werden, da die Blasenbildung hauptsächlich an Materialübergän-

gen sichtbar wird. Umgesetzt wurde dies, in dem das Kulturmedium nur Kontakt mit dem Schlauchmaterial und nicht wie sonst üblich mit der Verschlusskappe hat.

Die notwendige Anreicherung von Sauerstoff findet nicht wie üblich durch Injektion von Atemgas (Bubbletechnik) statt, sondern geschieht durch Diffusion über spezielle gaspermeable Schläuche und somit blasenfrei. Zusätzlich kann ein spezielles Gasdiffusionsmodul verwendet werden, welches einen blasenfreien Austausch von beliebigen Konzentrationen an Atemgasen ermöglicht.

Dennoch kann es beim Transport von Medium in nicht vorhersehbaren Zeitabständen zu weiteren Blasenbildungen an Materialübergängen des Systems kommen. Damit diese das artifiziellem Interstitium nicht erreichen, wird ein Gasausgleichsmodul unmittelbar vor einen Perfusionskulturcontainer geschaltet. Innerhalb dieses Moduls überschreitet das Kulturmedium eine Barriere. Gasblasen werden hier von der Flüssigkeitsphase separiert. Messungen mit einem speziell dafür entwickelten Sensor zeigten, dass sich damit effektiv Gasblasen entfernen lassen, ohne dass sich dabei der Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Kulturmedium verringert.

Für die Kultur von Stammzellen an einem artifiziellem Interstitium mußte schließlich ein spezieller Perfusionscontainer konstruiert werden. Er besteht aus einem Boden- und Deckelteil. In seinem Binnenraum können je nach Bedarf unterschiedliche Lagen von einem Polyestervlies eingelegt werden. Dazwischen befindet sich das jeweilige biologische Material. Nach dem Schließen des Containers kann das verbrauchte Kulturmedium an seinem höchsten Punkt ausströmen. Dies bewirkt, dass durch Atmung am Gewebe gebildete Gasblasen kontinuierlich den Perfusionscontainer verlassen können. Für eine mehrwöchige Kultur wird immer frisches, chemisch defi-

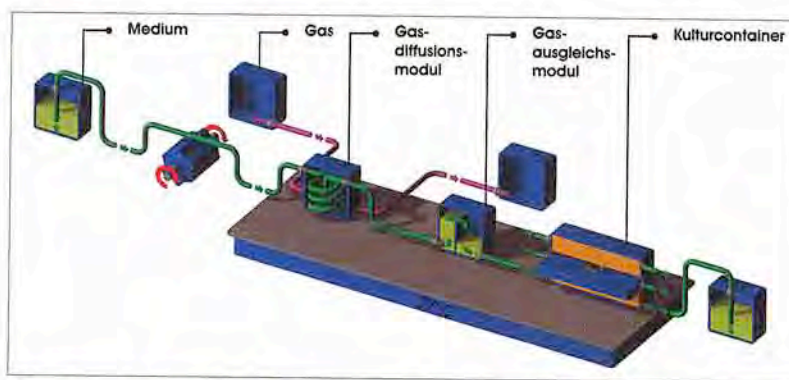


Abbildung 2: Schematische Darstellung des neu entwickelten Kultursystems für die Generierung von funktionellen Geweben aus Stammzellen. Links: Langsamer Transport von Medium unter Vermeidung von Gasblasenbildung. Über ein Gasdiffusionsmodul erfolgt der beliebige Austausch von Atemgas ohne die Entstehung von Gasblasen. Mitte: Gasausgleichsmodul zur Eliminierung von Gasblasen und ein Kulturcontainer mit Gewebeträger, der von einem künstlichen Interstitium umgeben ist. Rechts: Sammeln des Kulturmediums. Das System arbeitet unter atmosphärischer Luft auf einem Labortisch für beliebig lange Zeit.

nirtes Kulturmedium eingeströmt, das verbrauchte Medium wird nicht rezirkuliert. Auf diese Weise lassen sich absolut kontrollierbare Versuchsbedingungen erzeugen.

Entdeckung der tubulogenen Wirkung von Aldosteron

Erste Kulturversuche mit renalen Stammzellen an der Grenze eines artifiziellen Interstitiums verliefen mehr enttäuschend als zufriedenstellend. Beobachtet wurde, dass sich das entstehende Gewebe über viele Tage am Leben erhalten ließ. Dennoch zeigte das Gewebe immer noch nicht den notwendigen Grad an zellulärer Differenzierung. Dies bedeutete, dass offensichtlich die technischen Voraussetzungen für die Kultur geschaffen waren, ein auslösender Stimulus für die Entwicklung von Tubulusstrukturen jedoch noch fehlte. Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Hormonen in Kombination mit der neuen Kulturtechnologie getestet.

Im Rahmen der weiteren Experimente zeigte sich, dass das Steroidhormon Aldosteron eine bisher unbekannt tubulogene Wirkung auf die Entwicklung von renalen Stamm-

zellen entfaltet [31,36,37]. Wird dem Kulturmedium (Iscove's modified Dulbecco's Medium, IMDM) Aldosteron (1×10^{-7} M) hinzugefügt, so entstehen nach 14 Tagen eine Vielzahl an Tubuli (Abb. 3 a, 3b), die mit SBA-Lektin nachgewiesen werden (Abb. 3 c, 3d). Die Spezifität der am Aldosteronrezeptor vermittelten

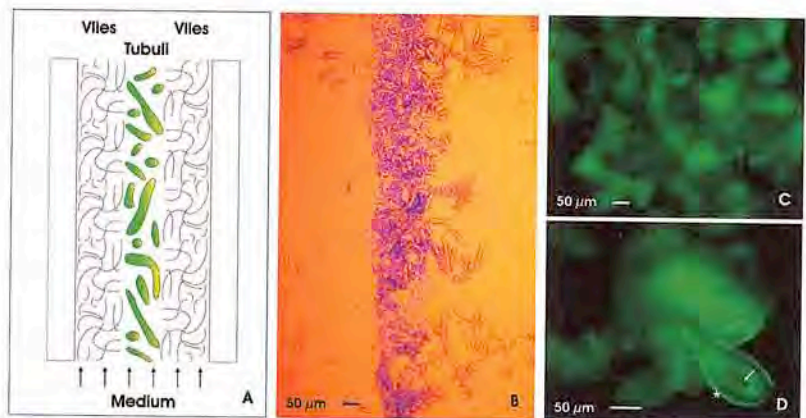


Abbildung 3 : A-D. Generierung von renalen Tubuli aus Stammzellen. A) Schematische Darstellung von entstehenden Tubuli zwischen zwei Vliesen an der Grenzfläche von einem künstlichen Interstitium. B) Mikroskopische Ansicht von generiertem Nierengewebe, welches aus Stammzellen nach 14 Tagen in Kultur mit Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM) und Aldosteron entstanden ist. C) und D) Generierte Tubuli nach SBA-Markierung an der Grenzfläche eines artifiziellen Interstitiums. Die Besonderheit ist, daß das Gewebe nicht in das Vlies eingewachsen ist, sondern im Spaltraum zwischen 2 Lagen Vlies entsteht = artifizielles Interstitium. Deutlich ist die Basalmembran (Sternchen) und das Lumen (Pfeil) zu erkennen.

Wirkung kann mit Antagonisten wie Spironolacton und Canrenoat gezeigt werden. Der morphogene Effekt von Aldosteron lässt sich dagegen mit Dexamethason nicht auslösen, obwohl das Glukokortikoidhormon an den Aldosteronrezeptor bindet.

Die Menge und die Differenzierungseigenschaften der durch Aldosteron gebildeten Tubuli ist bemerkenswert. Mit einem Antikörper gegen Laminin $\gamma 1$ kann die Bildung einer Basalmembran festgestellt werden. Markierung mit anti-Occludin zeigt die Bildung von Tight junctions und an der basolateralen Plasmamembran kann Na/K-ATPase nachgewiesen werden. Alle diese Eigenschaften zeigen, dass in den Tubuli ein polar differenziertes Epithel ausgebildet ist.

Spekulationen

Bislang wissen wir, dass mit der vorgestellten Methode renale Stammzellen zu Tubulusstrukturen reifen und dass diese Entwicklung an der Grenzfläche eines artifiziellen Interstitiums stattfindet. Bisher kann jedoch nur darüber spekuliert werden, welche biophysikalische Einflüsse an

der Grenzfläche des artifiziiellen Interstitiums die Entstehung von dreidimensional strukturierten Tubulusstrukturen unterstützen. Hier eröffnet sich ein gänzlich neues biophysikalisches Forschungsfeld.

Informationen zum Kultursystem: Minucells and Minutissue GmbH (www.minucells.de).

Literatur

- Schiffel H. Dosing pattern of renal replacement therapy in acute renal failure: current status and future directions. *Eur J Med Res* 2006;11[4]:178–82
- Bisceglia M, Galliani CA, Senger C, Stallone C, Sessa A. Renal cystic disease: a review. *Adv Anat Pathol* 2006;13[1]:26–56
- Callaghan CJ, Bradley JA. Current status of renal transplantation. *Methods Mol Biol* 2006; 331:1–28
- Gutmann T, Daar AS, Sells RA, Land W. Ethical, Legal, and Social Issues in Organ Transplantation, Editors Pabst Publishers, Lengerich, 2004; ISBN 3–89967–017–5 (Europe), ISBN 1–59326–063–6 (USA).
- Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. *Cell Transplant* 2006;15[1]:S111–7
- Hammerman MR. Organogenesis of kidneys following transplantation of renal progenitor cells. *Transpl Immunol* 2004;12:229–239
- Paul G. Cell transplantation for patients with Parkinson's disease. *Handb Exp Pharmacol* 2006;174:361–88
- Trucco M. Is facilitating pancreatic beta cell regeneration a valid option for clinical therapy? *Cell Transplant* 2006;5,1: 575–84
- Stamm C, Liebold A, Steinhoff G, Strunk D. Stem cell therapy for ischemic heart disease: beginning or end of the road? *Cell Transplant* 2006;15[1]:S47–56
- Benten D, Cheng K, Gupta S. Identification of transplanted human cells in animal tissues. *Methods Mol Biol* 2006;326:189–201
- Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 2006;354[19]:2034–45
- Karihaloo A, Nickel C, Cantley LG. Signals which build a tubule. *Nephron Exp Nephrol* 2005;100:e40–45
- Lubarsky B, Krasnow MA. Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes. *Cell* 2003;112:19–28
- Davies JA. Morphogenesis of the metanephric kidney. *Scientific Worldjournal* 2002;2:1937–1950
- Cha JH, Kim YH, Jung JY, Han KH, Madson KM, Kim J. Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1410–1421
- Costantini F, Shakra R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays* 2006;28:117–127
- Sariola H. Nephron induction. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17,9:88–90
- Dressler G. Tubulogenesis in the developing mammalian kidney. *Trends Cell Biol* 2002;12:390–395
- Lauszus FF, Klebe JG, Rasmussen OW, Klebe TM, Dorup J, Christensen T. Renal growth during pregnancy in insulin-dependent diabetic women. A prospective study of renal volume and clinical variables. *Acta Diabetol* 1995;32,4:225–9
- Stepanov VN, Vidiukov VI, Seregin AV, Speranskii IV. Change in anatomo-functional state of the parenchyme in early unilateral renal carcinoma before and after surgical treatment. *Urologia* 2001;4:22–6
- Hammerman MR, O'Shea M, Miller SB. Role of growth factors in regulation of renal growth. *Annu Rev Physiol* 1993;55:305–21
- Hammerman MR. Cellular therapies for kidney failure. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:87–97
- Vigneau C, Zheng F, Polgar K, Wilson PD, Striker G. Stem cells and kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:238–244
- Deke B, Reischer Y. Embryonic committed stem cells as a solution to kidney donor shortage. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:443–454
- Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1113–1125
- Meyer TN SC, Bush KT, Stuart RO, Rose DW, Shah MM VD, Steer DL, Nigam SK. Spatiotemporal regulation of morphogenetic molecules during in vitro branching of the isolated ureteric bud: toward a model of branching through budding in the developing kidney. *Dev Biol* 2004;275:44–67
- Inoue CN, Sunagawa N, Morimoto T, Ohnuma S, Katsushima F, Nishio T, Kondo Y, Iinuma K. Reconstruction of tubular structures in three-dimensional collagen gel culture using proximal tubular epithelial cells voided in human urine. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* 2003;39,8–9:364–7
- Hellman NE, Greco AJ, Rogers KK, Kanchagar C, Balkovetz DF, Lipschutz JH. Activated extracellular signal-regulated kinases are necessary and sufficient to initiate tubulogenesis in renal tubular MDCK strain I cell cysts. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F777–785
- Han HJ, Sigurdson WJ, Nickerson PA, Taub M. Both mitogen activated protein kinase and the mammalian target of rapamycin modulate the development of functional renal proximal tubules in matrigel. *J Cell Sci* 2004;117:1821–1833
- Minuth WW, Sorokin L, Schumacher K. Generation of renal tubules at the interface of an artificial interstitium. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:387–394
- Minuth WW, Denk L, Heber S. Growth of embryonic renal parenchyme at the interphase of a polyester artificial interstitium. *Biomaterials* 2005;26:6588–6598
- Maeshima A, Sakurai H, Nigam SK. Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:188–98
- Kanwar YS KA, Yang Q, Tian Y, Wada J, Kashihara N, Wallner EI. Tubulointerstitial nephritis antigen: an extracellular matrix protein that selectively regulates tubulogenesis vs. glomerulogenesis during mammalian renal development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11323–11328
- Minuth WW. Patent 2006;Nr. DE 199 52 847: Vorrichtung zum Kultivieren und/oder Differenzieren und/oder Halten von Zellen und/oder Geweben.
- Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. Tissue factory: conceptual design of a modular system for the in vitro generation of functional tissues. *Tissue Engineering* 2004;10,1/2:285–294
- Heber S, Denk L, Hu K, Minuth WW. Modulating the development of renal tubules growing in serum-free culture medium at an artificial interstitium. *Tissue engineering* 2007;3,2:281–292.
- Minuth WW, Denk L, Hu K. The role of polyester interstitium and aldosterone during structural development of renal tubules in serum-free medium. *Biomaterials* 2007;28:4418–4428

Info

Will W. Minuth, Lucia Denk,
Kanghong Hu
Institut für Zelluläre und Molekulare
Anatomie, Universität Regensburg,
Universitätsstraße 31,
D-93053 Regensburg,
Phon: +49 941 943 2876,
FAX +49 941 943 2868,
E-Mail:
will.minuth@vkl.uni-regensburg.de