

Generierung von Tubuli aus renalen Stamm-/Progenitorzellen mit Aldosteron

Einleitung: Derzeit wird intensiv untersucht, ob Stammzellen in Zukunft genutzt werden können, um bei akuten und chronischen Erkrankungen der Niere das Parenchym zu erneuern. Wie solche Regenerationsvorgänge gezielt therapeutisch induziert und gesteuert werden können, ist bisher nicht bekannt. In diesem Zusammenhang werden in unserer Arbeitsgruppe Strategien untersucht, wie sich Stamm-/Progenitorzellen der Niere unter exakt kontrollierbaren Bedingungen zu dreidimensional strukturierten Tubuli entwickeln lassen. Im Fokus der Arbeiten steht die tubulogene Wirkung von Aldosteron.

Material und Methoden: Renale Stamm-/Progenitorzellen werden gewonnen, indem bei der Niere von neonatalen Kaninchen die Kapsel mit der anhaftenden embryonalen Zone abgezogen wird. Das Präparat enthält zahlreiche epitheliale Stammzellen in den Sammelrohrampullen sowie nephrogene mesenchymale Stammzellen. Da für die Generierung von dreidimensional strukturierten Tubuli konventionelle Kulturmethode nicht leistungsfähig genug sind, werden die isolierten renalen Stamm-/Progenitorzellen in einem Perfusionscontainer an der Grenze zu einem artifiziellen Interstitium und unter permanenter Durchströmung mit immer frischem, chemisch definiertem Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM) gehalten.

Ergebnisse: Erfolgt die Kultur von renalen Stamm-/Progenitorzellen in IMDM ohne einen Hormonzusatz, so ist keine Bildung von Tubuli zu beobachten. Wird jedoch Aldosteron (1×10^{-7} M) hinzugefügt, so entsteht nach 13 Tagen eine Vielzahl an Tubuli, die mit fluoreszierendem Soybean Agglutinin (SBA)-Lektin histochemisch nachgewiesen werden können. Die tubulogene Wirkung ist abhängig von der applizierten Aldosteronkonzentration und kann weder durch Glukokortikoide, molekulare Vorstufen von Aldosteron noch durch andere Steroide hervorgerufen werden. Antagonisten wie Spironolacton und Canrenoat hemmen die Wirkung von Aldosteron. Zudem kann die tubulogene Wirkung von Aldosteron durch Interferenz zwischen dem Mineralokortikoidrezeptor, dem Heat shock Protein 90, Heat shock Protein 70 und dem Immunophilin FKBP 12 blockiert werden.

Fazit: Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass renale Stamm-/Progenitorzellen sich nach Zugabe von Aldosteron zu strukturierten Tubuli unter kontrollierten In-vitro-Bedingungen entwickeln lassen. Dies wiederum eröffnet die genaue Analyse von renalen Entwicklungsvorgängen, um zukünftig neue Ansätze bei einer regenerativen Therapie mit Stammzellen zu finden.

Schlüsselwörter:

Niere, Tubuli, Stamm-/Progenitorzellen, Regeneration, Aldosteron

Aldosterone-dependent Generation of Tubules Derived from Renal Stem/Progenitor Cells

Considerations about the application of stem/progenitor cells in renal injury and repair are the subject of intense biomedical and clinical research. In recent experiments it was shown that aldosterone exhibits a tubulogenic activity on renal stem/progenitor cells. However, little information is available about the signaling between the steroid hormone, the mineralocorticoid receptor (MR) including the interacting proteins in the cytoplasm of the target cell. To obtain new insights in the molecular signalling of MR embryonic tissue from neonatal rabbit kidney containing renal stem/progenitor cells was kept at the interface of polyester fleeces creating an artificial interstitium. Culture was performed in a perfusion container with always fresh and chemically defined Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) for 13 days. The development of tissue was controlled on cryosections labeled with fluorescent Soybean Agglutinin (SBA) and other cellbiological markers.

Fluorescence microscopy revealed that cultures without hormone application failed to generate SBA-labeled tubules, while treatment with aldosterone (1×10^{-7} M) resulted in development of numerous tubules showing intensive reaction with SBA. The tubulogenic action of aldosterone depends on the applied hormone concentration and is inhibited by the application of spironolactone and canrenoate. Interference in the molecular contact between the mineralocorticoid receptor (MR) and heat shock protein (hsp) 90 using geldanamycin or radicicol results in a lack of tubule development. Disturbing the contact between MR and hsp 70 with quercetin and KNK 437 shows only to a minimal degree structured tubules. Preventing the interaction between MR and immunophilins by cyclosporin A and rapamycin does not influence the generation of numerous SBA-labeled tubules, while administration of FK 506 demonstrates a lack of tubule development.

In conclusion, the actual results suggest that the signal for structural development of tubules induced by aldosterone is mediated by interaction of MR, hsp 90, hsp 70 and especially immunophilin FKBP 12.

Key words:

kidney, tubule, stem/progenitor cells, regeneration, aldosterone

len und damit durch eine Regeneration des Parenchyms wieder erlangt werden kann (4, 9, 21, 25). Die Idee, ein erkranktes Organ mit der Hilfe von Stammzellen zu erneuern, war lange Zeit ein reines Wunschdenken. Durch die enormen Entwicklungen im Bereich der Biomedizin hat diese Idee in den letzten Jahren jedoch eine immer breitere Forschungsplattform erhalten.

Es ist unbekannt, warum die Niere im Vergleich zur Leber nur eine eingeschränkte Kapazität zur Regeneration besitzt. Die therapeutische Herausforderung besteht darin, mit einer Applikation von Stammzellen verloren gegangenes Parenchym durch Regeneration zu ersetzen (24, 32). Bisher konnte z.B. gezeigt werden, dass sich Stammzellen nach einer Implantation innerhalb der Niere ansiedeln (11, 12, 13, 38, 40, 41). Trotz intensiver Forschungstätigkeit konnte jedoch bislang keine durch Stammzellen bedingte De-novo-Synthese von Nephronen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass allein durch die Implantation von Stammzellen keine organotypische Regeneration des Parenchyms zu erwarten ist und dass noch viel Forschungsarbeit geleistet werden muss, um geeignete Strategien für eine therapeutische Regeneration zu finden (3, 22, 27).

Die Entwicklung der Niere ist ein komplexer Vorgang, der bisher nur in wenigen Facetten verstanden ist. Rein morphologisch wurden Entwicklungsvorgänge der Niere schon seit langem untersucht (8). Ziemlich viel weiß man inzwischen auch über die molekularen Vorgänge bei der Entstehung der Nierenanlagen (6, 28, 36). Im Gegensatz dazu kennt man jedoch nur ganz wenig über die Bildung der Tubuli und über die Steuerung des dreidimensionalen Organwachstums während der Entwicklung.

Tubulogenese geschieht in einer langen Kette von zellbiologischen Ereignissen, bei denen aus einzelnen Zellen zuerst sozial agierende Zellverbände entstehen, die dann Röhrenstrukturen bilden (10, 17, 20, 23). Das resultierende Tubulussegment hat eine definierte Länge, eine apiko-basale Polarisierung sowie einen konstanten Innen- und Außendurchmesser. Zudem wird festgelegt, ob es zu einem geradlinigen (Pars recta) oder geschlängelten (Konvolut) Längenwachstum kommt.

Der komplexe Aufbau der Niere erschwert experimentelle Untersuchun-

Abkürzungen

FKBP12	FK-bindendes Protein 12
HEPES	Hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid
Hsp	Heat shock Protein
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
MR	Mineralokortikoidrezeptor

Einleitung

Beim akuten und chronischen Nierenversagen zerstören unaufhaltsam degenerative Prozesse die funktionellen Eigenschaften des Parenchyms (2, 5, 37). Vor diesem klinischen Hintergrund stellt sich die Frage, ob eine verloren gegangene Funktionalität der Niere durch eine Applikation von Stammzel-

gen zur Tubulogenese am Organ. Aus diesem Grund werden In-vitro-Experimente durchgeführt. Verwendet werden dazu vorwiegend Nierenanlagen von Maus- und Rattenembryonen (28), aus dem Urin des Menschen angereicherte Zellen (19) sowie Zelllinien wie z.B. MDCK (16). Um eine dreidimensionale Entwicklung zu ermöglichen, ummantelt man die Kulturen mit Agar, Agarose oder Kollagen. Neuerdings wird häufig das von Tumorzellen gebildete Matrigel verwendet (14). Zur besseren Entwicklung enthält das Kulturmedium meist fötales Rinderserum. Arbeitet man jedoch in Hinblick auf eine zukünftige Therapie für den Menschen, so dürfen von einem Implantat keine Risiken ausgehen. Wegen der möglichen Kontaminationsgefahr darf ein generiertes Gewebe, welches Kontakt z.B. mit Rinderserum (Prionen, BSE) oder der extrazellulären Matrix aus Tumormaterial hat, nicht in einen Patienten implantiert werden. Aus diesen Gründen wurde für die eigene Forschung entschieden, die experimentellen Arbeiten ausschließlich mit chemisch definierten Kulturmedien und ohne eine Beschichtung mit extrazellulären Matrixproteinen durchzuführen (18).

In den vorgestellten Experimenten wird die Generierung von strukturierten Tubuli aus renalen Stamm-/Progenitorzellen mit Unterstützung eines artifiziellen Interstitiums unter exakt kontrollierbaren In-vitro-Bedingungen geschildert. Von besonderer Bedeutung sind die tubulogene Wirkung von Aldosteron und die molekularen Interaktionen zwischen dem Mineralokortikoidrezeptor, Heat shock Proteinen und benachbarten Immunophilinen.

Material und Methoden

Für die gezeigten Versuche wurden Stammzellen verwendet, die aus der Niere von neonatalen Kaninchen stammen (31). Die Isolierung wird mikrochirurgisch durchgeführt, indem die Organkapsel mit einer dünnen Schicht anhaftender Sammelrohrampullen (epitheliale Stammzellen) und nephrogener mesenchymaler Stammzellen unter dem Binokularmikroskop mit Hilfe einer Pinzette abgezogen wird.

Um die Entstehung und funktionelle Reifung von Tubulusstrukturen experimentell untersuchen zu können, benötigt man ein leistungsfähiges Kultursys-

tem. Es muss geeignet sein, sowohl die Entstehung als auch die Aufrechterhaltung von Tubulusstrukturen in einem organotypischen Differenzierungsgrad über Zeiträume von Wochen zu gewährleisten. Unsere Arbeiten zeigen, dass dies möglich ist, wenn renale Stammzellen an der Grenze eines artifiziellen Interstitiums gehalten werden (29, 30, 31).

Zur Generierung von Tubuli wird das isolierte embryonale Gewebe zwischen zwei Vliese aus Polyester (Walraf, Grevenbroich, BRD) gelegt, die einen Durchmesser von 5 mm haben. Dieses Sandwich ist oben und unten von zwei weiteren Vliesen mit einem Durchmesser von 13 mm bedeckt (Abb. 1a). Das Sandwich wird in einem Minusheet®-Gewebeträger eingelegt, der sich in einem Perfusionscontainer (Minucells and Minutissue, Bad Abbach, BRD; www.minucells.de) mit horizontalen Strömungscharakteristika befindet. Nach dem Schließen des Containers ist das Gewebe-Vlies-Sandwich für die Dauer der Kultur in seiner Lage fixiert. Der Raum für die Entwicklung der Tubuli zwischen den Vliesen beträgt somit 5 mm im Durchmesser und bis zu 250 µm in der Höhe.

Während der Kultur von 13 Tagen unter atmosphärischer Luft auf einem Labor-tisch erfolgt ein kontinuierlicher Transport (1 ml/h) von immer frischem Kulturmedium mit einer IPC N8 Peristaltikpumpe (Ismatec, Wertheim, BRD). Die Temperierung von 37° C erreicht man mit einer Wärmeplatte (Medax-Nagel, Kiel, BRD), die mit einem Plexiglasdeckel bedeckt ist.

Zur Ernährung der Kultur wird chemisch definiertes Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit Phenolrot (IMDM, GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe, BRD) verwendet. Bis zu 50 mmol/l HEPES (GIBCO/Invitrogen) wird zugefügt, damit das Medium unter atmosphärischer Luft mit 0.3% CO₂ einen konstanten pH von 7.4 aufrechterhält. Um die Bildung von Tubuli zu induzieren, enthält das Medium Aldosteron (1 x 10⁻⁷ M, Fluka, Taufkirchen, BRD). Infektionen werden durch die Zugabe eines antibiotisch-antimykotischen Cocktails (1%, GIBCO/Invitrogen) vermieden.

Zur Hemmung der tubulogenen Wirkung von Aldosteron wird Spironolacton (1 x 10⁻⁴ M) oder Canrenoat (1 x 10⁻⁴ M; beides von Sigma, Taufkirchen, BRD) verwendet. Die Interferenz zwi-

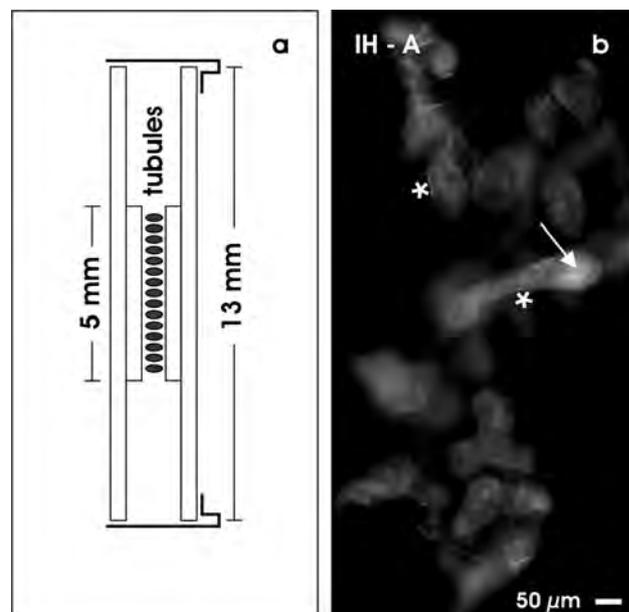


Abb. 1 a-b: Generierung von Tubuli aus renalen Stamm-/Progenitorzellen. a) Schematische Darstellung von entstehenden Tubuli zwischen zwei Vliesen an der Grenzfläche von einem künstlichen Interstitium. Die Besonderheit dabei ist, dass das Gewebe nicht in das Vlies eingewachsen ist, sondern im Spaltraum zwischen 2 Lagen Vlies entsteht = **artifizielles Interstitium**. b) Mikroskopische Ansicht von SBA-markierten renalen Tubuli, welche aus Stamm-/Progenitorzellen nach 13 Tagen in Kultur mit Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) und Aldosteron entstanden sind. Deutlich sind die Basalmembran (Sternchen) und das Lumen (Pfeil) zu erkennen.

schen dem Aldosteronrezeptor und Heat shock Protein 90, Heat shock Protein 70 und Immunophilinen geschieht mit folgenden Substanzen: Geldanamycin ($3,6 \times 10^{-6}$ M, Biomol, Hamburg, BRD), Radicol (1×10^{-6} M, Sigma), Quercetin (2×10^{-4} M, Biozol, Eching, BRD), KNK 437 (1×10^{-4} M, Calbiochem, Darmstadt, BRD), Cyclosporin A (2×10^{-6} M, Fluka), Rapamycin ($2,2 \times 10^{-9}$ M, Assay designs, Michigan, USA) und FK 506 (2×10^{-8} M, Sigma). Die jeweiligen Konzentrationen entsprechen Daten aus der Literatur mit kultivierten Zellen.

Zur histochemischen Analyse werden Gefrierschnitte der Kulturen angefertigt, anschließend in Äthanol fixiert, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) sowie 10% Pferdeserum für 30 Minuten geblockt. Um entstandene Tubuli zu visualisieren, werden die Schnitte mit Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugiertem Soybean Agglutinin (1 : 2000; SBA, Vector, Burlingame, USA) für 45 Minuten inkubiert, mit PBS gewaschen und in Slow Fade Light Antifade Kit (Molecular Probes, Eugene, USA) eingebettet. Die Präparate werden dann an einem Axioskop 2 plus Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, BRD) analysiert. Fluoreszenzaufnahmen entstehen mit einer Digitalcamera während einer Standardexpositionszeit von 1.3 Sekunden. Die Bilder werden mit Corel DRAW 11 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) verarbeitet.

Ergebnisse

Wird für die Kultur von renalen Stamm-/Progenitorzellen IMDM ohne einen Hormonzusatz verwendet, so entstehen keine Tubuli (Abb. 2a'). Bei der Zugabe von Aldosteron (1×10^{-7} M) bildet sich jedoch innerhalb von 13 Tagen eine Vielzahl an Tubuli, die z.B. mit SBA-Lektin nachgewiesen werden können (Abb. 1b, 2b'). Immunhistochemisch kann zusätzlich mit anti-Laminin $\gamma 1$ die Bildung einer Basallamina festgestellt werden, Markierung mit anti-Occludin zeigt die Bildung von Tight junctions und die basolaterale Plasmamembran ist positiv für anti-Na/K-AT-Pase, was auf die Entwicklung von vektorellen Transporteigenschaften in einem polar differenzierten Epithel schließen lässt (15, 29, 30, 31).

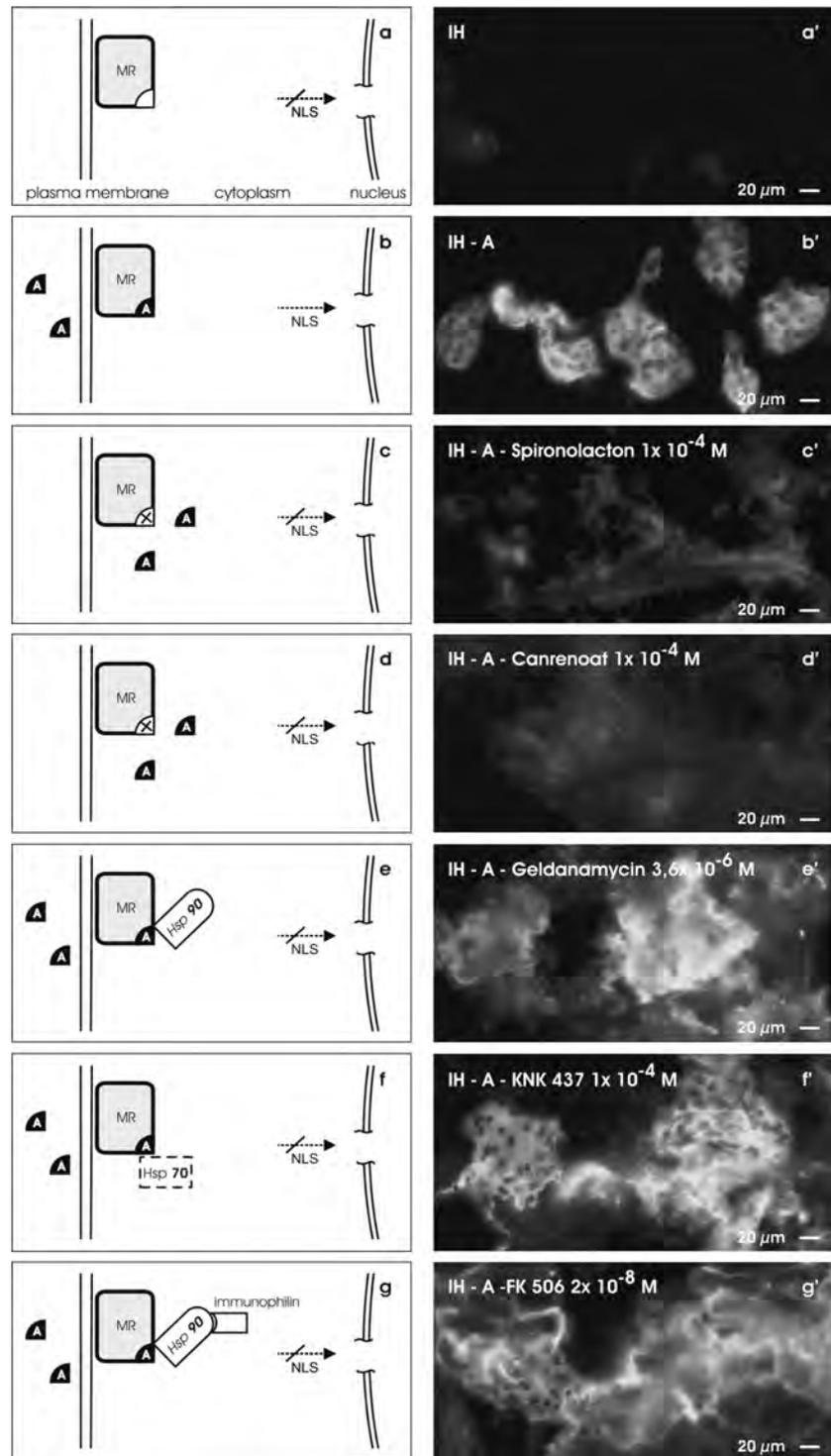


Abb. 2 a-g; a' - g': Schematische Darstellung der tubulogenen Aldosteronwirkung auf den Mineralokortikoidrezeptor und Interferenz mit benachbarten Molekülen (a - g). SBA-Markierung zeigt, dass ohne Aldosteron (a') keine Tubuli entstehen, während die Applikation von Aldosteron (b') zahlreiche Tubuli hervorbringt. Applikation von Spironolacton (c') oder Canrenoat (d') in Verbindung mit Aldosteron verhindert die Bildung von Tubuli. Inkubation mit Geldanamycin (e') oder Radicol zusammen mit Aldosteron verhindert die Bildung von Tubuli. Ebenso zeigt die Applikation von Quercetin oder KNK 437 (f) in Verbindung mit Aldosteron keine strukturierten Tubuli. Inkubation mit Cyclosporin A oder Rapamycin in Verbindung mit Aldosteron zeigt keinen Einfluss auf das tubulogene Signal. Dagegen hemmt FK 506 (g') in Verbindung mit Aldosteron die Entwicklung von Tubuli. Die Ergebnisse zeigen, dass das tubulogene Signal in Interaktion mit dem Mineralokortikoidrezeptor, dem Heat shock Protein 90, dem Heat shock Protein 70 und dem Immunophilin FKBP 12 vermittelt wird.

Die tubulogene Wirkung von Aldosteron ist abhängig von der eingesetzten Menge des Hormons und kann durch Antagonisten wie Spironolacton (Abb. 2c') oder Canrenoat (Abb. 2d') blockiert werden (15, 31). Ein tubulogener Effekt kann mit Dexamethason nicht ausgelöst werden, obwohl das Glukokortikoidhormon an den Aldosteronrezeptor bindet. Andere getestete Steroidhormone oder Vorstufen von Aldosteron zeigen ebenfalls keine tubulogene Wirkung.

Bislang gibt es keine gesicherten Informationen über die intrazelluläre Verarbeitung des durch Aldosteron ausgelösten tubulogenen Signals. Es gibt allerdings Hinweise dafür, dass der Mineralokortikoidrezeptor nicht zufällig im Zytoplasma vorkommt, sondern in engem molekularen Kontakt zu den Heat shock Proteinen 90 und 70 steht, die wiederum mit den Immunophilinen, speziell FKBP 12 benachbart sind (1, 26, 39). Um die molekularen Interaktionen bei der Freischaltung des tubulogenen Signals zu untersuchen, wurde Aldosteron zusammen mit Substanzen inkubiert, die zwischen MR, hsp 90, hsp 70 und den Immunophilinen interferieren.

Interferenz zwischen MR und Heat shock Protein 90:

Werden renale Stamm-/Progenitorzellen in IMDM mit Geldanamycin ($3,6 \times 10^{-6}$ M) in Kombination mit Aldosteron (1×10^{-7} M) für 13 Tage kultiviert (Abb. 2e'), so werden keine strukturierten Tubuli gebildet. Stattdessen sind zahlreiche SBA-markierte Zellen zu erkennen, die sich in Form von ausgedehnten und unstrukturierten Clustern zusammen gelagert haben. Gleiche Ergebnisse werden beobachtet, wenn die embryonalen Kulturen mit Radicol (1×10^{-6} M) in Kombination mit Aldosterone (1×10^{-7} M) kultiviert werden (keine Abbildung). Dies bedeutet, dass das Blockieren des molekularen Kontaktes zwischen MR und hsp 90 mit Geldanamycin oder Radicol die Bildung von Tubuli verhindert.

Interferenz zwischen MR und Heat shock Protein 70:

In dieser Serie von Experimenten wurde Quercetin (2×10^{-4} M) in Kombination mit Aldosteron (1×10^{-7} M) appliziert. Eine Entstehung von Tubuli konnte nicht beobachtet werden, dafür sind zahlreiche Zellcluster festzustellen (keine Abbildung). Gleiche Ergebnisse

wurden festgestellt, wenn KNK 437 (1×10^{-4} M) mit Aldosteron (1×10^{-7} M) inkubiert wurde (Abb. 2f'). Somit wird gezeigt, dass eine Unterbindung des molekularen Kontaktes zwischen MR und hsp 70 durch Quercetin und KNK 437 die Bildung von Tubuli blockiert.

Interferenz zwischen MR und Immunophilinen:

Wenn die Kulturen mit Cyclosporin A (2×10^{-6} M) in Kombination mit Aldosteron (1×10^{-7} M) inkubiert werden, so ist eine intensive Entwicklung von Tubuli festzustellen (keine Abbildung). Eine starke Entwicklung von Tubuli wurde auch beobachtet, wenn die Kulturen mit Rapamycin ($2,2 \times 10^{-9}$ M) in Kombination mit Aldosteron (1×10^{-7} M) inkubiert werden (keine Abbildung). Ein hemmender Effekt auf die Bildung von Tubuli ist nicht festzustellen, wenn eine Interferenz zwischen dem MR und Immunophilinen mit Cyclosporin A oder Rapamycin durchgeführt wird.

Im Gegensatz dazu zeigte die Applikation von FK 506 (2×10^{-8} M) zusammen mit Aldosteron (1×10^{-7} M) nur in sehr geringem Ausmaß SBA-markierte Tubuli, dafür sind zahlreiche und ausgedehnte Zellcluster zu erkennen (Abb. 2g'). Das Ergebnis zeigt, dass durch Interferenz mit dem FK 506-bindenden Protein (FKBP12) keine Weiterleitung des tubulogenen Signals erfolgt.

Diskussion

Die Experimente wurden durchgeführt, um erste Informationen zur molekularen Interaktion des durch Aldosteron ausgelösten tubulogenen Signals zu erhalten. Es ist davon auszugehen, dass die Aktivierung des Signals eingeleitet wird, wenn Aldosteron die kompetente Zelle erreicht, die Plasmamembran durchdringt und im Zytoplasma an den Mineralokortikoidrezeptor (MR) bindet.

An anderen Modellen wurde gezeigt, dass der MR im Zytoplasma in Abwesenheit von Aldosteron einen engen Kontakt zu Chaperonen wie hsp 90 und hsp 70 sowie zu Immunophilinen hat (7, 33, 34, 35). Der wohl engste Kontakt des Mineralokortikoidrezeptors besteht zwischen seiner Ligandenbindungsstelle und hsp 90 (Abb. 2e). Dabei stehen sich die ATP-Bindungsdomäne von hsp 90 und die Ligandenbindungs-

stelle von MR unmittelbar gegenüber. In engem Kontakt zum MR stehen ebenfalls hsp 70 (Abb. 2f) sowie Immunophiline, speziell FKBP 12 (Abb. 2g). Nach einer erfolgten Bindung von Aldosteron an den MR wird offensichtlich die Interaktion mit diesen Proteinen gelöst, infolgedessen kann das Nuclear localization signal (NLS) freigeschaltet und damit der aktivierte Rezeptor in den Zellkern gelangen.

Es war unbekannt, ob die Heat shock Proteine und Immunophiline auch in die Weitergabe des tubulogenen Signals involviert sind, welches durch Aldosteron in den renalen Stamm-/Progenitorzellen ausgelöst wird. Um dies herauszufinden, wurden Substanzen wie Geldanamycin, Radicol, Quercetin, KNK 437, Cyclosporin A, Rapamycin und FK 506 getestet, damit die molekularen Interaktionen zwischen dem MR, den benachbarten Chaperonen und Immunophilinen blockiert wurden.

Die Versuche zeigten, dass eine molekulare Interaktion zwischen dem Mineralokortikoidrezeptor und dem Heat shock Protein 90 mit Geldanamycin ($3,6 \times 10^{-6}$ M) das durch Aldosteron (1×10^{-7} M) ausgelöste tubulogene Signal unterbindet (Abb. 2e). In diesem Fall entwickeln sich keine Tubuli, sondern nur ausgedehnte Areale von Clustern mit SBA-markierten Zellen (Abb. 2e'). Eine Hemmung der Tubulusbildung wird ebenfalls erzielt, wenn Radicol (1×10^{-6} M) in Kombination mit Aldosteron (1×10^{-7} M) appliziert wird.

Unterbrechung des tubulogenen Signals auf der Ebene von hsp 70 mit Quercetin (2×10^{-4} M) oder KNK 437 (1×10^{-4} M, Abb. 2f) in Verbindung mit Aldosteron (1×10^{-7} M) zeigt nur zahlreiche SBA-markierte Zellen innerhalb von Clustern, aber keine Bildung von strukturierten Tubuli (Abb. 2f').

Interferenz des tubulogenen Signals auf der Ebene mit Immunophilinen führt zu widersprüchlichen Ergebnissen. Experimente mit Cyclosporin A (2×10^{-6} M) in Kombination mit Aldosteron (1×10^{-7} M) zeigt die Entwicklung von zahlreichen SBA-markierten Tubuli. Ebenso führte die Inkubation von Rapamycin ($2,2 \times 10^{-9}$ M) in Verbindung mit Aldosteron (1×10^{-7} M) zur Bildung von zahlreichen SBA-markierten Tubuli. Im Gegensatz dazu zeigen die Experimente, dass eine Inkubation von FK 506 (2×10^{-8} M) in Verbindung mit Aldosteron (1×10^{-7} M) umfangreiche Zellcluster entstehen lässt und nur zu

einer minimalen Menge an Tubuli führt (Abb. 2g').

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass der durch Aldosteron aktivierte MR und das daraus resultierende tubulogene Signal mit Geldanamycin, Radicicol, Quercetin, KNK 437 und FK 506, nicht aber durch Cyclosporin A und Rapamycin unterbrochen werden kann. Dies bedeutet, dass die topologische Orientierung von Heat shock Protein 90, Heat shock Protein 70 und dem Immunophilin FKBP 12 von essentieller Bedeutung für die tubulogene Entwicklung ist, die durch Aldosteron ausgelöst wird.

Literatur

- Bamberger CM, Wald M, Bamberger A, Schulte HM (1997) Inhibition of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor function by the heat shock protein 90-binding agent geldanamycin. *Mol Cell Endocrinol* 131: 233-240
- Bisceglia M, Galliani CA, Senger C, Stallone C, Sessa A (2006) Renal cystic disease: a review. *Adv Anat Pathol* 13 (1): 26-56
- Braam B, Verhaar MC, Blankestijn P, Boer WH, Joles JA (2007) Technology insight: innovative options for end-stage renal disease – from kidney refurbishment to artificial kidney. *Nat Clin Pract Nephrol* 3 (10): 564-572
- Bussolati B, Camussi G (2007) Stem cells in acute kidney injury. *Contrib Nephrol* 156: 250-258
- Callaghan CJ, Bradley JA (2006) Current status of renal transplantation. *Methods Mol Biol* 331: 1-28
- Costantini F, Shakya R (2006) GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays* 28: 117-127
- Cox MB, Riggs DL, Hessling M, Schuhmacher F, Buchner J, Smith DF (2007) FK506-binding protein 52 phosphorylation: a potential mechanism for regulating steroid hormone receptor activity. *Mol Endocrinol* 21: 2956-67
- Davies JA (2002) Morphogenesis of the metanephric kidney. *Scientific World Journal* 2: 1937-1950
- Dekel B, Reisner Y (2004) Embryonic committed stem cells as a solution to kidney donor shortage. *Expert Opin Biol Ther* 4: 443-454
- Dressler G (2002) Tubulogenesis in the developing mammalian kidney. *Trends Cell Biol* 12: 390-395
- Hammerman MR (2004) Treatment for end-stage renal disease: an organogenesis/tissue engineering odyssey. *Transpl Immunol* 12: 211-218
- Hammerman MR (2004) Organogenesis of kidneys following transplantation of renal progenitor cells. *Transpl Immunol* 12: 229-239
- Hammerman MR (2006) Cellular therapies for kidney failure. *Expert Opin Biol Ther* 6: 87-97
- Han HJ, Sigurdson WJ, Nickerson PA, Taub M (2004) Both mitogen activated protein kinase and the mammalian target of rapamycin modulate the development of functional renal proximal tubules in matrigel. *J Cell Sci* 117: 1821-1833
- Heber S, Denk L, Minuth WW (2007) Modulating the development of renale tubules growing in serum-free culture medium at an artificial interstitium. *Tissue Eng* 13: 281-291
- Hellman NE, Greco AJ, Rogers KK, Kancharar C, Balkovetz DF, Lipschutz JH (2005) 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* 289: F777-785
- Hogan BLM, Kolodziej PA (2002) Molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nature Reviews* 3: 513-523
- Hu K, Denk L, de Vries U, Minuth WW (2007) Chemically defined medium environment for the development of renal stem cells into tubules. *Bio-technol J* 2: 992-995
- Inoue CN, Sunagawa N, Morimoto T, Ohnuma S, Katsushima F, Nishio T, Kondo Y, Inuma K (2003) 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* 39 (8-9): 364-7
- Karihaloo A, Nickel C, Cantley LG (2005) Signals which build a tubule. *Nephron Exp Nephrol* 100: e40-45
- Koh CJ, Atala A (2004) Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol* 15: 1113-1125
- Little MH (2006) Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney. *J Am Soc Nephrol* 17: 2390-2401
- Lubarsky B, Krasnow MA (2003) Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes. *Cell* 112: 19-28
- Maeshima A, Sakurai H, Nigam SK (2006) Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney. *J Am Soc Nephrol* 17: 188-98
- Mansilla E, Drago H, Sturla, F, Bossi S, Salas E, Marin GH, Ibar R, Soratti C (2007) Matrix super-highways configurations: new concepts for complex organ regeneration. *Transplant Proc* 39 (7): 2431-2433
- Manwell LA, Heikkila JJ (2007) Examination of KNK437-and quercetin-mediated inhibition of heat shock protein gene expression in *Xenopus laevis* cultured cells. *Comp Biochem Physiol. A Mol Integr Phy* 148 (3): 521-530
- McTaggart SJ, Atkinson K (2007) Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrology* 12: 44-49
- Meyer TN SC, Bush KT, Stuart RO, Rose DW, Shah MM VD, Steer DL, Nigam SK (2004) 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* 275: 44-67
- Minuth WW, Sorokin L, Schumacher K (2004) Generation of renal tubules at the interface of an artificial interstitium. *Cell Physiol Biochem* 14: 387-394
- Minuth WW, Denk L, Heber S (2005) Growth of embryonic renal parenchyme at the interphase of a polyester artificial interstitium. *Biomaterials* 26: 6588-6598
- Minuth WW, Denk L, Hu K (2007) The role of polyester interstitium and aldosterone during structural development of renal tubules in serum-free medium. *Biomaterials* 28: 4418-4428
- Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B (2006) The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. *Cell Transplant* 15 (1): S111-7
- Onuoha SC, Mukund SR, Coulstock ET, Sengerova B, McLaughlin SH, Jackson SE (2007) Mechanistic studies on Hsp90 inhibition by ansamycin derivatives. *J Mol Bio* 372: 287-297
- Phillips JJ, Yao ZP, Zhang W, McLaughlin S, Laue ED, Robinson CV, Jackson SE (2007) Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90 in complexes with a co-chaperone and anticancer drugs. *J Mol Bio* 537: 1189-1203
- Pratt WB, Galigiana, MD, Harrell JM, DeFranco DB (2004) Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in the signaling protein movement. *Cellular Signalling* 16: 857-872
- Sariola H (2002) Nephron induction. *Nephrol Dial Transplant* 17 (9): 88-90
- Schiff H (2006) Dosing pattern of renal replacement therapy in acute renal failure: current status and future directions. *Eur J Med Res* 11 (4): 178-82
- Steenhard BM, Isom KS, Cazarro P, Dunmore JH, Godwin AR, St John PL, Abrahamson DR (2005) Integration of embryonic stem cells in metanephric kidney organ culture. *J Am Soc Nephrol* 16: 1623-1631
- Tomiya T, Yamaoka Y, Nishikawa T, Yanase M, Ikeda H, Tejima K, Nagashima K, Watanabe N, Omata M, Fujiwara K (2007) Effect of rapamycin on hepatocyte function and proliferation induced by growth factors. *Chemotherapy* 53: 59-69
- Vigneau C, Zheng F, Polgar K, Wilson PD, Striker G (2006) Stem cells and kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15: 238-244
- Vigneau C, Polgar K, Striker G, Elliott J, Hyink D, Weber O, Fehling HJ, Keller G, Burrow C, Wilson P (2007) Mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies generate progenitors that integrate long term into renal proximal tubules in vivo. *J Am Soc Nephrol* 18: 1709-1720

Prof. Dr. Will W. Minuth
Institut für Zelluläre und Molekulare
Anatomie
Universität Regensburg
Universitätsstr. 31
93053 Regensburg
will.minuth@vkl.uni-regensburg.de