

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**“On-a-Chip”-Modell eines humanen renalen Progenitorzell-
basierten Tubulus zur Untersuchung von Immunzellmigration nach
zellulärer Schädigung *in vitro***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Gregor Johannes Wilken

aus
Hamburg

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Dr. Martha Merrow

Drittes Gutachten Prof. Dr. Clemens Cohen

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2025

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen:

Marschner, J. A., Martin, L., Wilken, G., Melica, M. E., & Anders, H. J. (2023). A "Kidney-on-the-Chip" Model Composed of Primary Human Tubular, Endothelial, and White Blood Cells. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2664, 107–121.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3179-9_8

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	6
ABSTRACT.....	7
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	9
TABELLENVERZEICHNIS.....	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
EINHEITENVERZEICHNIS.....	12
1 EINLEITUNG	13
1.1 ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DER NIERE.....	13
1.2 NIERENPATHOLOGIEN UND NEPHROTOXIZITÄT	14
1.3 MODELLE IN DER ZELLKULTUR	18
1.4 RENALE ZELLEN UND ZELLINNEN IN DER ZELLKULTUR	21
1.5 RATIONALE FÜR DIE ENTWICKLUNG NEUER NIERENMODELLE IN DER ZELLKULTUR	24
1.6 ZIELSETZUNG UND HYPOTHESE DER ARBEIT.....	25
2 MATERIAL.....	26
2.1 ZELLKULTURMETHODEN	26
2.2 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	26
2.3 FÄRBUNGEN	27
2.4 GERÄTE	28
2.5 SOFTWARE.....	28
3 METHODEN	29
3.1 ZELLKULTUR	29
3.2 DIE ORGANOPLATE®-3 LANE	32
3.3 IMMUNZELLMIGRATION „ON-THE-CHIP“	38
3.4 FÄRBUNGEN	41
3.5 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	45
4 ERGEBNISSE.....	48
4.1 WACHSTUMSMUSTER VON HRPCs IN ABHÄNGIGKEIT VON KOLLAGEN-I UND FLUIDER SCHERKRAFT	48
4.2 IMMUNFLUORESENZFÄRBUNG IN DER ORGANOPLATE® UND UNTER HERKÖMMLICHEN ZELLKULTURBEDINGUNGEN	49
4.3 BARRIEREFUNKTIONSMESSUNG: KINETIK UND PARAMETERETABLIERUNG	52
4.4 CHARAKTERISIERUNG DES HRPC-TUBULUS	54
4.4.1 CHARAKTERISIERUNG DES HRPC-TUBULUS IN DER ORGANOPLATE®	54
4.4.2 CHARAKTERISIERUNG HRPC-BASIERTER TUBULI IN DER ORGANOPLATE® UNTER PRIMÄRHARNBEDINGUNGEN (PROTEINRESTRIKTION)	58
4.4.3 BARRIEREFUNKTION HRPC-BASIERTER TUBULI UNTER TOXINEXPOSITION.....	59
4.5 BARRIEREINTEGRITÄTSMESSUNG AN GLOMERULÄREN ENDOTHELIALEN ZELLEN (GENC) MIT FITC- DEXTRAN UND FITC-SINISTRIN.....	61
4.6 CALCEINFÄRBUNG.....	62
4.7 IMMUNZELLMIGRATION „ON-THE-CHIP“	63
4.7.1 RATIONALE UND HYPOTHESE	63
4.7.2 MIGRATION IM CHIP – PROTOKOLLETABLIERUNG UND ÜBERSICHT	64
4.7.3 EINFLUSS VERSCHIEDENER KOLLAGENKONZENTRATIONEN AUF DIE MIGRATION	64
4.7.4 MIGRATIONSFÄHIGKEIT DER VERSCHIEDENEN LEUKOZYTENFRAKTIONEN UNTER STATISCHEN BEDINGUNGEN	65
4.7.5 MIGRATIONSFÄHIGKEIT DER PBMCs UNTER FLUIDEN UND STATISCHEN BEDINGUNGEN	66
4.7.6 SCHÄDIGUNGSBASIERTES MIGRATIONSMODELL UND DOSIS-WIRKUNGSBEZIEHUNG	67

5 DISKUSSION	70
5.1 ZIELSETZUNG UND HYPOTHESEN.....	70
5.1.1 HUMANE RENALE PROGENITORZELLEN ZEIGEN EIN WACHSTUMSMUSTER ALS ZELLRASEN ODER ALS SPHÄROIDE MIT UNTERSCHIEDLICHER METABOLISCHER AKTIVITÄT.....	70
5.1.2 HRPCS BILDEN IN DER ORGANOPLATE® EINEN 3-DIMENSIONALEN, KONFLUENTEN TUBULUS (1).....	71
5.1.3 DER HRPC-TUBULUS ZEIGT EINE STABILE VIABILITÄT UND BARRIEREFUNKTION (2A) ÜBER 9 TAGE UND KANN ALS GRUNDLAGE FÜR LANGZEITUNTERSUCHUNGEN DIENEN (2B).....	71
5.1.4 DER HRPC-TUBULUS ZEIGT IN BEZUG AUF DIE MARKERPROTEINE F-AKTIN, NA+-K+-ATPASE UND ZO-1 IM VERGLEICH ZU HRPCS IN HERKÖMMLICHEN 2D-PLATTFORMEN KEINE PHÄNOTYPISCHEN UNTERSCHIEDE (3)	72
5.1.5 DER HRPC-TUBULUS EXPRIMIERT MDR1 UND KÖNNTE ALS PLATTFORM FÜR TOXIZITÄTSSTUDIEN DIENEN (4)	74
5.1.6 DIE DIFFUSION DES INDIKATORS FITC-DEXTRAN ZUR BARRIEREFUNKTIONSMESSUNG DES HRPC-TUBULUS ZEIGT EINE SIGMOIDALE KINETIK.....	74
5.1.7 DAS AUSMAß EINER HISTON-INDUIZIERTEN SCHÄDIGUNG DES HRPC-TUBULUS KORRELIERT MIT DER ANZAHL MIGRIERENDER PRIMÄRER HUMANER PBMCs (5)	75
5.2 LIMITATIONEN DER ARBEIT.....	78
6 ZUSAMMENFASSUNG	80
LITERATURVERZEICHNIS	81
ANHANG	91
DANKSAGUNG.....	93
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	94

Zusammenfassung

In der Grundlagen- und translationalen Forschung besteht ein Mangel an Modellen mit guter *in vitro*- zu *in vivo*-Extrapolation (IVIVE). Dieser wird durch herkömmliche Zellkulturmodelle nicht ausreichend adressiert. Ursächlich hierfür ist einerseits ein aberranter Phänotyp kultivierter Zellen unter statischen, 2D-Zellkulturbedingungen. Hierbei kommt es zum Verlust der *in vivo* getreuen Polarisation und Funktion der Zellen. Andererseits ist eine normale Gewebestruktur mit 3D-Organisation, Perfusion und physiologischer Interaktion verschiedener Kompartimente (z.B. Organparenchym, Gefäße und extrazellulärer Matrix) mit herkömmlichen *in vitro*-Methoden nicht realisierbar.

Ein weiterer Grund mangelhafter IVIVE ist die weithin verbreitete Anwendung immortalisierter Zelllinien sowie nicht-humaner Zellen. Deren Verwendung leitet sich neben der einfachen Handhabung vor allem daraus ab, dass die Gewinnung primärer humaner Zellen oftmals sehr aufwändig ist. In der Nephrologie war dies lange Zeit nur über eine invasive operative Prozedur möglich. Dies hat sich mit der Möglichkeit, humane renale Progenitorzellen (engl.: human renal progenitor cells; hRPCs) aus dem Urin zu extrahieren, wesentlich geändert.

In der Forschung sowie in der medizinischen Praxis werden personalisierte diagnostische und therapeutische Ansätze immer wichtiger. Vor diesen Hintergründen sollte im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung und Charakterisierung eines mikrofluiden, 3-dimensionalen Modells eines renalen Tubulus erfolgen. Ferner war es das Ziel, Immunzellextravasation und Chemotaxis als Antwort auf eine akute Tubulusschädigung zu modellieren (Modell einer sterilen Inflammation). Hierbei sollten ausschließlich primäre humane Zellen verwendet werden, um neben den Zellkulturbedingungen auch über die Zellen selbst die bestmögliche IVIVE zu erzielen.

Zu diesem Zweck wurde die „Organ-on-a-Chip“-Zellkulturplattform OrganoPlate® 3-lane (Mimetas, Leiden) in Kombination mit primären hRPCs und primären humanen Leukozyten genutzt. Die Charakterisierung erfolgte mittels verschiedener *in vitro* Methoden.

Unter bidirektionaler Perfusion (entspr. einer mittleren apikalen Scherkraft von 0,13 dyn/cm²) bildeten 15.000 hRPCs nach drei Tagen einen konfluenten 3D-Tubulus. Dieser zeigte eine stabile Viabilität bei zunehmender Barrierefunktion über den Zeitraum von neun Tagen. Hierbei implizierten die ermittelten Daten eine über diesen Zeitraum hinaus gehende Viabilität des hRPC-Tubulus. An hRPCs konnten keine quantifizierbaren Unterschiede in der Expression von F-Aktin, Na⁺-K⁺-ATPase und ZO-1 unter herkömmlichen und 3-dimensionalen, mikrofluiden Zellkulturbedingungen gezeigt werden. Im Ggs. dazu zeigen differenzierte renale Zellen in Abhängigkeit von Scherkraft (engl.: „fluid shear stress“; FSS) und 3D-Formation eine unterschiedliche Expression dieser Marker. Diese Ergebnisse deuten an, dass undifferenzierte hRPCs weniger auf FSS reagieren als differenzierte Tubuluszellen. FSS scheint somit als singulärer Stimulus nicht ausreichend um eine hRPC-Differenzierung zu induzieren. Es erfolgte die Messung der epithelialen Barrierefunktion von hRPC-Tubuli anhand der Diffusion von Fluoreszein-markiertem Dextran. Durch Schädigung mittels verschiedener Toxine (Cisplatin, Aristolochiasäure, Histone) wurde gezeigt, dass die Barrierefunktion als Parameter

in Toxizitätsstudien dienen könnte. Ferner wurde die Expression und Funktionalität des Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR-1) mittels Calcein-Färbung +/- MDR-1-Inhibitor im hRPC-Tubulus gezeigt. Dies illustriert eine potentielle Nutzbarkeit des Modells im Rahmen von Interaktionsstudien (engl.: „Drug-Drug-Interaction“, DDI). Abschließend konnte nach Histon-induzierter Schädigung des hRPC-Tubulus die Migration primärer humaner Leukozyten induziert werden. Diese migrierten hierbei, dem chemotaktischen Gradienten der Zellschädigung folgend, aus einem perfundierten Kanal in die Kollagen-I-Matrix in Richtung des hRPC-Tubulus. Hierbei zeigte sich eine Zunahme der Anzahl migrierender Lymphozyten in Abhängigkeit vom Ausmaß des Tubulusschadens.

Die Ergebnisse dieser Modelletablierungsarbeit zeigen, dass die Organ-on-a-Chip-Technologie in Kombination mit primären humanen Zellen ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der IVIVE ist. Gerade in dem Bereich präklinischer Toxizitäts- und DDI-Studien sowie im rasant wachsenden Feld der personalisierten Medizin ergeben sich hierdurch neue Möglichkeiten. Aufgrund des verbesserten räumlichen und physiko-mechanischen Mikromilieus ermöglicht die Organ-on-a-Chip-Technologie hochkomplexe Ko-Kulturen sowie Langzeitkulturen. Dies kann einen wertvollen Beitrag in der Grundlagen- und translationalen Forschung leisten. Des Weiteren kann so ein signifikanter Beitrag zur Reduktion von Tierversuchen geleistet werden. Die Sinnhaftigkeit solcher Ansätze hat mit dem 3R-Prinzip („Replace-Reduce-Refine“) der EU-Richtlinie „zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“ auch einen rechtlichen Rahmen gefunden.

Abstract

In basic and translational research, there is a lack of models with good *in vitro* to *in vivo* extrapolation (IVIVE). This need is not sufficiently addressed by conventional cell culture models. One reason for this is an aberrant phenotype of cultured cells with loss of *in vivo* polarization and function under static 2D conditions. On the other hand, a normal tissue structure with 3D organization, perfusion, and physiological interaction of different compartments (e.g. organ parenchyma, vessels and extracellular matrix) cannot be generated with conventional *in vitro* methods.

Another reason for inadequate IVIVE is the widespread use of immortalized cell lines and non-human cells. Their vast use is mainly due to their simple handling and the reduced availability and complex isolation of primary human cells. In the field of Nephrology the isolation of primary cells was for a long time only possible through invasive interventions. This has changed significantly with the possibility of extracting human renal progenitor cells (hRPCs) from urine.

Personalized diagnostic and therapeutic approaches are becoming increasingly important in research and medical practice. Thus, the aim of this work was to establish and characterize a microfluidic, 3-dimensional model of a renal tubule. A further aim was to establish a model of acute tubular damage with consecutive immune cell extravasation and chemotaxis through an extracellular matrix. Only primary human cells were to be used to achieve the best possible IVIVE.

For this purpose, the “organ-on-a-chip” cell culture platform OrganoPlate® 3-lane (Mimetas, Leiden) was used in combination with primary hRPCs and primary human leukocytes. Characterization was performed using various *in vitro* methods.

Under bidirectional perfusion with a resulting mean apical shear stress of 0.13 dyn/cm², 15,000 hRPCs formed a confluent 3D tubule after three days. This showed stable viability with increasing barrier function over the period of nine days, whereby the data obtained implied a viability of the hRPC tubule extending beyond this period. Interestingly, hRPCs showed no significant differences in the expression of F-actin, Na+-K+-ATPase and ZO-1 under 3-dimensional microfluidic cell culture conditions compared to conventional 2D cell culture conditions. While differentiated renal cells show a marked change in these markers in response to shear stress and 3D formation, this implied that hRPCs may require additional biological factors for differentiation. Dextran-based measurements of the epithelial barrier function of hRPC tubules after damage by various toxins (cisplatin, aristolochic acid, histones) indicated that barrier function could serve as a parameter in toxicity studies. Furthermore, the expression and functionality of Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR-1) was shown by calcein staining +/- MDR-1 inhibitor in the hRPC tubule. This illustrated the usefulness of the model in the context of drug-drug interaction (DDI) studies. Finally, after histone-induced damage to the hRPC tubule, the migration of primary human leukocytes from a perfused compartment into the collagen I matrix towards the site of damage was demonstrated (in the sense of initiation of sterile inflammation). An increase in the number of migrating lymphocytes depending on the extent of tubular damage.

The results of this model establishment work show that organ-on-a-chip technology in combination with primary human cells could be a promising approach for improving IVIVE. Especially in the field of preclinical studies on toxicity and DDI as well as in the rapidly growing field of personalized medicine, this paves the way for new possibilities. With the help of improved spatial and physico-mechanical microenvironments, the organ-on-a-chip technology enables highly complex co-cultures as long-term cultures. This can make a valuable contribution to basic and translational research. Furthermore, a significant contribution to the reduction of animal experiments could be made, which has also found a legal framework with the 3R principle (“Replace-Reduce-Refine”) of the EU Directive “on the protection of animals used for scientific purposes” implemented in 2010.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Niere.....	16
Abbildung 2: Komponenten des Immunsystems	18
Abbildung 3: Schemazeichnung OrganoPlate® 3-lane 40, Mimetas.....	32
Abbildung 4: Schemazeichnung OrganoPlate® und Matrix.....	33
Abbildung 5: Zellimplementation in die OrganoPlate®	34
Abbildung 6: Schemazeichnung Tubulusformation in der OrganoPlate®	35
Abbildung 7: Datenaufbereitung der Barrierefunktionsmessung.....	37
Abbildung 8: Herstellung einer Lockstofflösung <i>in vitro</i>	39
Abbildung 9: Versuchsablauf der Migrationsinduktion im Chip	40
Abbildung 10: Datenaufbereitung Zellmigration	41
Abbildung 11: Calcein-Färbung	42
Abbildung 12: Pipettierschema 1	43
Abbildung 13: Pipettierschema 2	44
Abbildung 14: Wachstumsmuster von hRPCs in Abhängigkeit von Kollagen und Perfusion	48
Abbildung 15: Metabolische Aktivität von hRPCs auf beschichteten (Kollagen I) und unbeschichteten Wells	49
Abbildung 16: Immunfluoreszenz an hRPC-Tubuli.....	52
Abbildung 17: Repräsentative lichtmikroskopische Bilder eines hRPC-Tubulus über 9 Tage.....	55
Abbildung 18: Konfokalmikroskopisches Bild eines hRPC-Tubulus	56
Abbildung 19: Barrierefunktion von hRPC-Tubuli über 9 Tage	57
Abbildung 20: Metabolische Aktivität und LDH-Freisetzung von hRPC-Tubuli über 9 Tage	57
Abbildung 21: Barrierefunktion unter Standard- (hRPC-Medium) und Primärharnbedingung (Ringerlaktatlösung).....	59
Abbildung 22: Metabolische Aktivität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung unter Standardbedingungen (hRPC-Medium) und Primärharnbedingungen (Ringerlaktatlösung).....	59
Abbildung 23: Barriereintegrität des hRPC-Tubulus nach Toxinexposition	61
Abbildung 24: Barrierefunktion von glomerulären endothelialen Zellen (GEnC) in Bezug auf FITC-Dextran (schwarz) und FITC-Sinistrin (blau)	62
Abbildung 25: Calcein-Färbung mit/ohne MDR-1-Inhibitor	63
Abbildung 26: Mechanische Stabilität der EZM in Abhängigkeit von der Kollagen-I-Konzentration	65
Abbildung 27: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen matrixinvasiver Leukozyten nach Stimulation mit LSL	66
Abbildung 28: Anzahl migrierter Leukozyten nach Etablierung eines chemotaktischen Gradienten mittels	66
Abbildung 29: Migration unter statischen und fluiden Bedingungen	67
Abbildung 30: Schädigung eines hRPC-Tubulus <i>in vitro</i> mit konsekutiver gerichteter PBMC-Migration	68
Abbildung 31: Graphische Darstellung der Anzahl migrierter PBMCs in Abhängigkeit von der Toxinexposition des	69
Abbildung 32: Apparente Permeabilität	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einheitenverzeichnis	12
Tabelle 2: Charakteristika verwendeter BIA-Indikatoren	36
Tabelle 3: Charakteristika des Farbstoffes Acridin-Orange.....	42
Tabelle 4: FITC-Dextran-Diffusionskinetik in hRPC-Tubuli.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tabelle 5: Datengrundlage Migrationsinduktion und Dosis-Wirkung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständiger Name
AA	Engl. Aristolochic Acid
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	Adenosintriphosphate-binding-cassette transporters
AIC	Aikaike Information Criterion
AICc	Aikaikes Information Criterion corrected for small sample size
AKI	Acute kidney injury

AO	Acridin-Orange
AQP1	Aquaporin 1
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BIA	Barrier integrity assay
biol.	Biologisch
BL	Blockierlösung
Bml-1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
bp	Base pair
BSA	Bovine Serum Albumin
Caco-2	Cancer coli ("colon cancer") (Zelllinie)
Calcein-AM	Calcein-O,O'-diacetate-tetrakis-(acetoxyethyl)-ester
CD	Cluster of differentiation
CDH1	Cadherin-1
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic acid
CisP	Cisplatin
cTEC	conditionally immortalized renal tubular epithelial cells
CKD	Chronic kidney disease
DAMP	Damage /Danger associated molecular pattern
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Double distilled water
DDI	Drug-drug interaction
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleosidetriphosphate
D-PBS	Dulbecco's Phosphate-buffered saline
dsDNA	Double strand Desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EBM	Endothelial Basal Medium
ECGSH/H	Endothelial Cell Growth Supplement / Heparin
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGM-MV	endothelial growth medium-microvascular
EMA	European Medicines Agency
EZM / ECM	Extrazelluläre Matrix / engl.: extracellular matrix
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSS	Fluid shear stress
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GEnC	Glomerular Endothelial Cell
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
gGT	gamma-Glutamyl Transferase
GIMP	GNU Image Manipulation Program
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HC	Hydrocortisone
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
hEGF	human Epidermal Growth Factor
HEK293	Human Embryonic Kidney Cellline 293
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
hFGF	human Fibroblast Growth Factor
Hist	Histone
HK2	Human Kidney 2 (Zelllinie)
HMGB1	High-mobility group box 1
hPSC	human pluripotent stem cell
hRPC	Human renal progenitor cell
hRPTEC	human renal proximal tubular epithelial cells
HWZ	Halbwertszeit
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
IF	Immunfluoreszenz

IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
iPSC	Induced pluripotent stem cell
ITSS	Insulin transferrin-sodium selenite supplement
IVIVE	<i>in vitro</i> zu <i>in vivo</i> Extrapolation
KCl	Kaliumchlorid
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
LDH	Laktatdehydrogenase
LLC-PK1	Lilly Laboratories cell, porcine kidney 1 (Zelllinie)
LSL	Lockstofflösung
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (Zelllinie)
MDR1	Multidrug-Resistance-Protein 1 (syn.: p-Glykoprotein "P-gp")
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mPTC	murine proximal tubular cell
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (NAD ⁺ : oxidierte Form / NADH+H ⁺ : reduzierte Form)
(NAD ⁺ /NADH+H ⁺)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP ⁺ oxidierte Form / NADPH+H ⁺ : reduzierte Form)
NADP	
(NADP ⁺ /NADPH+H ⁺)	
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCBI	National Center for Biotechnology
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGAL	Neutrophilen-Gelatinase-assoziertes Lipocalin
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher 3
NLR	NOD-like receptor
NLRP3	NOD-like Rezeptor Protein 3
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
OAT	Organic anion transporter
OCT	Organic cation transporter
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
OK/MK/UK	Oberer Kanal / Mittlerer Kanal / Unterer Kanal
OoC	Organ on a Chip
OW	Observationwindow
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
Pax-2	Paired box 2
PBMC	peripheral blood mononucleated cells
PCR	Polymerase chain reaction
PDMS	Polydimethylsiloxan
PGE1	Prostaglandin E1
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMN	polymorph nucleated cells
PP	Permeabilisationspuffer
PRR	Pattern recognition receptor
PTC (hPTC / mPTC)	Proximal tubular cell (human / murine)
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
Repl	Replikat
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RPTEC/TERT1	Renal proximal tubular cell / Telomerase reverse transcriptase 1 (Zelllinie)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SD	Standard deviation
SGLT2	Sodium glucose linked transporter 2
SLC	solute carriers

T3/T4	Triiodthyronin (3,3',5-Triiod-L-thyronin) / Tetraiodthyronin (L-Thyroxin / 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin)
Tab.	Tabelle
techn.	Technisch
TJ	Tight junction
TLR	Toll-like receptor
Tm	Temperature melting
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
V-ATPase	Vacuolar-Adenosintriphosphatase
VCAM	vascular cell adhesion molecule
WBC	White blood cell
WL	Waschlösung
ZO-1	Zonula occludens 1

Einheitenverzeichnis

Symbol	Name	Definition in SI-Einheit	Größe
kg	Kilogramm		Masse
mol	Mol		Stoffmenge
s	Sekunde		Zeit
°C	Grad Celsius		Temperatur
Da	Dalton		Atomare Masseneinheit
g	Gravitationskraft		Beschleunigung
min	Minute	60 s	Zeit
h	Stunde	3600 s	Zeit
rpm	rounds per minute	60rpm = 1/s	x/s
l	Liter	0,001m ³	Volumen

Tabelle 1: Einheitenverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Niere

Die Nieren liegen als paarige Organe im Retroperitoneum auf Höhe der 11.-12. Rippe. Die makroskopisch differenzierbaren Abschnitte aus Rinde (Cortex), Mark (Medulla), Kelchen (Calices renales) und Nierenbecken (Pelvis renalis) zeigen hierbei ein sowohl mikroskopisches als auch funktionell unterscheidbares Korrelat (s. Abb. 1). Die Blutversorgung erfolgt im arteriellen Schenkel ausgehend von der Aorta abdominalis über die Aa. renales. Diese münden in der ebenfalls arteriellen Funktionseinheit aus Vas afferens, Glomerulumkapillaren und Vas efferens. Das kapilläre System im Kortex sowie den peritubulären Vasa recta im Mark ist eng mit den Prozessen aus Absorption und Urinkonzentration der Nieren verbunden. Venös rezirkuliert das Blut über die Vv. renales in die V. cava inferior. Im Kortex wird an der glomerulären Filtrationsbarriere, bestehend aus den Glomerulumkapillaren, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten (inneres Blatt der Bowmankapsel), der Primärharn als Ultrafiltrat des Blutes generiert. Dieser nimmt den Weg über das Nephron, welches die zentrale funktionelle Einheit der Niere darstellt. Das Nephron besteht aus Glomerulum und dem Tubulussystem. Der weitere Weg führt über die Calices und das Pelvis renalis mit anschließender Ausscheidung über das ableitende Harnwegssystem (Ureter, Blase, Urethra). Im Tubulussystem wird der Primärharn, welcher in seiner Zusammensetzung weitgehend dem proteindepletierten Plasma entspricht, über Filtration, Sekretion, Reabsorption und metabolische Modifikationen zum Endharn aufbereitet. Während das Glomerulum des Nephrons ausschließlich im Kortex zu finden ist, bildet das Tubulussystem sowohl Anteile der Rinde wie auch des Markes. Der proximale Tubulus, welcher sich an das parietale Blatt der Bowmankapsel anschließt, befindet sich mit seiner Pars convoluta im Kortex und mit seiner Pars recta im Mark. Die Pars recta bildet zugleich den Anfangsteil der „Henle’schen Schleife“. Diese besteht aus einer proximalen Pars recta, dem dünnen absteigenden und aufsteigenden Schenkel sowie der Pars recta des distalen Tubulus. An diesen schließt sich wiederum eine Pars convoluta an. Über einen Verbindungstubulus und das Sammelrohr geht das Tubulussystem in die Nierenkelche über.

Die Nieren werden mit ca. 20% des Herzzeitvolumens (entsprechend ca. 1l/min) perfundiert. Diese hohe Perfusion ermöglicht eine kontinuierliche Kontrolle des Blutes auf seine Zusammensetzung hin und ermöglicht eine schnelle und feine Regulation derselben mit Auswirkungen auf den gesamten Körper. Über Exkretion, Retention und hormonelle Mechanismen greift die Niere regulierend in viele systemische Körperfunktionen ein. Neben einer ausgeglichenen Wasserbilanz reguliert die Niere den Elektrolythaushalt, Blutdruck, Knochenstoffwechsel, die Erythropoese sowie den Säure-Base-Haushalt. Aus diesem Grund gehen Nierenpathologien mit umfassenden Störungen der Körperhomöostase einher (Webster et al., 2017)

1.2 Nierenpathologien und Nephrotoxizität

1.2.1 Systematik der Nierenerkrankungen

Die systematische Klassifikation von Erkrankungen der Niere ist vielfältig und uneinheitlich. Ursächlich hierfür ist der Umstand, dass die Erkrankungen oftmals nicht gänzlich einer Kategorie zuzuordnen sind, bzw. vollständig durch diese erfasst werden. Nach dem Ort der Schädigung lassen sich glomeruläre von tubulo-interstitiellen Erkrankungen unterscheiden. Des Weiteren werden Erkrankungen, welche sich primär in der Niere manifestieren von Nierenschädigungen im Rahmen von Systemerkrankungen unterschieden. Ferner bestehen die Entitäten der Nierentumore und Nephrolithiasis. Eine wichtige Einteilung erfolgt anhand des klinischen Bildes. Hier unterscheidet man unter Anderem das nephrotische und nephritische Syndrom, die isolierte Proteinurie oder Hämaturie sowie die akute (engl.: acute kidney injury; AKI) und chronische (engl.: chronic kidney disease; CKD) Nierenschädigung. Zu bemerken ist, dass in keiner der genannten Einteilungen anhand ätiologischer Faktoren klassifiziert wird.

1.2.2 Akute und chronische Nierenerkrankung (AKI und CKD)

Besondere Relevanz im klinischen Alltag hat die Einteilung nach akuter und chronischer Nierenfunktionsalteration (engl. „acute kidney injury“ AKI, „chronic kidney disease“ CKD). Während nach KDIGO (engl.: Kidney Disease Improving Global Outcomes) AKI durch eine akut auftretende potenziell reversible Nierenfunktionsminderung definiert ist (Walther et al., 2014), handelt es sich bei der CKD um eine über mehr als drei Monate bestehende, funktionelle und/oder strukturelle Auffälligkeit der Niere mit Auswirkung auf die Gesundheit (Levey et al., 2020)

1.2.3 Pathophysiologische Aspekte der Nierenschädigung

Die Nieren sind ein zentrales Organ sowohl der Elimination als auch der immunologischen Toleranzerhaltung gegenüber vielen exogenen und endogenen Substanzen (Tecklenborg et al., 2018). Der hohe renale Blutfluss (ca. 1500 l/Tag) und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR; 150-180 l/Tag) ermöglichen diese wichtigen Funktionen, exponieren die Niere jedoch gleichzeitig für Schädigungen durch verschiedenste zirkulierende Stoffe. Gerade im Rahmen der Modelletablierung ist die Kenntnis pathophysiologische Kaskaden renaler Schädigungen von Bedeutung. Aus deren räumlichen, biologischen und physikomechanischen Charakteristika muss nämlich abgeleitet werden, wie ein entsprechendes Modell aussehen muss: Während substanzinduzierte direkte Zytotoxizität *in vitro* relativ einfach zu realisieren ist (s.u.), erfordern Pathomechanismen, welche Blut- und/oder Urinfluss involvieren, komplexere Modelle. Noch herausfordernder stellt sich die *in vivo* getreue Realisation immunmediierter Schädigungen oder die Darstellung chronischer Erkrankungen dar.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl ein Modell der direkten Zytotoxizität als auch zur schädigungsinduzierten Immunzellrekrutierung erarbeitet wurde, soll im Folgenden auf pharmakokinetische Aspekte direkter substanzinduzierter Zytotoxizität eingegangen werden. Des Weiteren wird allgemein auf renale immunmedierte Erkrankungen und Mechanismen

der Immunzellrekrutierung (Chemotaxis) eingegangen. Für die gesamte Bandbreite an Pathomechanismen renaler Erkrankungen sei auf einschlägige Literatur verwiesen.

Substanzinduzierte Zytotoxizität durch Pharmaka: Die renale Clearance von Medikamenten geschieht durch die Prozesse der Filtration und anschließenden tubulären Modifikation des Filtrates durch Absorption und Sekretion. Während die Filtration ein passiver Prozess ist und proteinungebundene, hydrophile Pharmaka betrifft, sind die tubulären Prozesse energieabhängig und werden über Enzyme und Transportproteine der Biotransformation erreicht (Freissmuth et al., 2020). Hierbei kann es zu Nephrotoxizität - und analog zur Leber, zu relevanten Interaktionen (engl.: drug-drug interactions (DDI)) kommen. Dies geschieht, wenn verschiedene Substanzen über gleiche Enzyme und/oder Transporter biotransformiert werden, bzw. Induktoren/Inhibitoren der metabolisierenden Enzyme gleichzeitig appliziert werden. Das konzertierte Zusammenspiel tubulärer Absorptions- und Sekretionsprozesse bestimmt wesentlich die Pharmakokinetik und -dynamik renal eliminerter Substanzen (s. Abb.1). So kommt es beispielsweise bei einer verminderten blutseitigen Absorption zu einer verlängerten Halbwertszeit (HWZ). Im Ggs. dazu kann eine Exkretionsminderung in den Urin bei ungestörter basolateraler Aufnahme in die Tubuluszellen zur intrazellulären Akkumulation und substanzabhängig zu Nephrotoxizität führen. In diesem Zusammenhang hat der proximale Tubulus eine besondere Relevanz, da er im Vergleich zu anderen Abschnitten des Nephrons in erhöhtem Maße in die Pharmakokinetik involviert ist. Gleichzeitig zeigt er aufgrund seines sehr hohen Energieverbrauches und der hohen Reabsorptionsrate filtrierter Stoffe eine besondere Vulnerabilität (Freissmuth et al., 2020). Eine Dysbalance der Biotransformation bzw. eine Überschreitung der Kapazität der renalen Entgiftungsfunktion resultiert in diversen, substanzspezifischen Mechanismen der Zytotoxizität. Dabei kann es neben tubulärer Zytotoxizität und Nekrose zu veränderter renaler Hämodynamik, Inflammation, Kristallopatherien oder thrombotischer Mikroangiopathie kommen (Yu et al., 2022).

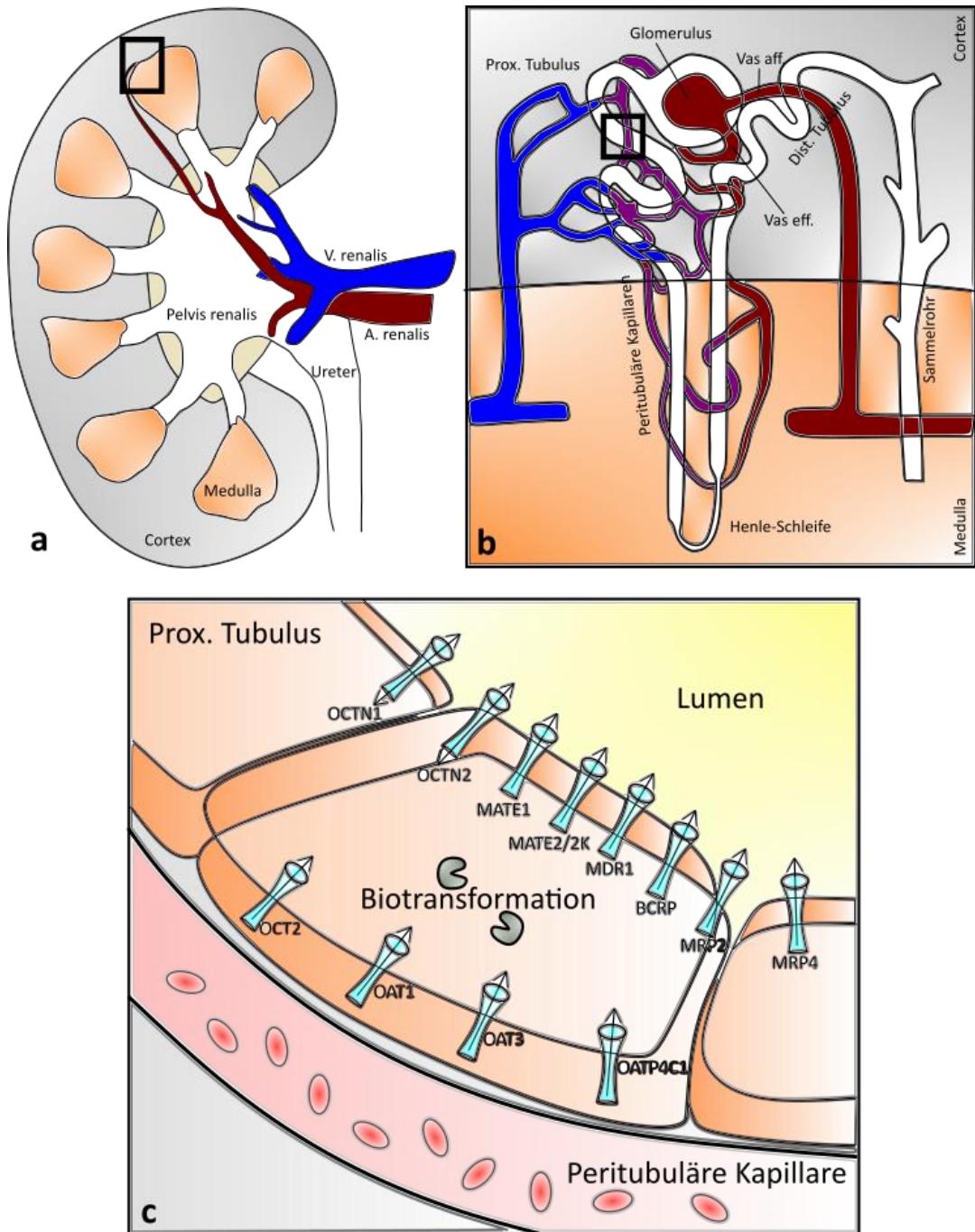


Abbildung 1: Anatomie der Niere

a) Makroskopische Anatomie der Niere und der renalen Blutgefäße. b) (Ausschnitt s. Kasten in a)) Schemazeichnung des Nephrons bestehend aus Glomerulum und den verschiedenen Tubulusabschnitten. c) (Ausschnitt s. Kasten in b)) Mikroskopische Schemazeichnung mit Darstellung der Transporter- und Enzyme welche in die renale Elimination und Biotransformation div. Substanzen involviert sind. (Abb. b u. c. adaptiert nach Morrissey et al., 2013)

Immunologische Aspekte und Chemotaxis im Rahmen infektiöser und steriler Erkrankungen der Niere: Das Immunsystem ist ein komplexes System, welches den Organismus vor Erkrankungen durch pathogene Erreger schützt. Grundlegend wird zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort unterschieden, wobei diese beiden Arme jeweils über zelluläre und humorale Mechanismen verfügen (s. Abb. 2). Während die angeborene Immunantwort bei Erkennung pathogener Erreger anhand hochkonservierter, struktureller

Merkmale (z.B. Lipopolysaccharid, Flagellin, Peptidoglykan, Chitin, mikrobielle / virale DNA und RNA) unmittelbar eingeleitet wird, erfolgt die adaptive Immunantwort mit zeitlicher Latenz. Hierbei kommt es zur Ausbildung einer antigenspezifischen Reaktion und Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Beide Systeme sind eng miteinander verzahnt und keinesfalls unabhängig voneinander zu betrachten. Die Erkennung der o.g. pathogenen Molekülstrukturen (engl.: pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) erfolgt durch ebenfalls hochkonservierte Rezeptoren (engl.: pattern recognition receptors; PRRs). Diese PRRs kommen in membranständiger, intrazellulärer und löslicher Form vor. Zwei wichtige Familien der PRRs sind die membranständigen Toll-like receptors (TLRs) und die zytoplasmatischen NOD-like receptors (NLRs). In Analogie zu den PAMPs wurde der Begriff DAMPs (engl.: danger / damage-associated molecular patterns) für körpereigene Moleküle definiert, welche von PRRs erkannt werden und eine Immunreaktion auslösen können. Es handelt sich dabei um Substanzen, welche bei Zellschäden durch Kompartimentwechsel eine Störung der zellulären / parenchymatösen Integrität und Homöostase signalisieren. Dabei kann es sich beispielsweise um nukleäre oder zytoplasmatische Moleküle handeln, welche nach Ruptur der Kern- bzw. Plasmamembran in den Extrazellulärraum gelangen. Ein weiteres Beispiel ist extraluminales Uromodulin (Tamm-Horsfall-Protein) bei tubulärer Schädigung. Als DAMPs fungieren unter anderem nukleäre (z.B. High-mobility group box 1 (HMGB1), Histone, DNA, RNA), zytosolische (z.B. Harnsäure, Adenosintriphosphat (ATP), Hitzeschockproteine) oder mitochondriale Moleküle. Des Weiteren zählen auch Komponenten der Extrazellulärmatrix wie Biglycan, Decorin und Hyaluronsäure dazu. Nierenspezifische DAMPs sind unter anderem Kristalle oder das schon erwähnte Uromodulin (Anders & Schaefer, 2014; Ma et al., 2024; Meissner et al., 2019). Auslöser einer DAMP-basierten, und damit sterilen Inflammation können traumatisch, toxisch oder ischämisch bedingt sein. Nach dem Initialereignis aktivieren DAMPs und PAMPs TLRs auf Parenchymzellen und residenten dendritischen Zellen sowie Makrophagen. Ebenfalls kommt es in mononukleären Phagozyten zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, dessen PRR (NLRP3) ein sehr breites Spektrum an DAMPs detektiert (Swanson et al., 2019). Ein wichtiger Signalweg nach TLR-Aktivierung erfolgt über den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), dessen Aktivierung die Produktion von Interferonen, Interleukin 12 (IL12), Tumornekrosefaktor-a (TNFa), IL6 sowie den Chemokinliganden CCL2, CCL5 und CXCL8 bewirkt (Anders & Schaefer, 2014; De Haij et al., 2002; Kurts et al., 2013). Weitere chemoattraktiv wirkende Substanzen außerhalb der Chemokin-Gruppe sind Komplementfaktoren (C5a und C3a), Prostaglandine, Leukotriene oder bakterielle Formylpeptide (Zabel et al., 2015). Des Weiteren kommt es via NLRP3-Inflammasom und Caspase-1 zur Aktivierung von Pro-IL-1b und pro-IL-18. Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine bewirkt in der Folge eine Endothelaktivierung mit Präsentation von Selektinen und Adhäsionsmolekülen wie das intercellular cell adhesion molecule (ICAM) und vascular cell adhesion molecule (VCAM). Hierdurch kommt es zur Leukodiapedese (Singh et al., 2023). Die Einwanderung von Neutrophilen, mononukleären Phagozyten und Lymphozyten fachen das proinflammatorische Milieu durch Freisetzung von Zytokinen und zytotoxischen Substanzen wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) weiter an. Es kommt zur regulierten Nekrose von Parenchym- und Immunzellen, was wiederum zur vermehrten DAMP-Freisetzung führt. Diese Kaskade der einander bedingenden und verstärkenden

Prozesse aus Nekrose und Inflammation wird als Nekroinflammation bezeichnet (Mulay et al., 2016). Im weiteren Verlauf dieser stereotyp geschilderten Vorgänge einer renalen Immunpathologie kommt es zu einer Abnahme der inflammatorischen und nekrotischen Aktivität zugunsten regenerativer Prozesse. Auf die zugrunde liegenden Mechanismen die z.T. noch unverstanden sind, soll im Rahmen dieser Einleitung nicht näher eingegangen werden. Vor dem Hintergrund der Modelletablierung einer Immunzellrekrutierung wurde der Fokus auf die Initiation einer inflammatorischen Reaktion gelegt. Nichtsdestotrotz sei auf die klinische Relevanz steriler renaler Inflammation verwiesen: Zum einen gehört der Großteil renaler Erkrankungen dieser Gruppe an. Zum anderen können die genannten Prozesse Ausgangspunkt einer CKD sein, sowie autoimmune und alloimmune Prozesse triggern (Anders & Schaefer, 2014). Darüber hinaus muss das Initialereignis einer intrarenalen Immunpathologie nicht zwangsläufig intrarenal liegen. Zum Beispiel kann es im Rahmen von Immunkomplexerkrankung zur Sedimentation von Immunkomplexen an der glomerulären Filtrationsbarriere kommen. Konsekutiv kommt es hernach zur Immunzellaktivierung, Störung der glomerulären Filtrationsbarriere und manifesten Glomerulonephritis (Anders et al., 2023). Auch im Rahmen akuter interstitieller Nephritiden spielen oftmals ähnliche Mechanismen eine Rolle (Praga & González, 2012). Vor diesem Hintergrund besteht ein großes Interesse für ein besseres Verständnis immunpathologischer Vorgänge, um mögliche Ziele neuer Therapieansätze zu definieren.

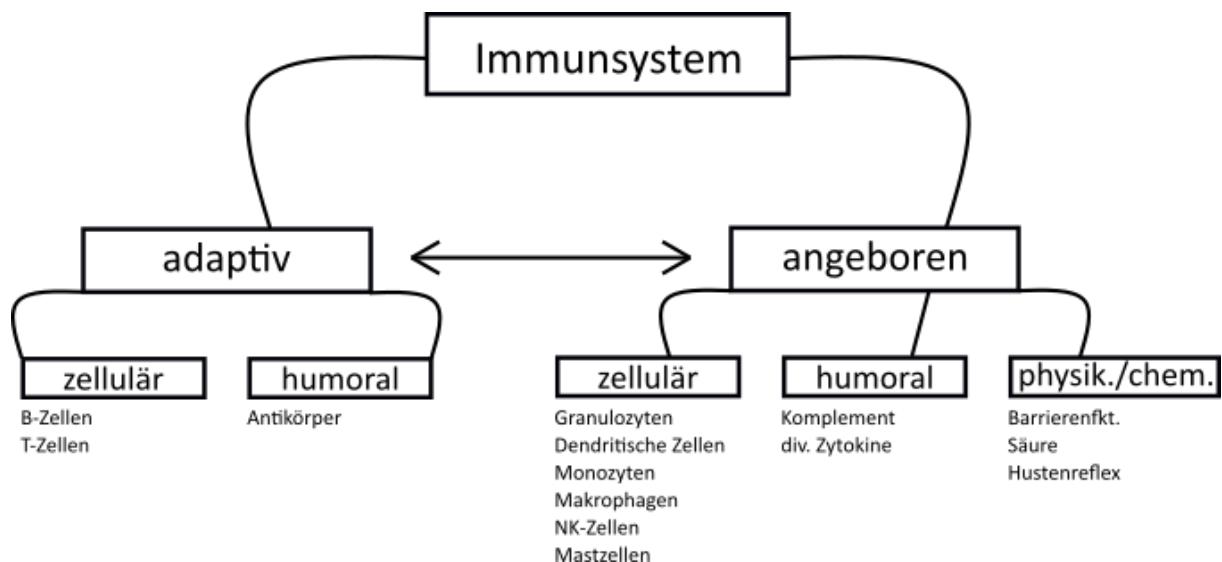


Abbildung 2: Komponenten des Immunsystems

1.3 Modelle in der Zellkultur

1.3.1 Grundlagen verschiedener Zellkulturplattformen und die Entwicklung der Organ-on-a-Chip-Technologie

2D-Zellkulturschalen sind in allen Bereichen der Zellkultur die Basisplattform. Vorteilhaft ist die gute Reproduzierbarkeit und die einfache Handhabung. Darüber hinaus sind 2D-Modelle

wenig zeit- und kostenintensiv. Nachteilig ist ein Verlust der *in vivo* getreuen Zellmorphologie und Funktion. Unter 2D-Bedingungen kommt es unter anderem zur Abflachung eigentlich hochprismatischer Zellen sowie zu einer differenten Expression charakteristischer Proteine. Dies geht einher mit dem Verlust der morphologisch- und funktionellen Polarisierung in ein apikales und basolaterales Kompartiment (Jang et al., 2013; Soo et al., 2018; Tiong et al., 2014; Wilmer et al., 2016). Die mit diesem veränderten Phänotyp einhergehenden funktionellen Alterationen führen zu einer reduzierten Übertragbarkeit und Aussage der zellkulturellen Resultate von 2D-Modellen für den Menschen (*in vitro* zu *in vivo*- Extrapolation (IVIVE)). Des Weiteren sind Ko-Kulturen nicht *in vivo* getreu realisierbar und der Zugang zu den Zellen in 2D-Plattformen ist nur von apikal aus möglich. Dies ist beispielsweise bei Untersuchungen von trans-/parazellulären Transportprozessen von Nachteil.

Trans-Well-Systeme ermöglichen das Zellwachstum als Zellrasen auf einer Porenmembran die als Inlay in ein Well eingebracht wird. Durch Applikation von Medium in das Well sowie auf den Zellrasen ist ein apikales und ein basales separat zugängliches Kompartiment vorhanden. Dies ermöglicht Untersuchungen von trans-/interzellulären Transportprozessen und Barrieremessungen. Nachteilig ist auch hier der atypische Phänotyp zweidimensionaler, statischer Zellkulturen (s.o.).

Seit den 2000-er Jahren ist die Anzahl an Publikationen unter der Suchmaske „three-dimensional cell culture“ exponentiell gestiegen (PubMed®-Suche). Während in den Anfängen mit Zellkulturen in einem Extrazellulärmatrixgel gearbeitet wurde („Konventionelle 3D-Kulturen“), resultierte der Einzug des Microengineering in der Zellbiologie in weitaus komplexeren Modellen. Über Verfahren wie die Photolithographie und Replica molding wurden 3D Mikroplattformen erstellt, welche über diverse Techniken die 3-Dimensionalität mit der Applizierbarkeit von Scherkraft (engl.: fluid shear stress) kombinierten. Über komplexe Kompartimentierung der Zellkulturplattformen wurde zudem eine *in vivo* getreue Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion erreicht (Huh et al., 2011). Diese sogenannte Organ-on-a-Chip-Technologie (OoC) (s. Abschn. 1.3.2) zielte darauf ab, über eine möglichst physiologische Umgebung eine *in vivo* getreue Zellkultur zu erreichen.

In diesem Zusammenhang stellt die Extrazelluläre Matrix (EZM) eine wichtige und zunehmend in den Fokus der Forschung rückende Komponente da. Die EZM bildet mit ca. 300 verschiedenen Proteinen und einer großen Vielfalt an Matrix-assoziierten Proteinen (Hynes & Naba, 2012) die Gesamtheit aller Makromoleküle im Interzellularraum. Grob lassen sich hier Faserproteine von einer sog. Grundsubstanz abgrenzen. Zu den Fasern gehören im wesentlichen verschiedene Kollagene und elastische Fasern, während die Grundsubstanz von einer heterogenen Gruppe aus Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen, Adhäisionsproteinen, Elektrolyten und Wasser gebildet wird (Theocharis et al., 2016). Die EZM ist eine hochdynamische Struktur, in deren Synthese, Abbau und Modulation neben Fibroblasten auch Epithelzellen, Endothelzellen und Immunzellen involviert sind. Neben strukturellen Funktionen der 3-dimensionalen Formgebung erfüllt die EZM in verschiedenen Organen unterschiedliche mechanische (Vgl. Lungenelastizität und die Zugfestigkeit einer Sehne) und physikomechanische (z.B. der molekulare Filter der Niere) Aufgaben. Darüber hinaus ist sie ein Reservoir an Cytokinen, Wachstumsfaktoren und biologisch aktiven Abbauprodukten

(engl.: „matrikines“). Damit ist sie wesentlich in die Immunfunktion, Zellpolarisation, Zelladhäsion, Migration, Proliferation, Apoptoseregulation, Morphogenese, Neogenese und Differenzierung aller Gewebe eingebunden (Boyd & Thomas, 2017; Frantz et al., 2010; Kleinman et al., 2003; Pampaloni et al., 2007; Theocharis et al., 2016). Vor diesem Hintergrund hat sich die Implementation von EZM in der Zellkultur als Standard etabliert.

Huh et al. definierten konventionelle 3D-Kulturen als Zellkulturen in EZM-Gels (Huh et al., 2011). Unter diesen Konditionen zeigen viele Zelltypen die Bildung sphärischer 3D-Zellaggregate (sog. Sphäroide). Zellen solcher Sphäroide haben einen polarisierten Phänotyp mit *in vivo* gerechterer Funktion bei relativ einfacher Handhabung (Pampaloni et al., 2007; Secker et al., 2018). Sie sind gängige Zellkulturmodelle und finden breite Anwendung u.a. in der Grundlagenforschung (Lin et al., 2023), Tumorbiologie (Habanjar et al., 2021) und Pharmakologie (Pampaloni et al., 2007; Secker et al., 2018). Nachteilig ist unter anderem, dass Ko-Kulturen interagierender Organstrukturen (z.B. vaskuläres Endothel und Epithel) sowie mechanische Eigenschaften (z.B. Scherkraft in normalerweise durchflossenen Lumina) nicht realisiert werden können. Des Weiteren ist der Zugang zu etwaigen apikalen / basolateralen Kompartimenten in EZM -Gelen erschwert, was die Analyse von Barrierefunktionen und Transportprozessen verhindert (Pampaloni et al., 2007).

Im Zuge der Bestrebungen möglichst *in vivo* getreue *in vitro* Modelle zu entwickeln, wurde Scherkraft als wichtiger Faktor identifiziert. Epithiale und endothiale Zellen, welche *in vitro* apikalem Scherkraft ausgesetzt sind, überwinden einige phänotypische und funktionelle Nachteile statischer Systeme. Am Beispiel der Niere herrscht aufgrund der GFR im tubulären System ein Fluss, welcher in einer apikalseitigen Scherkraft (engl.: „fluid shear stress“; FSS) auf das Epithel resultiert. Berechnungen auf Basis von Einzelnephron-GFR-Messungen gehen von einem FSS im ersten Teil des proximalen Tubulus von ca. 0,2-1 dyn/cm² aus (Duan et al., 2008; Essig et al., 2001). FSS ist ein Schlüsselmodulator des Phänotyps und der Funktion proximaler Tubuluszellen (engl.: proximal tubular cell; PTC). Studien unter FSS zeigen eine *in vivo* getreuere Morphologie mit hochprismatischen Zellen, basaler Fältelung, Tight-junction-Formation und Zilien-/Mikrovilliformation sowie Aktin-Reorganisation (Duan et al., 2008; Essig et al., 2001; Jang et al., 2013; Kaysen et al., 1999; Raghavan et al., 2014). Funktionell zeigen PTCs unter FSS erhöhte Expression bzw. Aktivität der Na/K-ATPase, Aquaporin 1 (AQP1), alkalischer Phosphatase sowie erhöhte Natrium- und HCO₃-Absorption via NHE3 (Na⁺/H⁺-Austauscher) und H⁺-ATPase (Duan et al., 2010; Jang et al., 2013). Des Weiteren kommt es unter FSS zur vermehrten Glukoseaufnahme, Albuminresorption, Cubilin- und Megalin-Expression sowie zu erhöhter Pinozytose-Rate (Jang et al., 2013; Kaysen et al., 1999; Raghavan et al., 2014). Neben einer erhöhten Aktivität wichtiger Transportproteine und erhöhter Sensitivität für Nephrotoxine (Jang et al., 2013) zeigten Miravète et al. zudem eine FSS-induzierte Immunzellrekrutierung (Miravète et al., 2011). Dies ist vor dem Hintergrund einer pathologischen Hyperfiltration an der glomerulären Filtrationsbarriere, welche im Rahmen div. Nierenerkrankungen auftritt ein interessanter Aspekt. Es existieren verschiedene Arten der Induktion von FSS in mikrofluiden Systemen, wobei die Nutzung von Pumpensystemen am weitesten verbreitet ist (Pennathur, 2008).

Vor dem Hintergrund, dass viele physiologische und pathophysiologische Vorgänge erst über Zell-Zell-Interaktionen entstehen (s. auch Abs. 1.2.3), ist die Etablierung komplexer Ko-Kulturen *in vitro* von besonderem Interesse. Die Organ-on-a-Chip-Technologie eröffnete diesbezüglich neue Möglichkeiten mit einer stetig wachsenden Anzahl neuer Publikationen unterschiedlichster Modelle.

1.3.2 Organ-on-a-Chip Technologie

Die Organ-on-a-Chip (OoC) Zellkultur nahm ihren Anfang in den 1990-er Jahren und verbindet heute im Zuge kontinuierlicher Weiterentwicklung die oben genannten Merkmale aus 3-Dimensionalität, FSS, EZM, Ko-Kultur verschiedener Zellarten, Zell-Zell-Interaktion und Zell-Matrix-Interaktion. Eine treffende Definition lautet: „*Organs-on-chips are systems containing engineered or natural miniature tissues grown inside microfluidic chips. To better mimic human physiology, the chips are designed to control cell microenvironments and maintain tissue-specific functions*“ (Leung et al., 2022).

Es gibt mittlerweile unzählige Plattformen für unterschiedlichste Fragestellungen. Gemeinsam ist ihnen, dass über die größtmögliche Kontrolle der Mikroumgebung bei gleichzeitig hoher Komplexität eine *in vivo* ähnliche Situation entsteht. Hierbei können kontrolliert einzelne Parameter variiert, und deren Effekt auf die Zellen ausgelesen werden. Dabei sorgen vielfältige, und oftmals plattformspezifische Analyseverfahren für einen maximalen Informationsgewinn. Dies unterscheidet OoCs auch von Organoiden oder Assembloiden. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist, dass durch die Möglichkeit der Langzeitkultivierung Modelle chronischer Erkrankungen *in vitro* realisiert werden können. Damit überwinden OoCs eine große Limitation herkömmlicher Zellkulturplattformen (DesRochers et al., 2013).

1.4 Renale Zellen und Zelllinien in der Zellkultur

1.4.1 Grundlagen

Abhängig von der Fragestellung bestehen unterschiedliche Anforderungen an die verwendeten Zellen. Grundlegend gilt, dass primäre Zellen eine gute Prädiktion der *in vivo* Situation zeigen, jedoch schwer erhältlich, kurzlebig und in der Teilungsfähigkeit limitiert sind. Immortalisierte Zelllinien hingegen sind einfacher in der Handhabung und bei kommerzieller Vertreibung gut Verfügbar. Nachteilig bei Zelllinien ist ihr Phänotyp, welcher sich zum Teil deutlich von demjenigen primärer Zellen unterscheidet. Daher zeigen sie bei vielen Fragestellungen eine reduzierte Prädiktion für die *in vivo*-Situation. Bei IVIVE gilt daher, die bestmögliche Prädiktion mit einer annehmbaren Praktikabilität zu vereinbaren. Bis dato sind 2D-Kulturen primärer oder immortalisierter primärer proximaler Tubuluszellen (engl.: conditionally immortalized renal tubular epithelial cells „ciTEC“) der Goldstandard *in vitro* basierter Nephrotoxizitäts-Modelle (Soo et al., 2018). Dabei sind die Kriterien, anhand welcher sich die Güte einer Zellreihe bemisst nicht genau definiert. Gerade in Hinsicht auf renale Toxizitätsstudien ist in den letzten Jahrzehnten durch pharmakokinetische Studien das Wissen um Transporter und Enzyme der Biotransformation exogener (und endogener) Substanzen immens gewachsen. Da die Anzahl der bekannten Enzyme und Transporter in der

Niere groß - deren Relevanz aber z.T. noch wenig untersucht ist, empfehlen die European Medicines Agency (EMA) und die Food and Drug Administration (FDA) in ihren aktuellen Drug-Interaction-Guidelines (Food and Drug Administration, 2020; ICH, 2022) die Untersuchung ausgewählter Cytochrom P450-Enzyme sowie einiger Transportproteine aus den zwei Superfamilien ATP-binding-cassette transporters (ABC-Transporter) und solute carriers (SLC). Im Detail sind dies die zwei ABC-Transporter BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2) und P-gp (P-glycoprotein / ABCB1) sowie die SLC-Mitglieder OATP1B1/3, OAT1, OAT3, OCT2, MATE1 und MATE2-k (s. auch Abb. 1). Hinzu kommen weitere Proteine wie z.B. Na⁺/K⁺-ATPase, Aquaporine, alkalische Phosphatase, Gamma-Glutamyltransferase (gGT), NHE3, vakuoläre ATP-ase (V-ATPase), sodium-glucose transporter-2 (SGLT2), Megalin, Cubilin, Tight junctions-Proteine sowie zytologische Aspekte proximaler Tubuluszellen (z.B. hochprismatische Konfiguration, basale Fältelung, Mitochondrienreichtum am basalen Pol).

1.4.2 Renale Zellen und Zelllinien (Auswahl)

Primäre Zellen (engl.: human renal proximal tubular epithelial cells; hRPTEC), welche frisch isoliert und kommerziell erhältlich sind, zeigen einen *in vivo* getreuen Phänotyp und haben eine komplette Ausstattung mit Transportern und Enzymen. Nachteilig ist die limitierte Verfügbarkeit, die erhebliche Interdonorvariabilität, die geringe Teilungsfähigkeit und der Verlust ihrer Polarisation sowie Transporter- und Enzymausstattung in herkömmlichen 2D-Kulturen (Soo et al., 2018; Tiong et al., 2014; Van der Hauwaert et al., 2014; Wilmer et al., 2016). Einige der oben genannten Nachteile konnten durch Immortalisierung überwunden werden. Die erste, hRPTEC-abgeleitete Zelllinie war in diesem Zusammenhang die RPTEC/TERT1-Zelllinie: Hier wurde in primären Zellen durch Überexpression der humanen Telomerase reverse Transkriptase (hTERT) eine Langlebigkeit induziert. Eine weitere Zellquelle sind aus humanen pluripotenten Stammzellen (engl: human pluripotent stem cells; hPSC) differenzierte „hPTC-like cells“. Ausgangszellen können hierbei sowohl humane embryonische- (hESC) als auch humane induzierte (hiPSC) Stammzellen sein. Beide Zelllinien sind zwar bisher noch mangelhaft validiert, Studien deuten aber auf eine gute *in vivo* Prädiktivität hin (Aschauer et al., 2015; Tiong et al., 2014; Wilmer et al., 2016). Interessanterweise zeigen sowohl hPTC als auch hPTC-like cells *in vitro* sowohl unter Proliferation als auch bei Konfluenz eine hohe Expression von Vimentin. Dieses ist *in vivo* nur nach Schädigung hochreguliert und wird als De-Differenzierungsmarker gehandelt (Andrianova et al., 2019; Soo et al., 2018). Eine weitere Frage bei der Verwendung von iPSC-abgeleiteten Zellen ist das epigenetische Muster: Im Rahmen der Ent- und Redifferenzierung der iPSCs kommt es nämlich zu einem differenten epigenetischen Muster im Vergleich zu nativen, somatischen Zellen. Der Effekt auf die IVIVE ist bis dato nicht ausreichend untersucht (Scesa et al., 2021). Neben der o.g. Expression von Vimentin exprimieren hPTC *in vitro* ohne vorhergehende Schädigung PAX-2, NGAL, KIM-1 und Clusterin, welche *in vivo* als Schädigungsmarker gelten. Dies suggeriert, dass *in vitro* ein Zellstress vorliegt der mit De-Differenzierung und erhöhter Proliferationsaktivität einhergeht. Tiong et al. diskutierten vor diesem Hintergrund die reduzierte Transporter- und Enzymausstattung 2D-kultivierter Zellen als De-Differenzierung bei Zellstress und erhöhter Proliferationsbereitschaft: Im Rahmen von Schädigungen (hier: Unphysiologische *in vitro*-Kultivierung sowie das Isolationsprozedere bei

der Zellgewinnung) käme es über diese Mechanismen zu einer verringerten Sensitivität für Toxine (Tiong et al., 2014).

Immortalisierte Zelllinien: Die Mehrzahl der bestehenden Nierenmodelle nutzt Zelllinien wie die MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), LLC-PK1 (Lilly Laboratories cell, porcine kidney 1) und HEK293 (Human Embryonic Kidney Cellline 293), welche als renale Zellen auch Erwähnung in den Drug-Drug-Interaction-Guidelines der FDA finden (Food and Drug Administration, 2020). Eine weitere häufig verwendete Zelllinie ist die humane immortalisierte HK2-Linie (Human Kidney 2). Bis auf die MDCK, welche aus dem distalen Tubulus stammen, handelt es sich um PTCs. Während MDCK (Hund) und LLC-PK1 (Schwein) als nicht humane Zelllinien aufgrund Speziesdifferenzen per-se eine geringe Prädiktivität zeigen (Prasad, 2019; Tiong et al., 2014; Zou et al., 2021), sind auch die humanen Zelllinien HK2 und HEK293 aufgrund differenter Expression wichtiger funktionaler Marker in Hinsicht ihrer Prädiktion der *in vivo* Situation kritisch zu sehen (Tiong et al., 2014; Van der Hauwaert et al., 2014). Einsatz finden diese Zelllinien häufig im Rahmen mechanistischer Studien als einzel-/mehrgefach transfizierte Zellmodelle mit Überexpression eines bestimmten Transporters (Bsp. „HEK-OATP1B1“ oder „MDCK-OCT1-Pgp“) (Haberkorn et al., 2021; Tiong et al., 2014). Anhand dieser Modelle wird beispielsweise in pharmakokinetischen Studien untersucht, ob ein Arzneimittel Substrat oder Inhibitor eines bestimmten Transporters ist.

1.4.3 Humane renale Progenitorzellen (engl. Human Renal Progenitor Cells; hRPCs)

Die definitive Niere (Metanephros) entwickelt sich im intermediären Mesoderm im Rahmen der Organogenese ab der 5. Embryonalwoche. Dabei lassen sich die Ureterknospe (später extra- und intrarenale ableitende Harnwege) und das metanephrogene Blastem voneinander abgrenzen. Die Progenitorzellen des metanephrogenen Blastems sind dabei die Vorläufer aller Zellen des Nephrons inklusive der Glomeruli und aller Tubulusabschnitte. Ausnahme hiervon sind die Sammelrohre, welche aus der Ureterknospe hervorgehen. Diese renalen Progenitorzellen gehen im weiteren Verlauf stark zurück und machen in der adulten Niere noch 0,5-3% der Zellen aus (Lazzeri et al., 2007; P. L. Zhang & Hafron, 2014).

In der adulten Niere stellen die renalen Progenitorzellen (engl.: renal progenitor cells; RPCs) einen Zellpool aus epithelialen Zellen der parietalen, urinpolseitigen Bowmankapsel (Sagrinati et al., 2006) dar. Zudem kommen sie mit distinkter Verteilung im proximalen und distalen Tubulus vor (Angelotti et al., 2012; Ivanova et al., 2010). Bei Koexpression der Stammzellmarker CD133 und CD24 sowie der stammzellspezifischen Transkriptionsfaktoren Oct-4 und Bml-1 weisen die RPCs keine spezifischen Differenzierungsmarker auf (Lindgren et al., 2011; Sagrinati et al., 2006). RPCs zeigen *in vitro* eine hohe klonale Expansionsfähigkeit von 60-90 Populationsverdoppelungen in 4 Monaten sowie ein multipotentes Differenzierungspotential (Lazzeri et al., 2015). So können Merkmale verschiedener Gewebe induziert werden: Beispielsweise von Podozyten und Tubuluszellen aber auch osteogener, adipogener und neurogener Zellen (Angelotti et al., 2012; Ronconi et al., 2009; Sagrinati et al., 2006). Die Bedeutung von RPCs im Rahmen diverser (patho-)physiologischer Prozesse wie Regeneration, Sklerose und Tumorgenese ist Gegenstand aktueller Forschung. Neben regenerativer Kapazität nach tubulärer Schädigung (Lazzeri et al., 2018; Lindgren et al., 2011; Rinkevich et al., 2015) zeigen Untersuchungen auch, dass RPCs bei Podozytopathien im Rahmen maladaptiver Regeneration Ausgang von hyperplastischen Läsionen (Halbmond-GN,

collapsing glomerulopathy) und sklerotischen Prozessen (Fokal-Segmentale Glomerulosklerose) sind (Anguiano et al., 2020; Melica et al., 2023; Smeets et al., 2009; P. L. Zhang & Hafron, 2014). Lazzeri et al. konnten einige Jahre nach der Entdeckung der humanen RPCs ein Protokoll zur Gewinnung der hRPCs aus dem Urin proteinurischer Patienten entwickeln (Lazzeri et al., 2015). Vor diesem Hintergrund sind diese Zellen ein vielversprechender Gegenstand der Forschung zu diversen Erkrankungen und der Entwicklung neuer Therapien sowie im Rahmen der personalisierten Medizin (Benigni et al., 2011; Lazzeri et al., 2007; Melica et al., 2023).

1.5 Rationale für die Entwicklung neuer Nierenmodelle in der Zellkultur

In den letzten Jahrzehnten erlebte die Zellkultur in der Grundlagen- und translationalen Forschung viele maßgebliche Innovationen. Ursächlich hierfür ist der Mangel an Modellen mit guter IVIVE, welcher durch Tiermodelle und durch herkömmliche 2D-Zellkulturen nicht ausreichend adressiert wird (Soo et al., 2018; Tiong et al., 2014). Weiterhin ist seit der Implementation der EU-Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere mit dem 3R-Prinzip („Replace-Reduce-Refine“) auch ein rechtlicher Rahmen für die Reduktion und Ersetzung von Tiermodellen geschaffen worden (Kommission, 2010).

Medikamentenentwicklung: 32% der 200 meist verschriebenen Medikamente in den USA werden renal eliminiert, wovon wiederum 90% aktiven Transportprozessen in den Urin unterliegen (Morrissey et al., 2013). Dieser Umstand ist u.a. sehr relevant im Rahmen der Medikamentenentwicklung, da die Nieren (neben der Leber) als zentrales Organ der Substanzelimination und Biotransformation häufig von unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen (UAWs) betroffen sind. Des Weiteren steigt die Rate extra- und intrarenaler UAWs bei Nierenfunktionseinschränkungen sowie durch Interaktionen im Rahmen der Biotransformation mit Substanzakkumulation und konsekutiv erhöhter Toxizität. Vor diesem Hintergrund fordern EMA und FDA im Rahmen der Zulassung neuer Medikamente stets präklinische Studien zur Pharmakokinetik und DDI. Hierbei müssen die Mechanismen des Metabolismus und der Elimination untersucht werden um auf diesem Wege mögliche UAWs zu antizipieren (EMA, 2012; Food and Drug Administration, 2020). Limitierend in diesem Zusammenhang ist, dass die bisher in den präklinischen Phasen der Medikamentenentwicklung eingesetzten *in vitro*- und Tiermodelle nur eine geringe IVIVE zeigen (Soo et al., 2018). Dies führte in retrospektiven Datenauswertungen zu Abbruchraten aufgrund von Sicherheitsbedenken von 25% in Phase II- und 14% in Phase III-Studien. Die Abbruchrate aufgrund mangelnder Wirksamkeit in Phase II- und III-Studien lag dabei mit 52% sogar noch höher (Harrison, 2016). Dabei ist das späte Ausscheiden von Medikamenten in klinischen Phasen der Testung mit hohen Kosten und Zeitaufwand verbunden. In diesem Zusammenhang gibt es erste Daten, welche darauf hindeuten, dass die Implementation der OoC-Technologie bei besserer Prädiktion sowohl Kosten als auch Zeit einsparen könnte (Ewart et al., 2022).

Gleiches wie in der Pharmakologie und Toxikologie gilt für die Grundlagen- und translationale Forschung. In allen Fachbereichen haben bestehende Modelle aufgrund ihrer geringen IVIVE einen limitierenden Effekt bei der Erweiterung des Verständnisses (patho-)physiologischer

Vorgänge. Gerade an der translationalen Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und deren klinischer Anwendung werden hoch prädiktive Modelle gebraucht. Breitere Anwendung finden OoCs bereits in der Onkologie in Bezug auf Tumorbiologie und Therapie (Nolan et al., 2023). Ein weiteres Beispiel aus der Nephrologie publizierte Petrosyan et al. mit einem Modell eines „Glomerulus-on-a-Chip“, bestehend aus den drei Komponenten Podozyten, GBM und Endothel. An diesem wurde zudem die Induktion und Therapie bei membranöser Nephropathie sowie eine Puromycin- und Glukose-induzierte Albuminurie gezeigt (Petrosyan et al., 2019). Neben vielen weiteren Modellen sind diese Beispiele vielversprechend und es ist zu vermuten, dass die Implementation solcher Zellkulturansätze einen weiter wachsenden Stellenwert in der Forschung erlangen wird.

1.6 Zielsetzung und Hypothese der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Protokolls für einen hRPC-basierten „Tubulus-on-the-Chip“ sowie die Etablierung eines Modells zur Untersuchung von Immunzellmigration. Es sollte die Charakterisierung grundlegender Eigenschaften des hRPC-Tubulus anhand verschiedener zellkultureller und biochemischer Methoden erfolgen. Die Verwendung von hRPCs sollte dabei primär die Fragestellung beantworten, ob es möglich sei, einen hRPC-basierten Tubulus-on-the-Chip mit basischarakteristischen Funktionen eines renalen Tubulus (Morphologie, Proteinexpression, Barrierefunktion, Induktion von Immunzell-Migration im Rahmen einer sterilen Inflammation) zu realisieren. Damit sollte eine Modell-Grundlage für weitere, darüber hinaus gehende Fragestellungen und Anwendungen geschaffen werden. Die daraus abzuleitenden Hypothesen beliefen sich daher auf folgende Kernhypothesen:

- Die Realisation eines hRPC-Tubulus in der OrganoPlate® 3-lane ist möglich (1).
- Der hRPC-Tubulus zeigt eine stabile Viabilität und Barrierefunktion (2a) und kann als Grundlage für Langzeituntersuchungen dienen (2b).
- Die Zellkulturbedingungen der OrganoPlate® (3-dimensionale tubuläre Konformation, bidirektionale Perfusion mit konsekutiver apikaler Scherkraft sowie die Zell-Matrix-Interaktion) induzieren einen differenten hRPC-Phänotyp in Bezug auf die Markerproteine F-Aktin, Na⁺-K⁺-ATPase und ZO-1 im Vergleich zu hRPCs in herkömmlichen 2D-Zellkulturplattformen (3).
- Der hRPC-Tubulus ist ein geeignetes Modell für Toxizitätsstudien (4).
- Die Histon-induzierte Schädigung des hRPC-Tubulus führt zu einer gerichteten Migration primärer humaner Leukozyten durch die extrazelluläre Kollagen-Matrix in Richtung des geschädigten Tubulus (5a). Hierbei korreliert die Anzahl migrierender Leukozyten mit dem Ausmaß des Histon-induzierten Tubulusschadens (5b).

2 Material

2.1 Zellkulturmethoden

in vitro Kultivierung von humanen renalen Progenitorzellen (hRPC)

Name	Katalognummer	Firma
Endothelial Cell Growth Basal Medium HyClone™	C-22210 SH30070.03	PromoCell Cytiva (GE Healthcare Life Sciences)
Endothelial Cell Growth Supplement / Heparin (ECGS/H) hEGF-0.5	C-30120 C-30220	PromoCell PromoCell
HC-500	C-31061	Promocell
Penicillin-Streptomycin	P06-07100	PAN-Biotech GmbH
Zellkulturschalen	93150 93100	TPP Techno Plastic Products AG
Zellkulturplatten 6 Well	92006	TPP Techno Plastic Products AG
OrganoPlate®3-lane 40	4004-400-B	Mimetas
Trypsin 0.05 %/EDTA 0.02 % in PBS, w/o: Ca and Mg	P10-023100	PAN-Biotech GmbH
Zählkammern Neubauer improved	T729.1	Roth GmbH & Co. KG
1X PBS	P04-36500	PAN-Biotech GmbH

Rezept für hRPC-Medium

Komponente	Volumen
Endothelial Cell Growth Basal Medium	400ml
HyClone™	100ml
ECGS/H	2ml
hEGF 0,05µg/500µl	500µl
HC 500µg/500µl	500µl
Penicillin-Streptomycin	5ml

Isolation und *in vitro* Kultivierung von primären humanen Leukozyten

Name	Katalognummer	Firma
Dextran	31392	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kalium-Chlorid (KCl)	1.04936	EMSURE®
RPMI 1640 Medium (1X) + GlutaMAX™-I	61870-010	Thermo Fisher Scientific Inc.
Biocoll Separating Solution	L6115	Merck
UltraPure™ Distilled Water	10977-035	Invitrogen
1X PBS	P04-36500	PAN-Biotech GmbH
S-Monovette® Lithium Heparin Gel	01.1634.288	Sarstedt Germany

Kollagen

Name	Katalognummer	Firma
3-D Culture Matrix Collagen I	3447-020-01	Cultrex®
HEPES	15630-056	Gibco®
Natriumhydrogencarbonat	1063291000	MERCK
Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline, 10x	D1408	Sigma®
UltraPure™ Distilled Water	10977-035	invitrogen

Barrierefestigkeitstest

Name	Katalognummer	Firma
Fluorescein isothiocyanate-dextrane 150kD (FITC-Dextrane)	46946	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FITC Sinistrin	NA	Fresenius Kabi Deutschland GmbH

2.2 Biochemische Methoden

Name	Katalognummer	Firma

CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT)	G4100	Promega
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	11644793001	Roche
PureLink™ RNA Mini Kit	12183018A	Invitrogen™
Ethanol 96% EMSURE®	159010	Merck KGaA
UltraPure™ Distilled Water	10977-035	Invitrogen
2-Mercaptoethanol	M6250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNAse AWAY®	83931	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNase-Free DNase Set (50)	79254	Qiagen GmbH
DEPC-treated Water	R0601	Thermo Fisher Scientific Inc.

Zellkultur

Name	Katalognummer	Firma
Aristolochiasäure	3447-020-01	Cultrex®
Cisplatin	15630-056	Gibco®
Natrium-Oxalat	1063291000	MERCK
Calcium-Oxalat		
Histone	D1408	Sigma®
Histonantikörper	10977-035	invitrogen
Biocoll Separating Solution	L6115	Merck Biochrom
Histone H (from calf thymus)	11034758001	Roche

2.3 Färbungen

Calcein-AM

Name	Katalognummer	Firma
Calcein O,O'-diacetate tetrakis(acetoxyethyl) ester (Calcein-AM)	56496	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Verapamil hydrochloride	V4629-1G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethyl sulfoxide	1.02950	Merck

Immunkärfbung

Name	Katalognummer	Firma
TWEEN®20	93773-1KG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triton™ X-100	P9616	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
HBSS (+Ca/Mg)	55037C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fetal bovine serum	S0115	Biochrom GmbH
Formaldehyde-Lösung	252549	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	10735086001	Roche Diagnostics GmbH
1X PBS	P04-36500	PAN-Biotech GmbH

Antikörper

Name	Host / Isotyp / Klasse	Target / [Prim/Sek.] / Conjugate	Katalognummer	Firma
ZO-1 Polyclonal Antibody	Rabbit / IgG / Polyclonal	ZO-1 / Prim.	61-7300	Thermo Fisher Scientific Inc.
Recombinant Anti-Sodium Potassium ATPase antibody [EP 1845Y] – Plasma Membrane Loading Control	Rabbit / IgG / Monoclonal	Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase / prim	ab76020	Abcam plc.
Anti-F-actin antibody [4E3.ad1]	Mouse / IgM / Monoclonal	F-aktin / prim	Ab130935	Abcam plc.
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Goat / IgG / Polyclonal	Rabbit IgG / Sek. / Alexa Fluor® 488	111-545-144	Jackson ImmunoResearch
Goat Anti-Mouse IgM Antibody, Mu Chain Specific, Biotinylated	Goat / IgM /	Mouse / sek / Biotinyliert	BA-2020-5	Vector Laboratories
Streptavidin, Fluorescein			SA-5001-1	Vector Laboratories

4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI)

MBD0015

Sigma-Aldrich Chemie
GmbH

2.4 Geräte

Name	Bezeichnung / Typ	Firma
Inkubationsschrank	Hera Cell 150	Heraeus Instruments
Wasserbad	1013	GFL
Zentrifuge	5702	Eppendorf (SE)
Zentrifuge	MegaFuge 1.0R	Heraeus Instruments
Lichtmikroskop	DMIL	Leica Biosystems
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Ti2-E	Nikon
Konfokalmikroskop	Kamera: DS-Qi2 Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
	Lasermodul: LSM 5	Carl Zeiss
Microplate Reader	MRX	Dynatex Technologies
Spectrophotometer Nano Drp®	ND-100	pexLab Biotechnologie GmbH
Perfusion Rocker™ Mini	NA	Mimetas

2.5 Software

Name	Version	Entwickler
NIS-Elements	NA	Nikon
AIM 4.2	NA	Carl Zeiss
GraphPad Prism	9	GraphPad Software, Inc.
Inkscape	1.3.2	Inkscape Community
GNU Image Manipulation Program (GIMP)	2.10.36	Gimp-Team
Mendeley Desktop	2.99.0	Mendeley Ltd.
ImageJ (Fiji)	NA	Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Albert Cardona, Mark Longair, Benjamin Schmid, and others (Schindelin et al., 2012)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Isolation von humanen renalen Progenitorzellen

Die isolierten humanen renalen Vorläuferzellen (engl.: human renal progenitor cells; hRPCs) für die vorliegende Arbeit wurden freundlicherweise durch das Labor Prof. Paola Romagnani, Excellence Centre for Research, Transfer and High Education for the Development of DE NOVO Therapies, University of Florence, Florence, Italy zur Verfügung gestellt. Die Isolation erfolgte durch das Labor Prof. Romagnani nach dem Protokoll von Lazzeri et al. (Lazzeri et al., 2015). Zu weiteren Hintergründen sowie auf die Rationale der Verwendung von hRPCs sei auf die Einleitung (s. Abschn. 1.4.3) und Diskussion (Abschn. 5) verwiesen.

Für die Isolation wurden durch Zentrifugation frischer Urinproben Zellen aus Niere und ableitenden Harnwegen gewonnen. Die hRPCs wurden durch Verwendung des Nährmediums endothelial growth medium-microvascular (EGM-MV) mit 20% FBS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (1 mg/ml) und Rifampicin (8 µg/ml) über 6 Tage selektiert und kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit PBS zur Entfernung nicht adhärenter und toter Zellen erfolgte eine weitere Inkubation über weitere 2-3 Wochen. Um eine bakterielle Kontamination durch Keime aus dem Urin auszuschließen, erfolgte eine PCR auf ribosomale 16S-RNA. Daraufhin erfolgte die Kultivierung unter oben genannten Kulturbedingungen ohne Antibiotika (im Folgenden: RPC-Medium). Die Zellen wurden der Arbeitsgruppe Prof. H.J. Anders zur weiteren Kultivierung und Verwendung unter den unter Abschn. 3.1.2 beschriebenen Bedingungen überlassen.

3.1.2 *in vitro*-Kultivierung von humanen renalen Progenitorzellen

Die kryokonservierten hRPCs wurden durch Zugabe von vorgewärmtem (37°C) hRPC-Medium (s. Abschn. 2.1) aufgetaut und in 5 cm oder 15 cm Zellkulturschalen mit 5 bzw. 10 ml Medium bei 37 °C und 5 Vol.-% CO₂ für 24 Std. inkubiert. Dann erfolgte ein Mediumwechsel, um nicht adhärente und tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurde abhängig von der Präsentation der Zellen und Detritus im Überstand das Medium alle 2 – 3 Tage gewechselt.

Bei 90 %-iger Konfluenz des Zellrasens wurde das RPC-Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Hernach erfolgte die Disadhäsion durch Inkubation mit 10 ml (5 ml bei 5 cm- Zellkulturschalen) Trypsin für 5 Min. bei 37°C. Durch seitliches Klopfen an die Schalen am Ende der Inkubation wurde dieser Prozess mechanisch unterstützt. Die mikroskopische Kontrolle stellte sicher, dass die Mobilisierung vollständig erfolgte. Bei vollständiger Ablösung wurde der enzymatische Verdau der Adhäsionsproteine durch Trypsin schnell mittels Zugabe von RPC-Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt. Verbliebene Zellen wurden durch Waschen der Zellkulturschale mit PBS gelöst und ebenfalls in das Falcon überführt. Dieses wurde dann bei 350 g für 5 Min. zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in RPC-Medium resuspendiert und die Zellen für experimentelle Arbeiten verwendet oder erneut in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen in 10 ml RPC-Medium auf einer 15 cm Zellkulturschale eingesät.

3.1.3 Isolation von primären humanen Leukozyten

Die Isolationsmethode orientierte sich nach dem Protokoll vom Kim et al. (Kim et al., 2020).

Die Isolation erfolgte aus humanem, venösem Vollblut. Die venöse Punktion und Gewinnung von Vollblut erfolgte nach Aufklärung und informierter Einwilligung gesunder Probanden. Die verwendeten Lösungen (1,25% Dextranlösung , 0,6M KCl-Puffer , D-PBS, Aqua dest.) wurden bei 4°C vorgekühlt und während der Isolation auf Eis gelagert. Durch Abnahme in Heparinröhrchen wurde das Blut ungerinnbar gemacht und anschließend in 50 ml Falcontubes überführt. Im nächsten Schritt wurde das Blut im Volumenverhältnis 1:1 mit Dextranlösung vermischt. Es folgte eine 15- bis 20-minütige Inkubation bei 4°C, bis die Erythrozyten sichtbar am Falcontubeboden sedimentiert waren. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 50 ml Falcontube überführt, welches auf 50 ml mit D-PBS aufgefüllt wurde. Während der anschließenden Zentrifugation (5 Min., 1300 rpm, 4°C) wurden 4 ml KCl-Lösung in einem 15 ml Falcontube vorbereitet. Der nächste Schritt diente der Lyse der verbliebenen Erythrozyten im Zellpellet. Hierfür wurde zunächst der Überstand abgenommen und das Pellet in 10 ml Aqua dest. resuspendiert. Ca. 15-20 sek. nach initialem Kontakt des Zellpellets mit dem destillierten Wasser wurde durch Zugabe des KCl-Puffers die Lyse der weißen Blutzellen verhindert. Nach Auffüllen des Ansatzes auf 50 ml mit D-PBS erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 Min., 1300 rpm., 4°C). Nach Aspiration des Überstandes wurde das Zellpellet in 4 ml D-PBS resuspendiert und vorsichtig auf 4 ml Biocoll (vorgelegt in einem 15 ml Falcon) gegeben. Bei der folgenden Dichtezentrifugation (30 Min., 1500 rpm., 4°C, keine Bremse) erfolgte die Auftrennung der weißen Blutzellen in mononukleäre (engl.: peripheral blood mononucleated cells; PBMCs) und polymorphnukleäre (engl.: polymorphnucleated cells; PMNs) Zellen. Hierbei entsprachen die PBMCs (Lymphozyten und Monozyten) der mittig lokalisierten Bande und die PMNs (neutrophile/basophile/eosinophile Granulozyten und Mastzellen) dem Pellet am Boden des Falcontubes. Zur Gewinnung der PBMCs wurde mit einer 1ml Pipette vorsichtig die mittige Bande selektiv abgenommen und in 10ml D-PBS resuspendiert. Auch das Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 10 ml D-PBS resuspendiert. Es erfolgte eine letzte Zentrifugation (5 Min., 1200 rpm., 4°C) und Resuspension in RPMI.

Für eine primäre Verwendung von PBMCs konnte das Protokoll angepasst werden. Hierfür wurde das Zellpellet nach dem ersten Zentrifugationsschritt in 4 ml D-PBS resuspendiert und direkt zur Dichtezentrifugation übergegangen. Es resultierte ein Zellpellet am Boden des Falcontubes mit PMNs und Erythrozyten sowie eine mittige Bande, welche die PBMCs enthielt. Abschließend erfolgte auch hier die Abnahme und das Waschen der Bande (s.o.). Die primären humanen Leukozyten wurden aufgrund ihrer limitierten Haltbarkeit stets direkt in Experimenten weiterverwendet.

3.1.4 Kultivierung von glomerulären endothelialen Zellen

Glomeruläre endotheliale Zellen (engl.: glomerular endothelial cell; GEnC) (Shi, 2021) wurden in DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 Vol.-% CO₂ bis zur Konfluenz inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Der Erntevorgang erfolgte analog dem Procedere in Abschn. 3.1.2

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl erfolgte die optische Zählung am Mikroskop mittels Zählkammer (Neubauer improved). Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, wurde darauf geachtet, dass

die Zelldichte in der Kammer 100 Zellen / 0,1 µl weder signifikant unter- noch überschritt. Jede wie oben beschrieben angesetzte Zellsuspension wurde zweimal gezählt, indem zwischen beide Kammern und das Deckglas jeweils 10 µl Volumen pipettiert wurden. Alle vier Großquadrate beider Kammern wurden ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde als Zellzahl in 0,1 µl Medium näherungsweise angenommen. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wurde das Ergebnis entsprechend dem Gesamtvolumen, aus welchem die Zählprobe gewonnen wurde multipliziert.

3.1.6 Kollagen

Herstellung: In der vorliegenden Arbeit wurde Kollagen I (Cultrex 3-D Culture Matrix™ Rat Collagen I) verwendet. Für experimentelle Applikationen in einer Kollagenkonzentration von 4 mg/ml wurde unter sterilen Bedingungen das Kollagen mit HEPES (1M) und NaHCO₃ (37 g/l) im Verhältnis HEPES/NaHCO₃/Kollagen I; 1:1:8 v/v/v gemischt. HEPES, NaHCO₃ und Kollagen wurden durchgehend bei 4°C auf Eis gelagert. Die Pipettenspitzen und Eppendorftubes wurden bei 4°C vorgekühlt. Hierbei erfolgte im ersten Schritt die Mischung von HEPES und NaHCO₃ in einem Eppendorftube (1,5 ml) im Volumenverhältnis von 1:1. Anschließend wurde das 4-fache des vorgelegten Volumens an Kollagen I hinzugegeben. Mit der Pipette wurden die Komponenten vorsichtig gemischt. Hierbei wurde darauf geachtet keine Blasen zu produzieren. Bei Kühlung auf Eis war das Kollagen 6-8 Min. verwendbar bevor es gelerte. Für geringere Kollagenkonzentrationen als die Standardkonzentration von 4 mg/ml wurde analog zu oben vorgegangen und die gewünschte Konzentration durch Zusatz von D-PBS erreicht.

Anwendung in der 96-Well-Platte: In die Wells einer vorgekühlten (4°C) 96-Well-Zellkulturplatte wurden je 35 µl Kollagen I der gewünschten Konzentration appliziert. Dabei wurde darauf geachtet keine Blasen zu produzieren. Durch kurze Zentrifugation (350g, 20 sek., keine Bremse, 4°C) wurden etwaige Bläschen abzentrifugiert und eine gleichmäßige Beschichtung der Wells erreicht. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurden die beschichteten Wells direkt weiterverwendet oder es wurden 40 µl PBS je Well appliziert um ein Austrocknen des Kollagens zu verhindern. Bei 37°C wurden die beschichteten Platten maximal bis zum nächsten Tag gelagert. Vor der Weiterverwendung wurde das PBS vorsichtig mit der Pipette abgenommen.

Anwendung in der OrganoPlate®: Siehe Abschnitt 3.2.2

3.2 Die OrganoPlate®-3 lane

3.2.1 Aufbau und Funktionsweise der OrganoPlate® 3-lane 40

Die OrganoPlate® 3-lane 40 der Firma Mimetas (Leiden, Niederlande) ist eine Plattform für 3-dimensionale Zellkulturen. In einem 384-Well Zellkulturplattenformat sind 40 Funktionseinheiten (sog. „Chips“) angeordnet. Ein Chip besteht aus 9 quadratisch angeordneten (3 x 3) Wells mit 3 Kanälen (oberer Kanal „OK“, mittlerer Kanal „MK“, unterer Kanal „UK“), wovon jeder über jeweils einen Ein- und Ausgang („In-/Outlet“) verfügt. Im mittleren Well eines Chips befindet sich das sog. „Observation Window“ (OW). In diesem Bereich des OW fusionieren die drei Kanäle und sind nur durch zwei schmale Schwellen („Phaseguides“) am Boden zwischen den Kanälen getrennt. Die Höhe der Kanäle beträgt 220 µm und die Maße der Phaseguides belaufen sich auf 100 x 55 µm (Breite x Höhe).

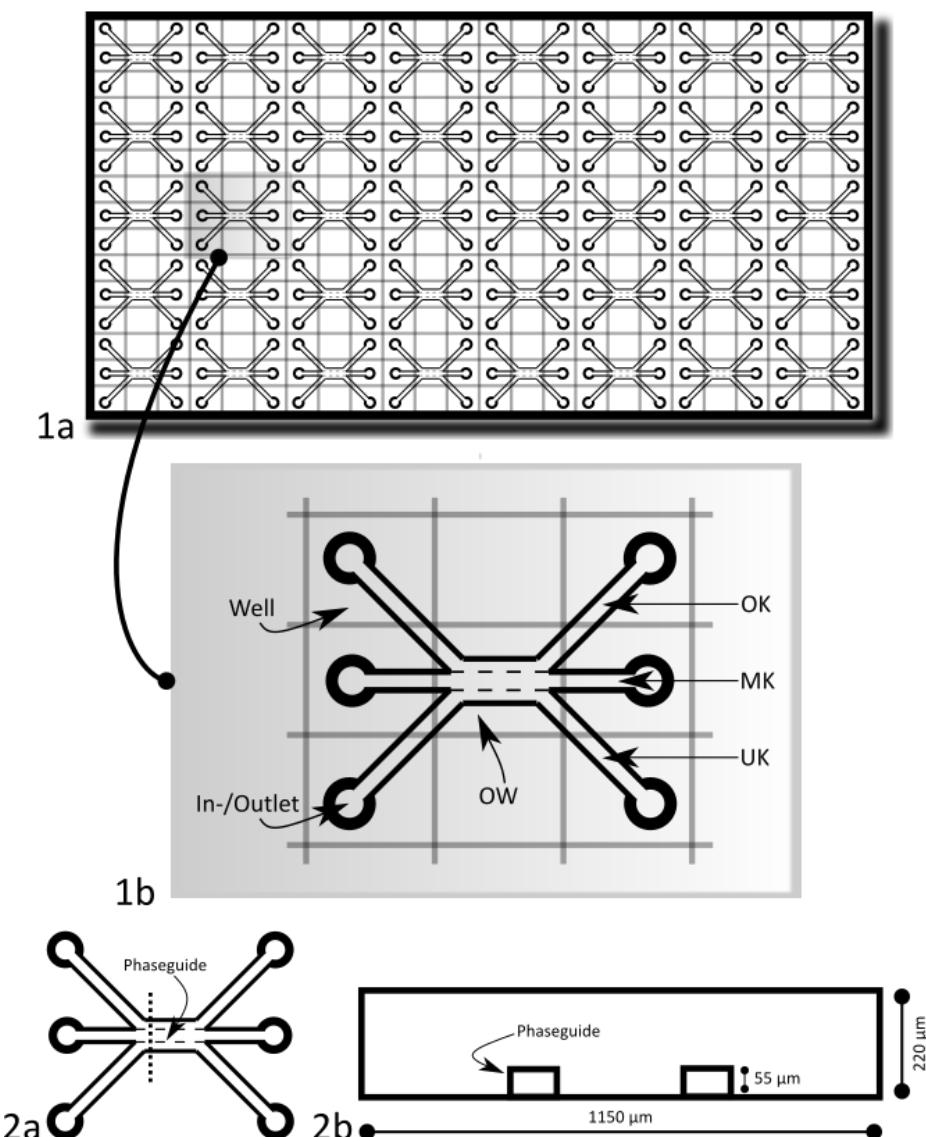


Abbildung 3: Schemazeichnung OrganoPlate® 3-lane 40, Mimetas
Funktionseinheiten der OrganoPlate® (1a) sind die sog. „Chips“ (1a/b), welche aus 3x3 Wells mit 3 Kanälen (oberer/mittlerer/unterer Kanal; OK/MK/UK) bestehen. Zugang besteht über die In- bzw. Outlets der entsprechenden Kanäle innerhalb der Wells. Im Bereich des zentralen Wells (engl.: observation window; OW) werden die Kanäle durch zwei schmale Schwellen (Phaseguides) getrennt (2a/b; 2b Querschnitt im Bereich des OW. Siehe gepunktete Linie in 2a).

Die Phaseguides stellen Leitschienen dar, anhand derer sich die in den MK eingebrachte extrazelluläre Matrix (EZM) über Kapillarkräfte zu einer Membran formiert. Strukturell werden so OK und UK über eine bimeniskal- /bikonkav konfigurierte Barriere voneinander getrennt. So ist bei Einbringung von Zellen in den OK und UK eine Zell-Zell-Interaktion über die EZM im MK möglich. Des Weiteren erlaubt die OrganoPlate®-Plattform einen separaten Zugriff auf die Zellen von apikal als auch von basolateral, was eine große Bandbreite an neuen Interventionsmöglichkeiten bietet. Durch Auslenkung der OrganoPlate® aus der Horizontalebene um definierte Winkel und Zeitintervalle, kann ein bidirektionaler Fluss der Zellkulturmedien in den Kanälen induziert werden. Der von Mimetas entwickelte Perfusion Rocker™ Mini (s. Abb. 5) ermöglicht die Applikation einer definierten und frei einstellbaren Scherkraft auf die adhärenten Zellen.

3.2.2 Kollagen-Implementation

Das Laden der Kollagenmatrix erfolgte weitgehend nach Maßgabe des von Mimetas bereitgestellten Protokolls. (Für den Umgang mit Kollagen siehe Abschn. 3.1.6). Pipettenspitzen und Eppendorftubes wurden bei 4°C vorgekühlt. Kollagen, HEPES und Natriumbicarbonatlösung (37 g/l) wurden durchgängig auf Eis gelagert.

Im ersten Schritt wurden die OWs aller zu beladender Chips mit 50 µl ultra pure dist. water befüllt. Anschließend wurden ca. 1,8 µl (+/- 0,5µl) Kollagen-I in das Inlet des MK gegeben. Es folgte eine Inkubation (37°C, 5-8 Min.) zur Aushärtung des Kollagens und darauffolgend die Beladung des OK (und/oder UK) mit Zellen (s.u.). Für die Barrierefunktion und das Wachstumsmuster der hRPCs zeigten sich jedoch bessere Ergebnisse, wenn die Zellen 6-24 Std. nach der Implementation der EZM in die Chips eingebracht wurden. Hierfür wurden in In- und Outlet des MK nach der EZM-Implementation je 30 µl PBS gegeben und die Platte bei 37°C gelagert.

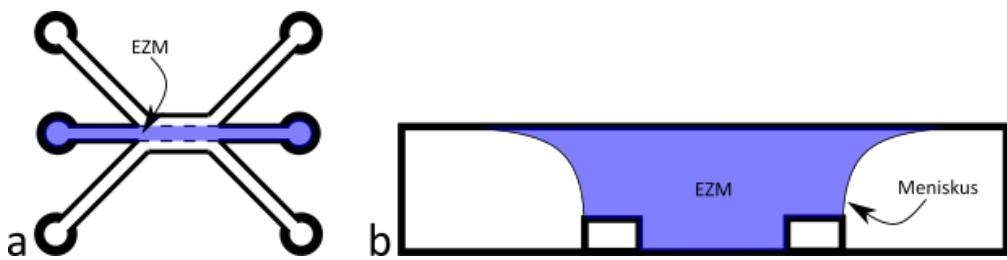


Abbildung 4: Schemazeichnung OrganoPlate® und Matrix

Dargestellt ist die bimeniskal konfigurierte Extrazellulärmatrix- Membran (EZM) entlang der Phasenguides in Aufsicht (a) und Querschnitt (b) eines Chips.

3.2.3 hRPC-Implementation

Die Implementation von Zellen in die OrganoPlate® erfolgte nach Maßgabe von Mimetas. Adhäsente hRPCs einer konfluenten Zellkulturschale wurden zunächst nach Protokoll geerntet (s. Abschn. 3.1.2) und in der gewünschten Konzentration im Nährmedium resuspendiert. Für hRPCs erwies sich eine Konzentration von $7,5 - 10 \times 10^3$ Zellen pro µl als suffizient, um innerhalb von ca. 3 Tagen einen homogenen Tubulus in der OrganoPlate® zu etablieren. Bei der Implementation der Zellen wurde ein Volumen von 2 µl direkt in das Kanalinlet (OK und/oder UK) appliziert. Anschließend wurden 50 µl Nährmedium (s. Abs. 3.1) in das Inlet-Well des Kanals gegeben. Für die Adhäsion der Zellen an die EZM erfolgte anschließend eine Inkubation (37°C, 5 % CO₂) der OrganoPlate® auf dem Mimetas Plate-holder für 3-5 Stunden. Hierbei sorgt die Neigung der OrganoPlate® auf dem Plate-holder (15°

gegen die Vertikale mit dem Zellbeladenen Kanal nach oben und der Oberseite der OrganoPlate® nach unten) dafür, dass die Zellen an der EZM zum liegen kommen (s. Abb. 5). Bei Adhäsion der Zellen (Abflachung der Zellen unter lichtmikroskopischer Kontrolle) wurden weitere 50 µl Nährmedium in das Outlet-Well gegeben und die Platte auf dem Perfusion-Rocker™ platziert. Durch die Einstellung des Rockers wurde die Platte alle 8 Minuten um 7° aus der Horizontalebene ausgelenkt, was zu einer dynamischen Scherkraft (engl.: „fluid shear stress“; FSS) von 0 bis ca. 1,41 dyn/cm² (Mittlerer FSS: 0,13 dyn/cm²) führte (Vormann et al., 2018) (s. auch Abschn. 1.3.1). Ein Mediumwechsel erfolgte 24 Std. nach Zellimplementation und anschließend alle 2 Tage.

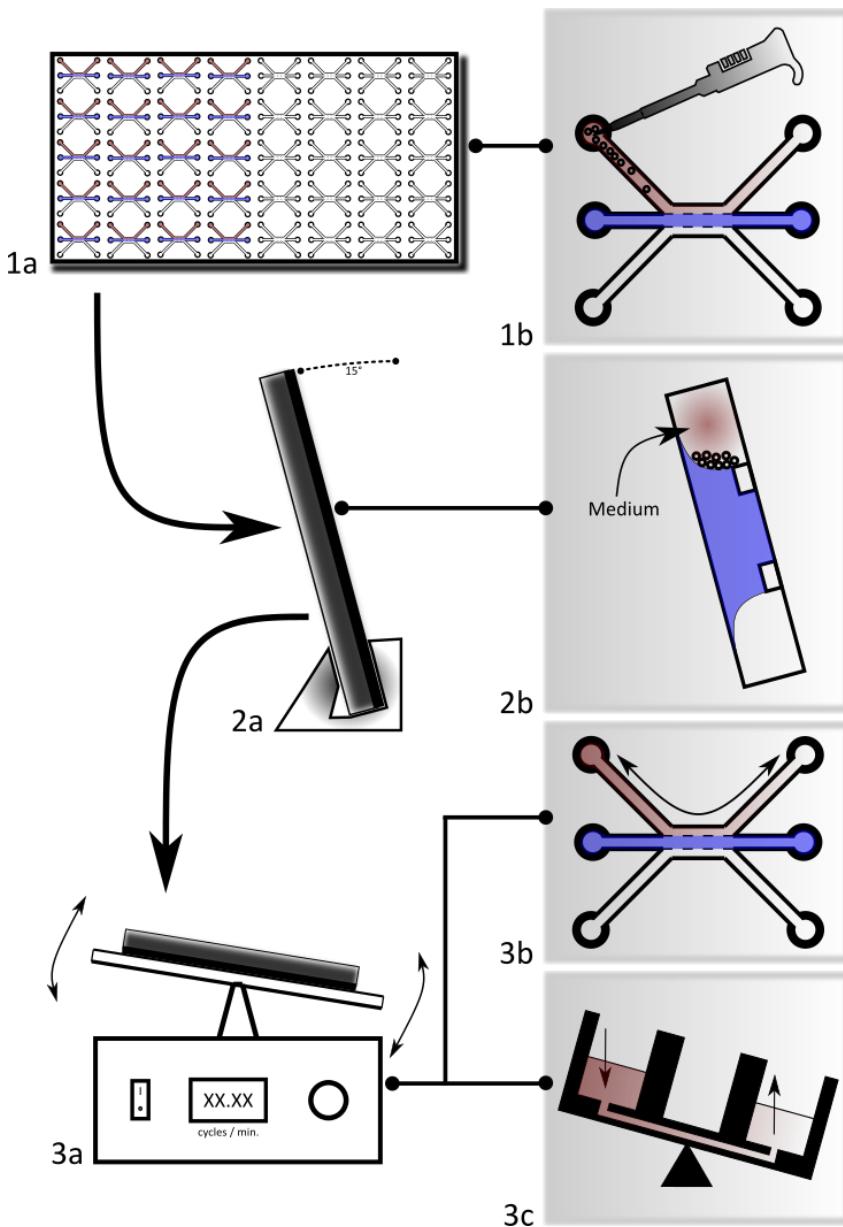


Abbildung 5: Zellimplementation in die OrganoPlate®

Nach Einbringung der Zellsuspension in die Chips (1a/b) erfolgte die Inkubation der Organoplate® in einem Neigungswinkel von 15° gegen die Vertikale (2a). Dies bewirkte die Adhäsion der eingebrachten Zellen am Meniskus der EZM (2b). Durch Platzierung auf dem Rocker (3a) wurde über Auslenkung der Organoplate aus der Horizontalen (7° alle 8 Min.) ein bidirekionaler Fluss in den Kanälen induziert (3b/3c).

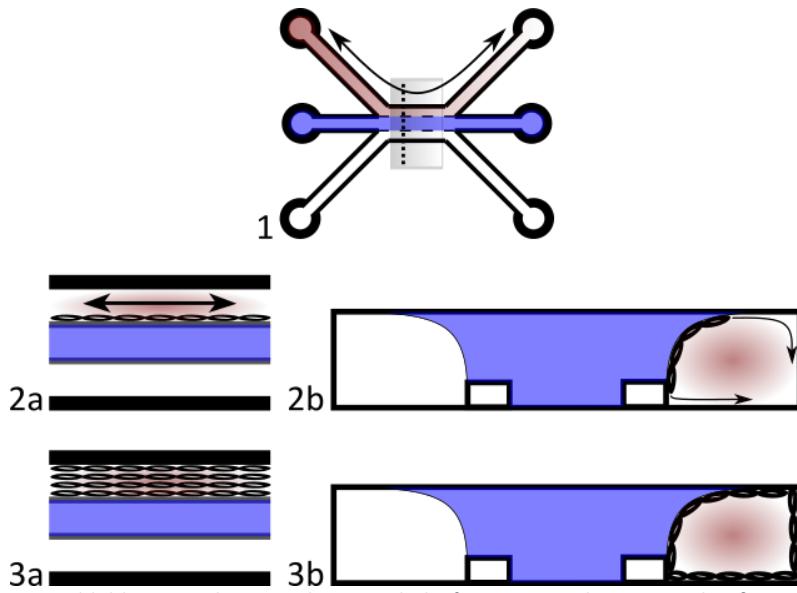


Abbildung 6: Schemazeichnung Tubulusformation in der OrganoPlate®

Detailansicht in Aufsicht (2a+3a) bzw. im Querschnitt (2b + 3b; s. gestrichelte Linie in 1). Nach Zelladhäsion an der EZM (2a/b) bildete sich unter Perfusionsbedingungen innerhalb weniger Tage eine geschlossene Zellschicht (3a/b)

Für den Vergleich von 2D- und 3D-Zellkultur erfolgte bei der 2D-Zellkulturetabstirierung die Matrix und Zellimplementation analog zu dem oben beschriebenen. Lediglich die Adhäsionszeit auf dem Plate-holder sowie die anschließende Perfusion auf dem Perfusion-Rocker wurden weggelassen um einen 2D-Zellrasen in der OrganoPlate® zu erhalten.

3.2.4 Leukozyten-Implementation

Primäre humane Leukozyten wurden nach der Isolation (s. Abs. 3.1.3) in die gewünschte Konzentration (s.u.) gebracht und aufgrund ihrer limitierten Stabilität bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert. Es wurde eine maximale Dauer zwischen Isolation und Implementation von 30 Min. toleriert. Je nach Fragestellung wurden die einzelnen Fraktionen (PBMCs und PMNs) oder PBMCs und PMNs gemeinsam in die OrganoPlate® eingebracht. Als suffiziente Zellkonzentration für eine reproduzierbare Applikation in den Chip erwiesen sich 15.000 Leukozyten pro 1 μ l RPMI. Von dieser Zellsuspension wurden 2 μ l (entsprechend 30 x 10³ Zellen) in das gewünschte Kanalinlet eines Chips gegeben. Hierbei wurde darauf geachtet die Pipettenspitze direkt in dem Inlet des Kanals zu positionieren und das Volumen langsam zu applizieren, damit die Leukozyten direkt in den Kanal und nicht in das Well gelangten. Etwaige im Leukozytenkanal vorhandene Flüssigkeit wurde vor der Leukozytenapplikation mit der Pipette abgenommen um das Eintreten der Leukozyten in den Kanal zu erleichtern. Nachfolgend wurden 30 μ l RPMI in das Well des Kanalinlets appliziert. Der resultierende hydrostatische Druck führte zu einer guten Verteilung der Leukozyten an der Kollagenmembran im Bereich des OW. Abschließend wurden 30 μ l RPMI in das Outlet-Well desselben Kanals gegeben. Die Endkonzentration der Zellen im Leukozytenkanal belief sich somit auf 30 x 10³ Zellen / 62 μ l Medium – entsprechend ca. 500 Zellen / μ l.

3.2.5 Barrierefunktionsmessung in der OrganoPlate®

Die Barrierefunktions-Messung (engl.: „Barrierintegrityassay“; BIA) stellt eine Methode zur Evaluation der Barrierefunktion eines Zellrasens hinsichtlich seiner Dichtigkeit in Bezug auf ein Indikatormolekül dar. Hierfür wurden fluoreszenzmarkierte Moleküle in den zellhaltigen Kanal eingebracht und mittels Fluoreszenzmikroskop die Lichtintensität im Zeitverlauf in allen drei Kanälen bestimmt (s. Abb. 7). Als Indikatormoleküle wurden Dextran und Sinistrin verwendet, welche jeweils mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert waren (siehe Tab. 2).

Molekül	Chemische Struktur	Molare Masse (kDa)	Anmerkung
Dextran	Polysaccharid	150	
Sinistrin	Polysaccharid (Inulin-Analogon)	3,5 (2-6)	Goldstandard zur <i>in vivo</i> Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (Sinistrinclearance)
FITC	Fluorescein-Derivat	0,389	Exzitationsmax.: 495 nm, Emissionsmax.: 519 nm

Tabelle 2: Charakteristika verwendeter BIA-Indikatoren

Die Durchführung des BIA orientierte sich an dem von Mimetas bereitgestellten Protokoll. Zunächst wurde die Stocklösung des FITC-Dextran (25 mg/ml in HBSS) im Verhältnis 1:50 im Nährmedium verdünnt um die Arbeitslösung zu erhalten (Arbeitslösung: 0,5 mg/ml). Das Nährmedium wurde abhängig vom verwendeten Zelltyp gewählt (s Abs. 3.1) und auf 37°C vorgewärmt. Es folgte die Entfernung von Medium aus allen In-/Outlets der zu messenden Chips und anschließend die Zugabe von 20 µl Medium in In-/Outlet der nicht-zellhaltigen Kanäle. Zuletzt wurden 50 µl der Arbeitslösung in das Inlet - und 20 µl in das Outlet des zellhaltigen Kanals appliziert. Der durch die Volumendifferenz induzierte Druckgradient bewirkte durch den konsekutiven Fluss im Kanal eine gleichmäßige Verteilung des Indikators im Bereich des OW.

Um möglichst genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden alle Einstellungen am Fluoreszenz-Mikroskop im Vorhinein getroffen und darauf geachtet, die Zeit zwischen Zugabe des Farbstoffes und dem Start der Aufnahmen möglichst gering zu halten. Es wurde eine Aufnahmefrequenz mit 1 / Min. pro Chip gewählt. Die Fokusebene wurde für eine genaue Reproduzierbarkeit in Höhe der Phasenführungen gelegt. Zwischen den Aufnahmen wurde durch manuelle Auslenkung der Platte aus der Horizontalebene (10° für 10 sek.) ein kontinuierlicher bidirektionaler Fluss induziert um eine möglichst genaue Aussage über die Barrierefunktion unter Perfusionsbedingungen treffen zu können.

3.2.5.1 Datenaufbereitung

Die Datenaufbereitung erfolgte nach Maßgabe von Mimetas. Der Rohdatensatz belief sich auf die Bilder im Zeitverlauf der Barriermessung (s. Abb. 7). Diese wurden in die ImageJ basierte open source Software Fiji geladen und anschließend „Stack-“ transformiert (via Image -> Stacks -> Images to Stack) sowie auf 8 bit reduziert (via Image -> Type -> 8-bit). Mittels des Plugins „Template Matching“ (via Plugins -> Template Matching -> Align slices in Stack) wurden die interessierenden Bereiche exakt übereinandergelegt. Über die Funktion „ROI- (engl.: „region of interest) Manager“ (via Analyze -> Tools -> ROI-Manager) wurde eine

rechteckige ROI über den Kanal gelegt, welchem initial der Fluoreszenzfarbstoff zugefügt wurde. Diese ROI wurde in die Messung einbezogen (->Add) und dann in den angrenzenden Matrixkanal verschoben. Durch erneute Auswahl von „Add“ auf dem ROI-Manager wurde auch dieses Areal in die Messung einbezogen. Dieselbe Prozedur erfolgte für den dritten Kanal des Chips (s. Abb. 7).

Im letzten Schritt wurden über die Funktion „Multi Measure“ (via ROI-Manager -> More -> Multi Measure) die Lichtintensitäten in den ROIs tabellarisch ausgegeben. Diese Daten wurden als Excel-Dokument in .csv-Format abgespeichert und mittels R-Software oder GraphPad Prism 9 (.xlsx) weiter analysiert und graphisch dargestellt. Die Werte der Lichtintensitäten über die Zeit in den zu messenden Kanälen wurden in Prozent der mittleren Lichtintensität des Kanals, in welchen der Indikator initial appliziert wurde, normalisiert angegeben (s. Abb. 7).

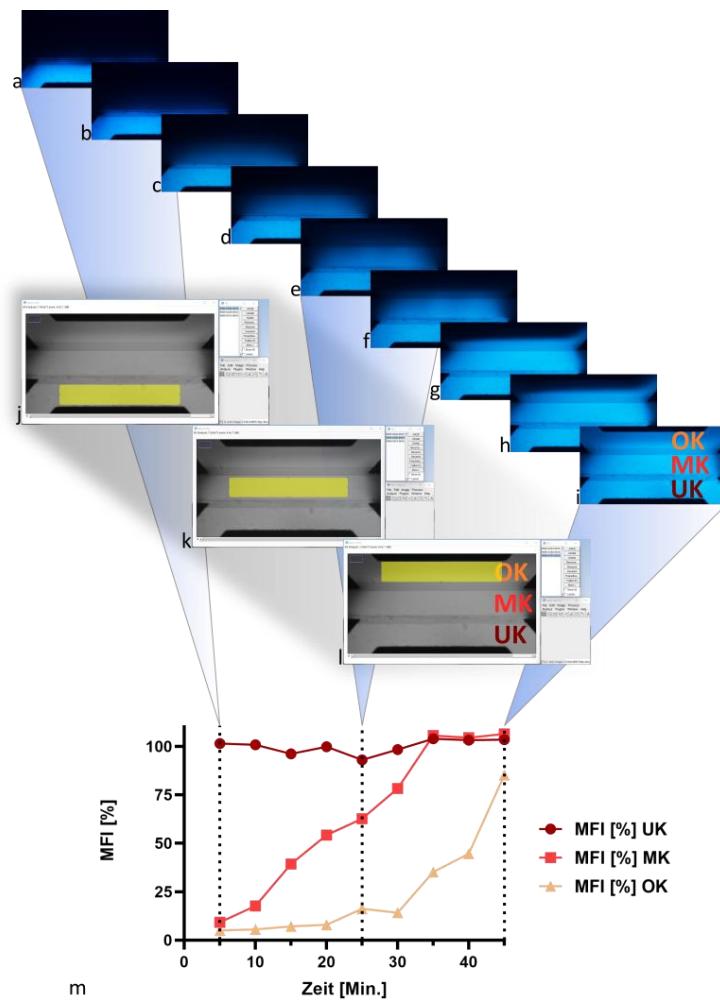


Abbildung 7: Datenaufbereitung der Barrierefunktionsmessung

a-i: Sequentielle fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Chips. Nach Applikation des fluoreszierenden Indikatormoleküls in den unteren Kanal (UK) erfolgten sequentielle (hier alle 5 Min.) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Der Indikator diffundierte über die Zeit (a – i) vom UK über die zelluläre Barriere in die Matrix des mittleren Kanals (MK) und von dort weiter in den oberen Kanal (OK). j-l: Fiji-basierte Datenaufbereitung. Nach Stack-Transformation der Bilder und Reduktion auf 8-bit erfolgte die manuelle Eingabe einer „region of interest“ (ROI; gelbe Rechtecke), in welcher anschließend die Lichtintensität gemessen wurde. Die Messwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wurden anschließend normalisiert in % der MFI im UK über die Zeit dargestellt (m)

3.3 Immunzellmigration „on-the-Chip“

Anmerkung: Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Protokollentwicklung einer *in vitro* Ko-Kultur als Modell für einen hRPC-Tubulus. Im Zuge dessen sollte evaluiert werden, ob und unter welchen Bedingungen eine Migrationsinduktion (i.S. eines hRPC-basierten Schädigungsmodells) humaner primärer Leukozyten im Chip möglich ist.

Das im Folgenden beschriebene Protokoll zur Migrationsinduktion ist im Rahmen dieser Arbeit entwickelt worden. Da Bestandteile davon ebenfalls Grundlage für weitere Applikationen waren, finden sich die final ausgearbeiteten Arbeitsschritte im folgenden Methodenteil. Gleichzeitig stellt dieses Protokoll im Rahmen der Modellentwicklung ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit dar, weswegen sich im Ergebnisteil (s. Abschn. 4.7) wiederum der Verweis auf diesen Abschnitt findet.

3.3.1 Übersicht und Arbeitsschritte

Für die Migration von primären humanen Leukozyten entlang eines Chemokingradienten in die Kollagenmatrix der OrganoPlate® waren mehrere Arbeitsschritte vonnöten; diese umfassten die

1. Extrazellulärmatriximplementation: Einbringung der Extrazellulärmatrix (EZM) (unterschiedliche Konzentrationen) in den mittleren Kanal (s. Abschn. 3.2.2),
2. hRPC-Implementation: Einbringung der hRPCs in die OrganoPlate® mit Ausbildung eines intakten Tubulus (s. Abschn. 3.2.3)
3. Erzeugung eines chemotaktischen Gradienten: Etablierung eines Lockstoffgradienten über die EZM durch
 - die Herstellung und Einbringung einer Lockstofflösung (s. Abschn. 3.3.2) oder
 - die *in vitro* Schädigung eines etablierten Tubulus mit konsekutiver Freisetzung chemotaktisch wirkender Moleküle (s. Abschn. 3.3.5)
4. Leukozytenimplementation: Isolation aus humanem Vollblut (s. Abschn. 3.1.3) und Implementation der isolierten Leukozyten / Leukozytenfraktionen in die OrganoPlate® (s. Abschn. 3.2.4).

3.3.2 Herstellung der Lockstofflösung (LSL)

Die Herstellung einer Lockstofflösung (LSL; s. auch Abb. 8) zur Induktion der Migration von primären Immunzellen erfolgte *in vitro*. Hierfür wurden 3 Mio. hRPCs nach dem Erntevorgang (s. Abschn. 3.1.2) einer konfluenten Zellkulturschale zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in 1 ml PBS resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden diese Zellen durch fünfmaliges Einfrieren (bei -20°C, ca. 5 Min. bis zum Entstehen von Kristallen) und Auftauen (bei 37°C im Wasserbad) mechanisch zerstört („necrotic soup“). Durch Zentrifugation (350 g, 5 Min.) und Verwerfen des Pellets wurden zelluläre Bestandteile der necrotic soup entfernt. Im Anschluss wurden hRPCs einer konfluenten Zellkulturschale (5 cm) mit der necrotic soup stimuliert. Hierfür wurde das Medium der konfluenten Zellkulturschale gewechselt und das frische Medium mit 0,3 ml der necrotic soup versetzt. Es folgte eine 24-stündige Stimulation im Inkubator (37°C, 5 Vol-% CO₂). Der Überstand dieser Platte wurde abgenommen und durch Zentrifugation (350 g, 5 Min.) von etwaigem Zelldetritus befreit. Es wurde angenommen, dass die so erhaltene Flüssigkeit (Lockstofflösung; LSL) durch die Stimulation von hRPCs mit

Material zerstörter Zellen (DAMPs) Moleküle enthielt, welche potentiell als Chemotaxine fungieren könnten (LSL als Chemotaxisinduktor). Für die Migrationsversuche wurden von der fertigen LSL je 30 µl in In-/Outlet des „Zielkanals“ gegeben.

Die stimulierten Zellen wurden für bestimmte Fragestellungen geerntet (s. Abschn. 3.1.2) und ebenfalls in den Chip eingebracht (s. Abschn. 3.2.3).

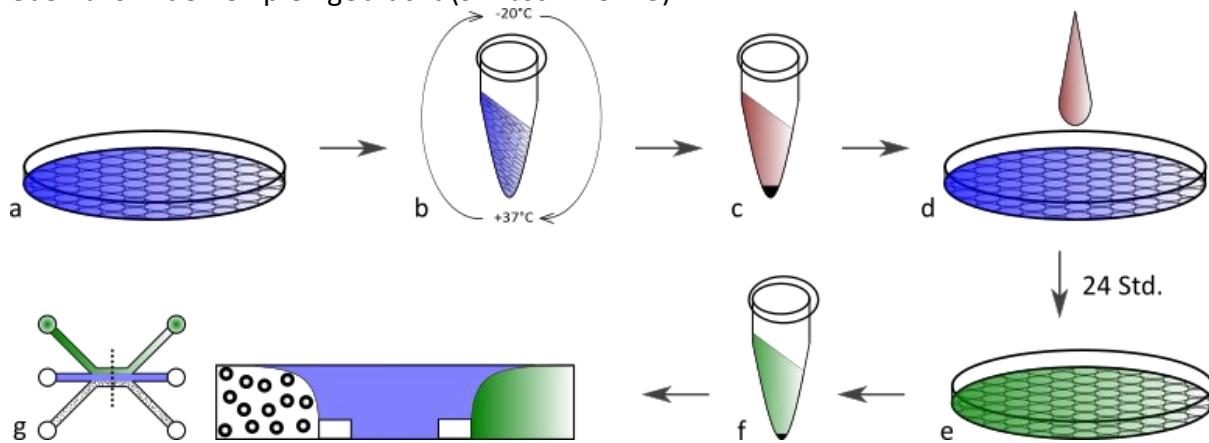


Abbildung 8: Herstellung einer Lockstofflösung *in vitro*

3 Mio. hRPCs einer konfluenten Zellkulturschale (a) wurden geerntet, abzentrifugiert, in ein Eppendorftube in 1 ml PBS resuspendiert und 5- malig eingefroren und wieder aufgetaut (b). Nach erneuter Zentrifugation bei 350 g für 5 min. (c) wurden vitale hRPCs (d) mit 0,3 ml des Überstandes (aus c) für 24 Std. stimuliert (e). Dieser Überstand wurde ebenfalls zentrifugiert zur Entfernung etwaiger zellulärer Bestandteile (f). Die so erzeugte Lösung wurde zur Migrationsinduktion in den Chip eingebracht (g)

3.3.3 Chemotaxis: Statische Bedingungen

Nach Einbringung von EZM, LSL (je 30 µl in In- und Outlet des „Zielkanals“) und Leukozyten in die OrganoPlate®, wurde diese anschließend für 24 Std. auf dem Plate-holder (s. auch Abb. 5) inkubiert.

Die Auslesung der Migration erfolgte nach 6 und 24 Stunden mittels Lichtmikroskopie und Fotodokumentation.

3.3.4 Chemotaxis: Fluide Bedingungen

Nach Einbringung von EZM, LSL (je 30 µl in In- und Outlet des „Zielkanals“) und Leukozyten in die OrganoPlate®, wurde diese anschließend für 24 Std. auf dem Perfusion-Rocker™ inkubiert. Die Auslesung der Migration erfolgte nach 6 und 24 Stunden mittels Lichtmikroskopie und Fotodokumentation.

3.3.5 Chemotaxis: *in vitro*-Schädigungsmodell

Etablierte, 72 Std. alte Tubuli wurden *in vitro* mittels Histone geschädigt (s. Abb. 9). Hierfür erfolgte ein Mediumwechsel mit unterschiedlichen Histonkonzentrationen und eine anschließende 24-stündige Inkubation auf dem Perfusion-Rocker™ (37°C, 5 Vol.-% CO₂). Darauf folgte die Implementation (s Abschn. 3.2.4) zuvor isolierter (s. Abschn. 3.1.3) humarer primärer Leukozyten sowie eine weitere 24-stündige Inkubation auf dem Rocker. Die Quantifizierung der gewanderten Leukozyten erfolgte mittels Lichtmikroskopie und softwarebasierter Auszählung (s. Abschn.3.3.6).

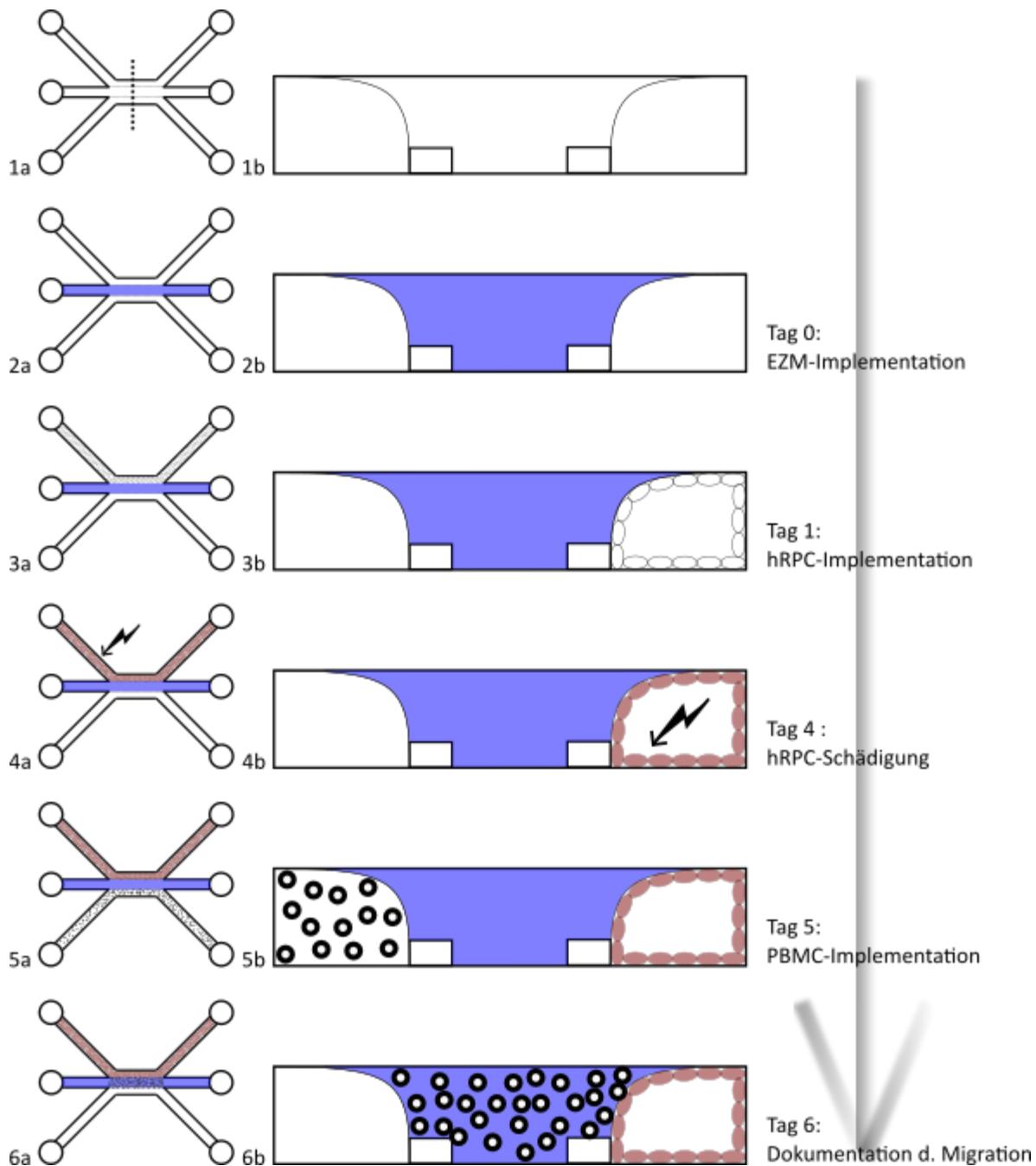


Abbildung 9: Versuchsablauf der Migrationsinduktion im Chip

Nummerierung 1 bis 6 (Spalten) in zeitlicher Abfolge der Arbeitsschritte. 1-6b zeigen die jeweils korrespondierenden Querschnitte (eingezzeichnet in 1a) der Chips (Spalte 1-6a). Nach Implementation von Matrix (EZM) und hRPCs in den Chip, wurde die Organoplate® für 72 Std. inkubiert. Anschließend (Tag 4) erfolgte die Schädigung des mittlerweile etablierten Tubulus mittels Histone. 24 Std. darauf (Tag 5) wurden humane primäre PBMCs isoliert und in den Chip implementiert. Der Read-out erfolgte nach weiteren 24 Std. (Tag 6) auf dem Rocker mittels Fotodokumentation.

3.3.6 Datenaufbereitung

Die Datenakquise erfolgte per Lichtmikroskopie mit anschließender softwarebasierter Auszählung der gewanderten Leukozyten in der Kollagenmatrix (s. Abb. 10). Hierfür wurde das Bildmaterial mittels der Software „GNU Image Manipulation Program“ (GIMP) auf den interessierenden Bildausschnitt (Matrixkanal) zugeschnitten und mittels dem Threshold-Tool (Color -> Threshold) die Farbinformation binarisiert. Die Threshold wurde dabei so adjustiert,

dass sie bei uniformer Anwendung auf alle auszuwertenden Bilder eine gute Abbildung der Anzahl der gewanderten Leukozyten ergab. Im Folgenden wurde die Datei in .png-Format gespeichert und in Fiji (Schindelin et al., 2012) (ImageJ-basiertes Bildbearbeitungsprogramm) geöffnet. Nach Reduzierung der Bildinformation auf 8 bit (Image -> Type -> 8 bit) und Anwendung der Threshold (Image -> Adjust -> Threshold) wurden die Zellen ausgezählt (Analyze -> Analyze Particles). Um die Spezifität der Auszählung für Zellen zu erhöhen wurden nur Objekte in die Zählung miteinbezogen welche größer gleich 30 Pixel² waren und eine annähernd runde Geometrie zeigten (Circularity 0,50-1,00). Über die Optionen im Menü von „Analyze particles“ konnten diese Parameter festgelegt werden. Über „Display results“ wurden die Anzahl und Koordinaten der gewanderten Leukozyten als Tabelle ausgegeben. Die zusätzliche Auswahl von „Show outlines“ bot die Möglichkeit das finale Bild mit dem Original abzugleichen um ggf. Verbesserungen in den genannten Optionen zu tätigen. Durch die Anwendung gleicher Parameter auf alle Rohdaten ließen sich objektive und reproduzierbare Daten generieren.

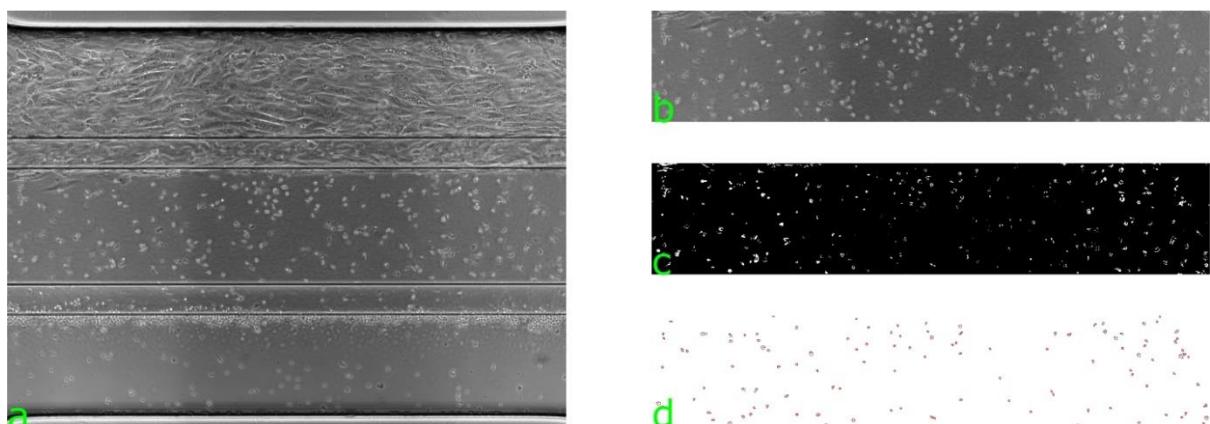


Abbildung 10: Datenaufbereitung Zellmigration

Die lichtmikroskopischen Bilder (a) wurden auf den interessierenden Ausschnitt zugeschnitten (b). Nach Festlegung eines einheitlichen Schwellengrauwertes wurden die Ausgangsbilder binarisiert (c). Nach Definition einer bestimmten Morphologie und Größe (s. Text) erfolgte die softwarebasierte Auszählung (d).

3.4 Färbungen

3.4.1 Chemische Fluoreszenzfärbung

3.4.1.1 Acridin-Orange (AO)

Für die Färbung in der OrganoPlate® erfolgte zunächst die Entfernung des Mediums aus allen Kanälen mit anschließender Applikation von 70µl Arbeitslösung (s. Tab. 3) in das Inlet und 30µl Arbeitslösung in das Outlet des zellhaltigen Kanals. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten 30 Min. nach Applikation des AO.

Farbstoff	<ul style="list-style-type: none"> • Unterscheidung von DNA und RNA <ul style="list-style-type: none"> ○ dsDNA-Farbstoff-Komplex <ul style="list-style-type: none"> ▪ Absorption 502 nm, Emission 526 nm (grün) ○ RNA- (und ssDNA-) Farbstoff-Komplex <ul style="list-style-type: none"> ▪ Absorption 460 nm, Emission 650 nm (rot)
Färbeverhalten	Permeiert tote und lebende Zellen und generiert bei Kernbindung grünes Signal.
Molgewicht	265,35 g/mol

Arbeitslösung	0,5-1µg/ml (=1,884 - 3,769µM)
Arbeitslösung an hRPCs:	0,5µg/ml (in PBS)

Tabelle 3: Charakteristika des Farbstoffes Acridin-Orange

3.4.1.2 Calcein-AM (Calcein-O,O'-diacetate-tetrakis-(acetoxyethyl)-ester)

Der Acetoxymethylester von Calcein (Calcein-AM) kann frei über Zellmembranen nach Intrazellulär diffundieren und wird dort von zellulären Esterasen zu Calcein hydrolysiert. Dieses zeigt nach Calciumchelatisierung eine grüne Fluoreszenz (s. Abb. 11). Das Anregungsmaximum des Calceins liegt bei 494 nm und das Emissionsmaximum liegt bei 517 nm. In toten Zellen kommt es aufgrund des Mangels an Esterasen nicht zur Fluoreszenz. Der Export des Calcein-AM-Komplexes ist energieabhängig und an die Aktivität des ABC-Transporters Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR1 / p-Glykoprotein „P-gp“) und in geringerem Umfang Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) gebunden. Dies resultiert in einer negativen Korrelation von MDR1-Aktivität und Fluoreszenzsignalintensität (Fruttero et al., 2010).

MDR1 lässt sich mit dem Calciumantagonisten Verapamil hemmen. Dies führt zu einer Anhebung der Signalintensität durch verminderter Efflux von Calcein (Jang et al., 2013; Schutgens et al., 2019; Thomas & Coley, 2003). Die genannten physikalischen und zellbiologischen Mechanismen machen Calcein-AM geeignet zur Detektion von lebenden Zellen („Cellviability“) sowie für Studien zur „Drug-Drug-Interaction“ (Fruttero et al., 2010).

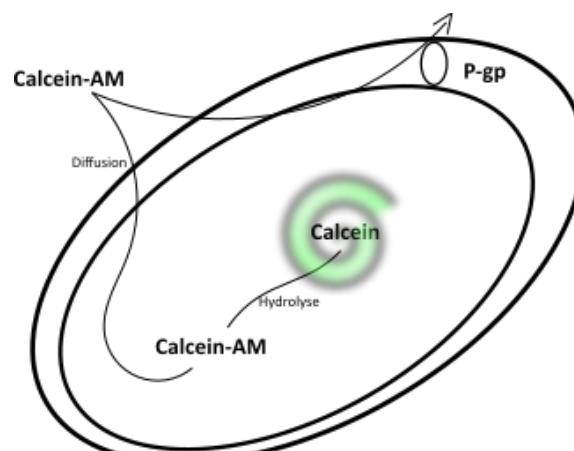


Abbildung 11: Calcein-Färbung

Calcein-Acetoxymethylester diffundiert frei über die Zellmembran nach Intrazellulär und wird dort von zellulären Esterasen in das fluoreszierende Calcein hydrolysiert. Der Efflux geschieht über P-gp.

Für die Calcein-Färbung wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums für 30 Min. mit 100µl Calcein-AM-Lösung (2 µM) inkubiert (37°C, 5 Vol.-% CO₂). Hierfür wurde die Calcein-Stammlösung (50µg Calcein-AM + 25µl DMSO [2mM]) durch Verdünnung mit PBS (1:1000) in die gewünschte Arbeitslösung überführt.

Für die Hemmung von MDR1 erfolgte eine 60-minütige Vorbehandlung mit 100µM Verapamil in RPC-Medium. Anschließend erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Fotodokumentation.

3.4.1.3 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

DAPI wurde nach Herstellerangaben in Dimethylformamide gelöst (Stammlösung: 14,3 mM) und anschließend in zwei Verdünnungsschritten mit PBS auf die Konzentration der Arbeitslösung (300 nM) überführt. Diese wurden bis zu ihrer Verwendung unter Lichtabschluss auf Eis gelagert. Die Inkubationszeit nach Applikation der DAPI-Färbung betrug 30 Minuten.

3.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen

3.4.2.1 Immunfluoreszenzfärbung in der OrganoPlate® 3-lane 40

Es wurde nach dem von Mimetas zur Verfügung gestellten Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung in der OrganoPlate® vorgegangen. Die wesentlichen Arbeitsschritte umfassten das Fixieren, Waschen, Permeabilisieren und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Hernach folgte die eigentliche Färbung mit primären und sekundären Antikörpern sowie direkten nukleären Färbereagenzien. Um gute Färbeergebnisse zu erhalten, wurde während der gesamten Prozedur durch Pipettierschemata (s.u.) und/oder Kippung der Platte eine ausreichende Perfusion der Kanäle sichergestellt. Die gesamte Prozedur erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Im ersten Schritt wurde nach Aspiration des Mediums aus allen Wells die Fixierlösung (3,7% Formaldehyd in HBSS) nach Schema 1 (s. Abb. 12) hinzugegeben und für 10-15 Min. inkubiert.

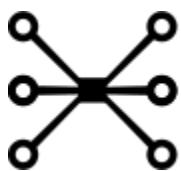


100 µl		50 µl
50 µl		50 µl
50 µl		50 µl

Abbildung 12: Pipettierschema 1

Nach Aspiration der Fixierlösung erfolgten zwei Waschschrifte mit jeweils 5 Min. Inkubation. Im ersten Waschschrift wurde in jedes Well 50µl PBS appliziert. Im 2. Waschschrift wurde nach Schema 1 (s. Abb. 12) PBS in die Wells gegeben. Durch Applikation von 50µl PBS zu jedem Well war nach den Waschschriften an diesem Punkt eine Lagerung von 2 Wochen bei Raumtemperatur möglich. Alternativ konnte direkt mit der Färbung fortgefahrene werden.

Es erfolgte zunächst die Herstellung des Permeabilisations-Puffers (0,3% Triton X-100), der Blockierlösung (2% FBS, 2% Bovines Serumalbumin (BSA), 0,1% Tween20 in PBS) und der Waschlösung (4% FBS in PBS). Nach Aspiration des PBS wurden die Zellen zunächst nach Schema 1 mit Waschlösung behandelt (Inkubation: 5 Min.) und anschließend mit Permeabilisations-Puffer permeabilisiert (Applikation nach Schema 1, Inkubation: 10 Min.). Nach dem folgenden Waschschrift (WL, Schema 1, Inkubation: 5 Min.) wurden mittels Blockierlösung unspezifische Proteinbindungsstellen für 30-45 Min. blockiert (Schema 1). In der Zwischenzeit wurden die primären Antikörper in Blockierlösung auf die jeweilige Konzentration verdünnt (s. Abschn. 3.4.2.3) und auf Eis gelagert. Pro Chip wurde hier ein Volumen von 80µl kalkuliert. Dieses wurde nach Schema 2 (s. Abb. 13) nach Aspiration der Blockierlösung in die Wells gegeben. Die Inkubationszeit betrug 1-2 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.



40 µl		10 µl
20 µl		10 µl

Abbildung 13: Pipettierschema 2

Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in Blockierlösung verdünnt (s. Abschn. 3.4.2.3) und unter Lichtabschluss auf Eis gelagert. Nach zweimaligem Waschen (2x3 Min. mit Waschlösung nach Schema 1) erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (Schema 2) und Inkubation für 30 Min. unter Lichtabschluss. Zur Reduktion von Hintergrundsignalen erfolgte erneutes zweimaliges Waschen (2x3 Min. mit Waschlösung nach Schema 1). Bei Verwendung enzymgekoppelter sekundärer Antikörper wurde in einem weiteren Schritt das Enzymsubstrat hinzugegeben (s. Abschn. 3.4.2.3.) und erneut mit Waschlösung nach Schema 1 für 3 Min. gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte die nukleäre Gegenfärbung mittels DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol; s. Abschn. 3.4.1.3) nach Schema 2. Nach Aspiration und Waschen (mit PBS nach Schema 1 für 1 Min.) wurde abschließend in jedes Well 50µl PBS gegeben. Die Auswertung erfolgte innerhalb von 2 Tagen.

3.4.2.2 Immunfluoreszenzfärbung in 96-Well-Zellkulturschalen

Für Immunfärbungen wurden analog zur OrganoPlate® 15×10^3 hRPCs je Well mit 100 µl Medium für 3 Tage bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte nach 24 Std. Das Protokoll zur Immunfluoreszenz-Färbung in der OrganoPlate® (s.o.) wurde für das 96-Well-Format mit einigen Adaptationen übernommen.

Im ersten Schritt wurde nach Aspiration des Mediums aus allen Wells 100µl Fixierlösung (3,7% Formaldehyd in HBSS) hinzugegeben und für 10-15 Min. inkubiert.

Nach Aspiration der Fixierlösung erfolgten zwei Waschschrifte (PBS, 100µl/Well, 5 Min. Inkubation) mit anschließender Applikation von 100µl Waschlösung (4% FBS in PBS) für 5 Minuten. Dann erfolgte die Permeabilisation mit 100µl Permeabilisationspuffer (0,3% Triton X-100) pro Well für 10 Min. und erneutes Waschen (Waschlösung, 100µl/Well, 5 Min.) des Ansatzes. Mittels 100µl/Well Blockierlösung (2% FBS, 2% Bovines Serumalbumin (BSA), 0,1% Tween20 in PBS) erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit einer Inkubationszeit von 30-45 Minuten. Mit den primären und sekundären Antikörpern wurde analog zu Abschn. 3.4.2.1 verfahren. Das applizierte Volumen des primären Antikörpers pro Well belief sich bei gleichen Antikörper-Konzentrationen auf 50µl / Well mit einer Inkubation für 1-2 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Der sekundäre Antikörper wurde auch bei gleicher Konzentration und Inkubationszeit mit 50µl / Well appliziert. Abschließend erfolgten zwei Waschschrifte (Waschlösung, 100µl/Well, 3 Min. Inkubationszeit) sowie bei enzymgekoppelten sek. Antikörpern die Hinzugabe von 50µl des Enzymsubstrates. Die nukleäre Gegenfärbung erfolgte mit DAPI mit 50 µl/Well für 30 Minuten. Nach Aspiration und Waschen (PBS, 100µl/Well, 1 Min.) wurde abschließend in jedes Well 50µl PBS gegeben. Die Auswertung erfolgte innerhalb von 2 Tagen.

3.4.2.3 Primäre und sekundäre Antikörper

Zonula-occludens 1 (ZO-1): Der Antikörper gegen ZO-1 (s. Abschn. 2.3) wurde in Blockierlösung (2% FBS, 2% Bovines Serumalbumin (BSA), 0,1% Tween20 in PBS) im Verhältnis 1/25 verdünnt und bis zu seiner Verwendung auf Eis gelagert. Als sekundärer Antikörper wurde anti-rabbit IgG AlexaFluor® 488 mit einem Verdünnungsfaktor von 1/100 in Blockierlösung angesetzt und bis zu seiner Verwendung unter Lichtabschnitt auf Eis gelagert.

F-Aktin: Der Antikörper gegen F-Aktin (s. Abschn. 2.3) wurde in Blockierlösung im Verhältnis 1/480 verdünnt und bis zu seiner Verwendung auf Eis gelagert. Als sekundärer Antikörper wurde anti-mouse IgM (Biotinylated) mit einem Verdünnungsfaktor von 1/25 in Blockierlösung angesetzt und bis zu seiner Verwendung auf Eis gelagert. Nach Inkubation und Waschschritt (s.o.) wurde Straptavidin-FITC im Verhältnis 1/25 in PBS verdünnt und unter Lichtabschluss für 30 Min. inkubiert.

Natrium-Kalium-ATPase: Der Antikörper gegen Na⁺-K⁺-ATPase (s. Abschn. 2.3) wurde in Blockierlösung im Verhältnis 1/400 verdünnt und bis zu seiner Verwendung auf Eis gelagert. Als sekundärer Antikörper wurde anti-rabbit IgG AlexaFluor® 488 mit einem Verdünnungsfaktor von 1/100 in Blockierlösung angesetzt und bis zu seiner Verwendung unter Lichtabschnitt auf Eis gelagert.

3.4.3 Datenaufbereitung

Die Bildakquise chemischer und immunologischer Fluoreszenzfärbungen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mit anschließender deskriptiver und software-basierter Analyse des Bildmaterials. Innerhalb eines normierten Bildausschnittes (gesamter zellhaltiger Kanal im Bereich des observation window (OW)) wurde die Fluoreszenz-Signalintensität gemessen und ein Wert für die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt. Dies erfolgte mittels der open source Software Fiji analog zur BIA-Analyse (s. Abs. 3.2.5.1). Über die Funktion „ROI-Manager“ (via Analyze -> Tools -> ROI-Manager) wurde ein Rechteck über den interessierenden Ausschnitt gelegt und über die Auswahl von „Add“ hinzugefügt. Über die ROI-Funktion „Measure“ wurde dann die Lichtintensität in den „regions-of-interest“ (ROI) bestimmt und tabellarisch ausgegeben. Diese Daten wurden als Excel-Dokument abgespeichert und mittels GraphPad Prism 9 ausgewertet.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 LDH-Test

Hintergrund und Funktionsweise: Die Laktatdehydrogenase (LDH)-Messung erfolgte nach Herstellerangaben mittels des Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche. Die LDH ist ein Enzym, welches die Oxidation von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Dabei fungiert Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) als Coenzym und wird im Rahmen der Reaktion zu NADH+H⁺ reduziert. Die LDH ist im Zytosol lokalisiert, hat eine lange Halbwertszeit (im Menschen Isoenzymabhängig zwischen 8 – 120 Std.) und wird bei Zytolyse vermehrt

freigesetzt. Dies macht sie zu einem geeigneten Parameter für Zellschädigungen. Das Testprinzip beruht auf oben beschriebener Redoxreaktion. Die Reaktionskinetik ist durch Zugabe aller Edukte (Pyruvat, NAD⁺) im Überschuss von der LDH-Konzentration abhängig. In einem zweiten Schritt kommt es durch das hinzugegebene Katalyst (Diaphorase) zu einer weiteren Oxidoreduktion. Hierbei wird NADH+H⁺ als Cofaktor für die Reduktion eines blassgelben Tetrazolium-Salzes oxidiert. Dabei entsteht Formazan, dessen rote Farbe als quantitativer Parameter der LDH-Aktivität nach 5 Min. bei 490 nm photometrisch bestimmt wurde.

LDH-Test im 96-Well-Format: Es wurden 30-50 µl des Überstandes unterschiedlich behandelter Zellen abgenommen und in eine weitere 96-Well-Zellkulturplatte überführt. Die Arbeitslösung für den LDH-Nachweis wurde separat nach Herstellerangaben hergestellt. Hierfür wurden 56 µl des Katalysats (Diaphorase/NAD⁺) zu 2444 µl der Färbelösung (Iodotetrazolium-chlorid, Natrium-laktat) gegeben. Durch Zugabe der Arbeitslösung zum Überstand im Verhältnis 1:1 wurde die Reaktion gestartet. Die photometrische Messung erfolgte 5 Min. nach Reaktionsstart bei 490 nm. Die Werte wurden als Tabelle ausgegeben.

LDH-Test in der OrganoPlate®: Analog zum LDH-Test im 96-Well-Format wurde die LDH-Aktivität im Chip gemessen, indem zunächst das gesamte Medium eines Chips aus allen Wells abgenommen und in ein Well einer 96-Well-Platte überführt wurde. Bei getrennter Messung der LDH-Aktivität in den verschiedenen Kanälen erfolgte die Überführung des Mediums aus den Kanälen in separate Wells einer 96-Well-Platte. Mit 30 µl des gesammelten Überstandes wurde im Anschluss analog zum Vorgehen im 96-Well-Format (s.o.) verfahren.

3.5.2 MTT-Test

Hintergrund und Funktionsweise: Der MTT-Test erfolgte nach Herstellerangaben mittels CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) von Promega. Der MTT-Test dient der Quantifizierung der metabolischen Aktivität von Zellen. Das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)) wird NAD(P)H-abhängig korrelierend mit der Glykolyserate der Zellen zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert (Präbst et al., 2017). Die Intensität des Farbumschwunges wird nach Beendigung der Reaktion und Auflösung der Formazankristalle durch die Zugabe von Solubilization Solution/Stop Mix photometrisch bei 570 nm erfasst. Die metabolische Aktivität lässt als indirekter Parameter Rückschlüsse auf die relative Zellviabilität und Zellzahl (und damit Proliferationsaktivität) zu.

MTT-Test im 96-Well-Format: Zellen wurden nach unterschiedlicher Behandlung für 4 Std. in einem Gesamtvolumen von 115µl/Well inkubiert (37°C, 5 Vol.-% CO₂). Hierfür wurde zunächst das Zellmedium abgenommen und durch 100µl zell-spezifisches Nährmedium (siehe 2.1) und 15µl MTT-Zusatz ersetzt. Anschließend erfolgte die Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 100µl Solubilization Solution/Stop Mix. Nach vollständiger Lösung der Formazankristalle (Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur) wurde die Farbintensität photometrisch bestimmt und als Tabelle ausgegeben.

MTT-Test in der OrganoPlate®: Für den MTT-Test in der OrganoPlate® wurde zunächst das gesamte Medium aus allen Wells entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 115µl (100µl Nährmedium + 15µl MTT-Zusatz) in den Zellkanal. Nach 1-stündiger Inkubation wurde die Reaktion mit 100µl Solubilization Solution/Stop Mix gestoppt. Es folgte eine Inkubation bei

Raumtemperatur über Nacht mit anschließender Abnahme der gesamten Flüssigkeit aus allen Wells eines Chips. Diese wurde mit der Pipette in ein Well einer 96-Well-Zellkulturplatte überführt und photometrisch gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstumsmuster von hRPCs in Abhängigkeit von Kollagen-I und fluider Scherkraft

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines 3-dimensionalen, perfundierten Zellkulturmodells eines hRPC-Tubulus. Hierbei sollte zudem eine Zell-Matrix-Interaktion durch die Einbringungen von Kollagen-I ermöglicht werden. Es sollte daher zunächst gezeigt werden, dass diese Faktoren einen Effekt auf das Wachstumsmuster, die metabolische Aktivität und damit die Biologie von hRPCs haben.

Hierfür erfolgte die Kollagenbeschichtung (s. Abschn. 3.1.6) mit 4 mg/ml Kollagen-I sowie anschließend die Aussaat von 5×10^3 hRPCs in 100 μ l Medium/Well in einer 96-Well-Platte. Als Vergleich dienten unbeschichtete Wells mit gleicher Zellzahl. Des Weiteren wurde das Wachstumsmuster von 5 Tage alten hRPCs in der OrganoPlate® konfokalmikroskopisch nach Färbung mittels Acridin-Orange dargestellt.

Während sich nach 5-tägiger Inkubation ein konfluenter Zellrasen in den unbeschichteten Wells zeigte, imponierte ein sphäroides Wachstumsmuster der hRPCs auf Kollagen-I ohne Tendenz zur Bildung eines konfluenten Zellrasens (s. Abb. 14). Des Weiteren zeigte sich nach Bildung der Sphäroide (ca. ab Tag 2 bis Tag 3) keine messbare Größenprogredienz bis zu Tag 5. Im Vergleich dazu zeigte sich das hRPC-Wachstumsmuster am Kollagenmeniskus der OrganoPlate® als konfluenter Zellrasen und nicht sphärisch wie unter statischen, 2D-Zellkulturbedingungen.

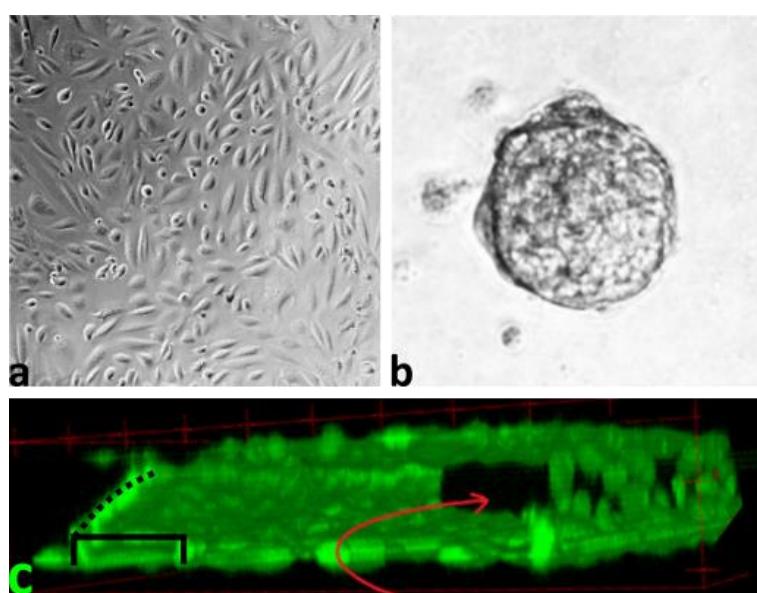


Abbildung 14: Wachstumsmuster von hRPCs in Abhängigkeit von Kollagen und Perfusion

a) Wachstum als Zellrasen in unbeschichteten Wells. b) Sphäroidales Wachstum auf Kollagen-I (96-Well-Platte). c) In der OrganoPlate® zeigt sich ein Wachstumsmuster als Zellrasen auf Kollagen-I (Die gepunktete Linie markiert den Kollagen-Meniskus oberhalb des Phasenguides. Der Rote Pfeil markiert das perfundierte Kanallumen.).

Mittels MTT-Test erfolgte die Bestimmung der metabolischen Aktivität an Tag 5 in beschichteten und unbeschichteten Wells. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen im unabh. T-Test ($****p<0,0001$). Dabei betrug die metabolische Aktivität des Zellrasens (unbeschichtete Wells) ca. das Dreifache derjenigen der Sphäroide (Koll.-I-Beschichtung) (s. Abb. 15). Die Zusammenschau aus lichtmikroskopischen Bildern und MTT-Test ließ hierbei vermuten, dass die metabolische Aktivität vor allem im Sinne einer geminderten Zellzahl, also einer geringeren Proliferationsrate der Sphäroide zu verstehen war.

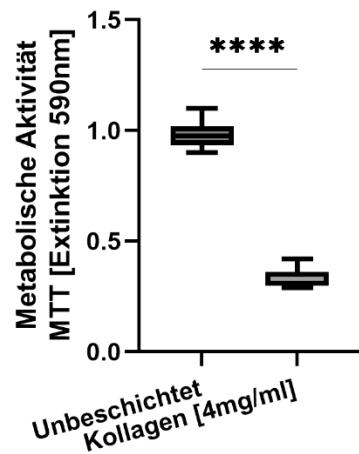


Abbildung 15: Metabolische Aktivität von hRPCs auf beschichteten (Kollagen I) und unbeschichteten Wells
Während hRPCs auf unbeschichteten Wells als Zellrasen wuchsen, bildeten sie auf Kollagen I Sphäroide (s. Abb 14). Die metabolische Aktivität der Sphäroide war hierbei ca. 3-fach geringer als beim Zellrasen ($0,98 +/- 0,06$ vs. $0,33 +/- 0,04$; $****p<0,0001$)

4.2 Immunfluoreszenzfärbung in der OrganoPlate® und unter herkömmlichen Zellkulturbedingungen

Mittels Immunfluoreszenzfärbung (IF) sollten phänotypische Unterschiede von hRPCs unter herkömmlicher 2D-Zellkultivierung und den Bedingungen in der OrganoPlate® dargestellt werden. Hierfür erfolgte die IF der Proteine Na^+/K^+ -ATPase, filamentäres Aktin (F-Aktin) und Zonula Occludens-1 (ZO-1).

Hintergrund: Physiologisch ist ZO-1 ein Protein im Bereich der Tight junction (TJ). Dort ist es an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert und dient als funktionelle Verbindung zwischen den Transmembranproteinen Occludin und Claudin und den Aktin-Fasern (Heinemann, 2019).

F-Aktin fungiert in epithelialen Zellen als zytoskelettales Mikrofilament. In Tubuluszellen bildet es am apikalen Zellpol (definiert als oberhalb der TJs befindlicher Zellabschnitt) unterhalb des Bürstensaums das sog. „terminal web“. Dieses ist maßgeblich in essentielle Prozesse eingebunden: Beispielsweise in den Transport und die Integration membranärer Kanäle und Pumpen in die Plasmamembran. Des Weiteren dient es dort der Verankerung der Aktinkerne der Mikrovilli. Das terminal web geht in seiner Peripherie kurz unterhalb der TJs in ein gürtelförmiges dichtes Bündel aus Aktinfilamenten über. Dieses stabilisiert als Bestandteil der Zonula adhaerens die mechanisch wichtigen interzellulären Adhärenskontakte. Basal verankert Aktin das Zytoskelett über Fokalkontakte mit der EZM (Duan et al., 2008; Uhlén et

al., 2015). Durch Vernetzung mittels des Proteins a-Actinin und Assoziation mit nicht muskulärem Myosin kann F-Aktin kontraktile Faserbündel bilden. Diese sog. Stressfasern sind in nicht muskulären Zellen essentiell für Adhäsion, Kontraktilität und Fortbewegung (Pellegrin & Mellor, 2007).

Die Na^+/K^+ -ATPase ist ein ubiquitärer Enzymkomplex, welcher durch den Natriumexport und Kaliumimport den Motor des Membranpotentials darstellt. Damit ist sie in den Nierentubuli maßgeblich an den Resorptionsprozessen beteiligt.

Die Hypothesengenerierung bezüglich einer Scherkraft (engl.: „fluid shear stress“; FSS)-induzierten Expressionsänderung dieser Marker in hRPCs gestaltet sich komplex. Während FSS-induzierte Änderungen differenzierter proximaler Tubuluszellen *in vitro* untersucht wurden (s.u.), kann das Verhalten undifferenzierter hRPCs möglicherweise davon abweichen. Hierbei war vorauszusetzen, dass es nicht FSS-induziert zu einer Differenzierung der hRPCs kommt. Bezuglich der in dieser Arbeit untersuchten Markerproteine kommt es in differenzierten renalen Tubuluszellen unter FSS zu folgenden Änderungen:

Na^+/K^+ -ATPase: Duan et al. (Maus-PTC, 0,2 dyn/cm² für 3 Std.) und Jang et al. (prim. hPTC 0,2 dyn/cm² für 3 Tage) zeigten sowohl eine FSS-induzierte Integration der Na^+/K^+ -ATPase in die basolaterale Membran, als auch eine quantitativ erhöhte Expression im Vergleich zu statisch inkubierten Zellen (Duan et al., 2010; Jang et al., 2013).

ZO-1: Duan et al. zeigten an immortalisierten Maus-PTC unter statischen Bedingungen trotz Konfluenz mehr interzelluläre Lücken, wobei die ZO-1-Verteilung mit diskontinuierlich / punktuellmembranären- und punktförmig zytosolischem Muster imponierte. Unter FSS zeigte sich eine kontinuierliche membranäre Verteilung mit Verschwinden der interzellulären Lücken (Duan et al., 2008). Jang et al. und Ross et al. beschrieben an jeweils primären hPTCs und RPTEC/TERT1-Zellen keine FSS-induzierten Unterschiede der ZO-1-Expression (Jang et al., 2013; Ross et al., 2021) wohingegen Maggiorani et al. an HK-2 Zellen eine diskontinuierliche ZO-1-Expression an den Zell-Zell-Grenzen bei supraphysiologischem FSS zeigten (Maggiorani et al., 2015). Insgesamt zeigt die Literatur bezüglich einer FSS-induzierten Expressionsveränderung von ZO1 in renalen Tubuluszellen eine eher heterogene Datenlage (Cattaneo et al., 2011; Dankers et al., 2011; Frohlich et al., 2012; Jang et al., 2013; Maggiorani et al., 2015; Ross et al., 2021). Hierbei spielen die Heterogenität der verwendeten Zellen und vor allem die nur deskriptiv erfassbaren Änderungen der ZO-1-Expression mit konsekutiv erschwerter Objektivierbarkeit eine Rolle.

F-Aktin: Duan et al. zeigten an immortalisierten Maus-PTC eine FSS- (1 dyn/cm² für 5 Std.) induzierte Disruption basal lokalisierter Stressfasern und Umverteilung zugunsten des terminal web (Duan et al., 2008). Diese Ergebnisse wurden zudem u.a. in primären Maus-PTC, LLC/PK1-Zellen und im Maus-Tiermodell (Essig et al., 2001) sowie in RPTEC/TERT1-Zellen (Ross et al., 2021) gezeigt. Maggiorani et al. zeigten darüber hinaus, dass bei pathologisch erhöhtem tubulärem FSS, welcher bei renalen Erkrankungen mit glomerulärer Hyperfiltration auftritt, die Aktinreorganisation ausbleibt. Hierfür exponierten sie HK-2-Zellen für 48 Std. mit 5 dyn/cm² und postulierten, dass die Aktinreorganisation auf den ebenfalls FSS-verursachten Verlust der mechanosensorischen Mikrovilli zurück zu führen sei (Maggiorani et al., 2015).

Für die Versuchsrealisation wurden hRPC-Tubuli für 3 Tage unter fluiden Bedingungen (im Folgenden „3D+FSS“) auf dem Perfusion-Rocker™ inkubiert (37°C, 5% CO₂). Für die Färbung von hRPCs unter herkömmlichen 2D-*in vitro* Bedingungen (im Folgenden „2D“) wurden 7.500 hRPCs nach der Kollagenimplementation in einen Kanal der OrganoPlate® appliziert. Hernach wurde diese in horizontaler Position inkubiert, sodass die Zellen nicht an dem Kollagen, sondern auf dem Boden adhärierten. Durch horizontale, statische Inkubation bildete sich auf diesem Wege kein Tubulus, sondern ein einfacher 2D-Zellrasen auf dem Boden der OrganoPlate®. Auch in diesem Ansatz erfolgte die Färbung nach 3 Tagen. Ein Mediumwechsel erfolgte bei beiden Ansätzen nach 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gefärbt (s. Abschn. 3.4.2.). Hierbei wurde neben der Immunfluoreszenzfärbung DAPI als nukleäre Gegenfärbung verwendet (s. 3.4.1.1).

Die Bildanalyse erfolgte deskriptiv.

Zusammengefasst zeigten sich keine mittels herkömmlicher Immunfluoreszenz-mikroskopie quantifizierbaren Unterschiede zwischen statischer und fluider Inkubation.

Die Färbung für die Na⁺-K⁺-ATPase zeigte unter beiden Konditionen eine kontinuierliche Fluoreszenzbande in den Zellperipherien. Unter 2D-Bedingungen zeigten sich zudem punktförmige perinukleäre Fluoreszenzen, welche unter fluiden Bedingungen nur in einigen Zellen mit gleichmäßigerer zytoplasmatischer Verteilung imponierten. Besonders ausgeprägt zeigten sich die perinukleäre Fluoreszenz in mitotischen Zellen (s. Abb. 16). Die F-Aktin-Färbung zeigte unter beiden Bedingungen strangförmige zelldurchspannende Fluoreszenzbanden i.S. von Stressfasern. Diese imponierten unter 2D-Bedingungen prominenter als unter 3D+FSS. Zudem zeigte sich unter beiden Bedingungen eine Fluoreszenzbande im Bereich der Plasmamembran. Der ZO-1-Ak zeigte unter beiden Konditionen eine distinkte Fluoreszenzbande im Bereich der Zell-Zell-Grenzen. Bei Konfluenz zeigten sich unter beiden Bedingungen nur sehr vereinzelte Lücken zwischen den Zellen. Des Weiteren zeigte sich bei beiden Bedingungen eine kräftige nukleäre / perinukleäre Fluoreszenz des ZO-1-Antikörpers.

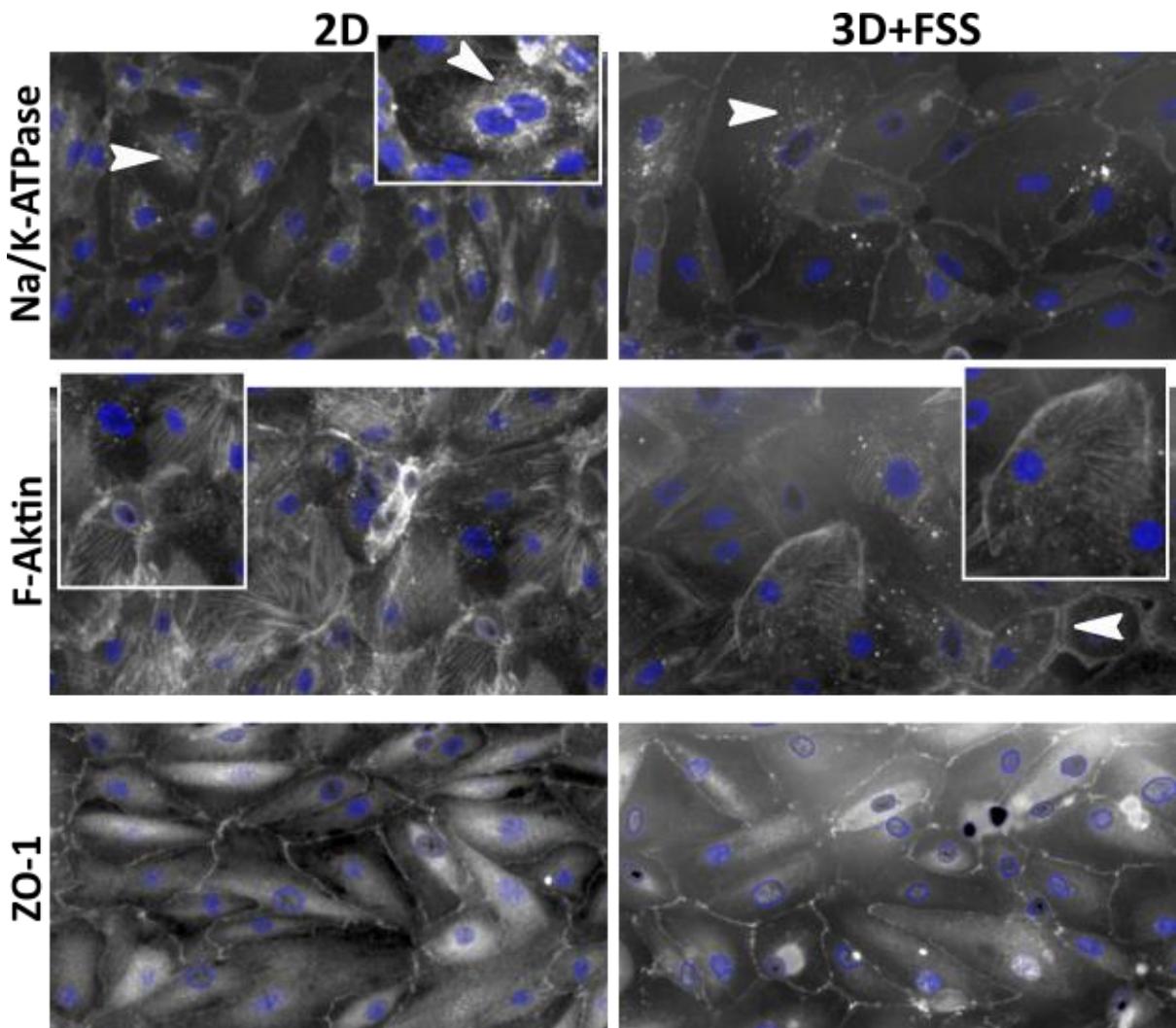


Abbildung 16: Immunfluoreszenz an hRPC-Tubuli

Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von hRPCs mit Färbungen für Na^+/K^+ -ATPase, F-Aktin und ZO-1 unter 2-dimensionalen Bedingungen (2D) und 3-dimensionalen Bedingungen mit fludier Scherkraft (3D+FSS).

Na^+/K^+ -ATPase: Unter beiden Bedingungen zeigt sich eine kontinuierliche Fluoreszenzbande im Bereich der Plasmamembran sowie mit punktueller Verteilung (2D > 3D+FSS) im perinukleären Zytoplasma (besonders betont in mitotischen Zellen (s. vergrößerten Ausschnitt)). F-Aktin: Unter beiden Bedingungen imponieren zytoplasmatisch lokalisierte Stressfasern (2D > 3D+FSS) sowie eine periphere Fluoreszenzbande, welche jedoch nur marginal unter 2D-Bedingungen ausgebildet ist. ZO-1: Unter beiden Bedingungen zeigt sich eine distinkte Fluoreszenz an den Zell-Zell-Grenzen sowie ein weiteres nuklear/perinuklear lokalisierter Fluoreszenzmaximum.

4.3 Barrierefunktionsmessung: Kinetik und Parameteretablierung

Eine zentrale Anforderung an innere und äußere Grenzschichten von Organismen ist der selektive, regulierte Stoffaustausch, welcher über die Barrierefunktion der verschiedenen Epithelien realisiert wird. Diese gewebespezifische Permeabilität ist eine Grundvoraussetzung und Steuerelement der Homöostase. Die Barriereeigenschaften renaler Tubulusepithelien stellen über die Mechanismen der kontrollierten Sekretion und Reabsorption das grundlegende Prinzip der Nierenfunktion dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der hRPC-Tubulus hinsichtlich seiner Barrierefunktion charakterisiert werden.

Im Zuge dessen sollte die Diffusionskinetik von FITC-Dextran ermittelt, und ein Parameter zur einfachen Interpretation der Dextran-Barrierefunktion etabliert werden.

Kinetik: Im ersten Schritt der Parameteretablierung wurde die Kinetik, mit welcher der Indikator FITC-Dextran über die Zellschicht in den Matrixkanal diffundierte untersucht. Um zu verstehen, ob sich die Diffusionskinetik unter verschiedenen Bedingungen gleich verhielt, wurden insgesamt 48 Messungen mit 13 unterschiedlichen Behandlungen der Chips ausgewertet. Hierbei waren 22 dieser Messungen biologisch unabhängig (s. Anhang; Tab. 4). Mithilfe der Heterogenität der Datengrundlage sollte untersucht werden, ob sich die Kinetik der FITC-Dextran-Diffusion abhängig von den unterschiedlichen Behandlungen (Unterschiedliches Alter, Nährstoffdepletion, toxin-induzierte Barrierestörung) veränderte oder gleichblieb. Die Datenanalyse erfolgte softwarebasiert mittels GraphPad Prism 9. Die Modellselektion („best fit“) erfolgte nach Aikaike Informationskriterium („AIC“, bzw. Aikakes Informationcriterion corrected for small sample size „AICc“) (Dziak et al., 2020).

Es zeigte sich eine Kinetik der FITC-Dextrandiffusion mit sigmoidaler Funktion. Abhängig vom Alter und der verschiedenen Behandlungen der Chips ergaben sich sigmoidale Diffusionskinetiken mit variabler Steigung, unterschiedlicher Lage des Wendepunktes sowie differierenden Maxima der im MK erreichbaren absoluten Fluoreszenzintensität.

Bei hRPC-Tubuli mit geringer Barrierefunktion zeigte sich eine frühe exponentielle Zunahme der Fluoreszenzintensität im MK mit asymptotischer Annäherung an das Maximum. Hier war in Betrachtung der Rohdaten auch eine hyperbole Funktion der Diffusionskinetik denkbar. Das AICc ergab ein mittleres Delta (Δ) von $\Delta\text{AICc} = 53$ im Vergleich der sigmoidalen und hyperbolischen Regressionen. Dies führte zur Annahme einer sigmoidalen Funktion. Unter den 48 Messungen ergab sich bei 6 Messungen (s. rot markierte Werte in Tab. 4) die Annahme einer hyperbolischen Funktion als besseres Modell nach AIC. Das mittlere ΔAICc war bei diesen Messungen mit -4,03 klein, was keine klare Aussage bezüglich der diesen Messungen zugrunde liegenden „wahren“ Diffusionskinetik zuließ. Denkbar war hier jedoch auch ein technischer Fehler da bei 4 der genannten 6 Messungen die gleiche Variable (Alter = 7 Tage) vorlag. Weitere Messungen mit der Variable Alter ergaben hingegen ein positives ΔAICc . Splines wurden zur Interpolation aufgrund einer möglichen Überinterpretation („overfitting“) der Ergebnisse zugunsten der sigmoidalen Regression nicht verwendet.

Parameter: Als objektiver und reproduzierbarer Parameter der Barrierefunktion wurde durch Interpolation der Messpunkte der „MFI-25“ (Mittlere Fluoreszenz-Intensität-25) mit der Einheit Minuten [Min.] etabliert (s. auch Abb. 19). Hierbei handelte es sich um die Zeit, nach welcher die MFI im mittleren Kanal (MK) 25% derjenigen im initial mit dem Indikator beladenen Kanal entsprach. Je stabiler die Barrierefunktion, desto höher der Wert für die MFI-25%, desto länger die Zeit bis eine MFI von 25% im MK erreicht war.

Bezüglich der Reliabilität des Parameters MFI-25 zeigte sich trotz der geringen Anzahl an biologischen und technischen Replikaten ein Mittelwert der Standardabweichungen von +/- 4,91 Minuten (s. Anhang, Tab. 4). Daher wurde angenommen, dass eine ausreichend gute Reproduzierbarkeit des Parameters vorlag.

Der BIA erfolgte an Chips ohne zelluläre Diffusionsbarriere (initial 100 %-ige MFI im MK ohne Zellimplementation), an unterschiedlich alten Chips (Ausbildung der zellulären Diffusionsbarriere über die Zeit) und nach Schädigung von etablierten Chips (Destruktion der Barriere). Die Ergebnisse dieser Messungen legten eine Kausalität und Korrelation der FITC-

Dextran-Barrieremessung mit dem Ausmaß der tatsächlichen Zellbarriere nahe (s. Abs. 4.5.2/3/4/5). Neben dieser inerten Validität des BIA erfolgte eine qualitative Zusammenschau der Präsentation der Zellen (Fotodokumentation) und der Zellviabilität (LDH-Messung, MTT-Test) im Sinne einer konvergenten Validität (s. Abschn. 4.4.1). Hierbei zeigte sich deskriptiv eine Korrelation der zusammenhängenden Konstrukte aus Barrierefunktion und zellulärer Viabilität.

4.4 Charakterisierung des hRPC-Tubulus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der hRPC-Tubulus hinsichtlich folgender Aspekte charakterisiert:

- Charakterisierung des hRPC-Tubulus unter Normalbedingungen über 9 Tage (s. Abschn. 4.4.1):
 - Morphologische Charakterisierung (Lichtmikroskopie, Konfokalmikroskopie)
 - Zellschaden (LDH-Messung) und metabolische Aktivität (MTT-Test) sowie
 - Barrierefunktionsmessung mittels BIA
- Charakterisierung des hRPC-Tubulus unter „Primärharnbedingungen“ (s. Abschn. 4.4.2):
 - Zellschaden (LDH-Messung) und metabolische Aktivität (MTT-Test)
 - Barrierefunktionsmessung mittels BIA
- Charakterisierung des hRPC-Tubulus nach Applikation unterschiedlicher Nephrotoxine (s. Abschn. 4.4.3):
 - Barrierefunktion mittels BIA
- Vergleich der Barrierefunktion von hRPC-Tubuli und Tubuli aus humanen glomerulären endothelialen Zellen (engl.: Glomerular Endothelial Cells; „GEnCs“). Hierbei wurden zwei verschiedene Indikatoren eingesetzt (s. Abschn. 4.5):
 - Barrierefunktionsmessung mittels BIA mit FITC-Dextran
 - Barrierefunktionsmessung mittels BIA mit FITC-Sinistrin
- Charakterisierung des hRPC-Tubulus in Hinsicht auf MDR-1-Aktivität mittels Calcein-Färbung (s. Abschn. 4.6)

4.4.1 Charakterisierung des hRPC-Tubulus in der OrganoPlate®

Um den hRPC-Tubulus in der Organoplate® zu charakterisieren wurden über einen Zeitraum von 9 Tagen wiederholte Messungen der Barrierefunktion sowie der Zellviabilität (LDH, MTT) durchgeführt. Hierfür wurde an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9 (entspr. 24, 72, 120, 168 und 216 Std.) nach Implementation der hRPCs in den Chip o.g. Messungen sowie eine lichtmikroskopische Fotodokumentation durchgeführt. Des Weiteren erfolgte an Tag 3 nach Anfärbung des hRPC-Tubulus mit Acridin-Orange eine konfokalmikroskopische Bildgebung zur Bestätigung der Ausbildung der 3-dimensionalen Tubulusstruktur.

Lichtmikroskopisch zeigte sich nach 3 Tagen ein geschlossener Zellrasen (s. Abb. 17), was konfokalmikroskopisch bestätigt wurde (s. Abb. 18). Im weiteren Verlauf zeigte sich eine Zunahme der Zelldichte. In einigen Chips zeigte sich an Tag 9 eine geringe Verschiebung der Grenze zwischen Kollagen und hRPCs in dem Bereich des mittleren Kanals aufgrund einer

Kontraktion des Kollagens über die Zeit. BIA-Messungen (s.u.) zeigten hier jedoch keinen Hinweis auf Störungen der Barrierefunktion.

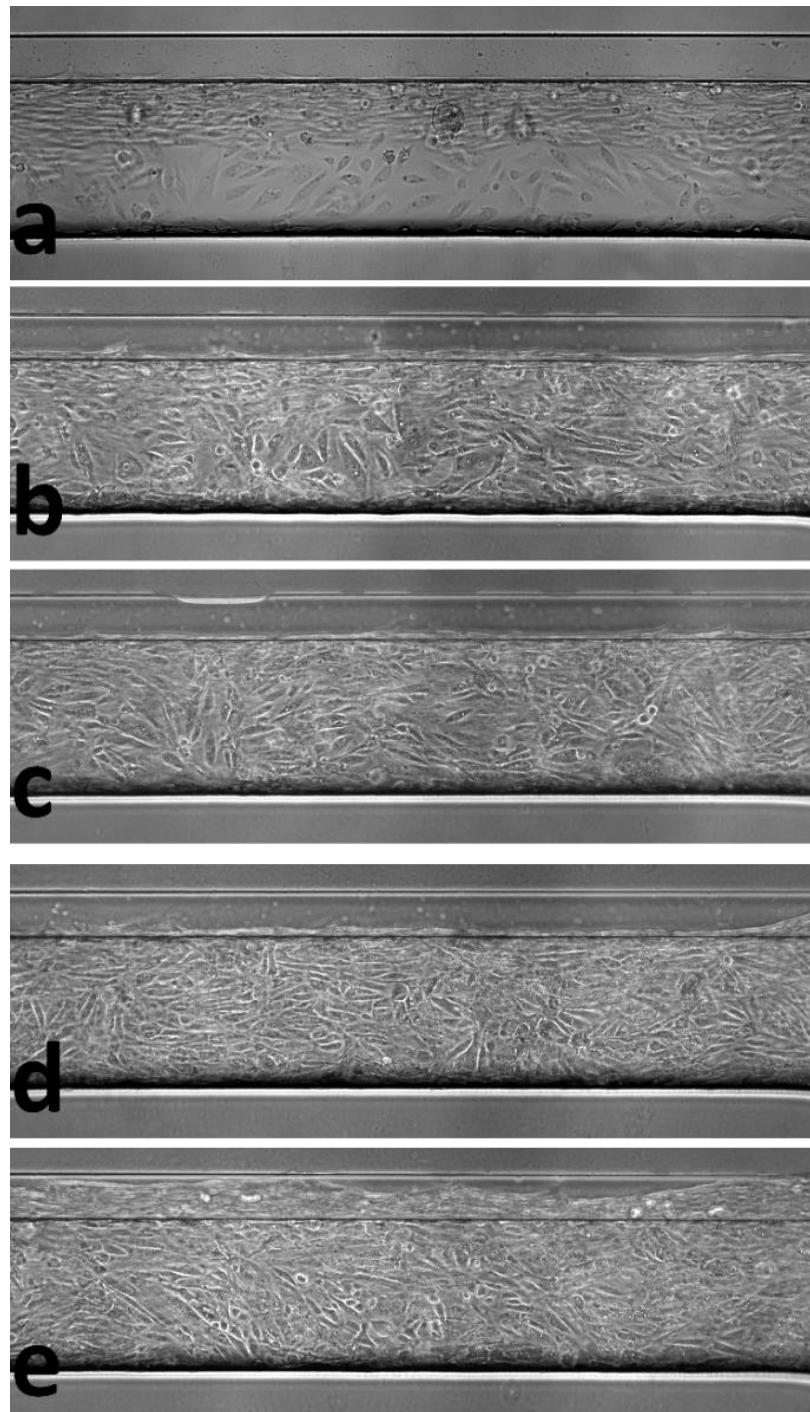


Abbildung 17: Repräsentative lichtmikroskopische Bilder eines hRPC-Tubulus über 9 Tage
(a - e entspr. Tag 1,3,5,7,9)

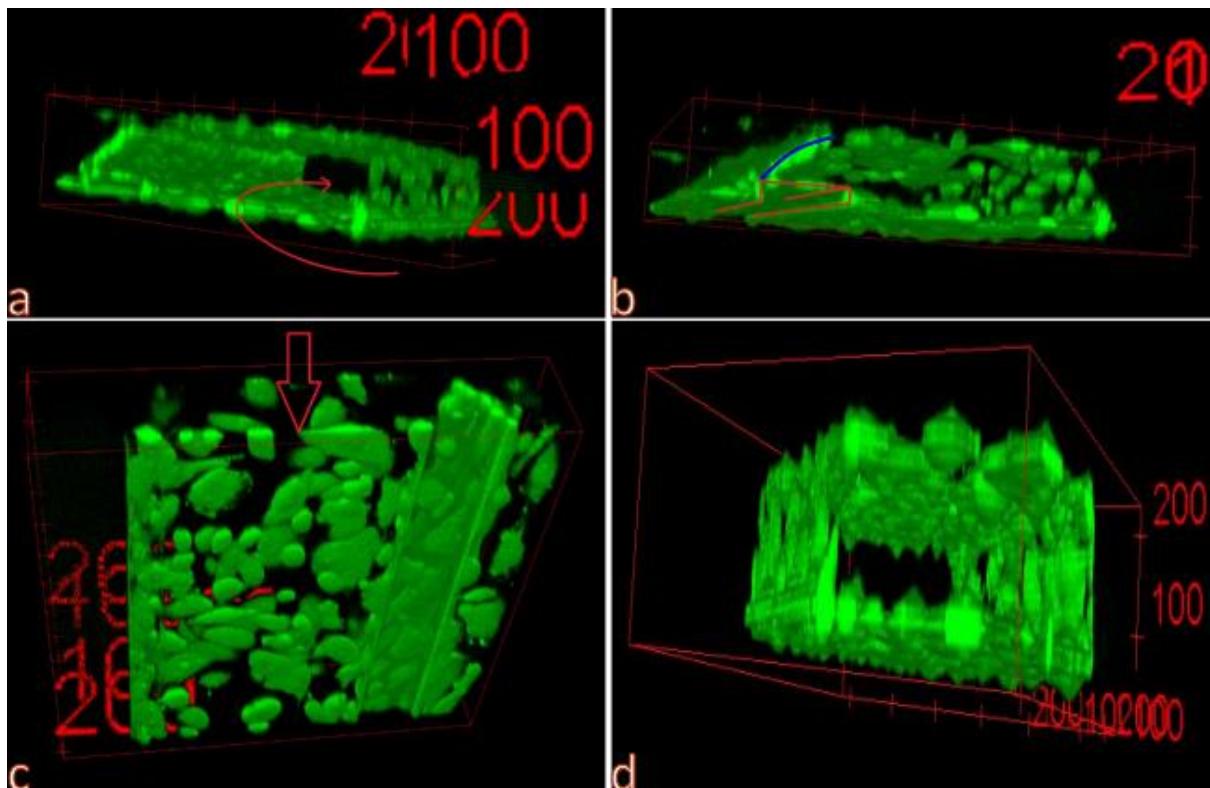


Abbildung 18: Konfokalmikroskopisches Bild eines hRPC-Tubulus

3D-Rekonstruktion aus konfokalmikroskopischen Bildern nach Färbung mit Acridin-Orange (AO) an 3 Tage alten hRPC-Tubuli. Vom Phaseguide (rote Linien in b) zieht der Kollagen-Meniskus (blaue Linie in b) an die Decke des Kanals. Die AO-Färbung zeigt die Ausbildung eines geschlossenen Tubulus mit durchgängigem Lumen (Pfeile in a und c).

Gemessen an dem Wert MFI-25% zeigte sich eine Zunahme der Barrierefunktion (s. Abb. 19) um 36,4 Minuten von Tag 1 bis zu Tag 9 (4,7 Min. (+/-2,58) vs. 41,1 Min. (+/-11,1); ***p <0,0001). Simultan zur Barrieremessung erfolgte zur weiteren Charakterisierung der hRPC-Tubuli die LDH-Bestimmung sowie die Messung der metabolischen Aktivität durch den MTT-Test. Beide Parameter zeigten einen kontinuierlichen Anstieg über den Verlauf von 9 Tagen (s. Abb. 20). Der MTT-Test zeigte an Tag 9 eine Zunahme der metabolischen Aktivität der hRPCs auf das 4-fache des Ausgangswertes von Tag 1 (4,02 (+/-0,87) vs. 1 (+/-0,02); ***p < 0,0001). Interessanterweise stieg trotz verbesserter Barrierefunktion und erhöhter Viabilität im MTT-Test die LDH -Aktivität als Marker zellulärer Schädigung über die Zeit an. An Tag 9 zeigte sich eine Zunahme der mittleren LDH-Aktivität auf das 2,2-fache des Ausgangswertes von Tag 1 (2,24 (+/-0,28) vs. 1 (+/-0,27); ***p < 0,0001). In der Zusammenschau der verschiedenen Messungen könnte dies aufgrund einer Überkonfluenz (s. Fotodokumentation) mit konsekutiv vermehrtem Zellstress zurückzuführen sein. Ebenfalls denkbar ist, vor dem Hintergrund der Zunahme der metabolischen Aktivität (MTT), eine Zunahme der LDH-Aktivität im Sinne einer positiven Wachstumsrate der hRPCs im Chip.

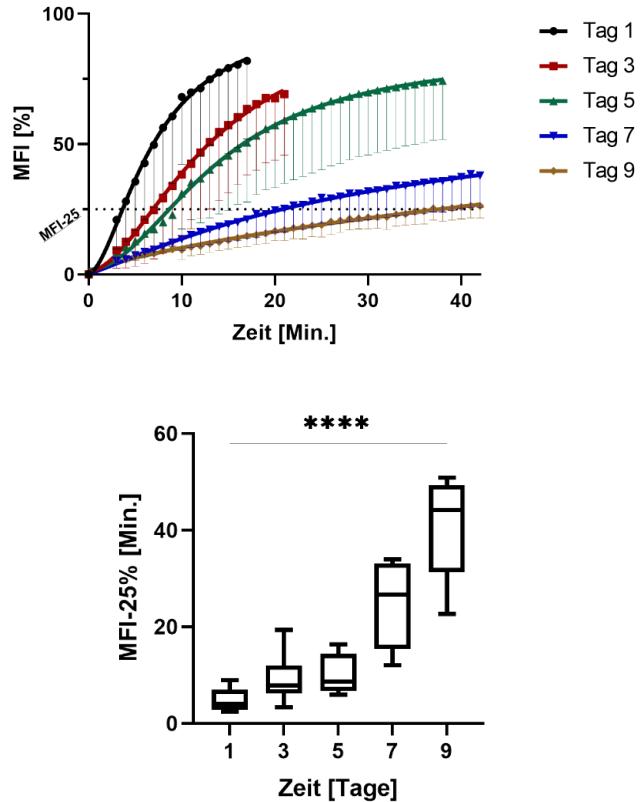


Abbildung 19: Barrierefunktion von hRPC-Tubuli über 9 Tage

Oben: Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) im mittleren Kanal (MK) über die Zeit mit Messungen an 1,3,5,7 und 9 Tage alten Tubuli. Gepunktete Linie: Die MFI im MK entspricht 25% der MFI des initial mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladenen Kanals.

Unten: Die MFI-25-Werte betrugen an den Tagen 1,3,5,7 und 9 jeweils 4,7 (+/-2,57), 9,26 (+/-5,19), 10,16 (+/-4,22), 24,71 (+/-9,23) und 41,1 (+/-11,1) Minuten. (****p<0,0001). Repl. Biol.: 2. Repl. Techn.: 2-4 (s. Tab. 3)

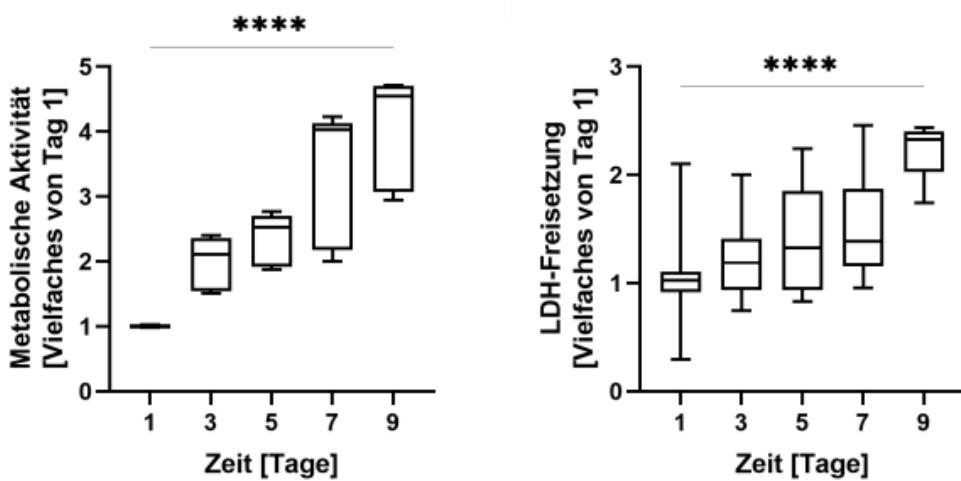


Abbildung 20: Metabolische Aktivität und LDH-Freisetzung von hRPC-Tubuli über 9 Tage

Links: Die metabolische Aktivität (MTT-Test), dargestellt als Vielfaches des Mittelwertes von Tag 1 erreicht am 9. Tag das 4,02 (+/-0,87) -fache des Ausgangswertes (****p<0,0001). (Repl. biol.: 2; Repl. techn.: 5) Rechts: LDH-Profil, dargestellt als Vielfaches des Basiswertes von Tag 1. Die LDH-Aktivität beträgt am 9. Tag das 2,24 (+/-0,28) -fache des Ausgangswertes (****p<0,0001). (Repl. biol.:2; Repl.: techn.: 5).

4.4.2 Charakterisierung hRPC-basierter Tubuli in der OrganoPlate® unter Primärharnbedingungen (Proteinrestriktion)

Zellen des proximalen Tubulus sind *in vivo* apikal dem Primärharn, einem Ultrafiltrat des Blutes, ausgesetzt. Dieses entspricht in seiner Zusammensetzung in etwa einem proteindepletierten Blutplasma. Die nutritive Versorgung des Tubulusepithels erfolgt dabei von basal über die peritubulären Kapillaren. Die Überlegung hinter diesem Experiment war, neben der räumlichen (3D) und mechanischen (Scherkraft) Annäherung der Zellkultur an die *in vivo*-Situation das chemische Mikromilieu ebenfalls physiologischer zu gestalten. Die Hypothese war, dass die Viabilität und die Barrierefunktion der hRPCs unter Primärharnbedingungen erhalten blieb. Hierfür wurden etablierte drei Tage alte hRPC-Tubuli mit isotonischer Ringerlaktatlösung inkubiert. Die tubuläre Nährstoffversorgung erfolgte dabei von basal durch Applikation des hRPC-Mediums in den zellfreien Kanal (in Analogie zu einer peritubulären Kapillare).

Für dieses Experiment erfolgte der Austausch des hRPC-Mediums gegen Ringerlaktatlösung (100µl in den zellhaltigen Kanal) nach 72 Stunden. In den zellfreien Kanal wurden 100µl hRPC-Medium gegeben. Es folgte die Inkubation unter Perfusionsbedingungen auf dem Rocker (37°C und 5 Vol.-% CO₂). An den Tagen 5, 7 und 9 erfolgte analog zu Abschnitt 4.3.1 die Messung der Barrierefunktion, der LDH-Aktivität sowie der metabolischen Aktivität (MTT).

Sowohl die Barrierefunktion als auch die LDH-Aktivität und die metabolische Aktivität zeigten sich an den Tagen 5, 7 und 9 stabil zu dem Vorniveau von Tag 3. Statistisch zeigten sich hier keine signifikanten Änderungen. Tendenziell kam es jedoch zu einer Zunahme der LDH-Aktivität und metabolischer Aktivität mit parallel angedeuteter Minderung der Barrierefunktion.

Die Barrierefunktion stellte sich an den Tagen 5, 7 und 9 mit MFI-25-Werten von 7,48 (+/-7,1), 10,22 (+/- 1,42) und 5,81 (+/-2,54) Minuten dar. Im Vergleich zu denjenigen unter Standardbedingungen ergab sich eine signifikant geringere Barrierefunktion an Tag 9 (41,1 Min. +/-11,1 vs. 5,81 Min. +/-2,54; ***p=0,0001) (s. Abb. 21). Sowohl die LDH-Aktivität als auch die metabolische Aktivität zeigten tendenziell eine leichte Zunahme unter Ringer-Lösung, jedoch ohne statistische Signifikanz zum Vorniveau von Tag 3 (s. Abb. 22). Das Vielfache der metabolischen Aktivität von Tag 1 lag an den Tagen 5,7 und 9 bei jeweils 1,56 (+/-0,2), 1,7 (+/-0,51) und 1,8 (+/-0,24). Im Vergleich zeigte sich eine signifikant höhere metabolische Aktivität an Tag 9 unter Standardbedingungen als unter Primärharnbedingung (1,8 (+/-0,24) vs. 4,02 (+/-0,9) ***p=0,0001). Ähnliches galt für die LDH-Aktivität, welche an den Tagen 5, 7, und 9 das jeweils 1,48- (+/-0,42), 1,45- (+/-0,37) und 1,72- (+/-0,35) fache des Basiswertes von Tag 1 zeigte. Hierbei zeigten sich im Vergleich der LDH-Aktivitäten an Tag 9 unter Standard- und Primärharnbedingungen keine signifikanten Unterschiede (p=0,3).

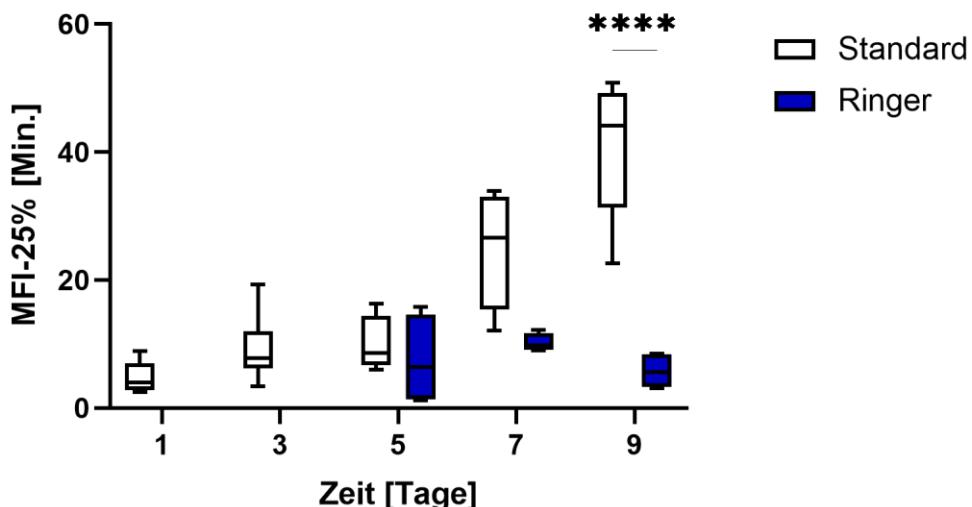


Abbildung 21: Barrierefunktion unter Standard- (hRPC-Medium) und Primärharnbedingung (Ringerlaktatlösung)
Unter Ringerlösung zeigt sich eine konstante Barrierefunktion über 9 Tage (MFI-25 an den Tagen 5,7,9 jeweils 7,48 (+/-7,1), 10,22 (+/- 1,42) und 5,81 (+/-2,54) Min.) mit signifikant geringerer MFI-25 an Tag 9 gegenüber Standardbedingungen (41,1 Min. +/-11,1 vs. 5,81 Min. +/-2,54; ***p=0,0001). (Repl. biol.: 2; Repl. techn.: 4-5).

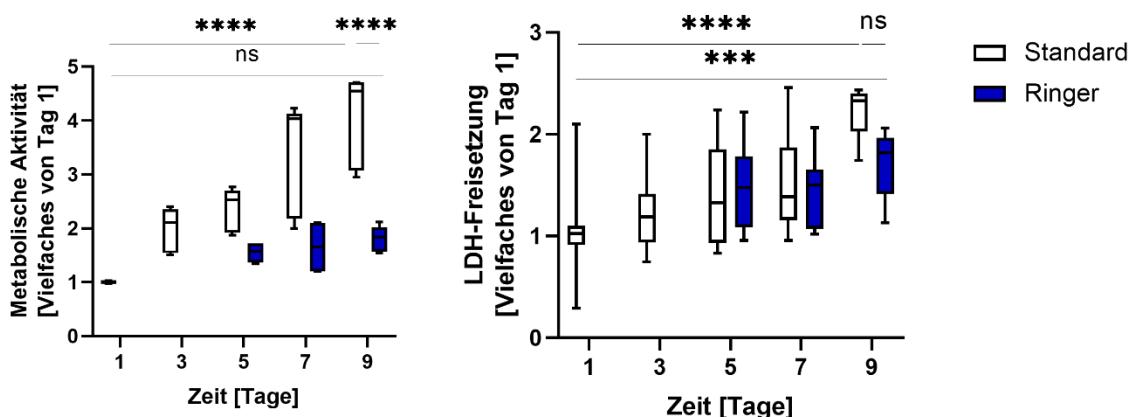


Abbildung 22: Metabolische Aktivität (MTT-Test) und LDH-Freisetzung unter Standardbedingungen (hRPC-Medium) und Primärharnbedingungen (Ringerlaktatlösung)

Links: Das Vielfache der metabolischen Aktivität von Tag 1 an den Tagen 5,7 und 9 betrug jeweils das 1,56- (+/-0,2), 1,7- (+/-0,51) und 1,8- (+/-0,24) fache. Im Vergleich zeigte sich am Tag 9 unter Standardbedingungen eine Vervierfachung der metabolischen Aktivität (Vielfaches von Tag 1: 4,02 (+/-0,9) vs. 1,8 (+/-0,24), ***p<0,0001). (Repl. biol.: 2: Messungen insg. an den Tagen 5,7,9: 4,4,5).

Rechts: Das Vielfache der LDH-Aktivität zeigt einen tendenziell flacheren Anstieg unter Ringer-Lösung (Tag 5, 7, und 9 jeweils 1,48- (+/-0,42), 1,45- (+/-0,37) und 1,72- (+/-0,35) fach) ohne signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen an Tag 9 (2,24 (+/-0,28) vs. 1,72 (+/-0,35); p=0,3). (Repl. biol.: 2; Repl. techn.: 5-9).

4.4.3 Barrierefunktion hRPC-basierter Tubuli unter Toxinexposition

In Bezug auf die Anwendbarkeit des hRPC-Tubulusmodells sollte die Frage beantwortet werden, ob mittels BIA eine Differenzierung verschiedener Toxin-induzierter Schädigungen möglich sein.

Hierfür wurden 72 Std. alte Tubuli für 24 Std. mit Toxinen (Histone (Hist) [100µg/ml], Aristolochiasäure (AA) [100µM], Cisplatin (CisP) [100µM], Tween-Positivkontrolle [1%]) und ohne Toxine als Negativkontrolle („Baseline“) inkubiert. Anschließend wurde ein FITC-Dextran-BIA durchgeführt. Die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) im mittleren Kanal (MK) wurden auf die korrespondierenden MFI-Werte im initial mit dem Indikator beladenen Kanal normalisiert und in Prozent angegeben. Anhand des MFI-25 wurde die Barrieredichtheit quantifiziert.

Vor dem Hintergrund der toxikogenen Wirkmechanismen der eingesetzten Toxine wurden aus pathophysiologischer Sicht unterschiedliche MFI-25-Werte erwartet:

Extrazelluläre Histone zeigen im Rahmen gewebeschädigender Prozesse wie Ischämien, Autoimmunopathien oder Sepsis vielfältige Mechanismen der Organschädigung, Immunstimulation und Initiation pathophysiologischer Kaskaden (Allam et al., 2014). Daneben haben sie starke direkt zytotoxische Wirkung. Unter anderem kommt es durch Interaktion mit Phospholipiden der Plasmamembran endothelialer und epithelialer Zellen zu einem erhöhten Calcium-Influx mit konsekutivem Zelltod (Silk et al., 2017).

Der Wirkmechanismus von AA, einem bekannten Nephrotoxin, ist aktuell noch nicht vollständig verstanden. Neben einer mutagenen Wirkung werden hier jedoch auch direkte zytotoxische Effekte durch oxidativen Stress und Apoptoseinduktion propagiert (Jadot et al., 2017).

CisP bewirkt als anorganischer Schwermetallkomplex eine Hemmung der Replikation durch DNA-cross-linking im Zellkern und Mitochondrien. Des Weiteren kommt es u.a. zu einem p53-medierten Zellzyklusarrest sowie zu oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (Kumar & Tchounwou, 2015; Schoch et al., 2021; Volarevic et al., 2019). Die zelluläre Aufnahme von CisP erfolgt u.a. über den basolateral lokalisierten Kanal OCT2 und durch passive Diffusion über die Zellmembran (Schoch et al., 2021; Tiong et al., 2014).

Tween® ist ein nichtionisches Tensid, welches als membranlösendes Detergens bei Konzentrationen von 1% die Lyse von Zellen bewirkt. Im Rahmen dieses Experiments wurde es als Positivkontrolle eingesetzt, da es einen schnellen und maximalen direkten Zellschaden mit erwartbar vollständigem Barrieverlust bewirkt.

Hypothese vor dem Hintergrund der beschriebenen Wirkmechanismen war, dass Toxine mit starker direkter zytotoxischer Aktivität wie Tween oder Histone eine stärkere Disruption der Barriere nach 24 Std. bewirken, als das mit Latenz wirksame CisP. Für AA wurde dementsprechend eine intermediäre Wirkung auf die Barrierefunktion nach 24 Std. erwartet. Die MFI-25-Werte unter toxinfreien Standardbedingungen lagen bei 14,9 Minuten. Für Cisplatin, AA und Histone betrugen sie jeweils 10,6-, 5,7- und 4,6 Minuten. In der Tween-Positivkontrolle lagen sie bei 1,7 Min. (s. Abb. 23).

Die Abbildung 23 zeigt den Verlauf der MFI im MK unter oben genannten Konditionen. Zu sehen ist, dass unter Standardbedingungen der höchste MFI-25-, und unter Tween der geringste MFI-25 erreicht wird. Die direkt zytotoxisch wirksamen Agenzien (Histone und AA) zeigen eine stärkere Minderung der Barrierefunktion als das Zytostatikum Cisplatin. Die Ergebnisse entsprachen also der Hypothese. Da die Ergebnisse jedoch aus einem Versuch (Repl. techn./biol.: 1) stammen, können sie bestenfalls illustrieren, dass der BIA möglicherweise Aussagen bzgl. unterschiedlicher toxikogener Wirkungen auf die

Barrierefunktion erlaubt. Hier sind weitere Versuche notwendig um eine solide Aussage treffen zu können.

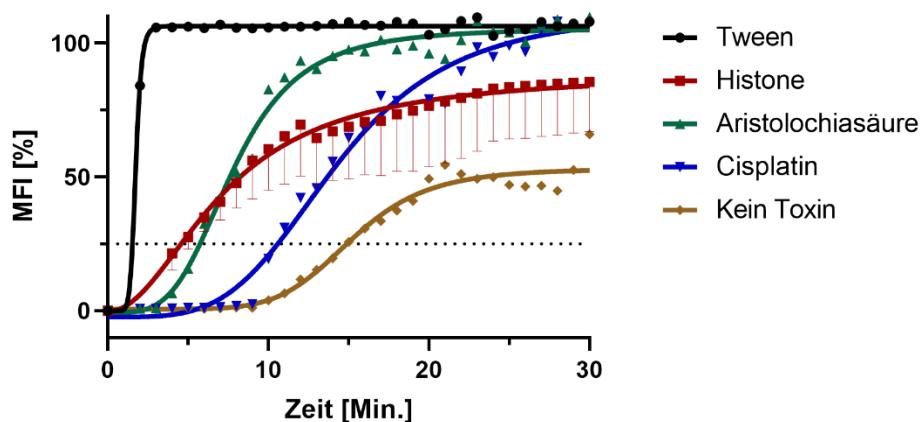


Abbildung 23: Barrierefunktion des hRPC-Tubulus nach Toxinexposition

Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) im mittleren Kanal über die Zeit. Nach 24-stündiger Toxinexposition mit Tween [1%], Histonen [100 µg/ml], Aristolochiasäure [100 µM], Cisplatin [100 µM] und ohne Toxinapplikation erfolgte ein FITC-Dextran-BIA. Die MFI-25 lag hierbei für Tween bei 1,5 Min., Histonen 4,6 Min., Aristolochiasäure 5,7 Min., Cisplatin 10,6 Min., ohne Toxinexposition bei 14,9 Min. Repl. biol 1 (Histone 2), techn. 1 (Histone 2).

4.5 Barrierintegritätsmessung an glomerulären endothelialen Zellen (GEnC) mit FITC- Dextran und FITC-Sinistrin

Der BIA erlaubt im engeren Sinne nur Aussagen der Barrierefunktion eines Zelllayers in Bezug zu dem eingesetzten Indikatormolekül.

Glomeruläre endotheliale Zellen (GEnC) bilden *in vivo* neben der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten die glomeruläre Filtrationsbarriere. An dem fenestrierten Endothel wird diese Funktion durch zwei Mechanismen realisiert: Erstens die mechanische Größenselektivität (Porengröße der Endothelfenster beträgt 50-100 nm) mit nur geringer Filtration von Teilchen einer Größe > 50-100 nm sowie zweitens durch die Ladungsselektivität durch die anionische Glykokalyx. *in vivo* können Moleküle bis zu ca. 5kDa den glomerulären Filter problemlos passieren, wobei positiv geladene und ungeladene Teilchen besser filtriert werden als negativ geladene (Menon et al., 2012).

Sinistrin (4 kDa) gilt als Goldstandard zur Messung der GFR. Es wird über die GBM frei filtriert und tubulär weder sezerniert, resorbiert noch metabolisiert.

Davon ausgehend, dass die GEnCs im Chip eine Filtrationsselektivität vergleichbar mit derjenigen *in vivo* zeigen, wurde angenommen, dass die Permeation des sehr viel größeren Moleküls FITC-Dextran (150 kDa) im Vergleich verzögert ist.

An 96 Std. alten GEnC-Tubuli wurde ein BIA durchgeführt. Hierbei wurde jeweils ein Versuch mit den Indikatoren FITC-Sinistrin und FITC-Dextran realisiert. Die über die Zeit gemessene Zunahme der MFI im MK wurde auf den Mittelwert der MFI des zellhaltigen Kanals normalisiert und in % angegeben.

Während der MFI-25 für FITC-Dextran bei ca. 59 Min. lag, zeigte sich in Bezug auf das FITC-Sinistrin keine nennenswerte Barrierefunktion (s. Abb. 24). Der erste gemessene Wert nach 3 Minuten lag bei ca. 94% der MFI im zellhaltigen Kanal.

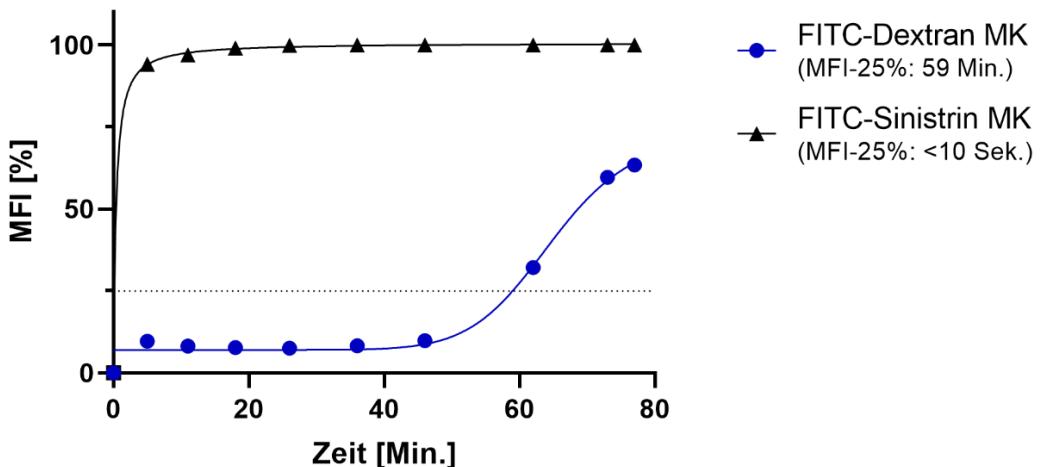


Abbildung 24: Barrierefunktion von glomerulären endothelialen Zellen (GEnC) in Bezug auf FITC-Dextran (schwarz) und FITC-Sinistrin (blau)

Gezeigt ist die mittlere Fluoreszensintensität (MFI) im Matrikkanal (MK). Während die Barrierefunktion gemessen nach MFI-25% (gepunktete Linie) in Bezug auf FITC-Dextran bis Minute 59 stabil ist, zeigt sich bezüglich FITC-Sinistrin keine Barrierefunktion. (Repl. biol.: 1, techn.: 1).

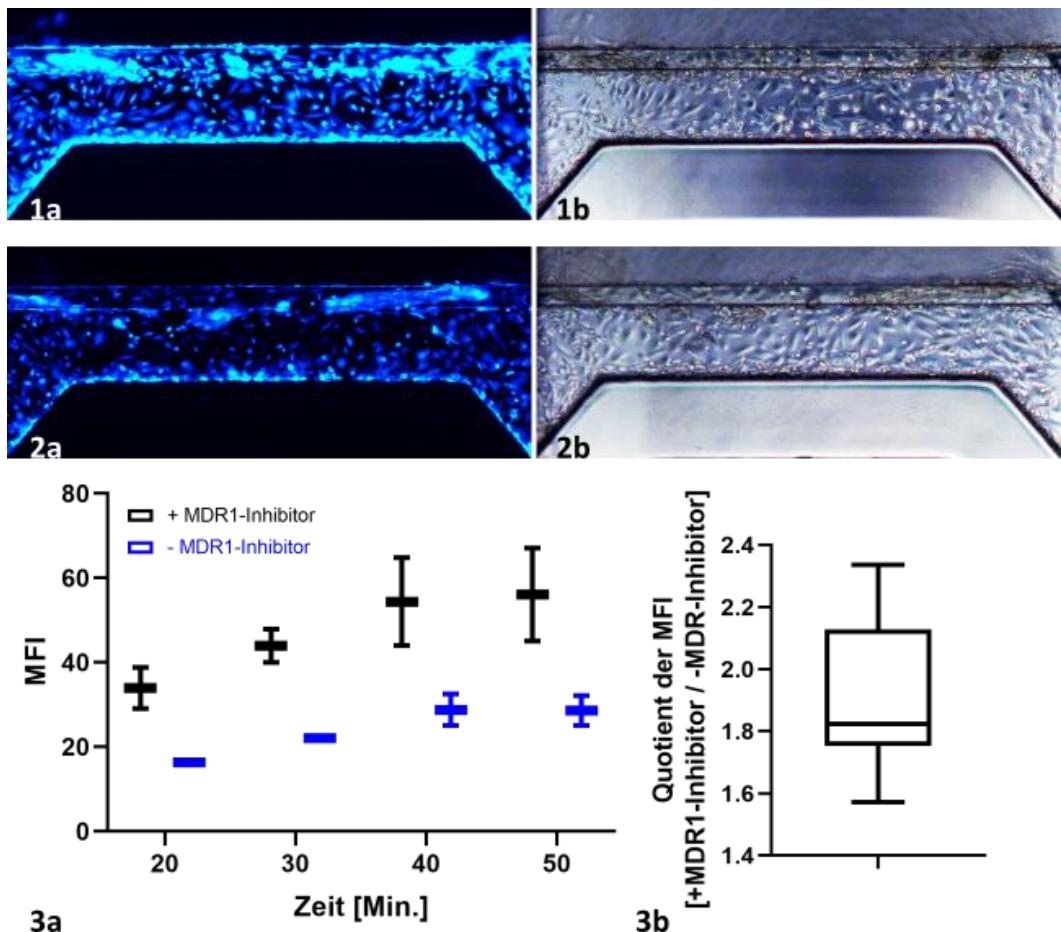
Diese Daten können aufgrund der geringen Stückzahl nur andeuten, dass die Interpretation des BIA nur in Hinsicht auf das verwendete Indikatormolekül erfolgen kann. Erwähnt sei an dieser Stelle auch, dass die Barrieredichtheit (FITC-Dextran) von GEnCs diejenige der hRPCs deutlich übertraf (s. Abschn. 4.4.1).

4.6 Calceinfärbung

MDR1 ist ein essentieller Transporter des proximalen Tubulusepithels. Calcein-AM diffundiert frei über Zellmembranen und wird intrazellulär zum fluoreszierenden Calcein hydrolysiert, welches wiederum ein Substrat von MDR1 ist (s. zur Funktionsweise von Calcein-AM auch Abschn. 3.4.1.2). Mittels der Calcein-AM-Färbung +/- MDR1-Inhibitor sollte gezeigt werden, ob hRPCs nach Implementation in den Chip MDR-1-Aktivität zeigen.

Hierfür wurden 15.000 hRPCs in 100 µl Medium für 72 Std. in der OrganoPlate® auf dem Perfusionrocker™ kultiviert (37°C, 5% CO₂). Ein Mediumwechsel erfolgte nach 24 Std.

Zur Evaluation der Aktivität von MDR-1 erfolgte die Hemmung von MDR-1 durch eine halbstündige Inkubation mit 100µM Verapamil sowie die anschließende Färbung mit Calcein-AM. Es folgte die fluoreszenzmikroskopische Fotodokumentation über 50 Min. Es zeigte sich eine über die Zeit konstante, im Mittel 1,9-fach (+/-0,24) stärkere Fluoreszenzintensität in der Verapamil-Gruppe im Gegensatz zur Gruppe ohne MDR1-Inhibition (s. Abb. 25). Dieses Ergebnis zeigte die Expression und Aktivität von MDR1 in hRPCs unter den Konditionen der OrganoPlate®.



4.7 Immunzellmigration „on-the-Chip“

4.7.1 Rationale und Hypothese

Immunologische Aspekte spielen in der Pathophysiologie renaler Erkrankungen eine zentrale Rolle. Unabhängig von der Ätiologie stellt die Extravasation und Chemotaxis von Immunzellen ein zentrales Ereignis der immunologischen Kaskade dar.

Zellkulturbasierte Standardmethoden zur Untersuchung von Immunzellmigration sind Trans-Well basierte Migrations- und Invasions-Tests (Boyden-Chamber) sowie Microfluidic chamber assays. Seltener kommen Methoden wie LMAT (engl.: „leukocyte migration agarose technique assay“) oder der 3D-vertikal-Migration/Invason-Assay zum Einsatz (Kramer et al., 2013). Keine dieser Methoden kann jedoch eine Inflammation *in vitro* in der Gesamtheit abbilden. Es können jeweils nur Teilkomponenten untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob die OrganoPlate als Zellkulturplattform eines hRPC-basierten Tubulus als Grundlage für ein Chemotaxis-Modell dienen könnte.

Die Hypothese war, dass es möglich ist, eine funktionelle Interaktion von hRPCs und Immunzellen im Sinne einer schädigungsinduzierten Immunzellrekrutierung in der OrganoPlate® zu realisieren. Des Weiteren wurde angenommen, dass eine Korrelation der

Schädigungsstärke (Ausmaß des Tubulusschadens) und der Immunantwort (Ausmaß der Immunzellmigration) in der OrganoPlate® darstellbar sei.

4.7.2 Migration im Chip – Protokolletablierung und Übersicht

Anmerkung: Zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Protokolletablierung einer Ko-Kultur in der OrganoPlate® zur Darstellung von Chemotaxis nach steriler Zellschädigung *in vitro*. Die Übersicht und die einzelnen Arbeitsschritte, deren Etablierung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte, sind im Abschnitt Methoden dargelegt (s. Abschn. 3.3).

Im Rahmen der Etablierungsarbeit zu dem Protokoll wurden folgende Parameter im Chip variiert und in Hinsicht auf die Migration von primären humanen Leukozyten untersucht:

- Der Einfluss verschiedener Kollagenkonzentrationen im Extrazellulärmatrix-Kanal auf die Migration (s. Abschn. 4.7.3)
- Die unterschiedliche Migrationsfähigkeit von frisch isolierten primären humanen- (s. Abschn. 4.7.4):
 - Leukozyten (engl.: white blood cells; WBCs)
 - neutrophilen Granulozyten (engl.: polymorphnucleated cells; PMNs)
 - peripheren mononukleären Blutzellen (engl.: peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)
- Die Migrationsfähigkeit der PBMCs unter statischen und fluiden Bedingungen (s. Abschn. 4.7.5)
- Die Schädigungs-induzierte Migration mittels Histonen („Schädigungs-basiertes Migrationsmodell“) sowie der Einfluss verschiedener Histonkonzentrationen im schädigungs-basierten Migrationsmodell auf das Ausmaß der Migration (Dosis-Wirkung). (s. Abschn. 4.7.6)

4.7.3 Einfluss verschiedener Kollagenkonzentrationen auf die Migration

Die Variation der Kollagendichte bei Migrationsexperimenten erfolgte aufgrund der Hypothese, dass die Dichte der Extrazellulärmatrix (EZM) einen Effekt auf das Ausmaß der Migration von primären humanen Leukozyten hat.

Kollagen-I wurde in der Konzentration von 2, 3 und 4mg/ml in den MK eingebracht (s. Abschn. 3.1.6 und 3.2.2). Anschließend wurden frisch isolierte (s. Abschn. 3.1.3 und 3.2.4) humane Leukozyten in den OK des Chips eingebracht.

Die getesteten Konzentrationen unterhalb von 4 mg/ml zeigten eine mechanische Instabilität. Dies führte bei Implementation der Zellen in den OK zu einem sofortigen Einstrom von Zellen in das Kollagen oder führte zum Durchbruch der Membran (s. Abb. 26) mit initialem Barrieverlust zwischen den Kompartimenten des OK und UK.

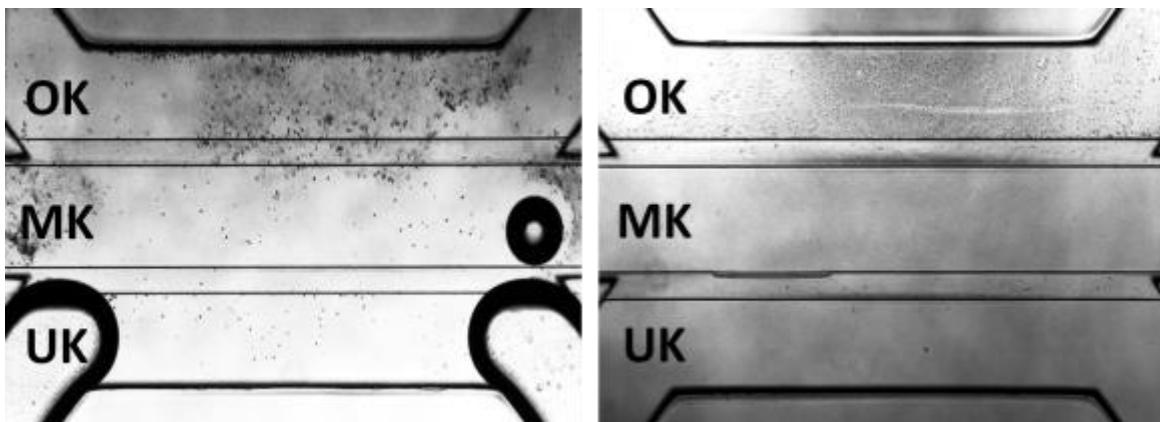


Abbildung 26: Mechanische Stabilität der EZM in Abhängigkeit von der Kollagen-I-Konzentration
Kollagenkonzentrationen im MK von 3 mg/ml (links) und 4 mg/ml (rechts): Die linke Abbildung zeigt die initiale Desintegration der Kollagenmatrix im MK nach Applikation der Leukozyten in den OK. Zu sehen ist dies an den in den UK verlagerten Meniskus durch Vorfall des Kollagens sowie den Leukozyten im UK. Rechts: Stabile Kollagenmembran bei Kollagen-I-Konzentration von 4 mg/ml.

4.7.4 Migrationsfähigkeit der verschiedenen Leukozytenfraktionen unter statischen Bedingungen

Es sollte untersucht werden, ob die gesamten WBCs oder deren separierte Fraktionen (PBMCs und PMNs) Unterschiede in der Migration zeigen. Hierfür wurden mit necrotic soup stimuliert hRPCs in Lockstofflösung (s. Abschn. 3.3.2) in den UK eingebracht. Direkt im Anschluss wurden frisch isolierte primäre humane Leukozyten in den OK eingebracht. Hierbei wurden sowohl die gesamten WBCs als auch die isolierten Fraktionen der PBMCs und PMNs in den Chip eingebracht. Die Auswertung erfolgte nach einer 24-stündigen Inkubation (37°C , 5% CO_2) auf dem PlateHolder (s. Abb. 5) durch die Auszählung der Zellen (s. Abschn. 3.3.6), welche in die EZM des MK eingewandert waren. Als Negativkontrolle diente D-PBS im UK. In den LSL-Gruppen zeigte sich im Vergleich zu den Negativkontrollen in allen drei Gruppen eine signifikant höhere Migration nach Mann-Whitney-U ($p^*=0,03$). Unter Migrationsinduktion mittels LSL zeigten die PBMCs die höchste Anzahl gewanderter Zellen (s. Abb. 27). Unter LSL waren dies $574,5 +/- 178,9$ vs. $63 +/- 21,5$ in der Negativkontrolle. Die PMN-Faktion zeigte eine geringere absolute Migration mit $175 +/- 11,3$ vs. 42^* . Die geringste Migration zeigte sich bei der gemeinsamen Implementation beider Fraktionen mit $63 +/- 21,5$ vs. $2 +/- 2,8$ (s. Abb. 28). Illustrativ zeigte sich in der einfachen Varianzanalyse (ordinary one-way ANOVA) der LSL-Gruppe ein signifikanter Unterschied in der Migration der PBMCs im Vergleich mit den PMNs ($p^*=0,025$) und WBCs ($p^{**}=0,008$). Zusammengefasst lag damit die unspezifische Migration in den einzelnen Gruppen bei 3,1% (WBCs), 9,8% (PBMCs) und 19,4% (PMNs), wobei die höchste absolute Migration bei der PBMC-Gruppe lag. Aufgrund dieser Ausgangsdaten wurden die folgenden Experimente mit PBMCs durchgeführt.

(*Aufgrund eines technischen Fehlers ist die PMN-Negativkontrolle unikat)



Abbildung 27: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen matrixinvasiver Leukozyten nach Stimulation mit LSL. Die Leukozyten wurden in den OK appliziert während der Lockstoff (LSL + mit „necrotic soup“ stimulierte hRPCs) in den UK gegeben wurde. Es folgte eine 24-stündige Inkubation mit anschließender Fotodokumentation der Anzahl matrix-invasiver Zellen. WBCs (a), PMNs (b), PBMCs (c).

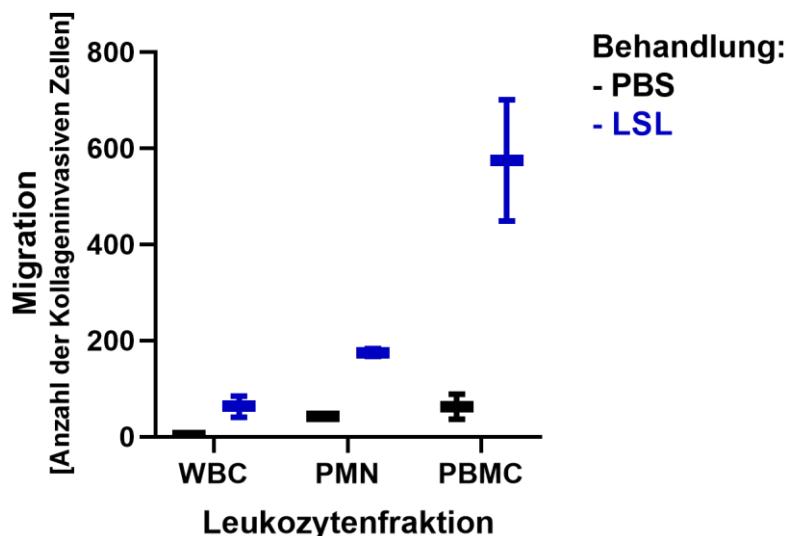


Abbildung 28: Anzahl migrierter Leukozyten nach Etablierung eines chemotaktischen Gradienten mittels Lockstofflösung (LSL)

Unter LSL zeigen alle Gruppen eine höhere Migration (WBC: 63 vs. 2, PMN: 175 vs. 42, PBMC: 574,5 vs. 63). (Repl. biol.: 1, techn.: 2. *Aufgrund eines technischen Fehlers ist die PMN-Negativkontrolle unikat).

4.7.5 Migrationsfähigkeit der PBMCs unter fluiden und statischen Bedingungen

Als nächstes wurde das Ausmaß der Migration unter fluiden und statischen Bedingungen verglichen.

Hierfür wurden frisch isolierte humane PBMCs in den OK der Chips gegeben. Als Lockstoff diente LSL, welches in den UK gegeben wurde. Des Weiteren wurde eine Medium-Kontrolle mit hRPC-Medium sowie eine Negativkontrolle mit D-PBS realisiert. Es folgte eine Inkubation über 24 Std. unter statischen (PlateHolder) oder fluiden (Rocker) Bedingungen. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Auswertung durch die Auszählung der Matrix-invasiven PBMCs. Es zeigte sich, dass eine Migrationinduktion ebenfalls unter fluiden Bedingungen möglich war. Hierbei fand sich über die vier Behandlungsgruppen hinweg eine signifikant höhere Migration im statischen Ansatz im Vergleich zum fluiden Versuchsaufbau (4,1- (+/-1,3)-fach; ***p<0,0001 Einstichproben t-Test) (s. Abb. 29). Die höchste absolute Migration zeigte sich bei der Behandlung mit LSL (fluide: 78 +/-17,4; statisch: 370 +/-50,3). Die Stimulation mit

Medium zeigte eine geringere Migration (fluide: 37,7 +/-4; statisch: 166,7 +/-69,6), welche jedoch höher lag als die der PBS-Kontrolle (fluide: 8,7 +/-3,1; statisch: 27,3 +/-7,8).

Diese Ergebnisse zeigten bei vorhandener Migration sowohl unter statischen als auch fluiden Bedingungen eine konsistent höhere Migration bei statischer Inkubation der OrganoPlate®. Illustrativ* zeigte dabei die Varianzanalyse statistisch signifikante Unterschiede zwischen den statischen, nicht aber zwischen den fluiden Konditionen (LSL-statisch vs. Medium-statisch; ***p= 0,0002 und Medium-statisch vs. PBS-statisch; **p=0,0049). Interessant war, dass auch das Medium damit eine chemotaktische Wirkung zeigte.

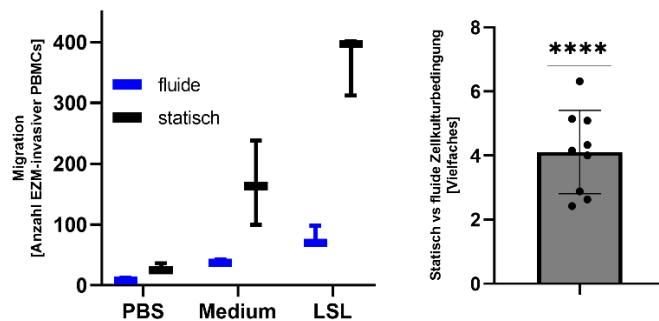


Abbildung 29: Migration unter statischen und fluiden Bedingungen

links: Graphische Darstellung der Migration in Abhängigkeit von der Migrationsinduktion (PBS, Medium, LSL) unter statischen und fluiden Bedingungen (Repl. biol.: 1, techn.: 3). Unterschiede zeigen sich zwischen den fluiden und statischen Gruppen unter Migrationsinduktion mit Medium (fluide: 37,7; statisch: 166,7; **p=0,0088) und LSL (fluide: 78; statisch: 370; ****p<0,0001). Nicht signifikant unterscheidet sich die Migration in der PBS-Gruppe (fluide: 8,7; statisch: 27,3; p=0,99). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen ergeben sich nur in der statischen Gruppe (LSL vs. Medium; ***p=0,0002 und Medium vs. PBS; **p=0,0049) Rechts: Die Migration unter fluiden Bedingungen ist auf den Mittelwert der Migrationszahlen unter statischen Bedingungen normalisiert und als Vielfaches graphisch dargestellt. Das Verhältnis liegt bei 4,1 +/-1,3; ****p<0,0001).

*Der Terminus „illustrativ“ soll darauf hinweisen, dass im Rahmen der Modelletablierung keine hohe Anzahl an biol./ techn. Replikaten angestrebt wurde. Auf eine graphische Darstellung des Signifikanzniveaus wurde daher in der Abbildung 29 (links) verzichtet.

4.7.6 Schädigungsbasiertes Migrationsmodell und Dosis-Wirkungsbeziehung

Neben der Migrationsinduktion durch die Lockstofflösung (s.o.) sollte gezeigt werden, dass eine Schädigung etablierter hRPC-Tubuli im Chip als chemotaktischer Stimulus ausreicht, um primäre humane PBMCs zur Migration zu bringen. Der chemotaktische Gradient über die Kollagenmembran sollte also *in vitro* durch Toxinwirkung an den hRPC-Tubuli erzeugt werden. Der Versuchsaufbau orientierte sich damit an der physiologischen Immunantwort nach zellulärer Schädigung.

An diese Versuchsreihe gab es zwei Fragestellungen: Erstens ob sich die Idee einer schädigungs-induzierten Migration im Chip praktisch umsetzen ließe („proof of concept“). Zweitens sollte gezeigt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Toxinkonzentration und dem Ausmaß der Migration gäbe (Dosis-Wirkung).

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden 72 Std. alte hRPC-Tubuli mit aufsteigenden Histonkonzentrationen (von 0 bis 1 mg/ml) für 24 Std. auf dem Rocker inkubiert. Es wurde zudem noch eine LSL-Kontrolle eingefügt durch Ersatz des Mediums des hRPC-Tubulus mit

LSL. Die Negativkontrolle wurde mit PBS realisiert. Nach der Inkubation erfolgte die Implementation von primären humanen PBMCs in den zellfreien Kanal (s. Abschn. 3.2.4). Anschließend erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation auf dem Rocker (fluide Bedingungen). Die Auslesung erfolgte lichtmikroskopisch und softwarebasiert durch Auszählung der EZM-invasiven PBMCs (s. Abschn. 3.3.6).

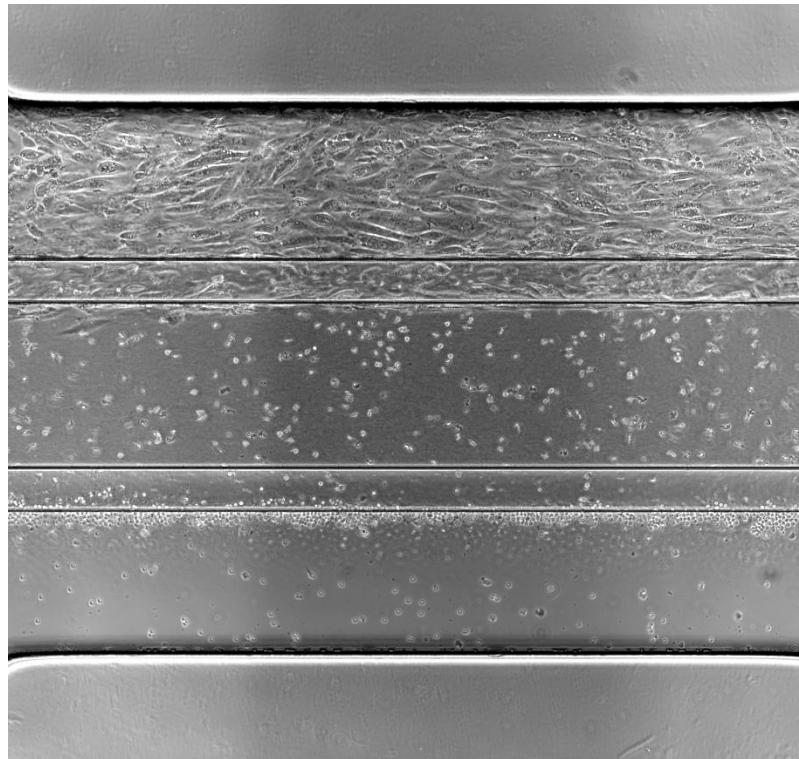


Abbildung 30: Schädigung eines hRPC-Tubulus *in vitro* mit konsekutiver gerichteter PBMC-Migration
Die Schädigung eines hRPC-Tubulus mittels Histonen (oberer Kanal) führt zur Chemotaxis humaner primärer PBMCs (unterer Kanal). Konsekutiv infiltrieren die PBMCs die Kollagenmatrix (mittlerer Kanal) und wandern in Richtung des geschädigten hRPC-Tubulus. Repräsentatives lichtmikroskopisches Bild.

Die generierten Daten zeigten eine positive Korrelation von Toxindosis und dem Ausmaß der Migration, sodass die Anzahl der gewanderten Immunzellen mit steigender Histondosis (bis zu 500 µg/ml) zunahm. Die Anzahl der migrierten Zellen lag bei den Histondosen 0 µg/ml (=Mediumkontrolle), 15,625 µg/ml und 31,25 µg/ml jeweils bei 75,4 (+/-57,2), 83,4 (+/- 36,12) und 95 (+/- 18,52) Zellen. Bei den höheren Histondosen von 62,5 µg/ml, 250 µg/ml und 500 µg/ml stieg die Migration deutlich an auf jeweils 120,4 (+/-50,15), 208,5 (+/-125,3) und 272,7 (+/- 27,57) Zellen. Bei der Histondosis 1000 µg/ml zeigte sich mit 39,2 (+/-31,89) EZM-invasiven Zellen nur eine geringe Migration. Die LSL zeigte mit 76,14 (+/-51,86) migrierten Zellen eine chemotaktische Wirkung auf die PBMCs ähnlich der niedrigen Histondosen (s. Abb 31).

Illustrativ* zeigte sich in der einfachen Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied zwischen der Histondosis 15,625 µg/ml und 250 µg/ml (*p= 0,0475) sowie zwischen der Histondosis 250 µg/ml und 1000 µg/ml (**p=0,0019). Es zeigte sich ein Anstieg der EZM-invasiven PBMCs bei Zunahme der Histonexposition des hRPC-Tubulus bis hin zu der Histonkonzentration von 500 µg/ml. Interessanterweise fiel die Anzahl gewanderter hPBMCs bei noch höheren Dosen

(1000 µg/ml) wieder deutlich ab. Hierbei zeigte sich lichtmikroskopisch im hRPC-Kanal eine optisch dichte Detritusmembran am Kollagenmeniskus.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass nach einer schädigungsinduzierten Freisetzung chemotaktischer Moleküle ein chemotaktischer Gradient über die EZM entstand, welcher wiederum die PBMCs zur Migration anregte. Dabei deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die Stärke der chemotaktischen Wirkung (und konsekutiv die Anzahl migrierender PBMCs) mit dem Ausmaß der Schädigung im hRPC-Tubulus korrelierte.

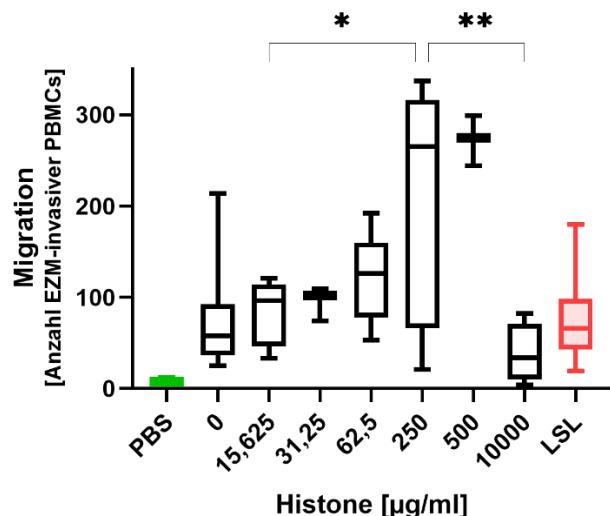


Abbildung 31: Graphische Darstellung der Anzahl migrierter PBMCs in Abhängigkeit von der Toxinexposition des hRPC-Tubulus.

Illustrativ* zeigt eine einfache Varianzanalyse (ordinary one-way ANOVA) Unterschiede in der Anzahl EZM-invasiver PBMCs zwischen der Histondosis 15,635 µg/ml und 250 µg/ml (*p=0,0475) sowie zwischen der Histondosis 250 µg/ml und 1000 µg/ml (**p=0,0019).

*Der Terminus „illustrativ“ soll darauf hinweisen, dass im Rahmen der Protokolletablierung dieses Chemotaxis-Modells nur eine geringe Anzahl an Experimenten realisiert wurde. Die genaue Aufschlüsselung der Anzahl biologischer und technischer Replikate sind in Tabelle 5 (Anhang) dargelegt.

5 Diskussion

5.1 Zielsetzung und Hypothesen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung eines hRPC-basierten, mikrofluiden, 3-dimensionalen Tubulusmodells in der OrganoPlate®. Darin sollte zudem eine komplexe Ko-Kultur von hRPCs und Immunzellen zur Darstellung von Immunmigration etabliert werden.

Im Rahmen dieser Modellentwicklung wurden folgende zentrale Fragestellungen und Hypothesen formuliert:

- Die Realisation eines hRPC-Tubulus in der OrganoPlate® 3-lane ist möglich (1).
- Der hRPC-Tubulus zeigt eine stabile Viabilität und Barrierefunktion (2a) und kann als Grundlage für Langzeituntersuchungen dienen (2b).
- Die Zellkulturbedingungen der OrganoPlate® (3-dimensionale tubuläre Konformation, bidirektionale Perfusion mit konsekutiver apikaler Scherkraft sowie die Zell-Matrix-Interaktion) induzieren einen differenten hRPC-Phänotyp in Bezug auf die Markerproteine F-Aktin, Na⁺-K⁺-ATPase und ZO-1 im Vergleich zu hRPCs in herkömmlichen 2D-Zellkulturplattformen (3).
- Der hRPC-Tubulus ist ein geeignetes Modell für Toxizitätsstudien (4).
- Die Histon-induzierte Schädigung des hRPC-Tubulus führt zu einer gerichteten Migration primärer humaner Leukozyten durch die extrazelluläre Kollagen-Matrix in Richtung des geschädigten Tubulus (5a). Hierbei korreliert die Anzahl migrierender Leukozyten mit dem Ausmaß des Histon-induzierten Tubulusschadens (5b).

5.1.1 Humane renale Progenitorzellen zeigen ein Wachstumsmuster als Zellrasen oder als Sphäroide mit unterschiedlicher metabolischer Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass hRPCs in Abhängigkeit von Kollagen-I differente Wachstumsmuster und metabolische Aktivität zeigen. Während sich in herkömmlichen Petri-Zellkulturschalen ein hRPC-Zellrasen bildete, kam es bei Aussaat auf Kollagen-I nach ca. 2 Tagen zur Formation von Sphäroiden. Hierbei zeigte sich lichtmikroskopisch keine quantifizierbare Größenprogredienz der Sphäroide bis zu Tag 5. Im Ggs. dazu zeigten hRPCs in unbeschichteten Wells eine schnelle Zunahme der Konfluenz. Es zeigte sich eine ca. 3-fach höhere metabolische Aktivität des hRPC-Zellrasens im Vergleich mit den Sphäroiden an Tag 5. Lichtmikroskopisch fanden sich hierbei in keinem der beiden Ansätze avitale Zellen. Dies steht im Einklang mit der Literatur: hRPCs weisen in herkömmlichen, unbeschichteten Zellkulturschalen eine sehr hohe klonale Expansionsfähigkeit von bis zu 90 Populationsverdoppelungen auf (Lazzeri et al., 2015). Hingegen zeigen sie bei Kultivierung in „hanging-drops“ die Formation von Sphäroiden mit geminderter Zellteilung. Postuliert wurde hier eine Proliferationshemmung durch die Bildung von Zellaggregaten (Sobreiro-Almeida et al., 2021).

5.1.2 hRPCs bilden in der OrganoPlate® einen 3-dimensionalen, konfluenten Tubulus (1)

Es konnte gezeigt werden, dass hRPCs eine geeignete Zellquelle zur Etablierung eines Tubulus in der OrganoPlate® darstellen (1a). Dabei erwies sich eine Zellzahl von 15.000 hRPCs pro Kanal als suffizient, um nach drei Tagen unter Perfusionsbedingungen einen geschlossenen Tubulus zu formieren. Durch Auslenkung der OrganoPlate® alle 8 Min. um 7° aus der Horizontalebene, wurde über die resultierende bidirektionale Perfusion der Kanäle eine mittlere apikale Scherkraft von ca. 0,13 dyn/cm² auf die Zellen erzeugt. Damit lag dieser Mittelwert im physiologischen Bereich des prox. Tubulus (Wilmer et al., 2016). Jedoch ist anzumerken, dass das Flussprofil nicht mit der aus der GFR resultierenden unidirektionalen, relativ konstanten Scherkraft (engl.: „fluid shear stress“; FSS) *in vivo* vergleichbar waren: Messungen in der OrganoPlate® zeigen, dass es zu FSS-Spitzen bis 1,7 dyn/cm² zu Beginn der Auslenkung und folgender asymptotischer Annäherung gegen 0 dyn/cm² in der OrganoPlate® kommt (Vormann et al., 2018). Mehrere Arbeiten an humanen prox. Tubuluszellen (PTC) und renalen Zelllinien konnten jedoch einen verbesserten Phänotyp der Zellen in der OrganoPlate® zeigen. Qualitativ ergaben sich dabei vergleichbare Ergebnisse zu mikrofluiden Systemen mit unidirektionalem und konstantem Flussprofil. So wurde unter anderem mittels IF-Färbung von ZO-1 (Tight-junction protein), Cadherin-1 (CDH1; Adhärenskontakt), acetyliertem Tubulin (prim. Zilien-Markerantigen), Ezrin (Mikrovilli) und der Na⁺-K⁺-ATPase an primären renalen Tubuluszellen eine *in vivo*-getreue Polarisierung gezeigt. Ebenso wurde eine stabile Barrierefunktion gegenüber 4,4- und 150 kDa-Dextranen gezeigt (Deane et al., 2013; Schutgens et al., 2019; Vormann et al., 2018; Vriend et al., 2018). Zudem konnte durch Applikation von Substraten und Inhibitoren verschiedener renaler Transportproteine (P-gp, MRP2/4, SGLT2, MRP, OCT1, OCT2, Cubilin, Megalin) die Funktionalität wichtiger tubulärer Transportwege und damit die Möglichkeit zu Toxizitäts- und DDI-Studien in der OrganoPlate® gezeigt werden (Vormann et al., 2018; Vriend et al., 2018, 2020).

5.1.3 Der hRPC-Tubulus zeigt eine stabile Viabilität und Barrierefunktion (2a) über 9 Tage und kann als Grundlage für Langzeituntersuchungen dienen (2b)

Der hRPC-Tubulus zeigte sich morphologisch, metabolisch und mit zunehmender Barrierefunktion über einen Zeitraum von 9 Tagen stabil. Unter voll supplementiertem Medium (20% Hyclone) zeigte sich dabei ein signifikanter Anstieg sowohl der metabolischen Aktivität (ca. 4-fach) als auch des zellulären Schädigungsmarkers LDH (ca. 2-fach) über die Zeit. *in vivo* sind Tubuluszellen apikal dem Primärharn ausgesetzt, welcher in seiner Zusammensetzung im weitesten Sinne einem proteindepletierten Plasma entspricht. Zur weiteren Optimierung erfolgte daher im nächsten Schritt die Inkubation des hRPC-Tubulus unter Nährstoffdepletion. Hierfür wurde an drei Tage alten Tubuli das Medium gegen Ringer-Laktat-Lösung getauscht. Durch die Applikation des voll supplementierten Mediums in den zellfreien Kanal sollte die Nährstoffversorgung in diesem Experiment im Sinne einer peritubulären Kapillare von basolateral erfolgen. Unter diesen Konditionen zeigte sich, dass die Barrierefunktion, LDH und metabolische Aktivität (MTT) auf dem zuvor erreichten Niveau (Tag 3) bis zu Tag 9 stabil blieb. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Tag 3 und Tag 9 in Hinsicht auf die Barrierefunktion, der LDH-Aktivität oder der metabolischen Aktivität. Tendenziell zeigten die Daten jedoch eine Abnahme der Barrierefunktion und der metabolischen Aktivität in Kombination mit einem LDH-Anstieg. Gerade in Hinsicht auf die

Etablierung einer Langzeitkultur (ggf. über die Dauer von 9 Tagen hinaus) scheinen diese Ergebnisse vielversprechend. Die beschriebenen Tendenzen unter Ringerlösung lassen sich in dem Sinne interpretieren, dass die Nährstoffdepletion nicht vollständig über die FBS-Applikation im zellfreien Kanal („peritubuläre Kapillare“) kompensiert werden konnte. Eine über den Zeitraum von 9 Tagen hinausgehende Nutzbarkeit des hRPC-basierten Tubulus mithilfe eines geringen Zusatzes von Nährsubstrat im Medium erscheint aufgrund der ermittelten Daten plausibel. Hierzu wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchungen angestellt.

In der Zusammenschau der Ergebnisse von LDH, MTT und BIA-Messungen an hRPC-Tubuli unter Standard- und Primärharnbedingungen war interessant, dass sich aus den vorliegenden Daten eine positive Korrelation von metabolischer Aktivität (MTT) und Zellschaden (LDH) andeutete. Hierbei war es denkbar, dass sich zwei Effekte Überlagerten, welche zu einem LDH-Anstieg führten: Zum einen zytotoxische Effekte bei zellulärem Stress (z.B. aufgrund von Überkonfluenz). Zum anderen kam es möglicherweise zu einer erhöhten „LDH-Baseline“ bei erhöhter (gesunder) Zellmasse (Cox et al., 2021). In diesem Falle zu hinterfragen, inwiefern die Zunahme der Barrieredichtheit auf eine tatsächliche Ausbildung von Schlussleistenkomplexen oder möglicherweise auf eine einfache Erhöhung der Zelldichte zurückzuführen war. Gerade vor dem Hintergrund der im Folgenden diskutierten Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung (s.u.) scheinen zumindest Überlagerungen dieser Effekte denkbar. Dies führt dementsprechend auch zu der Frage, ob und wenn ja, welche Differenzierung der hRPCs in der OrganoPlate® stattfindet: Während die verschiedenen Nephronabschnitte sehr unterschiedliche Barriereigenschaften aufweisen, ist dies die spezifische Funktion differenzierter Tubuluszellen. Die hRPCs wirken hieran jedoch nicht mit. Vor diesem Hintergrund und den noch vielen offenen Fragen, erscheinen Studien zur weiteren Differenzierung des hRPC-Tubulus in der OrganoPlate ein attraktives Projekt für nachfolgende Arbeiten zu sein.

5.1.4 Der hRPC-Tubulus zeigt in Bezug auf die Markerproteine F-Aktin, Na⁺-K⁺-ATPase und ZO-1 im Vergleich zu hRPCs in herkömmlichen 2D-Plattformen keine phänotypischen Unterschiede (3)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten IF-Färbungen der Marker Na⁺/K⁺-ATPase, F-Aktin und ZO-1 unter herkömmlichen 2D-Zellkulturbedingungen sowie in der OrganoPlate®. Hierbei sollte eine mögliche Scherkraft (engl.: „fluid shear stress“; FSS)- induzierte Veränderung des Phänotyps gezeigt werden. Auf die zellbiologischen Hintergründe dieser Proteine sowie deren Expressionsänderung unter FSS in differenzierten renalen Epithelzellen wurde ausführlich in Abschn. 4.2 eingegangen. Kurz zusammengefasst zeigen PTCs unter FSS eine Aktinreorganisation mit Ausbildung eines „terminal web“ und Reduktion von Stressfasern (Duan et al., 2008; Essig et al., 2001; Maggiorani et al., 2015; Ross et al., 2021). Daneben kommt es FSS-induziert zu einer Umverteilung der Na⁺/K⁺-ATPase in die basolaterale Membran (Duan et al., 2010; Jang et al., 2013). Bzgl. FSS-induzierter Veränderungen der ZO-1-Expression zeigen sich, bei heterogener Studienlage, keine eindeutigen Ergebnisse. Während einige Untersuchungen keine Unterschiede der ZO-1-Expression unter FSS fanden, konnten andere Arbeitsgruppen eine distinktere Expression in der Zellperipherie mit weniger interzellulären Lücken darstellen (Cattaneo et al., 2011; Dankers et al., 2011; Duan et al., 2008; Frohlich et al., 2012; Jang et al., 2013; Maggiorani et al., 2015; Ross et al., 2021).

Interessanterweise konnten an hRPC-Tubuli im Vergleich der fluiden und statischen Bedingungen keine quantifizierbaren Unterschiede der drei Markerproteine nachgewiesen werden. Mehrere Aspekte sind in diesem Zusammenhang diskussionswürdig: Methodisch muss angemerkt werden, dass gerade bei Fragen der Zellpolarisierung und Quantifizierung von Immunfluoreszenzfärbungen die Bildakquise mittels Konfokalmikroskopie angestrebt werden sollte. Aus den vorliegenden IF-Bildern ist über eine mögliche FSS-induzierte Zellpolarisation bzw. Umstrukturierung (ZO-1 sub-apikal, Na⁺-K⁺-ATPase basolateral) keine Aussage ableitbar. Darüber hinaus limitiert die geringe Auflösung in z-Richtung die Bildqualität insofern, als dass es durch die Tubuluskonformation zu einer Überlagerung von zwei Zellschichten kommt, während es bei der statischen Inkubation nur eine ist. Dies wiederum führt gerade in Hinsicht auf eine valide Quantifizierung der IF-Intensität zu methodisch nicht überwindbaren Schwierigkeiten. Vor diesem Hintergrund ist die Sensitivität einer möglichen Expressionsänderung der Markerproteine i.R. dieser Arbeit verringert. Interessant war jedoch, dass gerade die ausbleibende Phänotypänderung unter FSS dafürsprechen könnte, dass es sich auch nach drei Tagen unter FSS weiterhin um undifferenzierte hRPCs handelte. Damit wäre FSS als singulärer Stimulus nicht ausreichend um eine Differenzierung anzustoßen. Hinlänglich bekannt ist, dass gerade der proximale Tubulus funktionell und phänotypisch sehr sensibel auf FSS reagiert. *in vivo* muss der proximale Tubulus seine resorpptive Aktivität genau der GFR – und damit der apikalen Scherkraft anpassen. Dies ist ein zentraler Mechanismus der systemischen Homöostase, um den Wasser- und Elektrolythaushalts sowie den pH konstant zu halten. Es verwundert daher nicht, dass FSS *in vitro* einen *in vivo*-ähnlicheren Phänotyp induziert. Hierbei kommt es u.a. zu einer hochprismatischen Zellgeometrie und typischer Polarisation in ein apikales und basolaterales Kompartiment (s. Einleitung Abs. 1.3.1). Darüber hinaus findet sich als funktionelles Korrelat eine durchgreifende Änderung der Expression resorptiver Proteine in der Zellmembran (u.a. NHE3, V-ATPase, AQP1, H⁺-ATPase u.v.m.) (s. Einleitung Abs. 1.3.1). Untersuchungen zu Mechanismen der Mechanotransduktion in renalen Tubuli legen nahe, dass v.a. die Strukturen des Bürstensaums (Mikrovilli) durch FSS-induzierte Auslenkung eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen, welche konsekutiv zu funktionellen Anpassungen an eine veränderte GFR führen (Guo et al., 2000; S. Weinbaum et al., 2001; Sheldon Weinbaum et al., 2011). Im Ggs. dazu haben undifferenzierte hRPCs jedoch keinen Bürstensaum (Huang et al., 2021; Smeets et al., 2013), was möglicherweise ein Erklärungsansatz einer geringeren FSS-Responsivität sein könnte. Gleichsam wäre dies als Erklärungsansatz dafür zu verstehen, warum unter FSS keine Differenzierung von hRPCs zu erreichen ist. Darüber hinaus zeigten Sagrinati et al., dass Markerproteine differenzierter Tubulusabschnitte (u.a. NHE3, Aquaporin-1/3, Na/Cl-Transporter) in hRPCs fehlen. Eine tubuläre Differenzierung konnte jedoch durch Zusätze im Medium (Hydrocortison, hEGF, FBS, Epinephrin, Insulin, Triiodothyronin, Transferrin, HGF) induziert werden (Sagrinati et al., 2006). Eine Untersuchung, ob und inwiefern rein mechanistische Inkubationsbedingungen letztendlich den Verlust des Stammzellphänotyps der hRPCs induzieren können (Phänotypisierung bzgl. der Stammzellmarker CD24, CD133, Bmi-1, Oct-4), könnte Gegenstand folgender Arbeiten werden.

5.1.5 Der hRPC-Tubulus exprimiert MDR1 und könnte als Plattform für Toxizitätsstudien dienen (4)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte evaluiert werden, ob die Barrierefunktionsintegrität des hRPC-Tubulus als Schädigungsparameter für Toxizitätsstudien geeignet ist. Hierfür erfolgte die Barrierefunktionsmessung nach 24-stündiger Toxinexposition eines konfluenten hRPC-Tubulus. Die untersuchten Toxine waren Histone (Hist), Aristolochiasäure (AA) und Cisplatin (CisP). Tween diente als Positivkontrolle. Die Hypothese der jeweiligen Barrierefunktionsminderung durch die eingesetzten Toxine wurde aus deren unterschiedlichen Schädigungsmechanismen abgeleitet (siehe hierzu Abschn. 4.4.3). Hierbei zeigte sich, dass Tween eine vollständige Disruption der Barriere bewirkt. Hist. und AA, deren toxische Wirkung u.a. auf direkten zytotoxischen Effekten beruht, zeigten eine intermediäre Barrierefunktionsminderung, während CisP (Hemmung der DNA-Replikation) den geringsten Effekt zeigte. Bezüglich der CisP-Wirkung ist hierbei einschränkend anzumerken, dass *in vivo* die Aufnahme von Cisplatin hauptsächlich über den basolateral lokalisierten OCT2-Transporter erfolgt (Schoch et al., 2021; Tiong et al., 2014). In diesem Experiment erfolgte die Toxinexposition jedoch über den Zellkanal, und damit von apikal. Es ist also nicht ableitbar, ob es sich um eine im Vergleich zu Hist., AA und Tween geringere Toxizität nach 24 Std. handelt, oder ob ein polarisierter hRPC-Phänotyp die Pharmakokinetik dahingehend verändert hat, dass das Toxin nicht von apikal in die Zelle aufgenommen werden konnte. Darüber hinaus können diese Daten aufgrund der geringen Replikate (Biol.1, Techn.1) nur illustrieren, dass die Barrierefunktion des hRPC-Tubulus ein vielversprechender Parameter für Toxizitätsstudien sein könnte. Vor dem Hintergrund dieser pharmakodynamischen Überlegungen sollte illustriert werden, dass der hRPC-Tubulus ebenfalls als Modell bzgl. pharmakokinetischer Studien dienen könnte. Hierfür sollte mittels Calcein-Färbung die Aktivität von MDR1 im hRPC-Tubulus gezeigt werden. MDR1 ist eine primär aktive Effluxpumpe, welche neben dem proximalen Tubulus in vielen weiteren Zelltypen vorkommt. Sie gewährleistet den Transport vieler Stoffe aus den Zellen. Hierzu gehören neben Chemotherapeutika auch Antibiotika, diverse Toxine und Virostatika. Dieser Umstand macht MDR1 im Rahmen von Medikamentenentwicklung und Studien zur Drug-Drug-Interaktion (DDI) zu einem relevanten Faktor (Food and Drug Administration, 2020; ICH, 2022; Morrissey et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Applikation von Verapamil (Hemmung von MDR1, siehe hierzu auch Abschn. 3.4.1.2) mit konsekutiv geringerem Efflux von Calcein gezeigt werden, dass MDR1-Aktivität in hRPCs nachweisbar ist. Hierbei zeigten wiederholte Messungen der Fluoreszenzintensität über 50 Minuten eine 1,9-fach höhere MFI bei Hemmung von MDR1. Diese Ergebnisse zeigen, dass das hRPC-Modell in weiterführenden Arbeiten mit pharmakokinetischen Fragestellungen nutzbar scheint.

5.1.6 Die Diffusion des Indikators FITC-Dextran zur Barrierefunktionsmessung des hRPC-Tubulus zeigt eine sigmoidale Kinetik

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Parameter MFI-25 [Min.] als Kennzahl der zellulären Barrierefunktion in der OrganoPlate® etabliert. Dieser war definiert als die Zeit [Min.] bis das Verhältnis der MFI im MK zum OK 0,25 betrug. Hierbei wurde zunächst die Diffusionskinetik des 150 kDa-Dextrans über die zelluläre Barriere in die EZM des MK ermittelt. Es zeigte sich

eine sigmoidale Kinetik der Indikatordiffusion, welche unabhängig von der Barrieredichtheit der einzelnen Chips war. So zeigte sich sowohl an hRPC-Tubuli mit guter Barrierefunktion (Messung an Tag 9), als auch an hRPCs unter Primärharnbedingungen oder nach Schädigung mit div. Toxinen eine sigmoidale Diffusionskinetik. Insgesamt erfolgte die Auswertung von 48 Messungen mit 13 unterschiedlichen Behandlungen. Davon waren 22 Messungen biologisch unabhängige Replikate. Diese Diffusionskinetik stand im Einklang mit Daten von Trietsch et al. und Vormann et al., welche ebenfalls eine sigmoidale Funktion der Diffusionskinetik von FITC-Dextran an Caco-2 und RPTEC zeigten (Trietsch et al., 2017; Vormann et al., 2018). Bei Zunahme der Barrierefunktion zeigte sich, dass die MFI im MK nur submaximale Werte erreichte. Dies sprach neben Gründen der Praktikabilität (lange Messdauer) gegen einen (intuitiver erscheinenden) Parameter von 50% MFI im MK. Als Grund für die nur submaximale Fluoreszenzintensität im MK bei guter Barrierefunktion scheinen die Weiterdiffusion des Indikators in den OK sowie Bleichungseffekte plausibel (Trietsch et al., 2017). Vormann et al. definieren mit der apparenten Permeabilität „ P_{app} “ [cm/s] einen Parameter, welcher die initiale Diffusion (Messung nach 0 und 10 Minuten) des Indikators durch die Barriere ins Verhältnis zur applizierten Indikatorkonzentration und der Diffusionsfläche setzt (Formel s. Abb. 32 im Anhang). Hierbei wird eine lineare Zunahme der MFI im MK angenommen, solange das Verhältnis der MFI im MK zu Zellkanal 0,1 nicht übersteigt (Nicolas et al., 2021; Vormann et al., 2018). Vorteilhaft ist hier die kurze und zeitlich limitierte Messdauer, welche gerade bei Zellen mit ausgeprägter Barrierefunktion (Stunden bis Tage) sinnvoll erscheint. Als nachteilig kann hierbei die erschwerte Interpretierbarkeit gesehen werden. Die Einordnung der Barrierefunktion von hRPCs in der OrganoPlate® im Vergleich zu Barrierefunktionen anderer Zellen zeigt interessante Einblicke: Schutgens et al. zeigten an im Chip differenzierten adulten Stammzellen nach 20 Min. keine Zunahme der MFI im MK (Schutgens et al., 2019). Trietsch et al. zeigten an Caco-2-Zellen eine Barrieredichtheit für über 4 Tage (definiert ab einem Verhältnis der MFI im Matrixkanal zum Indikatorkanal von 0,4) (Trietsch et al., 2017). An GEnCs konnten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls deutlich längere MFI-25-Zeiten von 59 Minuten gemessen werden. Diese Ergebnisse sprechen in der Zusammenschau mit den oben diskutierten Ergebnissen der Barrierefunktionsmessungen und der Immunfluoreszenz dafür, dass unter den hier gewählten Konditionen keine Differenzierung der Progenitorzellen hin zu einem Phänotyp mit ausgebildeten Schlussleistenkomplexen stattgefunden hat. Neben der Barrierefunktionsmessung mittels Dextranen scheinen mittlerweile mit „On-a-Chip“-Plattformen kompatible Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER; engl.: transepithelial/transendothelial electrical resistance) vielversprechend: Neben einer weitaus größeren Sensitivität auch für kleine Barrierefunktionsänderungen zeigten Nicolas et al. eine deutlich erhöhte TEER-Impedanz an intestinalen Caco-2 Zellen im Ggs. zu RPTEC (Nicolas et al., 2021). Definierte Indikator-basierte Barrierefunktionsmessungen können jedoch weiterhin bei der Untersuchung spezifischer Transportwege und bei DDI-Studien einen wichtigen Beitrag leisten.

5.1.7 Das Ausmaß einer Histon-induzierten Schädigung des hRPC-Tubulus korreliert mit der Anzahl migrierender primärer humaner PBMCs (5)

Inflammation spielt in der Pathophysiologie der meisten Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Die zugrunde liegenden Ursachen sind hierbei vielfältig und umfassen beispielsweise

Infektionen, Autoimmunprozesse und Zellschädigungen unterschiedlichster Genese. Während die Inflammation als Antwort auf eine Infektion von größter Bedeutung für die Elimination der Erreger und damit der Resolution der Erkrankung ist, beruhen autoinflammatorische Erkrankungen auf einer Fehlfunktion des Immunsystems. Zellschädigungen können beispielsweise durch Toxine, Medikamente und mechanische Krafteinwirkung bedingt sein oder sekundär, beispielsweise im Rahmen von Ischämien auftreten. Während die Ursachen solcher direkten zellulären Schäden nicht immunbedingt sind, ziehen sie dennoch eine sterile Inflammation nach sich. Diese wird der unsterilen Inflammation infektiöser Genese gegenübergestellt. In der Initiation dieser sterilen Inflammation spielen DAMPs aus geschädigten Zellen eine zentrale Rolle. Diese Moleküle werden durch Kompartimentwechsel (für tiefergehende Informationen siehe Einleitung, Abschn. 1.2.3) von Rezeptoren benachbarter Zellen erkannt, was zur Synthese proinflammatorischer und chemotaktischer Faktoren führt. Hierdurch wird konsekutiv die Immunzellrekrutierung in das geschädigte Gewebe eingeleitet (Anders & Schaefer, 2014; Ma et al., 2024). Im weiteren Verlauf ist die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren für die Beseitigung des geschädigten Gewebes zum einen - und die Restitution und Wiederherstellung der Organfunktion zum anderen von entscheidender Bedeutung.

Sterile Inflammation nach Zellschädigungen rückt aktuell in vielen Fachgebieten in den Fokus intensiver Forschung, da diese inflammatorischen Prozesse oftmals den lokalen Gewebeschaden noch verstärken und damit den Verlauf der Erkrankung agravieren können (Ma et al., 2024; Vallés et al., 2023). Ein plastisches Beispiel hierfür findet sich in der Kardiologie, wo eine Vielzahl klinischer Studien zur Antagonisierung der inflammatorischen Kaskade nach Myokardinfarkt realisiert werden (Panahi et al., 2018). Ein zentraler Schritt der inflammatorischen Kaskade stellt die Rekrutierung zirkulierender Immunzellen in das geschädigte Gewebe dar. Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen dieser Arbeit evaluiert werden, ob der hRPC-Tubulus als Modell schädigungsinduzierter Migrationsinduktion dienen kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll zur Implementation primärer humaner PBMCs in die OrganoPlate® etabliert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Histonduzierte Schädigung eines hRPC-Tubulus zu einer Migration der Leukozyten in die Kollagenmatrix des mittleren Kanals der OrganoPlate® in Richtung des Schädigungsortes führt. Hierbei korrelierte die Anzahl der migrierten PBMCs mit der applizierten Histondosis.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte primär ein Protokoll („proof of concept“) zur Migrationsinduktion im Chip erarbeitet werden. Daher wurde initial evaluiert, welche primären Leukozyten die einfachste Handhabung in Bezug auf diese Fragestellung zeigen. Hierfür wurden die zuvor aus humanem Vollblut isolierten Fraktionen der Lymphozyten (PBMCs) und der neutrophilen Granulozyten (PMNs) sowie die beiden Fraktionen gemeinsam (WBCs) in die OrganoPlate® eingebracht. Durch die Applikation von Lockstofflösung (LSL) in den freien Kanal wurde daraufhin ein chemotaktischer Gradient über die Kollagenmatrix im mittleren Kanal geschaffen. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich eine signifikant höhere Migration unter LSL-Stimulation gegenüber einer nur geringen unspezifischen Migration in den Negativkontrollen (* $p=0,03$). Die Höhe der Migration unter LSL-Stimulation war vor dem

Hintergrund, dass LSL keine standardisierten Dosen definierter chemotaktischer Stoffe enthält (siehe Herstellung LSL unter Abschn. 3.3.2) in den absoluten Zahlen nicht sinnvoll interpretierbar. Vielmehr war aufgrund theoretischer Überlegungen erwartbar, dass LSL im allgemeinen Migration induziert. Über das Ausmaß der chemotaktischen Wirkung sowie der Identifizierung und Quantifizierung der Chemotaxine wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine Versuche realisiert. Nichtsdestotrotz sei erwähnt, dass durch die signifikante Immunzellmigration als Antwort auf LSL-Stimulation gezeigt werden konnte, dass die oben beschriebenen Abläufe einer sterilen Inflammation *in vitro* darstellbar waren.

Die PBMCs zeigten dabei zahlenmäßig die höchste absolute Migration, bei einer unspezifischen Migration von 9,8% (Verhältnis der Migration in der D-PBS-Kontrolle zu derjenigen unter LSL). Die PMNs zeigten eine intermediäre absolute Migration bei einer unspezifischen Migration von 19,4%. Die WBCs zeigten keine nennenswerte Migration. Während die verringerte Migration der neutrophilen Granulozyten a.e. auf ihre kurze HWZ *in vitro* zurück zu führen war (Kuhns et al., 2015), stellte der frühe Zerfall der Granulozyten möglicherweise auch eine plausible Erklärung für die geminderte Migration der PBMCs bei Ko-Implementation mit den PMNs dar. Hierbei könnte die chemotaktische Wirkung des LSL-Gradienten durch Interaktionen der PBMCs mit den absterbenden Granulozyten geschwächt worden sein. Weitergehende Untersuchungen zu den Hintergründen der unterschiedlichen Migrationsfähigkeit der Leukozytenfraktionen waren nicht Bestandteil dieser Arbeit. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die folgenden Experimente im Rahmen der Modelletablierung mit PBMCs durchgeführt.

Im nächsten Schritt erfolgte der Vergleich der Migration unter statischen (Plate-Holder) und fluiden (Rocker) Bedingungen. Hierbei zeigte sich eine 4,1-fach (****p<0,0001) niedrigere Migration im fluiden System bei jedoch guter absoluter Migration. Gründe für die niedrigere Migration unter fluiden Bedingungen war möglicherweise eine strömungsbedingte Ausschwemmung der Leukozyten von der Kollagenmembran oder auch ein vermehrtes „Auswaschen“ des chemotaktischen Gradienten. Auch schien eine Schwerkraft-bedingte artifizielle Triebkraft im statischen Design (Inkubation auf dem PlateHolder: Hierbei befand sich der PBMC-Kanal oben und LSL wurde in den unteren Kanal appliziert) neben den eigentlich zu messenden chemotaktischen Vorgängen denkbar.

Um das Modell weiter den Gegebenheiten *in vivo* anzupassen sollte eine hRPC-Schädigung *in vitro* eine PBMC-Migration initiieren. Die Idee hinter diesem Experiment war, dass die Initiation der Kaskade einer sterilen Inflammation im Chip möglich sei: Zelluläre Schädigung führt zu einer Freisetzung von DAMPs. Geschädigte und nicht geschädigte Zellen produzieren daraufhin proinflammatorische und chemotaktische Faktoren. Diese Zytokine und Chemokine führen zu einer gerichteten Immunzellmigration in Richtung des Schädigungsortes.

Wir konnten zeigen, dass die Schädigung eines hRPC-Tubulus mittels Histone die Migration von PBMCs im Chip induziert. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass das Ausmaß der Migration primärer PBMCs mit der Dosis der Histone korreliert, mit welcher ein hRPC-Tubulus geschädigt wurde. Hierbei kam es bis zu einer Dosis vom 500µg/ml Histonen zu einer Zunahme der Anzahl der gewanderten PBMCs. Bei der Höchstdosis (1000µg/ml) zeigte sich hingegen nur eine Migration auf dem Niveau der Medium-Kontrolle. Im lichtmikroskopischen Bild zeigte sich hierbei eine optisch dichte Membran am Kollagenmeniskus im hRPC-Kanal. Möglicherweise stellte diese eine Diffusionsbarriere für chemotaktische Faktoren dar.

Denkbar war jedoch vor allem, dass Histone in dieser Dosis eine unmittelbare und sofortige letale Wirkung auf die gesamten hRPCs hatten (im Ggs. zu einem subletalen Schaden bei den niedrigeren Dosen). In diesem Falle wäre dann die geminderte Migration auf die fehlende Produktion von Chemotaxinen zurückzuführen.

Die Darstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen einem Toxin-induzierten „Gewebeschaden“ und Immunzellmigration in einer „On-a-Chip“-Plattform, ist nach aktueller Recherche ein neuer Aspekt in der Literatur. Vor dem Hintergrund des rasch wachsenden Feldes neuer, biologika- und small-molecule- basierter Therapien, bei denen es darum geht, die Migration nur bestimmter (nämlich proinflammatorischer) leukozytärer Subfraktionen zu hemmen (Luster et al., 2005), könnten solche Modelle in Studien zur Pharmakodynamik einen wertvollen Beitrag leisten.

5.2 Limitationen der Arbeit

Dem Ziel, durch die Organ-on-a-Chip-Technologie (OoC) eine hohe IVIVE zu erzielen, stehen aktuell noch einige Hürden im Weg. Analog zu anderen Zellkulturplattformen spielt auch hier die Auswahl des Materials aufgrund von Unterschieden in Gas-Permeabilität, optischer Transparenz, Absorption diverser Stoffe, Elastizität und biologischer Kompatibilität eine wichtige Rolle. Beispielsweise zeigt das häufig eingesetzte Polydimethylsiloxan (PDMS) eine gute Gas-Permeabilität sowie vorteilhafte elastische und optische Eigenschaften. Des Weiteren ist es fast vollständig inert. Nachteilig an PDMS ist, dass es eine breite Ab-/Adsorption diverser Moleküle aufweist. Dies ist in experimentellen Fragestellungen wie beispielsweise Toxizitätsmessungen unbedingt zu berücksichtigen (Leung et al., 2022; Wang et al., 2012). Glas und kohlenstofffreie Polysiloxane zeigen verbesserte Ab-/Adsorptionseigenschaften, sind aber kostenintensiv und weniger einfach in der Handhabung und Herstellung. Die Gruppe der thermoplastischen Kunststoffe wie Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Polycarbonat weisen ebenfalls gute Ab-/Adsorptionseigenschaften auf und sind daher für Toxizitätsmessungen geeignet. Darüber hinaus sind sie kostengünstig, haben jedoch eine nur geringe Gaspermeabilität (Leung et al., 2022). Dargestellte Sachverhalte illustrieren, dass die Materialauswahl der Zellkulturplattform generell unter Berücksichtigung der Fragestellung und methodischen Auswertung erfolgen sollte.

Eine weitere große Hürde, Organfunktionen „on-the-Chip“ nachzuahmen liegt darin, dass bis dato unterkomplexe Komponenten der Extrazellulärmatrix verwendet werden. Hauptgrund hierfür ist der Umstand, dass Extrazellulärmatrix (EZM) in der jeweils organspezifischen Zusammensetzung und biologischer Funktion kommerziell nicht erhältlich ist. Infolgedessen wird, wie auch in dieser Arbeit, mit einzelnen Komponenten der EZM gearbeitet. Häufige Verwendung finden hierbei Kollagen-I-Gele aber auch Gemische wie Matrigel (Kutluk et al., 2023). Bisher sind über 15 verschiedene biochemische und biophysikalische Eigenschaften charakterisiert, welche die zelluläre Biologie, Differenzierung, Proliferation, Adhäsion und vieles mehr beeinflussen (Akhmanova et al., 2015; Schlie-Wolter et al., 2013). Hierzu gehören neben der Zusammensetzung (Bsp. Laminin, Fibronectin, Kollagene) auch die Matrixsteifigkeit, Porosität und Viskoelastizität. Darüber hinaus dient die EZM als Reservoir biologisch aktiver Moleküle („Matrikine“) wie Wachstumsfaktoren, welche ebenfalls ortsspezifische Zelfunktionen mitbestimmen (s. Einleitung). Während also die Verwendung

einzelner Komponente der EZM nicht die Komplexität der EZM *in vivo* wiederspiegelt, kommt es bei der Verwendung von Gemischen wie Matrigel ebenfalls zu Schwierigkeiten: Hierbei spielen Variabilität zwischen verschiedenen Chargen, organuntypische Zusammensetzung sowie differierende Matrikalmuster eine Rolle (Hughes et al., 2010; Kutluk et al., 2023). Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, werden neben diesen natürlichen auch synthetische Hydrogele verwendet. Diese erlauben eine höhere Standardisierung gerade in Hinsicht auf physikalische Eigenschaften, haben jedoch keine biologischen Funktionen wie Adhäsions-Sequenzen oder Wachstumsfaktoren (Kutluk et al., 2023). Ein interessanter Ansatz zur Überwindung dieser Problematik ist dezellularisierte EZM: Diese kann organspezifisch gewonnen werden und könnte so zu einer weiteren Verbesserung der IVIVE führen (X. Zhang et al., 2022).

Neben der Auswahl des Plattformmaterials und der EZM gibt es noch weitere Aspekte, welche dem breiten Einsatz von OoCs entgegenstehen. So ist die physiologische Relevanz für den Menschen im Gegensatz zu anderen *in vitro*-Modellen oder Tiermodellen wenig validiert. Für den Einsatz der OoC-Technologie beispielsweise im Rahmen personalisierter Medizin oder Medikamententestung ist eine breite Validierung und Standardisierung von OoC-Modellen anhand von klinischen Daten ausstehend (Leung et al., 2022). Ein weiterer Aspekt, welcher dem breiten Einsatz der OoC-Technik entgegensteht, ist die erschwerete Vereinbarkeit mit Hochdurchsatzverfahren: Die humane komplexe Anatomie kann *in vitro* letztendlich nicht vollständig abgebildet werden. Hier gilt es einen Kompromiss zwischen physiologischer Relevanz und Praktikabilität zu finden: Dieser sollte die Vorteile etablierter *in vitro*-Testung (kostengünstig, Hochdurchsatz, geringer Aufwand bei schnellen Ergebnissen) mit einer hohen IVIVE kombinieren. Dabei muss die Extrapolierbarkeit für den Menschen besser sein als die IVIVE von Tiermodellen. In diesem Sinne könnte das Design kommerzieller OoC-Plattformen ein sinnvoller Ansatz sein. Beispielsweise ist der Einsatz pumpenbasierter fludier Systeme im Ggs. zu Schwerkraft-induziertem Fluss mit deutlich höherem Aufwand verbunden. Des Weiteren erlaubt eine OoC-Zellkulturplattform im Layout herkömmlicher Zellkulturplatten wie 96-Well-Platten eine vereinfachte Kompatibilität mit vielen etablierten Ausleseverfahren (Leung et al., 2022).

Die vorliegende Arbeit und die bisher genannten Limitationen haben sich auf Fragestellungen und (patho-)physiologische Überlegungen bezogen, welche sich lokal begrenzt abspielen und somit in „einfachen“ OoC-Modellen darstellbar sind. Für die Untersuchung von systemischen Erkrankungen und Organinteraktionen, sowie Studien zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik sind diese jedoch nicht geeignet. Daher sind Tiermodelle bis heute der Standard, um solche Fragen zu untersuchen (Srivastava et al., 2024). Um auch hier die Nachteile von Tiermodellen zu umgehen bestehen Bestrebungen, multiple OoCs unterschiedlicher Organe zu einem Ansatz zusammen zu schalten. Diese sog. „multi-organ-on-Chip systems“ (MOC) oder „body-on-Chips“ versprechen eine nahezu ideale Zellkultur (Lacombe et al., 2022). Diese Art der hochkomplexen Zellkultur steht jedoch aktuell am Anfang ihrer Entwicklung. Es bleibt abzuwarten, ob und wie schnell die oben genannten Schwierigkeiten bei der Implementation von OoCs durch MOCs überwunden werden.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung, Charakterisierung und Anwendung eines hRPC-basierten, mikrofluiden und 3-dimensionalen „On-a-Chip“-Modells. Die zentrale Fragestellung i.R. der Etablierung war hierbei zunächst ob es überhaupt möglich sei einen hRPC-Tubulus in der OrganoPlate® zu realisieren. Darauf aufbauend sollte eine Charakterisierung erfolgen mit der Frage nach Viabilität, Barrierefunktion, Langzeitkultivierung sowie der Expression von Markerproteinen. Im Bereich der Anwendung sollte beantwortet werden, ob das Modell für Toxizitätsstudien und Immunmigrationsuntersuchungen geeignet sei.

Folgende Hypothesen leiteten sich hieraus ab:

- Die Realisation eines hRPC-Tubulus in der OrganoPlate® 3-lane ist möglich (1).
- Der hRPC-Tubulus zeigt eine stabile Viabilität und Barrierefunktion (2a) und kann als Grundlage für Langzeituntersuchungen dienen (2b).
- Die Zellkulturbedingungen der OrganoPlate® (3-dimensionale tubuläre Konformation, bidirektionale Perfusion mit konsekutiver apikaler Scherkraft sowie die Zell-Matrix-Interaktion) induzieren einen differenten hRPC-Phänotyp in Bezug auf die Markerproteine F-Aktin, Na⁺-K⁺-ATPase und ZO-1 im Vergleich zu hRPCs in herkömmlichen 2D-Zellkulturplattformen (3).
- Der hRPC-Tubulus ist ein geeignetes Modell für Toxizitätsstudien (4).
- Die Histon-induzierte Schädigung des hRPC-Tubulus führt zu einer gerichteten Migration primärer humaner Leukozyten durch die extrazelluläre Kollagen-Matrix in Richtung des geschädigten Tubulus (5a). Hierbei korreliert die Anzahl migrierender Leukozyten mit dem Ausmaß des Histon-induzierten Tubulusschadens (5b).

Die Untersuchungsmethoden beliefen sich auf die klassischen Methoden der Zellkultur. Es wurde die „Organ-on-a-Chip“-Zellkulturplattform OrganoPlate® 3-lane (Mimetas, Leiden) in Kombination von primären hRPCs und primären humanen Leukozyten genutzt.

Zentrale Ergebnisse der vorliegenden Arbeit war die Protokollentwicklung für einen hRPC-basierten Tubulus in der OrganoPlate® (1). Des Weiteren wurde gezeigt, dass über die Variation der zellkulturellen Bedingungen eine stabile Viabilität und Barrierefunktion über 9 Tage möglich war (2). Es konnten keine Expressionsunterschiede der Markerproteine (s.o.) mittels Immunfluoreszenz quantifiziert werden (3). Hierbei waren methodische Schwächen anzumerken, da die Fluoreszenzmikroskopie gerade bei 3D-Zellkulturen durch die geringe Ortsauflösung eine geringe Sensitivität aufweist: Durch die Überlagerung der Fluoreszenzsignale der oberen und unteren Tubulusschicht erschwert sich der Vergleich zu herkömmlichen 2D-Zellkulturen. Des Weiteren waren durch die geringe Ortsauflösung gerade in z-Richtung Darstellungen der IF-Signale auf Zellebene nicht möglich. Mögliche Umverteilungen der Markerproteine auf Zellebene unter den Bedingungen der OrganoPlate® waren somit nicht nachweisbar. Illustrativ konnte dargestellt werden, dass der hRPC-Tubulus ein interessantes Modell für Toxizitätsstudien sein könnte (4). Die Barrierefunktion unter 24-stündigem Einfluss von Toxinen mit direkter und schneller zytotoxischer Wirkung (Tween, Histone) zeigte geringe Werte. Im Gegensatz dazu zeigte Cisplatin, welches als Alkyllanz langsamer seine zytotoxische Wirkung entfaltet eine geringere Disruption der Barrierefunktion nach 24 Stunden. Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit war die

Protokolletablierung einer Immunmigration im Chip (5). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Schädigung eines etablierten hRPC-Tubulus zu einer Immunmigration von primären Leukozyten führte. Hierbei befanden sich die hRPCs in einem Kanal der OrganoPlate® während Leukozyten durch die Kollagenmembran getrennt in ein separates, perfundiertes Kompartiment (i.S. einer peritubulären Kapillare) appliziert wurden. Während sich nach Histon-induzierter Schädigung des Tubulus eine Migration der Leukozyten durch die Kollagenmatrix in Richtung Schädigungsart zeigte, kam es ohne Schädigung nur zu einer minimalen Migration. Im Rahmen dieses Versuchsaufbaus konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das Migrationsausmaß mit dem Schädigungsgrad der hRPCs korrelierte. Dieses Ergebnis ist nach aktueller Literaturrecherche ein neuer Aspekt. Anwendung könnte das etablierte Modell im Rahmen der Grundlagen- und translationalen Forschung gerade in Hinsicht auf pharmakologische Fragestellungen i.R. präklinischer Studien finden.

Literaturverzeichnis

- Akhmanova, M., Osidak, E., Domogatsky, S., Rodin, S., & Domogatskaya, A. (2015). Physical, Spatial, and Molecular Aspects of Extracellular Matrix of in Vivo Niches and Artificial Scaffolds Relevant to Stem Cells Research. *Stem Cells International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/167025>
- Allam, R., Kumar, S. V. R., Darisipudi, M. N., & Anders, H. J. (2014). Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *Journal of Molecular Medicine*, 92(5), 465–472. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1148-z>
- Anders, H. J., Kitching, A. R., Leung, N., & Romagnani, P. (2023). Glomerulonephritis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 23(July), 453–471. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00816-y>
- Anders, H. J., & Schaefer, L. (2014). Beyond tissue injury - Damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(7), 1387–1400. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014010117>
- Andrianova, N. V., Buyan, M. I., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Popkov, V. A., Babenko, V. A., Silachev, D. N., Plotnikov, E. Y., & Zorov, D. B. (2019). Kidney cells regeneration: Dedifferentiation of tubular epithelium, resident stem cells and possible niches for renal progenitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246326>
- Angelotti, M. L., Ronconi, E., Ballerini, L., Peired, A., Mazzinghi, B., Sagrinati, C., Parente, E., Gacci, M., Carini, M., Rotondi, M., Fogo, A. B., Lazzeri, E., Lasagni, L., & Romagnani, P. (2012). Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells*, 30(8), 1714–1725. <https://doi.org/10.1002/stem.1130>
- Anguiano, L., Kain, R., & Anders, H. J. (2020). The glomerular crescent: Triggers, evolution, resolution, and implications for therapy. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 29(3), 302–309. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000596>
- Aschauer, L., Carta, G., Vogelsang, N., Schlatter, E., & Jennings, P. (2015). Expression of xenobiotic transporters in the human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1. *Toxicology in Vitro*,

- 30(1), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.003>
- Benigni, A., Morigi, M., Rizzo, P., Gagliardini, E., Rota, C., Abbate, M., Ghezzi, S., Remuzzi, A., & Remuzzi, G. (2011). Inhibiting angiotensin-converting enzyme promotes renal repair by limiting progenitor cell proliferation and restoring the glomerular architecture. *American Journal of Pathology*, 179(2), 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.003>
- Bertorello, A. M., Komarova, Y., Smith, K., Leibiger, I. B., Efendiev, R., Pedemonte, C. H., Borisy, G., & Sznajder, J. I. (2003). Analysis of Na⁺,K⁺-ATPase Motion and Incorporation into the Plasma Membrane in Response to G Protein-coupled Receptor Signals in Living Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 14(3), 1149. <https://doi.org/10.1091/MBC.E02-06-0367>
- Boyd, D. F., & Thomas, P. G. (2017). Towards integrating extracellular matrix and immunological pathways. *Cytokine*, 98, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.004>
- Cattaneo, I., Condorelli, L., Terrinoni, A. R., Antiga, L., Sangalli, F., & Remuzzi, A. (2011). Shear stress reverses dome formation in confluent renal tubular cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(4), 673–682. <https://doi.org/10.1159/000335813>
- Cox, M. C., Mendes, R., Silva, F., Mendes, T. F., Zelaya-Lazo, A., Halwachs, K., Purkal, J. J., Isidro, I. A., Félix, A., Boghaert, E. R., & Brito, C. (2021). Application of LDH assay for therapeutic efficacy evaluation of ex vivo tumor models. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97894-0>
- Dankers, P. Y. W., Boomker, J. M., Huizinga-van der Vlag, A., Wisse, E., Appel, W. P. J., Smedts, F. M. M., Harmsen, M. C., Bosman, A. W., Meijer, W., & van Luyn, M. J. A. (2011). Bioengineering of living renal membranes consisting of hierarchical, bioactive supramolecular meshes and human tubular cells. *Biomaterials*, 32(3), 723–733. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.020>
- De Haij, S., Woltman, A. M., Bakker, A. C., Daha, M. R., & Van Kooten, C. (2002). Production of inflammatory mediators by renal epithelial cells is insensitive to glucocorticoids. *British Journal of Pharmacology*, 137(2), 197–204. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704866>
- Deane, J. A., Verghese, E., Martelotto, L. G., Cain, J. E., Galtseva, A., Rosenblum, N. D., Watkins, D. N., & Ricardo, S. D. (2013). Visualizing renal primary cilia. *Nephrology*, 18(3), 161–168. <https://doi.org/10.1111/nep.12022>
- DesRochers, T. M., Suter, L., Roth, A., & Kaplan, D. L. (2013). Bioengineered 3D Human Kidney Tissue, a Platform for the Determination of Nephrotoxicity. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059219>
- Duan, Y., Gotoh, N., Yan, Q., Du, Z., Weinstein, A. M., Wang, T., & Weinbaum, S. (2008). Shear-induced reorganization of renal proximal tubule cell actin cytoskeleton and apical junctional complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32), 11418–11423. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804954105>
- Duan, Y., Weinstein, A. M., Weinbaum, S., & Wang, T. (2010). Shear stress-induced changes of membrane transporter localization and expression in mouse proximal tubule cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21860–21865. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015751107>
- Dziak, J. J., Coffman, D. L., Lanza, S. T., Li, R., & Jermiin, L. S. (2020). Sensitivity and specificity of information criteria. *Briefings in Bioinformatics*, 21(2), 553–565. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz016>
- EMA. (2012). Guideline on the investigation of drug interactions. *European Medicine Agency*, 44(June), 59.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf

Essig, M., Terzi, F., Burtin, M., & Friedlander, G. (2001). Mechanical strains induced by tubular flow affect the phenotype of proximal tubular cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 281(4 50-4), 751–762. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.4.f751>

Ewart, L., Apostolou, A., Briggs, S. A., Carman, C. V., Chaff, J. T., Heng, A. R., Jadalannagari, S., Janardhanan, J., Jang, K.-J., Joshipura, S. R., Kadam, M. M., Kanellias, M., Kujala, V. J., Kulkarni, G., Le, C. Y., Lucchesi, C., Manatakis, D. V., Maniar, K. K., Quinn, M. E., ... Levner, D. (2022). Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology. *Communications Medicine*, 2(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s43856-022-00209-1>

Food and Drug Administration, U. S. (2020). Guidance for industry: clinical drug interaction studies — cytochrome P450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions. <Https://Www.Fda.Gov/Media/134581/Download. Accessed October 18, 2020., January. https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm%0Ahttps://www.fda.gov/media/134582/download>

Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>

Freissmuth, M., Offermanns, S., & Böhm, S. (2020). *Pharmakologie und Toxikologie : von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie / Michael Freissmuth, Stefan Offermanns, Stefan Böhm* (3., überar). Berlin : Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58304-3>

Frohlich, E. M., Zhang, X., & Charest, J. L. (2012). The use of controlled surface topography and flow-induced shear stress to influence renal epithelial cell function. *Integrative Biology*, 4(1), 75–83. <https://doi.org/10.1039/c1ib00096a>

Fruttero, R., Crosetti, M., Chegaev, K., Guglielmo, S., Gasco, A., Berardi, F., Niso, M., Perrone, R., Panaro, M. A., & Colabufo, N. A. (2010). Phenylsulfonylfuroxans as modulators of multidrug-resistance-associated protein-1 and P-glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(15), 5467–5475. <https://doi.org/10.1021/jm100066y>

Guo, P., Weinstein, A. M., & Weinbaum, S. (2000). A hydrodynamic mechanosensory hypothesis for brush border microvilli. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 279(4 48-4), 698–712. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.4.f698>

Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2021). 3D cell culture systems: Tumor application, advantages, and disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212200>

Haberkorn, B., Fromm, M. F., & König, J. (2021). Transport of Drugs and Endogenous Compounds Mediated by Human OCT1: Studies in Single- and Double-Transfected Cell Models. *Frontiers in Pharmacology*, 12(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.662535>

Harrison, R. K. (2016). Phase II and phase III failures: 2013-2015. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(12), 817–818. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.184>

Heinemann, U. (2019). *Structural Features of Tight-Junction Proteins*. 1–24.

Huang, J., Kong, Y., Xie, C., & Zhou, L. (2021). Stem/progenitor cell in kidney: characteristics, homing, coordination, and maintenance. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02266-0>

- Hughes, C. S., Postovit, L. M., & Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10(9), 1886–1890.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>
- Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2011). From Three-Dimensional Cell Culture to Organs-on-Chips. *Trends Cell Biol*, 21(12), 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>.From
- Hynes, R. O., & Naba, A. (2012). Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>
- ICH. (2022). ICH Harmonised Guideline – Drug Interaction Studies (M12). *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, 31(May), 1–69.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m12-drug-interaction-studies-step-2b_en.pdf
- Ivanova, L., Hiatt, M. J., Yoder, M. C., Tarantal, A. F., & Matsell, D. G. (2010). Ontogeny of CD24 in the human kidney. *Kidney International*, 77(12), 1123–1131. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.39>
- Jadot, I., Declèves, A. E., Nortier, J., & Caron, N. (2017). An integrated view of aristolochic acid nephropathy: Update of the literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2).
<https://doi.org/10.3390/ijms18020297>
- Jang, K. J., Mehr, A. P., Hamilton, G. A., McPartlin, L. A., Chung, S., Suh, K. Y., & Ingber, D. E. (2013). Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 5(9), 1119–1129. <https://doi.org/10.1039/c3ib40049b>
- Kaysen, J. H., Campbell, W. C., Majewski, R. R., Goda, F. O., Navar, G. L., Lewis, F. C., Goodwin, T. J., & Hammond, T. G. (1999). Membrane Biology Rotating Wall Vessels is Shear Stress Dependent. *Journal of Membrane Biology*, 168(1), 77–89.
- Kim, T., Lautenschlager, S. de O. S., Ma, Q., Eller, K., Pollheimer, M. J., Lazarin-Bidóia, D., Nakamura, C. V., Anders, H. J., & Steiger, S. (2020). Drug crystal-related gastrointestinal complications involve crystal-induced release of neutrophil and monocyte extracellular traps. *Cells*, 9(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cells9112481>
- Kleinman, H. K., Philp, D., & Hoffman, M. P. (2003). Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), 526–532.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.002>
- Kommission, E. (2010). RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. *Amtsblatt Nr. L 276/33, 2010*(September), 33–79.
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 752(1), 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.08.001>
- Kuhns, D. B., Priel, D. A. L., Chu, J., & Zaremba, K. A. (2015). Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), 7.23.1-7.23.16.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im0723s111>
- Kumar, S., & Tchounwou, P. B. (2015). Molecular mechanisms of cisplatin cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget*, 6(38), 40734–40746.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5754>
- Kurts, C., Panzer, U., Anders, H. J., & Rees, A. J. (2013). The immune system and kidney disease: Basic

- concepts and clinical implications. *Nature Reviews Immunology*, 13(10), 738–753. <https://doi.org/10.1038/nri3523>
- Kutluk, H., Bastounis, E. E., & Constantinou, I. (2023). Integration of Extracellular Matrices into Organ-on-Chip Systems. *Advanced Healthcare Materials*, 12(20), 1–22. <https://doi.org/10.1002/adhm.202203256>
- Lacombe, J., Soldevila, M., & Zenhausern, F. (2022). From organ-on-chip to body-on-chip: The next generation of microfluidics platforms for in vitro drug efficacy and toxicity testing. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 187, Issue 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.07.019>
- Lazzeri, E., Angelotti, M. L., Peired, A., Conte, C., Marschner, J. A., Maggi, L., Mazzinghi, B., Lombardi, D., Melica, M. E., Nardi, S., Ronconi, E., Sisti, A., Antonelli, G., Becherucci, F., De Chiara, L., Guevara, R. R., Burger, A., Schaefer, B., Annunziato, F., ... Romagnani, P. (2018). Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury. *Nature Communications*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03753-4>
- Lazzeri, E., Crescioli, C., Ronconi, E., Mazzinghi, B., Sagrinati, C., Netti, G. S., Angelotti, M. L., Parente, E., Ballerini, L., Cosmi, L., Maggi, L., Gesualdo, L., Rotondi, M., Annunziato, F., Maggi, E., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S., Vannelli, G. B., & Romagnani, P. (2007). Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(12), 3128–3138. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007020210>
- Lazzeri, E., Ronconi, E., Angelotti, M. L., Peired, A., Mazzinghi, B., Becherucci, F., Conti, S., Sansavini, G., Sisti, A., Ravaglia, F., Lombardi, D., Provenzano, A., Manonelles, A., Cruzado, J. M., Giglio, S., Roperto, R. M., Materassi, M., Lasagni, L., & Romagnani, P. (2015). Human urine-derived renal progenitors for personalized modeling of genetic kidney disorders. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(8), 1961–1974. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014010057>
- Leung, C. M., de Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G. A., Ko, J., Rho, H. S., Chen, Z., Habibovic, P., Jeon, N. L., Takayama, S., Shuler, M. L., Vunjak-Novakovic, G., Frey, O., Verpoorte, E., & Toh, Y. C. (2022). A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6>
- Levey, A. S., Eckardt, K. U., Dorman, N. M., Christiansen, S. L., Hoorn, E. J., Ingelfinger, J. R., Inker, L. A., Levin, A., Mehrotra, R., Palevsky, P. M., Perazella, M. A., Tong, A., Allison, S. J., Bockenhauer, D., Briggs, J. P., Bromberg, J. S., Davenport, A., Feldman, H. I., Fouque, D., ... Winkelmayer, W. C. (2020). Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney International*, 97(6), 1117–1129. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.02.010>
- Lin, M., Hartl, K., Heuberger, J., Beccaceci, G., Berger, H., Li, H., Liu, L., Müllerke, S., Conrad, T., Heymann, F., Woehler, A., Tacke, F., Rajewsky, N., & Sigal, M. (2023). Establishment of gastrointestinal assembloids to study the interplay between epithelial crypts and their mesenchymal niche. *Nature Communications*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38780-3>
- Lindgren, D., Boström, A. K., Nilsson, K., Hansson, J., Sjölund, J., Möller, C., Jirström, K., Nilsson, E., Landberg, G., Axelson, H., & Johansson, M. E. (2011). Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *American Journal of Pathology*, 178(2), 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.10.026>
- Luster, A. D., Alon, R., & von Andrian, U. H. (2005). Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*, 6(12), 1182–1190.

<https://doi.org/10.1038/ni1275>

- Ma, M., Jiang, W., & Zhou, R. (2024). DAMPs and DAMP-sensing receptors in inflammation and diseases. *Immunity*, 57(4), 752–771. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.03.002>
- Maggiorani, D., Dissard, R., Belloy, M., Saulnier-Blache, J. S., Casemayou, A., Ducasse, L., Grès, S., Bellière, J., Caubet, C., Bascands, J. L., Schanstra, J. P., & Buffin-Meyer, B. (2015). Shear stress-induced alteration of epithelial organization in human renal tubular cells. *PLoS ONE*, 10(7), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131416>
- Meissner, M., Viehmann, S. F., & Kurts, C. (2019). DAMPening sterile inflammation of the kidney. *Kidney International*, 95(3), 489–491. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.12.007>
- Melica, M. E., Antonelli, G., Semeraro, R., Angelotti, M. L., Lugli, G., Landini, S., Ravaglia, F., Regina, G. La, Chiara, L. De, Peired, A. J., Mazzinghi, B., Donati, M., Molli, A., Steiger, S., Magi, A., Bartalucci, N., Raglanti, V., Guzzi, F., Maggi, L., ... Romagnani, P. (2023). Europe PMC Funders Group Crescents derive from single podocyte progenitors and a drug enhancing their differentiation attenuates crescentic glomerulonephritis *. *Crescents*. 14(657). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abg3277.Crescents>
- Menon, M. C., Chuang, P. Y., & He, C. J. (2012). The glomerular filtration barrier: Components and crosstalk. *International Journal of Nephrology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/749010>
- Miravète, M., Klein, J., Besse-Patin, A., Gonzalez, J., Pecher, C., Bascands, J. L., Mercier-Bonin, M., Schanstra, J. P., & Buffin-Meyer, B. (2011). Renal tubular fluid shear stress promotes endothelial cell activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(4), 813–817. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.105>
- Morrissey, K. M., Stocker, S. L., Wittwer, M. B., Xu, L., & Giacomini, K. M. (2013). Renal transporters in drug development. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 503–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140317>
- Mulay, S. R., Linkermann, A., & Anders, H. J. (2016). Necroinflammation in Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(1), 27–39. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015040405>
- Nicolas, A., Schavemaker, F., Kosim, K., Kurek, D., Haarmans, M., Bulst, M., Lee, K., Wegner, S., Hankemeier, T., Joore, J., Domansky, K., Lanz, H. L., Vulto, P., & Trietsch, S. J. (2021). High throughput transepithelial electrical resistance (TEER) measurements on perfused membrane-free epithelia. *Lab on a Chip*, 21(9), 1676–1685. <https://doi.org/10.1039/d0lc00770f>
- Nolan, J., Pearce, O. M. T., Screen, H. R. C., Knight, M. M., & Verbrugge, S. W. (2023). Organ-on-a-Chip and Microfluidic Platforms for Oncology in the UK. *Cancers*, 15(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/cancers15030635>
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. K. (2007). Air-liquid interface Growth medium Apoptosis/anoikis Aggregation Polarization Differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(october), 839–845. www.nature.com/reviews/molcellbio
- Panahi, M., Papanikolaou, A., Torabi, A., Zhang, J. G., Khan, H., Vazir, A., Hasham, M. G., Cleland, J. G. F., Rosenthal, N. A., Harding, S. E., & Sattler, S. (2018). Immunomodulatory interventions in myocardial infarction and heart failure: A systematic review of clinical trials and meta-analysis of IL-1 inhibition. *Cardiovascular Research*, 114(11), 1445–1461. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy145>
- Pellegrin, S., & Mellor, H. (2007). Actin stress fibers. *Journal of Cell Science*, 120(20), 3491–3499. <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>

- Pennathur, S. (2008). Flow control in microfluidics: Are the workhorse flows adequate? *Lab on a Chip*, 8(3), 383–387. <https://doi.org/10.1039/b801448p>
- Petrosyan, A., Cravedi, P., Villani, V., Angeletti, A., Manrique, J., Renieri, A., De Filippo, R. E., Perin, L., & Da Sacco, S. (2019). A glomerulus-on-a-chip to recapitulate the human glomerular filtration barrier. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11577-z>
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods in Molecular Biology*, 1601, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1/FIGURES/6
- Praga, M., & González, E. (2012). Acute interstitial nephritis. *Kidney International*, 77(11), 956–961. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.89>
- Prasad, B. (2019). Kidney cortical transporter expression across species using quantitative proteomics. *Drug Metabolism and Disposition*, 47(8), 802–808. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.086579>
- Raghavan, V., Rbaibi, Y., Pastor-Soler, N. M., Carattino, M. D., & Weisz, O. A. (2014). Shear stress-dependent regulation of apical endocytosis in renal proximal tubule cells mediated by primary cilia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), 8506–8511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402195111>
- Rinkevich, Y., Montoro, D. T., Contreras-trujillo, H., Harari-, O., Newman, A. M., Tsai, J. M., Lim, X., Van-amerongen, R., Bowman, A., Januszyk, M., Pleniceanu, O., Nusse, R., Michael, T., Weissman, I. L., & Dekel, B. (2015). *HHS Public Access*. 7(4), 1270–1283. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.018.In>
- Ronconi, E., Sagrinati, C., Angelotti, M. L., Lazzeri, E., Mazzinghi, B., Ballerini, L., Parente, E., Becherucci, F., Gacci, M., Carini, M., Maggi, E., Serio, M., Vannelli, G. B., Lasagni, L., Romagnani, S., & Romagnani, P. (2009). Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(2), 322–332. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070709>
- Ross, E. J., Gordon, E. R., Sothers, H., Darji, R., Baron, O., Haithcock, D., Prabhakarpandian, B., Pant, K., Myers, R. M., Cooper, S. J., & Cox, N. J. (2021). Three dimensional modeling of biologically relevant fluid shear stress in human renal tubule cells mimics in vivo transcriptional profiles. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93570-5>
- Sagrinati, C., Netti, G. S., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Meini, C., Gacci, M., Squecco, R., Carini, M., Gesualdo, L., Francini, F., Maggi, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S., & Romagnani, P. (2006). Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(9), 2443–2456. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010089>
- Scesa, G., Adami, R., & Bottai, D. (2021). iPSC preparation and epigenetic memory: Does the tissue origin matter? *Cells*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/cells10061470>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlie-Wolter, S., Ngezahayo, A., & Chichkov, B. N. (2013). The selective role of ECM components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication in vitro. *Experimental Cell Research*, 319(10), 1553–1561. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.03.016>

Schoch, S., Sen, V., Brenner, W., Hartwig, A., & Köberle, B. (2021). In vitro nephrotoxicity studies of established and experimental platinum-based compounds. *Biomedicines*, 9(8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081033>

Schutgens, F., Rookmaaker, M. B., Margaritis, T., Rios, A., Ammerlaan, C., Jansen, J., Gijzen, L., Vormann, M., Vonk, A., Viveen, M., Yengej, F. Y., Derakhshan, S., de Winter-de Groot, K. M., Artegiani, B., van Boxtel, R., Cuppen, E., Hendrickx, A. P. A., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Heitzer, E., ... Clevers, H. (2019). Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling. *Nature Biotechnology*, 37(3), 303–313. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0048-8>

Secker, P. F., Luks, L., Schlichenmaier, N., & Dietrich, D. R. (2018). RPTEC/TERT1 cells form highly differentiated tubules when cultured in a 3D matrix. *Altex*, 35(2), 223–234. <https://doi.org/10.14573/altex.1710181>

Shi, C. (2021). *Extracellular DNA contributes to cholesterol crystal embolism-induced clot formation, acute kidney injury, and tissue infarction*.

Silk, E., Zhao, H., Weng, H., & Ma, D. (2017). The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death and Disease*, 8(5), 1–11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.52>

Singh, V., Kaur, R., Kumari, P., Pasricha, C., & Singh, R. (2023). ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clinica Chimica Acta*, 548(July), 117487. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117487>

Smeets, B., Angelotti, M. L., Rizzo, P., Dijkman, H., Lazzeri, E., Mooren, F., Ballerini, L., Parente, E., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Ronconi, E., Becherucci, F., Benigni, A., Steenbergen, E., Lasagni, L., Remuzzi, G., Wetzel, J., & Romagnani, P. (2009). Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(12), 2593–2603. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009020132>

Smeets, B., Boor, P., Dijkman, H., Sharma, S. V., Jirak, P., Mooren, F., Berger, K., Bornemann, J., Gelman, I. H., Floege, J., Van Der Vlag, J., Wetzel, J. F. M., & Moeller, M. J. (2013). Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *Journal of Pathology*, 229(5), 645–659. <https://doi.org/10.1002/path.4125>

Sobreiro-Almeida, R., Melica, M. E., Lasagni, L., Romagnani, P., & Neves, N. M. (2021). Retinoic Acid Benefits Glomerular Organotypic Differentiation from Adult Renal Progenitor Cells In Vitro. *Stem Cell Reviews and Reports*, 17(4), 1406–1419. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10128-8>

Soo, J. Y. C., Jansen, J., Masereeuw, R., & Little, M. H. (2018). Advances in predictive in vitro models of drug-induced nephrotoxicity. *Nature Reviews Nephrology*, 14(6), 378–393. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0003-9>

Srivastava, S. K., Foo, G. W., Aggarwal, N., & Chang, M. W. (2024). Organ-on-chip technology: Opportunities and challenges. *Biotechnology Notes*, 5(January), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.biotno.2024.01.001>

Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, 19(8), 477–489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>

Tecklenborg, J., Clayton, D., Siebert, S., & Coley, S. M. (2018). The role of the immune system in kidney disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 192(2), 142–150. <https://doi.org/10.1111/cei.13119>

- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 4–27.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2015.11.001>
- Thomas, H., & Coley, H. M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control*, 10(2), 159–165.
<https://doi.org/10.1177/107327480301000207>
- Tiong, H. Y., Huang, P., Xiong, S., Li, Y., Vathsala, A., & Zink, D. (2014). Drug-induced nephrotoxicity: Clinical impact and preclinical in vitro models. *Molecular Pharmaceutics*, 11(7), 1933–1948.
<https://doi.org/10.1021/mp400720w>
- Trietsch, S. J., Naumovska, E., Kurek, D., Setyawati, M. C., Vormann, M. K., Wilschut, K. J., Lanz, H. L., Nicolas, A., Ng, C. P., Joore, J., Kustermann, S., Roth, A., Hankemeier, T., Moisan, A., & Vulto, P. (2017). Membrane-free culture and real-time barrier integrity assessment of perfused intestinal epithelium tubes. *Nature Communications*, 8(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00259-3>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyarto, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6220).
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260419>
- Vallés, P. G., Gil Lorenzo, A. F., Garcia, R. D., Cacciamani, V., Benardon, M. E., & Costantino, V. V. (2023). Toll-like Receptor 4 in Acute Kidney Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021415>
- Van der Hauwaert, C., Savary, G., Buob, D., Leroy, X., Aubert, S., Flamand, V., Hennino, M. F., Perrais, M., Lo-Guidice, J. M., Broly, F., Cauffiez, C., & Glowacki, F. (2014). Expression profiles of genes involved in xenobiotic metabolism and disposition in human renal tissues and renal cell models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 279(3), 409–418.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.007>
- Volarevic, V., Djokovic, B., Jankovic, M. G., Harrell, C. R., Fellabaum, C., Djonov, V., & Arsenijevic, N. (2019). 69:Cis review. *Journal of Biomedical Science*, 26(25), 1–14.
- Vormann, M. K., Gijzen, L., Hutter, S., Boot, L., Nicolas, A., van den Heuvel, A., Vriend, J., Ng, C. P., Nieskens, T. T. G., van Duinen, V., de Wagenaar, B., Masereeuw, R., Suter-Dick, L., Trietsch, S. J., Wilmer, M., Joore, J., Vulto, P., & Lanz, H. L. (2018). Nephrotoxicity and Kidney Transport Assessment on 3D Perfused Proximal Tubules. *AAPS Journal*, 20(5), 1–11.
<https://doi.org/10.1208/s12248-018-0248-z>
- Vriend, J., Nieskens, T. T. G., Vormann, M. K., van den Berge, B. T., van den Heuvel, A., Russel, F. G. M., Suter-Dick, L., Lanz, H. L., Vulto, P., Masereeuw, R., & Wilmer, M. J. (2018). Screening of Drug-Transporter Interactions in a 3D Microfluidic Renal Proximal Tubule on a Chip. *AAPS Journal*, 20(5). <https://doi.org/10.1208/s12248-018-0247-0>
- Vriend, J., Peters, J. G. P., Nieskens, T. T. G., Škovroňová, R., Blaimschein, N., Schmidts, M., Roepman, R., Schirris, T. J. J., Russel, F. G. M., Masereeuw, R., & Wilmer, M. J. (2020). Flow stimulates drug transport in a human kidney proximal tubule-on-a-chip independent of primary cilia. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1864(1).
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.129433>
- Walther, C. P., Podoll, A. S., & Finkel, K. W. (2014). Summary of clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Hospital Practice* (1995), 42(1), 7–14. <https://doi.org/10.3810/hp.2014.02.1086>

- Wang, J. D., Douville, N. J., Takayama, S., & Elsayed, M. (2012). Quantitative analysis of molecular absorption into PDMS microfluidic channels. *Annals of Biomedical Engineering*, 40(9), 1862–1873. <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0562-z>
- Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L., & Masson, P. (2017). Chronic Kidney Disease. *The Lancet*, 389(10075), 1238–1252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)
- Weinbaum, S., Guo, P., & You, L. (2001). A new view of mechanotransduction and strain amplification in cells with microvilli and cell processes. *Biorheology*, 38(2–3), 119–142.
- Weinbaum, Sheldon, Duan, Y., Thi, M. M., & You, L. (2011). Cell Mol Bioeng. *Cell*, 4(4), 510–537. <https://doi.org/10.1007/s12195-011-0179-6.An>
- Wilmer, M. J., Ng, C. P., Lanz, H. L., Vulto, P., Suter-Dick, L., & Masereeuw, R. (2016). Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening. *Trends in Biotechnology*, 34(2), 156–170. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.11.001>
- Yu, P., Duan, Z., Liu, S., Pachon, I., Ma, J., Hemstreet, G. P., & Zhang, Y. (2022). Drug-induced nephrotoxicity assessment in 3D cellular models. *Micromachines*, 13(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/mi13010003>
- Zabel, B. A., Rott, A., & Butcher, E. C. (2015). Leukocyte chemoattractant receptors in human disease pathogenesis. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (Vol. 10). <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104640>
- Zhang, P. L., & Hafron, J. M. (2014). Progenitor/stem cells in renal regeneration and mass lesions. *International Urology and Nephrology*, 46(11), 2227–2236. <https://doi.org/10.1007/s11255-014-0821-z>
- Zhang, X., Chen, X., Hong, H., Hu, R., Liu, J., & Liu, C. (2022). Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioactive Materials*, 10(August 2021), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.014>
- Zou, W., Shi, B., Zeng, T., Zhang, Y., Huang, B., Ouyang, B., Cai, Z., & Liu, M. (2021). Drug Transporters in the Kidney: Perspectives on Species Differences, Disease Status, and Molecular Docking. *Frontiers in Pharmacology*, 12(November). <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.746208>

Anhang

Messung	Bedingungen / Variable		Replikate [Biol./Techn.]	Δ AICc [Hyp. - Sigm.]	Präferiertes Model	MFI- 25 [Min.]	
1	Standardbedingungen (s. Abs. 4.5.2) (RPC- basierte Tubuli wurden mit RPC-Medium inkubiert. Eine Barrieremessung erfolgte an den Tagen 1,3,5,7 und 9)	24 Std. (Tag 1)	1.1	14.65	Sig.	4.03	2.57
2			1.2	13.06	Sig.	5.02	
3			2.1	-8	Hyp.	8.95	
4			2.2	15.94	Sig.	3.02	
5			2.3	28.59	Sig.	2.48	
6		72 Std. (Tag 3)	1.1	40.99	Sig.	19.34	5.19
7			1.2	123.6	Sig.	12.02	
8			1.3	161.4	Sig.	9.26	
9			2.1	16.86	Sig.	6.78	
10			2.2	42.76	Sig.	3.37	
11		120 Std. (Tag 5)	2.3	33.58	Sig.	6.23	4.21
12			2.4	27.56	Sig.	7.81	
13			1.1	74.12	Sig.	8.64	
14			1.2	101.1	Sig.	7.38	
15			2.1	72.9	Sig.	5.95	
16		168 Std. (Tag 7)	2.2	64.79	Sig.	12.5	9.23
17			2.3	52.8	Sig.	16.31	
18			1.1	-4	Hyp.	33.91	
19			1.2	13.91	Sig.	12.08	
20			2.1	-4	Hyp.	32.23	
21			2.2	-0.43	Hyp.	18.66	11.07
22			2.3	-4	Hyp.	26.65	
23		216 Std. (Tag 9)	1.1	1	Sig.	22.62	
24			1.2	73.07	Sig.	50.89	
25			2.1	39.02	Sig.	47.65	
26			2.2	5	Sig.	44.13	
27			2.3	15.5	Sig.	40.05	
28	Primärharnbedingungen (s. Abs. 4.5.3) (72 Std. alte Tubuli wurden mit Ringerlaktat im RPC-Kanal und RPC- Medium im zellfreien Kanal inkubiert. Eine Barrieremessung erfolgte an den Tagen 5,7 und 9)	120 Std. (Tag 5)	1.1	96.21	Sig.	10.9	7.09
29			1.2	53.22	Sig.	15.82	
30			2.1	167.3	Sig.	1.19	
31			2.2	116	Sig.	1.99	
32		168 Std. (Tag 7)	1.1	85.16	Sig.	8.98	1.42
33			1.2	81.73	Sig.	10.14	
34			2.1	25.95	Sig.	9.52	
35			2.2	105.2	Sig.	12.23	
36		216 Std. (Tag 9)	1.1	54.17	Sig.	8.27	2.54
37			1.2	53.19	Sig.	3.59	
38			2.1	160.1	Sig.	3.11	
39			2.2	144.1	Sig.	5.56	
40			2.3	57	Sig.	8.53	
41	Toxin-induzierte Barrierestörung (s. Abs. 4.5.4) (72 Std. alte Tubuli wurden für 24 Std. mit Toxinen inkubiert. Anschließend erfolgte die Barrieremessung)	Kontrolle	1.1	40.58	Sig.	1.54	
42			Cisplatin [100µM]	1.1	60.3	Sig.	5.74
43		Aristolochiasäure [100 µM]	1.1	47.42	Sig.	10.58	
44			1.1	-3.74	Hyp.	3.95	0.86
45			1.2	6.71	Sig.	4.33	
46			2.1	25.3	Sig.	5.38	
47			2.2	108.5	Sig.	5.77	
48			Tween [1%]	1.1	46.39	Sig.	14.89

Tabelle 4: FITC-Dextran-Diffusionskinetik in hRPC-Tubuli

Δ AICc: Differenz Aikaikes informationcriterion corrected for small sample size.

Sig.: Sigmoidalfunktion. Hyp.: Hyperbole Funktion. MFI-25: Mittlere Fluoreszenintensität 25%.

48 BIA-Messungen, 13 versch. Konditionen, 22 biol. Repl.
rot: negatives ΔAICc

Behandlung	Repl. biol.	Messwerte	Repl. techn.	Repl. techn. errechnet
Medium (0 µg/ml Histone)	5	10	1 - 3	2
Histone 15,625 µg/ml	4	5	1 - 2	1,25
Histone 31,25 µg/ml	1	3	3	3
Histone 62,5 µg/ml	4	5	1 - 2	1,25
Histone 250 µg/ml	5	8	1 - 3	1,6
Histone 500 µg/ml	3	3	1	1
Histone 1000 µg/ml	4	5	1 - 2	1,25
LSL	5	7	1 - 3	1,4
PBS	1	3	3	3

Tabelle 5: Datengrundlage Migrationsinduktion und Dosis-Wirkung

$$P_{\text{app}} = \frac{\Delta C_{\text{receiver}} \times V_{\text{receiver}}}{\Delta t \times A_{\text{barrier}} \times C_{\text{donor}}} \left(\frac{\text{cm}}{\text{s}} \right)$$

Abbildung 32: Apparante Permeabilität

ΔC_{receiver}: Differenz d. MFI im EZM-Kanal bei 0 u. 10 Min. V_{receiver}: Vol. d. gemesenen Region im MK (0,0001cm²). Δt: Differenz d. Zeit zwischen den Messungen (10 Min.). A_{barrier}: meniskale Grenzfläche zwischen OK und MK (0,0057cm²). C_{donor}: Dextrans-Konzentration im OK (0,5mg/ml). Quelle: (Vormann et al., 2018).

Danksagung

Mein großer Dank und Bewunderung gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Julian Marschner der mir - im wahrsten Sinne des Wortes - rund um die Uhr mit Ratschlägen und Motivation zur Seite stand.

Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Wilken, Gregor Johannes

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**"On-a-Chip"-Modell eines humanen renalen Progenitorzell-basierten Tubulus
zur Untersuchung von Immunzellmigration nach zellulärer Schädigung in vitro**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, 07.11.2025

Ort, Datum

Gregor Johannes Wilken

Unterschrift Gregor Johannes Wilken