

Towards functional kidney organoids

Citation for published version (APA):

Schumacher, A. (2023). *Towards functional kidney organoids: Insights from kidney organoid and fetal kidney development*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20230926as>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20230926as](https://doi.org/10.26481/dis.20230926as)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Human kidneys are remarkably complex organs in which many different cell types cooperate to filter blood, regulate water, sodium and mineral levels, and secrete various hormones and humoral factors. The cellular complexity is a mirror of the kidney's anatomical design, which therefore is no less complex. In case of acute injury or chronic disease, kidneys generally do not regenerate, eventually leading to kidney failure. Current treatment options are inadequate long-term solutions and the morbidity for patients remains high. Stem cell-derived kidney organoids, which self-organize into kidney-like tissues, are promising alternatives. Yet, since they develop from stem cells, they have many limitations that have not yet been resolved. For instance, the kidney organoids do not mature further than kidneys between the first and second trimester, and they develop off-target cells, lack functional vasculature, and deteriorate after 25 days in culture. On top of that, their functionality and micro-anatomy are largely unstudied. Therefore, this thesis aimed to create more insight into kidney organoid development with guidance from human fetal nephrogenesis. To this end, in **Chapter 2**, we identified the variety of cell types in fetal versus adult human kidneys based on gene expression. This provided us insight into the cellular complexity present early in development, as well as the difficulty to distinguish cell populations in fetal kidneys, indicating high cellular plasticity.

We continued to study human fetal development in **Chapter 3**, by investigating human fetal kidney ultrastructure of comparable age to the kidney organoids. This allowed us to define additional glomerular developmental stages, as well as features of early tubule differentiation. The latter indicated that a specific order of tubule type-specific maturation might exist and that nuclear shape and chromatin organization might be an additional informative factor of cellular maturity in tubules.

Following the ultrastructural study of human fetal kidney organoids, we continued with assessing kidney organoid development according to our recent insights into the ultrastructure during human nephrogenesis. Accordingly, in **Chapter 4**, we

detected ultrastructural features in kidney organoids that were distinct from fetal kidneys. Most striking were large glycogen and lipid deposits that increased over time in various organoid cells. Along with tubular YAP expression, excessive matrix depositions, mitochondrial abnormalities, and EGFR upregulation, the glycogen and lipid depositions hinted towards a hyperglycemic culture, since these features combined are known for renal cells cultured in hyperglycemia and diabetic kidneys. We confirmed that the glucose concentration in the standard organoid culture medium was indeed hyperglycemic and recommended future work to culture organoids in lower concentrations.

In **Chapter 5**, we tackled the issue that the kidney organoids had dimensions in the millimeter range, leading to challenges in whole-mount imaging using light microscopy. The application of tissue clearing allowed us to fully image kidney organoids stained with conjugated antibodies. In the chapter, we discuss various methods and present technical details of the most successful method for researchers to easily replicate.

Finally, we used the method developed in **Chapter 5** to quantify the endothelial network in kidney organoids in **Chapter 6**. In this chapter, we were again inspired by the way kidneys develop in an embryo. We hypothesized that the air-liquid interface culture at 21% oxygen was hyperoxic. Since human kidneys initially develop in hypoxia and are later not exposed to oxygen concentrations above 9% oxygen, we estimated that 7% oxygen might be a more physiological choice. The endothelial cells in the kidney organoid culture are largely residing on the organoid surface, directly exposed to the hyperoxic air. Furthermore, it is well-known that the angiogenesis-stimulating factor vascular endothelial growth factor (VEGF) is hypoxia-regulated. We were therefore incentivized to investigate the effect of physiological hypoxia on the endothelial population. We found that the anti-angiogenic variant VEGF-A165b was downregulated in our culture in physiological hypoxia. At the same time, the length and connectivity of the endothelial network increased, indicating that a culture at 7% oxygen might be beneficial for endothelial survival.

Overall, the work of this thesis generated deeper insights into both human fetal kidney and human kidney organoid development and offers suggestions for further

improvements. This thesis also highlights the strength and necessity of microscopy as well as age-matched human tissue to understand and improve tissue-engineered constructs such as organoids.

Samenvatting

Menselijke nieren zijn opmerkelijk complexe organen waarin veel verschillende celtypen samenwerken om bloed te filtreren, het water-, natrium- en mineraalgehalte te reguleren en om verschillende hormonen en humorale factoren uit te scheiden. De cellulaire complexiteit is een weerspiegeling van het anatomische ontwerp van de nier, en is daarom niet minder complex. In het geval van acuut letsel of chronische ziekte regenereren de nieren over het algemeen niet, wat uiteindelijk leidt tot nierfalen. De huidige behandelingsopties zijn ontoereikende lange termijnoplossingen en de morbiditeit voor patiënten blijft hoog. Van stamcellen afgeleide nierorganoïden, die zichzelf organiseren tot nierachtige weefsels, zijn veelbelovende alternatieven. Echter, omdat ze zich ontwikkelen uit stamcellen, hebben ze veel beperkingen die nog niet zijn opgelost. De organoïden van de nieren rijpen bijvoorbeeld niet verder dan de nieren tussen het eerste en tweede trimester, en ze ontwikkelen cellen die niet in de nier thuishoren, missen een functioneel vaatstelsel en verslechteren na 25 dagen in cultuur. Bovendien zijn hun functionaliteit en micro-anatomie grotendeels onbestudeerd. Het doel van dit proefschrift was daarom om meer inzicht te genereren in de ontwikkeling van nierorganoïden door middel van kennis uit de menselijke foetale nefrogenese. Hiertoe hebben we in **Hoofdstuk 2** de diversiteit aan celtypen in foetale versus volwassen menselijke nieren geïdentificeerd op basis van genexpressie. Dit gaf ons inzicht in de cellulaire complexiteit die vroeg in de ontwikkeling aanwezig is, evenals de moeilijkheid om cel populaties in foetale nieren te onderscheiden, wat wijst op een hoge cellulaire plasticiteit.

We gingen door met het bestuderen van de ontwikkeling van de menselijke foetus in **Hoofdstuk 3**, door onderzoek te doen naar de ultrastructuur van menselijke foetale nieren van vergelijkbare leeftijd als de nierorganoïden. Hierdoor konden we extra glomerulaire ontwikkelingsstadia definiëren, evenals kenmerken van vroege tubulusdifferentiatie. Dit laatste gaf aan dat er een specifieke volgorde van type-specifieke rijping van tubuli zou kunnen bestaan en dat nucleaire vorm en chromatine-organisatie een aanvullende informatieve factor zou kunnen zijn voor cellulaire volwassenheid in tubuli.

Na de ultrastructurele studie van organoïden van menselijke foetale nieren, gingen we verder met het beoordelen van de ontwikkeling van nierorganoïden volgens onze recente inzichten in de ultrastructuur tijdens nefrogenese bij de mens. Dienovereenkomstig ontdekten we in **Hoofdstuk 4** ultrastructurele kenmerken in nierorganoïden die anders waren dan foetale nieren. Het meest opvallend waren de grote glycogeen- en vetafzettingen die in de loop van de tijd toenamen in verschillende organoïde cellen. Samen met tubulaire YAP-expressie, overmatige matrixafzettingen, mitochondriale afwijkingen en EGFR-hoogregulatie, wezen de glycogeen- en lipide-afzettingen op een hyperglycemische cultuur, aangezien deze gecombineerde kenmerken bekend zijn voor niercellen gekweekt in hyperglycemie en diabetische nieren. We bevestigden dat de glucoseconcentratie in het standaard organoïde kweekmedium inderdaad hyperglycemisch was en adviseerden toekomstig werk om organoïden in lagere concentraties te kweken.

In **Hoofdstuk 5** pakten we het probleem aan dat de organoïden van de nieren afmetingen hadden in het millimeterbereik, wat leidde tot uitdagingen bij de beeldvorming van een gehele organoïde met behulp van lichtmicroscopie. De toepassing van weefsel-clearing stelde ons in staat om nier-organoïden gekleurd met geconjugeerde antilichamen volledig in beeld te brengen. In het hoofdstuk bespreken we verschillende methoden en presenteren we technische details van de meest succesvolle methode die onderzoekers gemakkelijk kunnen repliceren.

Ten slotte hebben we de in **Hoofdstuk 5** ontwikkelde methode gebruikt om het endotheliale netwerk in nierorganoïden in **Hoofdstuk 6** te kwantificeren. In dit hoofdstuk werden we opnieuw geïnspireerd door de manier waarop nieren zich in een embryo ontwikkelen. Onze hypothese was dat de lucht-vloeistof-interfacecultuur bij 21% zuurstof hyperoxisch was. Aangezien menselijke nieren zich aanvankelijk in hypoxie ontwikkelen en later niet worden blootgesteld aan zuurstofconcentraties van meer dan 9% zuurstof, schatten we dat 7% zuurstof een meer fysiologische keuze zou kunnen zijn. De endotheelcellen in de nier-organoïdecultuur bevinden zich grotendeels op het organoïde-oppervlak, direct blootgesteld aan de hyperoxische lucht. Bovendien is het algemeen bekend dat de angiogenese-stimulerende vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF) door hypoxie wordt gereguleerd. We werden daarom geïnspireerd om het effect van fysiologische

hypoxie op de endotheel populatie te onderzoeken. We ontdekten dat de anti-angiogene variant *VEGF-A165b* in onze cultuur omlaag was gereguleerd in fysiologische hypoxie. Tegelijkertijd namen de lengte en connectiviteit van het endotheel-netwerk toe, wat aangeeft dat een kweek met 7% zuurstof gunstig kan zijn voor de overleving van het endotheel.

Over het algemeen heeft het werk van dit proefschrift geleid tot diepere inzichten in de ontwikkeling van zowel menselijke foetale nieren als de ontwikkeling van menselijke nierorganoïden en biedt het suggesties voor verdere verbeteringen. Dit proefschrift belicht ook de kracht en noodzaak van microscopie, en van op leeftijd afgestemd menselijk weefsel om lab-gemaakte weefsels zoals organoïden te begrijpen en te verbeteren.

Zusammenfassung

Menschliche Nieren sind bemerkenswert komplexe Organe, in denen viele verschiedene Zelltypen zusammenarbeiten, um Blut zu filtern, Wasser-, Natrium- und Mineralstoffspiegel zu regulieren und verschiedene Hormone und humorale Faktoren abzusondern. Die zelluläre Komplexität ist ein Spiegel des anatomischen Aufbaus der Niere, die daher nicht weniger komplex ist. Im Falle einer akuten Verletzung oder einer chronischen Erkrankung regenerieren sich die Nieren im Allgemeinen nicht, was letztendlich zu einem Nierenversagen führt. Die derzeitigen Behandlungsoptionen sind keine langfristigen Lösungen, und die Morbidität für Patienten bleibt hoch. Aus Stammzellen gewonnene Nierenorganoide organisieren sich selbst zu nierenähnlichen Geweben und sind eine vielversprechende Alternative. Da sie sich jedoch aus Stammzellen entwickeln, haben sie viele Einschränkungen, die noch nicht behoben wurden. Zum Beispiel reifen die Nierenorganoide nicht weiter als fötale Nieren zwischen dem ersten und zweiten Trimester, sie entwickeln Off-Target-Zellen, es fehlt ihnen an funktionellen Gefäßen und sie zerfallen nach 25 Tagen in Kultur. Darüber hinaus sind ihre Funktionsweise und Mikroanatomie weitgehend unerforscht. Daher zielte diese Dissertation darauf ab, mehr Einblick in die Entwicklung von Nierenorganoiden zu gewinnen, indem sie sich an der menschlichen fötalen Nephrogenese orientiert. Zu diesem Zweck haben wir in **Kapitel 2** anhand der Genexpression die Vielfalt der Zelltypen in fötalen und erwachsenen menschlichen Nieren identifiziert. Dies verschaffte uns einen besseren Einblick in die zelluläre Komplexität, die früh in der Entwicklung anwesend ist, sowie in die Schwierigkeit Zellpopulationen in fötalen Nieren zu unterscheiden, was auf eine hohe zelluläre Plastizität hinweist.

Wir haben die Entwicklung des menschlichen Fötus in **Kapitel 3** weiter untersucht, indem wir die Ultrastruktur der menschlichen fötalen Niere untersuchten, deren Entwicklungsstadien mit den Organoiden der Niere vergleichbar ist. Dies ermöglichte es uns, zusätzliche glomeruläre Entwicklungsstadien sowie Merkmale der frühen Tubulusdifferenzierung zu definieren. Letzteres weist darauf hin, dass eine spezifische Reihenfolge der Tubulustyp-spezifischen Reifung existieren könnte

und, dass Kernform und Chromatinorganisation ein zusätzlicher informativer Faktor für die Zellreife in Tubuli sein könnten.

Nach der ultrastrukturellen Untersuchung menschlicher fötaler Nierenorganoiden setzten wir die Bewertung der Entwicklung von Nierenorganoiden gemäß unseren jüngsten Erkenntnissen über die Ultrastruktur während der menschlichen Nephrogenese fort. Dementsprechend entdeckten wir in **Kapitel 4** ultrastrukturelle Merkmale in Nierenorganoiden, die sich von fötalen Nieren unterschieden. Am auffälligsten waren große Glykogen- und Lipidablagerungen, die sich im Laufe der Zeit in verschiedenen organoiden Zellen vermehrten. Zusammen mit der tubulären YAP-Expression, übermäßigen Matrixablagerungen, mitochondrialen Anomalien und EGFR-Hochregulierung deuteten die Glykogen- und Lipidablagerungen auf eine hyperglykämische Kultur hin, da die Kombination dieser Merkmale bekannt sind für hyperglykämische Kulturen von Nierenzellen und diabetischen Nieren. Wir bestätigten, dass die Glukosekonzentration des Organoid-Kulturmediums tatsächlich hyperglykämisch war, und empfahlen zukünftigen Forschungen Organoiden in niedrigeren Glukosekonzentrationen zu kultivieren.

In **Kapitel 5** haben wir uns mit dem Problem befasst, dass die Nierenorganoiden Abmessungen im Millimeterbereich hatten, was zu Herausforderungen bei der Ganz-organoid-Bildgebung mit Lichtmikroskopie führte. Die Anwendung des „Gewebe-Clearings“ ermöglichte es uns, mit konjugierten Antikörpern gefärbte Nierenorganoiden vollständig abzubilden. In diesem Kapitel diskutieren wir verschiedene Methoden und präsentieren technische Details der erfolgreichsten Methode, die Forscher leicht replizieren können.

Schließlich haben wir in **Kapitel 6** die in **Kapitel 5** entwickelte Methode verwendet, um das endotheliale Netzwerk in Nierenorganoiden zu quantifizieren. In diesem Kapitel wurden wir erneut von der Art und Weise inspiriert, wie sich Nieren in einem Embryo entwickeln. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Luft-Flüssigkeits-Grenzflächenkultur bei 21% Sauerstoff hyperoxisch war. Da sich menschliche Nieren zunächst in Hypoxie entwickeln und später keinen Sauerstoffkonzentrationen über 9% ausgesetzt sind, schätzten wir, dass 7% Sauerstoff eine physiologischere Wahl sein könnten. Die Endothelzellen in der Nierenorganoidkultur befinden sich größtenteils auf der Organoid-Oberfläche und

sind direkt der hyperoxischen Luft ausgesetzt. Darüber hinaus ist bekannt, dass der Angiogenese-stimulierende vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) Hypoxie-reguliert ist. Dies hat uns inspiriert, die Wirkung von physiologischer Hypoxie auf die Endothelpopulation zu untersuchen. Wir fanden heraus, dass die anti-angiogene Variante *VEGF-165b* in unserer Kultur bei physiologischer Hypoxie herunterreguliert war. Gleichzeitig nahm die Länge und Konnektivität des endothelialen Netzwerks zu, was darauf hinweist, dass eine Kultur mit 7% Sauerstoff für das Überleben des Endothels von Vorteil sein könnte.

Insgesamt lieferte die Arbeit dieser Dissertation tiefere Einblicke in die Entwicklung sowohl der menschlichen fötalen Niere als auch der menschlichen Nierenorganoide und bietet Vorschläge für weitere Verbesserungen. Diese Dissertation hebt auch die Stärke und Notwendigkeit der Mikroskopie sowie altersangepassten menschlichen Gewebes hervor, um durch Gewebezüchtung hergestellte Konstrukte wie Organoiden zu verstehen und zu verbessern.
