ABSCHLUSSBERICHT

1 Allgemeine Angaben

DFG-Geschäftszeichen:	AN391	AN 372
Projektnummern:	4-1	32-1
Titel des Projekts:	Tubulusregeneration und Nierenzellkarzinom nach Nierentransplantation - Pathomechanismen	
Name(n) des/r Antragstellenden:	Prof. Dr. med. Joachim Andrassy Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders	
Dienstanschrift/en:	Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie Klinikum der Universität München Marchioninistraße 15 81377 München Medizinische Klinik und Poliklinik IV Klinikum der Universität München Ziemssenstr. 5 80336 München	

Name(n) der Mitverantwortlichen:

Frau Dr. med. vet. Barbara Eißner (Tierschutzbeauftragte, Walter-Brendl-Zentrum)
Dr. med. vet. Shakarami (Veterinär und Tierhausleiter, Walter-Brendl-Zentrum)
Frau Dr. med. vet. Angela Lutterbach (Tierschutzbeauftragte)
Frau Meisi Kuang (Tierärztliche Versorgung)
Prof. Maciej Lech (Leiter Tierhaltung)

Name(n) der Kooperationspartner*innen:

Prof. Dr. med. Clemens Cyran, LMU, München
Prof. Dr. Paola Romagnani, Nephrologie, Univ. Florenz, Italien

Berichtszeitraum: Sommer 2022 bis Frühjahr 2026

2 Zusammenfassung / Summary

Das primäre Ziel dieses Projekts war die Untersuchung der Pathomechanismen, die zur signifikant erhöhten Inzidenz von Nierenzellkarzinomen nach einer Transplantation führen. Die wissenschaftliche Rationale basierte auf der Hypothese, dass der zwangsläufige Ischämie-Reperfusions-Schaden während der Transplantation zu einer akuten Nierenschädigung führt, und daß die Regeneration nach einem AKI durch die klonale Amplifikation von Pax2-positiven renalen Progenitorzellen erfolgt. Dieser an sich regenerative Prozess birgt das Risiko einer malignen Entartung in Form einer Adenom-Karzinom-Sequenz, begünstigt durch die permissive Wirkung immunsuppressiver Therapien. Der Arbeitsplan sah die Etablierung eines Tumor-im-Nierentransplantat-Modells in der Maus vor. Hierbei sollten Spendernieren mit unterschiedlichen kalten Ischämiezeiten (1h vs. 16h) transplantiert werden, um den Einfluss des Schweregrads der akuten Nierenschädigung auf die Tumorentstehung zu evaluieren. Zentrale Untersuchungsmethode sollte das klonale *lineage tracing* unter Verwendung von Pax2/Confetti-Reportermäusen sein. Durch die Induktion fluoreszierender Proteine in Pax2-Zellen sollte deren Beitrag zur Tubulusregeneration und zur späteren Entwicklung von papillären Adenomen und Karzinomen über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 36 Wochen verfolgt werden. Zudem war geplant, den Einfluss gängiger Immunsuppressiva wie Cyclosporin A (pro-tumorigene Wirkung vermutet) und Temsirolimus (mTOR-Inhibitor mit anti-proliferativer Wirkung) auf diese Prozesse systematisch zu vergleichen.

Im Verlauf der Projektumsetzung traten jedoch unvorhergesehene substantielle Hindernisse auf, die eine erfolgreiche Durchführung der entscheidenden Versuchsreihen verhinderten. Insbesondere kam es zu erheblichen Verzögerungen und Problemen bei dem initial bewilligten behördlichen Genehmigungsverfahren für die komplexen Tierversuchsprotokolle. Zudem gestaltete sich die Verfügbarkeit und Zucht der spezifischen transgenen Pax2.rtTA; TetO.Cre;R26.Confetti-Mauslinien als weitaus schwieriger als antizipiert, was die Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl an Versuchstieren für die geplanten Langzeitbeobachtungen unmöglich machte. Aufgrund dieser kumulativen Probleme verzögerten sich die geplanten Arbeiten. Da zudem der Hauptantragsteller, Prof. Joachim Andrassy, aus der LMU München ausgeschieden ist, kann die notwendige Kontinuität und Expertise für dieses hochkomplexe operative Modell vor Ort nicht mehr gewährleistet werden, so dass das zuletzt noch verlängertet Projekt letztlich abgebrochen werden musste.

The primary objective of this project was to investigate the pathomechanisms leading to the significantly increased incidence of renal cell carcinoma following transplantation. The scientific rationale was based on the hypothesis that the inevitable ischemia-reperfusion injury during transplantation leads to acute kidney injury (AKI), and that regeneration after AKI occurs through the clonal amplification of Pax2-positive renal progenitor cells. This inherently regenerative process carries the risk of malignant transformation in the form of an adenoma-carcinoma sequence, facilitated by the permissive effects of immunosuppressive therapies.

The work plan envisaged the establishment of a tumor-in-kidney-transplant mouse model. In this model, donor kidneys with different cold ischemia times (1h vs. 16h) were to be transplanted to evaluate the influence of the severity of acute kidney injury on tumorigenesis. The central investigative method was to be clonal lineage tracing using Pax2/Confetti reporter mice. By inducing fluorescent proteins in Pax2 cells, their contribution to tubular regeneration and the subsequent development of papillary adenomas and carcinomas was to be tracked over an observation period of up to 36 weeks. Additionally, it was planned to systematically compare the influence of common immunosuppressants such as Cyclosporine A (suspected pro-tumorigenic effect) and Temsirolimus (an mTOR inhibitor with anti-proliferative effects) on these processes.

In the course of the project implementation, however, unforeseen substantial obstacles arose that prevented the successful execution of the decisive experimental series. In particular, there were significant delays and problems regarding the initially approved regulatory permitting process for the complex animal testing protocols. Furthermore, the availability and breeding of the specific transgenic Pax2.rtTA; TetO.Cre;R26.Confetti mouse lines proved to be far more difficult than anticipated, making it impossible to provide a sufficient number of experimental animals for the planned long-term observations. Due to these cumulative problems, the planned work was delayed. Furthermore, as the principal investigator, Prof. Joachim Andrassy, has departed from LMU Munich, the necessary continuity and expertise for this highly complex surgical model can no longer be guaranteed on-site. Consequently, the project, which had recently been extended, ultimately had to be discontinued.

3 Wissenschaftlicher Arbeits- und Ergebnisbericht

Der Antrag verfolgte folgende Ziele:

I. Etablierung eines Tumor-im-Nierentransplantat-Modells mit unterschiedlich ausgeprägtem post-Transplant AKI in einem syngenen (A) und allogenen (B) Setting unter Immunsuppression.
II. Verifizierung der Rolle von Pax2+-Zellen unter Verwendung von Pax2.rtTA; TetO.Cre;R26.Confetti Mäusen als Nierenspender und klonalem lineage tracing
    a. bei der Tubulusregeneration und
    b. der Tumorentstehung nach Nierentransplantation mit Langzeitbeobachtung zur Ermittlung der Tumorinzidenz.
III. Untersuchung der Effekte in der Transplantationsmedizin gängiger Immunsuppressiva auf die Tumorentstehung infolge des post-Transplantations-AKI nach Nierentransplantation:
    a. Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A und
    b. mTOR-Inhibitor Temsirolimus
IV. Untersuchung der Effekte pro-proliferativer Substanzen / Substanzen auf Tubulusregeneration nach Nierentransplantation:
    a. 4-Phenylbuttersäure (PBA)
    b. Trichostatin (TSA)
    c. Rho-Kinase Inhibitor (RKI)
    d. anti-Histon-IgG

Ad I: Nach den Vorgaben der Regierung von Oberbayern durften wir zunächst und wie sich dann im weiteren Verlauf herausstellen sollte alleinig die Kontrollversuche durchführen. Wir haben C57bl/6-Nieren auf C57bl/6-Empfänger transplantiert. Die Nachbeobachtung war zwischen 24 und 36 Wochen. Dabei hatten wir in 2 Gruppen die Nieren mit 1 std. kalter Ischämie und in den restlichen 2 Gruppen mit 16 std. kalter Ischämie präkonditioniert. Die Hypothese war, dass sich nach dieser langen Beobachtungszeit Adenome und Nierenzellkarzinome ausbilden. In den Gruppen mit 16 std. kalter Ischämie hätten hierbei anteilig mehr Tumore entstehen sollen als in der Gruppe mit 1 std. kalter Ischämie aufgrund des ausgeprägteren Ischämieschadens.

Wir haben die Tiere am Ende der Nachbeobachtung kernspintomografiert, getötet und die Nieren, sowohl die Transplantate wie auch die nativen Nieren entnommen.

Im Rahmen der Kernspintomographie sah man bei allen Transplantaten noch erhaltene Perfusion unterschiedlicher Qualität, als Ausdruck eines funktionierenden technischen „setups“.

Die Makroskopie und die histopathologische Aufarbeitung aber zeigte bei allen Tieren schwere immunologische Abstossungsreaktionen, die zu einer fortgeschrittenen Zerstörung des Nierenparenchyms geführt hatte. Es konnten keine Tumore detektiert werden. Über diese Ergebnisse haben wir detailliert in unserer Publikation (Herr FL et al. Eur Radiol Exp. 2026 Feb 4;10(1):11) berichtet. Das war so nicht zu erwarten. Nach syngener Transplantation werden normalerweise keine Abstossungsreaktionen gesehen. Allerdings gibt es auch in der Fachliteratur keine vergleichbaren Experimente mit einer derart langen Laufzeit ohne zusätzliche immunsuppressive Therapie. Es gibt Berichte über Abstossungsreaktionen, getriggert durch „minor-H-differences“. Es ist anzunehmen, dass dies für die Ergebnisse verantwortlich ist.

Wie aber auch in o.g. Publikation dargestellt, haben wir das Nierentransplantationsmodell mit kalten Ischämie-Zeiten von 1 std. und 16 std. etablieren können.

Weitere Versuche wurden uns aufgrund der strafrechtlichen Verfolgung meiner Person, im Kontext vermuteter Vergehen gegen den Tierschutz untersagt.

Die Vorgänge bis hin zur Einstellung der Rechtsverfahren hatten wir Ihnen bereits vorgelegt.

Ad II-IV: Über Arbeiten zu dem Zellzyklusregulator MDM2 kam die AG Anders zu den molekularen Mechanismen der Regeneration des Tubulusepithels. Hierzu wurde vor Jahren begonnen, die Technik des klonalen lineage tracings zu etablieren. Die Reportermäuse hierzu hat die AG vom Kooperationspartner Prof. Romagnani erhalten. Es wurden Studien mit einer Dauer von bis zu 4 Wochen nach IRI durchgeführt, um durch per compound screening identifizierten Kandidatensubstanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die klonale Amplifikation der Pax2-Progenitorzellen, die Nierenregeneration und die langfristige Nierenfunktion nach AKI zu testen. Zunächst wurde aus 150 Testsubstanzen der Rho-Kinase Inhibitor RKI-1447 identifiziert, der potent die Amplifikation von humanen renalen Progenitorzellen in verschiedenen Assaysystemen stimuliert. Für das klonale lineage tracing in vivo konnten eine Reihe von technischen Hürden für die Auswertung eines 4-Farben-Reporters überwunden werden. Auch in vivo kam es zu einer Zunahme der Frequenz von Pax2+ Klone in Aquaporin (AQP)-2-negativen proximalen Tubuli unter Therapie mit RKI-1447, jedoch war die Zahl der überlebenden Progenitorzellen stark von dem Ausmaß des initialen Schadens abhängig. Besonders die Kombination einer frühen zytoprotektiven Therapie, die die Zahl der überlebenden Progenitorzellen erhöht und die pro-regenerative Therapie führte zu einer verbesserten Nierenfunktion mit längeren Progenitorzellklonen. Entsprechend der Erfahrungen aus dem gemeinsamen Projekt mit

Peired, et al., muss bei solchen Therapien im Langzeitverlauf mit vermehrter Bildung von Adenomen und Karzinomen gerechnet werden, insbesondere im Kontext der Nierentransplantation mit persistierender alloimmuner Entzündung und Immunsuppression.
Die akute Gewebeschädigung beim AKI führt zu DNA-Veränderungen und Reparatur durch extensive Proliferation von Stammzellpopulationen und/oder polyploider Genomveränderungen von differenzierten Zellen. Dazu können die Reparaturprozesse die Zellzyklusaktivierung, -Überleben und –Proliferation verändern, Prozesse, die bei Patienten nach AKI das etwa 2-4-fach erhöhtes Risiko haben an einem papillären Nierenzellkarzinom (pRCC) zu erkranken erklären könnte. In Ischämie/Reperfusions-Experimenten in der Maus konnte dies reproduziert werden. Nach 30 min warmer Ischämie durch Ausklemmen der Nierengefäße mit darauffolgender Reperfusion entstanden im weiteren Verlauf papilläre Adenome und Karzinome in Wildtyp-Mäusen. Vier Wochen nach IRI konnten noch keine Tumore gefunden werden. Zwischen den Wochen 12-36 nach IRI lag die Inzidenz von Adenomen bei 55,6% und von pRCCs bei 22.2%. 68,75% waren dabei vom Typ 1 und 31,25% vom Typ 2. Demgegenüber entwickelten Mäuse ohne Ischämie/Reperfusions-Schaden keine Tumoren. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass >95% der AKI-induzierten papillären Tumore jeweils durch klonale Amplifikation einer einzelnen Pax2+ renalen Progenitorzelle ausgehen. Daher sollte diese klonale Adenom-Karzinomsequenz nach Nierentransplantation untersucht werden. Die geplanten Langzeituntersuchungen nach experimenteller Nierentransplantation verzögerten sich jedoch, da die lokale Zucht der Reportermäuse einen Verlust des Transgens erfuhr und die Reintroduktion der Mauslinie aus dem Ausland kurzfristig nicht möglich war. Der Umzug des eigenen Tierstalls ans Biomedizinische Zentrum erforderte einen neuen Embryotransfer, und Embryonen konnten murzfristig nicht aus Italien erneut besorgt werden. Die Rückkreuzung der eigenen Tiere kam leider nicht zum gewünschten Ziel. Zudem musste die AG Andrassy parallel die Genehmigung für die Transplantationsexperimente zurückzuerlangen. Letztlich konnte das Problem nicht gelöst werden, so dass diese Experimente nicht wie geplant beendet werden konnten.

4 Veröffentlichte Projektergebnisse

4.1 Kategorie A – Fachaufsätze in Peer Review-Zeitschriften, Beiträge zu Konferenzen mit Peer Review oder Sammelbänden sowie Buchpublikationen

1. Herr FL, Kloiber-Langhorst S, Li MM, Dietrich O, Erdelkamp R, Walz C, Jacobi S, Wirth U, Ricke J, Cyran CC, Andrassy J. Impact of ischemia duration on MRI-derived perfusion parameters in a mouse kidney transplant model. Eur Radiol Exp. 2026 Feb 4;10(1):11. doi: 10.1186/s41747-025-00675-x.

2. Anders HJ, Andrassy J, Lichtnekert J. Regulators of necroinflammation in acute kidney injury. Kidney Int. 2024 Jan;105(1):22-25. doi:10.1016/j.kint.2023.10.019.

3. Long H, Lichtnekert J, Andrassy J, Schraml BU, Romagnani P, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: how resident and infiltrating mononuclear phagocytes account for organ injury, regeneration or atrophy. Front Immunol. 2023 Oct 6;14:1194988. doi: 10.3389/fimmu.2023.1194988.

4. Kruk L, Mamtimin M, Braun A, Anders HJ, Andrassy J, Gudermann T, Mammadova-Bach E. Inflammatory Networks in Renal Cell Carcinoma. Cancers (Basel). 2023 Apr 9;15(8):2212. doi: 10.3390/cancers15082212..

4.2 Kategorie B – Jede weitere Form öffentlich gemachter Ergebnisse Keine

4.3 Patente (angemeldete und erteilte) Keine