



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Scienze Biomediche

CICLO XXXI

COORDINATORE Prof. Massimo Stefani

*Studio dell'effetto di un danno renale  
acuto sulla formazione di carcinoma  
renale*

Settore Scientifico Disciplinare MED/14

**Dottorando**

Dott. Nardi Sara

(firma)

**Tutore**

Prof. Romagnani Paola

(firma)

**Coordinatore**

Prof. Stefani Massimo

(firma)

Anni 2015/2018

*A mia figlia Lara e alla mia famiglia*

# INDICE

|  |         |
|--|---------|
| 1. INTRODUZIONE  | pag.5   |
| 1.1 I carcinomi a cellule renali (RCC)   | pag. 5  |
| 1.2 Caratteristiche istologiche del carcinoma renale                                       | pag. 6  |
| 1.3 La pathway di Notch nel RCC  | pag. 10 |
| 1.4 Il danno renale acuto  | pag. 14 |
| 1.5.1 Cellule staminali tumorali   | pag. 15 |
| 1.5.2 Cellule staminali nel tumore renale  | pag. 17 |
| 1.6 Cellule staminali renali nel danno renale acuto (RPC E TEC)                            | pag. 19 |
| 1.7.1 Modelli murini per lo studio dei tumori  | pag. 25 |
| 1.7.2 I sistemi inducibili Tet-On  | pag. 25 |
| 1.7.3 I fattori di trascrizione Pax2 e Pax8  | pag. 28 |
| 1.7.4 Il transgene Notch1  | pag. 29 |
| 1.7.5 Sistemi basati sul <i>lineage tracing</i>  | pag. 29 |
| 1.8 Modello murino di RCC: il topo Pax8/NICD1  | pag. 31 |
| 2- PROPOSTA DI TESI  | pag. 35 |
| 3- MATERIALI E METODI  | pag. 36 |
| 3.1 <i>Modeling</i> degli animali transgenici  | pag. 36 |
| 3.2 Genotipizzazione   | pag. 39 |
| 3.3 Raccolta dei tessuti murini  | pag. 40 |
| 3.4 Analisi istologica   | pag. 41 |
| 3.5 Immunofluorescenza e microscopia confocale   | pag. 41 |
| 3.6 Immunoistochimica  | pag. 41 |
| 3.7 Analisi della frequenza dei cloni  | pag. 42 |
| 3.8 Danno renale da ischemia / riperfusione (IRI)  | pag. 42 |
| 3.9 Misura transcutanea della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) nei topi coscienti | pag. 43 |

|  |         |
|--|---------|
| 3.10 Analisi statistica  | pag. 44 |
| 4- RISULTATI   | pag. 45 |
| 4.1 L'overespressione dose-dipendente di NICD1 induce lo sviluppo di tumori papillari di tipo 2  | pag. 45 |
| 4.2 L'AKI promuove lo sviluppo di tumori papillari di tipo 2 nel topo                            | pag. 47 |
| 4.3 I tumori papillari di tipo 2 originano a seguito dell'espansione clonale di un subset di TEC | pag. 50 |
| 4.4 I tumori papillari di tipo 2 originano dall'espansione clonale dei progenitori Pax2+         | pag. 52 |
| 5 - DISCUSSIONE  | pag. 57 |
| 6- BIBLIOGRAFIA  | pag. 59 |

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 I carcinomi a cellule renali (RCC)

I tumori renali rappresentano dal 2% al 5% delle neoplasie dell'adulto, e nel 2012 sono stati stimati 338,000 nuovi casi nel mondo (1), con una maggiore incidenza nei paesi sviluppati (2). A livello mondiale il tumore renale è attualmente al nono posto per frequenza tra gli uomini e al quattordicesimo tra le donne, con 214,000 nuovi casi l'anno per gli uomini e 124,000 per le donne (3). In Italia il tumore del rene e delle vie urinarie si colloca al decimo posto in termini di frequenza, con circa 13.600 nuovi casi l'anno, con una manifestazione più frequente negli uomini rispetto alle donne. Nella maggior parte dei casi (85%) i tumori affliggono il parenchima renale, mentre le forme che colpiscono le vie urinarie sono meno frequenti (4). L'incidenza aumenta con l'età, con un picco verso gli 80 anni, con una frequenza circa doppia per gli uomini rispetto alle donne (5).

Nei nostri studi ci siamo dedicati in particolar modo ai carcinomi a cellule renali (*renal cell carcinoma*, RCC): essi sono una famiglia abbastanza eterogenea di tumori che originano dalle componenti epiteliali del nefrone. Gli RCC rappresentano il 2-3% di tutte le forme maligne e l'85% delle neoplasie primarie del rene (6). Malgrado i miglioramenti nel campo diagnostico e terapeutico, l'incidenza di questo tipo di tumori e la mortalità aumentano del 2% circa ogni anno, anche se le ragioni di questo rimangono sconosciute. L'eziologia di questo tipo di tumori è varia e non del tutto chiarita. Nel 39% dei casi di sviluppo del tumore la causa principale sembra essere il fumo di tabacco (7) il quale è classificato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC) come cancerogeno. I fumatori hanno un rischio del 50% più elevato di sviluppare un tumore del parenchima renale rispetto ai non fumatori (8). Anche altri fattori come l'esposizione ai composti dell'arsenico, l'assunzione di acqua contaminata, composti chimici ambientali come amianto, cadmio, solventi organici e pesticidi possono costituire uno stimolo cancerogenico (9,10). Da alcuni studi sembra che anche avere indice di massa corporea (*body mass index*, BMI) elevato incida sul rischio di sviluppare un tumore renale, in particolare l'incidenza di

RCC in persone obese ( $BMI > 29\text{kg/m}^2$ ) risulta doppia rispetto a un individuo normopeso(11,12), in entrambi i sessi (13). Il sovrappeso spiega anche l'aumentato rischio per i pazienti diabetici (14): tra questi il rischio di tumore del rene è più elevato in chi usa insulina rispetto a chi fa uso di metformina (15,16). Anche l'ipertensione arteriosa è associata ad un aumento del rischio di tumore renale di circa il 60% rispetto ai soggetti normotesi (17). Altre possibili cause si riscontrano in familiarità per forme di tumori renali (18), dieta sbilanciata con basso consumo di frutta e vegetali (19), utilizzo di farmaci antidepressivi e diuretici. Anche l'utilizzo protratto (> 10 anni) di antinfiammatori non steroidei diversi dall'aspirina è stato associato ad un incremento del rischio del tumore a cellule renali (20). Una piccola quota di tumori si manifesta anche in presenza di alcune sindromi genetiche, in particolare nei pazienti con sindrome di Von Hippel Lindau, nei quali il rischio di sviluppare un tumore a cellule chiare aumenta con l'età (21). Per le forme ereditarie di cancro renale sono state identificate mutazioni germinali che riguardano l'attivazione di oncogeni o la inattivazione di oncosoppressori e sono utilizzate per confermare la diagnosi clinica di sindrome ereditaria.

## **1.2 Caratteristiche istologiche del carcinoma renale**

A livello istologico il carcinoma renale presenta le seguenti caratteristiche con valore prognostico:

- l'istotipo delle forme comuni di carcinoma renale (carcinoma renale a cellule chiare 70-80% dei casi, carcinoma renale papillare 10-15%, carcinoma cromofobo 5%);
- il grado nucleare secondo Fuhrman;
- la presenza di una componente sarcomatoide e/o rabdoide;
- la presenza di necrosi tumorale;
- l'invasione del seno renale (13,14,22).

Studi basati sull'analisi univariata della sopravvivenza hanno confermato che l'istotipo maggiormente aggressivo è il carcinoma a cellule chiare, seguito dal

carcinoma papillare e dal carcinoma cromofobo; tuttavia le analisi multivariate suggeriscono che lo stadio e il grado della neoplasia abbiano un impatto sulla prognosi maggiore rispetto al solo istotipo (16). Il grado di Fuhrman rimane invece il fattore prognostico accreditato di maggior rilevanza per il carcinoma renale a cellule chiare e per quello papillare (13,17,23).

Di recente è stato proposto e accettato un nuovo sistema di classificazione per i tumori renali basato sulla prominenza dei nucleoli (Sistema ISUP/WHO) (tabella) (15).

| Classificazione Istologica ISUP/WHO 2016 dei tumori a cellule renali   |
|--|
| <b>Neoplasie maligne</b>   |
| Carcinoma renale a cellule chiare                                      |
| Neoplasia renale multiloculare cistica a basso potenziale di malignità |
| Carcinoma renale papillare   |
| Leiomiomatosi e carcinoma renale familiare                             |
| Carcinoma cromofobo  |
| Carcinoma dei dotti collettori   |
| Carcinoma renale midollare   |
| Carcinoma renale con traslocazioni della famiglia MiT                  |
| Carcinoma renale Xp11 traslocato                                       |
| Carcinoma renale t(6;11)   |
| Carcinoma renale associato a deficit della succinicodeidrogenasi B     |
| Carcinoma a cellule fusate e tubulare mucinoso                         |
| Carcinoma renale tubulo-cistico  |
| Carcinoma associato a malattia cistica acquisita                       |
| Carcinoma a cellule chiare tubulo papillare                            |
| Carcinoma renale non classificabile                                    |
| Classificazione Istologica ISUP/WHO 2016 dei tumori a cellule renali   |
| <b>Neoplasie benigne</b>   |
| Adenoma papillare  |
| Oncocitoma   |
| <b>Neoplasie renali entità emergenti</b>                               |
| Carcinoma renale oncocitico insorto dopo neuroblastoma                 |
| Carcinoma renale follicolare "tiroide-like"                            |
| Carcinoma associato alla traslocazione di ALK                          |
| Carcinoma renale con stroma leiomiomatoso                              |

Tabella . Classificazione Istologica ISUP/WHO 2016 dei tumori a cellule renali (15).

- **L'adenoma papillare** è la neoplasia più comune che colpisce l'epitelio dei tubuli renali; lesioni di questo tipo si riscontrano in pazienti in dialisi a lungo termine e nel

33% di questi pazienti affetti da malattia cistica renale acquisita (24). Questa forma tumorale si sviluppa con un'architettura papillare, tubulare o tubulo-papillare, con nuclei dalla forma variabile tra il circolare e l'ovale e un citoplasma voluminoso e eosinofilo, che ricorda molto il carcinoma papillare di tipo 1 e 2 (25,26). L'adenoma papillare è ben circoscritto, con noduli di colore variabile tra il giallo e il bianco-grigiastro di dimensioni inferiori a 1mm di diametro quando si ritrovano nella zona corticale. Si presentano di solito in maniera singola, e raramente in multipli o bilaterali. Dal punto di vista immunofenotipico, le cellule di adenoma papillare esprimono in maniera diffusa la citocheratina 7 (CK7) e sono negative per l'anidrasi carbonica IX (CAIX).

Gli adenomi papillari sono stati definiti fino al 2015 come tumori che misurano  $\leq 0,5$  cm. La classificazione WHO 2016 definisce gli adenomi papillari come tumori non incapsulati con architettura papillare o tubulare, basso grado OMS / ISUP e diametro  $\leq 1,5$  cm (27).

- **Il Carcinoma a Cellule Renali Papillare (pRCC)** è un tumore maligno di origine parenchimale con un'architettura papillare o tubulo-papillare ed è il più comune tipo di RCC con un'architettura papillare. Nelle casistiche chirurgiche circa il 10 % dei casi di tumore renale è costituito da questo carcinoma. I casi risultano essere concentrati in un *range* di età compreso tra 52 e 68 anni, con un rapporto maschi:femmine variabile tra 1,8:1 a 3,8:1 (25,28,29).

Frequentemente questo tumore contiene aree emorragiche, necrotiche e cisti degenerate. In alcuni tumori ben circoscritti è possibile identificare una pseudo-capsula a separare il tumore dal resto del tessuto (30,31). Il tumore papillare è composto da cellule epiteliali maligne che formano, in proporzione variabile, papille e tubuli. Le papille tumorali hanno all'interno un delicato nucleo fibrovascolare e possono essere presenti aggregati di macrofagi schiumosi e cristalli di colesterolo (32). Una variante è costituita da tubuli o piccole papille simili a glomeruli (33).

Sono stati descritti due tipi morfologici per questo tumore: nel tipo 1 si sviluppano papille coperte da un singolo strato di piccole cellule con scarso citoplasma sulla membrana basale. I tumori di questo tipo sono più frequentemente multifocali.

Quelli del tipo 2 sono costituiti da cellule con citoplasma eosinofilo e nuclei pseudo-stratificati in corrispondenza del centro della papilla.

- **Il Carcinoma a Cellule Renali a Cellule Chiare (ccRCC)** è una neoplasia maligna composta da cellule con citoplasma chiaro ed eosinofilo con una delicata rete vascolare. Sono tumori della zona corticale con uguale frequenza di manifestazione in entrambi i reni, la multicentricità e/o la bilateralità si ritrova in meno del 5% dei casi (34). La multiceutralità, come la bilateralità e la manifestazione in età precoce, sono caratteristici della sindrome ereditaria di Von Hippel-Lindau.

Il carcinoma a cellule chiare è tipicamente una massa globulare bozzoluta che si espande dalla corticale; i limiti sono normalmente ben marcati da un "margine di spinta" (*pushing margin*) e da una pseudo-capsula. Ha tipicamente un colore giallo, dato dall'alto contenuto lipidico delle cellule. Sono comunque comunemente presenti: cisti, aree necrotiche, emorragie e calcificazione (35,36).

Questo tumore ha una variegata architettura, si manifesta più frequentemente con strutture solide, alveolari o acinari. La fitta e sottile rete vascolare è un utile strumento per il riconoscimento e la classificazione. Nella struttura alveolare non sono presenti lumi, mentre è presente una cavità centrale piena di fluido sieroso lievemente acidofilo o eritrociti nella struttura acinare. Queste due architetture possono dilatarsi producendo microcisti e macrocisti.

Alla maggior parte dei tumori è associata una risposta infiammatoria, e solo raramente può essere presente infiltrato linfocitico o neutrofilo.

- **Il Carcinoma a Cellule Renali a Cellule Chiare con Cisti Multioculari** corrisponde a circa il 4% dei carcinomi a cellule chiare. Affligge adulti di mezza età colpendo maggiormente i maschi rispetto alle femmine in un rapporto 1,2:1 a 2,1:1. E' di solito scoperto casualmente durante analisi effettuate per altre cause ed è quasi sempre unilaterale (37-39)

Macroscopicamente il tumore è composto esclusivamente di cisti di dimensioni variabili separate da setti sottili, piene di un fluido chiaro gelatinoso o sieroso. Le

cellule chiare possono essere scambiate per linfociti o istiociti, anche in questo caso la vascolarizzazione è un importante strumento di analisi.

- **Il Carcinoma a Cellule Renali Cromofobo** è caratterizzato da grandi cellule pallide con spessa membrana. Corrisponde a circa il 5% dei tumori epiteliali renali rimossi chirurgicamente. Affligge in egual percentuale maschi e femmine tra 27-86 anni. Esistono rare forme ereditarie (40).

Appare come un tumore solido, circoscritto, con una superficie lievemente lobulata, ha un tono marrone che vira al grigio dopo fissazione in formalina.

Il tumore manifesta spesso zone di calcificazione e ampi setti fibrotici. A differenza del Carcinoma a Cellule Chiare molti vasi hanno pareti spesse ed eccentricamente ializzate, ovvero acquisiscono un aspetto vetroso e appaiono rifrangenti al microscopio (questo accade a causa di un arricchimento di collagene), ispessendosi e rigonfiandosi.

Nel tumore le grandi cellule poligonali con citoplasma chiaro sono comunemente mischiate a cellule più piccole con citoplasma granulare ed eosinofilo.

La variante eosinofila del carcinoma Cromofobo è completamente composta da cellule altamente eosinofile con una membrana prominente (41). Le cellule hanno poi nuclei irregolari e a volte sono binucleate.

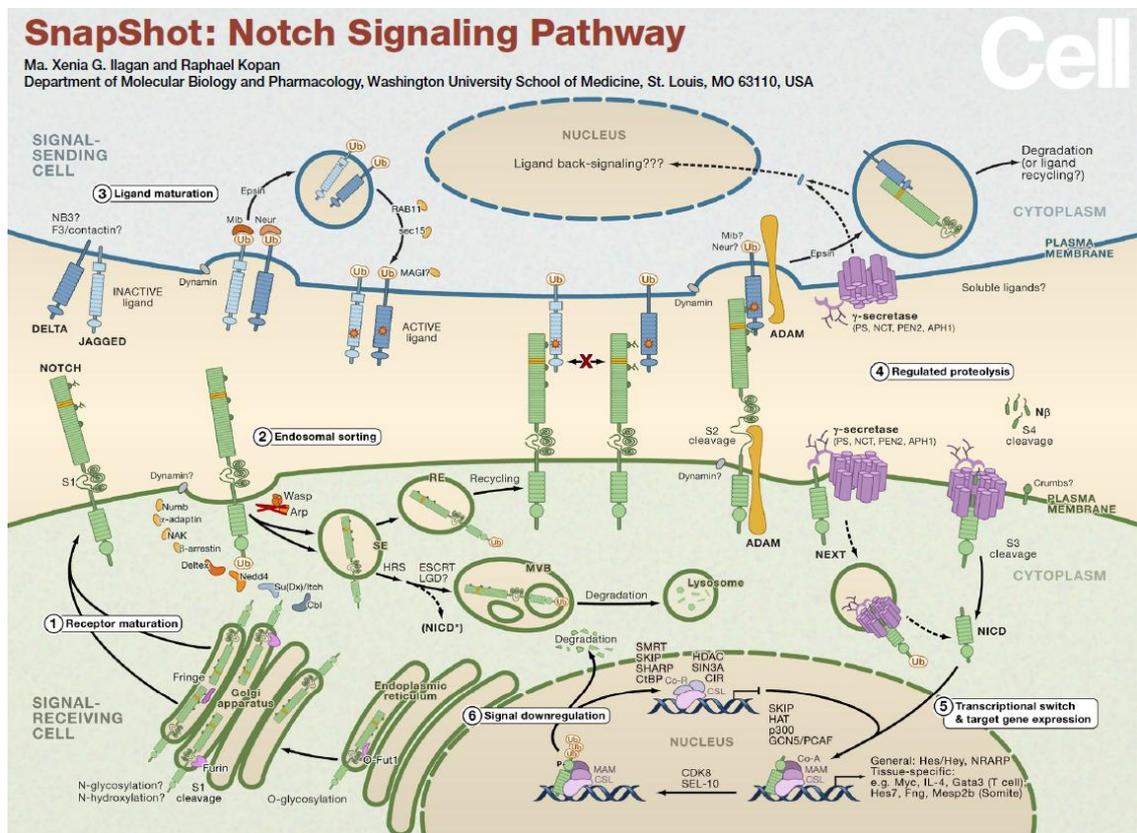
### **1.3 La pathway di Notch nel RCC**

La via di segnalazione di Notch è costituita da una famiglia di recettori transmembrana e dai loro ligandi, da molecole con azione modulante e da fattori di trascrizione. Notch è prodotto nel reticolo endoplasmatico sottoforma di precursore e clivato poi nel Golgi dove sia la porzione intra che quella extracellulare subiscono successive modificazioni. A livello di superficie Notch è un recettore eterodimerico che viene attivato in seguito al legame col ligando e questo innesca una serie di tagli proteolitici ad opera delle metalloproteasi della famiglia ADAM, in corrispondenza

del sito S2, e del complesso della  $\gamma$ -secretasi (Presenilina, Nicastrina, Aph1 e Pen2) in corrispondenza del sito S3 (42,43).

Il clivaggio in S3 induce l'endocitosi della porzione extracellulare di Notch insieme al ligando da parte della cellula segnalante, ed il conseguente rilascio del dominio intracellulare NICD (Notch Intracellular Domain) e la traslocazione di questo nel nucleo della cellula ricevente (44).

L'NICD nel nucleo scalza il co-repressore associato a Rbpj e ciò porta all'attivazione dei geni bersaglio di Notch (45) (Figura 1).



**Figura 1** - Via di segnalazione di Notch. Estratto e modificato da: Ilgan MX, Kopan R, Cell, 2007.

La via di segnalazione di Notch rappresenta un tipo di comunicazione cellula-cellula che regola molti processi cellulari tra cui la proliferazione, il mantenimento della staminalità, la differenziazione e l'apoptosi sia durante lo sviluppo che durante il mantenimento del tessuto adulto (46). La risposta alla segnalazione di Notch varia molto tra i differenti tipi cellulari: lo stesso segnale può infatti promuovere la proliferazione in alcune cellule e indurre apoptosi in altre (47-50). Questa plasticità

di effetti si può spiegare in parte attraverso il *cross-talk* con altre vie di segnalazione e in parte può essere dovuta alle diverse isoforme del recettore che possono avere effetti anche molto diversi tra loro (51-53).

La *pathway* di Notch è fortemente attiva durante l'embriogenesi renale: l'espressione dei recettori e dei suoi ligandi è stata ritrovata nei progenitori podocitari, nelle cellule epiteliali del glomerulo e dei dotti collettori e nelle cellule endoteliali (54-57). Da studi recenti sembra che Notch sia coinvolto nella formazione dell'epitelio del tubulo prossimale e nello stabilire la composizione dei dotti collettori determinando la percentuale di cellule principali e intercalari (58-61).

La *pathway* di Notch controlla anche la proliferazione e la differenziazione dei progenitori renali (RPC). In alcuni esperimenti *in vitro* sul comportamento dei progenitori renali nei disordini glomerulari è stato visto che l'attivazione di Notch nelle RPC umane porta queste cellule ad entrare nella fase S del ciclo cellulare e alla loro successiva divisione cellulare, mentre la sua *down* regolazione è essenziale per la differenziazione delle RPC a podociti (62). Analogamente, l'inibizione della *pathway* di Notch in un modello murino di glomerulosclerosi focale e segmentale (FSGS) ha migliorato la proteinuria e ridotto il numero di podociti morti durante la fase iniziale di danno, mentre ha indotto un peggioramento della proteinuria e una riduzione della proliferazione dei progenitori renali durante la fase rigenerativa. Questo dimostra che una regolata attivazione della *pathway* di Notch nelle RPC durante la fase di differenziazione verso il *lineage* podocitario è fondamentale per bilanciare il danno e la rigenerazione nei disordini glomerulari (62).

Pertanto si può dire che Notch è un regolatore chiave coinvolto non solo nelle fasi di embriogenesi renale ma anche nei processi rigenerativi agendo sulla proliferazione e differenziazione dei progenitori renali.

È stato visto inoltre che la aberrante attivazione di Notch può contribuire allo sviluppo di alcuni tumori tra cui il melanoma, il glioma, il carcinoma mammario, il carcinoma del colon e molti altri (63,64).

Alcuni studi riportano che Notch1, Notch3 e Jagged1 sono altamente espressi nel RCC e il bloccaggio del *signalling* può bloccare la crescita del tumore (65,66). Inoltre l'alta espressione di Jagged1 sembra essere legata ad un *outcome* peggiore (67). Un'alta espressione dei ligandi Jagged1 e Delta-like4 ha dato prova di correlare con un aumentato rischio di metastasi e una prognosi peggiore in pazienti affetti da ccRCC (68,54). In un altro studio i ricercatori hanno esaminato i *pattern* di espressione di Notch1, Notch2, Notch3 e Notch4 in campioni di RCC mediante la tecnologia del microarray tissutale e hanno messo in luce che nelle forme di RCC cromofobo l'espressione di Notch1 risultava aumentata (69). Notch1 potrebbe quindi risultare utile come *biomarker* nella diagnosi differenziale dei vari sottotipi istologici di RCC.

Un altro lavoro ha messo in luce come, in linee cellulari di carcinoma a cellule renali a cellule chiare (ccRCC), la cascata segnalatoria di Notch risulti costitutivamente attiva (70). Questi risultati indicano che la cascata segnalatoria di Notch potrebbe rappresentare un nuovo e accessibile percorso terapeutico nel trattamento del ccRCC. Questi risultati sono stati confermati anche dal gruppo di Hu J mostrando che l'inibizione della via segnalatoria di Notch tramite il blocco di KRT6 porta alla morte delle cellule di carcinoma a cellule renali in coltura (71).

Recentemente Zeng Liu e colleghi hanno suggerito di utilizzare l'analisi di espressione di alcuni componenti della *pathway* di Notch come possibili marcatori per la valutazione diagnostica e prognostica dei tumori renali (72). Dall'analisi che i ricercatori hanno condotto è stato costruito un algoritmo (JIH score) che rappresenta un indicatore prognostico indipendente sia per la sopravvivenza in generale che per la sopravvivenza da recidive e si fissa come una strategia alternativa per la ricerca di potenziali *biomarker* per le vie di segnalazione. (73).

L'analisi dei dati sui pRCC umani depositati nel The Cancer Genome Atlas (74) indica una forte associazione tra livelli elevati di Notch1 e una prognosi peggiore per i pazienti.

Quindi si può dire che l'aumento di Notch e dei suoi ligandi ha senz'altro un ruolo nello sviluppo del pRCC.

#### 1.4 Il danno renale acuto

Il danno renale acuto (*Acute Kidney Injury*, AKI) è un'alterazione acuta della funzionalità renale, causata da modifiche morfo-funzionali insorte a seguito del danno, indipendentemente dalle cause scatenanti.

L'AKI è una condizione patologica molto frequente nella pratica clinica e resta ancora un soggetto molto dibattuto nel mondo scientifico, non solo per quanto riguarda la sua incidenza (dall'1 al 31% di casi riportati) e la sua mortalità (dal 19 all'83%), ma anche per quanto riguarda l'identificazione dei metodi di trattamento e prevenzione più ottimali (75).

Il danno renale acuto viene normalmente classificato in base alla sede del danno e si differenzia in:

- AKI pre-renale, causato da patologie che determinano un'insufficiente perfusione del parenchima renale (55% dei casi di AKI), è la forma più frequente di danno renale acuto, ed è determinato da tutte quelle condizioni che causano una diminuzione dell'afflusso di sangue al rene. È una forma reversibile se tempestivamente trattato, in quanto non determina danno al parenchima renale.

- AKI intrinseco, causato da un'alterazione della normale struttura anatomico-funzionale del parenchima renale (circa il 40% dei casi). È determinato da un danno diretto al parenchima renale che può coinvolgere tutte le strutture presenti nel nefrone. La regione del rene maggiormente colpita nella condizione ischemica, sia nell'uomo che nel modello murino, è rappresentata dalla midollare esterna. Le cause più importanti di AKI intrinseco sono rappresentate dalla necrosi tubulare acuta (76) e dalle glomerulonefriti, ma anche da altre patologie capaci di determinare danni a livello parenchimale, come le nefriti (sia allergiche che infettive) o le infiltrazioni neoplastiche (soprattutto leucemie e linfomi).

- AKI post-renale, determinato da malattie ostruttive del tratto urinario (circa il 5% dei casi). L'ostruzione può accumularsi a qualsiasi livello delle vie escrettrici: pelvi renale, ureteri, uretra e vescica.

Sperimentalmente l'AKI può essere indotto nel modello animale tramite ischemia/riperfusione o iniezione di composti con un effetto tossico diretto

sull'epitelio tubulare. Quando si instaura un danno di questo tipo, Notch viene riattivato e può intervenire nei processi di differenziamento cellulare, proliferazione e riparazione (77). Vari studi ormai mettono in luce che l'espressione di Notch raggiunge alti livelli in un tessuto renale adulto in seguito a danno (78-93) e in modo particolare durante la risposta del rene all'AKI (94,95). In particolare è stato osservato che in un modello di danno da ischemia/riperfusionne nel ratto, l'espressione di Delta1, Notch2 e del loro bersaglio a valle Hes1 risulta aumentata (96).

### **1.5.1 Cellule staminali tumorali**

Il tumore si origina quando eventi genetici ed epigenetici determinano la perdita dei sistemi di controllo del ciclo cellulare interferendo con il suo corretto svolgimento e determinando il passaggio dallo stato di integrità allo stato di instabilità genomica. Questa condizione è alla base della trasformazione cellulare in quanto favorisce la progressiva acquisizione di nuove mutazioni. Per gran parte del XX secolo l'iniziazione e la progressione dei tumori è stata spiegata attraverso il modello stocastico secondo cui una cellula, o un gruppo di cellule, diventa tumorigenica in seguito all'acquisizione di una mutazione somatica. L'accumulo di mutazioni genomiche causano alterazioni dei processi di controllo dei meccanismi di proliferazione, portando ad una crescita sproporzionata della massa cellulare. Inoltre alcune cellule tumorali riescono a sopravvivere ai sistemi di controllo del sistema immunitario dell'ospite e i cloni cellulari predominanti sostengono la crescita tumorale conservando la capacità di iniziare la tumorigenesi se impiantati in topi immunodepressi. Secondo questo modello il tumore risulta composto da uno o più cloni con uguale grado di crescita e quindi tutte le cellule hanno la stessa probabilità di iniziare a propagare la neoplasia. Tuttavia questo modello non tiene in considerazione che i tumori sono morfologicamente e funzionalmente eterogenei e non considera che per riformare un nuovo tumore è necessario un numero abbondante di cellule. Questa osservazione è in contrasto con l'ipotesi che ogni cellula della massa tumorale sia in grado di causare il tumore (97). Negli ultimi anni

è stato proposto un modello che, al contrario di quello stocastico, stabilisce che il tumore possa originarsi da una popolazione rara di cellule, le cellule staminali cancerose (*cancer stem cell*, CSCs). Questa popolazione è reperibile all'interno della massa tumorale e possiede capacità di auto-rinnovamento e potenziale differenziativo ed è in grado di ricostruire l'eterogeneità fenotipica e istologica del tumore di origine se trapiantata *in vivo* (98,99). Le CSCs non sarebbero responsabili solo dello sviluppo tumorale, ma anche dell'aumento dell'aggressività, della recidività e delle metastasi (100). Alcuni autori hanno postulato che le CSCs derivino da cellule staminali adulte mutate (101) o da cellule progenitrici presenti nel tessuto adulto (102,103) sostenendo che tali cellule possano causare tumorigenesi alterando le *pathways* che regolano l'auto-rinnovamento. Esse infatti utilizzano le medesime vie di segnalazione coinvolte nel *self-renewal* delle cellule staminali adulte, normalmente presenti nei tessuti, e sono responsabili del loro regolare rinnovamento. Le prime evidenze della loro esistenza risalgono a degli studi degli anni '90 sulla leucemia mieloide acuta (AML). Lapidot e colleghi dimostrarono che solo una piccola popolazione di cellule tumorali leucemiche, con fenotipo CD34+/CD38+, aveva la capacità di formare il tumore una volta inoculate in un topo NOD/SCID (non-obese diabetic, severe combined immunodeficient) (104). Il fenotipo di queste cellule era simile a quello delle cellule staminali normali ematopoietiche, suggerendo quindi che esse potevano derivare da cellule staminali adulte mutate (105). L'identificazione di cellule staminali leucemiche ha alimentato nuove ricerche su altri tipi di tumore portando alla dimostrazione dell'esistenza di CSCs anche nei tumori solidi. Al-Hajj e colleghi sono stati i primi nel 2007 a identificare e isolare una sottopopolazione di cellule dal tumore al seno (106). Tali cellule avevano la capacità, *in vivo*, di formare il tumore in topi immunodepressi mentre la restante popolazione cellulare del tumore mostrava questa capacità solo quando iniettata ad alte dosi. La popolazione di cellule tumorigeniche è stata identificata sulla base di due marcatori di superficie. Iniettando cellule CD44+/CD24-/low si formava il tumore mentre la popolazione con fenotipo diverso non era in grado di formarlo. Risultati simili sono stati ottenuti nei tumori cerebrali (107). In questo caso le cellule staminali tumorali erano positive per il marcatore CD133. Negli anni risultati simili sono stati raggiunti anche con altri tipi di tumori, tra cui il

tumore polmonare (108), il tumore del colon (109), il tumore dell'ovaio (110), del pancreas (111), della prostata (112) e della tiroide (113). L'insieme di tutti questi risultati ha quindi portato a favorire il modello delle cellule staminali tumorali rispetto a quello stocastico.

### **1.5.2 Cellule staminali nel tumore renale**

Sulla base di quanto osservato nelle forme tumorali in altri organi, si è cercato di capire se anche le neoplasie renali e in particolare i carcinomi a cellule renali possono originarsi da processi tumorigenici a carico di cellule staminali del tessuto adulto o progenitori residenti nell'organo. Le CSCs sono state isolate e identificate nel carcinoma a cellule renali nell'uomo da tessuti tumorali solidi e sono state allestite delle linee cellulari (114-116) usando sorting magnetico o citometria a flusso sulla base dei marcatori CD133, CD24, CD105, ALDH1, Hoechst 33342 (117), CD44 e CXCR4. Sebbene il CD133 sia utilizzato comunemente come marcatore in molti tumori (118,119), da solo non è sufficiente per l'identificazione delle CSCs nel RCC (120). È stato osservato che nelle cellule di RCC le cellule CD133+, sebbene non abbiano la capacità di generare tumori, hanno comunque un ruolo importante nell'angiogenesi e quindi nel favorire la formazione di metastasi (121). È stato chiarito che il CD133, CD24, CD105, Snail, Nanog, Twist, OCT-3/4, CRT2, BCL-2, MDR1, KLF4 e altri sono *marker* di staminalità nelle CSCs di tumore a cellule renali (117,120). Nel 2008 Bussolati e colleghi hanno proposto il CD105 come marcatore di cellule staminali capaci di rigenerare il tumore RCC (122). I ricercatori hanno osservato che, quando iniettate in topi SCID, solo le cellule CD105+, e non le CD105-, mostrano proprietà tumorigeniche. La caratterizzazione dei cloni con fenotipo CD105+ ha evidenziato che queste cellule mostrano molte proprietà delle cellule staminali tra cui capacità clonogenica, espressione di Nestina, Nanog, Oct4, noti *marker* di staminalità, e assenza dei *marker* differenziativi. Inoltre *in vivo* hanno mostrato la capacità di generare carcinomi contenenti sia una popolazione di cellule tumorigeniche indifferenziate CD105+ che una popolazione di cellule differenziate non tumorigeniche CD105- (122). In seguito Dubinski e colleghi hanno proposto il

CD105 come fattore prognostico negativo nel ccRCC (123) in quanto aumentati livelli di espressione di questa molecola sono correlati con una ridotta sopravvivenza dei pazienti. Schrader e colleghi hanno invece osservato un'aumentata espressione del CXCR4 in alcuni campioni di RCC rispetto al tessuto sano (124). Queste cellule mostrano caratteristiche osservate in CSCs di altre forme tumorali tra cui resistenza agli inibitori delle tirosin-chinasi, capacità di crescere in mezzi di coltura privi di siero e fattori di crescita, alti livelli di espressione di NANOG, Oct4 e Sox2 (124). Anche questo marcatore può avere un valore clinico per indicare lo stadio del tumore.

Anche la glicoproteina di membrana CD44 è stata descritta come marcatore di alcune forme tumorali. In particolare i carcinomi umani CD44+ risultano essere altamente maligni e resistenti alla terapia e mostrano capacità metastatiche (125,126). Negli RCC il CD44 indica che il tumore si trova già in una fase invasiva e metastatica e può pertanto essere usato come *marker* prognostico per valutare lo stato della malattia (127). Inoltre è stato osservato che la presenza dei macrofagi nel tumore fa aumentare i livelli di espressione del CD44 in campioni di ccRCC, cosa che potrebbe suggerire un ruolo dei macrofagi nell'induzione dell'espressione del CD44 da parte delle cellule tumorali (128).

Altri ricercatori hanno isolato CSCs da RCC tramite citofluorimetria mediante individuazione della *Side Population*. Questa tecnica prevede l'utilizzo del colorante Hoechst 33342 il quale viene estruso dalle cellule della *side population* grazie alla presenza di trasportatori di membrana, mentre le altre cellule lo trattengono al loro interno. La capacità di alcune cellule di estrarre questa molecola è associata spesso a cellule con caratteristiche staminali (130). Negli RCC circa il 6% delle cellule esprimono questa caratteristica e parallelamente esprimono il CD105.

Recenti studi suggeriscono che anche l'aumentata attività della aldeide deidrogenasi (ALDH) nelle cellule è una caratteristica delle CSCs (131). Questo enzima sembra avere un ruolo importante nella maturazione delle cellule staminali, convertendo il retinolo ad acido retinoico (132). Inoltre cellule ALDH<sup>high</sup> isolate da

RCC mostrano capacità clonogenica, auto rinnovamento e una marcata espressione dei marcatori Oct4, Nanog, Pax2 e una maggior tumorigenicità in vivo (133).

Evidenze scientifiche suggeriscono che la *pathway* di Notch può promuovere la proliferazione, il differenziamento, l'angiogenesi e la migrazione delle cellule staminali tumorali (CSC) in varie forme tumorali (134-136).

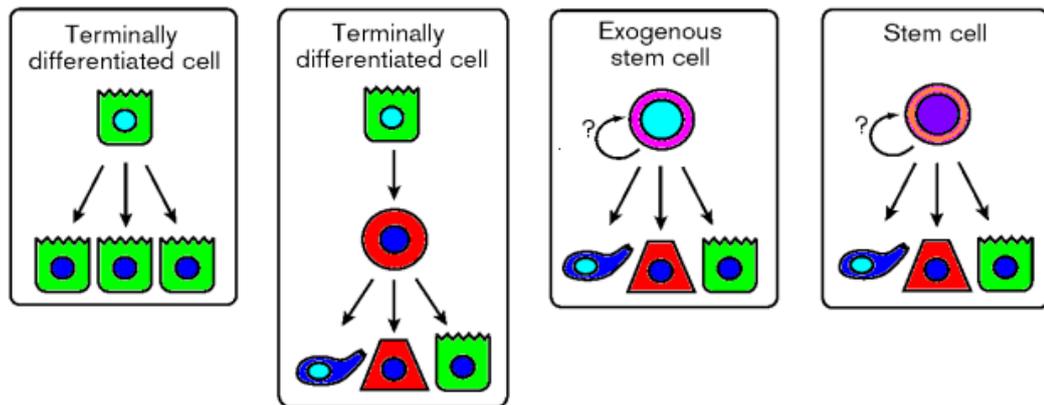
Comunque, sebbene le CSCs del RCC siano state identificate, il profilo di espressione della *pathway* di Notch in queste cellule e il suo possibile coinvolgimento nel mantenimento della staminalità di queste cellule rimane da chiarire.

### **1.6 Cellule staminali renali nel danno renale acuto (RPC E TEC)**

Il rene condivide con la maggior parte degli organi la capacità di rigenerare le strutture di cui è costituito, quando sottoposte a diversi tipi di danno (137-142).

L'identificazione delle cellule staminali nel rene ha, tuttavia, presentato notevoli difficoltà (143-149): è stato infatti proposto che la riparazione delle strutture soggette al danno potesse essere sostenuta da quattro meccanismi (Figura 2), non necessariamente mutuamente esclusivi e più probabilmente cooperanti:

1. cellule terminali completamente differenziate sarebbero in grado di proliferare e produrre cellule figlie identiche a loro stesse.
2. Cellule terminali completamente differenziate sarebbero in grado di proliferare e produrre cellule figlie identiche a loro stesse oppure andare in contro ad un processo di de-differenziazione, cui seguirebbe un nuovo differenziamento in diverse linee cellulari.
3. cellule staminali e precursori di origine extra-renale (in particolare ematopoietica) sarebbero reclutati nel rene danneggiato per differenziare in più tipi di cellule mature o in un solo tipo cellulare.
4. cellule staminali multipotenti residenti nel rene sarebbero in grado di generare tutti i tipi cellulari necessari per il ripristino dell'integrità del nefrone.

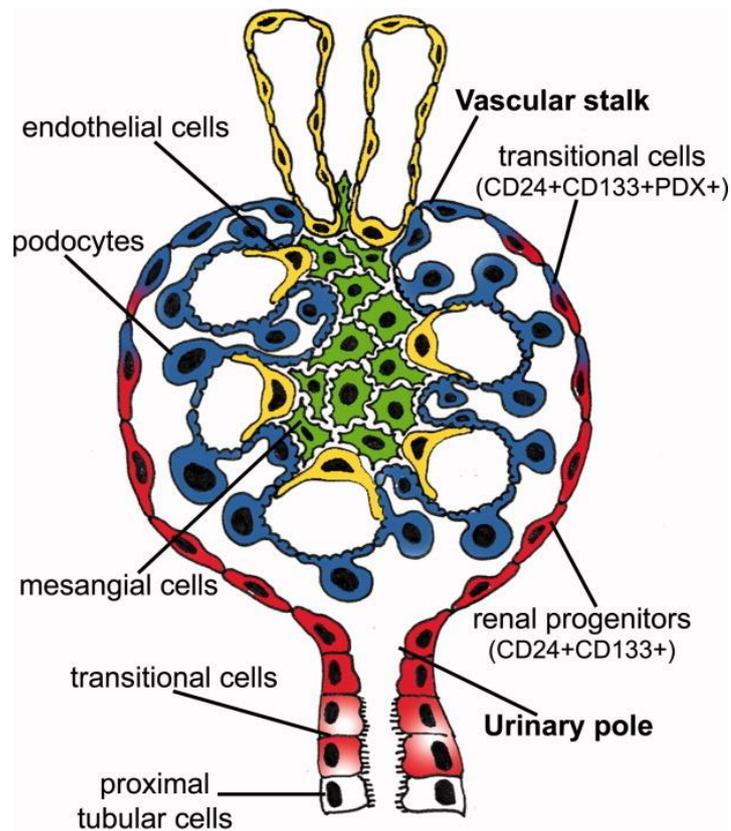


**Figura 2.** Possibili meccanismi coinvolti nel processo di rigenerazione renale. Modificato da Oliver JA, Curr Opin Nephrol Hypertension,2004;13:17–22

Nonostante l'estrema complessità anatomica e funzionale dell'organo, studi recenti effettuati sull'uomo hanno portato all'identificazione e alla caratterizzazione di una popolazione staminale localizzata nella capsula di Bowman (149). Tali cellule sono state individuate grazie all'espressione del CD24, una molecola di superficie utilizzata precedentemente per identificare altri tipi di cellule staminali umane, e del CD133, un *marker* comune alle cellule staminali ematopoietiche e ad altri tipi di cellule staminali adulte. La popolazione individuata CD133+CD24+ rappresenta cellule epiteliali parietali (*parietal epithelial cell*, PEC) e risulta selettivamente localizzata al polo urinario della capsula di Bowman. Questa popolazione è caratterizzata anche dalla mancata espressione dei marcatori specifici di *lineage*, dall'espressione dei fattori di trascrizione caratteristici delle cellule staminali multipotenti (Oct-4 e Bmi-1), e mostra, come le altre popolazioni staminali, capacità di *self-renewal*, efficienza clonogenica e potenziale multidifferenziativo (150,151). La scoperta dei progenitori CD24<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> e la loro specifica localizzazione al polo urinario della capsula di Bowman del rene adulto, l'unica regione del nefrone in continuità sia con le strutture tubulari che con i podociti glomerulari (149), suggeriscono che tali cellule rappresentino progenitori comuni che, a partire dalla loro sede strategica, possono raggiungere sia strutture tubulari che glomerulari, sostituendo cellule danneggiate in entrambe queste sedi. Inoltre, iniettate per via endovenosa in topi SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) affetti da

insufficienza renale acuta, queste cellule si sono dimostrate in grado di rigenerare strutture tubulari in differenti porzioni del nefrone con un conseguente notevole miglioramento della funzione renale (149).

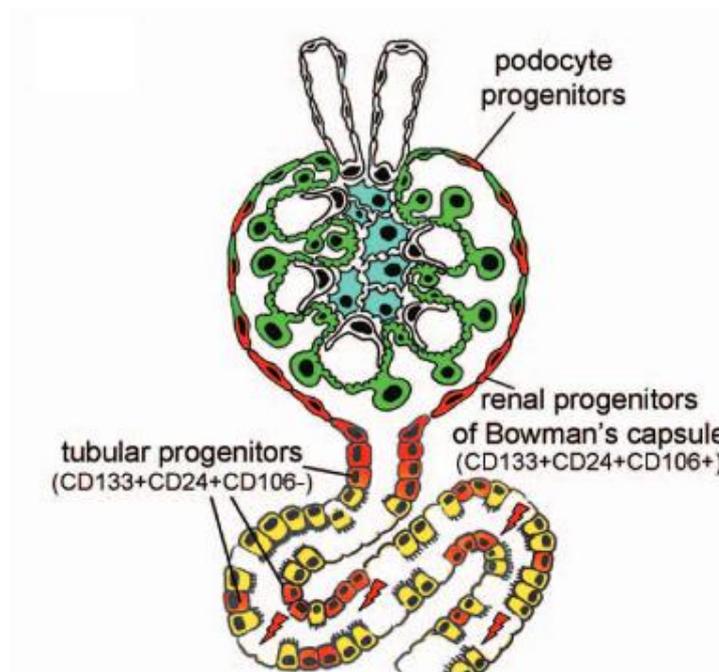
Nell'uomo è stato dimostrato che le cellule CD133+CD24+ rappresentano a tutti gli effetti una popolazione eterogenea e gerarchica di progenitori caratterizzata da una precisa organizzazione tissutale e con la capacità differenziativa e rigenerativa in differenti strutture renali (152). Queste cellule, oltre a esprimere elevati livelli dei marcatori CD133 e CD24, sono anche negative per l'espressione di marker podocitari, come la podocalixina (PDX) e mostrano un'elevata capacità clonogenica e differenziativa sia in senso tubulare che podocitario (Figura 3). Al contrario, le cellule localizzate a livello intermedio tra il polo urinifero e quello vascolare e caratterizzate dal fenotipo CD24<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>PDX<sup>+</sup>, *borderline* tra quello del progenitore e quello podocitario, hanno una capacità clonogenica decisamente minore e sono in grado di rigenerare soltanto cellule podocitarie. Infine, le cellule localizzate al polo vascolare della capsula hanno un fenotipo simile a quello del podocita maturo (CD133<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>PDX<sup>+</sup>), con cui condividono anche caratteristiche funzionali di cellule post-mitotiche: non sono in grado di dare origine a cloni e possono essere mantenute in coltura solo per pochi giorni in appositi *medium*, in accordo con la loro natura di cellule terminalmente differenziate.



**Figura 3.** Distribuzione gerarchica dei progenitori renali in un glomerulo umano adulto. I progenitori  $CD24^+CD133^+$  (in rosso) sono localizzati al polo urinario, in stretta contiguità con i podociti (in blu) ad un estremo e con le cellule tubulari (in bianco) a quello opposto. Una popolazione di cellule di transizione ( $CD24^+CD133^+PDX^-$ , rosso/blu) mostra caratteristiche intermedie tra progenitori renali (rosso) e podociti (blu) e si localizza tra il polo urinario e quello vascolare. Al polo vascolare del glomerulo la popolazione di transizione è in contiguità con cellule che mancano dell'espressione di markers di progenitori ma che risultano positive per l'espressione di quelli di podociti maturi (blu). Sono rappresentate anche le cellule endoteliali (in giallo) e le cellule mesangiali (in verde). [da Romagnani P, *Stem Cells*,2009;27(9): 2247-2253].

Successivamente Angelotti e colleghi hanno distinto i progenitori  $CD24^+CD133^+$  in due popolazioni in base all'espressione della molecola  $CD106$  (153). I ricercatori hanno identificato una popolazione  $CD24^+CD133^+CD106^+$  localizzata al polo urinario di un rene umano sano e una popolazione di cellule  $CD24^+CD133^+CD106^-$  localizzata nel tubulo prossimale e nel tubulo convoluto distale (Figura 4). Le cellule  $CD24^+CD133^+CD106^+$  mostrano un alto tasso proliferativo e sono in grado di differenziare sia verso il *lineage* podocitario che tubulare. Per contro, le cellule  $CD24^+CD133^+CD106^-$  mostrano un tasso proliferativo più basso e un fenotipo già commissionato al *lineage* tubulare (153). Rispetto alle altre popolazioni cellulari del

rene, entrambe queste popolazioni mostrano un'alta resistenza all'apoptosi e iniettate in topi SCID affetti da danno tubulare acuto sono in grado di generare nuove cellule tubulari e promuovere un miglioramento della funzione renale (153). Ciò conferma che il fenotipo di queste cellule è distinto da quello di cellule tubulari differenziate, almeno nell'uomo.



**Figura 4.** Rappresentazione schematica dell'ipotetica risposta ad un danno da parte dei progenitori renali commissionati verso il lineage tubulare. In seguito ad un danno renale acuto, le cellule tubulari differenziate (in giallo) vengono esposte ad agenti pro-apoptotici, mentre i progenitori tubulari (in arancio) sopravvivono. Questi progenitori tubulari potrebbero proliferare e differenziare in seguito a danno acuto per rimpiazzare le cellule morte. [modificato da Angelotti ML et al. *Stem Cells* 2012;30:1714-1725].

Anche Lindgren e collaboratori, sulla base dell'attività dell'aldeide deidrogenasi (ALDH) (caratteristica degli elementi staminali/progenitori), hanno isolato una popolazione di cellule a carattere di progenitori che risulta sparsa nei tubuli prossimali di tessuti renali umani adulti (154). Queste cellule esprimono il CD24 e CD133 e risultano positive per la citocheratina 7, citocheratina 19, gene antiapoptotico BCL-2, la molecola MYOF e per la vimentina. In biopsie di pazienti affetti da necrosi tubulare acuta in restituzione, le cellule CD133+Vimentina+ proliferano, lasciando presupporre che tali cellule rappresentino una popolazione di cellule progenitrici.

Se la caratterizzazione dei progenitori renali nell'uomo ha ricevuto molti contributi ed è ora univocamente chiarita, il dibattito scientifico circa la loro identificazione e caratterizzazione in modelli murini è ancora aperto. Per non cadere in erronee interpretazioni bisogna considerare che nel topo e nell'uomo le popolazioni staminali non sono individuate dai medesimi *marker* e anche la loro espressione e distribuzione temporale potrebbe essere differente (155). Lasagni et al., utilizzando sistemi di *lineage tracing*, hanno messo in evidenza una sottopopolazione di progenitori renali (*Renal Progenitor Cells*, RPC) nel rene murino adulto caratterizzati dall'espressione della molecola Pax2, che nell'uomo colocalizza con il CD133 espresso dalle RPC (156). Le cellule Pax2+ rappresentano la controparte murina delle RPC umane all'interno della capsula di Bowman e circa l'8-10% del totale dei podociti nel topo adulto deriva dalle Pax2+ PEC (157). Negli animali adulti le cellule Pax2+ rimangono localizzate all'interno della capsula di Bowman dei glomeruli sottocapsulari e solo nel 30% dei glomeruli iuxtamidollari, in linea con quanto osservato in studi precedenti (158). Gli autori hanno dimostrato che in un modello di danno podocitario questa popolazione è in grado di influenzare l'*outcome* della malattia (157). In particolare la remissione da proteinuria risulta associata alla rigenerazione da parte delle RPC nel 5-10% dei podociti totali (157). Poiché la sindrome nefrosica negli animali causa dal 15 al 20% di perdita podocitaria, si può dire che la rigenerazione osservata da Lasagni e colleghi ha interessato circa un terzo dei podociti persi. Nei topi che invece avevano sviluppato proteinuria persistente e CKD la rigenerazione era irrilevante. Il modello utilizzato ha permesso di stabilire che le Pax2+ della capsula sono la fonte della rigenerazione podocitaria in seguito a danno glomerulare e che questa molecola si rivela essere un buon marcatore per identificare la popolazione dei progenitori nel topo.

Successivamente Lazzeri e colleghi hanno identificato le cellule Pax2+ anche in varie porzioni del tubulo renale, in particolare esse rappresentano l'1.6% ± 0.5% delle cellule megalina+ nei segmenti S1 e S2 del tubulo prossimale, il 9.8% ± 0.9% delle cellule AQP1+ nel tratto S3 e il 12.3% ± 1.2% delle cellule THP+ nel tubulo distale (159). In un modello di AKI sperimentale queste cellule Pax2+ hanno mostrato un'aumentata sopravvivenza e proprietà clonogeniche in seguito al danno. Il

segmento che maggiormente viene colpito in seguito ad AKI è il segmento S3 del tubulo prossimale (160) ed è in questo tratto che i ricercatori hanno riscontrato una attività più sostenuta delle cellule Pax2+. Queste cellule mostrano attività clonogenica e sono in grado di formare cloni composti da cellule di un solo colore che si estendono fino a 10 cellule. In particolare il maggior contributo di queste cellule è stato apprezzato a 30 giorni di distanza dall'evento ischemico. Questo dimostra che in corso di AKI i progenitori Pax2+ mostrano un'aumentata sopravvivenza e capacità di intraprendere una mitosi (a differenza delle altre classi di cellule epiteliali tubulari, TEC), sono la popolazione che maggiormente si arricchisce, sia attraverso un'aumentata resistenza allo stress che tramite espansione clonale, e sono responsabili della rigenerazione dei segmenti tubulari necrotici in seguito ad AKI (159).

### **1.7.1 Modelli murini per lo studio dei tumori**

Nell'ultimo decennio sono stati sviluppati decine di nuovi modelli animali transgenici per permettere un più fine studio delle gerarchie e delle dinamiche cellulari, in condizioni fisiologiche e patologiche. Questi nuovi strumenti di studio permettono di capire *in vivo* quale sia l'effetto della delezione o dell'attivazione di un dato gene, in uno specifico tipo cellulare, e di correlarlo ad uno preciso fenotipo. Forniscono inoltre la possibilità di selezionare e studiare fasi specifiche dello sviluppo o dei processi di danno e riparazione del tessuto (161-164).

### **1.7.2 I sistemi inducibili Tet-On**

Questi modelli prevedono l'introduzione, nel genoma animale, di un promotore, di un sistema *reporter* e di un terzo transgene che permette una regolazione temporale oltre che spaziale. Mentre nei modelli "costitutivi" (chiamati così per contrapposizione) la ricombinazione genetica che porta all'espressione del gene *reporter* avviene in ogni cellula, in qualsiasi momento della sua vita o in qualsiasi condizione dovesse esprimere il promotore cellula-specifico, nei modelli inducibili è

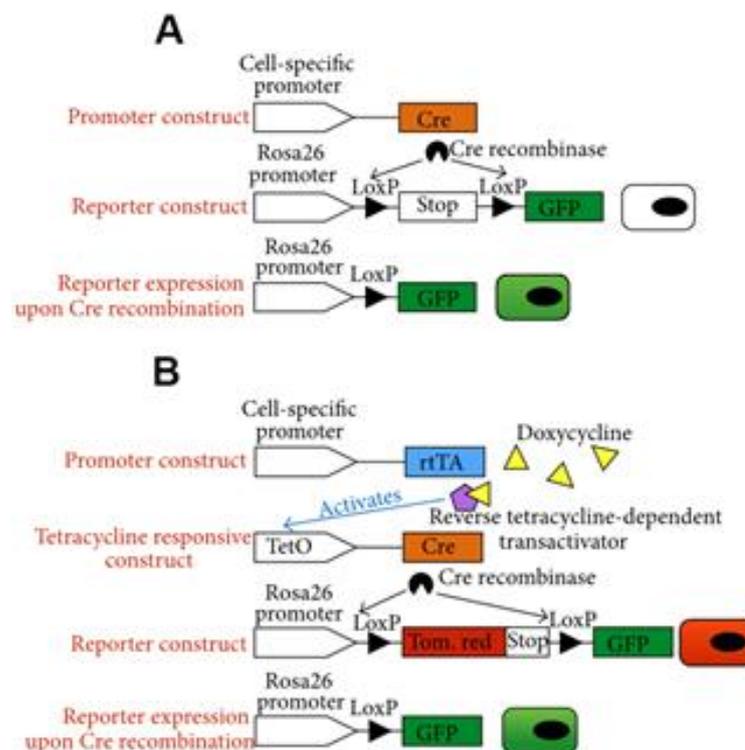
l'operatore a scegliere da quando far avvenire l'evento ricombinativo, tramite la somministrazione di molecole esogene che agiscono da induttori. Appartengono a questa categoria i sistemi regolati da tamossifene (CreER<sup>T</sup>), o i sistemi regolati da tetraciclina (Tet) (162,165).

Nei sistemi controllati da tetraciclina, il promotore cellula-specifico induce l'espressione del fattore trascrizionale *reverse tetracycline-controlled transactivator* (rtTA). Quando all'animale viene somministrata la Doxiciclina essa si legherà al fattore rtTA attivandolo e rendendolo in grado di legare la sequenza del transgene Tet (*Tetracycline-controlled transcriptional activation-elements*), determinando così l'espressione della Cre ricombinasi codificata subito a valle degli elementi Tet, e marcando così cellula (Figura 5B). I sistemi inducibili permettono, quindi, di marcare il *pool* cellulare di interesse solo durante la finestra di somministrazione dell'induttore, rendendo impossibile qualsiasi nuovo evento di ricombinazione genetica in seguito alla rimozione della molecola, anche qualora la cellula in oggetto fosse promotore-positiva. E' così possibile marcare solo le cellule desiderate, e solo nel momento richiesto in base all'*end point* sperimentale. I sistemi regolati dalla tetraciclina sono abbastanza robusti nel topo ma hanno lo svantaggio di richiedere 3 alleli separati e quindi una strategia di *breeding* più complessa.

Affinchè il gene *reporter* si attivi solo nelle cellule d'interesse è necessario scegliere promotori che siano cellula-specifici. Come promotori vengono selezionati geni espressi solo ed unicamente dal tipo cellulare d'interesse, e i transgeni vengono trascritti in maniera analoga a quanto la cellula farebbe fisiologicamente. Il transgene promotore porta al suo interno una modifica nella sequenza con le informazioni utili a produrre delle proteine, comunemente detti enzimi di ricombinazione, che agiscono come attivatori delle altre componenti transgeniche. La specificità del promotore consente l'attivazione dei *reporter* a livello di una popolazione specifica o anche di una singola cellula (162,156).

L'enzima di ricombinazione è in grado di modificare in maniera irreversibile la sequenza acidonucleica del transgene *reporter* inducendone l'espressione. Cre ricombinasi-LoxP è il sistema più usato. Esso si basa sull'azione dell'enzima Cre ricombinasi (*causes recombination of the bacteriophage P1 genome*) e sulla sua capacità di riconoscere una sequenza nucleotidica di 34 paia di basi che prende il

nome di sito LoxP (*locus of X-over P1*) (165,166). Quando due siti LoxP con lo stesso orientamento vengono riconosciuti dalla Cre ricombinasi, la sequenza di DNA interposta tra i due siti viene eliminata e le estremità vengono ricongiunte (166) (Figura 5A). In seguito alla delezione operata dalla Cre ricombinasi, il *reporter* verrà svincolato dallo stop e potrà essere espresso dalla cellula e da tutta la sua progenie (Figura 5A). Essendo infatti la modifica al DNA irreversibile, l'espressione del *reporter* sarà ereditata da tutte le cellule figlie, rendendo possibile la quantificazione della progenie derivata da una singola cellula, e il loro comportamento in condizioni fisiologiche e patologiche (165).



**Figura 5.** Rappresentazione schematica dei meccanismi esposti. Ogni linea rappresenta un differente ceppo transgenico murino che deve essere incrociato con gli altri affinché si possa ottenere il modello desiderato nella sua completezza. **A** - Il promotore cellula-specifico controlla direttamente l'attività della Cre ricombinasi creando così un modello costitutivo. Quando il promotore sarà attivato la Cre ricombinasi sarà espressa ed avrà accesso ai siti LoxP, rimuovendo così la cassetta di Stop floxata tra due siti LoxP. Questo evento ricombinatorio svincola la sequenza della GFP dal sito di Stop, permettendo la sua espressione. **B** - Modello inducibile basato sul fattore trascrizionale rtTA, il quale è costitutivamente espresso in forma inattiva nelle cellule positive al promotore scelto. Il legame con la Doxiciiclina permetterebbe il legame della rtTA alle sequenze TetO (*Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation-On*) che controllano l'espressione della Cre ricombinasi, attivando così i meccanismi ricombinatori già descritti in A e B. Estratta e modificata da: Lombardi D et al., *Stem Cells Int.*, 2015.

### 1.7.3 I fattori di trascrizione Pax2 e Pax8

Durante la maturazione del rene, le cellule sono regolate da un'intricata rete di molecole a loro volta prodotte da un limitato numero di fattori trascrizionali chiave. Tra tutti i fattori trascrizionali, quelli della famiglia Pax (Paired Box) giocano un ruolo fondamentale nell'induzione e nello sviluppo, nella morfogenesi e differenziamento del nefrone. La mancanza di funzionalità dei geni Pax si traduce in gravi difetti del sistema urogenitale generalmente definite come patologie CAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract).

Le proteine Pax sono un gruppo di fattori di trascrizione che agiscono generalmente nell'organogenesi (167). Sia nell'uomo che nel topo la famiglia di proteine Pax comprende 9 membri che sono associati all'organogenesi e al mantenimento dello stato di pluripotenza delle popolazioni staminali durante lo sviluppo e sono caratterizzati dalla presenza di un *paired domain* per il legame al DNA (168). Vicino al *paired domain* le proteine Pax 3, 4, 6 e 7 hanno un omodominio completo, mentre le proteine Pax 2, 5 e 8 hanno solo un omodominio parziale. Questi due domini proteici insieme garantiscono il legame specifico al DNA (169). Tutti i membri della famiglia, fatta eccezione per Pax 4 e 6 contengono un ottapeptide che agisce come modulatore dell'interazioni proteina-proteina (170). Tutte queste proteine hanno poi in corrispondenza del C-terminale un dominio di trans attivazione ricco di serine/treonine che suscita l'attività trascrizionale (171).

Pax2 e Pax8 sono i primi *marker* specifici del *lineage* renale e i soli a essere poi espressi nel rene maturo. Nel rene umano adulto Pax8 è espresso dalle cellule epiteliali renali, nelle cellule epiteliali della capsula di Bowman e nella regione midollare (172) ed è in grado di attivarsi in tutte le cellule differenziate dei tubuli renali. Pax2 è invece implicato nelle fasi cruciali dello sviluppo del rene (173) dove è espresso inizialmente nelle cellule della gemma ureterale e del mesenchima indotto, per poi essere down-regolato nel momento in cui i tubuli mesonefrici emergenti interferiscono con i capillari nascenti per formare l'apparato di filtrazione glomerulare (174,175). Nel rene murino adulto l'espressione di Pax2 è stata ritrovata a livello dei progenitori renali localizzati a livello della capsula di Bowman e lungo varie porzioni tubulari (157,159). Nel sistema inducibile Tet-On, il Pax8, usato

come promotore, consente di evidenziare tutte le cellule tubulari, mentre il Pax2 soltanto i progenitori renali.

#### **1.7.4 Il transgene Notch1**

Come precedentemente detto Notch è implicato in moltissimi processi fisiologici e patologici. Per studiarne l'effetto è stato scelto di utilizzare un transgene con una forma ingegnerizzata di Notch1. Questo produrrà il dominio intracellulare NICD sprovvisto del dominio PEST al C-terminale. Il segnale di Notch1 sarà quindi attivo in modo scoordinato dalla via canonica, l'attivazione sarà costitutiva e avrà una più lunga emivita, in quanto sarà riconosciuto più difficilmente dal proteasoma.

Mutazioni nel dominio PEST che possono condurre allo sviluppo di neoplasie sono state trovate nella Leucemia Linfoblastica Acuta a cellule T (T-ALL), nel Carcinoma polmonare non microcitico (NSCLC) e nel Cancro al Seno (176-178).

Tramite l'utilizzo di questo transgene è possibile studiare l'effetto della presenza continua di Notch nelle cellule dell'epitelio tubulare renale.

#### **1.7.5 Sistemi basati sul *lineage tracing***

I sistemi definiti di *lineage tracing* rappresentano un importante strumento nelle mani dei ricercatori per tracciare il contributo di varie popolazioni cellulari ai processi di sviluppo, omeostasi e rigenerazione in seguito a un danno e permettono di studiare come differenti *pool* cellulari si interfacciano ed interagiscono tra loro in varie condizioni sperimentali (162). In un esperimento di *lineage tracing* una cellula è identificata in base all'espressione di un gene *reporter* che viene inserito nel genoma dell'animale. Se questa cellula si divide, l'espressione del *reporter* si trasferisce a tutta la progenie e il destino delle cellule marcate può essere seguito facilmente (166).

I transgeni *reporter* sono solitamente proteine fluorescenti e garantiscono una sensibilità ed una specificità di vari ordini di grandezza superiore rispetto alle tecniche precedenti, come ad esempio quelle che utilizzavano la proteina  $\beta$ -

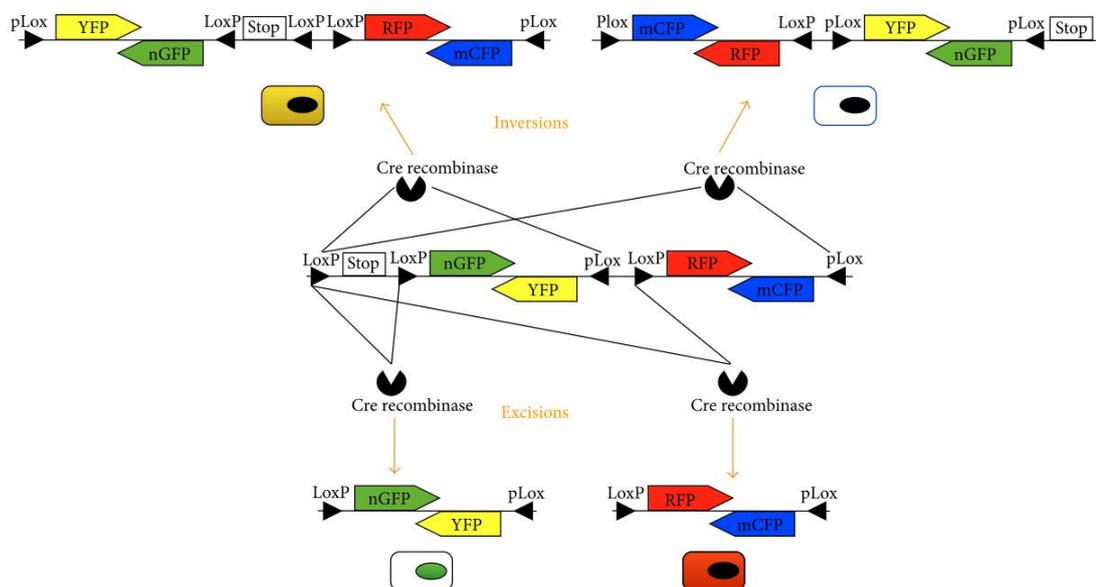
galattosidasi, o tecniche basate sull'uso di anticorpi, che comportavano notevoli limiti (come il rischio di legami aspecifici). Un vantaggio ulteriore dei *reporter* fluorescenti, prima non consentito, risiede nella possibilità di poter marcare eventuali cellule figlie in caso di divisione cellulare, le quali avranno lo stesso colore della cellula madre, permettendo così un'analisi di tipo clonale (156). Le analisi di *lineage tracing* rendono possibile non solo tracciare eventuali espansioni clonali dovute ad eventi rigenerativi o proliferativi, ma anche ottenere informazioni sull'estensione della duplicazione della popolazione marcata e capire lo stato differenziativo di una cellula sia basandosi sull'espressione di determinati geni che per effetto posizionale (162,179).

Grazie al *lineage tracing* possiamo avere informazioni circa il comportamento di una cellula sia nei tessuti post-natali che in fase di sviluppo, questo grazie anche ai modelli inducibili, basati sul sistema Tet-On, grazie al quale è possibile indurre l'espressione di una molecola in un preciso momento temporale e seguire il suo destino nel tempo.

Nell'ultimo decennio l'introduzione dei *reporter* multicolore ha fortemente incrementato l'*output* di dati derivanti dalle analisi di *lineage tracing*. Tra i *reporter* multicolore maggiormente impiegati troviamo il sistema Confetti, chiamato anche Rainbow, sviluppato nel 2007 da Livet *et al* (180-182), e modificato da Clevers *et al.* che lo hanno semplificato a soli 4 colori (181). Questo *reporter* permette l'espressione casuale di uno tra quattro fluorofori: GFP (*Green Fluorescent Protein*), RFP (*Red Fluorescent Protein*), YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) e CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) grazie all'impiego di varianti incompatibili dei siti LoxP (LoxP e PLox) poste in maniera alternata con orientamento invertito ( $5' \rightarrow 3'$  e  $3' \rightarrow 5'$ ), dove i geni *reporter* sono posti *in tandem* tra tali siti con orientamento opposto ( $5' \rightarrow 3'$  e  $3' \rightarrow 5'$ ). In questo modo è possibile ottenere delle excisioni (se la Cre ricombinasi lega due siti LoxP) o delle inversioni di sequenza acidonucleica (se la Cre Ricombinasi lega un sito Loxp ed un PLox) mutualmente esclusive dei transgeni *reporter*, evento che forza le cellule ad acquisire in maniera stabile solo uno tra i 4 colori possibili (Figura 6) (180). La casualità di ricombinazione consente di marcare le cellule con differenti fluorofori, permettendo ai sistemi costruiti con il *reporter* Confetti di rendere evidenti in maniera univoca le espansioni clonali derivanti da

una singola cellula madre: queste appariranno difatti come *cluster* continui di cellule dello stesso colore (162,166).

Inoltre, poichè cellule adiacenti saranno presumibilmente e statisticamente marcate con differenti fluorofori, il transgene Confetti permette non solo lo studio di più cellule staminali nel contesto della nicchia di residenza, ma consente anche di disettare come differenti effetti posizionali all'interno della nicchia stessa possano influire sulla capacità differenziativa e sul destino di cellule staminali o progenitori, sia in condizioni fisiologiche che patologiche (165,181,182).

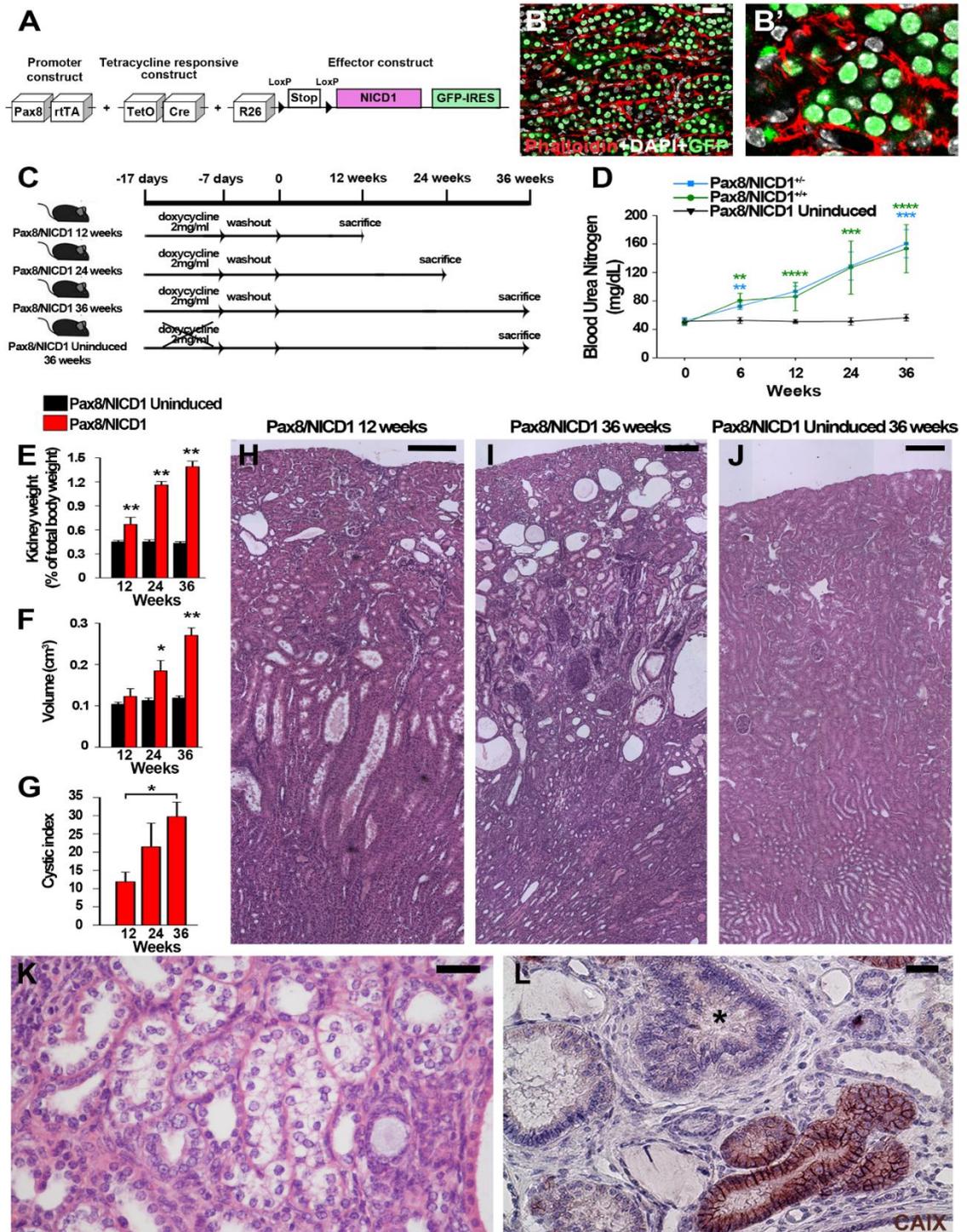


**Figura 6.** Rappresentazione schematica del sistema reporter Confetti. Al centro, il costrutto transgenico completo prima di eventi ricombinativi. In basso, le excisioni eliminano alcuni dei geni reporter portando la cellula verso una data colorazione. In alto, le inversioni si basano sui siti PLox e sono impiegate per invertire il costrutto, o parti di esso, così da favorire l'una o l'altra colorazione della cellula (la Cre ricombinasi inverte quei segmenti floxati tra due siti Lox posti con orientamento testa-a-testa). Sia i segmenti excisi che quelli invertiti possono continuare ad essere invertiti finché vi sia attività della Cre ricombinasi, dal momento in cui i siti LoxP sono rimossi dall'evento ricombinatorio, mentre i PLox no. Di conseguenza, questo sistema reporter necessita di modelli inducibili in quanto solo la rimozione dell'induttore è in grado di stabilizzare la colorazione di una data cellula. Estratta e modificata da: Lombardi D et al., Stem Cells Int., 2015.

### 1.8 Modello murino di RCC: il topo Pax8/NICD1

In uno studio antecedente a questa tesi, per verificare se l'overespressione di Notch1 potesse innescare tumorigenesi del RCC è stata creata la linea murina

transgenica *Pax8.rtTA;TetO.Cre;R26.NICD1.GFP* (Pax8/NICD1). Questa linea murina presenta una overespressione inducibile della porzione intracellulare del gene Notch1 (NICD1) nelle cellule epiteliali tubulari positive per Pax8 (Figura 7A,B). Gli animali sono stati valutati a 12, 24 e 36 settimane di distanza dall'induzione del transgene (Figura. 7C). Come osservato in studi precedenti, i livelli di azotemia (*blood urea nitrogen*, BUN) hanno rivelato un progressivo declino della funzione escretoria del rene nei topi Pax8/NICD1 indotti rispetto ai topi di controllo non indotti (Figura.7D). In particolare la presenza del transgene NICD1 in omozigosi o in eterozigosi non ha influenzato i livelli di BUN (Figura7D) suggerendo che la progressione della malattia renale cronica (*chronic kidney disease*, CKD) è indipendente da un ulteriore aumento dei livelli di NICD1. Pesi e volumi dei reni sono risultati significativamente più alti e aumentati nel tempo nei topi indotti Pax8/NICD1 (Figura7 E, F). L'analisi istologica ha rivelato lesioni non tumorali tra cui i cambiamenti cistici (Figura 7G), con o senza iperplasia epiteliale o sovrappollamento a singolo strato, nonché tumori (Figure 7H e 7I). In particolare, i reni dei topi Pax8 / NICD1 hanno sviluppato numerose lesioni papillari nella corteccia e nella porzione esterna della midollare esterna che sono aumentate in numero e complessità nel tempo (Figure 7H e 7I). È interessante notare che in alcuni topi sono state anche osservate aree di lesioni displastiche a cellule chiare (ccDLs; Figura 7K) positive per l'anidrasi carbonica IX (CAIX), mentre le lesioni papillari erano CAIX negative (Figura 7L). I topi di controllo Pax8/NICD1 non indotti non hanno sviluppato CKD, renomegalia o altre lesioni fino a 36 settimane di età (Figura 7J). Questi risultati suggeriscono che la overespressione di Notch nelle cellule epiteliali tubulari determina non solo la CKD, ma anche lesioni multiple tra cui RCC di tipo papillare.



**Figura 7.** *La overespressione di NICD1 nelle TEC induce tumori papillari, cCDL e CKD.*

(A) Schema raffigurante il modello di topo triplo transgenico Pax8.rTtA; TetO.Cre; R26.NICD1.GFP (Pax8/NICD1). (B) Immagine confocale rappresentativa della colorazione GFP (verde) in una sezione renale del topo Pax8/NICD1 indotto (n = 4). DAPI (bianco) contro i nuclei di contrasto. Falloidina (rosso) colora l'actina filamentosa (F-actina). Bar = 25  $\mu$ m. (B') Dettaglio di (B). (C) Schema sperimentale. (D) Misure di azotemia nel sangue (BUN) nel tempo in topi non indotti (n = 10) contro indotti (n = 26) Pax8/NICD1. Gli animali indotti sono stati ulteriormente divisi in Pax8/NICD1 +/- (n = 10) e Pax8/NICD1 +/+ (n = 5). I dati sono media  $\pm$  SEM. Il test di Mann-Whitney non è risultato significativo tra Pax8/NICD1 +/- e Pax8/NICD1 +/+ in ciascun punto temporale, il valore tra i topi non indotti e i topi Pax8/NICD1 +/- o Pax8/NICD1 +/+ sono indicati nel grafico, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001,

\*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Il significato statistico di ANOVA per confronti multipli tra i vari punti temporali indica un significato globale per entrambi i topi Pax8/NICD1 +/- ( $p < 0,0001$ ) e Pax8/NICD1 +/+ ( $p = 0,042$ ). (E) Peso del rene, espresso come percentuale del peso corporeo totale, di topi Pax8 / NICD1 non indotti verso gli indotti a 12, 24 e 36 settimane ( $n = 8$  per ciascun punto temporale e per ciascun gruppo). La significatività statistica è stata calcolata attraverso il test di Mann-Whitney tra i gruppi in ciascun punto temporale come indicato nei grafici. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . (F) Volume del rene in  $\text{cm}^3$  di topi Pax8 / NICD1 non indotti vs indotti a 12, 24 e 36 settimane ( $n = 8$  per ciascun punto temporale e per ciascun gruppo). La significatività statistica è stata calcolata dal test di Mann-Whitney tra i gruppi in ciascun punto temporale come indicato nei grafici. \*\*  $p < 0,01$ . (G) Indice cistico di topi Pax8/NICD1 indotti a 12, 24 e 36 settimane ( $n = 7$  a 12 settimane,  $n = 5$  a 24 e  $n = 5$  36 settimane). La significatività statistica è stata calcolata tramite ANOVA per confronti multipli con l'analisi post hoc di Bonferroni tra 12, 24 e 36 settimane. \*  $P < 0,05$ . (H, I) Immagini giustapposte di colorazione con ematossilina ed eosina (H & E) di sezioni renali di topi Pax8/NICD1 indotti a 12 settimane (H,  $n = 10$ ) e 36 settimane (I,  $n = 15$ ). Le frecce (in nero) indicano lesioni di natura proliferativa. Bar =  $75 \mu\text{m}$ . (J) giustapposizione di immagini H & E di sezioni renali di mouse Pax8/NICD1 non indotto a 36 settimane ( $n = 10$ ). Bar =  $75 \mu\text{m}$ . (K) Sezioni istologiche rappresentative di aree con cellule chiare con atipia severa. H & E Bar =  $25 \mu\text{m}$ . (L) Immagine rappresentativa di ccDL CAIX positiva (in marrone). L'asterisco indica un tumore papillare rappresentativo CAIX negativo. Bar =  $25 \mu\text{m}$ . I dati sono media  $\pm$  SEM.

## 2- PROPOSTA DI TESI

La lesione tissutale è un cofattore importante per molti tipi di cancro (183-185). Nel rene, alcuni studi epidemiologici hanno trovato un'associazione tra RCC e malattia renale cronica (CKD) (186-189). Tuttavia, i possibili legami patogenetici tra il danno tissutale e il RCC rimangono ancora da esplorare. Studi condotti su campioni di tessuti umani negli ultimi anni hanno suggerito che l'eterogeneità del RCC è elevata e hanno evidenziato il contributo fondamentale delle *pathways* correlate all'ipossia alla sua patogenesi (190,191). Tra l'82 e il 92% dei tumori a cellule chiare RCC (ccRCC) presentano inattivazione biallelica del gene Von Hippel-Lindau (VHL). Tuttavia, i topi con *knockout* di VHL in maniera specifica in cellule epiteliali renali non hanno sviluppato ccRCC (192) sostenendo che la formazione di ccRCC richiede altri fattori oltre alla delezione di VHL (193). Coerentemente, in studi recenti hanno generato ccRCC, aggiungendo l'iperattivazione di Notch ai topi *knockout* per VHL.

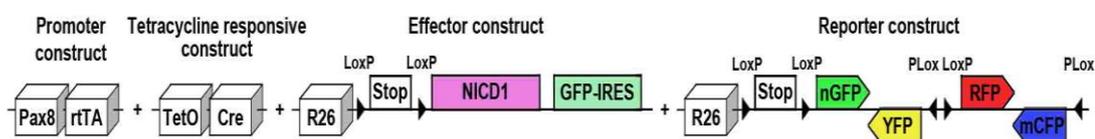
La pathway di Notch ha un ruolo critico nelle lesioni renali e nella riparazione (62,194-197), in particolare durante il danno renale acuto (AKI) (96,198), e l'iperpressione di Notch è stata riportata in pazienti con ccRCC (199,200) e pRCC (201,202). Il coinvolgimento di queste *pathway* nella patogenesi del cancro renale chiama in questione il ruolo del possibile episodio di AKI, in particolare quelli secondari al danno da ischemia-riperfusion (IRI) che coinvolgono anche l'iperattivazione di Notch, nella patogenesi del cancro renale.

Pertanto, per studiare la formazione di RCC e il ruolo dell'AKI nello sviluppo di RCC, abbiamo allestito un modello di topo transgenico condizionale che sviluppa tumori degli istotipi papillare e a cellule chiare ad alta frequenza, per consentire il *lineage tracing* e l'analisi clonale di RCC. Abbiamo pertanto ipotizzato che: 1. L'AKI può promuovere lo sviluppo di RCC attivando vie di segnalazione coinvolte nel danno e nella riparazione di cellule epiteliali tubulari. 2. differenti istotipi di RCC possono derivare da differenti sottotipi di cellule epiteliali tubulari.

### 3- MATERIALI E METODI

#### 3.1 Modeling degli animali transgenici

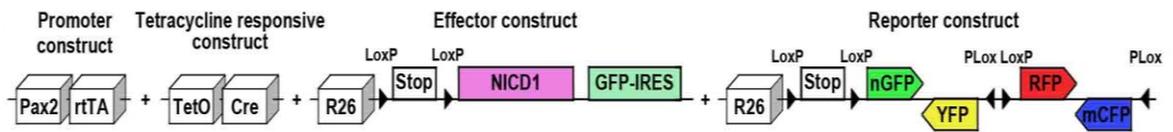
I topi Pax8.rtTA;TetO.Cre;R26.NICD1.GFP (Pax8/NICD1) e Pax8.rtTA;TetO.Cre;R26.Confetti (Pax8/Confetti) sono stati sviluppati nel background C57Bl/6 dall'incrocio di un topo Pax8.rtTA (B6.Cg-Tg(Pax8-rtTA2S\*M2)1Koes/J) con il ceppo TetO.Cre B6.Cg-Tg(TetO-Cre)1Jaw/J entrambi acquistati dalla Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). I topi doppio-transgenici sono stati quindi incrociati con il ceppo NICD1 Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1 (Notch1) Dam</sup> / J o con il ceppo Confetti Gt (ROSA) 26Sor<sup>tm1 (CAG-Brainbow2.1) Cle</sup> / J (entrambi dalla Jackson Laboratory), per ottenere un modello di topo inducibile triplo transgenico (Figura 7A). I topi Pax8/NICD1 sono stati ulteriormente incrociati con topi Pax8/Confetti per ottenere un modello di topo inducibile quadruplo transgenico (Pax8/NICD1/Confetti) (Figura 8). Da notare che i topi Pax8/NICD1/Confetti possono essere solo emizigoti per i transgeni NICD1 e Confetti, poiché entrambi sono stati inseriti nel locus ROSA26. I topi sono stati genotipizzati come riportato di seguito.



**Figura 8.** Schema del topo quadruplo transgenico Pax8.rtTA;TetO.Cre;R26.NICD1.GFP;R26.Confetti (Pax8/NICD1/Confetti).

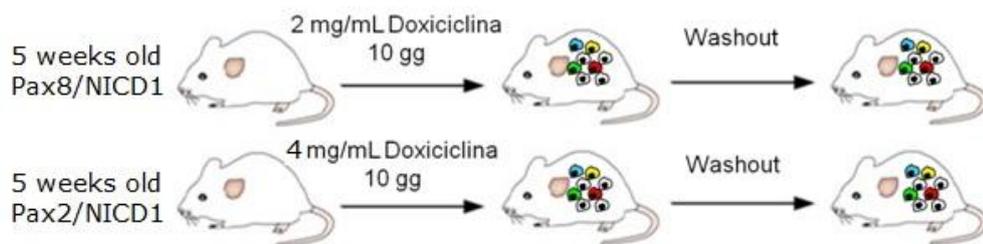
I topi Pax2.rtTA; TetO.Cre; R26.NICD1.GFP (Pax2/NICD1) e Pax2.rtTA; TetO.Cre; R26.Confetti (Pax2/Confetti) sono stati sviluppati nel background C57Bl/6 incrociando un topo Pax2.rtTA (159) (gentile donazione del Dr. Beat Schäfer, Dipartimento di oncologia e centro di ricerca per bambini, ospedale pediatrico universitario, Zurigo, Svizzera) con il ceppo TetO.Cre. I topi doppio-transgenici sono stati quindi incrociati con il ceppo NICD1 o con il ceppo Confetti, per ottenere un modello di topo triplo transgenico inducibile Pax2/NICD1 o Pax2/Confetti. I topi

Pax2/NICD1 sono stati ulteriormente incrociati con topi Pax2/Confetti per ottenere un modello di topo inducibile quadruplo transgenico (Pax2/NICD1/Confetti) (Figura 9). Di nota, i topi Pax2/NICD1/Confetti possono essere solo emizigoti per i transgeni NICD1 e Confetti, poiché entrambi sono stati inseriti nel locus ROSA26. I topi sono stati genotipizzati come riportato di seguito.



**Figura 9.** Schema del topo quadruplo transgenico *Pax2.rtTA;TetO.Cre;R26.NICD1.GFP;R26.Confetti* (*Pax2/NICD1/Confetti*).

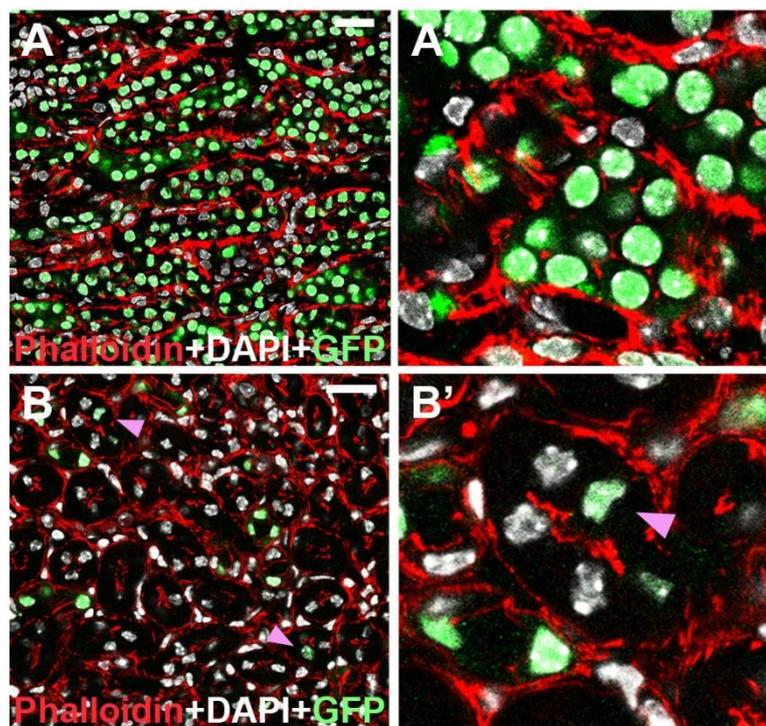
La ricombinazione genica del reporter è stata indotta a 5 settimane di età mediante somministrazione di 2 mg/ml (per i topi Pax8) o 4 mg/ml (per i topi Pax2) di doxiciclina iclato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparata in acqua da bere con aggiunta di saccarosio al 2,5% (Sigma-Aldrich) per 10 giorni, seguiti da una settimana di *washout* (Figura 10).



**Figura 10.** Schema di induzione e attivazione del transgene nel modello murino mediante somministrazione di doxiciclina iclato.

L'induzione degli animali che possiedono il transgene NICD1 porta all'espressione di una porzione intracellulare del gene Notch1 del topo (NICD1), ma priva del dominio PEST al C-terminale, e di una proteina verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP), la cui espressione è localizzata a livello del nucleo. L'espressione della

GFP non può essere rilevata mediante microscopia confocale senza colorazione con un anticorpo anti-GFP. Il frammento citoplasmatico troncato codificato dalla sequenza Notch1 causa una segnalazione costitutiva. Al fine di verificare l'effettiva attivazione dei transgeni e la successiva espressione delle proteine NICD1 e GFP, abbiamo colorato sezioni di rene di topi Pax8/NICD1 o Pax2/NICD1 con un anticorpo anti-GFP (Figura 11A). Nei topi Pax8/NICD1, abbiamo osservato che le TEC esprimevano alti livelli di GFP, mentre le cellule interstiziali rimanevano negative (Figura 11A). Nei topi Pax2/NICD1 abbiamo osservato cellule positive nella capsula di Bowman e disperse nei tubuli, coerentemente con la loro distribuzione cellulare (157) (Figura 11B).



**Figura 11.** Immagine confocale rappresentativa della colorazione GFP (verde). (A) Una sezione renale di topo Pax8 / NICD1 indotto (n=4). DAPI (bianco) controcolora i nuclei. Falloidina (rosso) colora l'actina filamentosa. Bar = 25  $\mu$ m. (A') Dettaglio di A. (B) Una sezione renale di topo Pax2 / NICD1 indotto (n=6). Falloidina (rosso) colora l'actina filamentosa (F-actina). DAPI (bianco) controcolora i nuclei. La freccia (rosa) indica le RPC GFP + Pax2 +. Bar = 25  $\mu$ m. (B') Dettaglio di (B).

Il *reporter* Confetti, in seguito all'induzione, ha permesso la marcatura stocastica delle cellule mediante ricombinazione permanente di un singolo gene codificante un colore (proteine fluorescenti rosse, gialle, verdi o blu, RFP, YFP, GFP o CFP), con

cellule GFP presenti ad una frequenza più bassa rispetto agli altri colori ed estremamente rare (159,181). Questa tecnica ci ha permesso di valutare la composizione clonale delle lesioni, dal momento che tutte le cellule marcate passeranno la loro proteina fluorescente alla loro progenie (159).

Dopo l'induzione, i topi sono stati lasciati invecchiare e sono stati sacrificati a 4, 12, 24 e 36 settimane dalla fine del periodo di *washout* (n = 4 per i topi Pax8/NICD1 e Pax8/NICD1/Confetti sacrificati a 4 settimane, n = 10 a 12 settimane, n = 8 a 24 settimane, n = 15 a 36 settimane, n = 4 per Pax8/Confetti e n = 6 Pax8/NICD1/Confetti sacrificati a 36 settimane). Gli animali Pax8/NICD1 non indotti sono stati usati come controllo e sono stati sacrificati a 36 settimane. Essi non hanno mostrato né perdita di espressione né un'espressione aspecifica del transgene (n = 10).

I topi indotti Pax2 / NICD1 di controllo non trattati sono stati sacrificati 4 settimane dopo la fine del periodo di induzione (n = 6).

Ulteriori topi sono stati indotti con doxiciclina per 10 giorni, mantenuti in un periodo di *washout* di 1 settimana prima di subire un danno da ischemia/riperfusion (IRI) e sono stati sacrificati 28 giorni dopo (n = 9 per i Pax8/NICD1 non indotti, n = 11 per i Pax8/NICD1, n = 4 per Pax8/Confetti, n = 5 per i Pax8/NICD1/Confetti, n = 4 per i Pax2/Confetti, n = 7 per i Pax2/NICD1, n = 4 per i Pax2/NICD1 non indotti, e n = 5 per i Pax2/NICD1/Confetti).

Non è stata osservata alcuna differenza di genere nell'estensione dello sviluppo del tumore, quindi maschi e femmine sono stati raggruppati per l'analisi. Tuttavia, poiché i topi femmina tollerano molto di più l'IRI rispetto ai maschi, solo i maschi sono stati utilizzati per gli esperimenti di IRI.

### **3.2 Genotipizzazione**

Biopsie di coda sono state incubate per una notte a 55 ° C nel reagente di lisi (1M TrisHCl pH 8,5, 0,5 M EDTA, 20% SDS, 4 M NaCl, 0,1 mg/ml proteinasi K neutralizzato con TrisHCl 40 mM, tutto da Sigma-Aldrich), centrifugato e il DNA è

stato estratto usando isopropanolo (Sigma-Aldrich). I *primer* e i parametri di PCR per il relativo ceppo acquistato sono stati ottenuti dal sito internet della Jackson Laboratory. Per distinguere la presenza dei transgeni Pax2.rtTA, Pax8.rtTA e TetO.Cre in omo- o in eterozigosi sono state eseguite analisi di qRT-PCR utilizzando 5 ng / ml di DNA genomico con il Master LightCycler® 480 SYBR Green I (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Svizzera). Le reazioni sono state eseguite utilizzando un LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) con un programma costituito da 40 cicli, ciascuno costituito da una fase di inizio a 95 °C per 15 ", fase di annealing a 60 °C per 45" e fase di amplificazione a 72 °C per 60 ". Sono stati utilizzati i seguenti *primer*:

Pax2.rtTA e Pax8.rtTA *forward* 5'-AACGCACTGTACGCTCTGTC-3 'e *reverse* 5'-GAATCGGTGGTAGGTGTCTC-3'; TetO.Cre *forward* 5'-TCGCTGCATTACCGGTCGATGC-3 'e *reverse* 5'-CCATGAGTGAACGAACCTGGTCG-3'. Il DNA genomico per TCR $\alpha$  è stato utilizzato come gene *housekeeping* per la quantificazione relativa ed è stato amplificato utilizzando i *primer forward* 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3 e *reverse* 5'-GTCAGTCGAGTGACAGTTT-3.

### **3.3 Raccolta dei tessuti murini**

Tutti gli animali sono stati pesati prima del sacrificio in camera a CO<sub>2</sub>; i reni sono stati raccolti, misurati e pesati.

Per l'analisi istologica, i reni sono stati conservati in formalina tamponata al 4% per tutta la notte a temperatura ambiente, disidratati e poi inclusi in paraffina. Per ogni rene sono state effettuate sezioni di 4-7  $\mu$ m di spessore e sono state preparate per la colorazione con ematossilina ed eosina (H & E). Per l'analisi confocale, i reni sono stati incubati in paraformaldeide al 4% (PFA, Sigma-Aldrich) in PBS (Sigma-Aldrich) per 2 ore a 4 °C, quindi immersi in una soluzione di saccarosio al 15% in PBS per 2 ore a 4 °C e, successivamente, in una soluzione di saccarosio al 30% in PBS per tutta la notte a 4 °C, e infine congelati.

### **3.4 Analisi istologica**

Sezioni del piano sagittale del rene sono state colorate con ematossilina (Bio Optica Milano Spa, Italia) e eosina (Eosina giallastra, Certistain, Millipore, Darmstadt, Germania) seguendo le linee guida del produttore. Le immagini sono state acquisite utilizzando il sistema di *imaging* cellulare EVOS XL (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), con un obiettivo 60x o 40x (dettagli) o un obiettivo 20x (intere sezioni).

### **3.5 Immunofluorescenza e microscopia confocale**

La microscopia confocale è stata eseguita su sezioni di 10 µm di tessuti renali utilizzando un microscopio confocale Leica SP5 AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) dotato di un laser a due fotoni Chameleon Ultra-II (Coherent, Milano, Italia). Abbiamo usato entrambi gli obiettivi 25x e 63x.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-GFP (pAb, Life Technologies, Monza, Italia) e anti-anidrasi carbonica IX (pAb, ThermoFisher Scientific). Gli anticorpi secondari Alexa-Fluor sono stati ottenuti da Molecular Probes (Life Technologies). Per il rilevamento dei tubuli è stata eseguita la colorazione con falloidina Alexa Fluor 633 (Molecular Probes). Per i topi con il *reporter* Confetti, l'acquisizione è stata impostata nelle lunghezze d'onda ciano, verde, giallo e rosso utilizzando rispettivamente lunghezza d'onda di eccitazione di 405, 488, 514 e 543 nm. I nuclei sono stati controcolorati con DAPI (Life Technologies) eccitato con laser multifotone a 689 nm.

### **3.6 Immunoistochimica**

Le colorazioni immunoistochimiche (IHC) sono state eseguite seguendo protocolli standard. I tessuti paraffinati sono stati tagliati in sezioni da 5 µm, sparaffinati e reidratati. Il recupero dell'antigene è stato eseguito utilizzando un tampone di citrato di sodio [citrato di sodio 10 mM, pH 6.0]. Dopo 30 minuti di preincubazione

con siero di cavallo (kit Vectastain ABC, Vector Laboratories, DBA, Milano, Italia), le sezioni sono state incubate per 30 minuti con l'anticorpo primario (anti-CAIX Ab (Life Technologies)), poi con l'anticorpo secondario biotinilato, un'incubazione di 30 minuti in una soluzione di perossido di idrogeno-metanolo allo 0,3% per neutralizzare l'attività della perossidasi endogena, quindi il complesso avidina-biotina-perossidasi (kit Vectastain ABC). 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC; Vector) è stato usato come substrato della perossidasi. Infine, le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Carazzi (Bio-Optica Milano SpA, Milano, Italia) e montate con gelatina di glicerina di Kaiser (Merck, Darmstadt, Germania). Come controllo negativo, l'mAb primario è stato sostituito con un anticorpo corrispondente all'isotipo con specificità irrilevante.

### **3.7 Analisi della frequenza dei cloni**

Il numero di cloni che formano ciascuna lesione tumorale è stato conteggiato nei topi Pax8/NICD1/Confetti e Pax2/NICD1/Confetti e riportato come percentuale di lesioni formate da 1, 2 o più di 3 cloni rispetto al numero totale di lesioni (n = 6 per i topi Pax8/NICD1/Confetti di 36 settimane, n = 5 per i topi Pax8/NICD1/Confetti IRI, n = 5 per i topi Pax2/NICD1/Confetti IRI). Un totale di 10 campi per ciascun topo sono stati analizzati da due osservatori indipendenti.

### **3.8 Danno renale da ischemia / riperfusione (IRI)**

Tutti i topi sottoposti a IRI erano omozigoti per il promotore Pax8 o Pax2 ed emizigoti per il transgene effettore NICD1 (n = 9 per i Pax8/NICD1 non indotti, n = 11 per i Pax8/NICD1, n = 4 per i Pax8/Confetti, n = 5 per i Pax8/NICD1/Confetti, n = 4 per i Pax2/Confetti, n = 7 per i Pax2/NICD1, n = 4 per i Pax2/NICD1 non indotti, e n = 5 per i Pax2/NICD1/Confetti,).

I topi sono stati anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di ketamina (100 mg/kg, Ketavet, Intervet Productions Srl, Aprilia, Italia) / xilazina (10 mg/kg, Xilor, Bio98 Srl, Milano, Italia), che ha prodotto un'anestesia chirurgica a breve termine

con una buona analgesia. Gli animali sono stati tenuti caldi utilizzando una camera di riscaldamento ventilata a 37 °C prima dell'intervento e la loro temperatura corporea è stata costantemente monitorata mediante una sonda rettale e mantenuta tra 36,5°C e 37 °C (159). Per l'operazione il topo è stato posizionato su una stazione termostatica disteso sul lato destro, rasato e disinfettato con Povidone-iodio ed è stata eseguita un'incisione di 1-1,5 cm sul lato sinistro della pelle, quindi lo strato muscolare sottostante è stato tagliato e aperto. Il rene sinistro è stato quindi esternalizzato e l'arteria renale è stata clampata per bloccare il flusso di sangue al rene e provocare l'ischemia. La durata dell'ischemia renale inizia dal momento del clampaggio. Dopo la verifica del viraggio di colore dal rosso al viola scuro, indicativo di ischemia, il rene è stato riposizionato nella cavità addominale e l'animale è stato rimesso nella camera di riscaldamento ventilata. L'ischemia è durata 30 minuti, dopo di che la pinza è stata rimossa per permettere la riperfusione, indicata dal cambiamento di colore del rene di nuovo verso il rosso. Lo strato muscolare è stato suturato, seguito dalla chiusura della ferita della pelle con clip metalliche. Immediatamente dopo la chiusura della ferita, all'animale è stato somministrato 0,5 ml di soluzione salina sterile calda (NaCl 0,9%) per via sottocutanea per reidratarlo (159).

### **3.9 Misura transcutanea della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) nei topi coscienti**

I topi sono stati assegnati in maniera casuale a entrambi i gruppi (n = 9 topi IRI Pax8/NICD1 non indotti, n = 9 topi IRI Pax8/NICD1 per la Figura 13B; n = 3 topi IRI Pax2/NICD1 non indotti, n = 3 topi IRI Pax2/NICD1 per Figura 17D) e sono stati anestetizzati con isoflurano. Gli animali sono stati quindi rasati sul collo per permettere l'alloggio, tramite nastro biadesivo di un dispositivo di registrazione dell'immagine miniaturizzato costituito da due diodi che emettono luce, un fotodiode e una batteria (Medibeacon GmbH, Mannheim, Germania). Per la durata della registrazione (circa 2 ore), ogni animale era cosciente ed è rimasto da solo in una gabbia. Il segnale di fondo è stato registrato per 5 minuti prima dell'iniezione

endovenosa di 150 mg/kg di FITC-sinistrina (Fresenius Kabi Italia S.r.l., Isola della Scala, Italia). Dopo aver rimosso il dispositivo di immagine, i dati sono stati estratti con il software MPD Lab, quindi analizzati utilizzando il software MPD Studio (Medibeacon GmbH). Il valore di GFR [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ] è stato calcolato in base alla diminuzione dell'intensità della fluorescenza nel tempo (es. Emivita plasmatica di FITC-sinistrina) utilizzando un modello cinetico a 3 compartimenti con una *baseline* modulata, il peso corporeo dell'animale e un fattore di conversione empirico (159).

Gli esperimenti sugli animali sono stati approvati dall'Ente di revisione istituzionale e dal Ministero della salute italiano e sono stati eseguiti in conformità con le linee guida istituzionali, regionali e statali e in conformità con la Guida per la cura e l'uso degli animali da laboratorio. I topi erano alloggiati in una specifica struttura priva di agenti patogeni, con libero accesso a cibo e acqua e un ciclo giorno/notte di 12 ore.

### **3.10 Analisi statistica**

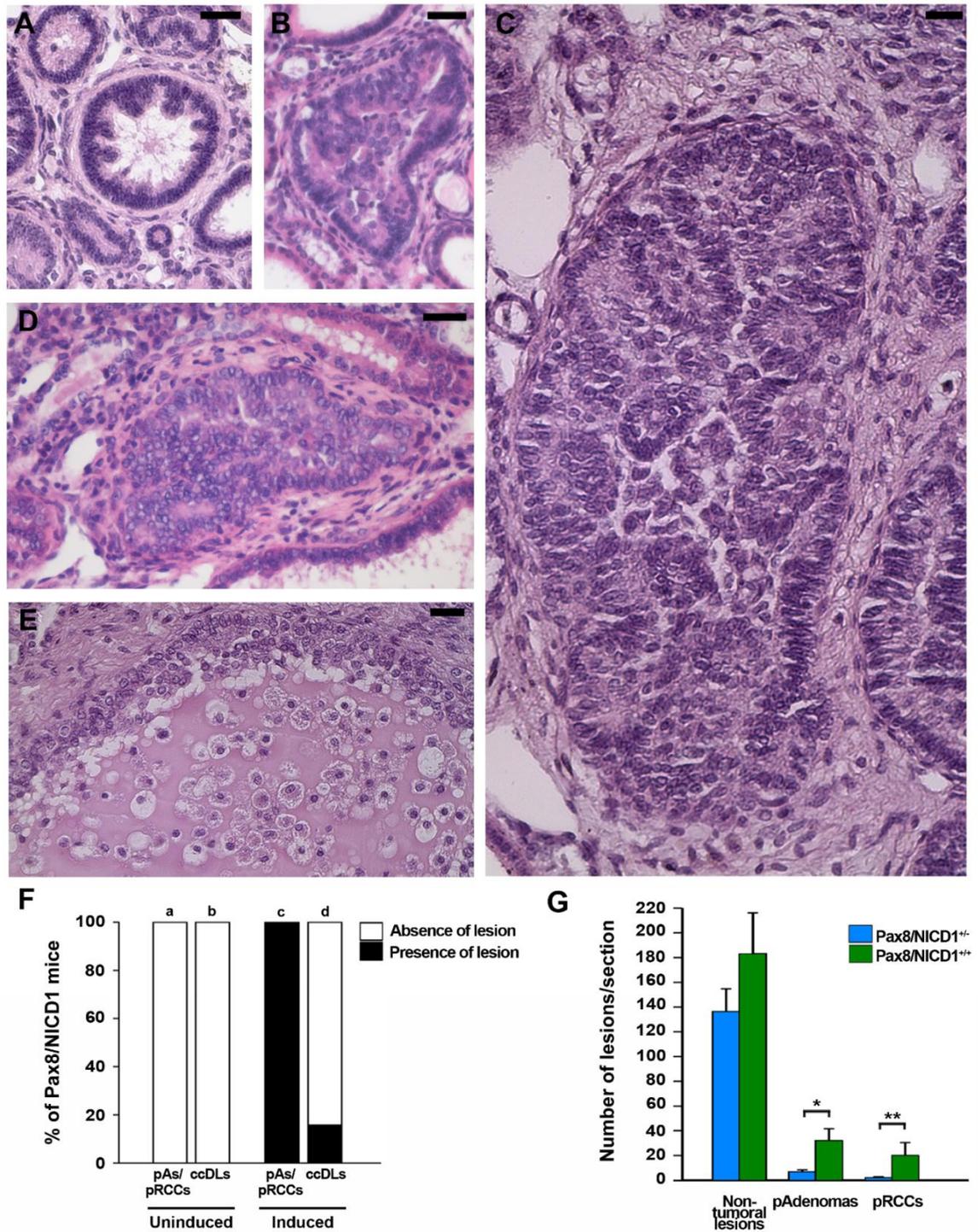
I risultati dello studio sugli animali sono stati espressi come media  $\pm$  SEM. Il confronto tra i gruppi è stato effettuato dal test di Mann-Whitney, o attraverso l'analisi della varianza per confronti multipli (ANOVA per misure ripetute) con l'analisi post hoc di Bonferroni, o con il test esatto di Fischer (*p-value* a due code).

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software statistico OriginPro 2017 (Northampton, MA). Un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## 4- RISULTATI

### 4.1 L'overespressione dose-dipendente di NICD1 induce lo sviluppo di tumori papillari di tipo 2.

Come descritto nell'introduzione, l'analisi istologica effettuata su reni di topi *Pax8.rtTA;TetO.Cre; R26.NICD1.GFP* (Pax8/NICD1) a 12, 24 e 36 settimane di distanza dall'induzione del transgene ha messo in evidenza lesioni di tipo tumorale e non tumorale, in particolare dei carcinomi papillari (vedi Figura 7). Gli adenomi papillari e i carcinomi papillari possono essere suddivisi in quelli di tipo 1 e di tipo 2 in base alla loro citomorfologia. Nei topi Pax8/NICD1 le lesioni tumorali si presentano con papille ricoperte da cellule con abbondante citoplasma con granuli eosinofili, con nucleoli prominenti associati ad aree di necrosi, suggerendo il sottotipo istologico 2 (eosinofilo) (Figura 12 A-D). Inoltre, l'accumulo focale di macrofagi nello stroma degli steli papillari, un segno istologico altamente specifico del pRCC, è stato ampiamente osservato nei tumori papillari dei topi Pax8/NICD1 (Figura 12E). Mentre le lesioni non papillari, come le lesioni ccDLs CAIX positive, sono state osservate solo nel 15.79% dei topi a 24 e 36 settimane (Figura 12F), il 100% dei topi presentava tumori papillari di tipo 2 a 24 e 36 settimane (Figura 12F), così come CKD e fibrosi. I tumori papillari di tipo 2 erano osservati in tutti i topi dopo le 24 settimane, indipendentemente dalla presenza del transgene NICD1 in emizigosi o in omozigosi. Comunque, il numero delle lesioni in ogni topo era fortemente influenzato dal genotipo (Figura 12G). Infine gli animali omozigoti per il transgene NICD1 hanno significativamente più adenomi papillari di tipo 2 e RCC e ciò suggerisce che i più alti livelli di NICD1 a livello di singola cellula siano critici per lo sviluppo di tumori papillari di tipo 2 (Figura 12G). Questi risultati suggeriscono che la overespressione di Notch è in grado di promuovere lo sviluppo di adenomi papillari di tipo 2 e pRCC in maniera dose-dipendente.



**Figura 12.** L'overespressione di NICD1 induce tumori papillari di tipo 2 in modo dose-dipendente

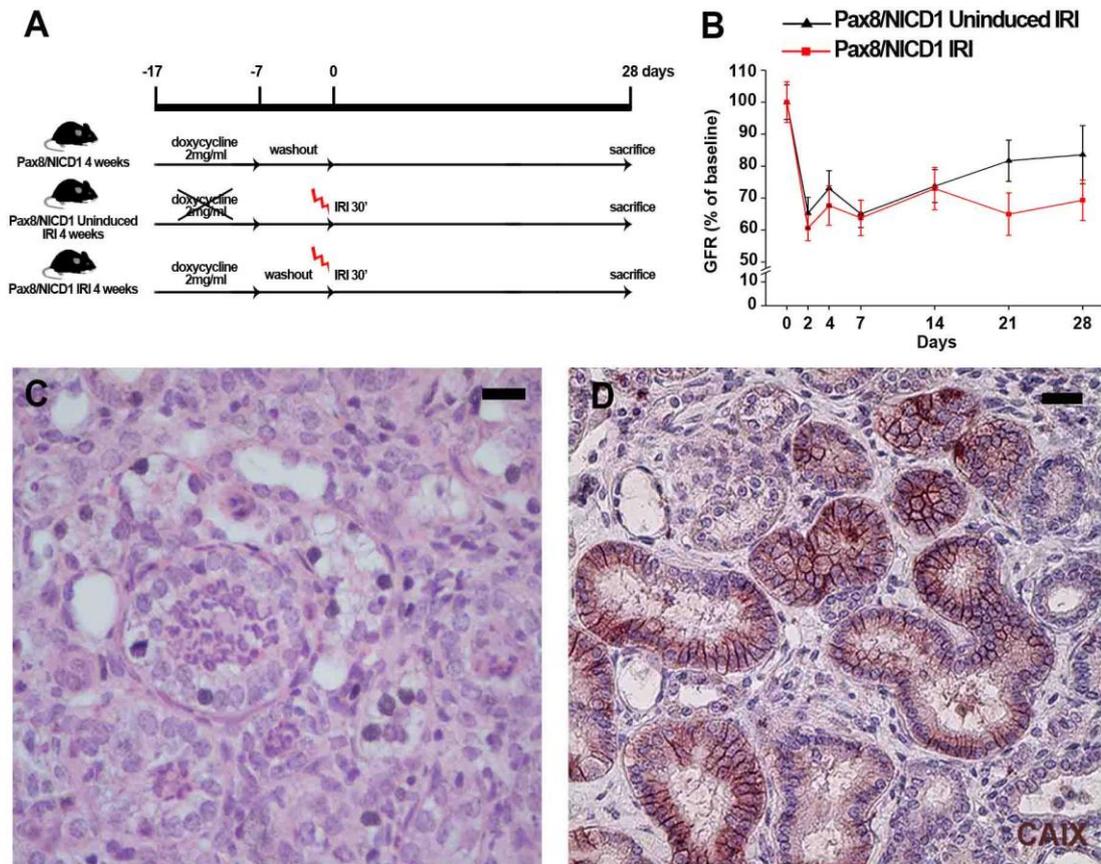
(A) Immagine istologica rappresentativa di adenoma papillare con colorazione ematossilina-eosina. Bar=25  $\mu$ m. (B) Immagine istologica rappresentativa di una lesione con un'architettura adenomatosa e caratteristiche citologiche di carcinoma.. Bar=25  $\mu$ m. (C, D) Immagini istologiche rappresentative di carcinoma papillare. Bars=25  $\mu$ m. (E) Immagine istologica rappresentativa con colorazione ematossilina-eosina di macrofagi schiumosi all'interno di una lesione papillare. Bar=25 $\mu$ m. (F) Percentuale di topi Pax8/NICD1 indotti (n=16-19) e non indotti (n=10) che presentano adenomi papillari, pRCCs (pAs/pRCCs) e lesioni ccDLs a 24-36 settimane. Il potere statistico per i gruppi indotti rispetto a quelli non indotti è stato valutato utilizzando il test esatto di Fisher: a vs. c p = 0,0001, b vs.

d non significativo. (G) Quantificazione delle lesioni proliferative in topi Pax8/NICD1 a 24-36 settimane. Gli animali sono stati divisi in Pax8/NICD1<sup>+/-</sup> (n=10) o Pax8/NICD1<sup>+/+</sup> (n=6). I dati sono media±SEM. Il significato statistico è stato calcolato mediante il test di Mann-Whitney. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

#### **4.2 L'AKI promuove lo sviluppo di tumori papillari di tipo 2 nel topo**

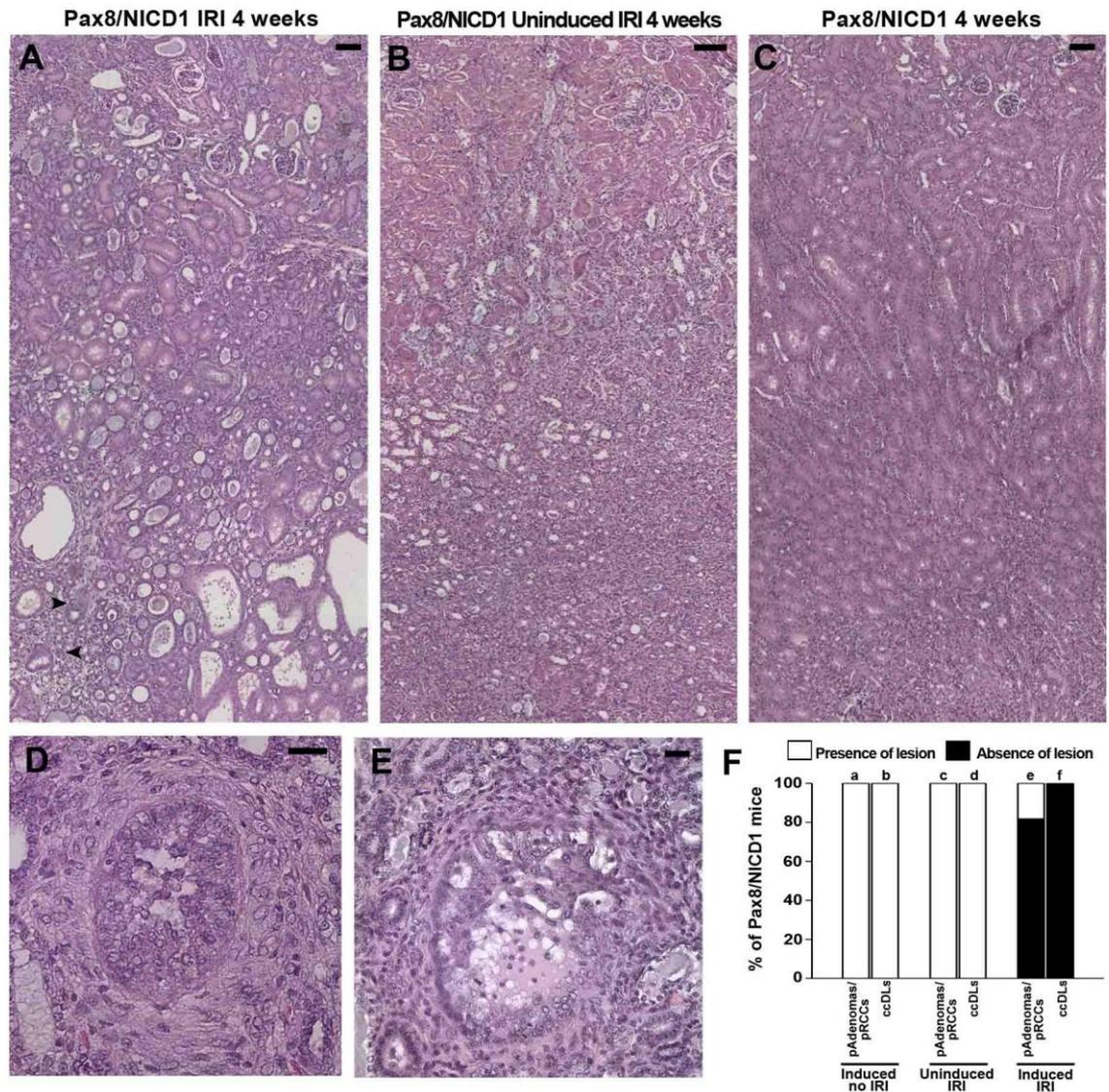
Dal momento che l'espressione di Notch1 raggiunge livelli elevati durante la risposta del rene al danno renale acuto (94,95), ci siamo chiesti se l'AKI potesse agire come un fattore di rischio per lo sviluppo del tumore. Per valutare questa ipotesi abbiamo effettuato un danno da ischemia-riperfusion (IRI) unilaterale in topi Pax8/NICD1 indotti e non indotti (Figura 13A). La misurazione della velocità di filtrazione glomerulare (*glomerular filtration rate*, GFR) in seguito ad IRI ha rivelato un rapido declino che dura fino a 7 giorni dopo l'IRI, seguito poi dal recupero della GFR in entrambi i gruppi (Figura 13B).

Aver indotto l'AKI ha accelerato la formazione delle lesioni nei topi Pax8/NICD1 indotti, mentre i topi non indotti che hanno subito AKI non hanno mostrato lesioni (Figura 14A,B). Dopo solo 4 settimane questi topi hanno mostrato lo stesso spettro di lesioni osservato nei topi Pax8/NICD1 senza AKI non prima di 12 settimane (Figura 14A,C). In particolare, i topi Pax8/NICD1 con AKI hanno rapidamente sviluppato CKD (Figura 13B), cisti, adenomi papillari di tipo 2 e pRCC (Figura 14D), così come numerose ccDLs (Figura 13C), come confermato dalla positività alla CAIX (Figura 13D). Inoltre nelle lesioni papillari erano presenti macrofagi schiumosi (Figura 14E). Da notare che quasi tutti i topi indotti sottoposti a IRI hanno sviluppato adenomi papillari o pRCC, mentre nessuno dei topi non indotti di controllo di pari età ha riportato lesioni di questo tipo (81,82% vs 0%, p = 0,0048 dal test esatto di Fisher, Figura 14F). Inoltre, il 100% dei topi presentava ccDL 4 settimane dopo l'IRI, in contrasto con nessuno dei controlli non indotti di pari età (Figura 14F) o con i topi Pax8/NICD1 senza AKI (Figura 12F). Questi risultati definiscono quindi l'AKI come un fattore che promuove più tipi di lesioni indotte da Notch, inclusi i tumori papillari di tipo 2.



**Figura 13.** L'AKI promuove lo sviluppo di ccDLs.

(A) Schema sperimentale. (B) Misurazione della GFR in topi Pax8/NICD1 non indotti e indotti in seguito a IRI (n=9 for each group). I dati sono media $\pm$ SEM. Il test di Mann-Whitney tra gruppi ad ogni intervallo di tempo è risultato non significativo. Il significato statistico tramite ANOVA per confronti multipli tra i vari punti temporali indica un significato globale sia per i topi non indotti (p=0.001) che per quelli indotti (p=0.0003). (C) Immagine istologica rappresentativa con colorazione ematossilina-eosina di ccDL. Bar=25  $\mu$ m. (D) Colorazione rappresentativa di lesioni ccDL CAIX positive (marrone). Bar=25  $\mu$ m.

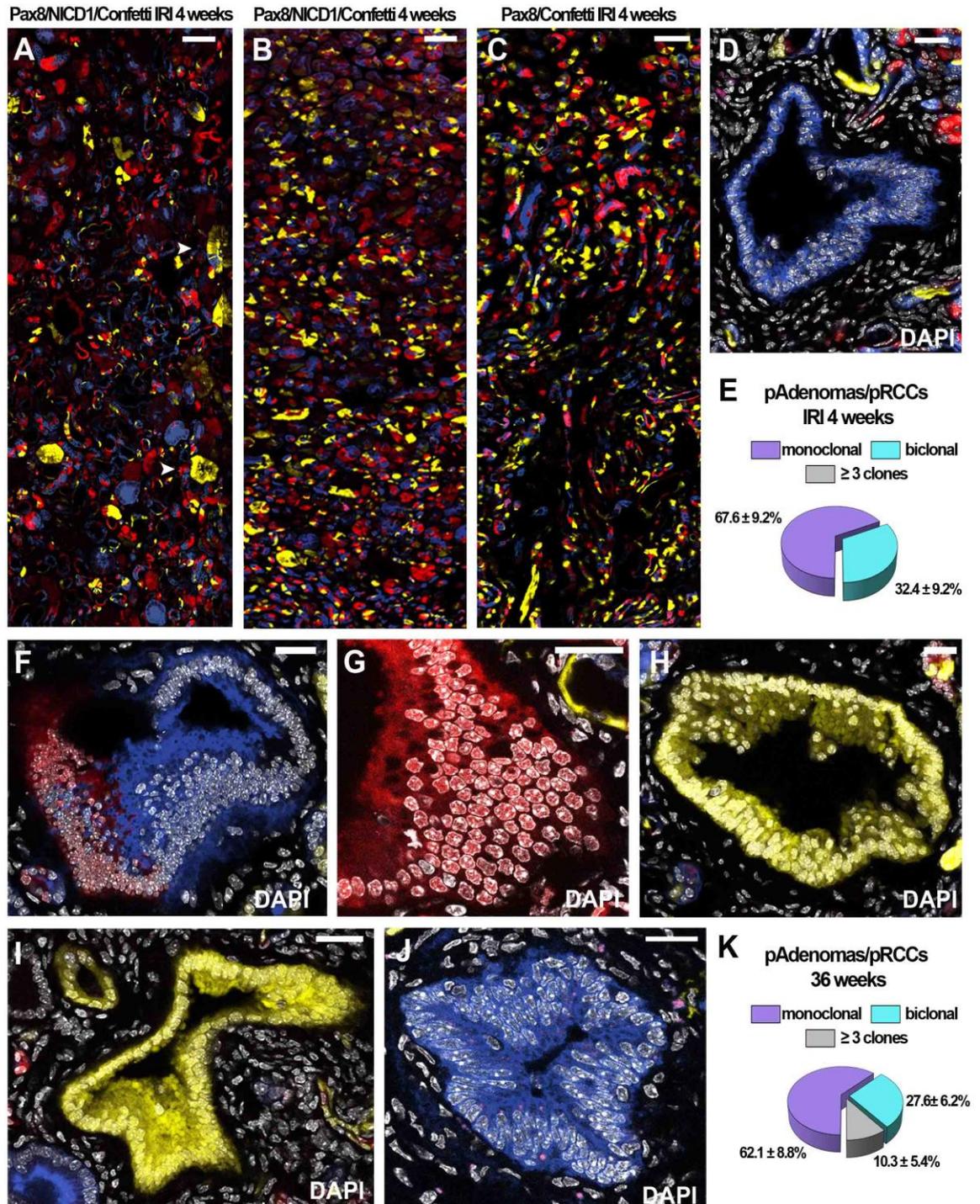


**Figura 14.** L'AKI promuove lo sviluppo di tumori papillari di tipo 2 nel topo.

(A) Giustapposizione di immagini H & E di reni di topi Pax8/NICD1 indotti, 4 settimane dopo IRI (n = 11). Bar = 75  $\mu$ m. Le frecce (nere) indicano lesioni di natura proliferativa. (B) Giustapposizione di immagini H & E di reni topi Pax8/NICD1 non indotti, 4 settimane dopo IRI (n = 5). Bar = 75  $\mu$ m. (C) Immagini H & E giustapposte di reni di topi Pax8 / NICD1 a 4 settimane (n = 4). Bar = 75  $\mu$ m. (D, E) Immagini istologiche rappresentative con colorazione H & E di tumori papillari presenti nei topi Pax8/NICD1 4 settimane dopo IRI. In (E), presenza di macrofagi schiumosi all'interno di un tumore papillare. Bar = 25 micron. (F) Percentuale di topi Pax8/NICD1 indotti a 4 settimane (n = 4), topi Pax8/NICD1 IRI a 4 settimane non indotti (n = 5) o indotti (n = 11) con lesioni tumorali. Il potere statistico è stato valutato utilizzando il test esatto di Fisher: a vs. e p = 0,011, c vs e p = 0,0048, b vs f p = 0,0015, d vs f p = 0,0002.

### 4.3 I tumori papillari di tipo 2 originano a seguito dell'espansione clonale di un subset di TEC

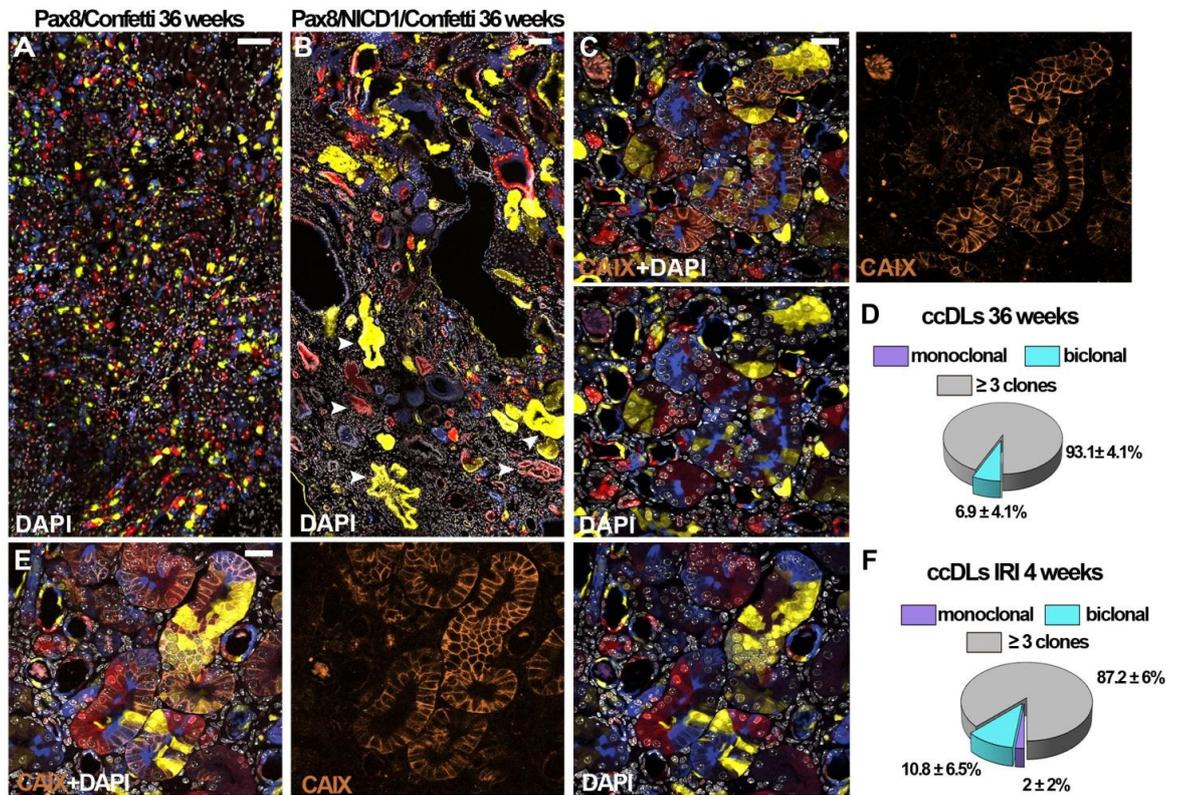
Per studiare l'origine dei tumori papillari di tipo 2 abbiamo valutato la composizione clonale dei differenti istotipi tumorali con un approccio di *lineage tracing* utilizzando il *reporter* Confetti. Per etichettare stocasticamente le cellule epiteliali tubulari (TEC), che overesprimono NICD1 con differenti fluorocromi a livello di singola cellula, abbiamo generato la linea murina *Pax8.rtTA;TetO.Cre;R26.NICD1.GFP;R26.Confetti* (*Pax8/NICD1/Confetti*) (Figura 8) e abbiamo indotto IRI dopo un periodo di *washout*. I topi *Pax8/NICD1/Confetti* ischemizzati a 4 settimane hanno sviluppato lesioni tumorali identiche ai topi *Pax8/NICD1* ischemizzati riportati sopra (Figura 15A), mentre nessuno dei topi *Pax8/NICD1/Confetti* che non ha subito IRI (Figura 15B), o dei topi *Pax8/Confetti* ischemizzati a 4 settimane, ha riportato lesioni (Figura 15C). Di nota, a 4 settimane i topi di *Pax8 /Confetti* ischemizzati hanno rivelato l'espansione clonale di alcune TEC nella porzione esterna della midollare esterna, rigenerando diversi segmenti tubulari, come recentemente descritto nello stesso modello sperimentale (159) (Figura 15C). Sorprendentemente, la maggior parte degli adenomi papillari di tipo 2 e dei pRCC erano costituiti da cellule di un singolo colore, il che implica che questi tumori si sono formati dall'amplificazione clonale di singole cellule (Figura 15D). Infatti, l'analisi clonale ha rivelato che tutti i tumori papillari erano mono- o biclonali (Figura 15E). I topi IRI *Pax8/NICD1/Confetti* presentavano in media  $2 \pm 0,63$  adenomi papillari e  $0,4 \pm 0,24$  pRCC per sezione, mentre questi tumori erano completamente assenti nei topi che non avevano subito IRI. Come ulteriore conferma, oltre l'80% degli adenomi papillari e dei pRCC che si sono sviluppati spontaneamente nei topi *Pax8/NICD1/Confetti* a 36 settimane erano mono- o biclonali ed erano per lo più localizzati nella midollare esterna (Figura 15F-K e Figura 16 A, B). Al contrario, le aree di immunoreattività di CAIX erano policlonali, sia a 4 settimane dopo l'IRI che a 36 settimane (Figura 16C-F). Questi risultati suggeriscono che i tumori papillari di tipo 2 hanno origine dall'amplificazione clonale di singole TEC.



**Figura 15.** La proliferazione clonale di un sottogruppo di TEC genera tumori papillari di tipo 2 nel topo.

(A) Immagini confocali giustapposte di reni di topi Pax8/NICD1/Confetti 4 settimane dopo IRI (n = 5). Bar = 75  $\mu$ m. Le frecce (bianche) indicano lesioni di natura proliferativa. (B) Immagini confocali giustapposte di reni di topi Pax8/NICD1/Confetti a 4 settimane (n = 4). Bar = 75  $\mu$ m. (C) Immagini confocali giustapposte di reni di topi Pax8/Confetti 4 settimane dopo IRI (n = 4). Bar = 75  $\mu$ m. (D) Tumore papillare rappresentativo da reni di topo Pax8/NICD1/Confetti 4 settimane dopo IRI. Bar = 25  $\mu$ m.

(E) Analisi della frequenza dei cloni nei tumori papillari dei topi Pax8/NICD1/Confetti 4 settimane dopo IRI (n = 5). (F-J) Tumori papillari rappresentativi da reni di topi Pax8/NICD1/Confetti a 36 settimane. In (G), dettaglio delle atipie nucleari. Bar = 25  $\mu$ m. (K) Analisi della frequenza dei cloni nei tumori papillari, nei topi Pax8/NICD1/Confetti a 36 settimane (n = 6). Il DAPI contrasta i nuclei. I dati sono media  $\pm$  SEM



**Figura 16.** Lesioni ccDLs derivano dalla proliferazione policlonale di molteplici TECs.

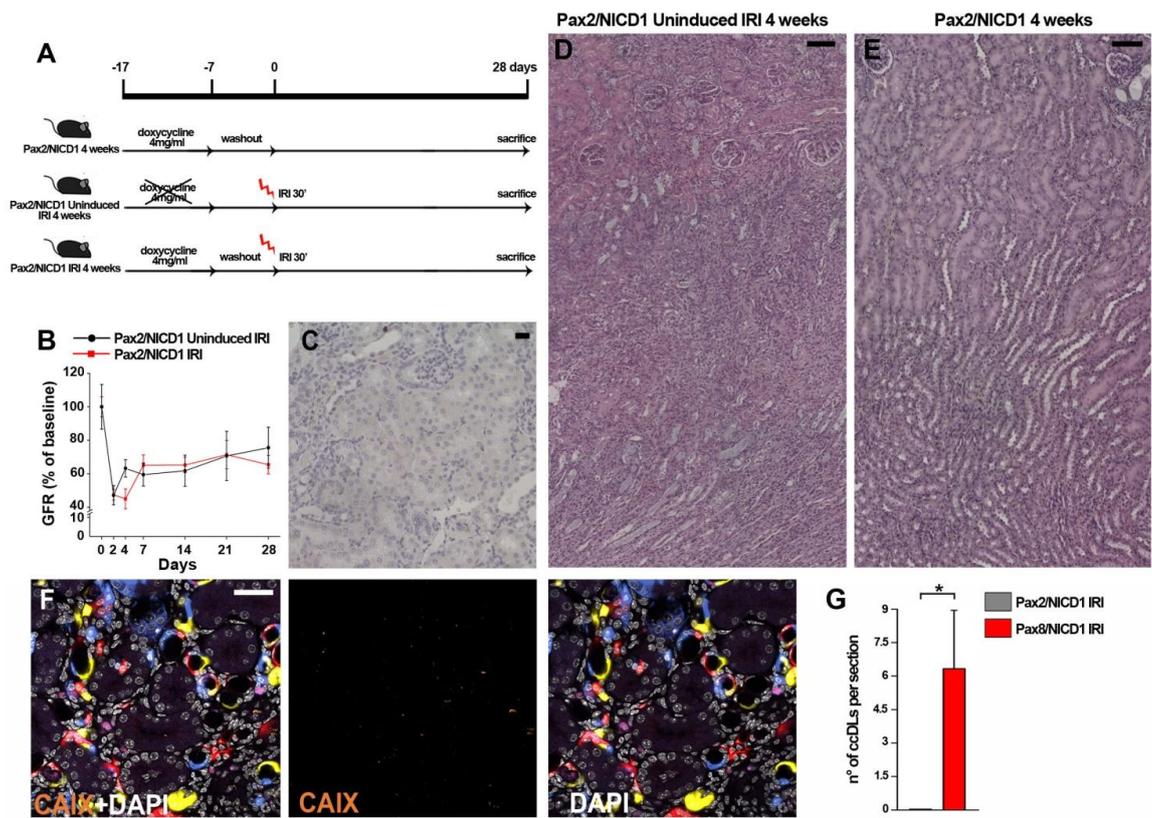
(A, B) Immagini confocali giustapposte di reni di topi Pax8/Confetti (A, n = 4) o Pax8/NICD1/Confetti (B, n = 6) a 36 settimane. Bar = 75  $\mu$ m. Le frecce (bianche) indicano lesioni di natura proliferativa. (C) Immagini confocali rappresentative di colorazione CAIX (arancione) in un topo Pax8/NICD1/Confetti a 36 settimane. Bar = 25  $\mu$ m. (D) Analisi della frequenza dei cloni di ccDL nei topi Pax8/NICD1/Confetti a 36 settimane (n = 6). (E) Immagini confocali rappresentative di colorazione CAIX (arancione) in un topo Pax8/NICD1/Confetti 4 settimane dopo IRI. Bar = 25  $\mu$ m. (F) Analisi della frequenza clonale di ccDL di topi Pax8/NICD1/Confetti 4 settimane dopo IRI (n = 5). DAPI (bianco) colora i nuclei. I dati sono media  $\pm$  SEM.

#### 4.4 I tumori papillari di tipo 2 originano dall'espansione clonale dei progenitori Pax2+

La monoclonalità dei tumori papillari ha suggerito la loro origine da una sottopopolazione unica di TEC, come una popolazione di cellule staminali o progenitori locali. Abbiamo pertanto considerato il ruolo delle cellule epiteliali

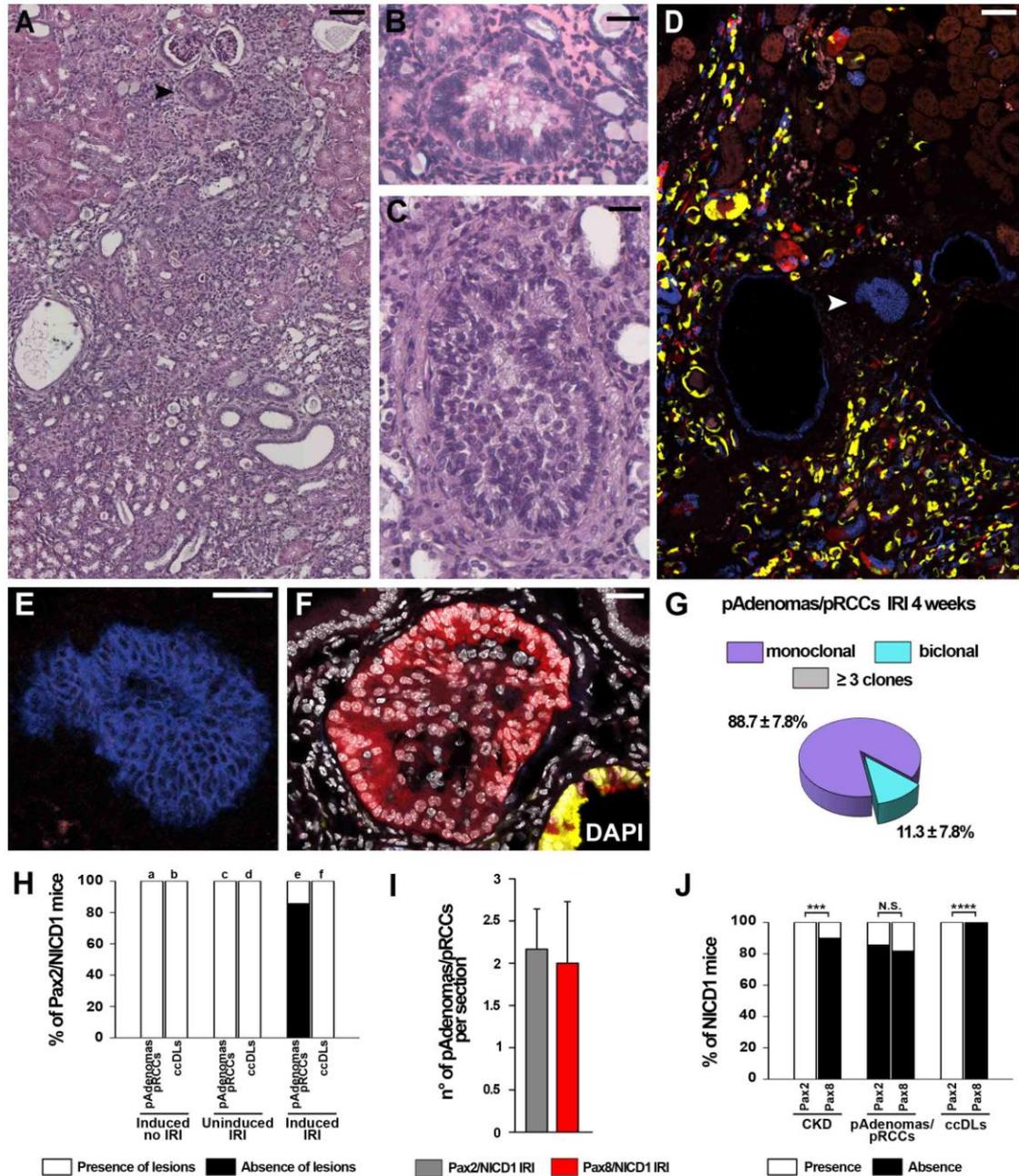
tubulari Pax2+, una popolazione di progenitori dispersi che è il tipo predominante di cellule che rigenera i tubuli danneggiati in seguito ad AKI (159). A questo scopo, abbiamo generato una linea di topi condizionali *Pax2.rtTA;TetO.Cre;R26.NICD1.GFP* che consentono la overespressione di NICD1 esclusivamente nella sottopopolazione Pax2 + delle TECs (Figura 9). In seguito a induzione con Doxiciclina, il promotore Pax2.rtTA ha portato alla persistente overespressione di NICD1 selettivamente nei progenitori Pax2 +, come descritto in precedenza (159) (Figura 17A). Come previsto, nei topi Pax2/NICD1, l'induzione dell'IRI è stata seguita da un rapido declino del GFR per un periodo di 7 giorni, seguito dal recupero funzionale (Figura 17B) (159). Più dell'85% dei topi Pax2/NICD1 indotti presentava cisti semplici o tumori papillari di tipo 2 entro quattro settimane dall'IRI, mentre le lesioni CAIX + erano assenti (Figura 18A-D, 17C). L'analisi istologica dei topi Pax2/NICD1 non indotti, 4 settimane dopo l'IRI, ha mostrato un epitelio tubulare apparentemente restaurato, con fibrosi focale interstiziale e sviluppo di cloni Pax2 +, come descritto in precedenza (159) (Figura 17D). I topi Pax2/NICD1 senza AKI non hanno mostrato lesioni tumorali a 4 settimane (Figura 17E).

Per effettuare il *lineage tracing* clonale delle lesioni papillari, abbiamo generato i topi condizionali *Pax2.rtTA;TetO.Cre;R26.NICD1.GFP;R26.Confetti* (Figura 9, Figura 18F), in cui le cellule Pax2+ esprimevano anche il reporter Confetti. L'analisi clonale ha rivelato che l' $88,7 \pm 7,8\%$  degli adenomi papillari o dei pRCC era monoclonale, mentre il resto era biclonale (Figura 18G-I). Un confronto quantitativo diretto dei tumori papillari di tipo 2 nei topi Pax8/NICD1 e Pax2/NICD1 4 settimane dopo IRI ha mostrato una quantità simile di queste lesioni in entrambi i gruppi ( $2,17 \pm 0,48$  adenomi papillari o pRCCs per sezione nei topi Pax2/NICD1 vs.  $2 \pm 0,73$  nei topi Pax8/NICD1) (Figura 18J). Non sono state osservate lesioni di ccDL e l'immunocolorezione per CAIX è risultata completamente negativa, confermando ulteriormente l'assenza di ccDL (Figura 18D, 17H, I). Questi risultati implicano che singoli progenitori tubulari Pax2 + sono l'unica fonte cellulare per tumori papillari di tipo 2, mentre CKD e ccDL devono derivare dall'overespressione di Notch in cellule epiteliali tubulari Pax2-negative.



**Figura 17.** I tumori papillari di tipo 2 hanno origine dalla proliferazione clonale di cellule progenitrici Pax2+.

(A) Schema sperimentale. (B) Misurazioni di GFR in topi non indotti (n = 3) e indotti (n = 3) Pax2/NICD1 dopo IRI. I dati sono media  $\pm$  SEM. Il test di Mann-Whitney tra i gruppi in ciascun tempo sperimentale non è risultato significativo. La significatività statistica di ANOVA per confronti multipli tra i vari punti temporali indica un significato globale per entrambi i topi non indotti ( $p = 0.002$ ) e indotti ( $p = 0.0008$ ). (C) Immagine rappresentativa dell'area corticale negativa per la colorazione CAIX nel rene di topi Pax2/NICD1 4 settimane dopo l'IRI. Bar = 25  $\mu$ m. (D) Giustapposizione di immagini H & E di reni di topi Pax2/NICD1 indotti, 4 settimane dopo IRI (n = 4). Bar = 75  $\mu$ m. (E) Giustapposizione di immagini H & E di reni di topi Pax2/NICD1 a 4 settimane (n = 6). Bar = 75  $\mu$ m. (F) immagini confocali rappresentative dell'area corticale negativa per la colorazione CAIX (arancione). Bar = 25  $\mu$ m. DAPI (bianco) contra i nuclei. (G) Grafico del numero di ccDL per sezione renale in topi Pax2/NICD1/Confetti (n = 5) e Pax8/NICD1/Confetti (n = 6) 4 settimane dopo IRI. DAPI contrasta i nuclei. I dati sono media  $\pm$  SEM



**Figura 18.** I tumori papillari di tipo 2 hanno origine dalla proliferazione clonale di cellule progenitrici Pax2+. nel topo.

(A) Immagini H & E giustapposte di reni di topi Pax2/NICD1, 4 settimane dopo IRI (n = 7). Bar = 75  $\mu$ m. La freccia (nero) indica un tumore papillare. (B, C) Immagini istologiche rappresentative con colorazione H & E di un adenoma papillare (B) e carcinoma (C) presenti nei topi Pax2 / NICD1. Bar = 25 micron. (D) Immagini confocali giustapposte di reni di topi Pax2/NICD1/Confetti, 4 settimane dopo IRI (n = 5). Bar = 75  $\mu$ m. La freccia (bianco) indica un tumore papillare. (E, F) Immagini rappresentative di tumori papillari di topi Pax2/NICD1/Confetti 4 settimane dopo IRI. (E) è un dettaglio di (D). Bar = 25  $\mu$ m. (G) Analisi della frequenza dei cloni nei tumori papillari dei topi Pax2/NICD1/Confetti, 4 settimane dopo IRI (n = 5). (H) Percentuale di topi Pax2/NICD1 indotti (n = 4), Pax2/NICD1 IRI non indotti (n = 4) o IRI indotti (n = 7) di 4 settimane con lesioni tumorali. Il potere statistico è stato valutato utilizzando il test esatto di Fisher: a vs. e p = 0,03, c vs e p = 0,0076, b vs. f non significativo, d vs. f non significativo. (I) Grafico del numero di tumori papillari per sezione renale

in topi Pax2/NICD1 (n = 5) e Pax8/NICD1 (n = 6) 4 settimane dopo IRI. Il significato statistico è stato calcolato dal test di Mann-Whitney tra i gruppi ed è risultato non significativo. (J) Percentuale di topi Pax2/NICD1 e Pax8/NICD1 IRI a 4 settimane con CKD (n = 6 e 10, rispettivamente), pAdenomi /pRCC e ccDL (n = 11 e 7, rispettivamente). Il potere statistico è stato valutato utilizzando il test esatto di Fisher: \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001, N.S. insignificante. DAPI contro colora i nuclei. I dati sono media  $\pm$  SEM.

## 5- DISCUSSIONE

Il pRCC è il secondo sottotipo più comune di RCC e rappresenta circa il 15% delle neoplasie epiteliali renali negli adulti, il 38-44% di RCC in pazienti in dialisi (203-205) e il 22-37% di RCC in pazienti che hanno subito trapianto (203,206,207). Nei pazienti con malattia renale terminale (*End Stage Renal Disease*, ESRD) e trapianto di rene, dove l'RCC è 100 volte più frequente e il 3-5% ne è affetto, il pRCC rappresenta un'importante causa di morte (208). Fino ad ora, il tipo cellulare che dà origine al pRCC era sconosciuto. Alcuni studi che utilizzano *l'immunolabeling* o i profili dell'mRNA sono a favore di una popolazione che ha origine dal tubulo prossimale per il pRCC (209). Dal momento che abbiamo identificato i tumori papillari come clonali, abbiamo ipotizzato che un sottogruppo di TEC con maggiore capacità di auto-rinnovamento, preferibilmente ma non selettivamente localizzate nel tubulo prossimale, possa essere la popolazione cellulare che dà origine ad adenomi papillari e pRCC. I progenitori renali Pax2+, recentemente identificati come una sottopopolazione distinta di TEC localizzata in maniera sparsa principalmente nel tubulo prossimale e distale, condividono queste caratteristiche (210,211). In risposta all'AKI, le RPC Pax2+ si espandono in maniera clonale per riparare il tessuto tubulare danneggiato (159). Coerentemente, i topi che sovraesprimono Notch in modo selettivo nelle RPC hanno generato tumori papillari clonali in numero simile ai topi che sovraesprimono Notch in tutte le TEC, sebbene le RPC Pax2+ rappresentino solo un piccolo sottogruppo di TEC. Inoltre, nei topi Pax2/NICD1, si sono sviluppati solo i tumori papillari di tipo 2 ma non la fibrosi tubulointerstiziale, ccDL o CKD, suggerendo che i tumori papillari si sviluppano dalla proliferazione clonale delle RPC Pax2+, mentre la fibrosi interstiziale, i ccDL o la CKD si sviluppano dalla overespressione di Notch nelle cellule Pax2-negative. Questi risultati, insieme all'origine clonale dei tumori, suggeriscono che singole RPC Pax2+ possono generare adenomi che continuano a crescere e alla fine si trasformano in pRCC. L'alta coincidenza, la multifocalità e le somiglianze istologiche tra l'adenoma papillare e il carcinoma pRCC hanno suggerito che essi rappresentano un *continuum* di un medesimo processo biologico, come si osserva ad esempio per la sequenza di adenoma-carcinoma del colon (212). I risultati ottenuti chiariscono questo punto

fornendo prove di *lineage tracing* che gli adenomi papillari e il pRCC si sviluppano sequenzialmente da una aberrante espansione clonale delle RPC Pax2 +.

Oltre a chiarire la cellula di origine dei tumori papillari, i risultati ottenuti forniscono anche evidenza di come la overespressione di Notch nelle TEC, promossa da AKI, induca lo sviluppo di adenomi papillari di tipo 2 e pRCC nel topo. In accordo con questo, i nostri risultati suggeriscono che la malattia renale cronica, l'invecchiamento e il diabete, tutte condizioni associate con una overespressione di Notch (94,95), sono anche associati ad un aumentato rischio di sviluppare pRCCs. Inoltre, l'attivazione di Notch è fortemente indotta nelle TEC durante l'AKI per attivare la riparazione tissutale (94). Coerentemente, un episodio di AKI rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di tumori papillari sia nel topo che nell'uomo. L'associazione tra AKI, Notch e adenomi papillari di tipo 2 e pRCC suggerisce che questi tumori sono direttamente collegati al processo di lesione e riparazione. Questa osservazione ha importanti implicazioni fisiopatologiche e cliniche. Infatti, sebbene l'AKI sia una preoccupazione per la salute pubblica a livello globale che colpisce circa 13,3 milioni di persone all'anno (3), è spesso trascurata e questo potrebbe spiegare perché il suo legame con il pRCC è rimasto fino ad ora sconosciuto (213-215). I risultati di questo studio potrebbero spiegare molti casi di pRCC apparentemente non correlati a nessuno dei fattori di rischio stabiliti.

In sintesi, l'identificazione delle RPC Pax2 + come popolazione cellulare di origine del pRCC fornisce un nuovo paradigma per lo sviluppo di pRCC che potrebbe offrire uno specifico *target* di trattamento mai conosciuto prima. Inoltre, l'identificazione della overespressione di Notch come meccanismo patologico comune per tutti i diversi sottogruppi genetici di pRCC di tipo 2 suggerisce che questo percorso dovrebbe essere mirato in questo istotipo di RCC.

## 6- BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
2. Eble J. N., Sauter G., Epstein J. I., Isabell A. Sesterhenn. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon: IARC Press, 2004, IARC Press.
3. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. *International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality*. Eur Urol. 2015 Mar;67(3):519-30
4. Fonte: "I numeri del cancro in Italia 2017", AIOM-AIRTUM
5. Fonte Itacan – Associazione Italiana Registri Tumori Airtum(www.itacan.ispo.toscana.it)
6. Miah MS, White SJ, Oommen G, Birney E, Majumdar S. *Late simultaneous metastasis of renal cell carcinoma to the submandibular and thyroid glands seven years after radical nephrectomy*. Int J Otolaryngol 2010.
7. Parkin DM, Pisani P, Lopez AD, Masuyer E. *At least one in seven cases of cancer is caused by smoking*. Int J Cancer. 1994 Nov 15;59(4):494-504.
8. Gandini S., Botteri E., et al. *Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis*. IJC 2008; 122:155-64.
9. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. Lyon : IARC Press, 1987.
10. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Hormonal contraception and postmenopausal hormonal therapy. Lyon : IARC Press, 1999.
11. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Weight control and physical activity. Lyon : IARC Press, 2002.
12. Bergstrom A, Lindblad P, Wolk A. *Birth weight and risk of renal cell cancer*. 1110-1113, s.l. : Kidney Int, 2001, Vol. 59.
13. Renehan AG., Tyson M., et al. *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet 2008;371:569-78.
14. Bao C., Yang X., et al. *Diabetes mellitus and incidence and mortality of kidney cancer: a meta-analysis*. J Diabetes Complications. 2013 Jul-Aug;27(4):357-64.
15. Karlstad O., Linde JS., et al. *Use of Insulin and Insulin Analogs and Risk of Cancer- Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies*. Curr Drug Saf. 2013 Nov 7.
16. Franciosi M., Lucisano G., et al. *Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review*. PLoS One. 2013 Aug 2;8(8):e71583.
17. Setiawan VW., Stram DO., et al. *Risk Factors for Renal Cell Cancer: The Multiethnic Cohort*. Am J Epidemiol 2007; 166(8):932-40.
18. Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castela JE, Ross RK, Yu MC. *Family history and risk of renal cell carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 Sep;10(9):1001-4.

19. Research, World Cancer Research Fund in Association with American Institute for Cancer. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, DC : WCRF, 1997.
20. Cho E., Curhan G., et al. *Prospective evaluation of analgesic use and risk of renal cell cancer*. Arch Intern Med 2011;171:1487-93.
21. Maher ER., Yates JR., et al. *Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease*. The Quarterly journal of medicine 1990;77:1151-63.
22. Hunt JD., van der Hel OD., et al. *Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies*. Int J Cancer Volume 114, Issue 1, pages 101-108, 10 March 2005.
23. Chow WH., Gridley G., et al. *Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men*. NEJM 2000; 343:1305-11.
24. Hughson MD, Buchwald D, Fox M. *Renal neoplasia and acquired cystic kidney disease in patients receiving long-term dialysis*. Arch Pathol Lab Med. 1986 Jul;110(7):592-601.
25. Del Vecchio MT, Lazzi S, Bruni A, Mangiavacchi P, Cevenini G, Luzi P. *DNA ploidy pattern in papillary renal cell carcinoma. Correlation with clinicopathological parameters and survival*. Pathol Res Pract. 1998;194(5):325-33.
26. Reese AJM, Winstanley DP. *The small tumor-like lesions of the kidney*. Br J Cancer. 1958 Dec;12(4):507-16.
27. Holger Moch, Antonio L. Cubilla, Peter A. Humphrey, Victor E. Reuter, Thomas M. Ulbright. *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours*. July 2016 Volume 70, Issue 1, Pages 93–105.
28. Delahunt B, Eble JN, McCredie MR, Bethwaite PB, Stewart JH, Bilous AM. *Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases*. 590-595, s.l. : Hum Pathol, 2001, Vol. 32.
29. Mydlo JH, Bard RH. *Analysis of papillary renal adenocarcinoma*. 529-534, s.l. : Urology, 1987, Vol. 30.
30. Amin MB, Corless CL, Renshaw AA, Tickoo SK, Kubus J, Schultz DS. *Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases*. 621-635, s.l. : Am J Surg Pathol, 1997, Vol. 21.
31. Mancilla-Jimenez R, Stanley RJ, Blath RA. *Papillary renal cell carcinoma: a clinical, radiologic, and pathologic study of 34 cases*. 2469-2480, s.l. : Cancer, 1976, Vol. 38.
32. Delahunt B, Eble JN. *Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors*. 537-544, s.l. : Mod Pathol, 1997, Vol. 10.
33. Renshaw AA, Zhang H, Corless CL, Fletcher JA, Pins MR. *Solid variants of papillary (chromophil) renal cell carcinoma: clinicopathologic and genetic features*. 1203-1209, s.l. : Am J Surg Pathol, 1997, Vol. 21.
34. Jacobs SC, Berg SI, Lawson RK. *Synchronous bilateral renal cell carcinoma: total surgical excision*. 2341-2345, s.l. : Cancer, 1980, Vol. 46.
35. JL, Bennington. *Tumors of the kidney*. In: Surgical Pathology of Urologic disease. Baltimore : In: Surgical Pathology of Urologic Williams and Wilkins, 1987.

36. Fukuoka T, Honda M, Namiki M, Tada Y, Matsuda M, Sonoda T. *Renal cell carcinoma with heterotopic bone formation. Case report and review of the Japanese literature..* 458-160, s.l. : Urol Int, 1987, Vol. 42.
37. H, Moch. *Cystic renal tumors: new entities and novel concept.* 209-214, s.l. : Adv Anat Pathol, 2010, Vol. 17.
38. You D, Shim M, Jeong IG, et al. *Multilocular cystic renal cell carcinoma: clinicopathological features and preoperative prediction using multiphase computed tomography.* 1444-1449, s.l. : BJU Int, 2011, Vol. 108.
39. von Teichman A, Compe´rat E, Behnke S, et al. *VHL mutations and dysregulation of pVHL- and PTEN-controlled pathways in multilocular cystic renal cell carcinoma.* 571-578, s.l. : Mod Pathol, 2011, Vol. 24.
40. Crotty TB, Farrow GM, Lieber MM. *Chromophobe cell renal carcinoma: clinicopathological features of 50 cases.* 964-967, s.l. : J Urol, 1995, Vol. 154.
41. Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ, Moll R, Baum HP, Werner S. *Chromophobe cell renal carcinoma and its variants—a report on 32 cases.* 277-287, s.l. : J Pathol, 1988, Vol. 155.
42. Ray WJ, Yao M, Mumm J, Schroeter EH, Saftig P, Wolfe M, Selkoe DJ, Kopan R, Goate AM. *Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch.* 36801-36807, s.l. : J Biol Chem, 1999, Vol. 274.
43. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, et al. *A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain.* 518-522, s.l. : Nature, 1999, Vol. 398.
44. Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R. *A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1.* 197-206, s.l. : Mol Cell, 2000, Vol. 5.
45. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. *Signalling downstream of activated mammalian Notch.* 355-358, s.l. : Nature, 1995, Vol. 377.
46. Ilagan MX, Kopan R. *SnapShot: notch signaling pathway.* 1246, s.l. : Cell, 2007, Vol. 128.
47. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.* 770-776, s.l. : Science, 1999, Vol. 284.
48. Qi R, An H, Yu Y, Zhang M, Liu S, Xu H, Guo Z, Cheng T, Cao X. *Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis.* 8323-8329, s.l. : Cancer Res, 2003, Vol. 63.
49. Yang X, Klein R, Tian X, Cheng HT, Kopan R, Shen J. *Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway.* 81-94, s.l. : Dev Biol, 2004, Vol. 269.
50. Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC. *Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism.* 881-888, s.l. : Nat Immunol, 2005, Vol. 6.
51. Cheng HT, Kim M, Valerius MT, Surendran K, Schuster-Gossler K, Gossler A, McMahon AP, Kopan R. *Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron.* 801-811, s.l. : Development, 2007, Vol. 134.

52. Morrow D, Guha S, Sweeney C, Birney Y, Walshe T, O'Brien C, Walls D, Redmond EM, Cahill PA. *Notch and vascular smooth muscle cell phenotype*. 1370-1382, s.l. : Circ Res, 2008, Vol. 103.
53. Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. *A Notch updated*. 621-629, s.l. : J Cell Biol, 2009, Vol. 184.
54. Aparicio LM, Villaamil VM, Gallego GA, Cainzos IS, Campelo RG, Rubira LV, Estevez SV, Mateos LL, Perez JL, Vazquez MR, et al. *Expression of Notch1 to -4 and their Ligands in Renal Cell Carcinoma: A Tissue Microarray Study*. 93-101, s.l. : Cancer Genomics Proteomics, 2011, Vol. 8.
55. Meehan B, Appu S, St Croix B, Rak-Poznanska K, Klotz L, Rak J. *Age-related properties of the tumour vasculature in renal cell carcinoma*. 416-424, s.l. : BJU Int, 2011, Vol. 107.
56. Sun S, Du R, Gao J, Ning X, Xie H, Lin X, Liu J, Fan D. *Expression and clinical significance of Notch receptors in human renal cell carcinoma*. 335-341, s.l. : Pathology, 2009, Vol. 41.
57. Rae FK, Stephenson SA, Nicol DL, Clements JA. *Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display*. 726-732, s.l. : Int J Cancer, 2000, Vol. 88.
58. McCright B, Lozier J, Gridley T. *A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of Jag1 haploinsufficiency*. 1075-1082, s.l. : Development, 2002, Vol. 129.
59. Madsen KM, Tisher CC. *Structural-functional relationship along the distal nephron*. F1-F15, s.l. : Am J Physiol, 1986, Vol. 250.
60. Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM, Promeneur D, Frokiaer J, Marples D. *Physiology and pathophysiology of renal aquaporins*. 647-663, s.l. : J Am Soc Nephrol, 1999, Vol. 10.
61. Jeong HW, Jeon US, Koo BK, Kim WY, Im SK, Shin J, Cho Y, Kim J, Kong YY. *Inactivation of Notch signaling in the renal collecting duct causes nephrogenic diabetes insipidus in mice*. 3290-3300, s.l. : J Clin Invest, 2009, Vol. 119.
62. Lasagni L, Ballerini L, Angelotti ML, Parente E, Sagrinati C, Mazzinghi B, Peired A, Ronconi E, Becherucci F, Bani D, Gacci M, Carini M, Lazzeri E, Romagnani P. *Notch activation differentially regulates renal progenitors proliferation and differentiation toward the podocyte lineage in glomerular disorders*. Stem Cells. 2010 Sep;28(9):1674-85
63. Buchler P, Gazdhar A, Schubert M, Giese N, Reber HA, Hines OJ, Giese T, Ceyhan GO, Muller M, Buchler MW, et al. *The notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer*. Ann Surg. 2005; 242(6):791-800. discussion 800-1.
64. Sjolund J, Manetopoulos C, Stockhausen MT, Axelson H. *The notch pathway in cancer: differentiation gone awry*. Eur J Cancer. 2005;41(17):2620-9.
65. Sjolund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S, Nilsson E, Ljungberg B, Axelson H. *Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of notch signaling in vitro and in vivo*. J Clin Invest. 2008;118(1):217-28.
66. Rae FK, Stephenson SA, Nicol DL, Clements JA. *Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display*. Int J Cancer. 2000;88(5):726-32.
67. Wu K, Xu L, Zhang L, Lin Z, Hou J. *High jagged1 expression predicts poor outcome in clear cell renal cell carcinoma*. Jpn J Clin Oncol. 2011;41(3):411-6.

68. Wang W, Yu Y, et al., Z. *Delta-like ligand 4: A predictor of poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma*. *Oncol Lett*. 2014 Dec;8(6):2627-2633. Epub 2014 Sep 24.
69. Bielez B, Sirin Y, Si H, Niranjana T, Gruenwald A, Ahn S, Kato H, Pullman J, Gessler M, Haase VH, Susztak K. *Epithelial Notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans*. *J Clin Invest*. 2010 Nov;120(11):4040-54.
70. Sjolund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S, Nilsson E, Ljungberg B, Axelson H. *Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo*. 217-228, s.l. : *J Clin Invest*, 2008, Vol. 118.
71. Hu J, Zhang LC, Song X, Lu JR, Jin Z. *KRT6 interacting with notch1 contributes to progression of renal cell carcinoma, and aliskiren inhibits renal carcinoma cell lines proliferation in vitro*. 9182-9188, s.l. : *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, Vol. 8.
72. Zheng L., Quiang F., et al. *A three-molecule score based on Notch pathway predicts poor prognosis in non-metastasis clear renal cell carcinoma*. *Oncotarget*, Vol.7, No. 42. September 06, 2016.
73. Pfaffl MW. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
74. *Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma*. January 14, 2016. *N Engl J Med* 2016; 374:135-145.
75. Van Biesen W, Vanholder R, Lameire N. *Defining acute renal failure: RIFLE and beyond*. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;1(6):1314-9.
76. Thadhani R, Pascual M, Bonventre J. *Acute renal failure*. *N Engl J Med* 334:1448-1460, 1996.
77. B. McCright. *Notch signaling in kidney development*. 5-10, s.l. : *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, Vol. 12.
78. Benedito R, Duarte A. *Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles*. *Gene Expr Patterns* 5: 750–755, 2005.
79. Challen GA, Bertoncello I, Deane JA, Ricardo SD, Little MH. *Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity*. *J Am Soc Nephrol* 17: 1896–1912, 2006.
80. Chen L, Al-Awqati Q. *Segmental expression of Notch and Hairy genes in nephrogenesis*. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F939–F952, 2005.
81. Cheng HT, Kim M, Valerius MT, Surendran K, Schuster-Gossler K, Gossler A, McMahon AP, Kopan R. *Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron*. *Development* 134: 801–811, 2007.
82. Cheng HT, Kopan R. *The role of Notch signaling in specification of podocyte and proximal tubules within the developing mouse kidney*. *Kidney Int* 68: 1951–1952, 2005.
83. Cheng HT, Miner JH, Lin M, Tansey MG, Roth K, Kopan R. *Gamma-secretase activity is dispensable for mesenchyme-to-epithelium transition but required for podocyte and proximal tubule formation in developing mouse kidney*. *Development* 130: 5031–5042, 2003.
84. Dressler GR. *The cellular basis of kidney development*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 509–529, 2006.

85. Leimeister C, Schumacher N, Gessler M. *Expression of Notch pathway genes in the embryonic mouse metanephros suggests a role in proximal tubule development.* Gene Expr Patterns 3: 595–598, 2003.
86. McCright B. *Notch signaling in kidney development.* Curr Opin Nephrol Hypertens 12: 5–10, 2003.
87. McCright B, Gao X, Shen L, Lozier J, Lan Y, Maguire M, Herzlinger D, Weinmaster G, Jiang R, Gridley T. *Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation.* Development 128: 491–502, 2001.
88. Morrissey J, Guo G, Moridaira K, Fitzgerald M, McCracken R, Tolley T, Klahr S. *Transforming growth factor-beta induces renal epithelial jagged-1 expression in fibrotic disease.* J Am Soc Nephrol 13: 1499–1508, 2002.
89. Nishinakamura R. *Stem cells in the embryonic kidney.* Kidney Int 73: 913–917, 2008.
90. Piscione TD, Wu MY, Quaggin SE. *Expression of Hairy/Enhancer of Split genes, Hes1 and Hes5, during murine nephron morphogenesis.* Gene Expr Patterns 4: 707–711, 2004.
91. Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, Deblandre GA, Kintner CR, Stark KL. *Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium.* Genes Dev 14: 1313–1318, 2000.
92. Walsh DW, Roxburgh SA, McGettigan P, Berthier CC, Higgins DG, Kretzler M, Cohen CD, Mezzano S, Brazil DP, Martin F. *Co-regulation of Gremlin and Notch signalling in diabetic nephropathy.* Biochim Biophys Acta 1782: 10–21, 2007.
93. Wang P, Pereira FA, Beasley D, Zheng H. *Presenilins are required for the formation of comma- and S-shaped bodies during nephrogenesis.* Development 130: 5019–5029, 2003.
94. Gupta S, Li S, Abedin MJ, Wang L, Schneider E, Najafian B, et al. *Effect of Notch activation on the regenerative response to acute renal failure.* Am J Physiol Renal Physiol 2010;298:F209-15.
95. Weidenbusch M, Rodler S, Song S, Romoli S, Marschner JA, Kraft F, et al. *Gene expression profiling of the Notch-AhR-IL22 axis at homeostasis and in response to tissue injury.* Biosci Rep 2017;37.
96. Kobayashi T, Terada Y, Kuwana H, Tanaka H, Okado T, Kuwahara M, Tohda S, Sakano S, Sasaki S. *Expression and function of the Delta-1/Notch-2/Hes-1 pathway during experimental acute kidney injury.* 1240-1250, s.l. : Kidney Int, 2008, Vol. 73.
97. Sengupta A., Cancelas JA. *Cancer stem cells: a stride towards cancer cure?* J Cell Physiol. 2010; 225:7-14.
98. Di C, Zhao Y. *Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer* (review). Exp Ther Med. 2015;9(2):289–93.
99. Liu F, Cao X, Liu Z, Guo H, Ren K, Quan M, Zhou Y, Xiang H, Cao J. *Casticin suppresses self-renewal and invasion of lung cancer stem-like cells from a549 cells through down-regulation of pakt.* Acta Biochim Biophys Sin. 2014;46(1):15–21.
100. Monteiro J, Fodde R. *Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives.* Eur J Cancer. 2010 May;46(7):1198-203.
101. Reya T., Morrison SJ., Clarke MF., Weissman IL. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells.* Nature 2001;414:105-111.

102. Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9*. Nature. 2006 Aug 17;442(7104):818-22. Epub 2006 Jul 16.
103. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. *Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML*. N Engl J Med. 2004 Aug 12;351(7):657-67.
104. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature. 1994 Feb 17;367(6464):645-8.
105. Bonnet D, Dick JE. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med. 1997 Jul;3(7):730-7.
106. Al-Hajj M. *Cancer stem cells and oncology therapeutics*. Curr Opin Oncol. 2007 Jan;19(1):61-4.
107. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res. 2003 Sep 15;63(18):5821-8.
108. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. *Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer*. Cell. 2005 Jun 17;121(6):823-35.
109. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature. 2007 Jan 4;445(7123):106-10. Epub 2006 Nov 19.
110. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. *Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors*. Cancer Res. 2008 Jun 1;68(11):4311-20.
111. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. *Identification of pancreatic cancer stem cells*. Cancer Res. 2007 Feb 1;67(3):1030-7.
112. Lang SH, Frame FM, Collins AT. *Prostate cancer stem cells*. J Pathol. 2009 Jan;217(2):299-306. Review.
113. Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. *Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy*. Clin Cancer Res. 2008 Apr 1;14(7):1931-7. Review.
114. Bussolati B, Dekel B, Azzarone B, Camussi G. *Human renal cancer stem cells*. Cancer Lett. 2013;338(1):141-6.
115. Huang B, Huang YJ, Yao ZJ, Chen X, Guo SJ, Mao XP, Wang DH, Chen JX, Qiu SP. *Cancer stem cell-like side population cells in clear cell renal cell carcinoma cell line*. 769p. Plos One. 2013;8(7):e68293.
116. Hasmim M, Bruno S, Azzi S, Gallerne C, Michel JG, Chiabotto G, Lecoq V, Romei C, Spaggiari GM, Pezzolo A, et al. *Isolation and characterization of renal cancer stem cells from patient-derived xenografts*. Oncotarget. 2016; 7(13):15507-24.

117. Khan MI, Czarnecka AM, Helbrecht I, Bartnik E, Lian F, Szczylik C. *Current approaches in identification and isolation of human renal cell carcinoma cancer stem cells*. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2015;6:178.
118. Zimmerer RM, Matthiesen P, Kreher F, Kampmann A, Spalthoff S, Jehn P, Bittermann G, Gellrich NC, Tavassol F. *Putative cd133+ melanoma cancer stem cells induce initial angiogenesis in vivo*. *Microvasc Res*. 2016;104:46–54.
119. Xiang T, Long H, He L, Han X, Lin K, Liang Z, Zhuo W, Xie R, Zhu B. *Interleukin- 17 produced by tumor microenvironment promotes self-renewal of cd133+ cancer stem-like cells in ovarian cancer*. *Oncogene*. 2015;34(2):165–76.
120. Kim K, Ihm H, Ro JY, Cho YM. *High-level expression of stem cell marker cd133 in clear cell renal cell carcinoma with favorable prognosis*. *Oncol Lett*. 2011;2(6):1095–100.
121. Galleggiante V, Rutigliano M, Sallustio F, Ribatti D, Ditunno P, Bettocchi C, Selvaggi FP, Lucarelli G, Battaglia M. *CTR2 identifies a population of cancer cells with stem cell-like features in patients with clear cell renal cell carcinoma*. *J Urol*. 2014 Dec;192(6):1831-41.
122. B. Bussolati, S. Bruno, C.Gränge, U. Ferrando, G.Camussi. *Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas*. *FASEB J*. 2008 Oct;22(10):3696-705.
123. Dubinski W, Gabril M, Iakovlev VV, Scorilas A, Youssef YM, Faragalla H, Kovacs K, Rotondo F, Metias S, Arsanious A, Plotkin A, Girgis AH, Streutker CJ, Yousef GM. *Assessment of the prognostic significance of endoglin (CD105) in clear cell renal cell carcinoma using automated image analysis*. *Hum Pathol*. 2012 Jul;43(7):1037-43.
124. Zhang Y, Sun B, Zhao X, Liu Z, Wang X, Yao X, Dong X, Chi J. *Clinical significances and prognostic value of cancer stem-like cells markers and vasculogenic mimicry in renal cell carcinoma*. *J Surg Oncol*. 2013 Nov;108(6):414-9.
125. Toole BP. *Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities*. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 15;15(24):7462-7468.
126. Lim SD, Young AN, Paner GP, Amin MB. *Prognostic role of CD44 cell adhesion molecule expression in primary and metastatic renal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 125 cases*. *Virchows Arch*. 2008 Jan;452(1):49-55. Epub 2007 Nov 20.
127. Ma C, Komohara Y, Ohnishi K, et al. *Infiltration of tumor-associated macrophages is involved in CD44 expression in clear cell renal cell carcinoma*. *Cancer Sci*. 2016 May;107(5):700-7.
128. Zhong Y, Guan K, Guo S, Zhou C, Wang D, Ma W, Zhang Y, Li C, Zhang S. *Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells*. *Cancer Lett*. 2010 Dec 28;299(2):150-60.
129. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo*. *J Exp Med*. 1996 Apr 1;183(4):1797-806.
130. Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. *Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform*. *Cell Cycle*. 2011 May 1;10(9):1378-84. Epub 2011 May 1. Review.

131. Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ, McDonnell DP. *Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 1;103(31):11707-12. Epub 2006 Jul 20.
132. L. Wang, P. Park, H. Zhang, et al. *Characterization of renal tumor-initiating cells in human renal carcinoma cell lines*. Cancer Research, vol.71, supplement 8, p.293, 2011.
133. Malaguarnera R1, Frasca F, Garozzo A, Gianì F, Pandini G, Vella V, Vigneri R, Belfiore A. *Insulin receptor isoforms and insulin-like growth factor receptor in human follicular cell precursors from papillary thyroid cancer and normal thyroid*. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Mar;96(3):766-74.
134. Yan B, Liu L, Zhao Y, Xiu LJ, Sun DZ, Liu X, Lu Y, Shi J, Zhang YC, Li YJ, et al. *Xiaotan sanjie decoction attenuates tumor angiogenesis by manipulating notch-1-regulated proliferation of gastric cancer stem-like cells*. World J Gastroenterol. 2014;20(36):13105–18.
135. Wang J, Sullenger BA, Rich JN. *Notch signaling in cancer stem cells*. Adv Exp Med Biol. 2012;727:174–85.
136. McAuliffe SM, Morgan SL, Wyant GA, Tran LT, Muto KW, Chen YS, Chin KT, Partridge JC, Poole BB, Cheng KH, et al. *Targeting notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(43):E2939–48.
- 137 Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et all. *Wound repair and regeneration*. Nature. 2008, Vol. 453(7193), 314-21.
138. Dressler GR. *The cellular basis of kidney development*. Annu Rev Cell Dev Biol. 2006, Vol. 22, 509-29.
139. Romagnani P. *Toward the identification of a "renopoietic system"?* Stem Cells. 2009, Vol. 27(9), 2247-53.
140. Imai E, Iwatani H. *The continuing story of renal repair with stem cells*. J Am Soc Nephrol. 2007, Vol. 18(9), 2423-4.
141. Little MH. *Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney*. J Am Soc Nephrol. 2006, Vol. 17(9), 2390-401.
142. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. *Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes*. J Clin Invest. 2006, Vol. 116(2), 288-96.
143. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, et al. *The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells*. J Clin Invest. 2004, Vol. 114(6), 795-804.
144. Dekel B, Zangi L, Shezen E, et al. *Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin-multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney*. J Am Soc Nephrol. 2006, Vol. 17(12), 3300-14.
145. Bussolati B, Bruno S, Grange C, et all. *Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney*. Am J Pathol. 2005, Vol. 166(2), 545-55.
146. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, et al. *Isolation and characterization of kidney-derived stem cells*. J Am Soc Nephrol. 2006, Vol. 17(11), 3028-40.
147. Challen GA, Bertoncello I, Deane JA, et al. *Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity*. J Am Soc Nephrol. 2006, Vol. 17(7), 1896-912.

148. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. *Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney*. J Am Soc Nephrol. 2003, Vol. 14(12), 3138-46
149. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, et al. *Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys*. J Am Soc Nephrol. 2006, Vol. 17(9), 2443-56.
150. Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, et al. *Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, Vol. 100(Suppl 1), 11854-60.
151. Cho KJ, Trzaska KA, Greco SJ, et al. *Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha*. Stem Cells. 2005, Vol. 23(3), 383-91.
152. Angelotti ML, et al. *Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors*. J Am Soc Nephrol. 2009, Vol. 20(2), 322-32.
153. Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, et al. *Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury*. Stem Cells 2012; 30: 1714–1725.
154. Lindgren D, Boström AK, Nilsson K, et al. *Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules*. Am J Pathol 2011; 178: 828–837.
155. Kikuchi K, Poss KD. *Cardiac regenerative capacity and mechanisms*. Annu Rev Cell Dev Biol 2012; 28: 719–741.
156. Romagnani, P., Rinkevich, Y., and Dekel, B. (2015). *The use of lineage tracing to study kidney injury and regeneration*. Nat. Rev. Nephrol. 11, 420–431.
157. Lasagni L, Angelotti ML, Ronconi E, et al. *Podocyte Regeneration Driven by Renal Progenitors Determines Glomerular Disease Remission and Can Be Pharmacologically Enhanced*. Stem Cell Reports. 2015 Aug 11;5(2):248-63
158. Ihara, G., Kiyomoto, H., Kobori, et al. (2010). *Regression of superficial glomerular podocyte injury in type 2 diabetic rats with overt albuminuria: effect of angiotensin II blockade*. J. Hypertens. 28, 2289–2298.
159. Lazzeri E, Angelotti ML, Peired A, et al. *Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury*. Nat Commun. 2018 Apr 9;9(1):1344.
160. Basile, D. P., Anderson, M. D. & Sutton, T. A. *Pathophysiology of acute kidney injury*. Compr. Physiol. 2, 1303–1353 (2012).
161. Chaible LM, et al. *Genetically modified animals for use in research and biotechnology*. 1469-1482, s.l. : Genet Mol Res, 2010, Vol. 9.
162. Lombardi D, Lasagni L. *Transgenic Strategies to Study Podocyte Loss and Regeneration*. 678347, s.l. : Stem Cells Int, 2015, Vol. 2015.
163. Barker N, et al. *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr*. 1003-1007, s.l. : Nature, 2007, Vol. 449.
164. Rompolas P, Mesa KR, Greco V. *Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate*. 513-518, s.l. : Nature, 2013, Vol. 502.

165. Kretzschmar K, Watt FM. *Lineage tracing*. 33-45, s.l. : Cell, 2012, Vol. 148.
166. Humphreys BD, DiRocco DP. *Lineage-tracing methods and the kidney*. *Kidney Int.* 2013 Oct 2.
167. DA, Underhill. *PAX proteins and fables of their reconstruction..* 161-177, s.l. : Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr, 2012, Vol. 22.
168. Chi N, Epstein JA. *Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease.* *Trends Genet* 2002; 18: 41–47.
169. Mansouri A, Hallonet M, Gruss P. *Pax genes and their roles in celldifferentiation and development.* 851-857, s.l. : Curr. Opin. Cell Biol, 1996, Vol. 8.
170. Eberhard D, Jimenez G, Heavey B, Busslinger M. *Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family.* 2292-2303, s.l. : EMBO J, 2000, Vol. 19.
171. Blake JA, Ziman MR. *Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance.* 737-751, s.l. : Development, 2014, Vol. 141.
172. Tong GX, Yu WM, Beaubier NT, Weeden EM, Hamele-Bena D, Mansukhani MM, et al. *Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissues: an immunohistochemical study.* 1218-1227, s.l. : Mod. Pathol, 2009, Vol. 22.
173. Nornes, H. O., Dressler, G. R., Knapik, E. W., Deutsch, U. & Gruss, P. *Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis.* *Development* 1990; 109, 797–809.
174. Eccles MR, Wallis LJ, Fidler AE, Spurr NK, Goodfellow PJ, Reeve AE. *Expression of the Pax2 gene in human fetal kidney and Wilms' tumor.* *Cell Growth Differ* 1992, 3:279–289.
175. Dressler GR, Douglass EC. *Pax2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms' tumor.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:1179–1183.
176. Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. *Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia.* *eng AP*, 269-271, s.l. : Science, 2004, Vol. 306.
177. Robinson DR, Kalyana-Sundaram S, Wu Y-M, Shankar S, Cao X, Ateeq B, et al. *Functionally recurrent rearrangements of the MAST kinase and Notch gene families in breast cancer.* 1646-1651, s.l. : Nat Med, 2011, Vol. 17.
178. Gordon WR, Roy M, Vardar-Ulu D, Garfinkel M, Mansour MR, Aster JC, et al. *Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL.* 4381-4390, s.l. : Blood, 2009, Vol. 113.
179. Chaible LM, et al. *Genetically modified animals for use in research and biotechnology.* 1469-1482, s.l. : Genet Mol Res, 2010, Vol. 9.
180. Livet J, et al. *Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system.* 56-62, s.l. : Nature, 2007, Vol. 450.
181. Snippert HJ, et al. *Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells.* 134-144, s.l. : Cell, 2010, Vol. 143.
182. Ritsma L, et al. *Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging.* 362-365, s.l. : Nature, 2014, Vol. 507.

183. Coussens, L. M. & Werb, Z. *Inflammation and cancer*. Nature 420, 860-867, (2002).
184. Dvorak, H. F. *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med 315, 1650-1659, (1986).
185. Schottenfeld, D. & Beebe-Dimmer, J. *Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia*. CA Cancer J Clin 56, 69-83 (2006).
186. Dey, S. et al. *Chronic Kidney Disease Is More Common in Locally Advanced Renal Cell Carcinoma*. Urology 105, 101-107, (2017).
187. Kim, S. H., Joung, J. Y., Seo, H. K., Lee, K. H. & Chung, J. *Baseline Chronic Kidney Disease and Ischemic Method of Partial Nephrectomy Are Important Factors for the Short- and Long-Term Deterioration in Renal Function for Renal Cell Carcinoma Staged T1-T2: A Retrospective Single Center Study*. Biomed Res Int 2016, 5398381, (2016).
188. Kim, Y. W. et al. *Preoperative Chronic Kidney Disease Status is an Independent Prognostic Factor in Patients with Renal Cell Carcinoma*. Ann Surg Oncol 22, 4098-4103, (2015).
189. Woldu, S. L. et al. *Renal insufficiency is associated with an increased risk of papillary renal cell carcinoma histology*. Int Urol Nephrol 46, 2127-2132, (2014).
190. Gurel, S. et al. *Subtypes of renal cell carcinoma: MRI and pathological features*. Diagn Interv Radiol 19, 304-311, (2013).
191. Sukosd, F., Kuroda, N., Beothe, T., Kaur, A. P. & Kovacs, G. *Deletion of chromosome 3p14.2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma*. Cancer Res 63, 455-457 (2003).
192. Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S. & Kaelin, W. G., Jr. *Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product*. Nat Med 1, 822-826 (1995).
193. Guinot, A., Lehmann, H., Wild, P. J. & Frew, I. J. *Combined deletion of Vhl, Trp53 and Kif3a causes cystic and neoplastic renal lesions*. J Pathol 239, 365-373, (2016).
194. Kida, Y., Zullo, J. A. & Goligorsky, M. S. *Endothelial sirtuin 1 inactivation enhances capillary rarefaction and fibrosis following kidney injury through Notch activation*. Biochem Biophys Res Commun 478, 1074-1079, (2016).
195. El Machhour, F., Keuylian, Z., Kavvadas, P., Dussaule, J. C. & Chatziantoniou, C. *Activation of Notch3 in Glomeruli Promotes the Development of Rapidly Progressive Renal Disease*. J Am Soc Nephrol 26, 1561-1575, (2015).
196. Xiao, Z. et al. *The Notch gamma-secretase inhibitor ameliorates kidney fibrosis via inhibition of TGF-beta/Smad2/3 signaling pathway activation*. Int J Biochem Cell Biol 55, 65-71, (2014).
197. Bielez, B. et al. *Epithelial Notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans*. J Clin Invest 120, 4040-4054, (2010).
198. Sorensen-Zender, I. et al. *Renal tubular Notch signaling triggers a prosenescent state after acute kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol 306, F907-915, (2014).
199. Bhagat, T. D. et al. *Notch Pathway Is Activated via Genetic and Epigenetic Alterations and Is a Therapeutic Target in Clear Cell Renal Cancer*. J Biol Chem 292, 837-846, (2017).
200. Liu, Z. et al. *A three-molecule score based on Notch pathway predicts poor prognosis in non-metastasis clear cell renal cell carcinoma*. Oncotarget 7, 68559-68570, (2016).

201. Saleeb, R. M. et al. *Integrated Phenotypic/Genotypic Analysis of Papillary Renal Cell Carcinoma Subtypes: Identification of Prognostic Markers, Cancer-related Pathways, and Implications for Therapy*. Eur Urol Focus, (2016).
202. Cancer Genome Atlas Research, N. et al. *Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med 374, 135-145, (2016).
203. Gigante M, Neuzillet Y, Patard JJ, Tillou X, Thuret R, Branchereau J, et al. *Renal cell carcinoma (RCC) arising in native kidneys of dialyzed and transplant patients: are they different entities?* BJU Int 2012;110:E570-3. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11273.x
204. Billis A, Freitas LLL, Costa LBE, Barreto IS, Asato MA, Araujo KS, et al. *Genitourinary Malignancies in Transplant or Dialysis Patients: The Frequency of Two Newly Described 2016 World Health Organization Histopathologic Types*. Transplant Proc 2017;49:1783-5.
205. Griffith JJ, Amin KA, Waingankar N, Lerner SM, Delaney V, Ames SA, et al. *Solid Renal Masses in Transplanted Allograft Kidneys: A Closer Look at the Epidemiology and Management*. Am J Transplant 2017;17:2775-81.
206. Hashimoto Y, Takagi T, Kondo T, Iizuka J, Kobayashi H, Omae K, et al. *Comparison of prognosis between patients with renal cell carcinoma on hemodialysis and those with renal cell carcinoma in the general population*. Int J Clin Oncol 2015;20:1035-41.
207. Neuzillet Y, Tillou X, Mathieu R, Long JA, Gigante M, Paparel P, et al. *Renal cell carcinoma (RCC) in patients with end-stage renal disease exhibits many favourable clinical, pathologic, and outcome features compared with RCC in the general population*. Eur Urol 2011;60:366-73.
208. Klatte T, Marberger M. *Renal cell carcinoma of native kidneys in renal transplant patients*. Curr Opin Urol 2011;21:376-9.
209. Lindgren D, Eriksson P, Krawczyk K, Nilsson H, Hansson J, Veerla S, et al. *Cell-Type-Specific Gene Programs of the Normal Human Nephron Define Kidney Cancer Subtypes*. Cell Rep 2017;20:1476-89.
210. Naiman N, Fujioka K, Fujino M, Valerius MT, Potter SS, McMahon AP, et al. *Repression of Interstitial Identity in Nephron Progenitor Cells by Pax2 Establishes the Nephron-Interstitial Boundary during Kidney Development*. Dev Cell 2017;41:349-65 e3.
211. Bussolati B, Maeshima A, Peti-Peterdi J, Yokoo T, Lasagni L. *Renal Stem Cells, Tissue Regeneration, and Stem Cell Therapies for Renal Diseases*. Stem Cells Int 2015;2015:302792.
212. Fearon ER, Vogelstein B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell 1990;61:759-67.
213. Mehta RL, Cerda J, Burdmann EA, Tonelli M, Garcia-Garcia G, Jha V, et al. *International Society of Nephrology's Oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology*. Lancet 2015;385:2616-43.
214. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, De Maeseneer J, Endre Z, Kellum JA, et al. *Acute kidney injury: an increasing global concern*. Lancet 2013;382:170-9.
215. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. *Acute kidney injury*. Lancet 2012;380:756-66.