



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biomediche

CICLO XXXIV

COORDINATORE Prof. Fabrizio Chiti

Studio delle *pathways* che promuovono la
trasformazione del progenitore renale in cellula di
origine del carcinoma renale papillare

Settore Scientifico Disciplinare MED/14

Dottorando

Dott. Antonelli Giulia

(firma)

Tutore

Prof. Romagnani Paola

(firma)

Coordinatore

Prof. Chiti Fabrizio

(firma)

Anni 2018/2021

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 I carcinomi a cellule renali (RCC).....	1
1.2 Caratteristiche istologiche del carcinoma renale	2
1.3 Caratterizzazione molecolare del tumore renale	7
1.4 Fattori di rischio per il tumore renale	8
1.4.1 Fattori di rischio classici	8
1.4.2 Il danno renale come fattore di rischio per la carcinogenesi renale	11
1.5 La cellula all'origine del tumore renale	16
1.5.1 Ruolo del progenitore renale nella rigenerazione renale dopo AKI	16
1.5.2 Cellule staminali tumorali (CSC).....	18
1.5.3 Ruolo dei progenitori renali nella carcinogenesi renale	24
1.6 Metodo di studio delle componenti cellulari del carcinoma renale: il Single-cell RNA sequencing	25
2. SCOPO DELLA TESI.....	30
3. MATERIALI E METODI.....	31
3.1 Coltura dei progenitori renali umani e analisi di single cell RNA sequencing.....	31
3.2 Infezione dei progenitori renali umani	31
3.3 Coltura 3D dei progenitori renali su organoplate	32
3.4 Saggio di proliferazione cellulare	32
3.5 The Cancer genome atlas (TCGA) database.....	33
3.6 Dataset di pazienti del Human Protein atlas	33
3.7 Microarray.....	33
3.8 Modello murino transgenico	34
3.9 Genotipizzazione dell'animale	35
3.10 Danno renale da ischemia/riperfusion (IRI).....	35
3.11 Misura transcutanea della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) nei topi.....	36
3.12 Raccolta dei tessuti murini.....	36
3.13 Definizione di pRCC nel topo	37
3.14 Immunofluorescenza e analisi confocale.....	37
3.15 Analisi della clonalità	38
3.16 Analisi statistica	38

4. RISULTATI	39
4.1 I progenitori renali rappresentano la cellula di origine del ccRCC e del pRCC.....	39
4.2 Le pathways alterate dopo un evento di AKI promuovono lo sviluppo di pRCC	42
4.3 L'overespressione di NOTCH1 è specifica del pRCC di tipo 2 e presagisce una prognosi sfavorevole nell'uomo	45
4.4 L'iperespressione di NOTCH1 e l'AKI promuovono lo sviluppo di pRCC nel topo.	48
4.5 L'overespressione di NOTCH1 trasforma le RPC e altera la loro capacità di formare strutture tubulari in colture 3D.....	50
4.6 NOTCH1 induce la trasformazione dei progenitori renali promuovendo mitosi aberranti	51
5. DISCUSSIONE.....	55
6. BIBLIOGRAFIA.....	58

1. INTRODUZIONE

Il carcinoma a cellule renali (RCC) rappresenta la neoplasia con il più alto tasso di mortalità tra i tumori urogenitali. Il tumore del rene è spesso asintomatico, e viene quindi diagnosticato tardivamente. Di conseguenza, quasi il 25% dei pazienti presenta una malattia diffusa già al momento della diagnosi, presentando una maggiore resistenza ai trattamenti classici. Pertanto, c'è bisogno di sviluppare nuovi metodi per una diagnosi precoce e accurata e nuove terapie mirate.

Per questo motivo, in questi anni, molti studi si sono focalizzati sull'identificazione della cellula di origine che promuove lo sviluppo dei vari tipi di tumore renale e sulla comprensione dei meccanismi che ne promuovono la trasformazione.

Inoltre, la sempre più evidente associazione tra il danno renale acuto (AKI) e il rischio di sviluppare un carcinoma renale, potrebbe rappresentare un potente strumento diagnostico per la valutazione del rischio del paziente con AKI pregressa di sviluppare un tumore renale nell'arco della vita.

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. 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 (2). 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, meno frequenti sono i tumori ad insorgenza dalla pelvi e dalle vie urinarie (3). L'incidenza aumenta con l'età, con un picco verso i 75 anni, con una frequenza circa doppia per gli uomini rispetto alle donne (3).

I tumori renali possono essere suddivisi in 8 macro-famiglie (4):

- Carcinomi a cellule renali (RCC)
- Tumori metanefrici
- Tumori nefroblastici
- Tumori mesenchimali
- Tumori epiteliali e mesenchimali misti
- Tumori neuroendocrini
- Tumori ematopoietici e linfoidi
- Tumori delle cellule germinali

In questa tesi ci concentreremo sui carcinomi a cellule renali (*renal cell carcinoma*, RCC) che rappresenta il gruppo di tumori renali più cospicuo e più frequente: 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 (5). 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.

1.2 Caratteristiche istologiche del carcinoma renale

La classificazione dei carcinomi a cellule renali si basa sulla morfologia del tumore stesso. L'attuale classificazione istologica dei tumori renali si fonda sulla classificazione di Heidelberg del 1996 che fu poi rivista dalle classificazioni di Rochester del 1997 e dalla classificazione WHO 2004. È stata necessaria una revisione in cui sono stati rivalutati anche i fattori prognostici delle neoplasie renali e una revisione della classificazione che avvenne a Vancouver nel 2013 (6).

Secondo questa ultima classificazione a livello istologico il carcinoma renale presenta le seguenti caratteristiche con valore prognostico:

- Dal punto di vista clinico esistono tre principali istotipi di carcinoma renale: il carcinoma a cellule chiare (80-90%), il carcinoma papillare tipo I e tipo II (10-15%, dei quali 60-70% di tipo I) ed il carcinoma cromofobo (4-5%).

- Aspetti a cellule chiare o granulose, aspetti di crescita papillare o cistica e campi sarcomatoidi possono essere presenti in tumori di diverso istotipo. Il giudizio di istotipo non può quindi basarsi mai su un singolo aspetto morfologico, ma deve tener conto anche delle caratteristiche macroscopiche, di aspetti microscopici citoplasmatici e nucleari.
- Diametro tumorale
- Grado nucleare secondo Fuhrman
- Presenza di necrosi: La presenza di necrosi ha significatività prognostica per il carcinoma a cellule chiare e cromofobo, ma non per il carcinoma papillare.
- Invasione del grasso perinefrico
- Invasione del seno renale: L'invasione di qualsiasi spazio delimitato da un endotelio (indipendentemente dalla sua dimensione) nel contesto del seno renale deve essere considerata infiltrazione del seno renale stesso

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 (6). Il grado di Fuhrman rimane invece il fattore prognostico accreditato di maggior rilevanza per il carcinoma renale a cellule chiare e per quello papillare (6). 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 1) (7).

Classificazione Istologica ISUP/WHO 2016 dei tumori a cellule renali
Neoplasie maligne
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
Neoplasie benigne
Adenoma papillare
Oncocitoma
Neoplasie renali entità emergenti
Carcinoma renale oncocitico insorto dopo neuroblastoma
Carcinoma renale follicolare "tiroide-like"
Carcinoma associato alla traslocazione di ALK
Carcinoma renale con stroma leiomiomatoso

Tabella 1. Classificazione Istologica ISUP/WHO 2016 dei tumori a cellule renali. (7)

- **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% dei pazienti affetti da malattia cistica renale acquisita (8). 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 (9) (10). 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 (7).

- **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 (9, 11, 12). 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 (13, 14). Il tumore papillare è coposto 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 (15). Una variante è costituita da tubuli o piccole papille simili a glomeruli (16). 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 (17). 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 (18). 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 (19-21). 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 (22). 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 (23). Le cellule hanno poi nuclei irregolari e a volte sono binucleate.

1.3 Caratterizzazione molecolare del tumore renale

Il cancro è una malattia altamente eterogenea, una caratterizzazione accurata di questa eterogeneità è essenziale per delineare i meccanismi di patogenesi del cancro, per promuovere strategie di trattamento e identificazione di nuovi bersagli per l'immunoterapia e lo sviluppo di farmaci (24).

L'importanza di identificare e differenziare i sottotipi e anche le varianti rare del carcinoma a cellule renali (RCC) è fondamentale per la gestione e il trattamento dei pazienti affetti da questa malattia. Sebbene la sottotipizzazione istologica divida i tumori in gruppi RCC distinti, è limitata nella sua capacità di fornire un'analisi approfondita dei meccanismi che producono queste differenze. Per questo motivo sono stati condotti numerosi studi che analizzavano l'intero trascrittoma del tumore.

I trascrittomi di massa tumorale per la maggior parte dei tipi di cancro umano sono stati generati nel contesto di numerosi studi sulla genomica del cancro, come quelli condotti dall'International Cancer Genome Consortium (ICGC) e dal Cancer Genome Atlas (TCGA) (25, 26).

La rete di ricerca Cancer Genome Atlas (TCGA) ha condotto una serie di caratterizzazioni molecolari complete in tipi istologici differenti di tumori, tra cui ccRCC, ChRCC e pRCC (27-29). Questi studi hanno rivelato un rimodellamento del metabolismo cellulare nel ccRCC che comporta la sottoregolazione dei geni del ciclo di Krebs, la sovraregolazione dei geni della via dei pentosi fosfati e la diminuzione dell'AMPK nella malattia di stadio superiore, di alto grado e di bassa sopravvivenza. È stato identificato un sottotipo pRCC distinto che era caratterizzato da un fenotipo metilatore dell'isola CpG (CIMP-RCC) e associato a malattia ad esordio precoce, scarsa sopravvivenza e mutazione germinale o somatica del gene fumarato idratasi (FH) (27-29).

In uno studio di Ricketts e colleghi, gli autori hanno valutato 843 RCC dai tre principali sottotipi istologici, inclusi 488 ccRCC, 274 pRCC e 81 chRCC. È emerso che l'alterazione somatica di BAP1, PBRM1 e PTEN e l'alterazione delle vie metaboliche correlate sono associate con la diminuzione della sopravvivenza specifica del sottotipo, mentre l'alterazione di CDKN2A, l'aumento dell'ipermetilazione del DNA e l'aumento dell'espressione genica Th2 correlata al sistema immunitario sono associati con la ridotta sopravvivenza all'interno di tutti i principali sottotipi istologici (30).

Inoltre, di recente, è stato osservato che nei tessuti metastatici di pazienti con ccRCC, il tasso di sopravvivenza a 5 anni, era significativamente maggiore tra i pazienti che mostravano un'espressione positiva di BAP1 (31).

Anche il proto-oncogene MET, che è fisiologicamente espresso dalle cellule tubulari renali, sembra essere coinvolto nello sviluppo di alcuni tipi di tumore. Mutazioni a carico del suo dominio tirosin chinasi che inducono una fosforilazione costitutiva, sono state riscontrate nella maggior parte dei casi di pRCC di tipo 1 (32). MET, tuttavia, sembra avere un ruolo anche nel ccRCC (33).

Recentemente, Lindgren e colleghi analizzando il dataset del TCGA, hanno identificato geni presenti nel tessuto sano che corrispondevano a pattern di geni segmento-specifici o compartimento-specifici rispettivamente nel ratto e nel nefrone umano. Confrontando questi geni con il dataset tumorale, hanno osservato una FOXI1 signature in chRCC, suggerendo che questo sottotipo di RCC derivi da cellule del dotto collettore, e una HNF1 signature nei ccRCC e nei pRCC, suggerendo che questi derivano invece da cellule precursore del tubulo prossimale (34). Quindi l'analisi genetica e genomica completa ha dimostrato che diversi sottotipi di RCC definiti istologicamente sono caratterizzati da mutazioni distintive, alterazioni del numero di copie cromosomiche e modelli di espressione di mRNA, miRNA e lncRNA e che la combinazione della valutazione istologica, combinata con l'analisi trascrittomica forniscono una caratterizzazione tumorale completa (30).

1.4 Fattori di rischio per il tumore renale

1.4.1 Fattori di rischio classici

Tra i fattori di rischio noti per il cancro del rene compaiono età, sesso maschile, obesità, diabete, ipertensione, fumo e fattori genetici (35).

- *Età e sesso*

I tassi di incidenza del cancro del rene aumentano costantemente con l'età, con un picco di incidenza all'età di circa 75 anni (2). Studi epidemiologici riportano che i maschi hanno un rischio due volte maggiore di sviluppare cancro del rene nel corso della loro vita rispetto alle femmine. Secondo un'analisi dell'incidenza mondiale del cancro, i dati per gli anni 1978-2007 indicavano un rapporto di

incidenza dei casi maschi/femmine di 2:1 che era costante per età, anno e regione (36). Dati riportati nel *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database*, per gli anni 2001-2016 mostrano tassi simili nei maschi, con un tasso di incidenza aggiustato per età doppio rispetto a quello femminile negli Stati Uniti (37). Dati dai registri globali hanno rivelato un aumento del 23,04% dell'incidenza standardizzata per età nel cancro del rene tra il 1990 e il 2013 in tutto il mondo, che corrispondeva ad un aumento del 31,19% dei maschi, rispetto all'8,79% delle femmine (38).

- *Obesità*

L'associazione tra il peso corporeo in eccesso e il rischio di cancro del rene è stata ampiamente riportata in coorti prospettiche (39, 40). Il sovrappeso è stato definito come un aumento dell'indice di massa corporea (BMI; in chilogrammi per metro quadrato). Rispetto alla categoria BMI di riferimento ($18,5 \leq 25$ kg/m²), gli individui sovrappeso (BMI, $25 \leq 30$ kg/m²) e obesi (BMI, ≥ 30 kg/m²) hanno un rischio aumentato rispettivamente del 28% e del 77% (39). Uno studio condotto su una coorte prospettica di adolescenti di sesso maschile con BMI misurato all'età di 16-19 anni ha riportato che l'eccesso di peso corporeo all'inizio della vita è associato ad un rischio significativamente più elevato di sviluppare un tumore renale nell'arco della vita (41). Si stima che un BMI elevato sia responsabile del 26% dei casi di tumore del rene in tutto il mondo (42).

- *Diabete*

L'associazione tra diabete mellito e rischio di cancro del rene è stata valutata in diversi studi prospettici, con alcune evidenze di un effetto biologico del diabete indipendente da alcune sue comorbidità, come l'obesità e l'ipertensione (43-45). Una storia di diabete sarebbe associata a un 40 % di aumento di rischio di cancro del rene (43).

- *Iipertensione*

L'ipertensione predispone al tumore renale (46, 47). Studi di coorte prospettici riportano costantemente associazioni dose-risposta tra pressione sanguigna al basale e rischio di cancro del rene (48-51). Anche i farmaci antipertensivi sono stati associati ad un aumento del rischio di cancro del rene, ma è difficile

distinguere l'effetto della condizione dall'effetto del trattamento (52). In uno studio con misurazioni ripetute della pressione sanguigna nel tempo, è stata osservata una diminuzione del rischio con la riduzione della pressione sanguigna (53). Ciò indica che è più probabile che la condizione ipertensiva, piuttosto che il trattamento, sia il fattore di rischio. L'ipertensione sembra anche essere biologicamente indipendente dall'obesità nell'aumentare il rischio di cancro del rene, con un effetto cumulativo tra gli individui che presentano entrambe le condizioni (48, 53).

- *Fumo*

Il fumo di tabacco è stato classificato come cancerogeno per i reni dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro e dal Dipartimento della salute e dei servizi umani degli Stati Uniti (54, 55). L'entità dell'effetto sul rischio di cancro del rene è modesta, con un aumento del rischio di circa il 30% in fumatori attuali e un aumento del rischio del 15% negli ex fumatori rispetto ai non fumatori (56).

- *Fattori genetici*

La maggior parte dei casi di tumore renale sono sporadici, solo il 3-5% si verificano in un contesto familiare (57). La sindrome di Von Hippel-Lindau è la sindrome genetica più comune associata ad un aumento del rischio di cancro del rene e rappresenta circa l'1% dei casi di carcinoma renale a cellule chiare (58). I pazienti con questa sindrome presentano una mutazione del gene oncosoppressore VHL, questo ha come target il fattore trascrizionale HIF-1 (hypoxia-induced factor 1) provocandone l'attivazione anche in condizioni di normossia. Di conseguenza vi è un aumento della trascrizione di alcuni geni chiave regolati da HIF, tra i quali VEGF, PDGF, TGF- β , EGFR, IGF, GLUC1, EPO, CXCR4, che a loro volta promuovono la neoangiogenesi, la crescita cellulare, il trasporto del glucosio ed i processi di metastatizzazione (59). Alcune varianti genetiche comuni associate al rischio di cancro del rene sono state scoperte attraverso studi di associazione sull'intero genoma e finora risultano implicati 13 loci (60).

1.4.2 Il danno renale come fattore di rischio per la carcinogenesi renale

Nella ricerca delle cause sconosciute del cancro del rene, gli studi epidemiologici hanno identificato diversi “fattori di rischio” per i quali non è sempre evidente un nesso causale diretto con la cancerogenesi. Obesità, diabete, ipertensione, fumo, farmaci nefrotossici e metalli pesanti promuovono tutti anche un danno a livello renale, sia acuto (AKI) che cronico (CKD), e possono essere collegati indirettamente ai tassi di cancro del rene correlati al danno (61-63).

- CKD (*Chronic kidney disease*)

La malattia renale cronica (CKD) è una patologia molto diffusa e in progressiva espansione in tutto il mondo, colpisce circa il 10% della popolazione mondiale. È caratterizzata dall’alterazione della funzione renale, che negli stadi più avanzati può portare a dialisi e trapianto (63).

Studi prospettici suggeriscono che la CKD causa direttamente lo sviluppo del tumore renale, in particolare dell'istotipo ccRCC che rappresenta il 70%-80% dei tumori del rene. Uno studio di follow-up su 33.346 soggetti, di età compresa tra 26 e 61 anni al basale con un follow-up mediano di 28 anni, ha mostrato che una moderata insufficienza renale cronica al basale aumentava il successivo rischio di cancro del rene (64). Inoltre, anche obesità e diabete, che promuovono la malattia renale cronica, possono promuovere lo sviluppo di RCC. Il legame tra queste due condizioni è rappresentato dal sovraccarico metabolico delle cellule del tubulo prossimale nei nefroni residui che subiscono un drastico aumento dell'iperfiltrazione del singolo nefrone (e dell'iperriassorbimento tubulare) (65). Questo determina il danno corticale cronico e la CKD nei pazienti con obesità e diabete, con possibile successivo sviluppo di ccRCC, che tipicamente origina dalle cellule del tubulo prossimale corticale (segmento S1/S2) (65).

-AKI (*acute kidney injury*)

Il danno renale acuto (AKI) è una condizione patologica molto frequente nella pratica clinica ed è ancora oggetto di dibattito 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 (66).

Recentemente, nel nostro gruppo di ricerca, abbiamo dimostrato che il danno renale acuto, in particolare il danno da ischemia-riperfusion, può essere un fattore di rischio per lo sviluppo di uno o più tipi di RCC (67).

Abbiamo infatti esaminato il database ospedaliero dell'Ospedale Universitario di Careggi di Firenze di tutti i pazienti con RCC (n = 1618) che hanno subito un intervento chirurgico tra il 2012 e il 2018. Abbiamo recuperato informazioni di laboratorio per 468 pazienti con un follow-up minimo di un anno prima della diagnosi del tumore. Gli episodi di AKI erano identificati nella storia clinica dei pazienti in 76 su 468 (16,2%) casi, corrispondenti a una stima del tasso di incidenza di 420 episodi di AKI per 10.000 persone per anno, mentre il tasso atteso nella popolazione generale va da 50 a 150 per 10.000 persone per anno (68, 69). Per confermare l'associazione osservata tra episodi di AKI e RCC, abbiamo analizzato uno studio di coorte nazionale in Danimarca (popolazione di 5,4 milioni) utilizzando database medico basati sulla popolazione (70, 71).

Abbiamo selezionato tutti i pazienti con diagnosi ospedaliera di AKI tra il 1977 e il 2006. Tra 12.480 pazienti con diagnosi di AKI, 7 (0,06%) sono stati diagnosticati con RCC entro il primo anno, e 14 (0,1%) sono stati diagnosticati con RCC più di un anno dopo il primo episodio di AKI. Confrontando il numero osservato di RCC con il numero atteso calcolato in base all'età e tassi di incidenza del cancro sesso-specifici nella popolazione generale danese (1,6 nel primo anno e 6,7 casi di cancro negli anni successivi) ha portato al calcolo dei rapporti di incidenza standardizzati per lo sviluppo di RCC di 4,4 (95% CI, da 1,7 a 9,0) 1 anno dopo l'episodio di AKI e di 2,1 successivamente (IC 95%, 1,1-3,5). Questi risultati suggeriscono che gli episodi di AKI si associano ad un rischio aumentato di sviluppare RCC (67).

Inoltre, abbiamo valutato se gli episodi di AKI si associano ad un aumento del rischio di sviluppare ccRCC e/o pRCC, i due tumori più frequenti che rappresentano rispettivamente circa il 75 e il 15% degli RCC (72). La frequenza di episodi di AKI precedenti allo sviluppo del tumore era significativamente più alta nei pazienti con pRCC rispetto a controlli interni non tumorali. Non si osservava nessuna differenza significativa per quanto riguarda i ccRCC (67) (Tabella 2).

	pRCC (n=56)	Controls (n=101)	p^(a)
Previous AKI episodes	12/56 (21.4%)	7/101 (6.9%)	0.008
Age at surgery (years)	65.3 ± 11.7	63.7 ± 9.9	0.184
Gender (male)	47/56 (83.9%)	65/101 (64.4%)	0.009
Preoperative CKD (eGFR < 60)	10/56 (17.9%)	11/101 (10.9%)	0.219
DM	8/56 (14.3%)	14/101 (13.9%)	0.942
Length of follow-up (years)	4.6 ± 2.8	4.3 ± 2.9	0.571
Variable	OR	(95%CI)	p^(b)
AKI (y/n)	3.479	(1.135 - 10.667)	0.029
Age (years)	0.979	(0.947 - 1.012)	0.213
Gender (M/F)	2.907	(1.250 - 6.761)	0.013
CKD (y/n)	1.093	(0.377 - 3.163)	0.870
DM (y/n)	0.715	(0.258 - 1.978)	0.518
	ccRCC (n=75)	Controls (n=101)	p^(a)
Previous AKI episodes	9/75 (12.0%)	7/101 (6.9%)	0.247
Age at surgery (years)	66.6 ± 9.3	63.7 ± 9.9	0.047
Gender (male)	48/75 (64.0%)	65/101 (64.4%)	0.961
Preoperative CKD (eGFR < 60)	12/75 (16.0%)	11/101 (10.9%)	0.320
DM	11/75 (14.7%)	14/101 (13.9%)	0.880
Length of follow-up (years)	4.2 ± 2.2	4.3 ± 2.9	0.916
Variable	OR	(95%CI)	p^(b)
AKI (y/n)	1.549	(0.514 - 4.664)	0.437
Age (years)	0.971	(0.939 - 1.004)	0.085
Gender (M/F)	0.945	(0.516 - 1.852)	0.945
CKD (y/n)	1.202	(0.463 - 3.115)	0.706
DM (y/n)	0.888	(0.366 - 2.155)	0.793

Tabella 2: L'AKI è un fattore di rischio per lo sviluppo di pRCC, ma non di cCRCC nell'uomo. In tabella sono riportati i dati clinici dei pazienti con pRCC, ccRCC e dei controlli. Tra i gruppi l'analisi statistica (a) è stata condotta utilizzando il Mann-Whitney U test o il chi-quadro test. L'analisi di regressione logistica binaria (b) è stata utilizzata per l'associazione tra pregressi episodi di AKI e lo sviluppo di pRCC, corretta per età, sesso, malattia renale cronica (CKD) e diabete mellito (DM). P values ≤ 0,05 sono indicati in grassetto (67).

Un'ulteriore analisi multicentrica ha mostrato che i pazienti sottoposti a resezione tumorale per pRCC e che hanno avuto un episodio di AKI postoperatorio avevano un rischio maggiore di recidiva tumorale rispetto a chi non ha avuto un episodio di AKI postoperatorio, suggerendo che il danno ischemico promuove la crescita tumorale(67). Questa associazione è stata ulteriormente confermata in un modello sperimentale di AKI, dove utilizzando un innovativo modello murino transgenico, abbiamo osservato che l'AKI promuove lo sviluppo a lungo termine di tumori promuovendo la crescita del tumore (67) (Figura 1). Gli animali presentavano l'insorgenza di adenomi papillari da 3 a 9 mesi dopo ischemia, che in alcuni casi si trasformavano in pRCC secondo la sequenza classica adenoma-carcinoma (67) (Figura 1A-D). Nel modello murino, gli adenomi e i carcinomi papillari erano maggiormente di pRCC di tipo 1, e per lo più localizzati nella porzione esterna della midollare esterna, laddove il danno ischemico colpisce maggiormente le cellule del segmento S3 dei tubuli prossimali(67, 73). Tramite l'utilizzo di un modello murino transgenico, basato sull'espressione stocastica di uno dei quattro fluorocromi del reporter Confetti a livello delle cellule epiteliali tubulari (Pax8+), è stato possibile condurre un'analisi della clonalità di questi tumori. È emerso che sia i pRCC di tipo 1 che quelli di tipo 2 che si sviluppavano nell'animale a 36 settimane dal danno erano per lo più di un singolo colore, l'analisi clonale ha rivelato infatti che più del 95% dei tumori papillari di tipo 1 e 2 erano monoclonali (Figura 1E). L'analisi tridimensionale (3D) ha inoltre confermato che questi tumori hanno invaso il parenchima renale e mostravano caratteristiche di vascolarizzazione aberrante, confermando la crescita invasiva tipica dei carcinomi (Figura 1F-G). Si può pertanto concludere che i pRCC che si sviluppano a seguito di un danno renale acuto originano dall'espansione clonale di una singola cellula tubulare (67).

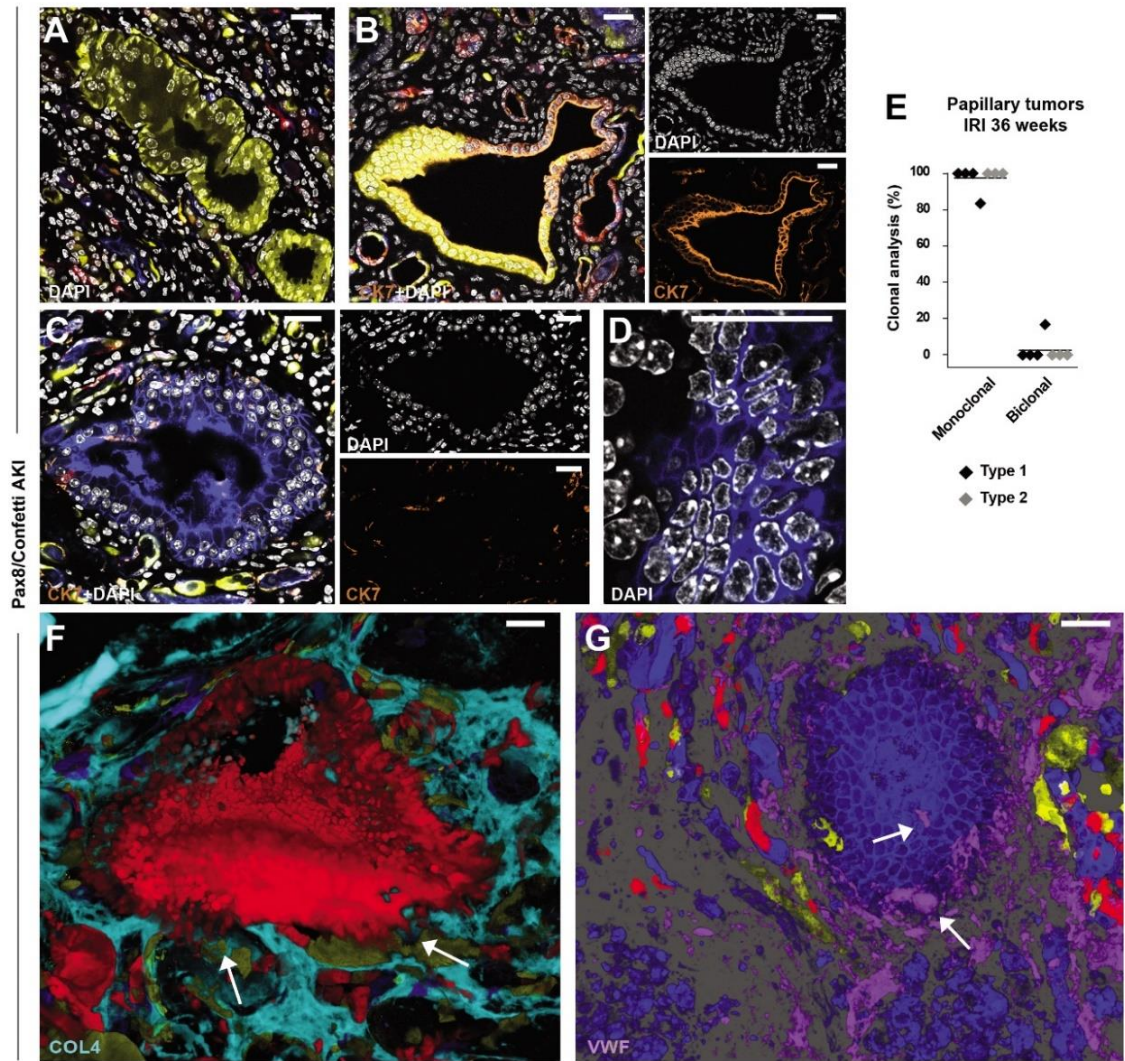


Figura 1. L'AKI induce i tumori papillari nel topo.

A) Immagine confocale rappresentativa di un pRCC di tipo 1 nel topo Pax8/Confetti a 36 settimane dopo l'IRI. Bar, 25 μ m. (B) Immagine confocale di un tumore papillare di tipo 1 positivo per la citocheratina 7 (CK7) in un topo Pax8/Confetti a 36 settimane dopo IRI. Bar, 25 μ m. (C) Immagine confocale di un tumore papillare di tipo 2 dai reni di topo Pax8/Confetti a 36 settimane dopo l'IRI negativo per la CK7. Bar, 25 μ m. (D) Dettaglio delle atipie nucleari in un tumore papillare di tipo 2 da reni di topo Pax8/Confetti a 36 settimane dopo l'IRI. bar, 25 μ m. (E) Analisi clonale dei tumori di tipo 1 e 2 nel topo Pax8/Confetti a 36 settimane dopo IRI. (F e G) Ricostruzione 3D di pRCC rappresentativi. (F) Marcatura di un pRCC per il collagene IV (COL4) (ciano). Le frecce indicano l'invasione. (G) Marcatura di un pRCC per il fattore di Von Willebrand (VWF) (viola). Le frecce indicano vascolarizzazione tumorale. Bar, 25 μ m. (67)

1.5 La cellula all'origine del tumore renale

1.5.1 Ruolo del progenitore renale nella rigenerazione renale dopo AKI

La regione S3 della porzione esterna della midollare esterna è quella più colpita dal danno ischemico (74, 75). Questa regione presenta un ambiente microvascolare che è estremamente vulnerabile all'ipoperfusione, all'ipossia renale e al danno mitocondriale (75, 76). Per molto tempo si è ritenuto che il processo di riparazione a seguito di un danno renale acuto fosse a totale carico delle cellule prossimali tubulari differenziate, che andavano incontro ad un processo di dedifferenziazione per poi rimpiazzare le cellule tubulari perse (77-80). Questa visione è però in netto contrasto con il fatto che i pazienti che hanno avuto un AKI, molto frequentemente vanno incontro a insufficienza renale cronica (CKD). Di recente, è stato dimostrato che la rigenerazione tubulare coinvolge una popolazione di cellule progenitrici renali, che è in grado in seguito ad un danno di differenziare e dare origine a una nuova cellula tubulare (73, 81).

Questa popolazione di progenitori (RPC) è stata identificata 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 (82, 83). La scoperta dei progenitori CD24+ CD133+ 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 (84), 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 (Figura 2)(85).

Inoltre, Angelotti e colleghi hanno distinto i progenitori CD24+ CD133+ in due popolazioni in base all'espressione della molecola CD106 (81). 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. 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 (81). 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 (81). Ciò conferma che il fenotipo di queste cellule è distinto da quello di cellule tubulari differenziate, almeno nell'uomo. La prova definitiva dell'esistenza delle RPC nel rene adulto e del loro coinvolgimento nei processi rigenerativi endogeni si è avuta utilizzando un modello transgenico nel quale le RPC murine sono marcate grazie all'espressione di un fluorocromo e possono essere così effettuati studi di lineage tracing. Non essendo possibile utilizzare nel topo le stesse molecole che nell'uomo identificano popolazioni staminali, come il CD133 e il CD24, si è scelto di utilizzare la molecola Pax2 per poterle identificare, dato che questa marca selettivamente popolazioni staminali durante la nefrogenesi e colocalizza con il CD133 nell'uomo (86). Con questo modello è stato dimostrato che i progenitori della capsula del Bowman rigenerano i podociti ed anche che è possibile modulare farmacologicamente la loro funzione rigeneratrice (87).

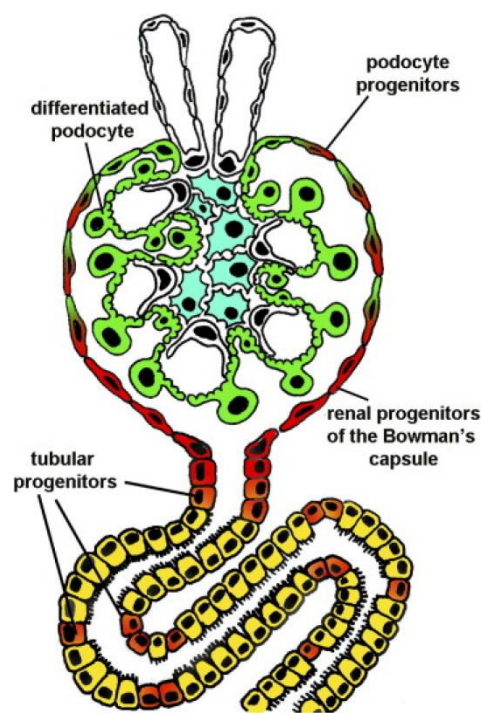


Figura 2. Illustrazione della localizzazione delle RPC. Le RPC CD133+ CD24+ (rosse) localizzate al polo urinario sono in stretta contiguità con le cellule renali tubulari (gialle) e con i podociti (verdi) al polo vascolare. Le RPC CD133+ CD24+ CD106- sono sparse lungo il tubulo (arancioni). (85)

Recentemente, utilizzando un ulteriore modello murino transgenico di lineage tracing, è stata inoltre fornita la prova rivoluzionaria che il rene risponde ad un danno renale acuto attraverso due meccanismi (Figura 3): 1. la spiccata resistenza alla morte delle RPC e la loro espansione clonale permette di rigenerare i segmenti di tubuli persi; 2. le cellule tubulari differenziate sopravvissute vanno incontro ad ipertrofia endociclo-mediata. L'endociclo è un ciclo cellulare alternativo in cui le cellule passano attraverso cicli successivi di fase S e G senza citochinesi con conseguente poliploidia (73). Questa risposta è stata probabilmente sviluppata dalle cellule per tollerare condizioni di alta richiesta metabolica e per migliorare rapidamente la funzione renale nelle primissime fasi che seguono un evento di AKI; tuttavia, l'aumento di cellule poliploidi possono rappresentare un rischio per lo sviluppo del cancro.

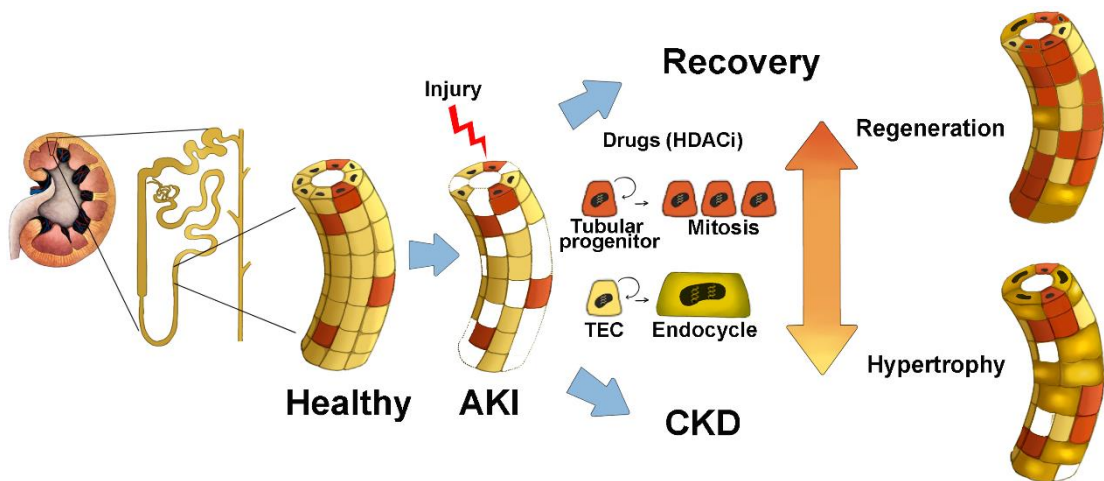


Figura 3. Schema che illustra i meccanismi di risposta renale dopo AKI (73).

1.5.2 Cellule staminali tumorali (CSC)

I tumori sono strutture eterogenee composte da diversi tipi di cellule cancerose, ciascuna popolazione cellulare presenta variazioni nel metabolismo, nell'espressione di recettori e ligandi e alterazioni della struttura epigenetica della cromatina, come recentemente sottolineato dalla loro caratterizzazione molecolare tramite sequenziamento genomico (88-92). L'identificazione di tipi cellulari specifici all'interno di un tumore che avviano o mantengono la tumorigenesi fornisce informazioni preziose e consente una migliore comprensione della biologia del tumore, nonché lo sviluppo di nuovi trattamenti. La cellula di origine del cancro, o cellula che inizia il tumore (TIC), è una cellula normale che sostiene le mutazioni che portano alla formazione del tumore (93). Le cellule che mantengono la crescita e la propagazione del tumore sono le cellule

staminali del cancro (CSC) (93). Tuttavia, l'uso della terminologia TIC o CSC è talvolta ridondante, poiché la distinzione tra le due popolazioni non è bene definita. Le CSC possiedono due caratteristiche principali: capacità di self-renewal e multipotenza. Il self-renewal consente una divisione cellulare illimitata e il mantenimento del pool di cellule staminali nel tumore. La multipotenza consente alle CSC di dividersi e creare una progenie che continua a dividersi fino a produrre cellule specializzate e differenziate in modo terminale (94) (Figura 4, (95)). Inoltre, le CSC possono da sole originare una massa tumorale indefinitamente, dopo il trapianto in topi immunodeficienti.

Di fatto, il test del trapianto del tumore costituisce il gold standard nell'identificazione delle CSC in quanto può fornire prove sia di auto-rinnovamento che di potenza multilineare delle CSC (96). Consiste nell'impiantare una presunta popolazione di CSC in topi immunodeficienti, e se le cellule danno origine a tumori serialmente trapiantabili che ricapitolano l'eterogeneità cellulare dei tumori parentali, possono essere

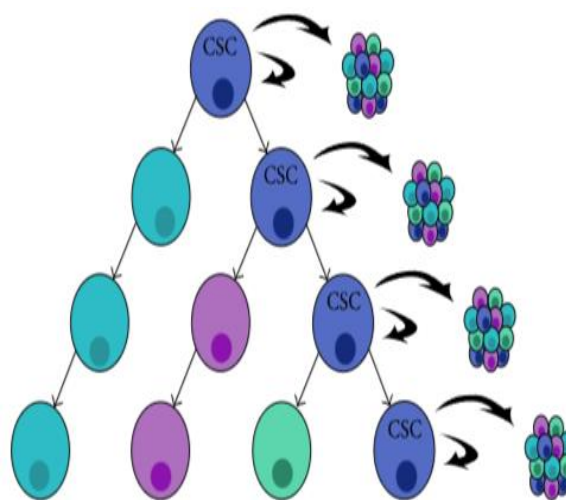


Figura 4. Modello della cellula staminale del cancro. Il tumore forma una massa eterogenea e solo cancer stem cell (CSC) ha la capacità di self-renewal e differenziare in altri tipi cellulari. (95)

definitivamente qualificate come CSC. D'altra parte, i TIC possono essere definiti mediante esperimenti di lineage tracing, che consentono di definire la cellula di origine della trasformazione nei modelli murini (96). L'uso di promotori specifici delle cellule consente di etichettare sottopopolazioni cellulari distinte, consentendo il monitoraggio di cloni derivati da singole cellule. Questa metodologia ci permette di valutare il destino delle singole cellule che si trasformano e formano un tumore e di identificarle definitivamente come TIC. Conseguentemente, i TIC identificati possono essere isolati e utilizzati nel trapianto seriale per valutare le loro proprietà di CSC.

Sulla base di quello che è stato osservato nelle forme tumorali di altri organi, si è cercato di capire se anche le neoplasie che colpiscono il rene, ed 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.

Ci sono stati numerosi studi che hanno cercato di isolare e caratterizzare una popolazione di CSCs a livello delle cellule tubulari, usando diversi marcatori cellulari e test funzionali. Non si è ancora trovato un possibile marcatore di CSCs “universale” che possa essere utilizzato per identificare le CSCs in qualsiasi forma tumorale. Per cui la ricerca delle putative CSCs in RCC è stato fatto con l’utilizzo dei seguenti marcatori: CD105, CD133, CD44 e CXCR4.

- *CD105*

CD105, è una molecola transmembrana di superficie che fa parte del complesso del recettore del fattore di crescita trasformante- β (TGF- β). Regola la proliferazione, la differenziazione e la migrazione cellulare e ha un ruolo importante nell'angiogenesi (97). Nel 2008 Bussolati et al. ha proposto CD105 come marker di cellule staminali originanti il tumore (98). Le cellule CD105+ isolate da campioni di pazienti con RCC rappresentavano meno del 10% delle cellule tumorali totali ed esprimevano i marcatori delle cellule staminali mesenchimali CD44, CD90, CD146, CD73 e CD29 e il marcatore mesodermico vimentina (VIM), ed i marcatori delle cellule staminali embrionali NANOG, OCT4, Musashi, e Nestina ed il marcatore renale embrionale Pax2, ma mancavano marcatori epiteliali differenziativi come la citocheratina. Queste cellule erano clonogeniche e potevano generare sfere in un mezzo di coltura cellulare specifico, che è considerata una caratteristica importante delle CSC. Queste cellule non esprimevano il marker CD133, un marcatore noto di cellule progenitrici tubulari umane adulte (81, 99). Inoltre, Dubinski et al. ha mostrato che CD105 è un marker prognostico sfavorevole nel ccRCC (100). In effetti, i pazienti con un livello di espressione di CD105 più elevato avevano una sopravvivenza significativamente più breve e uno stadio tumorale più elevato. CD105 è un indicatore importante dell'esito clinico e potrebbe diventare un possibile target terapeutico.

- *CD133*

CD133 è una glicoproteina a cinque domini transmembrana ed ed identifica diversi tipi di cellule staminali e progenitrici nei tessuti umani adulti, anche per scopi clinici (101). Bruno et al. Hanno sortato le cellule CD133+ e CD133- da pazienti con RCC e hanno mostrato che le cellule CD133+ da sole non hanno

indotto la formazione di tumori in topi immunodeficienti, ma cotrapiantate con cellule della linea cellulare K1 RCC hanno portato a un miglioramento dello sviluppo e della crescita dei tumori. Questo effetto non è stato imputato alla natura tumorigenica delle cellule CD133+ poiché sono stati osservati effetti identici utilizzando cellule CD133+ da reni normali, ed è stato ipotizzato che le cellule CD133+ presenti nel tumore potrebbero essere migrate dal tessuto renale sano. È interessante notare che la neovascolarizzazione era di origine umana, come dimostrato dalla presenza di HLA umani di classe I e CD31, che indicano le cellule CD133+ come loro origine, risultati confermati dall'ibridazione in situ fluorescente per l'espressione del cromosoma X umano (102). Galleggiante et al. Hanno identificato e caratterizzato una popolazione di CSC CD133+/CD24+ derivate da ccRCC (103). Il profilo di espressione genica ha identificato la proteina di trasporto del rame 2 (CTR2) come marcatore di membrana per questa popolazione neoplastica. CTR2 nei pazienti con RCC ha avuto un ruolo importante nella resistenza a base di cisplatino. Le cellule CD133+/CD24+/CTR2+ non esprimevano marcatori mesenchimali ed erano più indifferenziate rispetto alle cellule progenitrici renali adulte tubulari. Queste cellule hanno presentato capacità di auto-mantenimento e differenziazione in vitro e potrebbero indurre una risposta angiogenica in vivo. Lindgren et al. ha isolato una popolazione di cellule ALDHhigh da tessuto corticale renale umano adulto, che esprimeva anche CD133 e VIM (99, 104). Hanno dimostrato che questa popolazione CD133+/VIM+ di progenitori tubolari-commessi dimostra una significativa somiglianza trascrizionale con pRCC e coesprimono VIM, cheratina 7 (KRT7) e KRT19, un pattern caratteristico del pRCC. Inoltre, le cellule VIM+/KRT7+/KRT19+ sono state osservate negli adenomi corticali, neoplasie renali benigne. Questi risultati suggeriscono che il pRCC si sviluppa da queste cellule progenitrici e che gli adenomi corticali possono rappresentare un passaggio intermedio benigno durante questo processo oncogeno. Il significato clinico dell'espressione di CD133 nell'RCC umano è controverso e varia notevolmente tra gli studi (105). Da Costa et al. ha utilizzato un anticorpo policlonale anti-CD133, che ha marcato strutture epiteliali diffusamente differenziate nei reni embrionali e adulti, e ha scoperto che i pazienti nel gruppo a bassa espressione di CD133 avevano una maggiore probabilità di morte per RCC e progressione della malattia (106).

D'Alterio et al. Hanno invece utilizzato un anticorpo monoclonale anti-CD133/1 che ha riconosciuto selettivamente i progenitori renali e non ha visto alcuna correlazione con le caratteristiche patologiche cliniche o la prognosi del paziente (107). Tuttavia, altri due studi che hanno utilizzato l'anticorpo monoclonale anti-CD133 hanno mostrato risultati contrastanti. Zhang et al. hanno osservato che l'espressione di CD133 era correlata al grado, allo stadio e al tipo istologico e alla posizione del tumore (108). La prognosi dei pazienti con CD133 high, CD44 high, mimetismo vascolare positivo e bassa densità di microvasi era peggiore di quella dei pazienti con CD133low, CD44low, mimetismo vascolare negativo e alta densità di microvasi. Kim et al. hanno riportato che alti livelli di espressione di CD133 sono stati osservati in ccRCC con morfologia più differenziata e sono stati associati a un pattern macro/microcistico, cambiamenti non sarcomatoidi e malattia non metastatica e quindi lo considererebbero un marker prognostico favorevole (109). Uno studio di follow-up dello stesso gruppo ha mostrato che il CD133 può fungere da marker prognostico favorevole nel pRCC, in quanto correlato con le piccole dimensioni del tumore, il basso grado nucleare di Fuhrman e la sopravvivenza (110). Sono quindi necessari ulteriori studi sul significato dell'espressione di CD133 nell'RCC.

- *CXCR4*

CXCR4 è un recettore alfa-chemochine specifico per il fattore-1 di derivazione stromale (SDF-1, chiamato anche CXCL12), una molecola dotata di una potente attività chemiotattica. È stato scoperto che CXCR4 è un marker prognostico in vari tipi di cancro e svolge un ruolo nella proliferazione cellulare e nella migrazione delle cellule tumorali (111). L'asse CXCL12/CXCR4 forma ponti di comunicazione critici tra le cellule tumorali e le cellule stromali per creare un microambiente permissivo per la crescita e la metastasi del tumore. Schrader et al. hanno analizzato l'espressione e la funzione di CXCL12 α /CXCR4 in linee cellulari RCC umane (A-498, Caki-1, Caki-2 e HA-7), campioni di RCC di pazienti e tessuto renale normale corrispondente (112). Hanno osservato che nessuna delle quattro linee cellulari RCC esprimeva CXCL12, mentre le cellule A-498 esprimevano CXCR4. Ancora più importante, i campioni di RCC hanno mostrato una ridotta espressione di CXCL12 e una maggiore espressione di CXCR4, rispetto

al rispettivo tessuto renale sano adiacente, rivelando un ruolo nella progressione del tumore. Gassenmaier et al. hanno confrontato due linee cellulari RCC, RCC-26 e RCC-53, nella loro capacità di formare sfere in vitro e di stabilire tumori in vivo (113). Hanno osservato differenze nei livelli di espressione delle chemochine, poiché CXCR4 era presente solo nella linea cellulare più tumorigenica RCC-53. Le cellule CXCR4+ presentavano caratteristiche CSC, come una maggiore resistenza agli inibitori della tirosina chinasi, una maggiore capacità di formare sfere e un potenziale di induzione della crescita tumorale in vivo, ed esprimevano alti livelli di produttori associati alle cellule staminali NANOG, OCT3/4 e SOX2. Recentemente Micucci et al. hanno mostrato che l'aumentata attività di auto-rinnovamento delle sfere CXCR4+ è stata preceduta dalla sovraregolazione del fattore 2α inducibile dall'ipossia (HIF2 α) nelle linee cellulari RCC Caki-1, Caki-2, 786-O e 769-P (114). Il knockdown di HIF2 α ha abrogato l'espressione di CXCR4 e la formazione di sfere, mentre l'inibizione di HIF2 α ha abolito la crescita del tumore in vivo, rivelando il ruolo cruciale dell'attivazione di HIF2 α nell'espansione delle CSC. Numerosi studi mostrano che un'elevata espressione di CXCR4 nei campioni tumorali di pazienti con RCC è correlata a un esito sfavorevole (107, 115, 116). Inoltre, CXCR4 è significativamente correlato alle caratteristiche biologiche dello stadio del tumore, inclusi stadio, grado Fuhrman e presentazione clinica (117).

- CD44

L'antigene CD44 è una glicoproteina della superficie cellulare coinvolta nelle interazioni cellula-cellula e nell'adesione e migrazione cellulare. CD44, è un marcatore CSC ampiamente descritto in diversi carcinomi umani (118). Nella linea cellulare embrionale umana 293T, Debeb et al. descritto cellule CD44+/CD24- con diverse caratteristiche CSC (119). Sebbene la natura delle CSC sia ancora oggetto di dibattito, i carcinomi umani CD44+ sono altamente maligni e resistenti alla terapia e la presenza di CD44 ha dimostrato di conferire un aumento del potenziale metastatico, proprietà spesso associate alle CSC (108, 118). Il CD44 è strettamente associato a proliferazione, metastasi, recidiva del cancro e prognosi nell'RCC (120). Lime et al. ha suggerito che l'espressione di CD44 nell'RCC fornisce utili informazioni prognostiche sia nell'RCC primario che

in quello metastatico e può aiutare a determinare la terapia appropriata (120). Una meta-analisi della letteratura eseguita da Li et al. ha rivelato che un'elevata espressione di CD44 è un marcatore prognostico povero per la sopravvivenza globale a cinque anni e si correla con un alto grado Fuhrman e recidiva (121). Un possibile meccanismo di sovraregolazione dell'espressione di CD44 nel ccRCC è stato proposto nel 2016 da Ma et al. (122). Hanno osservato che circa un terzo dei campioni tumorali esprimeva CD44, senza alcuna correlazione con l'esito clinico, ma associato a un'alta densità di macrofagi associati al tumore. Esperimenti in vitro utilizzando linee cellulari RCC e macrofagi umani hanno dimostrato che l'espressione di CD44 è aumentata in seguito alla cocoltura diretta con i macrofagi. Il silenziamento o la soppressione da parte degli inibitori NF- κ B del TNF- α sui macrofagi ha abolito l'aumentata espressione di CD44 nell'RCC. Questo studio suggerisce che il TNF- α derivato dai macrofagi associati al tumore è collegato alla sovraregolazione di CD44 tramite la segnalazione di NF- κ B nel ccRCC (122). Anche se la natura del CD44 come marcatore CSC non è chiara, il suo ruolo nella tumorigenicità del RCC rimane degno di nota e ulteriori indagini potrebbero rivelare interessanti applicazioni cliniche.

1.5.3 Ruolo dei progenitori renali nella carcinogenesi renale

Molti studi suggeriscono che i progenitori renali possono avere un ruolo cruciale in molti tipi di cancro del rene, (123-125), nell' AKI (67) e nella CKD (87, 126, 127).

Già nel 2011, Lindgren e colleghi (99) hanno dimostrato una somiglianza nel trascrittoma tra la popolazione di progenitori tubulari isolati dalla frazione tubulare della porzione corticale del rene e le cellule che costituiscono i pRCC; in particolar modo le cellule RCC esprimono gli stessi marcatori dei progenitori tubulari come vimentina, KRT7, KRT19 e il CD133. Questo suggerisce quindi che la CSC in queste forme tumorali possono essere proprio i progenitori tubulari, che in seguito ad alterazioni genomiche e perdita dei meccanismi di controllo della proliferazione, portano all'insorgenza del tumore e soprattutto possono essere loro legate alla malignità di queste forme tumorali (99).

Inoltre, è stata osservata un'identica espressione di questi marcatori anche in adenomi corticali, i quali sembrano essere lesioni del tessuto renale che precedono quelle tumorali. Un ulteriore studio ha mostrato che un subset dei progenitori renali VCAM1+

è dotato di elevata resistenza alla morte, capacità proliferativa e capacità di differenziazione multipotente (81).

Due studi recenti supportano l'idea che l'angiomiolipoma, un tumore del rene formato da cellule del sistema vascolare, muscolo liscio e adipociti, che si osserva nello 0,3-3% della popolazione adulta e può essere associato con RCC, origina dall'espansione clonale di un sottoinsieme di cellule epiteliali renali multipotenti (123, 124). Entrambi gli studi di Goncalves e Cho suggeriscono che l'angiomiolipoma deriva da cellule epiteliali renali CD133+ CD24+. Queste comprendono sia le cellule epiteliali parietali della capsula di Bowman, sia la popolazione di progenitori del compartimento tubulare, che normalmente rappresenta il 2-4% del totale delle cellule renali. Queste cellule in determinate condizioni sono in grado di generare le diverse linee coesistenti nelle forme sporadiche di angiomiolipoma e nelle forme genetiche associate alle mutazioni del TSC (Tuberous sclerosis complex) (123, 124).

Uno studio di Young del 2018, ha ulteriormente confermato l'esistenza di una cellula del tubulo prossimale che potrebbero essere quella che dà origine al tumore renale, sia di tipo papillare che a cellule chiare (125).

1.6 Metodo di studio delle componenti cellulari del carcinoma renale: il Single-cell RNA sequencing

L'eterogeneità del tumore gioca un ruolo importante nella sua progressione ed è particolarmente importante comprendere a fondo i profili di espressione genica delle singole cellule (128-130). I metodi di sequenziamento comuni combinano migliaia di sottopopolazioni di cellule. Quindi i rari cloni cellulari, che possono svolgere un ruolo importante nella progressione del tumore, non vengono rilevati. È infatti impossibile con le metodiche di sequenziamento tradizionale tracciare con precisione le singole mutazioni cellulari nel processo di progressione del tumore (131). I metodi di sequenziamento di nuova generazione (NGS) possono essere utilizzati per valutare l'eterogeneità del tumore, per tenere traccia dei cambiamenti all'interno del microambiente tumorale e per valutare l'evoluzione selettiva delle cellule tumorali durante il corso del trattamento (132).

L'analisi dell'RNA a singola cellula basata sul sequenziamento di nuova generazione (scRNA-seq) supera i limiti dei metodi tradizionali di sequenziamento dell'RNA,

misurando l'intero trascrittoma con una risoluzione di singola cellula e distinguendo diversi tipi di cellule nel tessuto tumorale. Inoltre, ciò consente una comprensione più chiara dei meccanismi molecolari che promuovono l'insorgenza del tumore e rivela le mutazioni somatiche nel corso dell'evoluzione del tumore (133). Il scRNA-seq di tumori in diversi punti temporali può identificare mutazioni geniche chiave, nonché il cambiamento dinamico dell'eterogeneità del tumore nel tempo. Inoltre, questo metodo consente il monitoraggio di rare mutazioni cellulari durante i processi di insorgenza e sviluppo del tumore, come l'acquisizione di capacità invasive e metastatiche, nonché l'infiltrazione e l'attivazione di cellule immunitarie e altri processi importanti (134). La ricerca sulle tecnologie scRNA-seq ha visto un aumento significativo negli ultimi anni, fornendo così nuove opportunità e approcci strategici per il trattamento clinico del cancro.

L'analisi di scRNA-seq può fornire informazioni complete sull'espressione genica e sulle mutazioni di singoli nucleotidi nelle singole cellule tumorali e fornire nuove conoscenze nel processo di metastatizzazione del tumore primario. Ad esempio, Chen et al. (135) hanno identificato geni differenzialmente espressi nelle cellule in migrazione. Hanno scoperto stati di transizione epitelio-mesenchimale intermedi (EMT) e distinte sottopopolazioni epiteliali e mesenchimali di cellule migratorie, indicando così che le cellule del cancro al seno migrano rapidamente pur mantenendo uno stato epiteliale. Inoltre, hanno anche identificato nuovi geni correlati con la migrazione cellulare come potenziali biomarcatori prognostici e bersagli terapeutici per bloccare la metastatizzazione (135).

Anche Kyu-tae e colleghi. hanno chiarito l'eterogeneità trascrizionale nella metastasi del ccRCC utilizzando la tecnica di scRNA-seq. Il principale cambiamento genetico nel ccRCC è il gene oncosoppressore von Hippel-Lindau (VHL), la cui deregolamentazione porta a cambiamenti nell'invasione del tumore, nelle metastasi e nel metabolismo. Attraverso l'analisi dei dati ottenuti tramite sc-RNA-seq, gli autori hanno scoperto che l'elevata espressione di EGFR e Src nel carcinoma a cellule renali metastatico potrebbe essere utilizzata come bersaglio per la terapia (136).

Nell'ultimo decennio, l'analisi di scRNA-seq è stata ampiamente adottata come potente strumento per identificare la cellula di origine dei diversi istotipi tumorali. Fino ad ora, la cellula di origine dei vari sottotipi di RCC è ancora sconosciuta. Dato che il tubulo renale contiene da 10 a 20 diversi sottotipi di cellule epiteliali (137), non tutte le cellule

tubulari possono essere suscettibili di trasformazione neoplastica. Inoltre i tumori in genere contengono una ampia varietà di cellule cancerose e non cancerose che contribuiscono tutti alla biologia del tumore. Ecco perché effettuare l'identificazione del tipo cellulare di origine degli RCC è un compito difficile, che con le tecniche tradizionali non è facilmente perseguibile.

Ad oggi, l'espressione genica in tali tumori è stata profilata utilizzando metodi di analisi del trascrittoma alla rinfusa (come nel caso degli studi del TCGA), fornendo una misura trascrittomica unica per ciò che, in sostanza, rappresenta molti tipi di cellule. Utilizzando la tecnologia di scRNA-seq è invece possibile decostruire un tumore nelle sue componenti cellulari.

Lo sviluppo e l'applicazione della tecnologia di sequenziamento dell'RNA a singola cellula supporta inoltre la teoria delle cellule staminali del cancro. La cellula staminale del cancro (CSC) è un fattore importante nella causa dell'eterogeneità del tumore. Come accennato in precedenza, in questo modello, il tessuto tumorale è suddiviso in cellule staminali cancerogene e sottoinsiemi di cellule non cancerogene. Le CSC possono dividere ed espandere il pool di CSC e differenziarsi in tipi eterogenei di cellule tumorali non cancerogene. Si ritiene che le CSC abbiano il potenziale per guidare la crescita del tumore e promuovere la progressione della malattia e siano associate a metastasi a distanza e resistenza al trattamento (138, 139).

Fendler e colleghi, recentemente hanno sviluppato una procedura per isolare le CSC dai ccRCC e le hanno analizzate tramite scRNA-seq (140). Il profilo trascrizionale e il sequenziamento a singola cellula hanno mostrato che le vie di segnalazione di Wnt e Notch risultano attivate in queste CSC. Gli autori hanno utilizzato le CSC dei tumori per produrre tre modelli: colture di sfere non adese, organoidi 3D e tumori PDX (patient-derived xenograft in topi immunodeficienti). Hanno trattato ogni modello con inibitori di piccole molecole che hanno come bersaglio Wnt e Notch, dimostrando che specifiche popolazioni di pazienti possono trarre beneficio dalla soppressione delle vie di Wnt e Notch (141). Inoltre, gli autori hanno utilizzato il scRNA-seq per determinare il grado di eterogeneità all'interno della popolazione delle CSC. Questa analisi ha prodotto tre sottopopolazioni, due delle quali hanno mostrato un'elevata espressione di marcatori noti per essere associati alle cellule staminali e allo sviluppo renale. Queste due popolazioni hanno anche mostrato un'alta espressione delle componenti delle vie di segnalazione di WNT e NOTCH e un'alta espressione dai corrispondenti geni bersaglio

(140). Questo studio suggerisce un possibile ruolo di una sottopopolazione di cellule staminali nello sviluppo e nella progressione del tumore.

Recentemente, nello studio del 2018, precedentemente citato, Young e collaboratori hanno caratterizzato, tramite scRNA-seq, le popolazioni cellulari presenti in due dei sottotipi più comuni di RCC, il ccRCC e il pRCC. Gli autori hanno analizzato 72501 trascrittomi a singola cellula di tumori renali e tessuti sani (125). Una volta caratterizzate le popolazioni cellulari all'interno del tessuto sano (Figura 5), hanno caratterizzato le popolazioni cellulari provenienti da 3 casi di ccRCC e da 1 caso di pRCC (Figura 5).

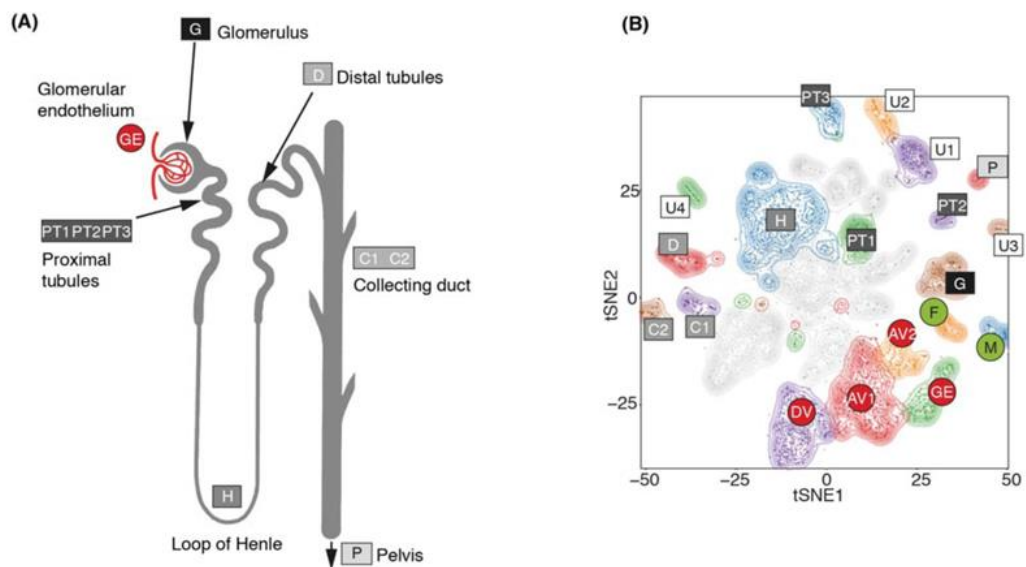


Figura 5: Popolazioni cellulari del rene sano adulto. (A) Illustrazione dell'anatomia del nefrone con la localizzazione dei vari cluster. (B) Rappresentazione tSNE di 8.707 cellule epiteliali e vascolari nel rene sano (125).

Confrontando le cellule di ccRCC e pRCC con le cellule del tessuto sano, è emerso un cluster di cellule del tubulo prossimale, definito PT1, caratterizzato dall'espressione di VCAM1 (vascular cell adhesion molecule-1), SLC17A3 (solute carrier family 17 member 3) e dall'assenza di espressione di SLC7A13 (solute carrier family 7 member 13) che presentava un trascrittoma sovrapponibile a quello delle cellule che compongono i pRCC e i ccRCC (125) (Figura 6).

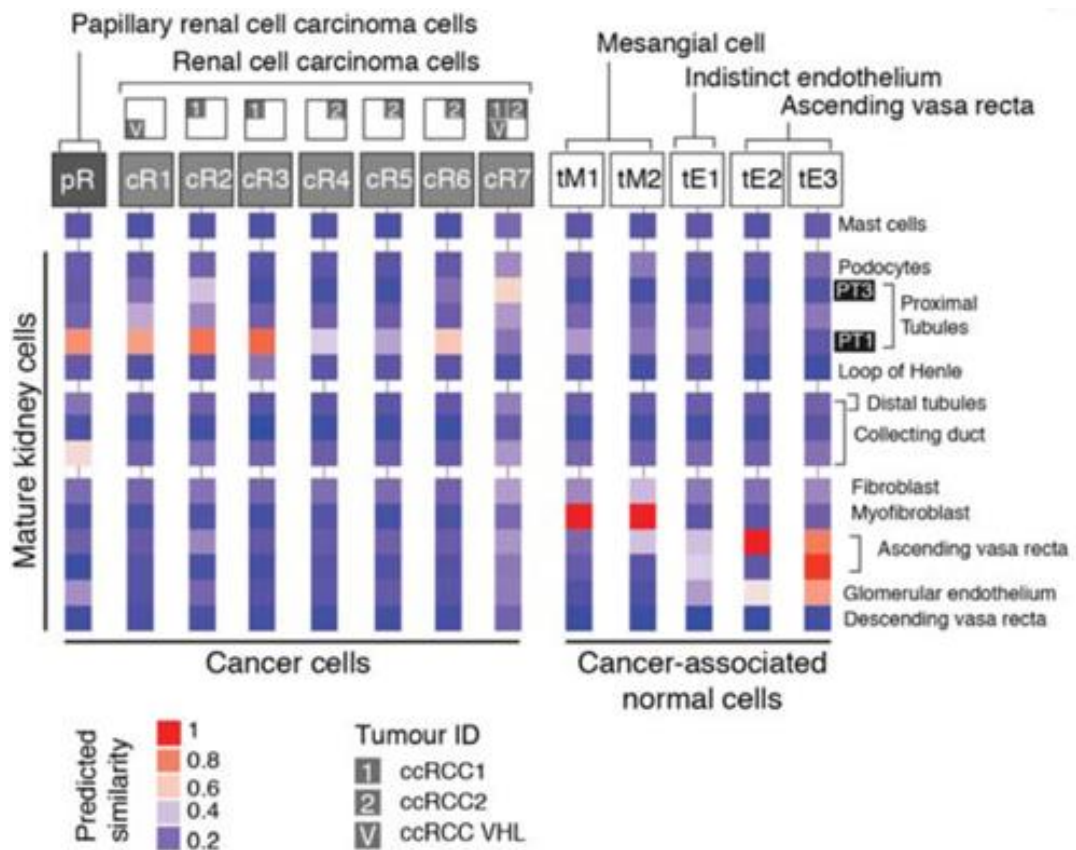


Figura 6. Confronto tra i trascrittomi di cellule del rene sano con cellule tumorali di pRCC e ccRCC. I colori rappresentano la probabilità che il cluster identificato nell'intestazione della colonna sia "simile" al cluster delle popolazioni del rene indicate nelle righe (125).

L'identificazione di questa sottopopolazione di cellule del tubulo prossimale, esprimenti il VCAM1, ci ha fatto ipotizzare una possibile omologia con la popolazione di cellule progenitrici renali, che come descritto in precedenza, sono caratterizzate dalla coespressione di CD133 e VCAM1 (81) (Figura 7).

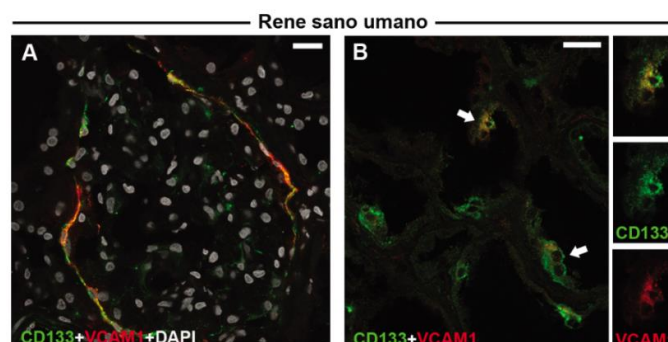


Figura 7. Immagini confocali rappresentative di un glomerulo(A) e di tubuli (B) di un rene sano marcati con CD133 (verde) e VCAM1 (rosso). Le frecce indicano i progenitori renali CD133+CD24+. Bar 25 μ m (67).

2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni, una serie di studi ha attribuito l'origine del carcinoma papillare renale ad una sottopopolazione di cellule del tubulo prossimale. In particolare, lo studio del 2018 di Young e colleghi (125), ci ha fatto ipotizzare che la popolazione, denominata PT1, identificata nei pRCC e nei ccRCC e caratterizzata dall'espressione del VCAM1, abbia un profilo simile a quello delle cellule progenitrici renali CD133+ VCAM+.

Quindi scopo di questa tesi è stato, in prima analisi, quello di andare a confrontare, tramite sequenziamento dell'RNA a singola cellula (scRNAseq), il trascrittoma delle cellule progenitrici renali umane in coltura, con il trascrittoma delle cellule di pRCC e ccRCC dello studio di Young.

Una volta identificata la cellula di origine del pRCC e del ccRCC, il secondo obiettivo di questo lavoro è stato quello di identificare le *pathways* coinvolte nella trasformazione neoplastica.

Il danno renale acuto (AKI), è stato recentemente dimostrato essere un fattore di rischio per lo sviluppo di pRCC nell'uomo (67), e dato che la cellula che ipotizziamo essere la cellula di origine del pRCC è il progenitore renale, che ha un ruolo chiave nella rigenerazione tubulare in seguito ad un danno renale acuto (73), siamo andati ad analizzare le *pathway* che vengono modulate in seguito ad un evento di AKI.

Per lo studio, di queste *pathway* ci siamo avvalsi dei dati depositati nel Cancer Genome Atlas, ipotizzando che tra queste alcune siano specifiche per lo sviluppo di pRCC per poi andare a modulare la loro espressione nella popolazione di cellule che ipotizziamo essere la cellula di origine del tumore, per comprendere a fondo i meccanismi coinvolti nella loro trasformazione neoplastica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Coltura dei progenitori renali umani e analisi di single cell RNA sequencing

Le cellule progenitrici renali (RPC) sono state ottenute secondo il metodo messo a punto da Sagrinati e collaboratori (84), sono state messe in coltura per l'espansione in terreno EGM-MV (endothelial Cell Growth Medium) supplementato con il 20% di siero fetale bovino (FBS, Hyclone, Euroclone, Milano, Italia) in fiasca (Corning 75 cm² flask canted neck).

Le RPC umane sono state successivamente raccolte e filtrate utilizzando il filtro Flowmi Tip (Miltenyi Biotec) per rimuovere agglomerati e detriti, ed è stata eseguita la valutazione della vitalità con tripan blu (Sigma-Aldrich) e ioduro di propidio (Miltenyi Biotec) /Calcein AM (Invitrogen). La sospensione a singola cellula con una vitalità del 98% è stata eseguita su uno strumento 10x Chromium Single Cell (10x Genomics) seguendo le istruzioni del produttore, come precedentemente descritto (137). Le librerie sono state costruite come descritto in precedenza (137) e sono state sequenziate tramite la piattaforma Illumina NextSeq550 (Illumina Inc.). Successivamente i dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi bioinformatica. Per l'analisi dei dati di scRNAseq dei PRCC e ccRCC, ci siamo avvalsi del dataset dello studio di Young e colleghi (125).

3.2 Infezione dei progenitori renali umani

L'NICD1 umano (5275-7332 bp) è stata clonata nel vettore lentivirale bicistronico pLVX-IRES-ZsGreen1 (Clontech) che porta il gene di interesse e la proteina fluorescente ZsGreen1 a essere coespressi simultaneamente da un singolo trascritto di mRNA, come precedentemente descritto (142). Particelle lentivirali (ZsGreen1-mock e ZsGreen1-NICD1) sono state prodotte dalla co-trasfezione del vettore lentivirale e 3 vettori di packaging di terza generazione in cellule Lenti-X 293T (Clontech).

I progenitori renali umani sono stati infettati con un surnatante contenente virus con un MOI (multiplicity of infection) di 15 e terreno EGM-MV, in presenza di 8 µg/mL di polybrene (Sigma-Aldrich). L'entità dell'infezione è stata valutata misurando le

percentuali di cellule ZsGreen1-positive con un citofluorimetro MacsQuant (Mylteni Biotech). Le percentuali di cellule infette variavano dal 92% al 99%.

Per l'imaging confocale e la colorazione H&E di colture 2D, 20.000 cellule progenitrici renali umane infettate sono state seminate in Lab-Tek II Chamber Slide System (Nunc, Thermo Fisher Scientific).

Per l'analisi della mitosi, le cellule infette sono state sincronizzate mediante doppio blocco di timidina (143).

3.3 Coltura 3D dei progenitori renali su organoplate

Per le colture 3D dei progenitori renali infettati (n=3 replicati biologici) è stato utilizzato un dispositivo microfluidico OrganoPlate 2-line (9603-400-B) di MIMETAS con 96 chip indipendenti per la coltura cellulare. Per preparare i chip alla deposizione delle cellule è stata preparata una soluzione gel contenente 4 mg/mL di Collagene I (AMSBio Cultrex 3D Collagen I Rat Tail, Cat. 3447-319 020-01) in 100 mM HEPES (Life Technologies, 15630), 3,7 mg/mL NaHCO₃ (Sigma 320 S5761) e tenuta in ghiaccio per mantenerla in stato liquido e poi inserita in volume di 1,6 µL in ogni canale di ingresso della matrice. La piastra è stata poi messa per 15' in incubatore a 37° C con un'inclinazione di 70° per la solidificazione del gel e la formazione del menisco lungo la Phaseguide. In seguito sono stati selezionati tramite microscopio ottico i chip in cui è avvenuta la corretta formazione della matrice, ovvero quei chip dove la matrice ha formato un menisco integro, che non invade il canale di perfusione. Sono state quindi inserite 30000 RPC per chip. il dispositivo è stato sistemato orizzontalmente sul Mimetas Perfusion Rocker™ Mini all'interno dell'incubatore e il terreno di coltura è stato cambiato 2 volte a settimana. Le cellule sono state fissate 20 minuti in PF4% prima di procedere alla marcatura con falloidina.

3.4 Saggio di proliferazione cellulare

I progenitori renali sono stati infettati con lentivirus ZsGreen1-mock o ZsGreen1-NICD1 come descritto precedentemente (Paragrafo 3.10). La proliferazione cellulare è stata valutata dopo 72 ore dall'infezione. A tal fine, le cellule sono state trattate per otto ore con 4 µCi [3H] timidina/ml (Amersham), poi congelate a -80°C, e infine raccolto su un foglio in fibra di vetro con un raccoglitore automatico di cellule (Tomtec, Wallac). La radioattività dei filtri a secco è stata misurata scintillazione liquida (1205 Betaplate,

Wallac). Gli esperimenti sono stati ripetuti indipendentemente con quattro diverse colture di progenitori renali.

3.5 The Cancer genome atlas (TCGA) database

Per comprendere le potenziali vie eziopatogeniche coinvolte nel pRCC, abbiamo utilizzato il database dei pazienti del Cancer Genome Atlas Research Network (28). Abbiamo considerato come fattori di rischio per pRCC: sesso (maschile), età, esposizione al fumo, espressione di NOTCH1, e mutazioni su geni precedentemente descritti come specifici per pRCC (MET, FH, CDKN2A, SETD2/BAP1/PBRM1 e la pathway di NFR2/ARE. L'RPPA era disponibile in 125 dei 161 pazienti inclusi nel database.

3.6 Dataset di pazienti del Human Protein atlas

Abbiamo analizzato la probabilità di sopravvivenza di tutti i pazienti con pRCC (n=285) depositati nel registro del Human Protein atlas (150) sulla base dell'espressione di PRKAA2, PARD6G, HNF1B, and CCNE1.

3.7 Microarray

L'RNA totale è stato estratto dai progenitori renali umani infettati con ZsGreen1-mock o ZsGreen1-NICD1 (n=3 replicati biologici per ciascuna condizione) utilizzando l' RNeasy Microkit (Qiagen). L'intero array del genoma per la profilazione dell'espressione a livello genico è stato eseguito utilizzando Affymetrix Human GeneChip Clariom S, presso l'Unità Genomica di Cogentech (Milano, Italia). I dati sono stati analizzati utilizzando il Software Partek Genomics Suite. Successivamente, abbiamo analizzato i dati utilizzando il software GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) (144). Abbiamo applicato la GSEA ai dati del microarray descritti sopra, utilizzando tutta la collezione di set di geni caratteristici curata dal Broad Institute. Questi set di geni sono stati generati da un sistema computazionale basato sull'identificazione di sovrapposizioni di set di geni e sulla conservazione dei geni che mostrano un'espressione coordinata (145). Abbiamo eseguito la GSEA utilizzando la nostra annotazione del chip per il test Clariom S.

3.8 Modello murino transgenico

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 (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 e con il ceppo Confetti, per ottenere un modello quadruplo transgenico (Pax2/NICD1/Confetti) (Figura 8).

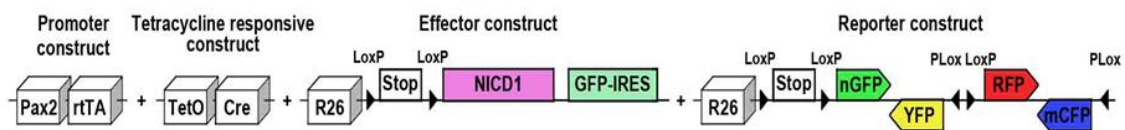


Figura 8: Schema del topo transgenico Pax2.rtTA;TetO.Cre;R26.NICD1.GFP;R26.Confetti (Pax2/NICD1/Confetti).

I topi sono stati genotipizzati come riportato di seguito. La ricombinazione genica del reporter è stata indotta a 5 settimane di età mediante somministrazione di 4 mg/ml di doxiciclina iclato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparata in acqua con aggiunta di saccarosio al 2,5% (Sigma-Aldrich) per 10 giorni, seguiti da una settimana di washout. 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. Il reporter Confetti, in seguito all'induzione, ha permesso la marcatura stocastica delle cellule mediante ricombinazione permanente di un singolo gene codificante una tra le 4 proteine fluorescenti (RFP, YFP, GFP o CFP), con cellule GFP presenti ad una frequenza più bassa rispetto agli altri colori ed estremamente rare (73). 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 (73).

Gli animali, dopo la settimana di washout, sono stati sottoposti ad un danno da ischemia riperfusione e sacrificati 4 settimane dopo il danno (n = 4 topi WT e n = 5 topi Pax2/NICD1/Confetti). Alcuni animali (n=6 topi Pax2/NICD1/Confetti) non sono stati sottoposti al danno e sono stati sacrificati a 4 settimane dalla fine del periodo di induzione come controllo.

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.

3.9 Genotipizzazione dell'animale

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 estratto usando la precipitazione con isopropanolo (Sigma-Aldrich). I primer e i parametri di PCR per il relativo transgene acquistato sono stati ottenuti dal sito internet della Jackson Laboratory o secondo la procedura precedentemente descritta (73, 87).

3.10 Danno renale da ischemia/riperfusione (IRI)

Gli animali sono stati anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di ketamina (100 mg/kg, Ketavet, Intervet Productions Srl) / xilazina (10 mg/kg, Xilor, Bio98 SrL), che ha prodotto un'anestesia chirurgica a breve termine con una buona analgesia. Gli animali sono stati tenuti al caldo 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 (73). 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 (73).

3.11 Misura transcutanea della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) nei topi

I topi sono stati anestetizzati con isoflurano. Sono stati quindi rasati sul dorso per permettere l'alloggio, tramite nastro biadesivo di un dispositivo di registrazione miniaturizzato costituito da due diodi che emettono luce, un fotodiodo 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.). Dopo aver rimosso il dispositivo, 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 (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 (73).

3.12 Raccolta dei tessuti murini

Tutti gli animali sono stati sacrificati in camera a CO₂; 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 μm di spessore e sono state preparate per la colorazione

con ematossilina ed eosina (H&E). Le immagini H&E sono state acquisite con il microscopio ottico Leica DM750, con obiettivo 40x.

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 sucrosio 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, ed infine congelati.

3.13 Definizione di pRCC nel topo

Per discriminare i tumori papillari dalla proliferazione tubulare, le lesioni sono state considerate come tumorali solo se acquisivano la classica morfologia con le papille.

Sono stati inoltre valutati i seguenti parametri:

1. Morfologia del nucleo, utilizzando i criteri descritti nelle linee guida WHO (7).
2. Neovascolarizzazione, utilizzando un marker vascolare specifico (Von Willebrand factor).
3. Invasione, considerate come capacità del tumore di invadere la membrana basale.

3.14 Immunofluorescenza e analisi confocale

Le analisi di microscopia confocale sono state condotte su sezioni di rene murino di 10 µm di spessore, e su progenitori umani messi in coltura nei vetrini multicamera o nell'Organoplate utilizzando un microscopio confocale Leica SP8 STED3X (Leica Microsystems). Per generare le ricostruzioni 3D abbiamo utilizzato il software Leica Application Suite X (Leica Microsystems). I singoli piani delle z-stack sono stati ottenuti da sezioni di rene di 50 µm di spessore e le immagini acquisite ogni 0,3 µm.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-collagene IV (COL4, Abcam, Cat# ab6586), anti-von Willebrand factor (VWF, Agilent, Cat# A0082), anti-phospho-histone H3 (H3-SER10) (Cell Signaling Technology Cat# 9701), and anti-α-tubulin (Sigma-Aldrich Cat# T6074). Gli anticorpi secondary Alexa-Fluor sono stati ottenuti dalla Molecular probes. Per la marcatura del citoscheletro delle cellule, è stata utilizzata la falloidina Alexa Fluor 546 (Molecular Probes Cat# A22283).

Per l'acquisizione confocale degli animali con il reporter Confetti, l'acquisizione è stata impostata lunghezza d'onda di eccitazione di 405 nm (CFP), 488 nm (GFP), 514 nm (YFP)

e 543 nm (RFP). I nuclei sono stati controcolorati con DAPI (Life Technologies), che è stato eccitato con un laser UV.

3.15 Analisi della clonalità

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

3.16 Analisi statistica

Le curve Kaplan-Meier sono state generate per valutare la sopravvivenza:

- 1) NOTCH1, PTEN, e SMAD4 RPPA (reverse-phase protein array) signal in pazienti affetti da pRCC, o NOTCH1 (utilizzando il 50th percentile come valore di cut-off) in pazienti con pRCC di tipo1 o 2 ottenuti dai dataset del TCGA research network)
- 2) Espressione di PRKAA2, PARD6G, HNF1B, and CCNE1 (utilizzando la migliore espressione come valore di cut-off) in pazienti affetti da pRCC ottenuti dal the Human Protein Atlas.

Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con il log-rank test. Inoltre per ogni Kaplan-Meier, è stato costruito un modello di regressione di Cox per fornire un hazard ratio (HR) e un intervallo di confidenza (IC) del 95%.

Per valutare invece l'effetto delle differenti variabili sulla prognosi di pRCC, è stato costruito un modello di regressione logistica multiplo, considerando gli stadi TNM>2 come variabili dipendenti; mentre tutti gli altri parametri precedentemente descritti come fattori di rischio noti per pRCC sono stati utilizzati come covariate.

Le comparazioni tra gruppi sono state eseguite con il Mann-Whitney test, con la correzione di Bonferroni.

4. RISULTATI

4.1 I progenitori renali rappresentano la cellula di origine del ccRCC e del pRCC

Basandoci sullo studio di Young del 2018 (125), abbiamo confrontato il set di dati di scRNAseq ottenuti da campioni di ccRCC e di pRCC del suo studio, con i dati scRNAseq ottenuti da colture primarie di cellule progenitrici renali umane sane, ottenute nel nostro laboratorio. Abbiamo precedentemente riportato che i progenitori renali sono costituiti da una popolazione di progenitori multipotenti caratterizzata dalla co-espressione di CD133 (PROM1), CD24 e VCAM-1 localizzati al polo urinario della capsula di Bowman o sparsi principalmente nel tubulo prossimale (81) (Figura 7).

In prima analisi, abbiamo confrontato un totale di 5244 cellule di cui 1468 cellule di ccRCC e 3776 cellule ottenute dalla coltura di progenitori. L'analisi ha identificato 8 distinti cluster di cellule (Figura 9A). Abbiamo osservato la presenza dei marker caratteristici della popolazione PT1 descritta da Young nel cluster numero 4 delle cellule del ccRCC: CD133, VCAM1, SLC17A3 e negativo per SLC7A13 (Figura 9B). Inoltre è emersa la presenza di un cluster di progenitori renali (cluster 0) che corrispondeva al cluster di cellule ccRCC della PT1 (cluster 4) (Figura 9C).

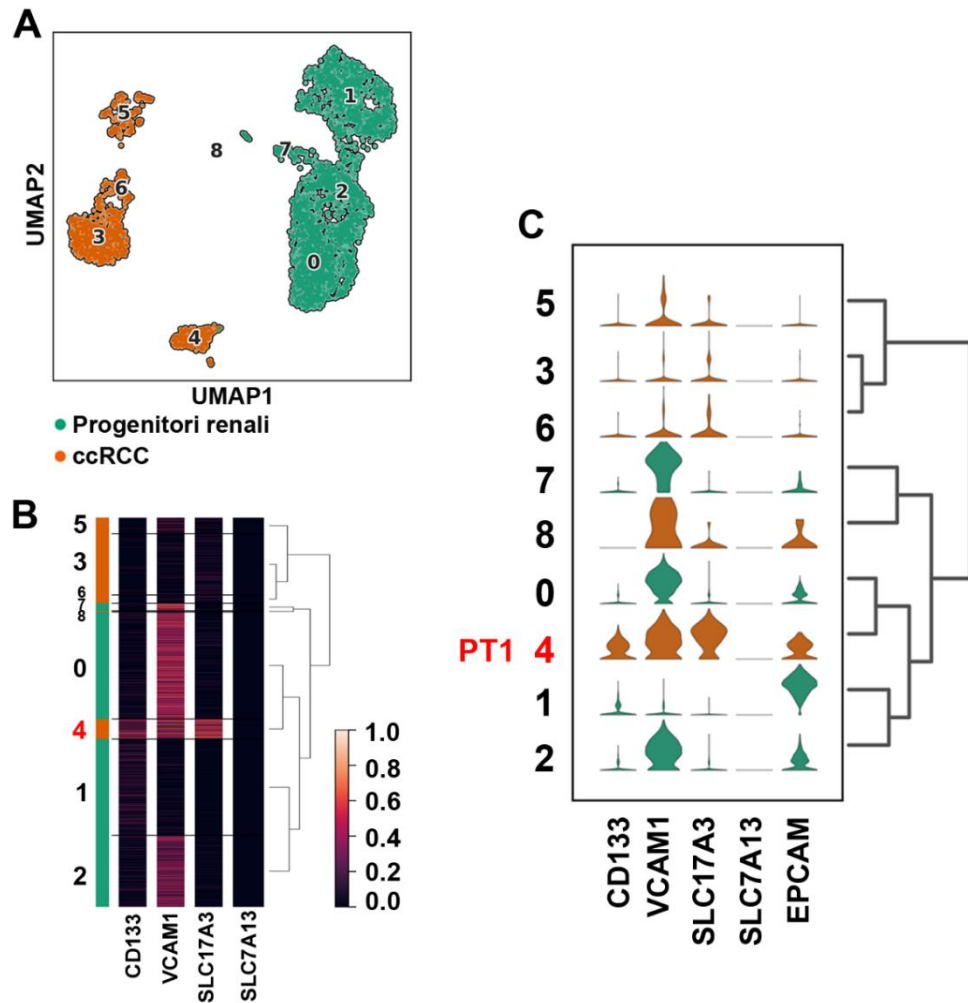


Figura 9. (A) Rappresentazione UMAP di 5244 cellule, tra cui 1468 cellule di ccRCC (arancioni) e 1468 progenitori renali umani (verdi). (B) Espressione dei geni caratteristici della PT1 e dei progenitori renali (CD133). (C) Violin plots di dati scRNA-seq da cellule di ccRCC(arancioni) e da colture di progenitori renali umani (verdi), raffiguranti geni selezionati. VCAM1, vascular cell adhesion molecule; EPCAM, epithelial cell adhesion molecule; SLC17A3, solute carrier family 17 member 3; SLC7A13, solute carrier family 7 member 13.

Successivamente, abbiamo ripetuto lo stesso tipo di analisi, confrontando il nostro dataset ottenuto dalla coltura di progenitori renali umani con quello del pRCC di Young. Abbiamo osservato sette popolazioni trascrizionalmente distinte (Figura 10A), quattro derivanti dal dataset del pRCC di Young (le popolazioni 1, 3, 4, e 5) e tre dai nostri dati sulle cellule progenitrici (popolazioni 0, 2 e 6). Il cluster 5 delle cellule pRCC è caratterizzato dall'espressione dei marcatori VCAM1, SLC17A3 e dall'assenza del marcatore SLC7A3 (PT1 signature). Come osservato con l'analisi condotta per i ccRCC, anche per i pRCC, il cluster della PT1 mostrava un pattern di espressione dell'mRNA

simile ai cluster di cellule progenitrici 0 e 6 (Figura 10, B e C). Tutti e tre i cluster esprimono oltre ai geni della PT1, anche il CD133 (PROM1), il PAX2, così come il marcatore EPCAM (epithelial cell adhesion molecule) e il VCAM1.

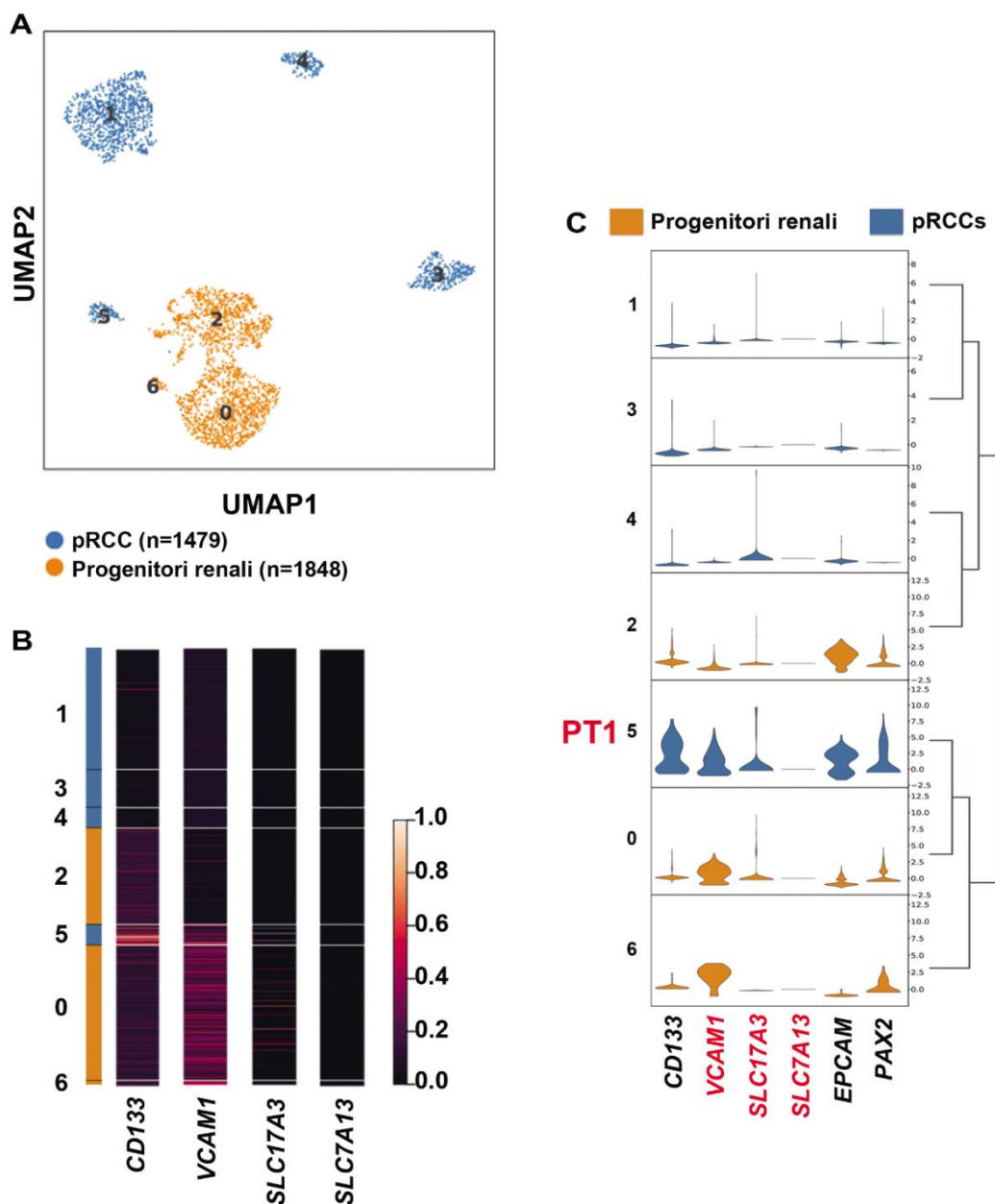


Figura 10. (A) Rappresentazione UMAP di 3327 cellule, tra cui 1479 cellule di pRCC (blue) e 1848 progenitori renali umani (arancioni). (B) Espressione dei geni caratteristici della PT1 e dei progenitori renali (CD133). (C) Violin plots di dati scRNA-seq da cellule di pRCC (blue) e da colture di progenitori renali umani (arancioni), raffiguranti geni selezionati. VCAM1, vascular cell adhesion molecule; EPCAM, epithelial cell adhesion molecule; SLC17A3, solute carrier family 17 member 3; SLC7A13, solute carrier family 7 member 13.

Questi risultati dimostrano che il cluster PT1 identificato nel ccRCC e nel pRCC ha un trascrittoma sovrapponibile a quello delle RPC, e quindi si può concludere che la cellula progenitrice renale è la cellula che dà origine sia al ccRCC che al pRCC.

4.2 Le pathways alterate dopo un evento di AKI promuovono lo sviluppo di pRCC

Come accennato in precedenza, abbiamo dimostrato che l'AKI rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di pRCC nell'uomo, mentre non sembra avere nessun valore prognostico ai fini dello sviluppo del ccRCC. Inoltre, L'AKI è in grado di promuovere lo sviluppo a lungo termine di pRCC di tipo 1 e 2, ma non di ccRCC, in un modello murino di danno da ischemia/riperfusionazione (67). Abbiamo quindi deciso sulla base dei dati preliminari di focalizzare la nostra attenzione sulle *pathways* che sono coinvolte nello sviluppo del pRCC, e di lasciare per studi futuri lo studio dei meccanismi coinvolti nel ccRCC. Ci siamo quindi chiesti se ci fossero delle *pathways* caratteristiche che si attivano in seguito ad un evento di AKI, che si associano a particolari sottotipi di pRCC.

Per questo motivo, abbiamo analizzato le *pathways* che vengono modulate in seguito all'AKI incluse nel protein array depositato nel The Cancer Genome Atlas (TCGA) ottenuto da 161 pazienti con pRCC (28). Tra le *pathways* identificate abbiamo osservato una ridotta espressione di mTOR (mammalian target of rapamycin), della β -catenina, del VHL (Von Hippel-Lindau) e un aumento dell'espressione di NOTCH1 e tutte si associavano ad uno stadio avanzato di pRCC (T3-T4) al momento della diagnosi (Figura 11A). Abbiamo inoltre condotto un'analisi della sopravvivenza, che ha evidenziato che solo l'overespressione di NOTCH1 si associa ad una prognosi infausta (Figura 11B), così come bassi livelli di espressione di PTEN e SMAD4 (Figura 11C e D).

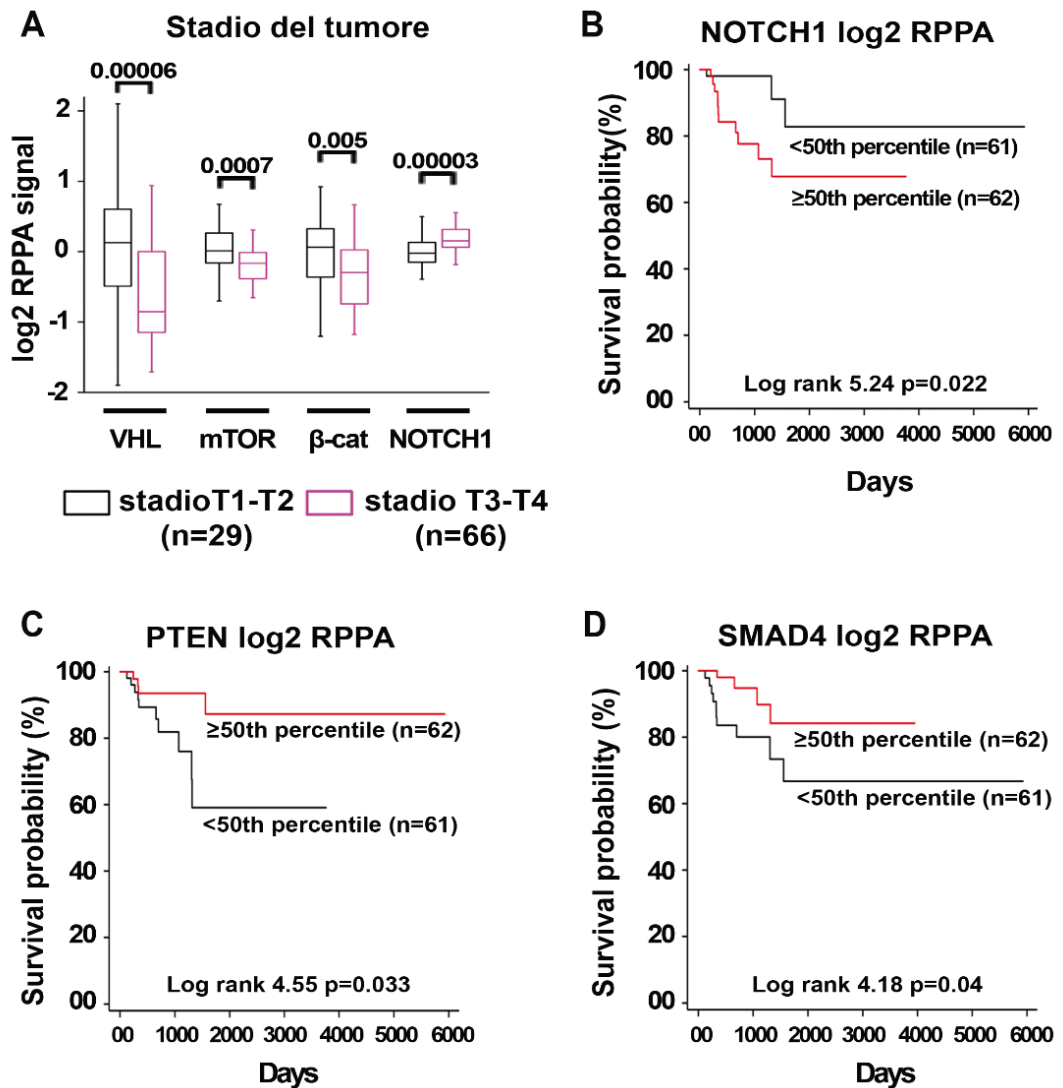


Figura 11. (A) Log₂ RPPA signal per proteine diversamente espresse nello stadio del pRCC T1-T2 (box nere, n = 29 pazienti) rispetto allo stadio T3-T4 (box rosa, n = 66). (B-D) Sopravvivenza dei pazienti con pRCC basata su elevati livelli (≥50th percentile, n = 62) o bassi livelli (<50th percentile, n = 61) di espressione di diverse proteine: NOTCH1 (B), PTEN (C) o SMAD4 (D). RPPA, reverse-phase protein assay. La significatività statistica è stata calcolata con il Mann-Whitney test. Le Kaplan-Meier sono state confrontate con il log-rank test e la regressione di Cox. HR(B) = 4.0 (1.1 to 14.3); HR(C) = 3.3 (1.0 to 10.8); HR(D) = 3.2 (1.0 to 10.1).

Successivamente, per indagare se le *pathways* identificate siano specifiche di un particolare sottotipo di pRCC, abbiamo ripetuto l'analisi suddividendo i pazienti sulla base del sottotipo di pRCC. 58 pazienti presentavano un pRCC di tipo 1, mentre 49 avevano un pRCC di tipo 2. L'analisi ha mostrato come alti livelli di mTOR, β-catenina e VHL siano associati al pRCC di tipo 1, mentre alte quantità di NOTCH1 sono fortemente associate con il pRCC di tipo 2 (Figura 12).

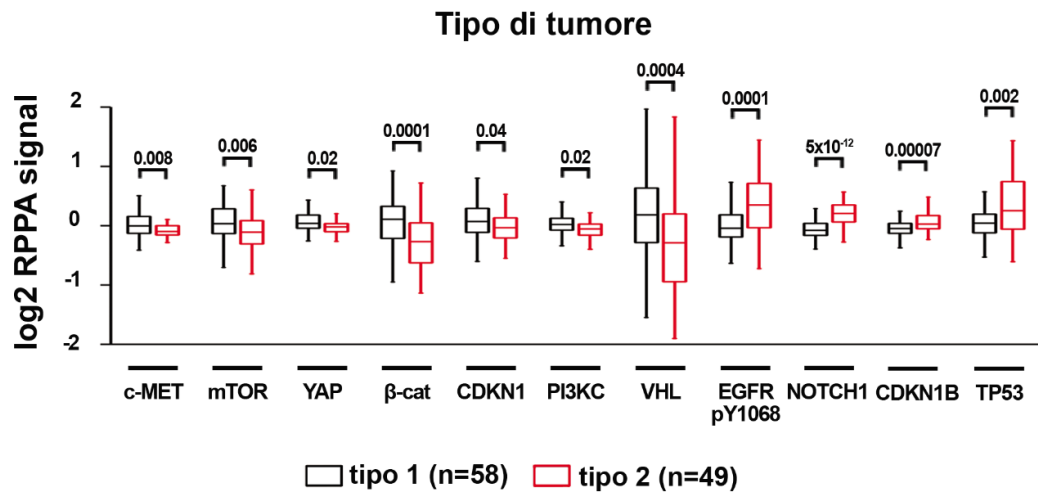


Figura 12. Log2 RPPA signal per proteine diversamente espresse nel pRCC di tipo 1 (box nera, n=58), rispetto al tipo 2 (box rossa, n=49). RPPA, reverse- phase protein assay. La significatività statistica è stata calcolata con il Mann-Whitney test.

Si può quindi concludere che lo sviluppo del pRCC nell'uomo è associato con l'alterazione di specifiche *pathways* che si attivano a seguito di un danno renale acuto, e che a seconda della *pathway* alterata si sviluppa un sottotipo di pRCC piuttosto che un altro.

4.3 L'overespressione di NOTCH1 è specifica del pRCC di tipo 2 e presagisce una prognosi sfavorevole nell'uomo

NOTCH1 è quindi fortemente associato alla gravità della malattia e alla sopravvivenza del paziente nel pRCC, ed è altamente specifico per il pRCC di tipo 2. NOTCH1 ha inoltre un ruolo chiave nella riparazione nelle fasi post AKI. (146). Per questi motivi abbiamo riesaminato i dati del TCGA Research Network ponendo la nostra attenzione sulla *pathway* di NOTCH1. L'analisi dei dati raccolti nel TCGA Research Network ha evidenziato che il pRCC di tipo 2 è costituito da almeno tre sottotipi che possono essere suddivisi sulla base delle caratteristiche molecolari (cluster C2a, C2b e C2c-CIMP).

L'espressione di NOTCH1 risulta aumentata in tre dei sottotipi di pRCC di tipo 2 ma non nel cluster C1, ossia nei pRCC di tipo 1. (Figura 13)

Da questa analisi è anche emerso che mutazioni germinali o somatiche del gene della fumarato idratasi (FH) o della nuclear factor erythroid 2 (NRF2) /antioxidant response element) (ARE) pathway, possono promuovere lo sviluppo di forme sporadiche di pRCC, solitamente di tipo 2. Invece, mutazioni germinali

che causano l'attivazione di MET portano allo sviluppo di pRCC ereditari di tipo 1 i quali non mostrano un aumento di NOTCH1 (Figura 14A). Al contrario, i pRCC di tipo 2, che presentano silenziamento di CDKN2A, mutazioni di SETD2/BAP1/PBRM1, mutazioni della FH o della pathways di NRF2-ARE mostravano tutti un aumento significativo dei livelli di NOTCH1, rispetto ai tumori non mutati (Figura 14A). Inoltre, dall'analisi della sopravvivenza, è emerso che la quantità di NOTCH1 è correlato con la sopravvivenza dei pazienti con pRCC di tipo 2. (Figura 14B)

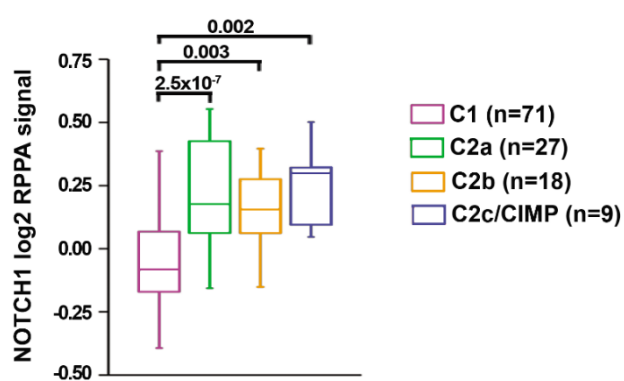


Figura 13. Log2 RPPA signal per l'espressione di NOTCH1 in pazienti con pRCC suddivisi in base ai cluster C1, C2a, C2b e C2c/CIMP (n = 71, 27, 18 e 9, rispettivamente). RPPA, reverse-phase protein assay. La significatività statistica è stata calcolata con il Mann-Whitney test.

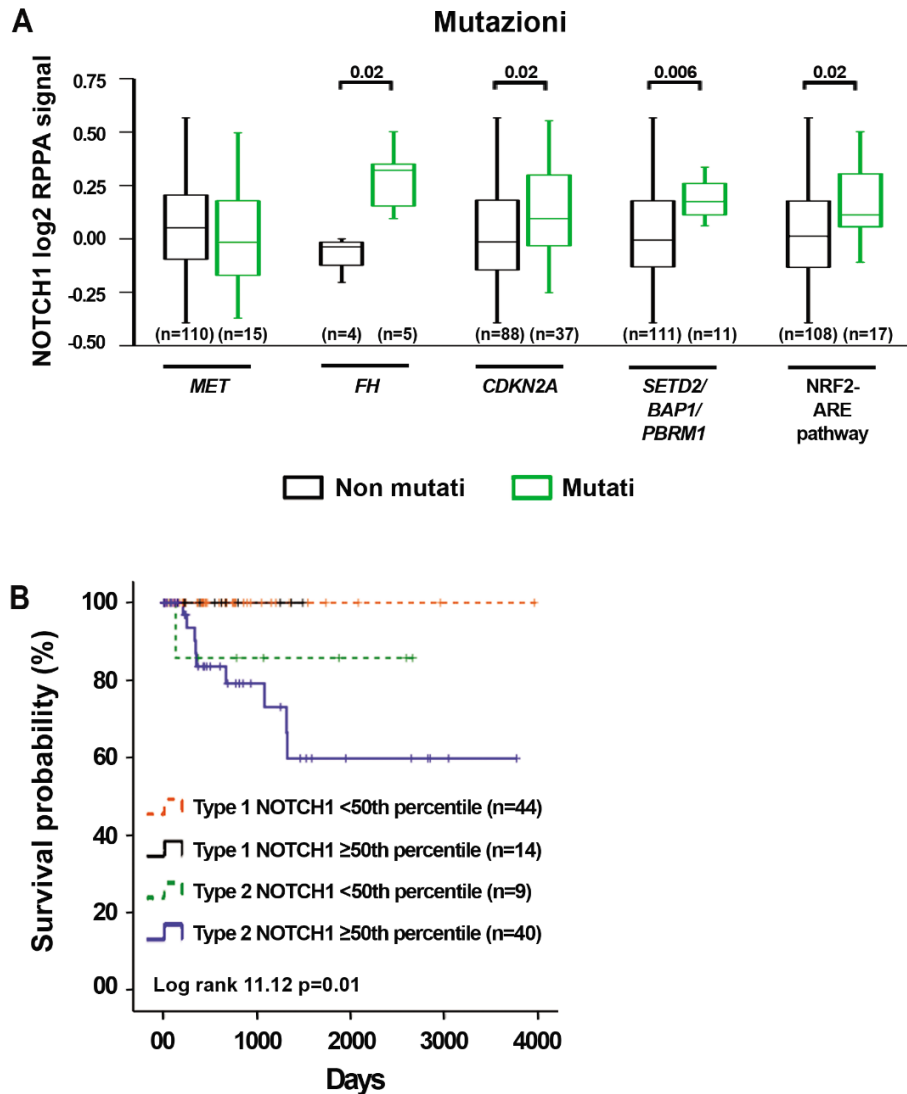


Figura 14. (A) Log₂ RPPA signal per l'espressione di NOTCH1 in pazienti con MET non mutato (box nere, n = 110) o mutato (box verdi, n = 15), FH (non mutato n = 4, mutato n = 5), CDKN2A (non mutato n = 88, mutato n = 37), SETD2/BAP1/PBRM1 (non mutato n = 111, mutato n = 11), pathway di NRF2-ARE (non mutato n = 108, mutato n = 17). (B) Sopravvivenza dei pazienti con pRCC di tipo 1 o 2 basate su alti (≥50th percentile, tipo 1 n = 14 e tipo 2 n = 40) o bassi (<50th percentile, tipo 1 n = 44 e tipo 2 n = 9) livelli di espressione della proteina NOTCH1. La Kaplan-Meier è stata confrontata con il log-rank test e la regressione di Cox. HR(B) = 4.6 (1.0 to 20.5). RPPA, reverse-phase protein assay

Infine, abbiamo costruito un modello di regressione logistica multipla inserendo gli stadi TNM >2 come variabile dipendente mentre i parametri descritti come fattori di rischio per pRCC sono serviti come covariate. In questa analisi abbiamo considerato i dati del Cancer Genome Atlas Research Network (28) e abbiamo incluso età all'intervento (anni), sesso, esposizione al fumo di sigaretta, espressione di RPPA NOTCH1, la presenza di alterazioni genetiche specifiche in diversi geni causali (MET, FH, CDKN2A, SETD2, TFE3). L'analisi multivariata ha mostrato che i livelli di NOTCH1 nei pazienti con pRCC correlano con la prognosi anche se confrontati con i fattori di rischio noti per pRCC (Tabella 3).

Variabile	OR	95%CI	P
Età all'intervento (anni)	1.00	0.96 – 1.04	0.905
Sesso (maschile)	0.40	0.14 – 1.15	0.090
Esposizione al fumo di tabacco (y/n)	2.84	0.92 – 6.69	0.072
Mutazioni in geni causali (y/n)	5.22	1.87 – 14.59	0.002
Espressione RPPA NOTCH1 (log2 RPPA signal)	3.27	1.22 – 8.78	0.018

Tabella 3: L'analisi multivariata indica NOTCH1 come fattore di rischio per la prognosi del pRCC. RPPA, reverse- phase protein assay.

Da questi risultati possiamo affermare che NOTCH1 è un fattore prognostico per tutti e tre i sottogruppi di pRCC di tipo 2, ma non per il pRCC di tipo 1.

Ci siamo quindi chiesti cosa accade modulando la pathway di NOTCH1 nella popolazione di cellule progenitrici umane e murine.

4.4 L'iperespressione di NOTCH1 e l'AKI promuovono lo sviluppo di pRCC nel topo.

Dati recentemente ottenuti nel nostro laboratorio, hanno dimostrato che un danno renale acuto da ischemia/riperfusion (IRI) nel topo, promuove lo sviluppo di adenomi papillari e pRCC sia di tipo 1 che di tipo 2, dopo 36 settimane dal danno. Questi tumori si sviluppano dall'espansione clonale di una singola TEC (Figura 1, paragrafo 1.4.2).

Tenendo conto inoltre dei risultati ottenuti tramite sc-RNAseq, che dimostrano che il progenitore renale è la cellula che da origine al pRCC, abbiamo generato un modello murino condizionale Pax2.rTetO;TetO.Cre;R26.NICD1.GFP;R26.Confetti (PAX2/NICD1/Confetti). Questo modello prevede che, in seguito all'induzione con Doxyciclina, vi sia una overespressione di NICD1 nella popolazione Pax2+ delle cellule tubulari, che rappresenta la popolazione di progenitori nel topo. Inoltre le cellule PAX2+, esprimeranno in maniera stocastica uno dei 4 fluorocromi del reporter Confetti, che permette di condurre un'analisi di lineage tracing. Per prima cosa, abbiamo indotto nell'animale un danno da ischemia /riperfusion, e come atteso gli animali andavano incontro ad un rapido declino della GFR, seguito poi dal recupero funzionale a 7 giorni dal danno (Figura 15A). Sorprendentemente, più dell'85% dei PAX2/NICD1/Confetti con AKI presentava pRCC di tipo 2 già a quattro settimane dal danno (Figura 15B-C). I topi Pax2/NICD/Confetti senza AKI non hanno mostrato lesioni tumorali a quattro settimane. Inoltre, l'analisi della clonità ha mostrato che l'88% degli adenomi papillari e dei pRCC di tipo 2 erano costituiti da cellule di un singolo colore, il che implica che questi tumori si sono formati dall'amplificazione clonale di singole cellule, raramente si sono infatti osservate lesioni biclonali o triclonali (Figura 15D e E).

Infine, abbiamo marcato delle sezioni di rene ottenute dai reni di questi animali con un anticorpo anti Collagene IV (COL4) e un anticorpo anti von Willebrand factor (VWF) per valutare rispettivamente l'invasività e la vascolarizzazione di questi tumori. La ricostruzione 3D, mediante microscopia confocale, ha confermato la malignità di questi pRCC, i quali presentavano invasione del parenchima da parte della popolazione clonale, e la vascolarizzazione aberrante, tipica di questo tipo di carcinoma (Figura 15 F-G)

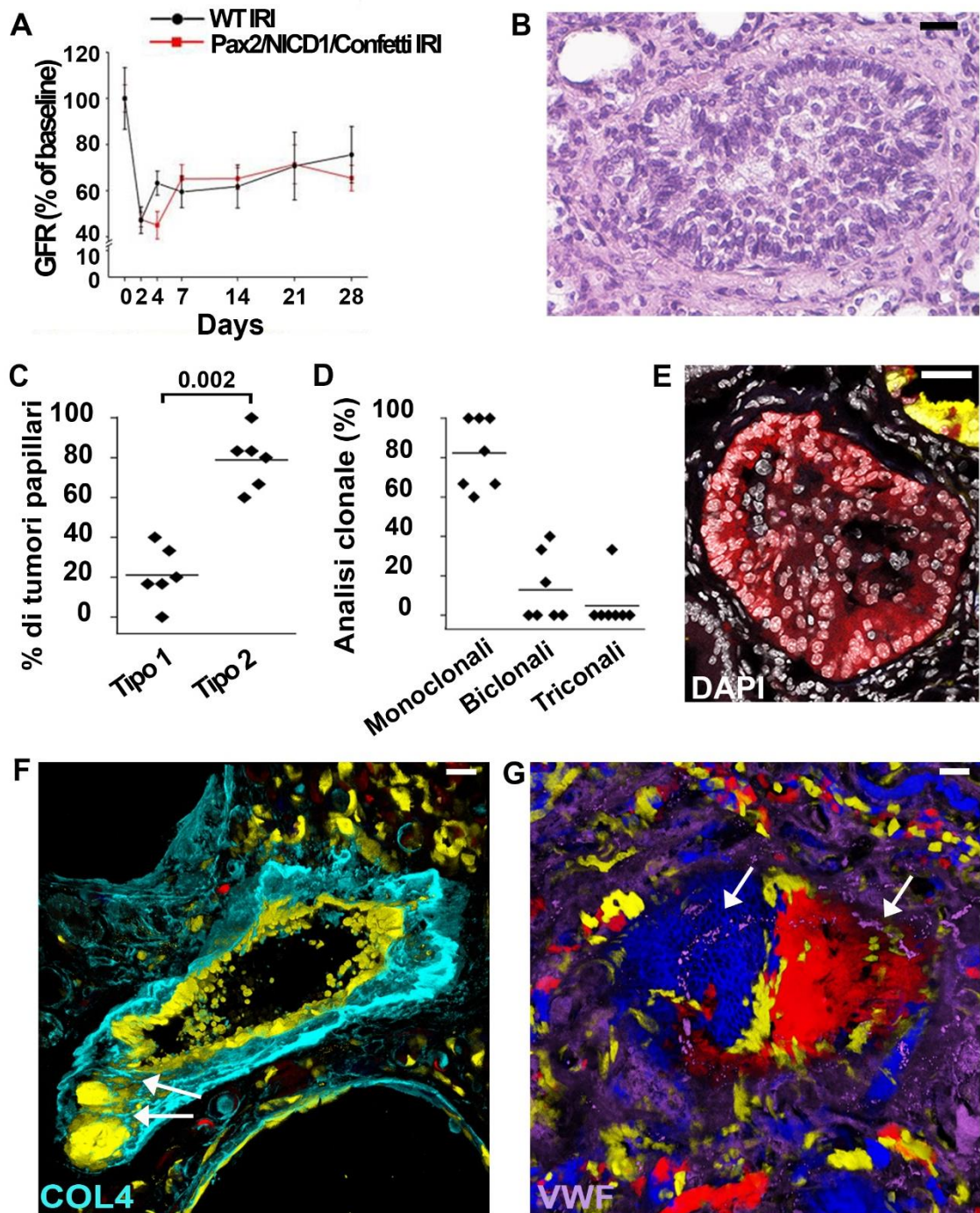


Figura 15. (A) Misurazione della GFR in topi Pax2/NICD1/Confetti IRI e WT IRI. (B) Immagine rappresentativa colorata con H&E di un tumore papillare di tipo 2 presente nel topo PAX2/NICD1/Confetti a 4 settimane dal danno. Bar 25 μm. (C) Percentuale di pRCC di tipo 1 vs pRCC di tipo 2 nei topi PAX2/NICD1/Confetti a 4 settimane dal danno. (D) Analisi della clonalità dei pRCC per ogni topo PAX2/NICD1/Confetti a 4 settimane dal danno (E) Immagine confocale di pRCC di tipo 2 presente nel topo PAX2/NICD1/Confetti a 4 settimane dal danno. Bar 25 μm. (F)e(G) Ricostruzioni 3D rappresentative di pRCC nel topo PAX2/NICD1/Confetti a 4 settimane dal danno, marcate con (F) collagene IV (COL4, ciano) e (G) Von Willebrand factor (VWF, viola). Le frecce indicano rispettivamente l'invasione e la vascolarizzazione tumorale. Bar 25 μm. IRI, ischemia/reperfusion injury. La significatività statistica è stata calcolata mediante il Mann Whitney test.

Questi risultati dimostrano che i pRCC di tipo 2 nel topo derivano dall'espansione clonale di una singola cellula Pax2+, e che l'AKI e l'iperpressione di NOTCH1 in queste cellule velocizzano la formazione del pRCC nel topo.

4.5 L'overespressione di NOTCH1 trasforma le RPC e altera la loro capacità di formare strutture tubulari in colture 3D

Per comprendere al meglio quali siano i meccanismi con cui NOTCH1 induce la trasformazione del progenitore in cellula che dà origine al tumore, abbiamo overespresso NOTCH1 nelle colture primarie di progenitori renali umani tramite l'infezione con il lentivirus ZsGreen1-NICD1 (142).

Abbiamo osservato che le RPC infettate con NICD1, acquisivano un citoplasma eosinofilo più ampio, e nucleoli prominenti, caratteristiche istologiche tipiche del pRCC (147), e inoltre presentavano un citoscheletro più complesso, come evidenziato dalla marcatura con la Falloidina, rispetto alle cellule di controllo infettate con il mock. (Figura 16 A-D). Successivamente siamo andati a piastrare sia le RPC infettate con NICD1 sia le rispettive RPC di controllo infettate con il mock in un device microfluidico, in condizioni di *shear stress*. Le cellule di controllo infettate con il mock erano in grado di ricostruire in modo ordinato un tubulo con un lume ben definito (Figura 16 E). Le RPC infettate con NICD1, al contrario, non erano in grado di dividersi con il giusto orientamento, promuovendo lo sviluppo di strutture simil-papillari all'interno del lume, fino a generare una massa all'interno del lume (Figura 16 F)

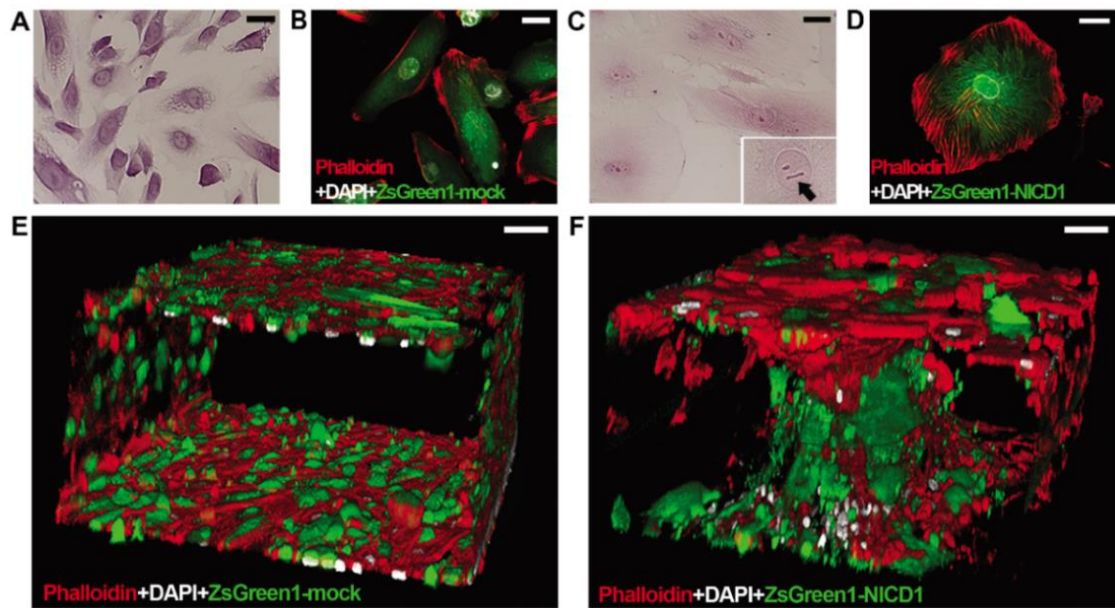


Figura 16. (A)e(B) Immagini rappresentative H&E (A) e confocale (B) di progenitori infettati con ZsGreen1-mock. In rosso la marcatura della falloidina. Bar 25 μ m. (C)e(D) Immagini rappresentative H&E (C) e confocale (D) di progenitori infettati con ZsGreen1-NICD1. In rosso la marcatura della falloidina. Bar 25 μ m. (E) e (F) Ricostruzioni 3D al microscopio confocale di z stack di progenitori renali infettati con ZsGreen1-mock (E) che generano una struttura tubulare con un lume e con ZsGreen1-NICD1 (F) che invece proliferano verso l'interno del lume formando strutture simil-papillari. In rosso la marcatura della falloidina. Bar 50 μ m.

Si può quindi concludere che l'overespressione di NOTCH1 nelle RPC umane in coltura, provoca una trasformazione verso un fenotipo tumorale, che si riflette sia a livello morfologico, sia a livello dell'orientamento del piano di divisione di queste cellule.

4.6 NOTCH1 induce la trasformazione dei progenitori renali promuovendo mitosi aberranti

Dato quanto osservato nella coltura 3D, ci siamo chiesti con quale meccanismo l'iperespressione di NOTCH controlli la proliferazione e la trasformazione delle RPC. In uno studio, precedente condotto dal nostro gruppo, è stato dimostrato che la pathway di NOTCH controlla la proliferazione delle RPC in vitro (142). Infatti, analizzando la capacità delle cellule di incorporare la timidina triziata, che viene incorporata nel DNA delle cellule in proliferazione, abbiamo osservato che l'infezione di NICD nelle RPC ne aumenta significativamente la capacità proliferativa rispetto alle RPC infettate con il solo mock. (Figura 17 A). Dalla coltura 3D, inoltre è emerso che le RPC infettate con NICD1 non sono in grado di dividersi con il giusto orientamento, abbiamo quindi ipotizzato che

la *pathways* di NOTCH potesse alterare l'organizzazione del fuso mitotico durante la mitosi. Siamo andati quindi a marcare con anticorpi anti fosfoistone-H3 e anti α -tubulina per evidenziare eventuali anomalie durante le varie fasi della mitosi. In effetti, abbiamo osservato che l'iperpressione di NOTCH in queste cellule provoca un'alterazione della polarità della cellula, provocando un aumento significativo di mitosi aberranti nelle cellule infettate rispetto a quelle di controllo (Figura 17 B-F).

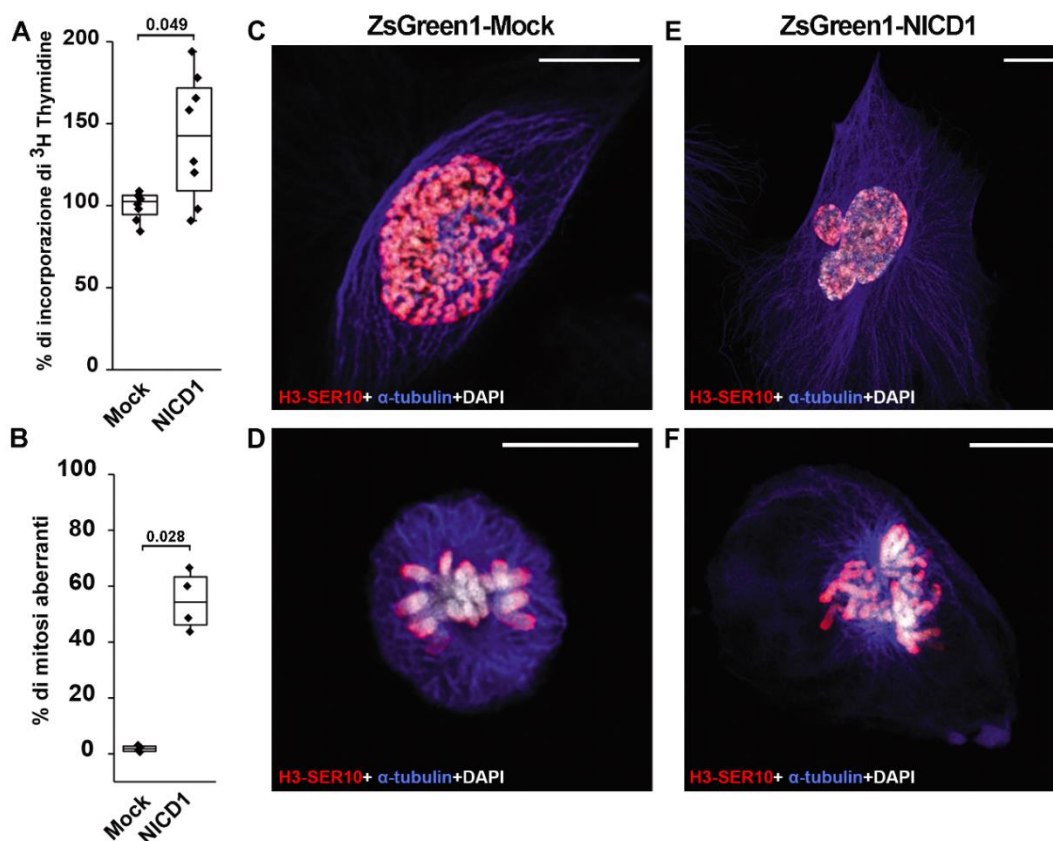


Figura 17. (A) Capacità proliferativa a 36 ore dall'infezione dei progenitori con ZsGreen1-NICD1 vs ZsGreen1-mock, tramite saggio di incorporazione della ^3H -thymidine. I risultati sono espressi come % over ZsGreen1-mock. (B) Percentuale delle mitosi anormali in progenitori infettati con mock o NICD1. (C- F) immagini rappresentative di progenitori renali infettati con mock (C e D), e infettati con NICD1 (E e F) marcati con H3-SER10 (rosso) e α -tubulina (blue). (C e F) profase, (D e E) metafase. I nuclei sono marcati con DAPI (bianco). Bars= 10 μm . La significatività statistica è stata calcolata con il Mann-Whitney test.

Abbiamo inoltre condotto un'analisi del trascrittoma delle RPC infettate con NICD1 mediante microarray. L'analisi ha evidenziato numerosi geni che sono differenzialmente espressi tra le RPC infettate con NICD1 e le cellule di controllo infettate con il mock. (Figura 18A). L'ulteriore analisi di gene ontology ha mostrato una down regolazione, nelle RPC infettate con NICD1, di alcune pathways coinvolte nell'assemblaggio del fuso

mitotico e/o nei checkpoint del ciclo cellulare. Tra questi geni troviamo i target di E2F (148), geni coinvolti nel checkpoint G2/M, e i target di MYC V1 e V2 (149) (Figura 18B). In particolare alcuni geni che regolano la polarità del fuso mitotico si ritrovano downregolati nelle RPC infettate con NICD1. Tra questi ci sono INSC, DYNC2H1, PRKAA2, DLG1, PARD3, PARD6G, STK33, HNF1B e CCNE1. (150, 151) (Figura 18C).

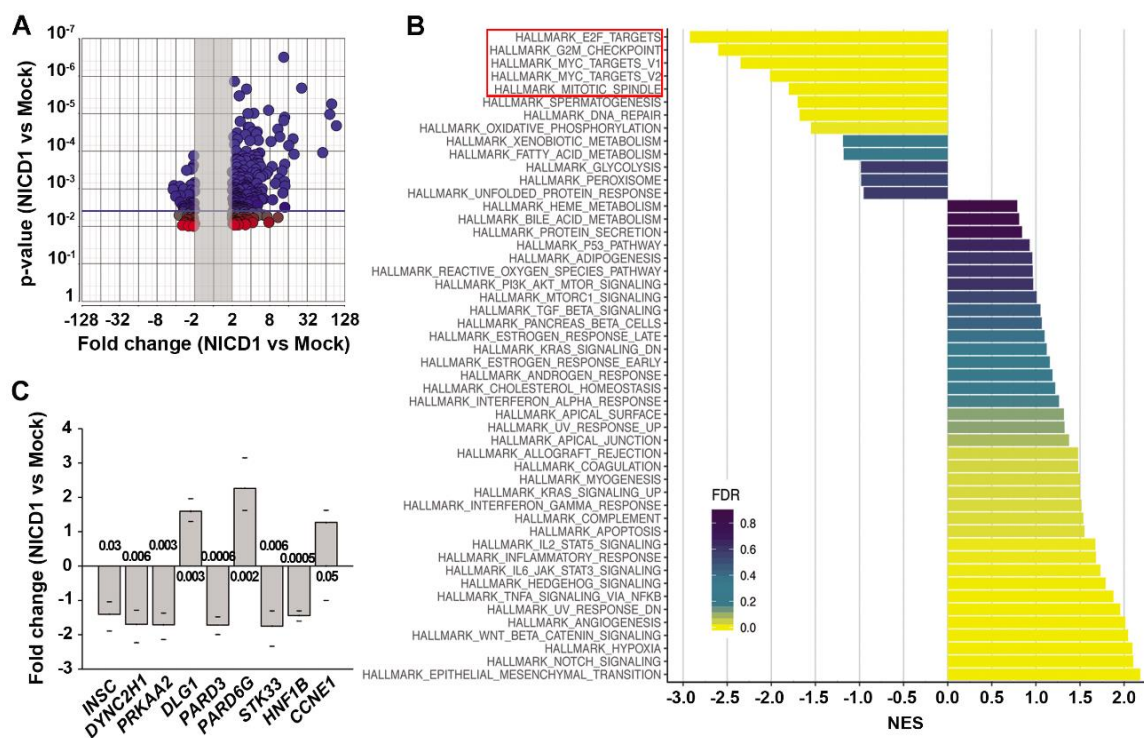


Figura 18. (A) Volcano plot di dati ottenuti mediante microarray raffigurante geni che sono arricchiti (destra) o depleti (sinistra) in progenitori renali infettati con NICD1 vs quelli infettati con mock. La linea blu orizzontale indica cutoff del p-value a 0,05. (B) Bar plot dei geni caratteristici arricchiti nei progenitori infettati con NICD1 vs quelli infettati con mock. Il bar plot mostra il NES (normalized enrichment scores) dei set di geni caratteristici. Un NES negativo indica un arricchimento nella popolazione infetta con mock. Un valore di NES positivo indica un arricchimento nella popolazione infettata con NICD1. I colori delle bar variano secondo il False discovery rate (FDR) q- values. (C) Fold change per i geni coinvolti nella mitosi. I trattini sopra le bar indicano i limiti di confidenza superiore e inferiore del 95%. La significatività statistica è stata calcolata con il t-test. I numeri indicano i p-values.

Infine abbiamo condotto un'analisi della sopravvivenza, valutando 285 pazienti con pRCC depositati nello *Human Protein Atlas* (152). Da questa analisi è emerso che la modulazione dei trascritti di alcuni di questi geni che controllano la polarità del fuso mitotico, nel tessuto tumorale di pazienti con pRCC correla con una ridotta sopravvivenza del paziente. (Figura 19 A-D).

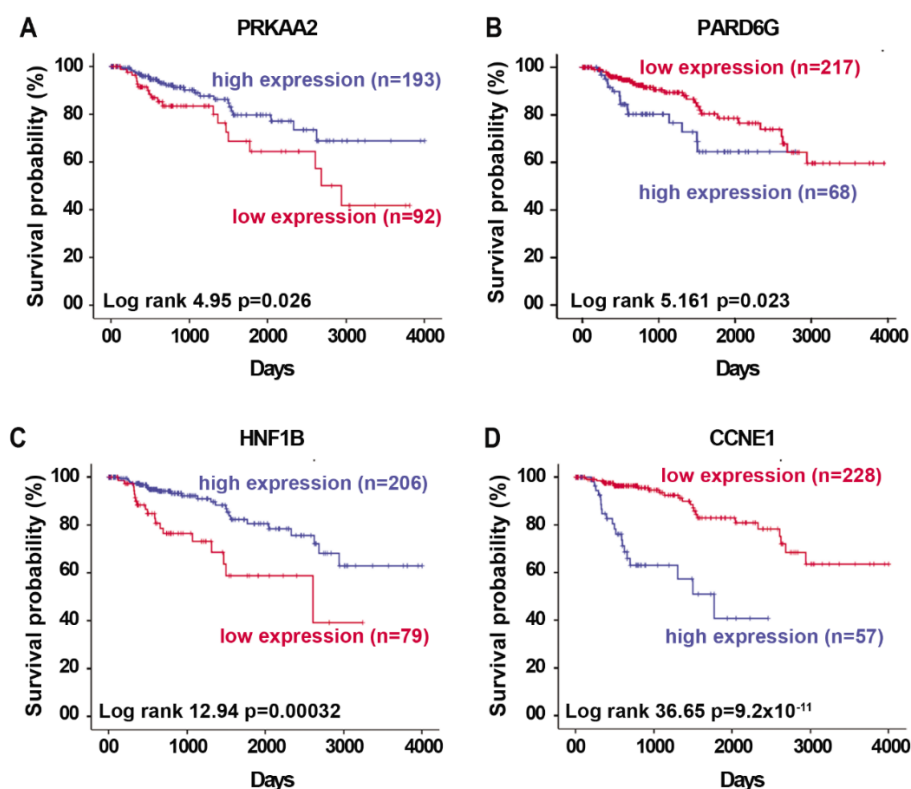


Figura 19. (A-D) Sopravvivenza dei pazienti con pRCC basata su elevati o bassi livelli di espressione di diverse proteine: PRKAA2 (A) (migliore cut off di espressione 3.07, bassa espressione n=92 pazienti, alta espressione n=193 pazienti); PARD6G (B) (migliore cut off di espressione -1.71, bassa espressione n=217 pazienti, alta espressione n=68 pazienti); HNF1B (C) (migliore cut off di espressione 36.43, bassa espressione n=79 pazienti, alta espressione n=206 pazienti); CCNE1 (D) (migliore cut off di espressione 1.29, bassa espressione n=228 pazienti, alta espressione n=57 pazienti). Le Kaplan-Meier sono state comparate utilizzando il log-rank test e con la regressione di Cox ($HR(A)= 1.942 [1.071-3.521]$; $HR(B)=0.485 [0.257-0.918]$; $HR(C)= 2.897[1.580-5.310]$; $HR(D)= 0.177 [0.094-0.332]$).

Si può quindi concludere che l'overespressione di NOTCH1 nei progenitori renali, ne stimola la proliferazione, promuovendo tuttavia mitosi aberranti, alterando l'espressione di geni coinvolti nell'assemblaggio del fuso mitotico e di geni coinvolti nel controllo della progressione del ciclo cellulare.

5. DISCUSSIONE

Il carcinoma a cellule renali (RCC) è un tumore molto comune, ma i meccanismi alla base dello sviluppo dei suoi diversi sottotipi sono in gran parte sconosciuti. È essenziale identificare specifici tipi di cellule all'interno dell'RCC che avviano o mantengono la tumorigenesi per consentire una migliore comprensione della biologia del RCC, nonché per lo sviluppo di nuovi trattamenti.

Il tubulo renale è composto da 10-20 popolazioni di cellule epiteliali differenti (137), e probabilmente non tutte le cellule tubulari sono soggette a trasformazione neoplastica. Recentemente è stata ipotizzata un'origine del pRCC da cellule tubulari prossimali (34, 99).

I nostri risultati forniscono una possibile spiegazione ai recenti risultati ottenuti utilizzando la tecnologia di scRNAseq, suggerendo la somiglianza dei pRCC e dei ccRCC con una popolazione non caratterizzata di cellule tubulari, che esprime il VCAM1, definita dagli autori PT1 (125).

Il nostro gruppo, ha identificato un subset di progenitori renali CD133+ VCAM1+ nell'uomo che ha la capacità di self-renewal e clonogenicità (81). La nostra analisi di scRNAseq ha dimostrato che la popolazione PT1 identificata nei ccRCC e nei pRCC ha un profilo sovrapponibile a quello del progenitore renale umano CD133+, provando quindi che questa è la cellula di origine del ccRCC e del pRCC.

Quali sono i meccanismi che promuovono questa trasformazione neoplastica del progenitore renale?

Diversi studi hanno stabilito un legame diretto tra le cellule staminali residenti e la patogenesi del cancro in molti organi (153-155).

Queste cellule sono altamente resistenti alla morte e subiscono più cicli di divisione cellulare durante la vita per far fronte al turnover fisiologico dell'organo o ad un danno (154). Queste caratteristiche favoriscono l'accumulo di danni al DNA, promuovendo la cancerogenesi (153). Eventi simili, avvengono anche nel rene, i progenitori renali sono infatti cellule longeve (73) con elevata resistenza alla morte (73, 81, 156) che subiscono un lento turnover durante la vita (73, 87) e si amplificano clonalmente, subendo numerose divisioni in risposta ad un danno renale acuto. L'attivazione di pathways correlate al danno tissutale che promuovono una più rapida proliferazione, può fornire

un secondo *hit* al progenitore renale, favorendo l'accumulo di ulteriori danni al DNA e quindi promuoverne la trasformazione neoplastica in cellula tumorale (157).

Recentemente, il nostro gruppo ha dimostrato che un singolo episodio di AKI rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di pRCC nell'uomo, inoltre i pazienti che hanno avuto un evento di AKI post-operatorio hanno un rischio maggiore di recidiva del tumore rispetto a coloro che non hanno avuto un AKI dopo l'intervento (67). Non sembra invece esserci nessuna associazione tra l'AKI e il rischio di sviluppare un ccRCC. Questa associazione è stata ulteriormente confermata in un modello murino sperimentale di AKI, in cui l'animale sviluppava adenomi e carcinomi papillari a trentasei settimane dal danno. Questi tumori erano per lo più localizzati nella porzione esterna della midollare esterna, proprio dove il danno ischemico colpisce maggiormente le cellule del segmento S3 del tubulo prossimale (67). Questa scoperta ha un enorme impatto clinico, dato che l'AKI è una condizione patologica molto frequente nella pratica clinica ed è oggetto di dibattito 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 (66).

Questo lavoro di tesi ha cercato di chiarire attraverso la regolazione di quali pathways, l'AKI promuove la trasformazione del progenitore in cellula che dà origine al pRCC. Dai risultati è emerso che alcune pathway che vengono overesprese in seguito all'AKI e si associano ad una prognosi infausta del paziente, e sono specifiche per il pRCC di tipo 1 o di tipo 2. Tra queste pathway ha catturato la nostra attenzione la pathway di NOTCH1. NOTCH1 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 (142). Analizzando i pazienti dello studio del TCGA è emerso che l'overespressione di NOTCH1 è un fattore di rischio specifico per il pRCC di tipo 2, indipendentemente dalla presenza delle mutazioni normalmente presenti in questo tipo di tumore, ed inoltre è un fattore prognostico sfavorevole.

L'overespressione di NOTCH1 in associazione ad un danno ischemico, si conferma promuovere lo sviluppo di adenomi e carcinomi papillari anche in un modello murino transgenico inducibile, dove l'attivazione costitutiva di NOTCH1 è limitata alla sola popolazione di progenitori renali (Pax2+).

Quanto osservato è in linea con due studi recenti, che supportano l'idea che l'angiomiolipoma (AML), origina dall'espansione clonale di un sottoinsieme di cellule epiteliali renali multipotenti (123, 124) mediante l'iperattivazione di un *loop* regolatorio RHEB-Notch-RHEB (123). Infatti, l'iperattivazione di Notch rappresenta un evento chiave che blocca la differenziazione delle cellule AML, inducendole a mantenere la loro multipotenza (123).

Al contrario, il *knock-out* di Notch1 nell'epitelio renale durante lo sviluppo può portare alla generazione di adenomi papillari di tipo 1 dalla nascita (158). Coerentemente con questo risultato, abbiamo infatti osservato che il pRCC di tipo 1 non si associa ad una overespressione di NOTCH1.

Inoltre, la pathway di NOTCH1 regola anche la proliferazione delle RPC in vitro (142). Una overespressione di NOTCH1, mediante infezione lentivirale, in colture 3D di progenitori, altera la capacità di formare una struttura tubulare bene definita, promuovendo invece una proliferazione incontrollata verso il lume del tubulo, portando alla formazione di strutture simil-papillari. I dati ottenuti dal microarray sui progenitori infettati hanno mostrato come l'overespressione di NOTCH1 induca una downregolazione dell'espressione di geni coinvolti nell'assemblaggio del fuso mitotico di geni coinvolti nei sistemi di controllo del ciclo cellulare.

In conclusione, i dati di questa tesi dimostrano che l'iperattivazione o la downregolazione di alcune pathways a seguito di un danno renale acuto promuovono la trasformazione del progenitore renale in cellula cancerosa che dà origine al carcinoma papillare. Inoltre, l'identificazione di NOTCH1 come pathways specifica di tutti i sottotipi di pRCC di tipo 2, fa sì che questa possa essere bersaglio per una eventuale terapia rivolta contro questo tipo di carcinoma renale particolarmente aggressivo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359-386 (2015).
2. A. Znaor, J. Lortet-Tieulent, M. Laversanne, A. Jemal, F. Bray, International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol* **67**, 519-530 (2015).
3. G. Scelo, T. L. Larose, Epidemiology and Risk Factors for Kidney Cancer. *J Clin Oncol*, JCO2018791905 (2018).
4. R. Montironi, L. Cheng, M. Scarpelli, A. Lopez-Beltran, Pathology and Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital System: Clinical Implications of the 4th Edition of the WHO Classification and Beyond. *Eur Urol* **70**, 120-123 (2016).
5. M. S. Miah, S. J. White, G. Oommen, E. Birney, S. Majumdar, Late simultaneous metastasis of renal cell carcinoma to the submandibular and thyroid glands seven years after radical nephrectomy. *Int J Otolaryngol* **2010**, (2010).
6. J. R. Srigley, B. Delahunt, J. N. Eble, L. Egevad, J. I. Epstein, D. Grignon, O. Hes, H. Moch, R. Montironi, S. K. Tickoo, M. Zhou, P. Argani, I. R. T. Panel, The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol* **37**, 1469-1489 (2013).
7. H. Moch, A. L. Cubilla, P. A. Humphrey, V. E. Reuter, T. M. Ulbright, The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* **70**, 93-105 (2016).
8. M. D. Hughson, D. Buchwald, M. Fox, Renal neoplasia and acquired cystic kidney disease in patients receiving long-term dialysis. *Arch Pathol Lab Med* **110**, 592-601 (1986).
9. M. T. del Vecchio, S. Lazzi, A. Bruni, P. Mangiavacchi, G. Cevenini, P. Luzi, DNA ploidy pattern in papillary renal cell carcinoma. Correlation with clinicopathological parameters and survival. *Pathol Res Pract* **194**, 325-333 (1998).
10. A. J. Reese, D. P. Winstanley, The small tumour-like lesions of the kidney. *Br J Cancer* **12**, 507-516 (1958).
11. B. Delahunt, J. N. Eble, M. R. McCredie, P. B. Bethwaite, J. H. Stewart, A. M. Bilous, Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol* **32**, 590-595 (2001).
12. J. H. Mydlo, R. H. Bard, Analysis of papillary renal adenocarcinoma. *Urology* **30**, 529-534 (1987).
13. M. B. Amin, C. L. Corless, A. A. Renshaw, S. K. Tickoo, J. Kubus, D. S. Schultz, Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. *Am J Surg Pathol* **21**, 621-635 (1997).
14. R. Mancilla-Jimenez, R. J. Stanley, R. A. Blath, Papillary renal cell carcinoma: a clinical, radiologic, and pathologic study of 34 cases. *Cancer* **38**, 2469-2480 (1976).
15. B. Delahunt, J. N. Eble, Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol* **10**, 537-544 (1997).
16. A. A. Renshaw, H. Zhang, C. L. Corless, J. A. Fletcher, M. R. Pins, Solid variants of papillary (chromophil) renal cell carcinoma: clinicopathologic and genetic features. *Am J Surg Pathol* **21**, 1203-1209 (1997).
17. S. C. Jacobs, S. I. Berg, R. K. Lawson, Synchronous bilateral renal cell carcinoma: total surgical excision. *Cancer* **46**, 2341-2345 (1980).
18. T. Fukuoka, M. Honda, M. Namiki, Y. Tada, M. Matsuda, T. Sonoda, Renal cell carcinoma with heterotopic bone formation. Case report and review of the Japanese literature. *Urol Int* **42**, 458-460 (1987).
19. H. Moch, Cystic renal tumors: new entities and novel concepts. *Adv Anat Pathol* **17**, 209-214 (2010).

20. D. You, M. Shim, I. G. Jeong, C. Song, J. K. Kim, J. Y. Ro, J. H. Hong, H. Ahn, C. S. Kim, Multilocular cystic renal cell carcinoma: clinicopathological features and preoperative prediction using multiphase computed tomography. *BJU Int* **108**, 1444-1449 (2011).
21. A. von Teichman, E. Comperat, S. Behnke, M. Storz, H. Moch, P. Schraml, VHL mutations and dysregulation of pVHL- and PTEN-controlled pathways in multilocular cystic renal cell carcinoma. *Mod Pathol* **24**, 571-578 (2011).
22. T. B. Crotty, G. M. Farrow, M. M. Lieber, Chromophobe cell renal carcinoma: clinicopathological features of 50 cases. *J Urol* **154**, 964-967 (1995).
23. W. Thoenes, S. Storkel, H. J. Rumpelt, R. Moll, H. P. Baum, S. Werner, Chromophobe cell renal carcinoma and its variants--a report on 32 cases. *J Pathol* **155**, 277-287 (1988).
24. I. Dagogo-Jack, A. T. Shaw, Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 81-94 (2018).
25. A. Blum, P. Wang, J. C. Zenklusen, SnapShot: TCGA-Analyzed Tumors. *Cell* **173**, 530 (2018).
26. C. International Cancer Genome, T. J. Hudson, W. Anderson, A. Artez, A. D. Barker, C. Bell, R. R. Bernabe, M. K. Bhan, F. Calvo, I. Eerola, D. S. Gerhard, A. Guttmacher, M. Guyer, F. M. Hemsley, J. L. Jennings, D. Kerr, P. Klatt, P. Kolar, J. Kusada, D. P. Lane, F. Laplace, L. Youyong, G. Nettekoven, B. Ozenberger, J. Peterson, T. S. Rao, J. Remacle, A. J. Schafer, T. Shibata, M. R. Stratton, J. G. Vockley, K. Watanabe, H. Yang, M. M. Yuen, B. M. Knoppers, M. Bobrow, A. Cambon-Thomsen, L. G. Dressler, S. O. Dyke, Y. Joly, K. Kato, K. L. Kennedy, P. Nicolas, M. J. Parker, E. Rial-Sebbag, C. M. Romeo-Casabona, K. M. Shaw, S. Wallace, G. L. Wiesner, N. Zeps, P. Lichter, A. V. Biankin, C. Chabannon, L. Chin, B. Clement, E. de Alava, F. Degos, M. L. Ferguson, P. Geary, D. N. Hayes, T. J. Hudson, A. L. Johns, A. Kasprzyk, H. Nakagawa, R. Penny, M. A. Piris, R. Sarin, A. Scarpa, T. Shibata, M. van de Vijver, P. A. Futreal, H. Aburatani, M. Bayes, D. D. Botwell, P. J. Campbell, X. Estivill, D. S. Gerhard, S. M. Grimmond, I. Gut, M. Hirst, C. Lopez-Otin, P. Majumder, M. Marra, J. D. McPherson, H. Nakagawa, Z. Ning, X. S. Puente, Y. Ruan, T. Shibata, M. R. Stratton, H. G. Stunnenberg, H. Swerdlow, V. E. Velculescu, R. K. Wilson, H. H. Xue, L. Yang, P. T. Spellman, G. D. Bader, P. C. Boutros, P. J. Campbell, P. Flicek, G. Getz, R. Guigo, G. Guo, D. Haussler, S. Heath, T. J. Hubbard, T. Jiang, S. M. Jones, Q. Li, N. Lopez-Bigas, R. Luo, L. Muthuswamy, B. F. Ouellette, J. V. Pearson, X. S. Puente, V. Quesada, B. J. Raphael, C. Sander, T. Shibata, T. P. Speed, L. D. Stein, J. M. Stuart, J. W. Teague, Y. Totoki, T. Tsunoda, A. Valencia, D. A. Wheeler, H. Wu, S. Zhao, G. Zhou, L. D. Stein, R. Guigo, T. J. Hubbard, Y. Joly, S. M. Jones, A. Kasprzyk, M. Lathrop, N. Lopez-Bigas, B. F. Ouellette, P. T. Spellman, J. W. Teague, G. Thomas, A. Valencia, T. Yoshida, K. L. Kennedy, M. Axton, S. O. Dyke, P. A. Futreal, D. S. Gerhard, C. Gunter, M. Guyer, T. J. Hudson, J. D. McPherson, L. J. Miller, B. Ozenberger, K. M. Shaw, A. Kasprzyk, L. D. Stein, J. Zhang, S. A. Haider, J. Wang, C. K. Yung, A. Cros, Y. Liang, S. Gnaneshan, J. Guberman, J. Hsu, M. Bobrow, D. R. Chalmers, K. W. Hasel, Y. Joly, T. S. Kaan, K. L. Kennedy, B. M. Knoppers, W. W. Lowrance, T. Masui, P. Nicolas, E. Rial-Sebbag, L. L. Rodriguez, C. Vergely, T. Yoshida, S. M. Grimmond, A. V. Biankin, D. D. Bowtell, N. Cloonan, A. deFazio, J. R. Eshleman, D. Etemadmoghadam, B. B. Gardiner, J. G. Kench, A. Scarpa, R. L. Sutherland, M. A. Tempero, N. J. Waddell, P. J. Wilson, J. D. McPherson, S. Gallinger, M. S. Tsao, P. A. Shaw, G. M. Petersen, D. Mukhopadhyay, L. Chin, R. A. DePinho, S. Thayer, L. Muthuswamy, K. Shazand, T. Beck, M. Sam, L. Timms, V. Ballin, Y. Lu, J. Ji, X. Zhang, F. Chen, X. Hu, G. Zhou, Q. Yang, G. Tian, L. Zhang, X. Xing, X. Li, Z. Zhu, Y. Yu, J. Yu, H. Yang, M. Lathrop, J. Tost, P. Brennan, I. Holcatova, D. Zaridze, A. Brazma, L. Egevard, E. Prokhortchouk, R. E. Banks, M. Uhlen, A. Cambon-Thomsen, J. Viksna, F. Ponten, K. Skryabin, M. R. Stratton, P. A. Futreal, E. Birney, A. Borg, A. L. Borresen-Dale, C. Caldas, J. A. Foekens, S. Martin, J. S. Reis-Filho, A. L. Richardson, C. Sotiropoulos, H. G. Stunnenberg, G. Thoms, M. van de Vijver, L. van't Veer, F. Calvo, D. Birnbaum, H. Blanche, P. Boucher, S. Boyault, C. Chabannon, I. Gut, J. D. Masson-Jacquemier, M. Lathrop, I. Pauporte, X. Pivot, A. Vincent-Salomon, E. Tabone, C. Theillet, G. Thomas, J. Tost, I. Treilleux, F. Calvo,

- P. Bioulac-Sage, B. Clement, T. Decaens, F. Degos, D. Franco, I. Gut, M. Gut, S. Heath, M. Lathrop, D. Samuel, G. Thomas, J. Zucman-Rossi, P. Lichter, R. Eils, B. Brors, J. O. Korbel, A. Korshunov, P. Landgraf, H. Lehrach, S. Pfister, B. Radlwimmer, G. Reifemberger, M. D. Taylor, C. von Kalle, P. P. Majumder, R. Sarin, T. S. Rao, M. K. Bhan, A. Scarpa, P. Pederzoli, R. A. Lawlor, M. Delledonne, A. Bardelli, A. V. Biankin, S. M. Grimmond, T. Gress, D. Klimstra, G. Zamboni, T. Shibata, Y. Nakamura, H. Nakagawa, J. Kusada, T. Tsunoda, S. Miyano, H. Aburatani, K. Kato, A. Fujimoto, T. Yoshida, E. Campo, C. Lopez-Otin, X. Estivill, R. Guigo, S. de Sanjose, M. A. Piris, E. Montserrat, M. Gonzalez-Diaz, X. S. Puente, P. Jares, A. Valencia, H. Himmelbauer, V. Quesada, S. Bea, M. R. Stratton, P. A. Futreal, P. J. Campbell, A. Vincent-Salomon, A. L. Richardson, J. S. Reis-Filho, M. van de Vijver, G. Thomas, J. D. Masson-Jacquemier, S. Aparicio, A. Borg, A. L. Borresen-Dale, C. Caldas, J. A. Foekens, H. G. Stunnenberg, L. van't Veer, D. F. Easton, P. T. Spellman, S. Martin, A. D. Barker, L. Chin, F. S. Collins, C. C. Compton, M. L. Ferguson, D. S. Gerhard, G. Getz, C. Gunter, A. Gutmacher, M. Guyer, D. N. Hayes, E. S. Lander, B. Ozenberger, R. Penny, J. Peterson, C. Sander, K. M. Shaw, T. P. Speed, P. T. Spellman, J. G. Vockley, D. A. Wheeler, R. K. Wilson, T. J. Hudson, L. Chin, B. M. Knoppers, E. S. Lander, P. Lichter, L. D. Stein, M. R. Stratton, W. Anderson, A. D. Barker, C. Bell, M. Bobrow, W. Burke, F. S. Collins, C. C. Compton, R. A. DePinho, D. F. Easton, P. A. Futreal, D. S. Gerhard, A. R. Green, M. Guyer, S. R. Hamilton, T. J. Hubbard, O. P. Kallioniemi, K. L. Kennedy, T. J. Ley, E. T. Liu, Y. Lu, P. Majumder, M. Marra, B. Ozenberger, J. Peterson, A. J. Schafer, P. T. Spellman, H. G. Stunnenberg, B. J. Wainwright, R. K. Wilson, H. Yang, International network of cancer genome projects. *Nature* **464**, 993-998 (2010).
27. N. Cancer Genome Atlas Research, Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* **499**, 43-49 (2013).
28. N. Cancer Genome Atlas Research, W. M. Linehan, P. T. Spellman, C. J. Ricketts, C. J. Creighton, S. S. Fei, C. Davis, D. A. Wheeler, B. A. Murray, L. Schmidt, C. D. Vocke, M. Peto, A. A. Al Mamun, E. Shinbrot, A. Sethi, S. Brooks, W. K. Rathmell, A. N. Brooks, K. A. Hoadley, A. G. Robertson, D. Brooks, R. Bowlby, S. Sadeghi, H. Shen, D. J. Weisenberger, M. Bootwalla, S. B. Baylin, P. W. Laird, A. D. Cherniack, G. Saksena, S. Haake, J. Li, H. Liang, Y. Lu, G. B. Mills, R. Akbani, M. D. Leiserson, B. J. Raphael, P. Anur, D. Bottaro, L. Albiges, N. Barnabas, T. K. Choueiri, B. Czerniak, A. K. Godwin, A. A. Hakimi, T. H. Ho, J. Hsieh, M. Ittmann, W. Y. Kim, B. Krishnan, M. J. Merino, K. R. Mills Shaw, V. E. Reuter, E. Reznik, C. S. Shelley, B. Shuch, S. Signoretti, R. Srinivasan, P. Tamboli, G. Thomas, S. Tickoo, K. Burnett, D. Crain, J. Gardner, K. Lau, D. Mallery, S. Morris, J. D. Paulauskis, R. J. Penny, C. Shelton, W. T. Shelton, M. Sherman, E. Thompson, P. Yena, M. T. Avedon, J. Bowen, J. M. Gastier-Foster, M. Gerken, K. M. Leraas, T. M. Lichtenberg, N. C. Ramirez, T. Santos, L. Wise, E. Zmuda, J. A. Demchok, I. Felau, C. M. Hutter, M. Sheth, H. J. Sofia, R. Tarnuzzer, Z. Wang, L. Yang, J. C. Zenklusen, J. Zhang, B. Ayala, J. Baboud, S. Chudamani, J. Liu, L. Lolla, R. Naresh, T. Pihl, Q. Sun, Y. Wan, Y. Wu, A. Ally, M. Balasundaram, S. Balu, R. Beroukhim, T. Bodenheimer, C. Buhay, Y. S. Butterfield, R. Carlsen, S. L. Carter, H. Chao, E. Chuah, A. Clarke, K. R. Covington, M. Dahdouli, N. Dewal, N. Dhalla, H. V. Doddapaneni, J. A. Drummond, S. B. Gabriel, R. A. Gibbs, R. Guin, W. Hale, A. Hawes, D. N. Hayes, R. A. Holt, A. P. Hoyle, S. R. Jefferys, S. J. Jones, C. D. Jones, D. Kalra, C. Kovar, L. Lewis, J. Li, Y. Ma, M. A. Marra, M. Mayo, S. Meng, M. Meyerson, P. A. Mieczkowski, R. A. Moore, D. Morton, L. E. Mose, A. J. Mungall, D. Muzny, J. S. Parker, C. M. Perou, J. Roach, J. E. Schein, S. E. Schumacher, Y. Shi, J. V. Simons, P. Sipahimalani, T. Skelly, M. G. Soloway, C. Sougnez, A. Tam, D. Tan, N. Thiessen, U. Veluvolu, M. Wang, M. D. Wilkerson, T. Wong, J. Wu, L. Xi, J. Zhou, J. Bedford, F. Chen, Y. Fu, M. Gerstein, D. Haussler, K. Kasaian, P. Lai, S. Ling, A. Radenbaugh, D. Van Den Berg, J. N. Weinstein, J. Zhu, M. Albert, I. Alexopoulou, J. J. Andersen, J. T. Auman, J. Bartlett, S. Bastacky, J. Bergsten, M. L. Blute, L. Boice, R. J. Bollag, J. Boyd, E. Castle, Y. B. Chen, J. C. Cheville, E. Curley, B. Davies, A. DeVolk, R. Dhir, L. Dike, J. Eckman, J. Engel, J. Harr, R. Hrebinko, M. Huang, L. Huelsenbeck-Dill, M. Iacocca, B. Jacobs, M. Lobis, J. K. Maranchie, S.

- McMeekin, J. Myers, J. Nelson, J. Parfitt, A. Parwani, N. Petrelli, B. Rabeno, S. Roy, A. L. Salner, J. Slaton, M. Stanton, R. H. Thompson, L. Thorne, K. Tucker, P. M. Weinberger, C. Winemiller, L. A. Zach, R. Zuna, Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **374**, 135-145 (2016).
29. C. F. Davis, C. J. Ricketts, M. Wang, L. Yang, A. D. Cherniack, H. Shen, C. Buhay, H. Kang, S. C. Kim, C. C. Fahey, K. E. Hacker, G. Bhanot, D. A. Gordenin, A. Chu, P. H. Gunaratne, M. Biehl, S. Seth, B. A. Kaiparettu, C. A. Bristow, L. A. Donehower, E. M. Wallen, A. B. Smith, S. K. Tickoo, P. Tamboli, V. Reuter, L. S. Schmidt, J. J. Hsieh, T. K. Choueiri, A. A. Hakimi, N. The Cancer Genome Atlas Research, L. Chin, M. Meyerson, R. Kucherlapati, W. Y. Park, A. G. Robertson, P. W. Laird, E. P. Henske, D. J. Kwiatkowski, P. J. Park, M. Morgan, B. Shuch, D. Muzny, D. A. Wheeler, W. M. Linehan, R. A. Gibbs, W. K. Rathmell, C. J. Creighton, The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Cell* **26**, 319-330 (2014).
 30. C. J. Ricketts, A. A. De Cubas, H. Fan, C. C. Smith, M. Lang, E. Reznik, R. Bowlby, E. A. Gibb, R. Akbani, R. Beroukhim, D. P. Bottaro, T. K. Choueiri, R. A. Gibbs, A. K. Godwin, S. Haake, A. A. Hakimi, E. P. Henske, J. J. Hsieh, T. H. Ho, R. S. Kanchi, B. Krishnan, D. J. Kwiatkowski, W. Lui, M. J. Merino, G. B. Mills, J. Myers, M. L. Nickerson, V. E. Reuter, L. S. Schmidt, C. S. Shelley, H. Shen, B. Shuch, S. Signoretti, R. Srinivasan, P. Tamboli, G. Thomas, B. G. Vincent, C. D. Vocke, D. A. Wheeler, L. Yang, W. Y. Kim, A. G. Robertson, N. Cancer Genome Atlas Research, P. T. Spellman, W. K. Rathmell, W. M. Linehan, The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep* **23**, 313-326 e315 (2018).
 31. W. H. da Costa, A. F. Fares, S. M. Bezerra, M. A. Morini, L. A. de Toledo Benigno, D. A. Clavijo, L. Fornazieri, M. M. Rocha, I. W. da Cunha, S. de Cassio Zequi, Loss of BAP1 expression in metastatic tumor tissue is an event of poor prognosis in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* **37**, 78-85 (2019).
 32. E. R. Maher, Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J Urol* **36**, 1891-1898 (2018).
 33. N. Nakaigawa, M. Yao, M. Baba, S. Kato, T. Kishida, K. Hattori, Y. Nagashima, Y. Kubota, Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* **66**, 3699-3705 (2006).
 34. D. Lindgren, P. Eriksson, K. Krawczyk, H. Nilsson, J. Hansson, S. Veerla, J. Sjolund, M. Hognlund, M. E. Johansson, H. Axelson, Cell-Type-Specific Gene Programs of the Normal Human Nephron Define Kidney Cancer Subtypes. *Cell Rep* **20**, 1476-1489 (2017).
 35. A. J. Peired, E. Lazzeri, F. Guzzi, H. J. Anders, P. Romagnani, From kidney injury to kidney cancer. *Kidney Int* **100**, 55-66 (2021).
 36. G. Scelo, P. Li, E. Chanudet, D. C. Muller, Variability of Sex Disparities in Cancer Incidence over 30 Years: The Striking Case of Kidney Cancer. *Eur Urol Focus* **4**, 586-590 (2018).
 37. C. Palumbo, A. Pecoraro, S. Knipper, G. Rosiello, S. Luzzago, M. Deuker, Z. Tian, S. F. Shariat, C. Simeone, A. Briganti, F. Saad, A. Berruti, A. Antonelli, P. I. Karakiewicz, Contemporary Age-adjusted Incidence and Mortality Rates of Renal Cell Carcinoma: Analysis According to Gender, Race, Stage, Grade, and Histology. *Eur Urol Focus* **7**, 644-652 (2021).
 38. G. W. Dy, J. L. Gore, M. H. Forouzanfar, M. Naghavi, C. Fitzmaurice, Global Burden of Urologic Cancers, 1990-2013. *Eur Urol* **71**, 437-446 (2017).
 39. F. Wang, Y. Xu, Body mass index and risk of renal cell cancer: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. *Int J Cancer* **135**, 1673-1686 (2014).
 40. K. Bhaskaran, I. Douglas, H. Forbes, I. dos-Santos-Silva, D. A. Leon, L. Smeeth, Body-mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults. *Lancet* **384**, 755-765 (2014).
 41. A. Leiba, J. D. Kark, A. Afek, E. Derazne, M. Barchana, D. Tzur, A. Vivante, A. Shamiss, Adolescent obesity and paternal country of origin predict renal cell carcinoma: a cohort study of 1.1 million 16 to 19-year-old males. *J Urol* **189**, 25-29 (2013).

42. M. Arnold, N. Pandeya, G. Byrnes, P. A. G. Renehan, G. A. Stevens, P. M. Ezzati, J. Ferlay, J. J. Miranda, I. Romieu, R. Dikshit, D. Forman, I. Soerjomataram, Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. *Lancet Oncol* **16**, 36-46 (2015).
43. S. C. Larsson, A. Wolk, Diabetes mellitus and incidence of kidney cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia* **54**, 1013-1018 (2011).
44. H. K. Joh, W. C. Willett, E. Cho, Type 2 diabetes and the risk of renal cell cancer in women. *Diabetes Care* **34**, 1552-1556 (2011).
45. J. L. Harding, J. E. Shaw, A. Peeters, B. Cartensen, D. J. Magliano, Cancer risk among people with type 1 and type 2 diabetes: disentangling true associations, detection bias, and reverse causation. *Diabetes Care* **38**, 264-270 (2015).
46. J. K. McLaughlin, L. Lipworth, R. E. Tarone, Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. *Semin Oncol* **33**, 527-533 (2006).
47. W. H. Chow, L. M. Dong, S. S. Devesa, Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* **7**, 245-257 (2010).
48. S. Weikert, H. Boeing, T. Pischon, C. Weikert, A. Olsen, A. Tjonneland, K. Overvad, N. Becker, J. Linseisen, A. Trichopoulou, T. Mountokalakis, D. Trichopoulos, S. Sieri, D. Palli, P. Vineis, S. Panico, P. H. Peeters, H. B. Bueno-de-Mesquita, W. M. Verschuren, B. Ljungberg, G. Hallmans, G. Berglund, C. A. Gonzalez, M. Dorransoro, A. Barricarte, M. J. Tormo, N. Allen, A. Roddam, S. Bingham, K. T. Khaw, S. Rinaldi, P. Ferrari, T. Norat, E. Riboli, Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol* **167**, 438-446 (2008).
49. T. Stocks, M. Van Hemelrijck, J. Manjer, T. Bjorge, H. Ulmer, G. Hallmans, B. Lindkvist, R. Selmer, G. Nagel, S. Tretli, H. Concin, A. Engeland, H. Jonsson, P. Stattin, Blood pressure and risk of cancer incidence and mortality in the Metabolic Syndrome and Cancer Project. *Hypertension* **59**, 802-810 (2012).
50. K. M. Sanfilippo, K. M. McTigue, C. J. Fidler, J. D. Neaton, Y. Chang, L. F. Fried, S. Liu, L. H. Kuller, Hypertension and obesity and the risk of kidney cancer in 2 large cohorts of US men and women. *Hypertension* **63**, 934-941 (2014).
51. L. M. Sun, H. T. Kuo, L. B. Jeng, C. L. Lin, J. A. Liang, C. H. Kao, Hypertension and subsequent genitourinary and gynecologic cancers risk: a population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)* **94**, e753 (2015).
52. C. Yoon, H. S. Yang, I. Jeon, Y. Chang, S. M. Park, Use of angiotensin-converting-enzyme inhibitors or angiotensin-receptor blockers and cancer risk: a meta-analysis of observational studies. *CMAJ* **183**, E1073-1084 (2011).
53. W. H. Chow, G. Gridley, J. F. Fraumeni, Jr., B. Jarvholm, Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med* **343**, 1305-1311 (2000).
54. I. W. G. o. t. E. o. C. R. t. Humans, Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **100**, 1-538 (2012).
55. in *The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General*. (Atlanta (GA), 2014).
56. M. G. Cumberbatch, M. Rota, J. W. Catto, C. La Vecchia, The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol* **70**, 458-466 (2016).
57. N. B. Haas, K. L. Nathanson, Hereditary kidney cancer syndromes. *Adv Chronic Kidney Dis* **21**, 81-90 (2014).
58. E. R. Maher, H. P. Neumann, S. Richard, von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* **19**, 617-623 (2011).
59. W. Y. Kim, W. G. Kaelin, Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* **22**, 4991-5004 (2004).
60. G. Scelo, M. P. Purdue, K. M. Brown, M. Johansson, Z. Wang, J. E. Eckel-Passow, Y. Ye, J. N. Hofmann, J. Choi, M. Foll, V. Gaborieau, M. J. Machiela, L. M. Colli, P. Li, J. N. Sampson,

- B. Abedi-Ardekani, C. Besse, H. Blanche, A. Boland, L. Burdette, A. Chabrier, G. Durand, F. Le Calvez-Kelm, E. Prokhortchouk, N. Robinot, K. G. Skryabin, M. B. Wozniak, M. Yeager, G. Basta-Jovanovic, Z. Dzamic, L. Foretova, I. Holcatova, V. Janout, D. Mates, A. Mukeriya, S. Rascu, D. Zaridze, V. Bencko, C. Cybulski, E. Fabianova, V. Jinga, J. Lissowska, J. Lubinski, M. Navratilova, P. Rudnai, N. Szeszenia-Dabrowska, S. Benhamou, G. Cancel-Tassin, O. Cussenot, L. Baglietto, H. Boeing, K. T. Khaw, E. Weiderpass, B. Ljungberg, R. T. Sitaram, F. Bruinsma, S. J. Jordan, G. Severi, I. Winship, K. Hveem, L. J. Vatten, T. Fletcher, K. Koppova, S. C. Larsson, A. Wolk, R. E. Banks, P. J. Selby, D. F. Easton, P. Pharoah, G. Andreotti, L. E. B. Freeman, S. Koutros, D. Albanes, S. Mannisto, S. Weinstein, P. E. Clark, T. L. Edwards, L. Lipworth, S. M. Gapstur, V. L. Stevens, H. Carol, M. L. Freedman, M. M. Pomerantz, E. Cho, P. Kraft, M. A. Preston, K. M. Wilson, J. Michael Gaziano, H. D. Sesso, A. Black, N. D. Freedman, W. Y. Huang, J. G. Anema, R. J. Kahnoski, B. R. Lane, S. L. Noyes, D. Petillo, B. T. Teh, U. Peters, E. White, G. L. Anderson, L. Johnson, J. Luo, J. Buring, I. M. Lee, W. H. Chow, L. E. Moore, C. Wood, T. Eisen, M. Henrion, J. Larkin, P. Barman, B. C. Leibovich, T. K. Choueiri, G. Mark Lathrop, N. Rothman, J. F. Deleuze, J. D. McKay, A. S. Parker, X. Wu, R. S. Houlston, P. Brennan, S. J. Chanock, Genome-wide association study identifies multiple risk loci for renal cell carcinoma. *Nat Commun* **8**, 15724 (2017).
61. S. Carriazo, M. Vanessa Perez-Gomez, A. Ortiz, Hypertensive nephropathy: a major roadblock hindering the advance of precision nephrology. *Clin Kidney J* **13**, 504-509 (2020).
 62. S. R. Mulay, A. Linkermann, H. J. Anders, Necroinflammation in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* **27**, 27-39 (2016).
 63. P. Romagnani, G. Remuzzi, R. Glasscock, A. Levin, K. J. Jager, M. Tonelli, Z. Massy, C. Wanner, H. J. Anders, Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17088 (2017).
 64. A. Christensson, C. Savage, D. D. Sjoberg, A. M. Cronin, M. F. O'Brien, W. Lowrance, P. M. Nilsson, A. J. Vickers, P. Russo, H. Lilja, Association of cancer with moderately impaired renal function at baseline in a large, representative, population-based cohort followed for up to 30 years. *Int J Cancer* **133**, 1452-1458 (2013).
 65. T. J. Polascik, D. G. Bostwick, P. Cairns, Molecular genetics and histopathologic features of adult distal nephron tumors. *Urology* **60**, 941-946 (2002).
 66. W. Van Biesen, R. Vanholder, N. Lameire, Defining acute renal failure: RIFLE and beyond. *Clin J Am Soc Nephrol* **1**, 1314-1319 (2006).
 67. A. J. Peired, G. Antonelli, M. L. Angelotti, M. Allinovi, F. Guzzi, A. Sisti, R. Semeraro, C. Conte, B. Mazzinghi, S. Nardi, M. E. Melica, L. De Chiara, E. Lazzeri, L. Lasagni, T. Lottini, S. Landini, S. Giglio, A. Mari, F. Di Maida, A. Antonelli, F. Porpiglia, R. Schiavina, V. Ficarra, D. Facchiano, M. Gacci, S. Serni, M. Carini, G. J. Netto, R. M. Roperto, A. Magi, C. F. Christiansen, M. Rotondi, H. Liapis, H. J. Anders, A. Minervini, M. R. Raspollini, P. Romagnani, Acute kidney injury promotes development of papillary renal cell adenoma and carcinoma from renal progenitor cells. *Sci Transl Med* **12**, (2020).
 68. S. Sawhney, H. A. Robinson, S. N. van der Veer, H. O. Hounkpatin, T. M. Scale, J. A. Chess, N. Peek, A. Marks, G. I. Davies, P. Fraccaro, M. J. Johnson, R. A. Lyons, D. Nitsch, P. J. Roderick, N. Halbesma, E. Miller-Hodges, C. Black, S. Fraser, Acute kidney injury in the UK: a replication cohort study of the variation across three regional populations. *BMJ Open* **8**, e019435 (2018).
 69. E. D. Siew, A. Davenport, The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail? *Kidney Int* **87**, 46-61 (2015).
 70. M. Schmidt, S. A. Schmidt, J. L. Sandegaard, V. Ehrenstein, L. Pedersen, H. T. Sorensen, The Danish National Patient Registry: a review of content, data quality, and research potential. *Clin Epidemiol* **7**, 449-490 (2015).
 71. M. L. Gjerstorff, The Danish Cancer Registry. *Scand J Public Health* **39**, 42-45 (2011).
 72. H. A. Alshenawy, Immunohistochemical panel for differentiating renal cell carcinoma with clear and papillary features. *J Microsc Ultrastruct* **3**, 68-74 (2015).

73. E. Lazzeri, M. L. Angelotti, A. Peired, C. Conte, J. A. Marschner, L. Maggi, B. Mazzinghi, D. Lombardi, M. E. Melica, S. Nardi, E. Ronconi, A. Sisti, G. Antonelli, F. Becherucci, L. De Chiara, R. R. Guevara, A. Burger, B. Schaefer, F. Annunziato, H. J. Anders, L. Lasagni, P. Romagnani, Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury. *Nat Commun* **9**, 1344 (2018).
74. W. Lieberthal, S. K. Nigam, Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol* **275**, F623-631 (1998).
75. A. A. Sharfuddin, B. A. Molitoris, Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* **7**, 189-200 (2011).
76. J. A. Funk, R. G. Schnellmann, Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **302**, F853-864 (2012).
77. T. Kusaba, M. Lalli, R. Kramann, A. Kobayashi, B. D. Humphreys, Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 1527-1532 (2014).
78. B. D. Humphreys, S. Czerniak, D. P. DiRocco, W. Hasnain, R. Cheema, J. V. Bonventre, Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9226-9231 (2011).
79. B. D. Humphreys, M. T. Valerius, A. Kobayashi, J. W. Mugford, S. Soeung, J. S. Duffield, A. P. McMahon, J. V. Bonventre, Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell* **2**, 284-291 (2008).
80. K. Berger, J. M. Bangen, L. Hammerich, C. Liedtke, J. Floege, B. Smeets, M. J. Moeller, Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 1533-1538 (2014).
81. M. L. Angelotti, E. Ronconi, L. Ballerini, A. Peired, B. Mazzinghi, C. Sagrinati, E. Parente, M. Gacci, M. Carini, M. Rotondi, A. B. Fogo, E. Lazzeri, L. Lasagni, P. Romagnani, Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells* **30**, 1714-1725 (2012).
82. Y. Jiang, D. Henderson, M. Blackstad, A. Chen, R. F. Miller, C. M. Verfaillie, Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11854-11860 (2003).
83. K. J. Cho, K. A. Trzaska, S. J. Greco, J. McArdle, F. S. Wang, J. H. Ye, P. Rameshwar, 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* **23**, 383-391 (2005).
84. C. Sagrinati, G. S. Netti, B. Mazzinghi, E. Lazzeri, F. Liotta, F. Frosali, E. Ronconi, C. Meini, M. Gacci, R. Squecco, M. Carini, L. Gesualdo, F. Francini, E. Maggi, F. Annunziato, L. Lasagni, M. Serio, S. Romagnani, P. Romagnani, Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* **17**, 2443-2456 (2006).
85. P. Romagnani, Family portrait: renal progenitor of Bowman's capsule and its tubular brothers. *Am J Pathol* **178**, 490-493 (2011).
86. B. Bussolati, S. Bruno, C. Grange, S. Buttiglieri, M. C. Deregibus, D. Cantino, G. Camussi, Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* **166**, 545-555 (2005).
87. L. Lasagni, M. L. Angelotti, E. Ronconi, D. Lombardi, S. Nardi, A. Peired, F. Becherucci, B. Mazzinghi, A. Sisti, S. Romoli, A. Burger, B. Schaefer, A. Buccoliero, E. Lazzeri, P. Romagnani, Podocyte Regeneration Driven by Renal Progenitors Determines Glomerular Disease Remission and Can Be Pharmacologically Enhanced. *Stem Cell Reports* **5**, 248-263 (2015).
88. S. H. Son, D. H. Kim, C. M. Hong, C. Y. Kim, S. Y. Jeong, S. W. Lee, J. Lee, B. C. Ahn, Prognostic implication of intratumoral metabolic heterogeneity in invasive ductal carcinoma of the breast. *BMC Cancer* **14**, 585 (2014).

89. A. P. Patel, I. Tirosh, J. J. Trombetta, A. K. Shalek, S. M. Gillespie, H. Wakimoto, D. P. Cahill, B. V. Nahed, W. T. Curry, R. L. Martuza, D. N. Louis, O. Rozenblatt-Rosen, M. L. Suva, A. Regev, B. E. Bernstein, Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**, 1396-1401 (2014).
90. H. Shen, P. W. Laird, Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* **153**, 38-55 (2013).
91. S. B. Baylin, P. A. Jones, A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* **11**, 726-734 (2011).
92. E. A. Kidd, P. W. Grigsby, Intratumoral metabolic heterogeneity of cervical cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 5236-5241 (2008).
93. A. Kreso, J. E. Dick, Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* **14**, 275-291 (2014).
94. R. Shukrun, N. Pode Shakked, B. Dekel, Targeted therapy aimed at cancer stem cells: Wilms' tumor as an example. *Pediatr Nephrol* **29**, 815-823; quiz 821 (2014).
95. A. J. Peired, A. Sisti, P. Romagnani, Renal Cancer Stem Cells: Characterization and Targeted Therapies. *Stem Cells Int* **2016**, 8342625 (2016).
96. K. Rycaj, D. G. Tang, Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Res* **75**, 4003-4011 (2015).
97. N. A. Dallas, S. Samuel, L. Xia, F. Fan, M. J. Gray, S. J. Lim, L. M. Ellis, Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* **14**, 1931-1937 (2008).
98. B. Bussolati, S. Bruno, C. Grange, U. Ferrando, G. Camussi, Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *FASEB J* **22**, 3696-3705 (2008).
99. D. Lindgren, A. K. Bostrom, K. Nilsson, J. Hansson, J. Sjolund, C. Moller, K. Jirstrom, E. Nilsson, G. Landberg, H. Axelson, M. E. Johansson, Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *Am J Pathol* **178**, 828-837 (2011).
100. W. Dubinski, M. Gabriel, V. V. Iakovlev, A. Scorilas, Y. M. Youssef, H. Faragalla, K. Kovacs, F. Rotondo, S. Metias, A. Arsanious, A. Plotkin, A. H. Girgis, C. J. Streutker, G. M. Yousef, Assessment of the prognostic significance of endoglin (CD105) in clear cell renal cell carcinoma using automated image analysis. *Hum Pathol* **43**, 1037-1043 (2012).
101. A. H. Yin, S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney, D. W. Buck, AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**, 5002-5012 (1997).
102. S. Bruno, B. Bussolati, C. Grange, F. Collino, M. E. Graziano, U. Ferrando, G. Camussi, CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol* **169**, 2223-2235 (2006).
103. V. Galleggiante, M. Rutigliano, F. Sallustio, D. Ribatti, P. Ditonno, C. Bettocchi, F. P. Selvaggi, G. Lucarelli, M. Battaglia, CTR2 identifies a population of cancer cells with stem cell-like features in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* **192**, 1831-1841 (2014).
104. H. Axelson, M. E. Johansson, Renal stem cells and their implications for kidney cancer. *Semin Cancer Biol* **23**, 56-61 (2013).
105. D. Matak, L. Szymanski, C. Szczylik, R. Sledziewski, F. Lian, E. Bartnik, A. Sobocinska, A. M. Czarnecka, Biology of renal tumour cancer stem cells applied in medicine. *Contemp Oncol (Pozn)* **19**, A44-51 (2015).
106. W. H. Costa, R. M. Rocha, I. W. Cunha, F. P. Fonseca, G. C. Guimaraes, C. Zequi Sde, CD133 immunohistochemical expression predicts progression and cancer-related death in renal cell carcinoma. *World J Urol* **30**, 553-558 (2012).
107. C. D'Alterio, L. Cindolo, L. Portella, M. Polimeno, C. Consales, A. Riccio, M. Cioffi, R. Franco, P. Chiodini, G. Carteni, V. Mirone, N. Longo, L. Marra, S. Perdona, L. Claudio, M. Mascolo, S. Staibano, M. Falsaperla, M. Puglisi, G. Martignoni, V. Ficarra, G. Castello, S.

- Scala, Differential role of CD133 and CXCR4 in renal cell carcinoma. *Cell Cycle* **9**, 4492-4500 (2010).
108. Y. Zhang, B. Sun, X. Zhao, Z. Liu, X. Wang, X. Yao, X. Dong, J. Chi, Clinical significances and prognostic value of cancer stem-like cells markers and vasculogenic mimicry in renal cell carcinoma. *J Surg Oncol* **108**, 414-419 (2013).
 109. K. Kim, H. Ihm, J. Y. Ro, Y. M. Cho, High-level expression of stem cell marker CD133 in clear cell renal cell carcinoma with favorable prognosis. *Oncol Lett* **2**, 1095-1100 (2011).
 110. K. Kim, J. Y. Ro, S. Kim, Y. M. Cho, Expression of stem-cell markers OCT-4 and CD133: important prognostic factors in papillary renal cell carcinoma. *Hum Pathol* **43**, 2109-2116 (2012).
 111. F. Guo, Y. Wang, J. Liu, S. C. Mok, F. Xue, W. Zhang, CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene* **35**, 816-826 (2016).
 112. A. J. Schrader, O. Lechner, M. Templin, K. E. Dittmar, S. Machtens, M. Mengel, M. Probst-Keppler, A. Franzke, T. Wollensak, P. Gatzlaff, J. Atzpodien, J. Buer, J. Lauber, CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer* **86**, 1250-1256 (2002).
 113. M. Gassenmaier, D. Chen, A. Buchner, L. Henkel, M. Schiemann, B. Mack, D. J. Schendel, W. Zimmermann, H. Pohla, CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells* **31**, 1467-1476 (2013).
 114. C. Micucci, G. Matakchione, D. Valli, S. Orciari, A. Catalano, HIF2alpha is involved in the expansion of CXCR4-positive cancer stem-like cells in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **113**, 1178-1185 (2015).
 115. G. Li, G. Badin, A. Zhao, A. Gentil-Perret, J. Tostain, M. Peoc'h, M. Gigante, Prognostic value of CXCR4 expression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Histol Histopathol* **28**, 1217-1222 (2013).
 116. L. Wang, W. Chen, L. Gao, Q. Yang, B. Liu, Z. Wu, Y. Wang, Y. Sun, High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol* **10**, 212 (2012).
 117. A. Ottaiano, Finding markers for cancer stem cells in renal cell carcinoma: looking beyond CD133. *Cell Cycle* **9**, 4431 (2010).
 118. B. P. Toole, Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin Cancer Res* **15**, 7462-7468 (2009).
 119. B. G. Debeb, X. Zhang, S. Krishnamurthy, H. Gao, E. Cohen, L. Li, A. A. Rodriguez, M. D. Landis, A. Lucci, N. T. Ueno, F. Robertson, W. Xu, L. Lacerda, T. A. Buchholz, M. Cristofanilli, J. M. Reuben, M. T. Lewis, W. A. Woodward, Characterizing cancer cells with cancer stem cell-like features in 293T human embryonic kidney cells. *Mol Cancer* **9**, 180 (2010).
 120. S. D. Lim, A. N. Young, G. P. Paner, M. B. Amin, Prognostic role of CD44 cell adhesion molecule expression in primary and metastatic renal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 125 cases. *Virchows Arch* **452**, 49-55 (2008).
 121. X. Li, X. Ma, L. Chen, L. Gu, Y. Zhang, F. Zhang, Y. Ouyang, Y. Gao, Q. Huang, X. Zhang, Prognostic value of CD44 expression in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* **5**, 13157 (2015).
 122. C. Ma, Y. Komohara, K. Ohnishi, T. Shimoji, N. Kuwahara, Y. Sakumura, K. Matsuishi, Y. Fujiwara, T. Motoshima, W. Takahashi, S. Yamada, S. Kitada, N. Fujimoto, T. Nakayama, M. Eto, M. Takeya, Infiltration of tumor-associated macrophages is involved in CD44 expression in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci* **107**, 700-707 (2016).
 123. J. H. Cho, B. Patel, S. Bonala, S. Manne, Y. Zhou, S. K. Vadrevu, J. Patel, M. Peronaci, S. Ghose, E. P. Henske, F. Roegiers, K. Giannikou, D. J. Kwiatkowski, H. Mansouri, M. M. Markiewski, B. White, M. Karbowiczek, Notch transactivates Rheb to maintain the multipotency of TSC-null cells. *Nat Commun* **8**, 1848 (2017).

124. A. F. Goncalves, M. Adlesic, S. Brandt, T. Hejhal, S. Harlander, L. Sommer, O. Shakhova, P. J. Wild, I. J. Frew, Evidence of renal angiomyolipoma neoplastic stem cells arising from renal epithelial cells. *Nat Commun* **8**, 1466 (2017).
125. M. D. Young, T. J. Mitchell, F. A. Vieira Braga, M. G. B. Tran, B. J. Stewart, J. R. Ferdinand, G. Collord, R. A. Botting, D. M. Popescu, K. W. Loudon, R. Vento-Tormo, E. Stephenson, A. Cagan, S. J. Farndon, M. Del Castillo Velasco-Herrera, C. Guzzo, N. Richoz, L. Mamanova, T. Aho, J. N. Armitage, A. C. P. Riddick, I. Mushtaq, S. Farrell, D. Rampling, J. Nicholson, A. Filby, J. Burge, S. Lisgo, P. H. Maxwell, S. Lindsay, A. Y. Warren, G. D. Stewart, N. Sebire, N. Coleman, M. Haniffa, S. A. Teichmann, M. Clatworthy, S. Behjati, Single-cell transcriptomes from human kidneys reveal the cellular identity of renal tumors. *Science* **361**, 594-599 (2018).
126. A. Maeshima, S. Yamashita, Y. Nojima, Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* **14**, 3138-3146 (2003).
127. B. Smeets, C. Kuppe, E. M. Sicking, A. Fuss, P. Jirak, T. H. van Kuppevelt, K. Endlich, J. F. Wetzels, H. J. Grone, J. Floege, M. J. Moeller, Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* **22**, 1262-1274 (2011).
128. H. H. Chang, M. Hemberg, M. Barahona, D. E. Ingber, S. Huang, Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* **453**, 544-547 (2008).
129. N. McGranahan, C. Swanton, Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* **168**, 613-628 (2017).
130. J. M. Alves, D. Posada, Sensitivity to sequencing depth in single-cell cancer genomics. *Genome Med* **10**, 29 (2018).
131. N. E. Navin, Delineating cancer evolution with single-cell sequencing. *Sci Transl Med* **7**, 296fs229 (2015).
132. N. A. Saunders, F. Simpson, E. W. Thompson, M. M. Hill, L. Endo-Munoz, G. Leggatt, R. F. Minchin, A. Guminski, Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives. *EMBO Mol Med* **4**, 675-684 (2012).
133. D. Lahnemann, J. Koster, E. Szczurek, D. J. McCarthy, S. C. Hicks, M. D. Robinson, C. A. Vallejos, K. R. Campbell, N. Beerenwinkel, A. Mahfouz, L. Pinello, P. Skums, A. Stamatakis, C. S. Attolini, S. Aparicio, J. Baaijens, M. Balvert, B. Barbanson, A. Cappuccio, G. Corleone, B. E. Dutilh, M. Florescu, V. Guryev, R. Holmer, K. Jahn, T. J. Lobo, E. M. Keizer, I. Khatri, S. M. Kielbasa, J. O. Korbel, A. M. Kozlov, T. H. Kuo, B. P. F. Lelieveldt, Mandoiu, II, J. C. Marioni, T. Marschall, F. Molder, A. Niknejad, L. Raczkowski, M. Reinders, J. Ridder, A. E. Saliba, A. Somarakis, O. Stegle, F. J. Theis, H. Yang, A. Zelikovsky, A. C. McHardy, B. J. Raphael, S. P. Shah, A. Schonhuth, Eleven grand challenges in single-cell data science. *Genome Biol* **21**, 31 (2020).
134. J. Kuipers, K. Jahn, N. Beerenwinkel, Advances in understanding tumour evolution through single-cell sequencing. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1867**, 127-138 (2017).
135. Y. C. Chen, S. Sahoo, R. Brien, S. Jung, B. Humphries, W. Lee, Y. H. Cheng, Z. Zhang, K. E. Luker, M. S. Wicha, G. D. Luker, E. Yoon, Single-cell RNA-sequencing of migratory breast cancer cells: discovering genes associated with cancer metastasis. *Analyst* **144**, 7296-7309 (2019).
136. K. T. Kim, H. W. Lee, H. O. Lee, H. J. Song, E. Jeong da, S. Shin, H. Kim, Y. Shin, D. H. Nam, B. C. Jeong, D. G. Kirsch, K. M. Joo, W. Y. Park, Application of single-cell RNA sequencing in optimizing a combinatorial therapeutic strategy in metastatic renal cell carcinoma. *Genome Biol* **17**, 80 (2016).
137. J. Park, R. Shrestha, C. Qiu, A. Kondo, S. Huang, M. Werth, M. Li, J. Barasch, K. Susztak, Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease. *Science* **360**, 758-763 (2018).

138. C. E. Meacham, S. J. Morrison, Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328-337 (2013).
139. M. Shackleton, E. Quintana, E. R. Fearon, S. J. Morrison, Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* **138**, 822-829 (2009).
140. A. Fendler, D. Bauer, J. Busch, K. Jung, A. Wulf-Goldenberg, S. Kunz, K. Song, A. Myszczyzyn, S. Elezkurtaj, B. Erguen, S. Jung, W. Chen, W. Birchmeier, Inhibiting WNT and NOTCH in renal cancer stem cells and the implications for human patients. *Nat Commun* **11**, 929 (2020).
141. Y. Mo, Y. Wang, L. Zhang, L. Yang, M. Zhou, X. Li, Y. Li, G. Li, Z. Zeng, W. Xiong, F. Xiong, C. Guo, The role of Wnt signaling pathway in tumor metabolic reprogramming. *J Cancer* **10**, 3789-3797 (2019).
142. L. Lasagni, L. Ballerini, M. L. Angelotti, E. Parente, C. Sagrinati, B. Mazzinghi, A. Peired, E. Ronconi, F. Becherucci, D. Bani, M. Gacci, M. Carini, E. Lazzeri, P. Romagnani, Notch activation differentially regulates renal progenitors proliferation and differentiation toward the podocyte lineage in glomerular disorders. *Stem Cells* **28**, 1674-1685 (2010).
143. G. Chen, X. Deng, Cell Synchronization by Double Thymidine Block. *Bio Protoc* **8**, (2018).
144. A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, J. P. Mesirov, Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550 (2005).
145. A. Liberzon, C. Birger, H. Thorvaldsdottir, M. Ghandi, J. P. Mesirov, P. Tamayo, The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* **1**, 417-425 (2015).
146. Y. Sirin, K. Susztak, Notch in the kidney: development and disease. *J Pathol* **226**, 394-403 (2012).
147. S. R. Granter, A. R. Perez-Atayde, A. A. Renshaw, Cytologic analysis of papillary renal cell carcinoma. *Cancer* **84**, 303-308 (1998).
148. L. N. Kent, G. Leone, The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nat Rev Cancer* **19**, 326-338 (2019).
149. C. Topham, A. Tighe, P. Ly, A. Bennett, O. Sloss, L. Nelson, R. A. Ridgway, D. Huels, S. Littler, C. Schandl, Y. Sun, B. Bechi, D. J. Procter, O. J. Sansom, D. W. Cleveland, S. S. Taylor, MYC Is a Major Determinant of Mitotic Cell Fate. *Cancer Cell* **28**, 129-140 (2015).
150. M. Dias Gomes, S. Letzian, M. Saynisch, S. Iden, Polarity signaling ensures epidermal homeostasis by coupling cellular mechanics and genomic integrity. *Nat Commun* **10**, 3362 (2019).
151. F. Martin-Belmonte, M. Perez-Moreno, Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 23-38 (2011).
152. M. Uhlen, L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, F. Ponten, Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
153. K. Kiwerska, K. Szyfter, DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy-a double-edged sword. *J Appl Genet* **60**, 329-334 (2019).
154. C. Tomasetti, B. Vogelstein, Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* **347**, 78-81 (2015).
155. A. K. Basu, DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
156. F. Sallustio, L. De Benedictis, G. Castellano, G. Zaza, A. Loverre, V. Costantino, G. Grandaliano, F. P. Schena, TLR2 plays a role in the activation of human resident renal stem/progenitor cells. *FASEB J* **24**, 514-525 (2010).

157. W. P. Roos, A. D. Thomas, B. Kaina, DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer* **16**, 20-33 (2016).
158. K. Surendran, M. Selassie, H. Liapis, H. Krigman, R. Kopan, Reduced Notch signaling leads to renal cysts and papillary microadenomas. *J Am Soc Nephrol* **21**, 819-832 (2010).