



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismos moleculares que regulan el crecimiento, la metástasis y la resistencia a terapias del carcinoma escamoso de piel

Adrià Bernat Peguera

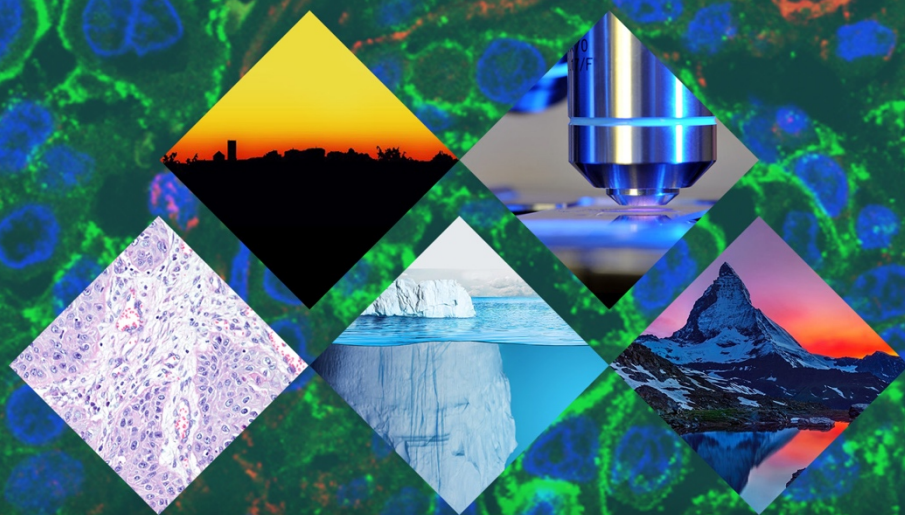
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Mecanismos moleculares que regulan el crecimiento, la metástasis y la resistencia a terapias del carcinoma escamoso de piel

Memoria Tesis Doctoral



Adrià Bernat Peguera
Barcelona, 2019



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



UNIVERSITAT

Mecanismos moleculares que regulan el crecimiento, la metástasis y la resistencia a terapias del carcinoma escamoso de piel

Memoria Tesis Doctoral

Adrià Bernat Peguera

Barcelona, 2019

IBELL 
d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

Mecanismos moleculares que regulan el crecimiento, la metástasis y la resistencia a terapias del carcinoma escamoso de piel

Memoria presentada por Adrià Bernat Peguera para optar al grado de
Doctor por la Universitat de Barcelona

UNIVERSITAT DE BARCELONA - FACULTAT DE FARMÀCIA I
CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA 2019

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Grupo de Envejecimiento y Cáncer, dentro del Programa Oncobell y del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

Dra. Purificación Muñoz Moruno
Directora

Dr. Albert Tauler Girona
Tutor

Adrià Bernat Peguera
Doctorando

Per la mare, el pare i el Xavier

Tant de bo no m'hagués merescut mai aquest reconeixement.
A Lesbos, el meu equip i jo mateix, hem vist la gran passivitat d'Europa respecte d'un drama
que succeeix a les seves costes.

Amb uns pocs voluntaris, hem fet més per la crisi que vint-i-vuit governs del segle XXI plegats.
A l'Egeu han mort centenars de persones i la UE ha esmerçat els recursos en l'expulsió
ostentosa i desproporcionada dels refugiats.

Ignoro el motiu de l'èxode, segurament les guerres obliguen a la gent a fugir de la mort.
Però hem salvat vides cada dia, fem el màxim que un ésser humà pot fer per un altre: salvar-li la
VIDA.

Oscar Camps
Fundador i director de l'ONG badalonina Proactiva Open Arms
Català de l'Any 2015

AGRADECIMIENTOS

Amb tota seguretat aquest apartat serà el que més fàcil em resultarà d'escriure, i es que malgrat aquest camí ha sigut més llarg de l'esperat, m'enduc la caixa de les coses positives ben plena.

Primerament, m'agradaria començar per agrair a tota aquella gent del PEBC i de l'IDIBELL que ha contribuït d'una manera o altra en aquesta tesi i en els articles que s'hi inclouen. Començant pels altres departaments de l'DIBELL. Moltes gràcies a la gent del LRT i del LOM, tant estudiants, predocs, com investigadors principals, per haver-me ajudat sempre que ho he necessitat.

Per alguns, el PEBC s'ha convertit durant tots aquests anys en casa nostra, d'aquí que el bon rotllo, la familiaritat i les ganes d'ajudar hagin estat els pilars que han sustentant aquest castell per on hi ha passat molta gent. Començant pels vells predocs i altres del grup del Dr. Manel Esteller com el Jose, el Miguel, el Javi, l'Humberto, la Laia, la Vanesa, la Carmen, l'Alexia, la Catia, i acabant pels meus contemporanis com la Montse, el Pere, la Vanesa, la Lida, la Cristina, l'Aida, etc... També la gent del laboratori de la Montse Sánchez, Manueeeeé!! També tota la gent de l'Àlex Vaquero, Dave Monk, Ethel, Esteban Ballestar i Maribel Parra. Gràcies a tots, de veritat! Gràcies pels moments a cultius, inclús en cap de setmana, eh Ana! I també per les vàries ajudes tècniques/bioinformàtiques, eeh Xec!! I per molts altres motius, mil gràcies!

Gent del laboratori de la Eva Gonzalez, em compartit moltes rialles, experiències positives, negatives, però ens n'hem sortit. Àlex, Pascuale, Marta, Gonzalo i David. Vosaltres ja fa temps que vàreu marxar, però l'empremta que vàreu deixar encara és visible avui en dia. Gràcies Àlex per tots el Joaquineees y els Chotacabras que em vas regalar! També als més actuals, Sandra, Eva, Clara, Marina, Ana, Kim, Alexes, Jorge i Guille. Quines tardes més divertides hem passat fins les 21.00h al laboratori, eh Jorge! Gràcies per tot el suport i serenitat que m'has donat durant tot aquest temps. Guille, para ti no tengo palabras... Te recogí un día de la calle y has acabado siendo uno de mis mejores amigos y una de las mejores personas que he conocido en mi vida. Admiro tu capacidad para afrontar todo, pero siempre teniendo muy claro dónde están los límites. ¡Sigue así hermano!

Ara vull fer especial menció a tots els que han format part del grup de la Dra Puri Muñoz. Empezando por ti Puri, gracias por darme la oportunidad de formarme y disfrutar de la ciencia en tu grupo. ¡Ha sido duro, pero ha valido la pena! Gracias a ti Vicky también. Probablemente eres la persona que más me ha enseñado y por la que más admiración he sentido. Tu colocaste los primeros ladrillos que han sustentado el PEBC6 y que otros hemos aprovechado luego para seguir construyendo. Sin tu base esto no hubiese sido posible. Per la Maria, perquè des del primer dia que va sortir per la porta l'hem trobat a faltar dia rere dia. Gràcies per amenitzar els dies amb les

teves rialles i balls. Per la Pili, la companyera perseverante, luchadora y siempre un gran punto de apoyo. Gracias por todas esas conversaciones que tanto nos han ayudado a los dos. També m'agradaria agrair a la Laura i a la Marta per tota l'ajuda que m'han ofert durant la recta final de la tesis i per fer-me riure els dies que més ho necessitava. Joan, a tu també et vull agrair que hagis agafat les regnes del projecte i que mostris il·lusió i dedicació. Molts ànims en aquesta etapa! Finalment, no puc deixar d'agrair a la gent que ha passat per aquest grup que amb més o menys mesura tots han contribuït a aquesta tesis, gràcies Sandra, Laura Díaz i Mikel.

També a la gent de l'Animalari, pels que encara hi son, i pels que ja no. Gràcies Joana, Rosa, Charo, Gloria, Mari, Amelia, Pablo, Brian y Eric, per fer tot el possible per facilitar-nos la feina i que aquesta pogués arribar a bon port.

Tampoc em puc oblidar de la gent que moltes vegades no es veu però que desenvolupa una tasca essencial en la ciència, les tècnics de neteja i autoclau. Sònia, Olga, Mari y Rosa, moltes gràcies. També a la gent del servei de neteja, per la gran tasca que fan però poc reconeguda moltes vegades, i per les converses dels vespres-nits al PEBC. Gràcies Porfi, Àlbaro i Isa.

I si és cert que la llista d'agraïments que tinc per tota la bona gent que m'he creuat durant tots aquests anys en el món professional és força extensa, una part molt important de tota aquesta etapa ha estat fora del laboratori.

L'exitós i històric Nothingam Pressa ha sigut una gran via d'escapament per evadir les tensions laborals inevitables en qualsevol lloc, però també ha sigut un motiu de trobada de gent molt i molt gran amb la qual he pogut aprendre i gaudir tant de partits de futbol com de barbacoes interminables! Carlos, David, Marc, Àlex, Pepelu, el Gran Míster (David) y Alfredo. També la gent del Mercé FS, perquè tot i que vam estar junts poc temps també vau demostrar-me humanitat, professionalitat, ganes de progressar i gaudir de l'esport. Cube, Chergio, Puig, Brau, Víctor i Eric, gràcies també a vosaltres.

Amics de total a vida, Sergi, Jordi, Josep, Pau, Axel, Ramon, soc conscient que durant aquest temps no he pogut estar molt per vosaltres i que les vides de tots han anat divergint. És l'inevitable pas de la vida, però se que quan ens unim no falten les rialles i les burrades.

També per la gent de Biotec que ens hem convertit en una petita família, que tot i que ens veiem poc, quan ho fem és com revivre una joventut on tot és fantàstic. Albert, Raúl, Nekane, Toni, Mireia, Kike, Tamara. Tu Noel també entres a aquest grup, però saps perfectament el que has representat i representes en la meva vida.

Pare, Mare i Xavier, soc conscient que moltes vegades no heu entès perquè feia algunes coses, però tot i així heu confiat en mi en tot moment i m'heu donat tot el suport i caliu que necessitava.

Sortir de la capital i tornar a Juneda sabeu molt bé que era una necessitat vital, i estar a casa amb vosaltres sempre ha estat un bon refugi per mi. Gràcies per tot l'esforç que m'heu dedicat durant la meua carrera, que, juntament amb els valors que m'heu transmès des de ben petit, han fet que ara pugui estar escrivint aquesta tesi doctoral. Sempre he cregut en que la vida t'acaba recompensant per tot allò positiu que has fet, i en aquest cas seré jo, i no la vida, qui us recompensarà per tot el que heu fet per mi.

Potser aquesta és la part que em contarà més, no per la falta de paraules sinó perquè em tremolen les mans a l'escriure. Cinc anys enrere fins ara heu estat la meua segona família. Neus, per sempre mirar pel benestar dels altres i haver-me fet sentir com a casa. A tu Lluís, per compartir amb mi el teu pou de saviesa i no deixar-me mai de sorprendre amb històries increïbles. A tu Marc, per que t'admiro enormement i perquè de tu també he après moltíssim. Alba, perquè malgrat les dificultats que t'ha tocat passar, el somriure és el teu segell d'identitat. Josep, si, tu també, perquè amb una mirada m'ho deies tot. Maria Rosa, per demostrar al món que mai és tard per sentir-se la princesa més bella. Nina, gràcies per la teva lliçó de vida i per la truita de patates més bona que he menjat mai. José, també gràcies a tu per la teva hospitalitat, per mostrar-me aquell punt just de trapella i per preguntar-me "como van los ratones" cada vegada que ens véiem. Gràcies a tots vosaltres per les rialles, per les converses, pels consells, per les excursions, pels dinars/sopars, per tots i cada un dels minuts que hem compartit que porto ben guardats dins el cor i que em serveixen per il·luminar les meves passes els dies de fosc.

I gràcies a tu Laia, perquè has entrat a la meua vida per quedar-t'hi. Perquè en tot moment m'has entès, m'has donat suport, i no has deixat que em rendeixi. T'estimo! Per mi, les glans sempre estarán unides, una al costat de l'altra, ben unides! A 3000 metres d'alçada segueixen unides, a -20 cm encara més unides, 900 km de distància no son suficients per trencar la unió. El temps, el cony de temps... la guspira, la llum,...

...tan se val, ha bufat molt de vent...

ÍNDICE

<u>ÍNDICE</u>	16
<u>ABREVIATURAS</u>	22
<u>INTRODUCCIÓN</u>	29
1. CÁNCER DE PIEL NO-MELANOMA	31
1.1. Carcinoma de célula escamosa de piel (cSCC)	31
1.2. Tratamiento del carcinoma de célula escamosa de piel	33
1.3. Modelos de ratón de carcinoma de célula escamosa de piel	34
1.3.1. Modelo de carcinogénesis química	34
1.3.2. Modelos animales modificados genéticamente	35
1.3.2. Modelo de progresión de SCC de piel	37
2. HETEROGENEIDAD Y PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS TUMORALES. CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER (CSCs)	38
2.1. Modelos de heterogeneidad tumoral	39
2.1.1. Modelo de evolución clonal	39
2.1.2. Modelo de células madre del cáncer	39
2.1.3. Modelo de plasticidad de las células tumorales	41
2.2. Identificación de las CSCs en carcinomas de célula escamosa de piel de ratón y humano	42
2.3. El programa EMT y el estado CSC en progresión tumoral y metástasis	45
2.3.1. EMT parcial y la adquisición de características <i>stemness</i>	46
2.3.2. EMT parcial y el desarrollo de metástasis	47
3. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS EN CÁNCER: TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR RECEPTORES TIROSINA QUINASA (RTKs)	48
3.1. Papel de los receptores tirosina quinasa en cáncer	50
3.1.1. La vía de señalización mediada por FGFR	51
3.1.1.1. La vía de FGFR y su implicación en cáncer	53
3.1.1.2. Terapias dirigidas contra la vía de FGFR	54
3.1.2. La vía de señalización mediada por PDGFR	56
3.1.2.1. La vía de PDGFR y su implicación en cáncer	57
3.1.2.2. Terapias dirigidas contra la vía de PDGFR	58
3.1.3. La vía de señalización mediada por EGFR	59

3.1.3.1. La vía de EGFR y su implicación en cáncer	60
3.1.3.2. Terapias dirigidas contra la vía de EGFR	63
3.2. Impacto del microambiente tumoral en el crecimiento y progresión de los tumores	64
3.2.1. La vía de SDF1/CXCR4	65
4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA EL CÁNCER	67
4.1. Tipos de resistencias a terapias dirigidas	68
4.2. Mecanismos de resistencia desarrollados por las células tumorales	69
4.3. Mecanismos de resistencia a inhibidores de EGFR	70
4.3.1. Mutaciones primarias y secundarias en EGFR	70
4.3.2. Mecanismos independientes de EGFR	71
4.3. Resistencia mediada por el microambiente tumoral	73
<u>OBJETIVOS</u>	76
<u>RESULTADOS</u>	80
Informe del director de los artículos publicados	82
Artículo 1	84
Resumen en castellano	86
<i>Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression</i>	88
Artículo 2	130
Resumen en castellano	132
<i>EGFR-targeted therapy blocks epithelial-like cutaneous carcinoma growth and FGFR signaling activation leads to therapy resistance</i>	135
Artículo 3	182
Resumen en castellano	184
<i>PDGFR-induced autocrine SDF-1 signaling in cancer cells promotes metastasis in advanced skin carcinoma</i>	187

<u>RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	230
<u>CONCLUSIONES</u>	250
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	255

ABREVIATURAS

#	
$\alpha 6$	Integrin alpha-6
$\beta 1$	Integrin beta-1

A

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AKT	AKT Serine/Threonine Kinase 1
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
ALL	Acute Lymphocytic Leukemia
AREG	Amphiregulin
ARN	Ácido Ribonucleico
α SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin
ATP	Adenosine Triphosphate
AXL	AXL Receptor Tyrosine Kinase

B

BCL-ABL	B-Cell Lymphoma 2 - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog fusion
BIM	Bcl-2-Like Protein 11
BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
BTC	Betacelulin
BCC	Basal Cell Carcinoma

C

CAF	Cancer-Associated Fibroblast
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T-Cell
CD133	Prominin-1
CD29	Integrin Beta 1 ($\beta 1$)
CD34	Hematopoietic Progenitor Cell Antigen CD34
CD44	Cell-Surface Glycoprotein CD44 Antigen
cKit	KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase
cMET	Hepatocyte Growth Factor Receptor
CML	Chronic Myeloid Leukemia
CRC	Colorrectal Cancer
CSC	Cancer Stem Cell
CTC	Circulating Tumor Cells
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCL4	C-X-C Chemokine Receptor Type 4
CXCR7	C-X-C Chemokine Receptor Type 7

D

DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracene
------	--------------------------------

E

E2F1	E2F Transcription Factor 1
EGF	Epidermal Growth Factor

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicines Agency
EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition
ErbB	Receptor Tyrosine-Protein Kinase Erbb
EREG	Epiregulin

F

FDA	Food And Drug Administration
FER	Tyrosine-Protein Kinase Fer
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor
FRS2	Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2

G

GAB2	Grb2 Associated Binding Protein 2
GBM	Glioblastoma
GFP	Green Fluorescent Protein
GIST	Gastrointestinal Stromal Tumors
GRB2	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2

H

HB-EGF	Heparin Binding EGF Like Growth Factor
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HF	Hair Follicle
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HNSCC	Head And Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Human Papillomavirus
HRas	Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

I

IFE	Interfollicular Epidermis
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IGF1R	Insulin Growth Factor Receptor 1
IGFBP	Insulin Growth Factor Binding Protein
IL6	Interleukin 6
INF- α	Interferon Alpha
IR	Insulin Receptor
ITGB3	Integrin beta-3 (β 3)

J

JAK	Janus Kinase
-----	--------------

K

K14	Keratin 14
K15	Keratin 15

K19	Keratin 19
K5	Keratin 5
K8	Keratin 8
KRas	Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog

L

LDA	Limiting Dilution Assay
-----	-------------------------

M

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MD	Moderately Differentiated
MEK1	Mitogen-activated Protein Kinase 1
MET	Mesenchymal - Epithelial Transition
MYC	Myc Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor

N

NCK	NCK Adaptor Protein
NOTCH	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein
NRG	Neuregulin
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer

P

p21	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1
p53	Tumor Protein P53
PD	Poorly Differentiated
PD/S	Poorly Differentiated/Spindle
PDGF	Platelet Growth Factor
PDGFR	Platelet Growth Factor Receptor
PDX	Patient-Derived Xenograft
PHP2	Pseudo Histidine-Containing Phosphotransfer Protein 2
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PKC	Protein Kinase C
PLC γ	Phospholipase C Gamma
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog

R

RAF	Raf-1 Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
RB	Retinoblastoma
SRC	Proto-oncogene Tyrosine-protein Kinase Src
RTK	Receptor Tyrosine Kinase

S

SC	Stem Cell
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SCLC	Small Cell Lung Cancer

SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor 1
SNAIL	Snail Family Transcriptional Repressor 1
SOX2	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2
SRC	Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Src
STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription

T

TGF α	Transforming Growth Factor Alpha
TGF β	Transforming Growth Factor Beta
TGFBR	Transforming Growth Factor Beta Receptor
TGFBR2	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
TIC	Tumor Initiating Cell
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
TME	Tumor Microenvironment
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate
TWIST	Twist Family BHLH Transcription Factor 1

V

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

W

WD	Well Differentiated
WNT	Proto-Oncogene Int-1 Homolog

Z

ZEB1	Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox 1
ZEB2	Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox 2

INTRODUCCIÓN

1. CANCER DE PIEL NO-MELANOMA

El cáncer de piel no-melanoma (NMSC) es el más común en humanos. El carcinoma de células basales (BCC) y el carcinoma de células escamosas (cSCC) son los dos principales tipos de cáncer de piel y representan más del 95% de todos los NMSC. El número de cánceres de piel diagnosticados en los Estados Unidos supera a todos los otros tipos de cáncer, y se estima que uno de cada cinco estadounidenses desarrollará cáncer de piel en algún momento de su vida (Yan et al., 2011; Yanofsky et al., 2011). Aproximadamente el 80% de estos son BCCs, mientras que los SCCs representan aproximadamente el 20% de todas las neoplasias cutáneas (American Cancer Society, 2018). Sin embargo, los cSCCs presentan un crecimiento más agresivo, una mayor capacidad de desarrollar metástasis y están asociados con un mayor número de muertes por NMSC (Clayman et al., 2005; Didona et al., 2018)

1.1. Carcinoma de célula escamosa de piel (cSCC)

El principal factor de riesgo para el desarrollo de cSCC es la exposición a la radiación ultra violeta (UVR) solar. La incidencia de cSCC ha aumentado en los últimos 30 años entre un 50 y un 200 y la cual puede atribuirse principalmente a un aumento de la exposición al sol, una exposición UV intensificada y al aumento de la vida media de la población (Yanofsky et al., 2011; Stratigos et al., 2015). La incidencia de cSCC aumenta en latitudes más bajas, que correlaciona con una mayor intensidad de luz solar, y la exposición a fuentes artificiales de UVR contribuyen al desarrollo de cSCCs. En el 90% de los casos, el tumor se desarrolla en áreas anatómicas expuestas crónicamente a la radiación UV, como la cabeza y el cuello, y las partes dorsales de las manos y los antebrazos y suelen aparecer en pacientes de edad avanzada (Revenga et al., 2004; De Vries et al., 2012).

Otros factores ambientales que impactan en el desarrollo de los cSCCs son la radiación de rayos X y la exposición a agentes químicos como el arsénico o hidrocarburos poli-cíclicos. Procesos inflamatorios crónicos de larga duración, como los que se observan en heridas crónicas, quemaduras, úlceras, en la enfermedad genética epidermólisis bullosa, también contribuyen significativamente al desarrollo de cSCCs. Por otra parte, se ha demostrado que la inmunosupresión asociada al trasplante de órganos, la terapia con inmunosupresores clásicos para tratar enfermedades inmunológicas y la quimioterapia para el tratamiento del cáncer (como el linfoma o la leucemia) se asocian a un mayor riesgo de cSCCs (Stratigos et al., 2015).

La infección del papilomavirus humano (HPV) también puede conducir al desarrollo de cSCCs, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (Arielle et al., 2015). Todas estas observaciones indican que el sistema inmune puede jugar un papel relevante en el desarrollo y progresión del cSCCs (Berg & Otley, 2002; Kadakia et al., 2016).

Diferentes estudios indican que el desarrollo de cSCC se inicia con la aparición de mutaciones en los queratinocitos, y más probablemente en las células madre (SCs) de la epidermis. Estas alteraciones pueden dar lugar a un área local dónde se produce una pérdida de la arquitectura normal de la piel (atipia celular), que da como resultado una región de *hiperqueratinización* que se denomina queratosis actínica (AK). Un aumento de la proliferación de los queratinocitos atípicos, dará lugar a neoplasmas intraepiteliales o cSCCs *in situ*, que generalmente se presentan como la enfermedad de Bowen. La acumulación de mutaciones adicionales y alteraciones celulares puede conducir a un crecimiento invasivo, dando lugar a los cSCCs. Las células tumorales pueden migrar y alcanzar vasos sanguíneos, diseminar y finalmente dar lugar a metástasis. El 97% de los SCCs invasivos son producto de la progresión maligna de una AK y se pueden subdividir en cuatro grupos en base al grado histopatológico (asociado al grado de atipia nuclear y queratinización).

La mayoría de ellos se consideran bien diferenciados o *well-differentiated* (WD-SCCs) o G1, los cuales conservan características de diferenciación epidermal. Se caracterizan por contener células con núcleos ligeramente alargados y grandes citoplasmas, que a su vez producen grandes cantidades de queratinas, dando lugar a la formación de nidos de queratina. Estos tumores generalmente están asociados a una baja malignidad y una baja tasa metastásica (0.5-2%) (Brantsch et al., 2008; Brinkman et al., 2015). Un segundo subtipo son los denominados tumores moderadamente diferenciados o *moderate-differentiated* (MD-SCCs) o G2. Estos tumores muestran una mayor desorganización estructural, presentan pleomorfismos nucleares y citoplasmáticos, mitosis más numerosas y limitada formación de nidos de queratinas. Los tumores pobremente diferenciados o *poorly differentiated* (PD-SCCs o G3) pierden las características de diferenciación epitelial y presentan una fuerte reducción de producción de queratinas. Estos tumores PD-SCCs se caracterizan por contener células alargadas y con núcleos pleomórficos y mitosis muy frecuentes. Finalmente, existe un subtipo de cSCCs llamados tumores indiferenciados o G4 que se caracterizan por ser completamente anaplásicos, perdiendo por completo cualquier rasgo de diferenciación epitelial e incluso pudiendo alcanzar un estadio fusocelular sarcomatoide. Los tumores de grado G3 y G4 tienen una gran importancia clínica, ya que están asociados a una mayor agresividad y una elevada tasa de metástasis (17%) y recurrencia (28%) (Brantsch et al., 2008; Arielle et al., 2015; Brinkman et al., 2015) (Figura 1).

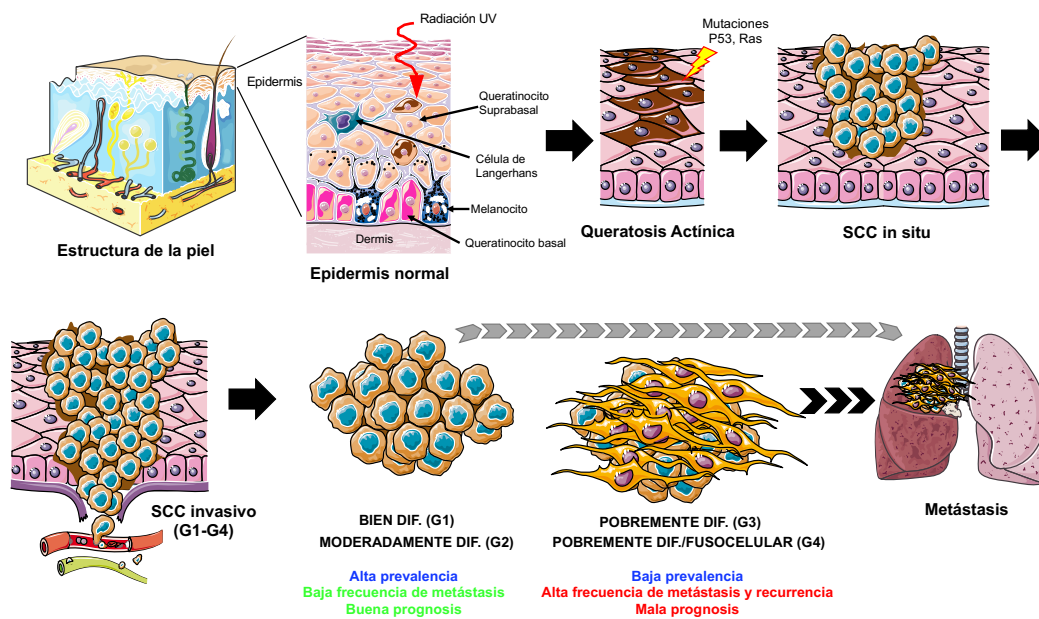


Figura 1. Estadios de progresión de los carcinomas de célula escamosa de piel. Después de un estímulo externo, como puede ser la radiación ultravioleta (UV) y la aparición de alteraciones genéticas, los queratinocitos comienzan a proliferar de forma descontrolada, dando lugar a lesiones pre-neoplásicas no malignas (queratosis actínica e hiperplasias). Estas células pre-neoplásicas pueden acumular mutaciones en genes como H-Ras, p53 o p19^{Arf}, entre otras, promoviendo la generación de carcinomas *in situ*, los cuales pueden progresar finalmente a carcinomas invasivos. Estos pueden ser bien diferenciados, moderadamente diferenciados, pobremente diferenciados y/o fusocelulares sarcomatoides, siendo estos dos últimos estadios los que están asociados a una mayor recurrencia y capacidad metastásica, lo que reduce la supervivencia de los pacientes.

1.2. Tratamiento del carcinoma de célula escamosa de piel

En el 90% de los casos, el pronóstico de los pacientes de cSCCs es favorable, ya que los tumores muestran un comportamiento relativamente benigno y se pueden curar con tratamientos dermatológicos y cirugía local (Yanofsky et al., 2011). Sin embargo, algunas de estas lesiones pueden evolucionar a lesiones altamente agresivas. Al contrario que los BCCs, el 2-5% de los cSCCs desarrollan metástasis, la cual se asocia a un mal pronóstico y una media de supervivencia del paciente de menos de 2 años (Stratigos et al., 2015). Aproximadamente un 85% de las metástasis se producen en nódulos linfáticos regionales, y en un menor porcentaje de los casos en tejidos distales como pulmones, hígado, cerebro, piel y hueso. Además, un 4.6% de los pacientes desarrollan recurrencias, de las cuales un 75% aparecen durante los primeros 2 años después de la resección y un 95% durante los primeros 5 años (Brantsch et al., 2008). Desafortunadamente, la mayoría de estos tumores recurrentes presentan una mayor agresividad y una mayor capacidad metastásica, lo que reduce dramáticamente la supervivencia del paciente (Alam & Désirée, 2001; Ashford et al., 2017).

El tratamiento de los cSCCs primarios puede variar en función de las características del tumor en cuestión. Los pacientes que presentan lesiones en forma de múltiples AK o cSCCs *in situ* son tratados con técnicas de criocirugía o electrodissección que permiten la eliminación total de la zona cancerosa. La escisión quirúrgica, muchas veces combinada con una reconstitución plástica, es la técnica más usada en aquellos pacientes que presentan tumores invasivos de alto riesgo. Sin embargo, en determinados casos donde la escisión quirúrgica está contraindicada, como por ejemplo en pacientes de edad avanzada, tumores de gran tamaño o en zonas de difícil resección, o tumores avanzados y metastásicos, los pacientes son tratados con radioterapia, agentes quimioterápicos convencionales por vía sistémica (como cisplatino, bleomicina, 5-fluorouracil, entre otros), o con ácido 13-cis-retinoico o inmunoterapia (IFN- α) (Guthrie et al., 1990; Sadek et al., 1990; Shin et al., 2001; Wollina et al., 2005; Brewster et al., 2007; Cranmer et al., 2010). Desafortunadamente, estos tratamientos tienen una respuesta clínica limitada en la mayoría de estos pacientes (Franco et al., 2012).

Por lo tanto, es necesario identificar los mecanismos moleculares y celulares que subyacen en la regulación de la proliferación y la invasión de las células tumorales en los diferentes estadios de la progresión del cSCC, con el objetivo de diseñar terapias efectivas para el tratamiento de los pacientes con cSCC de alto riesgo. En los últimos años se han realizado algunos ensayos clínicos basados en inhibidores contra el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) en pacientes con cSCC recurrentes y/o metastásicos. Sin embargo, el porcentaje de pacientes que logran una respuesta completa (CR) o parcial (PR) ha resultado ser muy bajo (Maubec et al., 2011; Gold et al., 2018;). Recientemente, ha sido aprobada por la FDA una terapia para el tratamiento de cSCC avanzados y metastásicos basada en el bloqueo de PD-1 con Cemiplimab, que logra una buena respuesta en aproximadamente la mitad de los pacientes tratados (Migden et al., 2018).

1.3. Modelos de ratón de carcinoma de célula escamosa de piel

1.3.1. Modelo de carcinogénesis química

Uno de los modelos de ratón más utilizados para el estudio del desarrollo de los cSCCs es el de carcinogénesis química. Este modelo permitió demostrar por primera vez que el desarrollo de la carcinogénesis seguía un proceso multi-etapa, caracterizado por una fase de iniciación, promoción y progresión tumoral. Este modelo está basado en un tratamiento inicial con una única dosis tópica del carcinógeno dimetilbenzantraceno (DMBA), que induce mutaciones en las células de la piel, seguido por el tratamiento continuado con ésteres de forbol proinflamatorios, como el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), que promueve la proliferación de las células y la formación de lesiones benignas conocidas como papilomas. Algunos de los papilomas pueden progresar a

cSCC invasivos y metastásicos, y de manera esporádica a carcinomas fusocelulares (Huang & Balmain, 2014).

El evento genético que induce la iniciación tumoral es principalmente la mutación Q61L en el gen Harvey-ras (HRAS) (Balmain et al., 1984; Quintanilla et al., 1986). Durante la promoción y la progresión maligna de los papilomas se produce la amplificación del alelo mutado de *HRAS* (Bremner & Balmain, 1990), la inactivación del gen supresor tumoral *TP53* mediante mutaciones o la pérdida de heterocigosis (LOH) (Buchmann et al., 1991) y finalmente la inactivación del locus Ink4/Arf, que codifica para proteínas como p16^{INK4A}, p15^{INK4B} y p19^{Arf} implicadas en la regulación de las funciones de la proteína retinoblastoma (RB) y p53 (Kelly-Spratt et al., 2004). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que además de estas mutaciones, se acumulan otras alteraciones génicas que podrían contribuir al desarrollo y progresión de los cSCCs inducidos por DMBA-TPA (Nassar et al., 2015).

1.3.2. Modelos animales modificados genéticamente

Uno de los modelos utilizados para el estudio de los factores que regulan la progresión de los cSCCs, son los ratones K14-HPV16 (keratina14 - virus del papiloma humano). Diferentes estudios demostraron que la infección con determinados papilomavirus humanos (HPV) conduce a varios desórdenes epiteliales, incluyendo el desarrollo de cSCCs (Zur Hausen, 2009). Este ratón transgénico expresa las oncoproteínas E6 y E7 de HPV16 bajo el promotor de la Keratina 14 (K14), la cual se expresa en los queratinocitos basales de la piel, incluyendo las células madre de la epidermis interfolicular (IFE) y del folículo piloso (HF). E6 y E7 regulan negativamente la función de p53 y proteínas de la familia del Rb, respectivamente (Moody and Laimins, 2010). El 100% de estos ratones desarrollan hiperplasias epidérmicas un mes después del nacimiento, las cuales pueden evolucionar a displasias en un periodo de 3 a 6 meses. A la edad de un año, el 50% de los ratones desarrollan carcinomas escamosos invasivos, el 30% de los cuales puede presentar metástasis a nódulos linfáticos regionales (Coussens et al., 1996), dependiendo del fondo genético de los ratones.

La utilización de modelos de ratón que expresan la recombinasa Cre, la cual permite la delección de alelos o la expresión de formas mutadas de determinados genes en poblaciones específicas de células epidérmicas (Albanese et al., 2002), permitió analizar la relevancia de algunos genes, como KRas, en el desarrollo de cSCCs. Así, se demostró que la expresión de una forma constitutivamente activa de KRas (KRas^{G12D}) en diferentes poblaciones de células epidérmicas, como las células suprabasales de la IFE (ratones Involucrina-Cre), las células madre de la epidermis interfolicular (ratones K5-Cre o K14-Cre) y las células madre del *bulge* del folículo piloso (ratones K15-Cre o K19-Cre) provocaba el desarrollo de papilomas, mientras que si

KRas^{G12D} era expresado en células *transit amplifying* de la matriz del pelo (ratones Shh-Cre) no se producían estas lesiones (Lapouge et al., 2011; White et al., 2011). Sin embargo, cuando se inducía la expresión de KRas^{G12D} concomitantemente con la delección de TP53 en las células madre de la IFE y del *bulge* de los folículos pilosos, se producía la generación de cSCCs. Por lo tanto, estos estudios demostraron que las células madre de la IFE y del *bulge* eran competentes para iniciar la generación de cSCCs (células de origen de los cSCCs), bajo la sobreexpresión de KRas^{G12D} y la pérdida de función de p53 (Lapouge et al., 2011; White et al., 2011).

Otros investigadores demostraron que la delección condicional de Rb en la epidermis (ratón Rb^{F/F}; K14cre) provoca una alteración en la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos basales. Cuando estos ratones se sometían a un tratamiento de carcinogénesis química, desarrollaban menos papilomas y más pequeños comparado con los ratones que expresan la proteína, aunque, estas lesiones preneoplásicas mostraron una mayor conversión maligna hacia cSCC (Ruiz et al., 2005). Además, la pérdida simultánea de Rb y p53, aunque no agrava el fenotipo observado en la epidermis deficiente en Rb, resulta en un desarrollo acelerado de SCCs espontáneos agresivos, indiferenciados y de origen folicular (Martínez-Cruz et al., 2008). Por otra parte, la delección de E2F1 (ratón Rb^{F/F}; K14creERTM; E2F1^{-/-}) o de p21 (ratón pRb^{ΔEpi}; p21^{-/-}) induce el desarrollo de tumores espontáneos en la piel en un contexto Rb deficiente (Costa et al., 2013; Saiz-Ladera et al., 2014). Todos estos resultados indican que esta familia de genes actúa ejerciendo funciones supresoras de tumores en la epidermis y que su pérdida favorece la iniciación y la progresión del cSCC.

En nuestro laboratorio se generaron modelos de ratones utilizando los K14-HPV16 y ratones de trazado de linaje que permiten identificar diferentes poblaciones de células madre del *bulge* (células madre K15⁺ y células madre Lgr5⁺). La caracterización de esos modelos de ratones demostró que la expresión de E6 y E7 induce una expansión de la progenie de las células madre Lgr5⁺, la cual se acumula en los folículos pilosos y se moviliza de forma aberrante a la IFE, dónde contribuye a la formación de cSCCs. Estas observaciones demostraron que los tumores generados en la IFE por la expresión de E6 y E7 tienen como origen células madre del *bulge* y su progenie (da Silva-Diz et al., 2012).

Además, mediante el uso de modelos de ratón de trazado de linaje, Latil y colaboradores demostraron que los cSCCs que se generaban a partir de las células madre de la IFE eran generalmente WD-SCCs, mientras que los derivados de células madre del *bulge* eran PD/S-SCCs, los cuales presentaban un crecimiento muy agresivo y un mayor potencial metastásico (Latil et al., 2017).

1.3.3. Modelo de progresión de SCC de piel

La mayoría de los modelos transgénicos descritos permiten analizar los cSCCs en una etapa determinada de su progresión. Nuestro grupo generó modelos de progresión de cSCCs de ratón con el objetivo de estudiar los mecanismos moleculares implicados en este proceso. Para ello, los ratones K14-HPV16 fueron tratados con DMBA/TPA para promover el desarrollo de tumores. Al final del tratamiento, todos los ratones desarrollaron múltiples cSCC invasivos, la mayoría de ellos con rasgos epiteliales, mientras que solo un 4,65% resultaron ser tumores indiferenciados y/o fusocelulares (PD/S-SCCs).

A continuación, se implantaron ortotópicamente pequeños fragmentos de cSCCs (espontáneos o inducidos por DMBA/TPA) en la piel de la espalda de ratones inmunodeficientes (Nude). Los tumores generados fueron reseccionados e implantados de forma seriada en otros ratones durante varios pases, permitiendo el crecimiento ilimitado de estos tumores y la generación de diferentes linajes (Figura 2). Después del primer implante, los tumores ortotópicos recapitulaban las características histopatológicas de los tumores parentales. Sin embargo, tras varios implantes seriados, el 62,5% de los tumores que inicialmente eran WD-SCCs, progresaron a MD-SCCs, después a PD-SCCs y finalmente a PD/S-SCCs. Otros investigadores, habían descrito que los PD/S-SCCs murinos, que presentaban inducido el programa epitelio-mesénquima (EMT; descripción en sección 2.3), podían tener un origen celular diferente e incluso generarse en contextos inflamatorios diferentes que los WD-SCCs (Wong et al., 2013; Latil et al., 2017). Contrariamente a estos estudios, nuestros modelos permitieron demostrar que los tumores PD-SCC y fusocelulares se generan a partir de la progresión maligna de los tumores WD-SCCs (da Silva-Diz et al., 2016) (Figura 2).

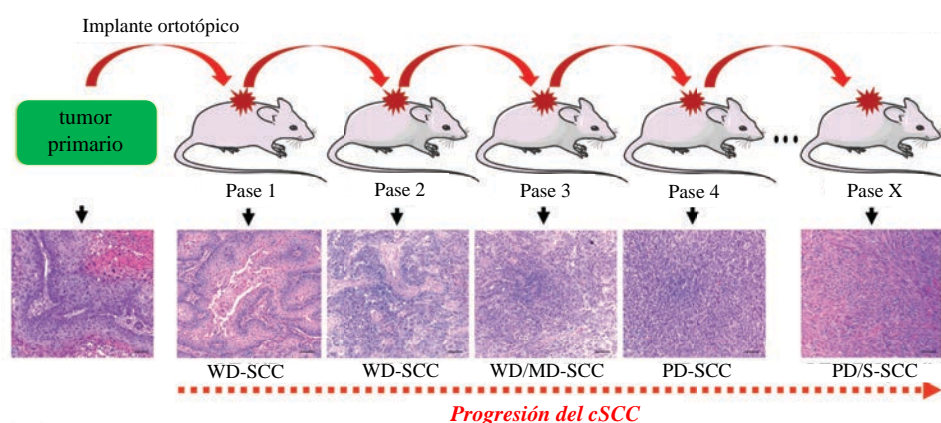


Figura 2. Modelo de progresión de los SCC de piel. El esquema resume el protocolo utilizado para la generación de linajes de progresión de los cSCCs murinos. Tumores primarios generados de forma espontánea o inducidos por el tratamiento con DMBA/TPA en los K14-HPV16, se implantaron de forma seriada en la piel de la espalda de ratones inmunodeficientes. Este procedimiento permite que la mayoría de los WD-SCCs progresen a PD/S-SCCs y, en consecuencia, el estudio de los eventos moleculares y celulares en cada estadio de la progresión tumoral. Adaptado de da-Silva y colaboradores, 2016.

La caracterización de los tumores de cada linaje demostró que durante la progresión se perdía la expresión de K14, mientras que aumentaba la expresión de Keratina 8 (K8). Además, se observó que los PD/S-SCCs crecían significativamente más rápido que sus respectivos precursores WD-SCCs, reduciendo la supervivencia de los ratones portadores debido a un aumento de la frecuencia de metástasis pulmonares y, en ocasiones, en los ganglios linfáticos regionales, riñón e hígado, las cuales se desarrollaban en un menor tiempo de latencia.

Por otra parte, se demostró que el 75% de los tumores generados a partir de la inducción con DMBA/TPA presentaban mutaciones activadoras en HRas (Q61L), mientras que los tumores espontáneos presentaban principalmente mutaciones en KRas. Sin embargo, la progresión desde WD-SCCs a PD/S-SCCs se observó en ausencia de mutaciones activadoras en HRas o KRas en algunos linajes de cSCCs, indicando que este tipo de mutaciones no era esencial para promover la progresión de los cSCCs (da Silva-Diz et al., 2016).

2. HETEROGENEIDAD Y PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS TUMORALES. CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER (CSCs)

Durante los últimos años, diferentes estudios, incluyendo aquellos donde se realizó una secuenciación masiva de los tumores, describieron la existencia de una gran heterogeneidad inter- e intra-tumoral, la cual tenía un fuerte impacto en la respuesta de terapias contra el cáncer. La heterogeneidad inter-tumoral se define como la variabilidad genética que existe entre tumores de pacientes del mismo tipo o subtipo histopatológico, mientras que la intra-tumoral, como la heterogeneidad fenotípica y funcional existente entre células dentro de un mismo tumor (Bedard et al., 2013; da Silva-Diz et al., 2018). Esta heterogeneidad intra-tumoral puede ser consecuencia de la variabilidad genética, expresión génica diferencial, transiciones entre estados diferentes de las células tumorales o perturbaciones en el microambiente tumoral (Junttila & De Sauvage, 2013; Meacham & Morrison, 2013). Actualmente, algunos de los estudios enfocados a identificar biomarcadores moleculares se centran en la heterogeneidad tumoral entre pacientes. Sin embargo, existe un creciente reconocimiento de la relevancia clínica de la heterogeneidad celular intra-tumoral, ya que los biomarcadores predictivos que se utilizan para tomar decisiones clínicas a partir de las biopsias podrían estar diferencialmente distribuidos en el resto del tumor (Bedard et al., 2013; Meacham & Morrison, 2013; McGranahan & Swanton, 2017).

Los orígenes de la heterogeneidad intra-tumoral han sido extensamente debatidos y se han postulado varios modelos para describir los posibles mecanismos que dan lugar a la diversidad de células tumorales dentro de una muestra tumoral.

2.1. Modelos de heterogeneidad tumoral

2.1.1. Modelo de evolución clonal

La teoría de la evolución clonal, propuesta por el Dr. Nowell el año 1976, proponía que los tumores se originan a partir de una población homogénea de células transformadas, y que la progresión tumoral era el resultado de la adquisición gradual de mutaciones dentro de este clon original. Esta inestabilidad genómica finalmente permitiría la selección secuencial de subclones cada vez más agresivos y la erradicación de clones con desventajas metabólicas o proliferativas, eliminados por la respuesta inmunológica o por la sensibilidad al tratamiento anti-tumoral (Nowell, 1976; Greaves et al., 2012; Cabrera et al., 2015). Este modelo, también conocido como modelo estocástico, proponía que los tumores son una masa celular homogénea que surge de cualquier célula que exprese las mutaciones necesarias para promover su crecimiento (Pardal et al., 2003). Además, el Dr Nowell planteó que las células de las distintas poblaciones dominantes poseerían un potencial tumorigénico similar y que serían estas las encargadas de dirigir la progresión tumoral. Finalmente, se apuntó que cada paciente requería una terapia específica individual, pero esta podría verse frustrada por la aparición de un subclon genéticamente diferente y resistente al tratamiento (Nowell, 1976) (Figura 3).

2.1.2. Modelo de las células madre del cáncer

El segundo modelo es de las células madre del cáncer (CSCs). A diferencia de la evolución clonal, donde todas las células de los subclones poseen un potencial tumorigénico similar, la hipótesis de las CSCs postula que solo una pequeña subpoblación de células tumorales indiferenciadas, las CSCs, tiene la capacidad de auto-renovación y potencial para dar lugar a un nuevo tumor (Zorniak et al., 2010; Cabrera et al., 2015). El resto del tumor estaría constituido por células fenotípicamente diferentes, con un mayor grado de diferenciación y con potencial proliferativo y tumorigénico limitado. Este modelo postula que los tumores siguen una organización jerárquica donde la población de CSCs es responsable de dar lugar al resto de células tumorales con diferentes fenotipos, contribuyendo así a la heterogeneidad celular del tumor.

La mayor parte de los estudios han utilizado marcadores de superficie celular para identificar y aislar CSCs. El implante en ratones inmunodeficientes de las células aisladas en base a los marcadores de superficie permite comprobar su potencial tumorigénico y de regenerar el tumor parental. Además, los ensayos de dilución límite (LDA), basados en el implante en diluciones seriadas de una determinada población de células tumorales en ratones inmunodeficientes, permiten calcular en qué frecuencia se encuentran las CSCs o células iniciadoras de tumores (TICs) dentro de esta población (Visvader, 2011; Kreso & Dick, 2014;). Así, el modelo de las CSCs se evidenció por primera vez cuando se aislaron células hematopoyéticas de pacientes con

leucemia mieloide aguda (AML) y estas fueron trasplantadas en ratones inmunodeficientes. Los resultados mostraron que solo las células CD34⁺ (marcador previamente asociado a células madre hematopoyéticas) CD38⁻, a diferencia de las poblaciones CD34⁺ CD38⁺ y CD34⁻, eran capaces de regenerar el tumor parental (Lapidot et al., 1994). Más adelante, Al-Hajj y sus colaboradores demostraron que, a diferencia de las otras poblaciones aisladas de tumores de mama, la inyección de células CD44⁺/CD24⁻ (marcadores de células madre mamarias normales) en ratones inmunodeficientes daba lugar a la formación de nuevos tumores en el 89% de los casos, los cuales recapitulaban las características de los tumores parentales (Al-Hajj et al., 2003).

Sin embargo, hay que destacar que estos dos modelos no tienen que ser mutuamente excluyentes. Un tumor podría contener diferentes clones de CSCs, genéticamente distintos, que pueden generarse a partir de una población inicial de células portadoras de mutaciones oncogénicas. Estos subclones de CSCs, cada uno con su capacidad de auto-renovación y de dar lugar a progenitores intermedios, así como a células tumorales más diferenciadas, podrían seguir una evolución clonal en paralelo, acumulando los cambios genéticos y epigenéticos necesarios para el mantenimiento del tumor (Cabrera et al., 2015).

El modelo de las CSCs ha sido recientemente validado en diferentes tipos de tumores. Así, mediante experimentos de trazado de linaje en modelos de ratón se demostró que las células madre adultas con mutaciones específicas, actuarían como las células de origen de los tumores de piel, colon y cerebro, y que estas células madre transformadas se comportan como CSCs (Schepers et al., 2010; Chen et al., 2012; Driessens et al., 2012). Sin embargo, otros estudios apuntan que las CSCs también se podrían originar a partir de progenitores más diferenciados, a través de procesos de desdiferenciación o reprogramación (Wang et al., 2014) (Figura 3).

Las CSCs tienen una gran relevancia clínica, ya que estas células pueden ser responsables del crecimiento tumoral, la resistencia al tratamiento, la recurrencia y la metástasis (Eun et al., 2017). A diferencia del resto de células tumorales, las CSCs son capaces de sobrevivir al tratamiento con quimioterapia a través de diferentes mecanismos (Phi et al., 2018). Algunos de los mecanismos propuestos serían: la expresión de altos niveles de proteínas transportadoras de drogas o detoxificadoras (Alisi et al., 2013; Raha et al., 2014), la capacidad de entrar en un estado quiescente (o *dormancy*) y cambiar a un fenotipo proliferativo (Kreso et al., 2013), la activación de mecanismos de resistencia a la muerte inducida por daño al DNA (Ishimoto et al., 2011; Peitzsch et al., 2013), mecanismos epigenéticos como la modificación de histonas y la metilación del DNA (Zhang et al., 2010; McDonald et al., 2011), así como la activación de procesos de desdiferenciación (Schwitalla et al., 2013; Pires et al., 2016). Además, la activación de vías de señalización que promueven la auto-renovación de las CSCs, como las vías de NOTCH, WNT, TGFβ, PI3K/AKT, EGFR y JAK/STAT (Kurth et al., 2014) y la adquisición de características de

célula madre a través de la inducción del programa epitelio-mesénquima (EMT; concepto que será abordado más adelante en la sección 2.3) (Nieto et al., 2016), son también algunos de los principales mecanismos que favorecen la supervivencia y la proliferación durante el periodo de tratamiento, así como la invasión y la metástasis de las CSCs.

2.1.3. Modelo de plasticidad de las células tumorales

Recientemente, se ha propuesto un tercer modelo que reconcilia los modelos de evolución clonal y el de CSCs (Meacham & Morrison, 2013). El modelo de plasticidad de las CSCs postula que las células tumorales tienen la capacidad de convertirse en CSCs y *viceversa* de forma dinámica. Este modelo ha añadido un grado de complejidad adicional a los modelos de evolución clonal y CSC que puede ayudar a explicar la heterogeneidad intra-tumoral y entender mejor los procesos de progresión tumoral, metástasis y respuesta a terapias (Figura 3).

El concepto de plasticidad celular es muy amplio y puede ser aplicado a células diferenciadas no transformadas, donde en respuesta a estrés fisiológico pueden adquirir un comportamiento plástico (Figura 3). Por ejemplo, la ablación de una de las poblaciones de SCs que contribuye a la homeostasis del intestino (SCs-LGFR5⁺) puede provocar la expansión de otra población de SCs intestinal (SCs-Bmi1⁺), la cual daría lugar a células LGR5⁺ que compensaría la pérdida de la población deplecionada (Tian et al., 2011). El proceso de curación de heridas también es un contexto donde la plasticidad de las SCs juega un papel relevante. En respuesta a la inducción de una herida, las poblaciones SCs foliculares adoptan transitoriamente características propias de las SCs de la IFE, y pueden movilizarse hasta esta localización, donde contribuyen, junto con su progenie a la curación de la herida (Ge et al., 2017).

En un contexto tumoral, la plasticidad de las células tumorales puede activarse en respuesta a señales intrínsecas de las propias células, estímulos del microambiente y/o en respuesta a terapias. Durante este proceso, las células tumorales diferenciadas pueden cambiar de forma dinámica hacia un estado indiferenciado con características de CSC, y *viceversa*, lo cual tiene un impacto relevante en la progresión tumoral, la metástasis y la resistencia a terapias (da Silva-Diz et al., 2018). En este sentido, células tumorales diferenciadas de colon pueden desdiferenciarse tras la ablación de la población CSC-LGR5⁺ preexistente en el tumor, compensando así la pérdida de CSCs (Shimokawa et al., 2017).

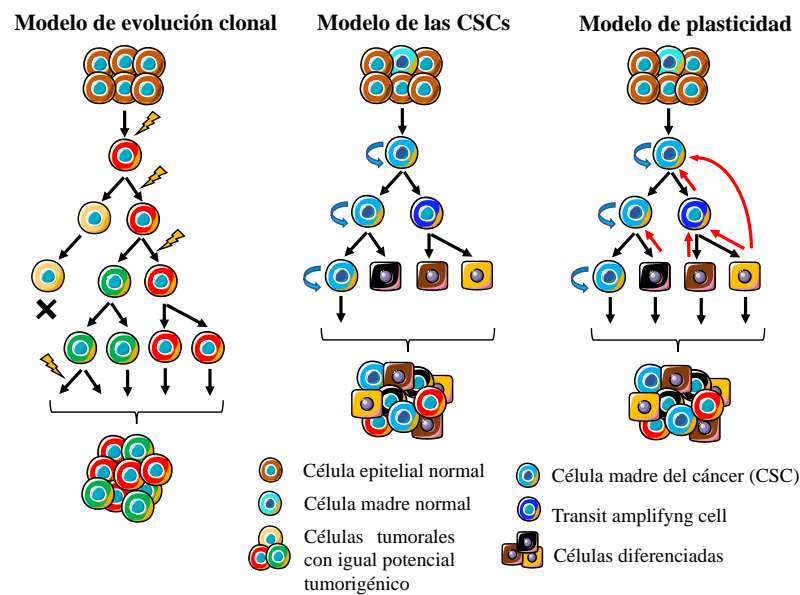


Figura 3. Descripción de los modelos propuestos de heterogeneidad intra-tumoral. El modelo de evolución clonal o estocástico considera que cada célula tumoral dentro tiene potencial tumorigénico similar. El modelo CSC clásico asume que células similares a las células madre adultas, las CSCs, son la fuente de la heterogeneidad intra-tumoral por su capacidad de auto-renovación y de diferenciación. El modelo de plasticidad de CSC propone un equilibrio (reversible) de conversión bidireccional entre CSC y no CSC.

Como se ha comentado anteriormente, el enriquecimiento de la población CSC después de la terapia podría ser la consecuencia de un aumento de la dinámica de división simétrica de estas células, pero también por la transición de un estado diferenciado (no-CSC) al estado CSC. Así, las células diferenciadas de glioblastoma inducen la expresión de marcadores de SC como SOX2, OCT4 y Nestina y se produce una expansión de CSC *in vivo* en respuesta al fármaco (Auffinger et al., 2014). Estas observaciones demuestran que las células tumorales diferenciadas o no-CSCs pueden adquirir un estado CSCs para promover la progresión tumoral y la resistencia a terapias.

Esta transición dinámica y reversible entre diferentes fenotipos de las células tumorales puede estar regulada por diferentes mecanismos incluyendo alteraciones epigenéticas, señales procedentes de las mismas células tumorales y/o del microambiente tumoral (TME) (da Silva-Diz et al., 2018)

2.2. Identificación de las CSCs en carcinomas de célula escamosa de piel de ratón y humano

Malanchi y colaboradores identificaron y aislaron por primera vez una población de células tumorales de cSCCs de ratón que reunía las características funcionales de las CSCs. Este grupo demostró que las células tumorales que expresaban CD34 (marcador de las células madre del *bulge* de los folículos pilosos) presentes en papilomas y WD-SCCs, mostraban un potencial 100 veces mayor de generación de tumores que el resto de células epiteliales, cuando eran implantadas en ratones inmunodeficientes. Estas células CD34⁺ conservaban algunas características de las

células madre del *bulge* y la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse, permitiendo el crecimiento de tumores que presentaban la misma organización jerárquica que los tumores parentales (Malanchi et al., 2008).

Sin embargo, otros investigadores mostraron que la expresión de CD34 no era suficiente para la identificación de CSCs en SCC de piel de ratón e incluyeron otros marcadores como la $\alpha 6$ -integrina y $\beta 1$ -integrina. La generación de tumores secundarios a partir de una sola CSC, ya fuera $\alpha 6^{\text{hi}}\beta 1^{\text{hi}}\text{CD}34^{\text{hi}}$ (alta expresión de CD34) o $\alpha 6^{\text{hi}}\beta 1^{\text{hi}}\text{CD}34^{\text{lo}}$ (baja expresión de CD34) demostró que ambos contenían células tanto $\text{CD}34^{\text{lo}}$ como $\text{CD}34^{\text{hi}}$, indicando que las dos poblaciones tenían potencial tumorigénico y que podrían coexistir diferentes poblaciones de CSCs que podían convertirse unas en otras de forma bidireccional (Schober & Fuchs, 2011). Más tarde, el grupo de Cedric Blanpain demostró mediante el uso de diferentes modelos de trazado de linaje celular, que únicamente las células tumorales $\text{CD}34^+$ eran capaces de mantener el crecimiento tumoral a largo plazo, siendo consideradas por lo tanto como CSCs (Lapouge et al., 2012).

Varios estudios han demostrado que las CSCs de cSCCs se localizan preferentemente en la periferia del tumor y en los frentes de invasión de los tumores más agresivos, sugiriendo que las funciones de las CSCs podrían estar reguladas por señales procedentes del estroma circundante (Malanchi et al., 2008; Beck et al., 2011; Schober & Fuchs, 2011). Asimismo, estos estudios demostraron que la señalización de β -catenina y $\text{TGF}\beta$ eran esenciales para el mantenimiento del fenotipo y la función de las CSCs. Mientras la ablación de β -catenina en las células tumorales provocaba la pérdida de las $\text{CD}34^+$ -CSCs y la regresión completa del tumor (Malanchi et al., 2008), la ablación del receptor II de $\text{TGF}\beta$ ($\text{TGFBR}2$) provocaba un aumento de la población $\text{CD}34^+$ en tumores pobremente diferenciados (Schober & Fuchs, 2011). En este sentido, la delección de $\text{TGFBR}2$ en las células epiteliales, induce el desarrollo de SCCs de piel invasivos en un contexto dónde HRas está mutado, o tras un tratamiento con el carcinógeno DMBA (Guasch et al., 2007). Sin embargo, la vía de $\text{TGF}\beta$ no siempre actúa como supresor tumoral, sino que puede tener un papel dual en muchos tipos tumorales, incluido el cSCC dónde inicialmente puede actuar como un supresor tumoral y promover la metástasis en estadios avanzados de progresión (Massagué, 2008). En este sentido, se ha demostrado que se requiere de la cooperación de las vías de señalización H-Ras y $\text{TGF}\beta$ (mediante la acumulación de Smad2 nuclear) para la transformación y progresión del cSCC hacia un estado fusocelular y con el programa EMT inducido (el concepto de EMT será descrito en la sección 2.3) (Oft, Akhurst, & Balmain, 2002).

Estudios realizados por nuestro grupo demostraron que, tal y como ya se había descrito en otros modelos de ratón (Malanchi et al., 2008; Lapouge et al., 2012), las células $\alpha 6$ -integrina⁺/ $\text{CD}34^+$ aisladas de WD-SCCs estaban enriquecidas en células iniciadoras de tumores en comparación

con la población de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺. Además, los tumores generados a partir del trasplante de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ aisladas de tumores PD/S-SCCs crecieron mucho más rápido que los tumores generados a partir de células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ aisladas de tumores WD-SCCs, sugiriendo que la capacidad de las CSCs para promover el crecimiento tumoral podría cambiar significativamente durante la progresión del cSCC de ratón. Mediante ensayos de dilución límite se demostró que la frecuencia de TICs aumentaba dramáticamente en PD/S-SCCs en comparación con sus precursores WD-SCCs. De acuerdo con estas observaciones, los PD/S-SCCs derivados de WD-SCCs, generados espontáneamente o inducidos por el tratamiento con DMBA/TPA, mostraron un aumento significativo del porcentaje de células con $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺ en comparación con sus respectivos precursores. Estos resultados demostraron que durante la progresión tumoral desde WD-SCCs a PD/S-SCCs se produce una expansión de la población CSC (da Silva-Diz et al., 2016).

Estudios recientes han identificado otros marcadores de CSCs en los cSCCs. Boumahdi y colaboradores (2014) demostraron que el factor de transcripción SOX2, que no se expresa en la epidermis normal y es prescindible para la homeostasis de la piel, se expresa de manera heterogénea en las células de los cSCCs invasivos murinos y humanos. Estos estudios demostraron que las células que expresan SOX2 en los SCCs invasivos de ratón están enriquecidas en CSCs. La ablación condicional de SOX2 en papilomas y cSCC invasivos provocó una clara regresión tumoral y una disminución de la capacidad de propagación después del trasplante en ratones inmunodeficientes, demostrando que SOX2 juega un papel importante en el mantenimiento del tumor, regulando las funciones de las CSCs (Boumahdi et al., 2014). El mismo año, Siegle y colaboradores demostraron que SOX2 es necesario para la iniciación y el crecimiento de los cSCCs en ratones y humanos, promoviendo la expansión de la población de las CSCs en las zonas de interacción entre el tumor y el estroma (Siegle et al., 2014).

Algunos estudios mostraron que la expresión de marcadores como CD44, CD133 y ALDH, que permitían identificar CSCs en otros tipos de cáncer (Al-Hajj et al., 2003; Ricci-Vitiani et al., 2006; Dalerba et al., 2007; Eramo et al., 2008), se expresaban en células con características de CSCs en cSCC humanos (Prince et al., 2007; Clay et al., 2010; Patel et al., 2012). Sin embargo, no fue hasta un año más tarde que Geng y colaboradores (2013) observaron que la expresión combinada de niveles altos de CD44 y CD29 (integrina $\beta 1$) podría ser suficiente para identificar y aislar CSCs de cSCC humanos. Los autores demostraron que las células CD44^{high}/CD29^{high} presentaban una mayor capacidad de formar colonias *in vitro* y una mayor capacidad de generar tumores *in vivo*, comparado con las células CD44^{low}/CD29^{low}, y estas presentaban una inducción de la expresión de genes relacionados con la activación del ciclo celular, metástasis, resistencia a drogas e inducción de EMT, todos ellos procesos característicos de las CSCs (Geng et al, 2013).

2.3. El programa EMT y el estado CSC en progresión tumoral y metástasis

Durante el desarrollo embrionario y el proceso de curación de heridas, las células epiteliales pueden adquirir un comportamiento dinámico y plástico que les permite transitar entre los estados epitelial y mesenquimal. El proceso hacia un estado mesenquimal se conoce como transición epitelio-mesenquima (EMT). La activación del programa EMT se produce como consecuencia de la inducción de la expresión de factores de transcripción específicos (TF) llamados EMT-TFs (por ejemplo, SNAIL, SNAI2, TWIST, ZEB1, ZEB2 y PRRX1), lo que conduce a la pérdida de algunas características epiteliales, como las interacciones célula-célula y la polaridad apical-basal, la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto y la producción de enzimas de degradación de la matriz extracelular. Estos procesos culminan con la adquisición de características fenotípicas y moleculares que permite a las células adoptar un comportamiento más migratorio e invasivo (Polyak & Weinberg, 2009; Nieto et al., 2016; da Silva-Diz et al., 2018).

Diferentes estudios han descrito que la expresión de EMT-TFs conduce a la adquisición de características de SCs (*stemness*) en las células normales y tumorales, y se ha demostrado que el programa EMT está inducido en las CSCs, siendo una característica general de estas células (Mani et al., 2008). Así, se ha descrito que la expresión de Snail o Twist en células epiteliales de mama induce el programa EMT y la adquisición de características de SCs (Mani et al., 2008). En esta misma dirección, la expresión de ZEB1 mantiene el estado *stemness* en células de carcinoma pancreático, reprimiendo la expresión de miRNAs que regulan negativamente este proceso (Wellner et al., 2009). Además, la expresión de Snail induce una expansión de la población CSCs a través de un cambio de la división asimétrica de estas células (la división de una SC da lugar a una célula con estas características y una célula destinada a la diferenciación) a una división simétrica (la división de una SCs da lugar a dos células con estas mismas características), lo que permitió asociar el programa EMT con un aumento de la población CSCs (Hwang et al., 2014). De acuerdo con este trabajo, en nuestro laboratorio se ha demostrado que durante la progresión del cSCC se produce una expansión de la población CSC (células $\alpha 6$ -integrina⁺/CD34⁺) que coincide con una robusta inducción del programa de EMT en los PD/S-SCCs, caracterizada por la pérdida de expresión de E-cadherina, y un aumento en la expresión de Vimentina y de factores de transcripción que regulan dicho proceso, como *SNAIL*, *TWIST*, *ZEB1* y *ZEB2* (da Silva-Diz et al., 2016).

A pesar de las múltiples evidencias que se han reportado durante años sobre la relación directa entre *stemness* y el programa EMT, otros estudios apuntan a que estas dos características de las CSCs transcurren en paralelo, en lugar de formar parte de un mismo proceso. Así, las CSCs, una vez diseminadas, necesitan activar el proceso de MET (transición mesénquima-epitelio) para

colonizar el nicho metastásico y generar un nuevo tumor. Diferentes estudios demostraron que este proceso se lleva a cabo mediante la represión de la expresión los EMT-TFs, lo cual inhibe el programa EMT (Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012; Tran et al., 2014), a la vez que se produce un aumento de la capacidad iniciadora de tumor (Ocaña et al., 2012). Además, en carcinomas de piel y de mama se ha descrito que la inducción de EMT y *stemness* están regulados por dosis diferentes de TWIST (Beck et al., 2015; Schmidt et al., 2015). Otros estudios indican que las células tumorales con diferenciación epitelial están más enriquecidas en células iniciadoras de tumores o CSCs y son más invasivas que aquellas que presentan un estado mesenquimal estable, indicando que *stemness* y EMT son dos procesos que podrían estar desacoplados (Korpal et al., 2011; Celià-Terrassa et al., 2012).

2.3.1. EMT parcial y la adquisición de características *stemness*.

La descripción clásica del programa EMT, entendida como la transformación de células epiteliales a células mesenquimales, podría interpretarse como un proceso dinámico entre dos estados finales. Sin embargo, trabajos más recientes han demostrado que las células oscilan entre estos dos estados a través de estados intermedios o híbridos inducidos por una activación parcial del programa EMT, donde las células tumorales conservan el fenotipo epitelial y a la vez expresan marcadores mesenquimales (Figura 4).

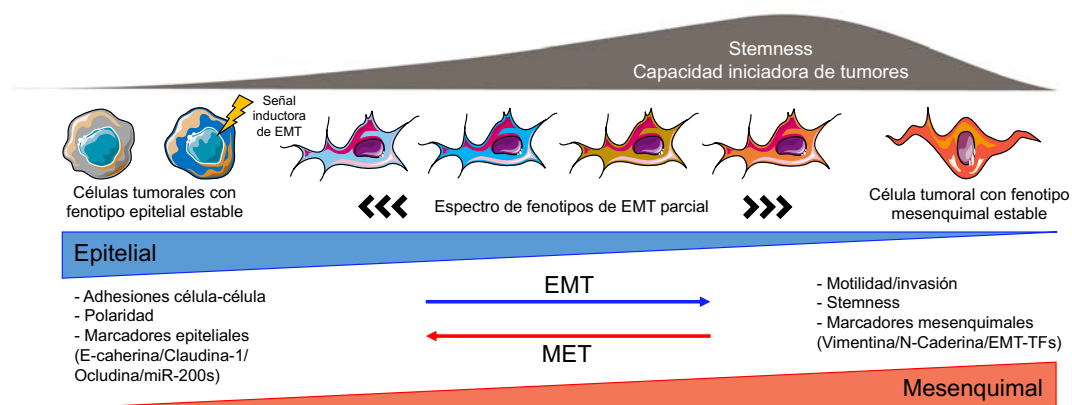


Figura 4. Espectro de los fenotipos celulares durante la inducción de EMT en células tumorales. Algunas células tumorales epiteliales pueden responder a señales inductoras de EMT, la cuales provocan la disrupción de las vías que mantenían su estado epitelial estable e inician una transición hacia un estado mesenquimal. Durante esta transición, las células pasan por estados de EMT parciales, que se consideran reversibles y transitorios. Estos estados híbridos se asocian con la adquisición de un potencial iniciador de tumor. Adaptado de Chaffer y colaboradores, 2016.

Este tipo de células se han identificado en tumores de mama (Yu et al., 2013), ovario (Lieber et al., 2009), cabeza-cuello (Parikh et al., 2017), pancreáticos y de próstata (Reichert et al., 2012; Ruscetti et al., 2015) y en líneas celulares de carcinoma de riñón y pulmón (Huang et al., 2013;

Sampson et al., 2014). La co-expresión de genes epiteliales y mesenquimales o la inducción parcial de EMT en células tumorales se ha relacionado con una mayor capacidad *stemness* y un mayor potencial tumorigénico (Lieber et al., 2011; Grosse-Wilde et al., 2015; Ruscetti et al., 2015), y varios estudios correlacionaron EMT parcial o la presencia de células tumorales híbridas con una baja supervivencia de los pacientes y resistencia a quimioterapia (Grosse-Wilde et al., 2015; Smith & Bhowmick, 2016) (Figura 4).

2.3.2. EMT parcial y el desarrollo de metástasis

Muchos estudios han demostrado que la inducción del programa EMT es un mecanismo esencial para la diseminación y el desarrollo de metástasis en muchos tipos de tumores (Thiery et al., 2009; Craene & Berx, 2013). Sin embargo, otros estudios han puesto en duda la necesidad del EMT en el proceso de metástasis. En este sentido, un modelo de trazado de células de cáncer de mama que permite identificar células con EMT inducido mediante la expresión de GFP, demostró que solo una pequeña población de células del tumor primario presentaba el programa EMT inducido y estas células GFP⁺ estaban altamente enriquecidas en la población de células tumorales circulantes (CTCs). Sin embargo, estas CTCs GFP⁺ no contribuyeron significativamente a la formación y el crecimiento de las metástasis (Fischer et al., 2015). Además, se ha descrito que la inhibición genética de Twist o Snail en modelos murinos de adenocarcinoma pancreáticos inhibe el programa EMT pero no bloquea la generación de metástasis (Zheng et al., 2015). Contrariamente, otros investigadores demostraron que la abrogación de ZEB1 reduce la plasticidad de las células tumorales, *stemness*, la invasión y la colonización en el nicho metastásico en modelos de ratón de cáncer de páncreas (Krebs et al., 2017), lo que demuestra que los diferentes EMT-TFs pueden tener funciones complementarias en el desarrollo de metástasis y que la relevancia de cada uno de ellos podría depender del tipo de tumor.

En un estudio *in vivo* se ha detectado un conjunto de células tumorales de mama que inducen de forma espontánea el programa EMT, adquieren un comportamiento migratorio, diseminan y finalmente reversionan al estado epitelial para favorecer el crecimiento de la metástasis (Beerling et al., 2016). Además, un estudio realizado en pacientes de cáncer de mama describió que las células tumorales circulantes estaban enriquecidas en células mesenquimales, pero también contenían una población celular que expresaba simultáneamente marcadores mesenquimales y epiteliales (Yu et al., 2013), indicando que una subpoblación de las células diseminadas podría tener activado de forma parcial el programa de EMT.

Todas estas observaciones sugieren que las células que diseminan presentando un EMT completo, podrían ser menos eficaces en la generación de metástasis que las células con EMT parcial. Así, el estado de EMT parcial puede representar un mecanismo clave para promover la metástasis, ya

que la adquisición de características mesenquimales puede favorecer la diseminación de las células tumorales y su invasión a tejidos distales, mientras que la conservación de algunas características de tipo epitelial puede facilitar la reprogramación al estado epitelial, lo que favorece la colonización y el crecimiento de la lesión metastásica (Bonnomet et al., 2011; Gunasinghe et al., 2012; Stankic et al., 2013). Por lo tanto, aquellas células que presenten un determinado grado de plasticidad tendrían una mayor capacidad para diseminar, colonizar y crecer en órganos distales.

Otros estudios mostraron que marcadores de superficie celular como CD61, CD106 y CD51 permitían clasificar células tumorales de tipo mesenquimal en distintas poblaciones en SCC de piel y tumores de mama. Así, las células EpCAM⁺ podían clasificarse en células con fenotipos epitelial-mesenquimal híbridos y aquellas con un fenotipo completamente mesenquimal. Las células con un fenotipo híbrido, co-expresaban el marcador epitelial K14 y Vimentina y presentaban una mayor capacidad para diseminar y formar metástasis que el resto de células mesenquimales. Además, presentaban una mayor plasticidad ya que podían dar lugar al resto de poblaciones con fenotipo mesenquimal cuando eran implantadas en ratones inmunodeficientes (Pastushenko et al., 2018).

Sin embargo, estudios realizados por nuestro laboratorio demostraron que los PD/S-SCCs de ratón y pacientes están formados por células con un fenotipo mesenquimal estable, y estas células presentan una elevada capacidad de generar metástasis pulmonares con fenotipo mesenquimal (da Silva-Diz et al., 2016). Estos resultados indican que las células de carcinoma pueden transitar desde un fenotipo epitelial estable a un fenotipo híbrido mediante la inducción parcial de EMT y finalmente a un fenotipo mesenquimal estable, y que las características fenotípicas idóneas para iniciar y finalizar el desarrollo de metástasis pueden depender del tipo de tumor y la etapa de la progresión del tumor en particular.

3. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN CÁNCER: TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR RECEPTORES TIROSINA QUINASA (RTKs)

Actualmente, la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, las terapias dirigidas y la inmunoterapia son las principales estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer. Los agentes quimioterápicos tradicionales actúan bloqueando la división celular, la replicación del ADN y la formación de los microtúbulos del huso mitótico (Jackson et al., 2007; Bagnyukova et al., 2010), por lo que tienen como diana las células tumorales que se dividen activamente. Estas terapias en muchos casos presentan efectos secundarios importantes y su efectividad es limitada en algunos

casos (Jackson et al., 2007). En los últimos años, se han dedicado muchos esfuerzos en diseñar terapias dirigidas a vías de señalización y procesos moleculares específicos de las células tumorales y del microambiente tumoral, así como a bloquear la función de las CSCs.

Entre las aproximaciones de terapia dirigida están los fármacos anti-angiogénicos, que actúan bloqueando el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es secretado por las células tumorales para favorecer la angiogénesis (Vasudev & Reynolds, 2014). Por otra parte, se han desarrollado nuevas estrategias más efectivas de inmunoterapia, como los anticuerpos que bloquean los receptores de punto de control inmunitario (*immune checkpoints*) o sus ligandos. El primer anticuerpo aprobado fue el Ipilimumab, que está dirigido contra el antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), que fue seguido por varios anticuerpos que bloquean el receptor de muerte celular programada 1 (PD-1) o su ligando, PD-L1 (Postow et al., 2015; Topalian et al., 2015; Baumeister et al., 2016). Estas terapias han resultado tener grandes beneficios clínicos en algunos tipos tumorales como el melanoma y el cáncer de pulmón (Garon et al., 2015; Larkin et al., 2015; Mellman et al., 2016). Además, se ha aprobado los inhibidores de PD-1 para el tratamiento de los tumores de cabeza y cuello (HNSCCs) recurrentes y metastásicos con progresión durante o después de la quimioterapia con platino (FDA y EMA) (Seiwert et al., 2016), y para el tratamiento de pacientes con SCCs cutáneos metastásicos o localmente avanzado que no pueden someterse a cirugía o radiación (FDA) (Migden et al., 2018). La terapia con células T con antígenos quiméricos (CAR-T) también constituye uno de los focos más actuales en el campo de la inmunoterapia. Los linfocitos T autólogos se aíslan del paciente, se modifican genéticamente para que expresen receptores contra antígenos tumorales y se transfieren al paciente como terapia antitumoral (Dougan et al., 2018).

Otras aproximaciones terapéuticas contra las células tumorales son las que tienen como objetivo inducir la apoptosis de las células tumorales (Koff et al., 2015), o las que se basan en la inducción de la diferenciación de las células tumorales. Esta última, aún en fase experimental, podría tener un gran impacto sobre las CSCs, induciendo su diferenciación y la pérdida de sus propiedades intrínsecas que promueven el crecimiento tumoral, la metástasis y resistencia a las terapias convencionales (Jin et al., 2017; De Thé, 2018).

Finalmente, una de las estrategias que ha concentrado más esfuerzos es la terapia basada en el bloqueo de vías de señalización que promueven el crecimiento tumoral y la metástasis (Levitzki & Klein, 2010). En esta memoria nos hemos centrado en las terapias dirigidas a bloquear la transducción de señales que regulan la proliferación y diseminación de las células tumorales, y más concretamente en las terapias dirigidas contra los RTKs. La mayoría de RTKs están formados por subunidades monoméricas, aunque muchos de ellos actúan como complejos multiméricos. Cada subunidad de RTK está formada por: (i) una región extracelular que contiene el sitio de

unión al ligando y una región de dimerización con otras subunidades o receptores; (ii) un dominio transmembrana hidrofóbico cuya función es estabilizar la dimerización de los receptores y (iii) un dominio intracelular compuesto por una región yuxtamembrana, el dominio tirosina quinasa y la región C-terminal. La región yuxtamembrana regula el estado activo e inactivo del receptor, mediante cambios de conformación. El dominio tirosina quinasa contiene un sitio de unión a ATP y su actividad catalítica permite la trans- y autofosforilación del receptor y, en consecuencia, su activación y la unión de proteínas efectoras que transducen la señal. El dominio quinasa también contiene residuos de lisina que son los sitios primarios de la ubiquitinación del receptor. La cola C-terminal incluye varios residuos de tirosina, que cuando son fosforilados en respuesta a la unión del ligando, pueden ejercer en algunos casos una función auto-inhibitoria de la señal, y en otros permitir el anclaje de una gran variedad de proteínas intracelulares efectoras que transducen las señales de los receptores activos (Ségaly et al., 2015).

3.1. Papel de los receptores tirosina quinasa en cáncer

Estos receptores son mediadores esenciales de la señalización celular y juegan un papel crucial en diversos procesos como la diferenciación, la proliferación y la apoptosis en respuesta a diferentes estímulos. La desregulación de las vías de señalización mediadas por estos receptores conduce a la interrupción del equilibrio entre la proliferación y la muerte celular (Schlessinger, 2000), por lo que una activación constitutiva de estos receptores puede conferir propiedades oncogénicas a las células normales y promover el desarrollo tumoral (McDonnell et al., 2015).

Muchas de las vías de señalización mediadas por los RTKs tienen importancia en cáncer por su papel en la inducción del programa EMT y en el control de la proliferación, migración e invasión de las células tumorales. Vías de señalización como las de MET, AXL, FGFR, PDGFR, EGFR y TGF β R se han asociado con desarrollo y progresión tumoral (Hynes & Lane, 2005; Jechlinger et al., 2006; Padua & Massagué, 2009; Turner & Grose, 2010; Logothetis et al., 2011; Rankin & Giaccia, 2016). Los cuatro mecanismos principales que conducen a la activación aberrante de RTKs en diferentes tipos de cáncer son: (i) mutaciones asociadas a una ganancia de función, (ii) amplificación genómica, (iii) reorganizaciones cromosómicas y (iv) activación autocrina del receptor (Du & Lovly, 2018) (Figura 5).

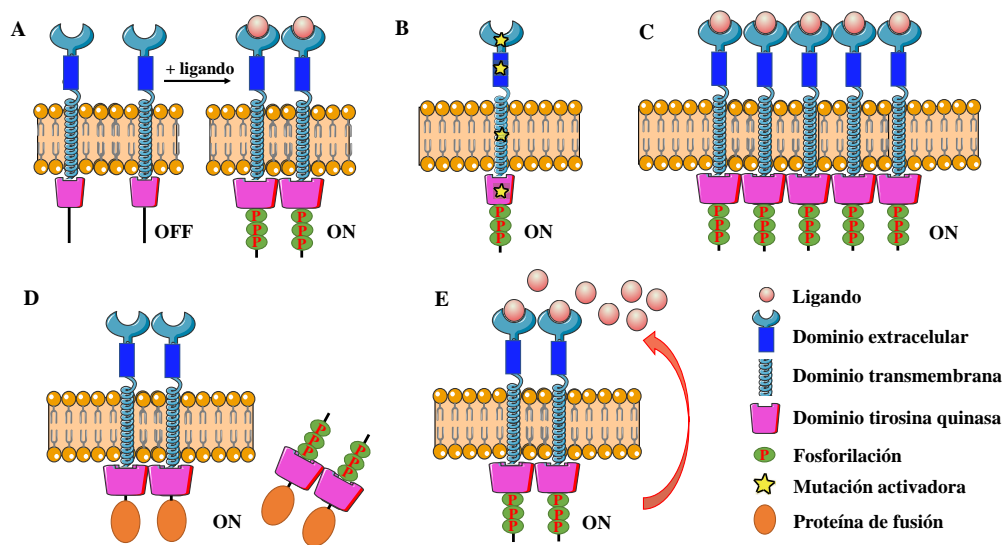


Figura 5. Mecanismos de activación fisiológica y oncogénica de los RTKs. **A.** Activación fisiológica de los RTKs. Los RTKs se activan tras la unión de su ligando y la formación de dímeros, lo que resulta en la activación de su dominio quinasa y la fosforilación de la región intracelular del receptor. **B.** Representación de posibles mutaciones activadoras en los diferentes subdominios que conllevan una activación constitutiva de los RTKs en ausencia de ligando. **C.** La sobreexpresión de RTKs, a menudo como resultado de la amplificación del gen, conduce a un aumento de la concentración local de los receptores. **D.** Los reordenamientos cromosómicos pueden dar lugar a la formación de una oncoproteína que consta en parte del RTK y en parte de otra proteína. Estas proteínas de fusión pueden estar ancladas en la membrana (lado izquierdo de la figura) o pueden ser citoplasmáticas (lado derecho de la figura), dependiendo de la ubicación del punto de fusión. En cualquier caso, el resultado es un dominio quinasa activado. **E.** La sobreexpresión de los ligandos, a menudo como resultado de la amplificación del gen, conduce a la activación autocrina de la vía de señalización.

3.1.1. La vía de señalización mediada por FGFR

La vía de FGF desempeña un papel crucial en la regulación de una gran cantidad de procesos, tanto en la etapa embrionaria como en la adulta. Esta vía de señalización controla la proliferación, la supervivencia, la migración y la diferenciación celular, procesos vitales para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, la curación de heridas y la angiogénesis (Kato, 2016).

La familia de los FGFs comprende 18 ligandos altamente conservados (FGF1-10, FGF16-23), agrupados en cinco subfamilias de acción autocrina y/o paracrina, una subfamilia de acción endocrina y cuatro factores homólogos a FGF (FGF11-14), que tienen una secuencia similar a FGF pero no inducen la activación de FGFR. FGF15 murino es ortólogo del FGF19 humano (Kato, 2016). La familia de receptores que unen los FGFs funcionales está formada por cuatro miembros: FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4. La región extracelular de los FGFRs está compuesta por tres dominios tipo Ig. El primer dominio desempeña un papel importante en la auto-inhibición del receptor, mientras que los otros dos dominios forman el sitio de unión al ligando (Olsen et al., 2004). La región N-terminal del tercer dominio Ig está codificada por un exón conservado (IIIa), mientras que la C-terminal está codificada por dos exones mutuamente

excluyentes (IIIb y IIIc). Como consecuencia del *splicing* alternativo de este dominio, FGFR1-3 presentan diferentes isoformas con diferente afinidad por los ligandos. Mientras que las isoformas IIIb se expresan en células de tipo epitelial, las isoformas IIIc se asocian a un fenotipo mesenquimal (Wesche et al., 2011). Esta regulación del *splicing* dependiente de tejido, marca la especificidad de la unión ligando-receptor. Así, las isoformas expresadas en el tejido mesenquimal se activan mediante ligandos que se expresan en las células epiteliales, como son los miembros de las subfamilias FGF4 (FGF4-5) y FGF8 (FGF8, FGF17-18), y las isoformas expresadas por los tejidos epiteliales son estimuladas por ligandos que se expresan en tejidos mesenquimales, como son los miembros de la subfamilia FGF7 (FGF3, FGF7, FGF10, FGF22). La subfamilia de FGF1 esta compuesta por FGF1 y FGF2. FGF1 puede activar todas las isoformas de FGFRs y FGF2 presenta afinidad para las isoformas IIIc de FGFR1-3, pero también puede activar la isoforma IIIb de FGFR1 (Ornitz & Itoh, 2015). Se ha descrito un quinto receptor (FGFRL1) que se caracteriza por no tener dominio tirosina quinasa y puede regular negativamente la vía de señalización, inhibiendo la proliferación y promoviendo la diferenciación celular (Trueb et al., 2003).

La unión del ligando a FGFR1-4 induce la dimerización del receptor y la activación de los dominios quinasa intracelulares, permitiendo la transfosforilación del mismo en residuos tirosina quinasa. Estos residuos fosforilados actúan como sitios de unión de proteínas adaptadoras como FRS2 (sustrato 2 de FGFR) y PLC γ (fosfolipasa C γ), las cuales cuando son fosforiladas estimulan las vías de RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT, STATs y PKC (Su et al., 2016).

En la piel, los queratinocitos expresan FGFR1 y FGFR2 (Beer et al., 2000; Zhang et al., 2004; Meyer et al., 2012), y el ligando FGF22, mientras que los fibroblastos de la dermis y la papila dermal expresan mayoritariamente FGF7 y FGF10 (Yang et al., 2010), los cuales juegan un papel clave en la migración y procesos de curación de heridas (Song et al., 2016). Además, la abrogación conjunta de las isoformas IIIb de FGFR1 y FGFR2 provoca una pérdida progresiva de los apéndices de la piel (glándula sebácea y folículo piloso), inflamación cutánea, hiperproliferación de los queratinocitos y finalmente el desarrollo de acantosis (Yang et al., 2010). Además, se ha demostrado que la delección condicional de *Fgfr2b* induce un engrosamiento severo de la piel, la aparición de papilomas espontáneos en un 10% de los ratones y un aumento masivo del desarrollo de papilomas, así como de cSCCs en respuesta al tratamiento con DMBA/TPA (Grose et al., 2007). Estas observaciones indican que FGFR2b puede desempeñar una función supresora tumoral.

3.1.1.1. La vía de FGFR y su implicación en cáncer

Se ha descrito una activación aberrante de la vía de FGFR en múltiples tipos de cáncer, la cual induce *stemness*, EMT, proliferación, supervivencia, migración e invasión de las células tumorales, y angiogénesis (Ota et al., 2009; Korc & Friesel, 2009; Katoh & Katoh, 2010; Nilsson et al., 2010; Cuevas et al., 2011; Heinzle et al., 2011). La señalización aberrante de la vía de FGFR se puede producir como consecuencia de todos los mecanismos descritos en la Figura 5, así como por una sobre-estimulación de los FGFRs por el *switch* de las isoformas IIIb a IIIc.

Las amplificación de *FGFR1* se ha descrito en el 17% de los tumores de pulmón de células no pequeñas (NSCLCs) (Stoelben et al., 2010; Yang et al., 2014), en un 6% de los tumores de pulmón de células pequeñas (SCLCs) (Peifer et al., 2012), en un 3% de los HNSCCs (Koole et al., 2016) y en un 10-15% de todos los cánceres de mama (Lee et al., 2014). La amplificación de *FGFR2* es menos frecuente, pero se ha observado en un 5-10% de los casos de cáncer gástrico más agresivo (Matsumoto et al., 2012) y en el 2-4% de los casos de cáncer de mama (Turner et al., 2010). *FGFR3* esta sobrepresado en aproximadamente el 50% de los SCC orales y orofaríngeos (Koole et al., 2016) y frecuentemente en cáncer de vejiga (Tomlinson et al., 2007; Fischbach et al., 2015), aunque en ninguno de los dos casos la sobrepresión está vinculada a la amplificación del gen. La sobrepresión de *FGFR4* se ha identificado en más del 50% del carcinomas hepatocelulares, donde juega un papel relevante en el control de la invasión de las células tumorales (Gauglhofer et al., 2014). La amplificación de *FGFR3* y *FGFR4* es poco frecuente y la activación oncogénica de estos receptores puede estar vinculada a mutaciones (Bernard-Pierrot et al., 2006), a la amplificación de ligando o a la formación de proteínas de fusión (Wu et al., 2013).

Las mutaciones activadoras en FGFRs raramente ocurren en la región tirosina quinasa, a diferencia de EGFR, y se han descrito en *FGFR2* y *FGFR3*, mientras que las mutaciones en *FGFR1* son muy poco frecuentes en cáncer. Las mutaciones de *FGFR2* se han identificado en el 10-12% de los carcinomas endometriales (Dutt et al., 2008; Helsten et al., 2016), el 4% de los NSCLC y cánceres gástricos (Greenman et al., 2007), y en el 2% de los tumores uroteliales (Gao et al., 2014). Las mutaciones en *FGFR2* y *FGFR3* se producen mayoritariamente en los dominios Ig II y III, así como en el dominio transmembrana, y pueden proporcionar una ganancia de función a través de un aumento de la afinidad de unión receptor-ligando (Ibrahimi et al., 2002; Ibrahimi et al., 2004), o por la dimerización constitutiva del receptor que activa la señalización independientemente de la unión del ligando (Bernard-Pierrot et al., 2006).

Esta vía también puede activarse de forma aberrante a través de alteraciones en la expresión de los ligandos. Las células tumorales pueden inducir la expresión de ligandos, activando la vía de forma autocrina, o se puede activar de forma paracrina, mediante los ligandos producidos por las

células estromales. Así, FGF2 y FGF9 y sus respectivos FGFRs pueden activar un bucle autocrino que promueve la proliferación de líneas celulares de NSCLC resistentes a gefitinib, un inhibidor de la vía de EGFR (Marek et al., 2009) o en tumores resistentes a la terapia anti-VEGF (Kopetz et al., 2010), sugiriendo que la activación autocrina de la vía de FGFR puede actuar como mecanismo de resistencia a terapias (ver más adelante en apartado 4).

Por otra parte, se ha descrito que las células tumorales de los melanomas metastásicos inducen el bucle autocrino FGFR1-FGF2 para regular su proliferación y promover la progresión de los melanomas malignos (Becker & Wang, 1997). La activación autocrina de esta vía se ha descrito además en líneas celulares de HNSCC y en SCCs de piel avanzados de ratón (Marshall et al., 2011; da Silva-Diz et al., 2016).

Diferentes estudios han relacionado la inducción del programa EMT con un cambio de la isoforma epitelial FGFR2b hacia las isoformas mesenquimales FGFR2c y FGFR1c. Así, nuestro grupo de investigación demostró que las CSCs de los WD-SCC de piel de ratón expresan altos niveles de FGFR2, mientras que las CSCs de PD/S-SCCs reprimen la expresión de esta isoforma e inducen de forma estable el programa EMT y la vía de FGFR1c, la cual promueve el crecimiento agresivo de estos tumores (da Silva-Diz et al., 2016). En modelos de ratón de cáncer de próstata y vejiga, el cambio de FGFR2b a FGFR2c resultó en una activación autocrina de FGFR2 y una inducción del programa EMT (Sorg et al., 2006; Savagner et al., 2013; Yan et al., 2015). En este sentido, estudios recientes indican que FGF2 y TGF- β pueden cooperar controlando el cambio de expresión de las isoformas FGFR1b y FGFR2b hacia una expresión de FGFR1c e inducir del programa de EMT, promoviendo la invasión y la metástasis (Shirakihara et al., 2011).

3.1.1.2. Terapias dirigidas contra la vía de FGFR

Las terapias dirigidas contra FGFRs para el tratamiento del cáncer están pendientes de aprobación por la FDA/EMA. Sin embargo, se han desarrollado un gran número de ensayos clínicos con inhibidores de FGFR. Las aproximaciones terapéuticas incluyen i) inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKI) no selectivos, ii) TKI dirigidos selectivamente al dominio quinasa de los FGFRs (TKI selectivos), iii) anticuerpos monoclonales (mAbs) contra los FGFRs y iv) las trampas de los FGFs (Figura 6).



Figura 6. Descripción de algunos ensayos clínicos que evalúan la respuesta a terapias dirigidas contra FGFRs. Varios inhibidores no selectivos de FGFR han entrado en ensayos de fase II/III, mientras que los inhibidores selectivos de FGFR se encuentran principalmente en estudios de fase temprana. Adaptado de Touat y colaboradores, 2015; Babina y colaboradores, 2017; ClinicalTrial.gov.

Los inhibidores selectivos, a diferencia de los no selectivos, permiten atribuir una determinada respuesta a la terapia a un estado de la vía de FGFR, así como reducir los efectos tóxicos asociados a los inhibidores que afectan a múltiples RTKs. El análisis retrospectivo de los ensayos basados en TKIs selectivos que están actualmente en desarrollo (Figura 6) demuestra que la eficacia de estas terapias es muy variable en los distintos tipos tumorales. En estudios de fase I y II para testar los fármacos AZD4547 y NVP-BGJ398 en pacientes con NSCLC y cáncer de mama con *FGFR1* amplificado, y en tumores uroteliales con alteraciones en FGFR3 se obtuvieron respuestas (parciales) en 5-10% de los casos (ClinicalTrials.gov: NCT00979134; NCT01795768; NCT00979134). Sin embargo, el tratamiento con NVP-BGJ398 dio una mejor respuesta en pacientes de cáncer de vejiga con FGFR3 mutado (Nogova et al., 2017).

Por otro lado, en un ensayo de fase II que evaluó el efecto del AZD4547 en pacientes con cáncer gástrico con *FGFR2* amplificado, 3 de 9 pacientes mostraron una buena respuesta (ClinicalTrials.gov: NCT01795768), mientras que en otro estudio el tratamiento con AZD4547 no mostró una ventaja significativa comparado con el tratamiento con paclitaxel.

Sin embargo, los tumores con fusiones de FGFRs parecen responder mejor a estas terapias. El tratamiento con NVP-BGJ398 provocó la remisión del tumor en un paciente con colangiocarcinoma y un paciente con hepatocarcinoma (HCC), ambos con fusiones genéticas FGFR2-BICC1 (Nogova et al., 2017). En consecuencia, actualmente hay estudios de fase II en

desarrollo para testar este fármaco en colangiocarcinoma (ClinicalTrials.gov: NCT02150967) y tumores gastrointestinales avanzados (ClinicalTrials.gov: NCT02257541), entre otros tumores sólidos y hematológicos (ClinicalTrials.gov: NCT02160041). Además, el tratamiento con JNJ-42756493 en pacientes con tumores uroteliales con la fusión de FGFR3-TACC3 mostró una buena respuesta clínica (Tabernero et al., 2015).

Finalmente, los anticuerpos monoclonales específicos para los FGFRs están en una fase de desarrollo muy inicial y hasta el momento hay pocos resultados clínicos para obtener conclusiones sobre su eficacia.

3.1.2. La vía de señalización mediada por PDGFR

Se han descrito cuatro cadenas polipeptídicas denominadas PDGF-A, -B, -C y -D, que se unen formando cinco factores de crecimiento funcionales, PDGF-AA, -BB, -AB, -CC y -DD. La dimerización de estos factores favorece la dimerización de sus receptores tirosina quinasa: PDGFR α y PDGFR β (Figura 7). Estos receptores tienen diferente afinidad por las distintas formas activas de PDGFR: PDGF-A, -B y -C se unen a PDGFR α , mientras que PDGF-B y -D se unen a PDGFR β . Por lo tanto, dependiendo de la isoforma específica de PDGF, se formarán diferentes homo (R α R α , R β R β) o heterodímeros (R α R β) del receptor. La activación de los receptores generalmente requiere que el ligando promueva la dimerización o la oligomerización del receptor (Figura 7).

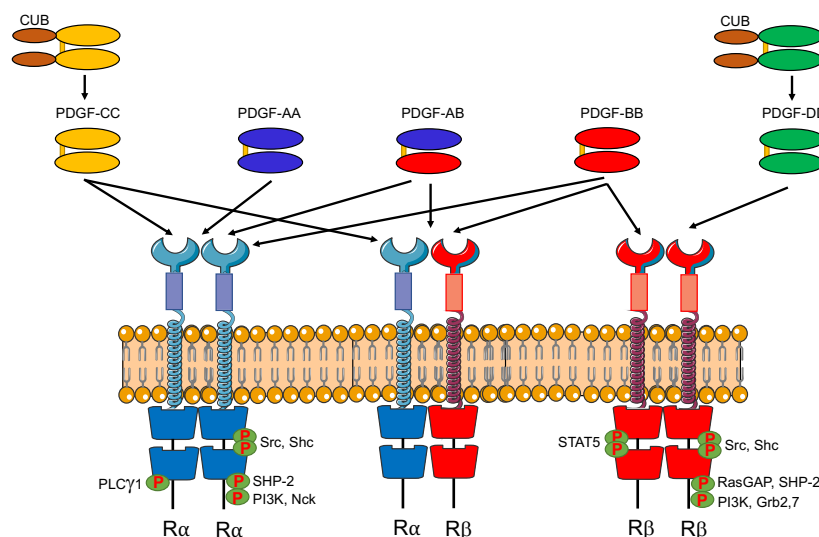


Figura 7. Factores de crecimiento PDGF y sus receptores. Se han descrito cinco formas de PDGF activas, formadas por la dimerización de cuatro polipéptidos, y tres receptores. Las flechas indican las afinidades entre ligandos y receptores. PDGF-C y -D contienen un dominio CUB auto-inhibitorio que requiere proteólisis extracelular para que el ligando sea funcional. En las regiones intracelulares de los receptores se muestran los diferentes efectores *downstream* que se unen a estos receptores activados. Adaptado de Ehnmm y Östrman, 2013 y Heldin, 2013.

Los PDGFRs dimerizados y activos, se autofosforilan en aproximadamente 10 residuos tirosina, creando sitios de unión para proteínas de señalización que contienen el dominio SH2. Estas proteínas incluyen la fosfolipasa PLC γ , las quinasas SRC, FER y PI3K y la fosfatasa SHP2. Además, proteínas adaptadoras como GRB2, GAB2, NCK también pueden unirse para formar los complejos de transducción de señal. La unión de estas proteínas al receptor induce a la activación de varias vías de señalización, como la vía de las MAP quinasas (MAPK), la vía de PI3K/AKT y la vía de PLC γ (Heldin, 2013)

Las diferentes isoformas de PDGF son producidas por células epiteliales y endoteliales, y actúan principalmente de manera paracrina, activando esta vía en las células mesenquimales cercanas, como fibroblastos, pericitos y células del músculo liso (Heldin, 2013). La activación de la vía de PDGFR α es importante para el desarrollo del esqueleto facial, folículos pilosos, oligodendrocitos y astrocitos (Soriano, 1997), así como para el desarrollo del pulmón (Boström et al., 1996) y las vellosidades intestinales (Karlsson et al., 2000), mientras que la vía de PDGFR β participa en el desarrollo de vasos sanguíneos, riñones (Soriano, 1994; Pekny et al., 2007) y tejido adiposo (Ohashi et al., 2011). Además, se ha descrito que PDGF estimula la cicatrización de heridas en la piel en ratones adultos (Robson et al., 1992). En este sentido, algunos de estos ligandos son expresados por los queratinocitos de la piel de ratón, mientras que sus receptores se expresan en células mesenquimales y fibroblastos de la dermis (Pontén et al., 1994; Akiyama et al., 1996). La inhibición genética de estos ligandos y receptores específicamente en la piel de ratón, ha demostrado que PDGF-A, PDGF-C y PDGFR α están implicados en el correcto desarrollo de la dermis (Soriano, 1997; Betsholtz, 2004; Ding et al., 2004). La inyección de PDGF-AA o PDGF-BB en la dermis de ratones promueve que los folículos pilosos en fase de reposo (fase de telogén) entren en la fase de crecimiento (fase de anagén), favoreciendo la renovación del pelo (Tomita et al., 2006). Además, PDGF-A secretado por la epidermis promueve la proliferación de las células mesenquimales progenitoras PDGFR α^+ que contribuyen a la correcta formación de la papila dermal y la dermis durante el desarrollo de la piel (Karlsson et al., 1999).

3.1.2.1. La vía de PDGFR y su implicación en cáncer

La activación aberrante de la vía de PDGFR se ha relacionado con procesos de tumorigénesis, progresión tumoral e invasión y metástasis. En glioblastoma multiforme (GBM), se demostró que la activación de PDGFR β mediada por PDGF-B promueve la auto-renovación y la capacidad iniciadora de tumores en las CSCs (Kim et al., 2012). Un subgrupo de GBM que engloba casi un 30% de los GBMs de pacientes, se caracteriza por la sobreexpresión de PDGFB, la cual conduce a un aumento de la fosforilación de PDGFR β (Brennan et al., 2009). Además, se ha descrito que la activación autocrina PDGF-B/PDGFR β promueve la supervivencia de las células tumorales en

leucemia linfocítica granular (Baab et al., 2009), mientras que la activación autocrina de PDGF-D/PDGFR β , mediante la secreción del activador proteolítico de PDGF-DD matriptasa, promueve el crecimiento de las células de cáncer de próstata (Ustach et al., 2010). En NSCLC y sarcomas, la co-expresión de PDGF-C y PDGFR α induce la proliferación de las células tumorales, la cual es inhibida en respuesta al tratamiento con sunitinib, un inhibidor dual de la vía de PDGFR y VEGFR (McDermott et al., 2009).

Por otra parte, se ha demostrado que algunas mutaciones que afectan a los genes que codifican los ligandos y receptores de PDGF provocan la activación de esta vía de señalización. Así, mutaciones en el dominio yuxtamembrana y en el dominio de unión al ATP de *PDGFRA* conducen a la activación constitutiva de la vía, independiente de ligando, en tumores gastrointestinales (GIST) (Kang et al., 2005). Además, se han observado amplificaciones del gen *PDGFRA* en un 5-10% de los GBM, SCC de esófago y sarcomas de la arteria íntima (Arai et al., 2003; Ohgaki et al., 2011). Por otra parte, se ha correlacionado una elevada expresión de *PDGFRB*, inducida por mutaciones en *TP53*, con una mayor agresividad y una menor supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas, colon y ovario (Weissmueller et al., 2014). La activación autocrina y/o paracrina de la vía de PDGFR se ha correlacionado con la progresión tumoral en algunos tipos de tumores (Cao, 2013a) y con la activación del programa EMT, promoviendo la invasión y metástasis en cáncer de mama, próstata y mesotelioma (Jechlinger et al., 2006; Konga et al., 2008; Tam & Weinberg, 2013). En este sentido, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la activación autocrina de la vía de PDGFR α en las CSCs promueve su invasión y la generación de metástasis de los SCC de piel murinos más avanzados (da Silva-Diz et al., 2016).

3.1.2.2. Terapias dirigidas contra la vía de PDGFR

Dado el patrón de expresión de las diferentes formas de PDGF y sus receptores en los tumores, a menudo no es posible valorar el efecto terapéutico sobre las células tumorales y cuál afecta al microambiente tumoral (TME). Actualmente, se dispone de tres estrategias para inhibir la vía de PDGFR: i) secuestrar el ligando con anticuerpos neutralizantes, regiones extracelulares solubles de los receptores que actúan como trampas de ligando, o aptámeros de ADN/ARN; ii) bloquear la interacción entre el ligando y el receptor con anticuerpos específicos contra la región extracelular del receptor o pequeñas moléculas inhibitoras; y iii) moléculas inhibitoras de bajo peso molecular que bloquean la actividad quinasa del PDGFR (Papadopoulos & Lennartsson, 2018).

Actualmente, solo han sido aprobadas algunas terapias basadas en inhibidores tirosina quinasa. Es importante destacar que algunas de estas terapias se han desarrollado para bloquear

directamente los PDGFRs, mientras que en otros casos, se han considerado estos receptores como una diana secundaria. Es el caso del imatinib, que fue aprobado en 2001 (Iqbal & Iqbal, 2014) para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (CML), causada por la activación constitutiva de la proteína oncogénica de fusión BCR-ABL, la cual conduce a una desregulación de la señalización de las células madre hematopoyéticas y precursores mieloides (Kurzrock et al., 2003). Sin embargo, este inhibidor también tiene como dianas terapéuticas a PDGFR y cKIT. Por este motivo, este fármaco es utilizado para el tratamiento de algunos tipos de leucemias (como por ejemplo la ALL), que presentan la activación de PDGFR β , y del GIST, que se caracteriza por tener c-KIT, y con menos frecuencia PDGFR α , mutado o sobreexpresado.

En muchos casos, el tratamiento conduce a una mejora significativa de la supervivencia de los pacientes, aunque pueden desarrollar resistencia al imatinib (Sleijfer et al., 2007). Para estos casos, se han desarrollado inhibidores de tirosina quinasa de segunda y tercera generación, como el dasatinib, el nilotinib, el bosutinib y el ponatinib con el objetivo de bloquear múltiples RTKs (por ejemplo, PDGFR, VEGFR, FGFR, entre otros) e inhibir así la proliferación celular y la angiogénesis tumoral (Regad, 2015; Wu et al., 2018). Como se ha descrito anteriormente, otros tipos de cáncer como el GBM, NSCLC, sarcoma, SCLC, cáncer de próstata, mama, ovario, presentan una fuerte activación de esta vía. Sin embargo, ninguna de estas terapias ha mostrado tener grandes beneficios clínicos en estos tipos de cáncer (Papadopoulos & Lennartsson, 2018).

En nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento con imatinib en ratones portadores de PD/S-SCCs de piel consigue reducir de forma significativa el número y tamaño de las metástasis (da Silva-Diz et al., 2016). Sin embargo, se desconocen los mecanismos que inducen la activación de la vía de PDGFR en las CSCs de los PD/S-SCCs y a través de qué mecanismos esta vía promueve la invasión de las CSCs y la generación de metástasis.

3.1.3. La vía de señalización mediada por EGFR

La familia de receptores ErbB incluyen EGFR (también llamado ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o NEU), HER3 (ErbB4) y HER4 (ErbB4). Estos receptores tirosina quinasa pueden formar homo y heterodímeros entre sí durante su activación. ErbB2 se caracteriza por no tener dominio de unión al ligando, aunque puede activarse mediante la formación de heterodímeros con otros receptores de su familia. Aunque HER3 puede unirse a ATP y catalizar la autofosforilación, tiene una actividad quinasa débil en comparación con el resto de los receptores ErbB (Arteaga & Engelman, 2014; Wee & Wang, 2017). Sin embargo, puede ser fosforilado por otro receptor de la familia, contribuyendo de forma eficiente a la activación de vías de señalización *downstream*.

Los miembros de la familia de EGF (factor de crecimiento epidermal) se agrupan en tres categorías según su afinidad por los diferentes receptores ErbB. En el primer grupo se encuentra EGF, TGF α , AREG y HB-EGF, los cuales se unen a EGFR. El segundo grupo presenta afinidad tanto por EGFR como por HER4 e incluye EREG, BTC y EPGN. El tercer grupo incluye todas las neuregulinas (NRG1-NRG4). NRG1 y NRG2 se unen a HER3 y HER4, mientras que NRG3 y NRG4 solo se unen a HER4 (Arteaga & Engelman, 2014; Roskoski, 2014).

La activación de los receptores tras la unión del ligando desencadena una red de señalizaciones a través de diferentes vías *downstream*, que pueden estar interconectadas entre sí. La formación de los complejos de proteínas efectoras que se acoplan en los residuos fosforilados del receptor, inicia la activación de varias vías de señalización, incluidas RAS/ERK, PI3K/AKT, PLC γ 1, SRC y STAT que regulan procesos celulares fundamentales, como la proliferación, la diferenciación, la migración celular, el metabolismo y la supervivencia (Citri & Yarden, 2006; Mitsudomi & Yatabe, 2010).

EGFR se expresa en los queratinocitos de la piel y su activación induce la proliferación de estas células, provocando un aumento de la celularidad y del grosor de la epidermis. También puede inducir la migración y supervivencia de los queratinocitos, así como inducir o bloquear la diferenciación de éstos de forma dependiente del contexto (Uribe & Gonzalez, 2011). La inhibición de la vía de EGFR en los queratinocitos de la piel, inducida en modelos de ratón por la pérdida del receptor o TGF α , tiene como consecuencia defectos en la diferenciación de estas células, disminución de la capacidad de cicatrización de heridas, desregulación del ciclo del pelo y alteraciones de la regulación de las reacciones inflamatorias/inmunitarias en la piel (Pastore et al., 2008; Schneider et al., 2008; Smolle et al., 2013; Holcman & Sibilio, 2015).

3.1.3.1. La vía de EGFR y su implicación en cáncer

La activación aberrante de estos receptores está fuertemente asociada con procesos de tumorigénesis y progresión tumoral en una gran variedad de tumores, incluyendo NSCLC, HNSCC, glioma, meduloblastoma, cáncer de mama, esófago, colorrectal, anal, gástrico, vejiga, endometrio, melanoma, próstata, páncreas y ovario (Arteaga & Engelman, 2014).

La sobreexpresión y las mutaciones activadoras en EGFR son las principales causas de desregulación de esta vía de señalización (Figura 8). Las mutaciones en el dominio quinasa de EGFR ocurren en un 10-40% de las muestras de cáncer de pulmón (Figura 8). La amplificación del gen EGFR se produce en aproximadamente el 15% de los adenocarcinomas y en el 30% de los SCC de pulmón, mientras que la amplificación de ErbB2 se produce en el 6% de los

adenocarcinomas y en el 2% de los SCC de pulmón. La sobreexpresión de EGFR se produce en aproximadamente el 60% de los NSCLC (Roskoski, 2014; Zhixiang Wang, 2017).

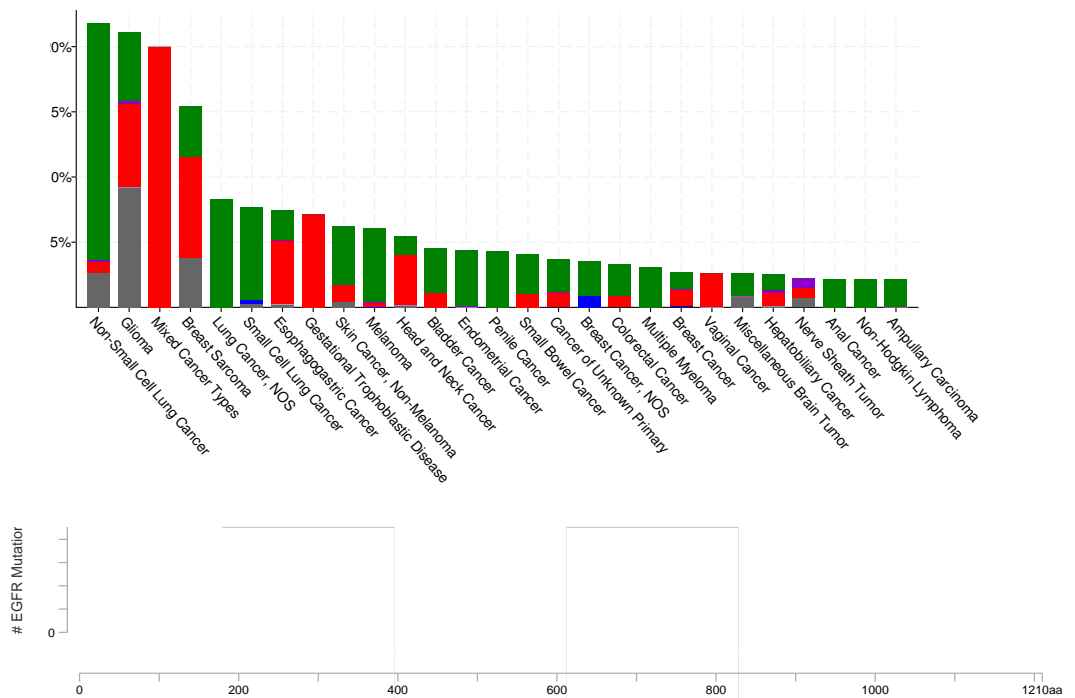


Figura 8. Alteraciones genéticas en EGFR en tumores humanos y distribución en los diferentes dominios del gen EGFR. A. Representación de los porcentajes de las diferentes alteraciones descritas para EGFR en pacientes con diferentes tipos de cáncer. Verde: mutación; lila: fusión con otro gen; rojo: amplificación del gen; azul: delección de alguna región del gen; gris: múltiples alteraciones. **B.** Representación de la distribución y tipo de mutaciones descritas para el gen EGFR. La información ha sido obtenida de cBioPortal y GENIE Cohort v5.0-public (56970 pacientes/59437 muestras).

Las mutaciones activadoras en EGFR son poco frecuentes en cáncer de mama, mientras que la sobreexpresión de EGFR se observa en un 15-30% de estos tumores y se asocia a una desensibilización a la quimioterapia a través de la inducción del programa de EMT, lo que conduce a una mayor agresividad y un peor pronóstico (Bartholomeusz et al., 2012). De forma similar, EGFR se sobreexpresa entre un 25% y un 82% de los cánceres colorrectales (CRC), y se asocia a un mayor grado del tumor y a una reducida supervivencia de los pacientes (Pabla, 2015). La sobreexpresión de EGFR también es muy frecuente en GBM y se han observado alteraciones en el número de copias somáticas en el 43% de los pacientes. Además, se han descrito mutaciones que conducen a la activación constitutiva del receptor, siendo la más común (40% de los pacientes) la que afecta a la pérdida de los exones 2-7 (llamada también EGFRvIII), correspondientes a la región extracelular, la cual provoca una activación constitutiva del receptor independiente del ligando. En general, alrededor del 60% de los pacientes con GBM tienen algún tipo de alteración genómica que afecta esta vía (Westphal et al., 2017). Por otra parte, EGFR está sobreexpresado en un 80% de los HNSCCs (Vatte et al., 2017), lo cual se ha asociado a un pronóstico desfavorable (Mitsudomi & Yatabe, 2010). En un análisis sistemático de 57 estudios

independientes se ha demostrado que la prevalencia mutaciones en EGFR en HNSCC es baja (2.8%) (Perisanidis, 2017) y se han correlacionado con un mayor grado histopatológico y con un estado avanzado del tumor (Vatte et al., 2017).

La expresión de EGFR está inducida en un porcentaje variable de cSCCs (Maubec et al., 2005), la cual no está generalmente asociada a una amplificación del receptor (Cañueto et al., 2017) y la frecuencia de mutaciones en este gen es muy baja (Pickering et al., 2014; South et al., 2014; Li et al., 2015). En nuestro laboratorio se ha demostrado que la vía de EGFR está fuertemente inducida en las CSCs de los WD-SCCs de piel de ratón y que su activación autocrina regula la proliferación y supervivencia de estas células, promoviendo el crecimiento tumoral. Sin embargo, se desconoce si la sobreexpresión y la activación de esta vía de señalización juegan un papel clave en el crecimiento de los cSCC en pacientes.

A parte de los eventos descritos en EGFR, también se han descrito alteraciones en otros receptores de la familia de ErbBs en múltiples tipos de cáncer, así como la inducción de la expresión de factores que activan estas vías de señalización (Tabla 1). Todas estas alteraciones, que conducen a la activación de las vías de señalización dependientes de ErbB, constituyen desde el punto de vista clínico una diana ideal, para la cual se han desarrollado toda una serie de estrategias terapéuticas que bloquean o disminuyen la actividad de estos receptores. En esta memoria me voy a centrar en las terapias dirigidas específicamente al bloqueo de la actividad de EGFR.

Molécula	Alteración	Tipo de cáncer	Observaciones
Ligandos			
TGF- α	Sobreexpresión	Próstata	Expresado por el estroma y las células tumorales
	Sobreexpresión	Páncreas	Correlaciona con un mayor crecimiento tumoral y baja supervivencia de los pacientes
	Sobreexpresión	Pulmón, ovario, colon	Correlaciona con una mala prognosis cuando se co-expresa con EGFR
NRG-1	Sobreexpresión	Adenocarcinoma mamario	Contribuye a la tumorigénesis en modelos animales
Receptores			
ERBB2	Sobreexpresión	Mama, ovario, pulmón, páncreas, colon, esófago, endometrio, cérvix	Sobreexpresión como consecuencia de la amplificación del gen en 15-30% de los cánceres de mama ductales invasivos y de ovario, y se asocia a una mala prognosis
ERBB3	Sobreexpresión	Mama y vejiga	Promueve la activación oncogénica de ERBB2 y EGFR.
	Sobreexpresión	SCC oral	La sobreexpresión correlaciona con metástasis en ganglios linfáticos y baja supervivencia de los pacientes
	Mutaciones	Mama y gástrico	
ERBB4	Baja Expresión	Mama y próstata	Correlaciona con un fenotipo diferenciado
	Expresión	Mama triple negativo	Marcador pronóstico y predictivo de respuesta a la terapia

Tabla 1. Alteraciones de los receptores de la familia ErbB (excluyendo EGFR) y sus ligandos en tumores humanos.

3.1.3.2. Terapias dirigidas contra la vía de EGFR

Actualmente, se emplean dos aproximaciones terapéuticas para bloquear la actividad de EGFR: los inhibidores tirosina quinasa (TKIs) y anticuerpos monoclonales (mAbs). Los TKIs, se unen al dominio de tirosina quinasa, bloqueando la actividad del receptor, mientras que los anticuerpos anti-EGFR se unen a los dominios extracelulares. Varios estudios han confirmado los beneficios de estas terapias en varios tipos de cáncer, incluidos el NSCLC, CRC, cáncer de páncreas, mama y HNSCC (Tabla 2). Estas terapias han mejorado significativamente la supervivencia de los pacientes comparado con los tratamientos convencionales basados en la administración de quimioterápicos (Vermorken et al., 2008; Van Cutsem et al., 2011; Rosell et al., 2012; Wu et al., 2015; Gold et al., 2018; Patil et al., 2018; Tian et al., 2018)

Actualmente, hay varios inhibidores de EGFR disponibles en clínica. Los de primera generación o reversibles (gefitinib y erlotinib) muestran una excelente eficacia clínica en pacientes con NSCLC portadores de mutaciones activadoras en EGFR, como por ejemplo la delección de los exones 19 y 15 o la mutación L858R en el exón 21. Los inhibidores covalentes de segunda generación (afatinib y dacomitinib) han demostrado tener un mayor efecto antitumoral en células con determinadas variantes oncogénicas de EGFR (EGFR-L858R), ya que se une de forma irreversible al sitio de unión al ATP y el receptor no restaura su señalización hasta que no se ha reciclado por completo. Sin embargo, algunos tipos de tumores, como el NSCLC, han desarrollado un mecanismo de resistencia a los fármacos de primera y segunda generación, basado en la adquisición de la mutación *EGFR T790M*. Para contrarrestar la resistencia mediada por la mutación T790M, se han desarrollado inhibidores de EGFR covalentes de tercera generación (osimertinib, olmutinib y rociletinib). Todos estos fármacos han sido designados como terapias innovadoras y aprobados por la FDA para diferentes tipos de cáncer (Tabla 2) (Yamaoka et al., 2017).

Los mAb contra EGFR están diseñados específicamente contra la región extracelular del receptor. Estos anticuerpos compiten con el ligando por la unión al receptor y bloquean la dimerización del receptor, la autofosforilación y la activación de la vía (Burgess et al., 2003). Además de inhibir el EGFR, estos mAbs inducen la ubiquitinación y degradación del receptor, así como una reducción de su expresión (Sunada et al., 2006). Actualmente, hay dos mAbs anti EGFR disponibles: cetuximab y panitumumab. El cetuximab, un mAb anti-EGFR quimérico humano-ratón IgG1, ha sido aprobado para el tratamiento contra el CRC metastásico y el HNSCC con KRAS no mutado. El panitumumab es un mAb IgG2 completamente humanizado que está aprobado para el tratamiento de CRC metastásico con KRAS no mutado.

Fármaco	Propiedades	Dianas	Usos aprobados por la FDA
TKIs			
Gefitinib (Iressa)	1ª Generación: reversible	EGFR	NSCLC metastásico con delección en exón 19 o mutación L858R en exón 21
Erlotinib (Tarceva)	1ª Generación: reversible	EGFR	NSCLC metastásico o localmente avanzado con delección en exón 19 o mutación L858R en exón 21. Cáncer pancreático metastásico o localmente avanzado en combinación con gemcitabina.
Afatinib (Gilotrif)	2ª Generación: irreversible	EGFR, HER2, HER4	NSCLC metastásico con delección en exón 19 o mutación L858R en exón 21
Osimetinib (Tagrisso)	3ª Generación: afinidad T790M y selectivo para EGFR no mutado	EGFR T790M	NSCLC metastásico con mutación T790M y refractario a la primera línea de tratamiento con inhibidores TKI.
Olmutinib (Olita)	3ª Generación: Afinidad T790M y selectivo para EGFR no mutado	EGFR T790M	Segunda línea de tratamiento en NSCLC metastásico con la mutación T790M (en Corea)
Lapatinib (Tykerb)	Reversible	EGFR, HER2	Cáncer de mama con sobreexpresión de HER2
Vandetanib (Caprelsa)	Reversible	EGFR, VEGFR, Ret	Carcinoma medular de tiroides
Anticuerpos monoclonales			
Cetuximab (Erbix)	Quimérico humano-ratón IgG1	EGFR	HNSCC y CRC metastásicos refractarios a la quimioterapia y sin mutaciones en KRAS
Panitumumab (Vectibix)	Humanizado IgG2	EGFR	CRC metastásicos con KRAS no mutado

Tabla 2. Terapias dirigidas contra EGFR aprobadas por la FDA

Las terapias dirigidas para los pacientes con cSCC de alto riesgo, recurrente y/o metastásico son limitadas, y solo se dispone de unos cuantos ensayos clínicos con inhibidores de EGFR en cohortes de pacientes reducidas. En estos ensayos clínicos se utilizaron anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la tirosina quinasa, como el gefitinib, para tratar pacientes con cSCC avanzados y metastásicos. Los resultados de estos ensayos mostraron que solo un porcentaje (15-27%) de los pacientes consiguen una respuesta completa o parcial duradera. De hecho, algunos de los pacientes presentaron progresión de la enfermedad tras una respuesta inicial (Maubec et al., 2011). Sin embargo, la falta de estudios moleculares pre y post tratamiento hace difícil de determinar si los casos que no respondieron de forma óptima estaban relacionados con la presencia de mutaciones o alteraciones genéticas que podrían evadir el efecto de la inhibición de EGFR (Mentré et al., 2011; Lewis et al., 2012; Stratigos et al., 2015; Gold et al., 2018)

3.2. Impacto del microambiente tumoral en el crecimiento y progresión de los tumores

Aunque hay muchos estudios que han demostrado que las células tumorales pueden activar de forma autocrina las vías de señalización que regulan su proliferación y supervivencia (Heldin, 2012), los factores de crecimiento y citoquinas derivados de las células del estroma o el TME

juegan un papel importante promoviendo el crecimiento tumoral y la metástasis (Pietras & Östman, 2010; Hanahan & Coussens, 2012). Los tumores sólidos están constituidos, además de por células tumorales, por el TME, que lo conforman células mesenquimales, como miofibroblastos y células madre mesenquimales, células endoteliales y pericitos, células inmunes, proteínas que forman la matriz extracelular y una gran variedad de factores de crecimiento y citoquinas que son segregadas por el estroma y las células tumorales (Bhowmick et al., 2004; Scheel et al., 2011; Sounni & Noel, 2013; Wang et al., 2017).

La angiogénesis es un proceso fundamental para la progresión tumoral en la cual las vías mediadas por RTKs tienen un papel relevante. Así, las células endoteliales pueden responder a factores secretados por las células tumorales y los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), como por ejemplo PDGFs, VEGFs y FGF2 favoreciendo el proceso de neo-angiogénesis (Wang et al., 2007; Chen et al., 2017)

Los CAFs son fibroblastos normales que se activan en respuesta a señales del estroma o de las células tumorales. Son el componente más abundantes del estroma tumoral y expresan altos niveles de PDGFRs (Cao, 2013b). La activación de los CAFs se induce por numerosas citoquinas, incluyendo TGF- β , VEGF, FGF2 y IL6, entre otras, que son secretadas por las células tumorales y otras células del estroma (Cirri & Chiarugi, 2012; Kalluri, 2016). Los CAFs activados se identifican por la expresión de la actina del músculo liso (α -SMA), y su expresión está estrechamente regulada por factores como el factor derivado de estroma 1 (SDF-1 o CXCL12) o los PDGFs, entre otros (Orimo et al., 2005; Zhong et al., 2009). Factores como TGF- β , FGFs y el factor de crecimiento hepático (HGF), desempeñan un papel crítico en la invasión de células tumorales mediada por CAF (Kalluri, 2016). Henriksson y colaboradores (2011) demostraron que los CAF activados *in vitro* mediante medio condicionado de células de cáncer de colon aumentaban la secreción de FGF1 y FGF2, los cuales inducían la migración e invasión de células tumorales (Henriksson et al., 2011; Knuchel et al., 2015). Se ha descrito también que PDGF-AA, -BB y -CC derivados de células tumorales promueven el reclutamiento de CAFs en tumores de mama, pulmón, melanoma y próstata (Shao et al., 2000; Tejada et al., 2006; Anderberg et al., 2010; Cheng et al., 2013), y la expresión de PDGFR en células estromales está asociada a un mal pronóstico en cáncer de mama, próstata (Paulsson et al., 2009; Stattin et al., 2010), colon (Heldin et al., 2006) y páncreas (Yuzawa et al., 2012; Heldin, 2013)

3.2.1 La vía de SDF-1/CXCR4

Las citoquinas median la comunicación entre las células tumorales y las estromales, y estas interacciones juegan un papel crucial durante la iniciación y la progresión tumoral (Guo et al, 2016), así como en el desarrollo de la metástasis (Sun et al, 2010). Una de estas citoquinas es SDF-1.

SDF-1 (o CXCL12) es una quimioquina homeostática de la familia CXC que induce la migración celular durante el desarrollo embrionario (Cheng et al., 2014). En tejidos adultos, esta quimioquina actúa estimulando la supervivencia de las células inmunes, como los linfocitos B (Kawaguchi et al., 2019) y regulando la quimiotaxis de las células T y los monocitos (Rosenkilde et al., 2016). SDF-1 se expresa en varios órganos, incluyendo corazón, hígado, cerebro, riñón, músculo esquelético y órganos linfoides. Las células endoteliales, los fibroblastos y los osteoblastos son la principal fuente de SDF-1 en estos órganos (Kryczek et al., 2007). Los fibroblastos de la dermis son la principal fuente de SDF-1 en la piel de ratón y humana (Florin et al., 2005; Quan et al., 2015).

El gen de SDF1 humano contiene cuatro exones y el *splicing* alternativo de su ARN mensajero puede dar lugar a seis isoformas distintas (SDF-1 α , SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ y SDF-1 ϕ), siendo la variante *alpha* la más abundante en los tejidos que las expresan (Janowski, 2009). SDF-1 se une a CXCR4 y CXCR7, dos receptores de membrana asociados a proteínas G. En condiciones fisiológicas, CXCR4 se expresa por múltiples tipos celulares, como linfocitos, células madre hematopoyéticas, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos (Guo et al., 2016), mientras que CXCR7 se expresa en células endoteliales y en linfocitos T e induce el desarrollo y la diferenciación de las células B (Burns et al., 2006).

En un contexto tumoral, la vía de señalización mediada por SDF-1 juega un papel importante facilitando la comunicación entre las células tumorales y el TME, creando un entorno ideal para el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. SDF-1 se expresa principalmente en las células tumorales y en CAFs (Kryczek et al., 2007) y está fuertemente expresado en cáncer de mama, páncreas, próstata, glioblastoma y SCC de piel (Quan et al., 2015). Dos estudios han correlacionado la expresión de SDF-1 con una menor supervivencia de los pacientes con cáncer de ovario (Ganzfried et al., 2013; Stordal et al., 2014). CXCR4 se sobrexprea en muchos tipos de tumores humanos, incluyendo mama, ovario, próstata, melanoma, pulmón y HNSCC (Sun et al., 2010), y en muchos de estos tejidos se expresa específicamente en las CSCs (Miki et al., 2007; Hermann et al., 2007; Bertolini et al., 2009; Gygi et al., 2014; Uemae et al., 2014). Por otra parte, CXCR7 se expresa en células inmunes, endoteliales y tumorales, y tiene una afinidad para SDF-1 diez veces más alta que CXCR4 (Burns et al., 2006).

La activación de la vía de SDF-1, ya sea de forma autocrina o paracrina (secretado por los CAFs), estimula la proliferación de las células tumorales de cáncer de próstata y de mama, así como la vascularización en estos tumores y gliomas (Darash-Yahana et al., 2004; Smith et al., 2004; Orimo et al., 2005; Folkins et al., 2009). La activación de la vía de CXCR4, junto con un aumento del programa EMT, promueven la migración y la invasión de las células tumorales de los HCC inducida por la vía de TGF- β (Bertran et al., 2013). La activación de esta vía a través de CXCR4 promueve la auto-renovación de las CSCs de tumores de mama y cerebro (Ehtesham et al., 2009; Uemae et al., 2014; Kong et al., 2016), e induce el programa EMT y la generación de metástasis en sarcoma, cáncer de mama, páncreas, colon y hígado (Li et al., 2014; Hu et al., 2014; Kong et al., 2016). En este sentido, se demostró que las células tumorales que expresan CXCR4 eran atraídas durante su diseminación a órganos distales que expresaban elevados niveles de SDF-1, donde podían iniciar el desarrollo de lesiones metastásicas (Guo et al., 2016). Inicialmente, se consideró que CXCR7 actuaba como un receptor *scavenger*. Así, la unión del ligando al receptor provocaba la activación de la β -arrestina, lo que conducía a la internalización del complejo ligando/CXCR7 y a su degradación vía lisosomas, o al reciclaje del receptor a la membrana celular (Naumann et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la vía de señalización SDF-1/CXCR7 induce proliferación y supervivencia (Tang et al., 2016), así como el programa de EMT en las células tumorales (Wu et al., 2016), sugiriendo que, al igual que la señalización mediada por CXCR4, podría promover el crecimiento tumoral y la metástasis.

La expresión de SDF-1 se induce significativamente en los fibroblastos del estroma de los cSCC humanos, comparado con la piel normal (Quan et al., 2015). Además, se ha descrito una inducción de la expresión de CXCR4 en cSCC metastásicos en comparación con los cSCC no metastásicos (Basile et al., 2008), mientras que la expresión de CXCR7 se induce en el 70% de cSCCs, y su activación se ha asociado con la supervivencia de las células cancerosas (Hu et al., 2014). Sin embargo, se desconoce si la inducción de esta vía juega un papel relevante promoviendo el crecimiento tumoral y la metástasis durante la progresión del cSCC.

4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA EL CÁNCER

Uno de los obstáculos más importantes en el tratamiento del cáncer es la resistencia que aparece frecuentemente a las terapias. En los últimos años se han realizado enormes esfuerzos para comprender los mecanismos moleculares responsables de la resistencia, sin embargo hay mucho camino por recorrer en este campo.

4.1. Tipos de resistencias a terapias dirigidas

Se han descrito dos categorías de resistencias farmacológicas, la intrínseca y la adquirida. La resistencia intrínseca se caracteriza por la falta de respuesta a una terapia específica o la rápida progresión de la enfermedad durante el tratamiento. Los factores responsables de la resistencia, tales como mutaciones u otras características celulares, pueden estar presentes en el tumor o en algunas subpoblaciones de células tumorales antes de recibir el tratamiento (Figura 9). La resistencia adquirida se refiere a la recidiva que se produce después de una respuesta inicial óptima al tratamiento y tras un largo periodo de tratamiento (Figura 9).

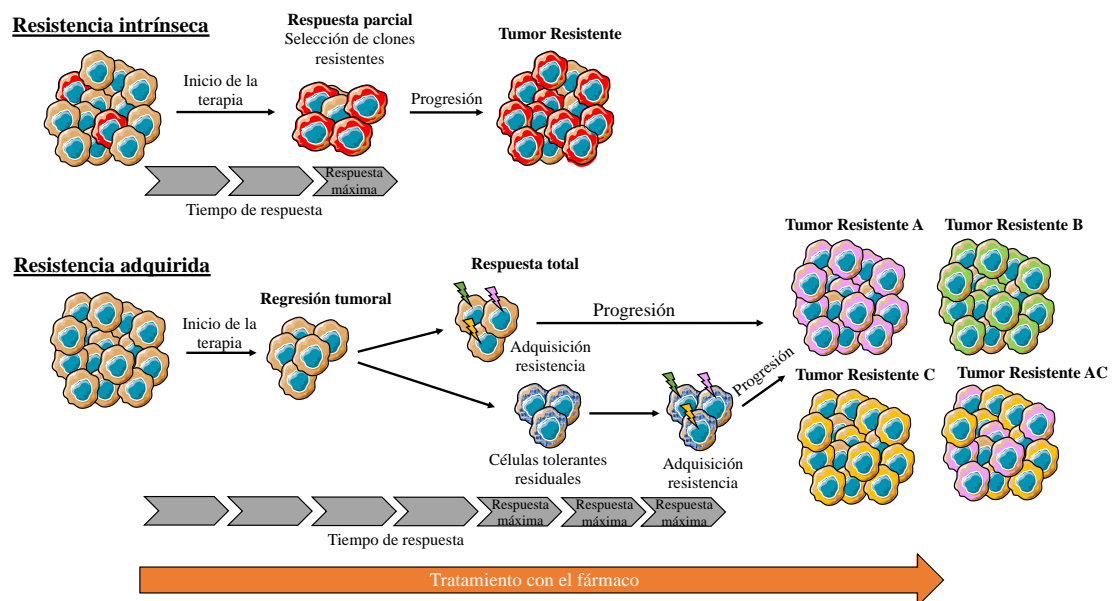


Figura 9. Descripción de las diferentes vías de generación de resistencia a fármacos. Comparación de los procesos de generación de resistencia intrínseca y adquirida y respuestas al tratamiento. Adaptado de Hammerlindl & Schaidler, 2017.

La heterogeneidad intra-tumoral y la plasticidad celular influyen de forma significativa en las respuestas terapéuticas y en la generación de resistencias. Así, el tumor puede contener poblaciones de células tumorales con alteraciones moleculares diferentes, que podrían mostrar distintas sensibilidades al tratamiento.

La plasticidad de las células tumorales es un mecanismo por el cual estas células cambian sus características para adaptarse al estrés o las condiciones del microambiente durante el crecimiento del tumor, o en respuesta a la terapia. Además de contribuir a la generación de heterogeneidad intra-tumoral, puede conducir al desarrollo de resistencia adaptativa mediante distintos mecanismos, como la reactivación de la vía de señalización diana, la hiperactivación de vías alternativas y/o modificando el *crossstalk* con el microambiente (Silva-Diz et al., 2018).

4.2. Mecanismos de resistencia desarrollados por las células tumorales

Los pacientes de CML portadores de fusiones BCR-ABL han mostrado una buena respuesta al tratamiento con imatinib. Sin embargo, en algunos casos esta respuesta se mantiene solo durante un corto período de tiempo. En el 50% de los casos, esto se debe a la aparición de mutaciones puntuales o cambios de pauta de lectura en la secuencia de BCR-ABL, que impiden la interacción del inhibidor con el dominio quinasa del receptor (Shah et al., 2002; Nardi et al., 2004; Karvela et al., 2012).

La mutación V555M en la región tirosina quinasa de FGFR3, así como en los residuos V561 de FGFR1 y V564 de FGFR2, inducen resistencia a múltiples inhibidores de FGFR en cultivos de células tumorales (Blencke et al., 2001; Chell et al., 2013; Mohammadi et al., 2015), lo cual ha sido recientemente confirmado en muestras de pacientes con colangiocarcinoma intrahepático, en los cuales la enfermedad progresó bajo el tratamiento con NVP-BGJ38 (Babina & Turner, 2017; Goyal et al., 2017). Mecanismos de resistencia similares se han descrito para múltiples dianas como FLT3, SRC o MEK1 (Hammerlindl & Schaidler, 2018).

La resistencia a los inhibidores está frecuentemente asociada a la activación de vías de señalización alternativas, que permiten superar los efectos de la terapia sobre la proliferación/supervivencia de las células tumorales (Figura 10). En este sentido, la activación de la vía de señalización HGF/cMET ha sido identificada como un mecanismo de resistencia a inhibidores de FGFR. Así, el tratamiento combinado con inhibidores de cMET y FGFR en xenoinjertos de tumores derivados de pacientes (*patient-derived xenograft*; PDX) de cáncer de pulmón resistentes a inhibidores de FGFR, resultó en un bloqueo casi total del crecimiento de las células tumorales (Harbinski et al., 2012). Otros ejemplos son, la activación de HER2 o ERBB3 observada en respuesta al tratamiento con NVP-BGJ398 en líneas celulares de cáncer de vejiga con amplificación de FGFR3 y la fusión FGFR3-TACC3 (Wang et al., 2015), o la co-activación de PDGFR α y HER2 en líneas celulares de NSCLC con amplificación de FGFR1, que desarrollaron resistencia a la terapia contra FGFR (Kotani et al., 2016). En la mayoría de estos casos, el tratamiento combinado con un fármaco dirigido contra la vía de señalización diana y otro contra la posible vía compensatoria suele tener resultados positivos.

Un mecanismo común de desarrollo de resistencia a una terapia contra un RTK es la activación de sus efectores *downstream* (Figura 10). Este es el caso de la activación de PI3K (mediante mutaciones activadoras en su subunidad catalítica, *PIK3CA*) en respuesta a trastuzumab o lapatinib (inhibidores de HER2) en pacientes con cáncer de mama con HER2 amplificado (Ramos & Bentires-Alj, 2015). Se han desarrollado inhibidores contra los efectores de los RTKs, como MEK, AKT, BRAF, entre otros (Levitzi & Klein, 2010). Sin embargo, también se han descrito

resistencias a estos inhibidores, que se producen mayoritariamente por la activación de otros efectores que regulan, mediante vías alternativas la proliferación/supervivencia de las células tumorales, o por un aumento de la expresión y activación de múltiples RTKs (Chandarlapaty et al., 2011). En este sentido, se ha visto que la resistencia a inhibidores de PI3K puede estar asociada a la activación de MAPK y al aumento de la expresión y activación de HER3, IGF1R o IR en células tumorales de próstata, mama y pulmón (Chandarlapaty et al., 2011), o mediada por la amplificación de MYC y la activación de las vías de NOTCH o de Wnt/ β -catenina en tumores de mama (Liu et al., 2011; Uras et al., 2011; Tenbaum et al., 2012).

De forma similar, se ha descrito que la resistencia a los inhibidores de RAF/MEK utilizados para el tratamiento del melanoma mutante para BRAF, puede estar mediada por la activación alternativa de las vías de PI3K, NOTCH1 y el receptor de estrógenos (ER). Algunas de ellas, como la activación de NOTCH1, ha sido corroborada en muestras de melanoma de pacientes con resistencia adquirida a inhibidores de RAF/MEK (Martz et al., 2015). Aunque el 50-60% de los pacientes con melanomas que contienen la mutación *BRAF V600E*, muestran una buena respuesta a la inhibición de BRAF (Hauschild et al., 2012), los CRC mutantes para BRAF (representan aproximadamente el 10% de todos los casos) muestran solo una tasa de respuesta del 5%. Esto es debido a que la inhibición de BRAF en estos tumores provoca la inhibición de CDC25C, una proteína implicada en la defosforilación e inactivación de EGFR, lo que conduce a una rápida activación de este receptor y AKT (Prahallad et al., 2012; Hammerlindl & Schaidler, 2018).

4.3. Mecanismos de resistencia a inhibidores de EGFR

De forma similar a lo descrito en la sección anterior, existen múltiples mecanismos que conducen al desarrollo de resistencia a la terapia contra EGFR.

4.3.1. Mutaciones primarias y secundarias en EGFR

Uno de los mecanismos de resistencia intrínseca o primaria más conocidos son las mutaciones en EGFR. Una inserción en el exón 20 del gen, que representa el 5-10% de las mutaciones de EGFR, induce resistencia a los inhibidores de EGFR de primera generación (Greulich et al., 2005; Naidoo et al., 2015). Actualmente, inhibidores dirigidos contra estas inserciones del exón 20 se encuentran en ensayos clínicos (NCT02716116). Resultados similares se han descrito para la mutación *EGFR T790M*. Esta mutación puede estar presente en una subpoblación de células tumorales antes del tratamiento, que puede seleccionarse durante la terapia con gefitinib y erlotinib, generando resistencia (Inukai et al., 2006; Arcila et al., 2012). Además, esta mutación también se ha encontrado en el 60% de muestras de pacientes con resistencia adquirida a los inhibidores de EGFR de primera generación (Rekhtman et al., 2013; Yu et al., 2013). La aparición

de esta mutación durante el tratamiento, es un ejemplo de deriva oncogénica y demuestra la adicción que presentan algunos tipos tumorales por la vía de EGFR. La mutación *EGFR T790M* aumenta cinco veces la afinidad del receptor por el ATP, lo que provoca una reducción de la sensibilidad a los inhibidores reversibles de EGFR de primera generación (Yun et al., 2008). El tratamiento con TKIs irreversibles de segunda generación, como el afatinib, consigue reducir la aparición de esta mutación a un 36-48% de los pacientes tratados (Tsai et al., 2013; Wu et al., 2014).

Para tratar a los pacientes que han desarrollado resistencia a los fármacos de primera y segunda generación, se han desarrollado fármacos de tercera generación, como el osimertinib. Este inhibidor se une irreversiblemente al dominio quinasa de EGFR, ejerciendo su actividad sobre las células que presentan mutaciones activadoras en EGFR, así como las que presentan la mutación T790M. Sin embargo, no actúa sobre los receptores no mutados. El uso del osimertinib ha resultado tener buenos resultados en un ensayo clínico de fase III en pacientes con NSCLC con EGFR mutado (delección en exón 19 o mutación L858R) sin otro tratamiento previo (Soria et al., 2017). Sin embargo, las células tumorales desarrollan mecanismos para vencer la inhibición ejercida por el osimertinib. La adquisición de una nueva mutación (C797S) en el sitio de unión del fármaco confiere resistencia. Por otra, se han descrito la pérdida de la mutación *EGFR T790M* y la amplificación de EGFR no mutado en muestras de pacientes resistentes a inhibidores de tercera generación (AZD9291) (Thress et al., 2016).

Otras mutaciones secundarias que confieren resistencia a inhibidores de EGFR con mucha menos frecuencia son las mutaciones G796S, G796R, L718Q, T854A, D761Y, L747S y L792F/H (Balak et al., 2006; Bean et al., 2008; Hayashi et al., 2017; Miller et al., 2017). En pacientes con CRC, la adquisición de las mutaciones de S492R, G465R y G465E en el exón 12, que codifica para el dominio extracelular de EGFR, están asociadas a resistencia a cetuximab. Curiosamente, la mutación S429R impide la unión del cetuximab al EGFR, pero no inhibe la unión del panitumumab a diferentes aminoácidos del receptor (Montagut et al., 2012; Bertotti et al., 2015).

Finalmente, se ha descrito que una variante de EGFR llamada EGFRvIII, que carece de una parte del dominio extracelular (región que comprendida entre el exón 2 y 7 del gen) (Kawamoto et al., 2015), es la mutación más prevalente en GBM (Brennan et al., 2013) y también se encuentra en cáncer de mama, pulmón, ovario y próstata (Moscatello et al., 1995; Okamoto et al., 2003). En ensayos clínicos, se ha mostrado que esta variante se encuentra en aproximadamente el 40% de los casos de HNSCC y confiere resistencia al cetuximab (Sok et al., 2006).

4.3.2. Mecanismos independientes de EGFR

De forma similar a lo descrito en el la sección 4.2, la activación de vías alternativas conduce al desarrollo de resistencia a las terapias contra EGFR. La desregulación de otros receptores tirosina quinasa o la activación anormal de efectores *downstream* pueden compensar la inhibición de EGFR (Tabla 3) (Figura 10).

Mecanismo	Pulmón (EGFR TKIs)	Colon (EGFR mAbs)	Cabeza-Cuello (cetuximab)	Mama	GBM/Próstata
Resistencia intrínseca	- Ins. exón 20 EGFR* - Del BIM* - EGFR-T790M*	- KRAS mut* - NRAS mut - PIK3CA mut* - BRAF mut* - Del. PTEN*	- EGFR tansloc. - Clivaje pro TGF- α , AREG		
Resistencia adquirida					
Modificación EGFR	- T790M* - Otras mut - EGFR ampl	- S492R* - G465R/E	- EGFRvIII		- EGFRvIII
Señalización alternativa	- BRAF mut* - PIK3CA mut* - FGFRs - HER2* - HER3 - IGF1R - VEGF - JAK2 - MAPK1 - MET/HGF* - NF- κ B* - Perdida PTEN	- HER2* - HER3 - IGF1 oe* - FGFR1 - PDGFR - KRAS mut* - MET - BRAF mut* - PIK3CA mut - Del. PTEN* - AXL - VEGFR - MEK	- Aurora - HER2 - HER3 - MET - AXL oe - FGFR3-TACC3 - FGFR2/3 activ.	- HER2 - HER3 - MET - PTEN perd	- MET
Transformación histológica	- Adq. <i>stemness</i> - EMT (activ. AXL, Notch-1 o TGF β)* - Transform. SCLC*		EMT (vía activ AXL)		

Tabla 3. Mecanismos de resistencia dependientes e independientes de EGFR. Resumen de los mecanismos de resistencia descritos en diferentes tipos de cáncer tratados con inhibidores de EGFR. * Significa que se ha verificado en pacientes. Fuente: (Oliveras-Ferraro et al., 2012; Chong & Jänne, 2013; Bertotti et al., 2015; Daly et al., 2017; Rotow & Bivona, 2017; Yamaoka et al., 2017; Zhao et al., 2017; Wu et al., 2018; Byeon et al., 2019)

Así, la amplificación de MET, que activa PI3K a través de la transactivación de ErbB3, la sobreexpresión de HGF, la amplificación de ErbB2, la activación de ErbB3, o de IGF1R por la unión de IGF o la reducción de IGFBP (un inhibidor de IGF1), la activación de AXL y la activación de FGFRs son algunos de los mecanismos que impulsan la proliferación e invasión de las células tumorales, la metástasis y la angiogénesis, cuando la vía de EGFR está bloqueada (Wu et al., 2018). Además, la pérdida de PTEN, que inhibe PI3K/AKT, y la activación constitutiva de PIK3CA y BRAF como consecuencia de mutaciones, conducen a la activación de las vías de señalización de AKT y ERK las cuales promueven la proliferación y supervivencia de las células tumorales, generando resistencia a las terapias contra EGFR (Wu et al., 2018). La activación de la vía de FGFR, a través de la inducción de la expresión de receptores y/o de sus ligandos, o la

formación de proteínas de fusión, también ha sido relacionada con la adquisición de resistencia a inhibidores de EGFR en algunos tipos de cáncer (Hallinan et al., 2016) (Tabla 3).

Actualmente hay varios ensayos clínicos que intentan prevenir y/o bloquear la resistencia a inhibidores de EGFR en varios tipos de cáncer mediante tratamientos combinados de fármacos (Wu et al., 2018).

4.3. Resistencia mediada por el microambiente tumoral

Aunque la mayoría de los estudios sobre los mecanismos de resistencia a la terapia dirigida se centran en las células tumorales, no podemos olvidar que el TME puede proteger las células tumorales, y por lo tanto, también podría estar implicado en la adquisición de resistencia. En este sentido, Straussman y colaboradores describieron que los CAFs de melanoma inducen resistencia a los inhibidores de BRAF mediante la secreción de HGF, lo cual, activa MAPK y PIK3, y promueve la supervivencia y la tolerancia al tratamiento. Mecanismos similares se han observado en células de CRC y glioblastoma mutantes para BRAF (Straussman et al., 2012). Por otra parte, las interacciones entre las células estromales y las tumorales estimulan vías alternativas de supervivencia en las células tumorales que les permiten resistir a los efectos citotóxicos de la terapia. Por ejemplo, la integrina $\beta 1$ promueve la supervivencia de las células de cáncer de mama resistentes a lapatinib a través de la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) y SRC, lo cual se revierte con el bloqueo de la integrina $\beta 1$ (Huang et al., 2011). En otro estudio se observó que la inhibición dual de PI3K/mTOR en cultivos de células tumorales en 3D provocaba la muerte por apoptosis de las células sin contacto con la matriz, mientras que las células localizadas externamente y en contacto con la matriz eran resistentes al tratamiento (Muranen et al., 2012), demostrando que la matriz estaba aportando señales de proliferación/supervivencia a las células tumorales (Figura 10).

En conjunto, estos estudios demuestran que las señales derivadas del TME pueden influenciar en la respuesta terapéutica, y sugieren que el bloqueo de la comunicación entre las células tumorales y su microambiente podría ser una estrategia para evitar la resistencia a terapias.

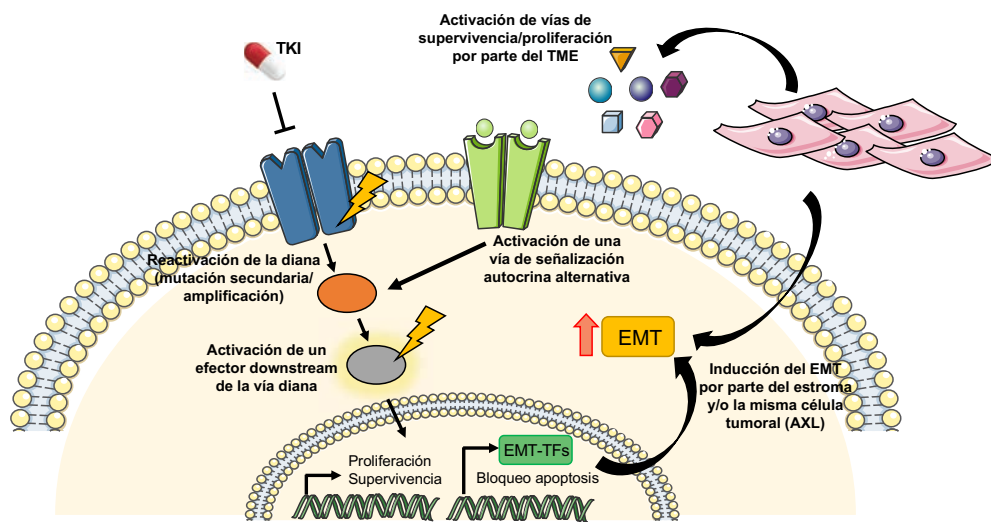


Figura 10. Resumen de los principales mecanismos de resistencia a inhibidores tirosina quinasa

OBJETIVOS

Los estudios realizados por nuestro laboratorio demostraron que las características y los mecanismos que regulan la proliferación y diseminación de las CSCs de los cSCCs de ratón cambian durante la progresión tumoral. Así, la activación autocrina de la vía de EGFR induce la proliferación de estas células en cSCCs que conservan características de diferenciación epitelial (WD-SCCs). Esta vía de señalización se atenúa en las CSCs de los cSCCs avanzados e indiferenciados (PD/S-SCCs), las cuales inducen de forma autocrina las vías de FGFR1 y PDGFR α para promover respectivamente el crecimiento y la metástasis de los cSCCs avanzados. Sin embargo, al inicio de esta tesis doctoral, no se conocía si estos mecanismos regulaban de forma similar el crecimiento y la metástasis de los cSCCs de pacientes, o a través de qué mecanismos la vía de PDGFR α promueve la metástasis.

El objetivo principal de esta tesis es caracterizar los mecanismos moleculares que controlan la proliferación y diseminación de las células tumorales del cSCC, y evaluar qué aproximaciones terapéuticas serían más apropiadas para bloquear el crecimiento tumoral y la metástasis en cada estadio de la progresión tumoral.

Los objetivos concretos de esta tesis son:

- 1.- Análisis de las características epiteliales/mesenquimales y la expresión de receptores de las familias de EGFR, FGFR y PDGFR y de sus ligandos en las células tumorales de los cSCCs de pacientes en diferentes estadios de progresión.
- 2.- Generación y caracterización molecular de cultivos primarios de células tumorales y de modelos de ratón (*patient-derived xenograft*, PDX) derivados de muestras de pacientes de cSCCs en diferentes estadios de progresión.
- 3.- Estudio del efecto de la inhibición de EGFR en el crecimiento de los cSCCs de tipo epitelial de pacientes (MD/PD-SCC o G2/G3-SCC) y los mecanismos implicados en la adquisición de resistencia a esta terapia.
- 4.- Determinar los mecanismos implicados en la invasión de las células tumorales y en el desarrollo de metástasis inducida por la vía de PDGFR α en los cSCCs avanzados de ratón y de pacientes.

RESULTADOS

Por la presente, certifico que el doctorando **ADRIÀ BERNAT PEGUERA** presentará la Tesis Doctoral en forma de compendio de tres artículos. Su contribución a cada uno de estos artículos se indica a continuación:

ARTÍCULO 1: Victoria da Silva-Diz, Pilar Simón-Extremera*, **Adrià Bernat-Peguera***, Jana de Sostoa, Maria Urpí, Rosa M. Penín, Diana Pérez Sidelnikova, Oriol Bermejo, Joan Maria Viñals, Annie Rodolose, Eva González-Suárez, Antonio Gómez Moruno, Miguel Ángel Pujana, Manel Esteller, Alberto Villanueva, Francesc Viñals, and Purificación Muñoz.

* ambos autores contribuyeron igualmente

TÍTULO: Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression

REVISTA: Cancer Res. 2016; 76(5):1245–59. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1631. Factor de impacto: 9.122 (2016)

Adrià Bernat contribuyó en una gran parte de los experimentos descritos en este artículo, en colaboración con Dra. Victoria da Silva y Dra. Pilar Simón, y fue responsable del diseño y desarrollo de todos los ensayos relacionado con las muestras de cSCCs de pacientes. Adrià analizó e interpretó los resultados, junto con la Dra. Purificación Muñoz, y participó en las discusiones científicas, escritura y revisión final del artículo.

ARTÍCULO 2: **Adrià Bernat-Peguera**, Juan Navarro-Ventura, Victoria da Silva-Diz, Laura Lorenzo-Sanz, Rosa M. Penin, Mattia Bossio, Diana Pérez Sidelnikova, Oriol Bermejo, Joan Maria Viñals, Eva González-Suárez, Salvador Capella-Gutierrez, Alberto Villanueva, Francesc Viñals and Purificación Muñoz

TÍTULO: EGFR-targeted therapy blocks epithelial-like cutaneous carcinoma growth and FGFR signaling activation leads to therapy resistance

REVISTA: Manuscrito pendiente de publicación

Adrià Bernat ha contribuido activamente en la concepción y diseño experimental de este artículo. Ha sido responsable del desarrollo de la mayor parte de los experimentos relacionados con este estudio, así como del análisis y discusión de los resultados, bajo la supervisión de la Dra. Purificación Muñoz. Además, participó en la escritura y revisión del manuscrito.

ARTÍCULO 3: Adrià Bernat-Peguera, Pilar Simón-Extremera*, Victoria da Silva-Diz*, Mikel López de Munain, Laura Díaz-Gil, Rosa M. Penin, Eva González-Suárez, Diana Pérez Sidelnikova, Oriol Bermejo, Joan Maria Viñals, Francesc Viñals, Purificación Muñoz.

* ambos autores contribuyeron igualmente

TÍTULO: PDGFR-induced autocrine SDF-1 signaling in cancer cells promotes metastasis in advanced skin carcinoma

REVISTA: Oncogene 2019; 38(25):5021-5037. doi: 10.1038/s41388-019-0773-y. Factor de impacto: 6.854 (2019)

En este artículo, Adrià Bernat fue responsable del desarrollo de la mayor parte de los experimentos relacionados con este estudio, así como del análisis y discusión de los resultados, en colaboración con la Dra. Pilar Simón y Dra. Victoria da Silva, bajo la dirección de la Dra. Purificación Muñoz. Adrià participó además en la escritura y revisión del manuscrito, hasta su publicación.

Y para que así conste a todos los efectos firmo la presente en L'Hospitalet de Llobregat, 25 de Junio de 2019

Purificación Muñoz, Ph.D.
Coordinadora del Grupo de Envejecimiento y Cáncer
Programa Oncobell
Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL)
Avda. Gran Vía de L'Hospitalet, 199-203
08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona
Telf: +34 932607139
e-mail: p.munoz@idibell.cat

ARTÍCULO 1: Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression

Victoria da Silva-Diz¹, Pilar Simón-Extremera¹, **Adrià Bernat-Peguera**¹, Jana de Sostoa¹, Maria Uрпи¹, Rosa M. Penín², Diana Pérez Sidelnikova³, Oriol Bermejo³, Joan Maria Viñals³, Annie Rodolosse⁴, Eva González-Suárez¹, Antonio Gómez Moruno¹, Miguel Ángel Pujana⁵, Manel Esteller^{1,6,7}, Alberto Villanueva⁵, Francesc Viñals^{5,6,7}, and Purificación Muñoz¹

Pilar Simón-Extremera and Adrià Bernat-Peguera contributed equally to this article

1. Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain. 2. Pathology Service, Hospital Universitario de Bellvitge/IDIBELL, Barcelona, Spain. 3. Plastic Surgery Unit, Hospital Universitario de Bellvitge/IDIBELL, Barcelona, Spain. 4. Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona, Spain. 5. Laboratory of Translational Research, Catalan Institute of Oncology (ICO/IDIBELL), Barcelona, Spain. 6. Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain. 7. Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain.

Cancer Research. Published Online First December 30, 2015; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1631. *Cancer Res*; 76(5); 1245–59. © 2015 AACR.

RESUMEN EN CASTELLANO

Diferentes estudios han demostrado que en la mayor parte de los tumores, incluyendo los carcinomas escamosos de piel (cSCCs), existe una población de células tumorales, llamadas células madre del cáncer (CSCs), que son responsables de mantener el crecimiento tumoral a largo plazo y del desarrollo de metástasis. Sin embargo, se desconoce si las características de esta población de células cambian durante la progresión de los cSCCs. El principal objetivo de este trabajo es identificar alteraciones moleculares y funcionales de las CSCs que serían responsables de la mayor malignidad y desarrollo de metástasis asociada a la progresión del cSCC. Para ello, se han generado modelos de progresión de cSCCs, mediante el implante seriado de tumores generados en los ratones K14-HPV16 (espontáneos o inducidos por DMBA/TPA), en ratones inmunodeficientes. La caracterización de los diferentes linajes de progresión obtenidos demuestra que los tumores más avanzados e indiferenciados (PD/S-SCCs), se generan a partir de la progresión maligna de los SCC bien diferenciados y que exhiben características epiteliales (WD-SCCs). Durante este proceso, se produce un aumento dramático de la frecuencia de CSCs y una robusta inducción del programa de transición epitelio mesénquima (EMT), que correlacionan con el crecimiento agresivo y la mayor capacidad metastásica que presentan los PD/S-SCCs. La caracterización de las CSCs aisladas de los WD-SCCs (E-CSCs) y de los PD/S-SCCs (L-CSCs) demuestra que, a diferencia de las E-CSCs, las L-CSCs pierden características de diferenciación epitelial. Además, los mecanismos que regulan la proliferación/supervivencia y la diseminación de las CSCs cambian durante la progresión. Así, las E-CSCs presentan activada la vía de β -catenina e inducen de forma autocrina la vía de EGFR, la cual promueve la proliferación y supervivencia de estas células. Sin embargo, estas vías se atenúan en las L-CSCs, las cuales, a su vez inducen de forma autocrina las vías de FGFR1 y PDGFR α . La activación de la vía de FGFR1 promueve la proliferación/supervivencia de las L-CSCs y el crecimiento agresivo de los PD/S-SCCs, mientras que la vía de PDGFR α induce la invasión de las L-CSCs y la generación de metástasis en los PD/S-SCCs. El análisis de muestras de SCCs de piel de pacientes de diferentes estadios de progresión muestra que los cSCCs más avanzados y recurrentes presentan una expansión de una población de células tumorales CD44⁺ con características CSCs, una fuerte inducción del programa de EMT e inducen la expresión de PDGFR α/β y FGFR1. Por el contrario, la expresión de estos genes está atenuada en los WD/MD-SCCs de pacientes, los cuales presentan una fuerte expresión de EGFR y sus ligandos.

Por lo tanto, estos resultados sugieren, que similarmente a lo descrito en los cSCCs de ratón, las vías de FGFR y PDGFR podrían jugar un papel importante promoviendo el crecimiento y la metástasis de los cSCCs avanzados e indiferenciados de pacientes, y la utilización de inhibidores de estos receptores sería una buena aproximación terapéutica para bloquear el crecimiento agresivo, la recurrencia y el desarrollo de metástasis de los PD/S-SCCs de pacientes.

ABSTRACT

Cancer stem-like cells (CSC) play key roles in long-term tumor propagation and metastasis, but their dynamics during disease progression are not understood. Tumor relapse in patients with initially excised skin squamous cell carcinomas (SCC) is characterized by increased metastatic potential, and SCC progression is associated with an expansion of CSC. Here, we used genetically and chemically-induced mouse models of skin SCC to investigate the signaling pathways contributing to CSC function during disease progression. We found that CSC regulatory mechanisms change in advanced SCC, correlating with aggressive tumor growth and enhanced metastasis. β -Catenin and EGFR signaling, induced in early SCC CSC, were downregulated in advanced SCC. Instead, autocrine FGFR1 and PDGFR α signaling, which have not been previously associated with skin SCC CSC, were upregulated in late CSC and promoted tumor growth and metastasis, respectively. Finally, high-grade and recurrent human skin SCC recapitulated the signaling changes observed in advanced mouse SCC. Collectively, our findings suggest a stage-specific switch in CSC regulation during disease progression that could be therapeutically exploited by targeting the PDGFR and FGFR1 pathways to block relapse and metastasis of advanced human skin SCC.

INTRODUCTION

Skin squamous cell carcinoma (SCC) is the second most common nonmelanoma skin cancer in humans. Eight percent to 10% of patients suffer tumor relapse after surgical excision, which is associated with an enhanced propensity to metastasize and with poor survival (1). SCC development in humans and mice is a multistage process ending in the generation of invasive tumors (2). Most invasive tumors conserve some epithelial traits and are considered to be well-differentiated SCCs (WD-SCCs). However, some tumors have poorly differentiated features (PD-SCCs) and are eventually spindle-shaped, these traits being associated with enhanced recurrence and metastasis (1, 3). Currently, advanced and metastatic skin SCCs are mostly treated with radiotherapy or classical chemotherapy, which have limited clinical benefits (4). Furthermore, the mechanisms that control SCC growth and metastasis at different stages of progression remain unclear, limiting the possibilities for targeted therapy.

Solid tumors may be hierarchically organized and contain cancer stem cells (CSC), which drive long-term tumor growth and disease progression (5, 6) and are responsible for relapse after therapy (7, 8). CSCs are also the most likely candidates for metastasis-initiating activities, as they may induce epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which promotes tumor cell migration (9, 10). Mouse skin SCC cells expressing CD34 and $\alpha 6$ -integrin are enriched in tumor-initiating and long-term tumor-propagating cells compared with the bulk of tumor cells, and they are able to recapitulate the phenotypic cell diversity of parental tumors in engraftment assays (11, 12). Sox2 expression is induced in CSCs of SCCs to promote CSC self-renewal and skin SCC growth (13, 14). Wnt/ β -catenin, TGF β , and VEGF signaling pathways regulate CD34⁺-CSC features at early stages of progression (11, 15, 16). Moreover, skin SCC progression is associated with an expansion of the CD34⁺-CSC population (12, 16). However, it is not known whether signaling pathways regulating CSC function switch during progression. In this study, we demonstrate that CSC features and regulatory mechanisms change during late stages of skin SCC progression to promote aggressive tumor growth and metastasis.

MATERIALS AND METHODS

Mouse models

K14-HPV16^{Tg/+} mice (FVB/C57/Bl6 F1; ref. 17) were used as models of SCC development. K14-HPV16^{Tg/+} mice were treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (DMBA/TPA), as previously described (18). To generate ortho-SCC (OT-SCC) lineages, small pieces of spontaneous or DMBA/TPA-induced tumor (2-4 mm³) were implanted in the back skin of nude mice (Harlan Laboratories). Tumor sizes were measured every week ($V = \pi/6 \times L \times W^2$). When they reached a critical size, they were surgically excised and a small piece was serially engrafted in each new immunodeficient mouse. Resected mice were checked daily until they presented symptoms of poor health, where upon they were sacrificed and checked for the presence of metastatic lesions. Animal housing, handling, and all procedures involving mice were approved by the Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL) Ethics Committee (Barcelona, Spain), in accordance with the Spanish national regulations.

Human skin SCC samples

Samples of human skin SCCs were supplied by the Plastic Surgery and Pathology Units of the Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL, Barcelona Spain) and the Spanish Hospital Platform Biobank Network (RetBioH; www.redbiobancos.es). The protocol of sample collection was supervised and approved by the Ethical Committee of Clinical Research of Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL). All patients were informed beforehand and their signed consent to participate was obtained.

Isolation of SCC cells and flow cytometry analysis

Tumor cells were isolated from SCC and analyzed for flow cytometry as previously described (19). For detailed protocols, see Supplementary Methods.

Cell cultures and treatments

Tumor cells (hematopoietic lineage and endothelial-negative cells) isolated from PD/S-SCCs (PD/S cells) were grown in basic medium composed of DMEM-F12 medium (Gibco, Life Technologies) with B27 (Gibco, Life Technologies) and penicillin/streptomycin (PAA Laboratories) in a humidified 37 °C, 5% CO₂ incubator. Tumor cells isolated from WD-SCCs (WD cells), were grown in basic medium with EGF (20 ng/mL; Sigma). Protocols for determining cell proliferation and lentiviral transduction are described in detail in Supplementary Methods.

Tumor cell grafting and *in vivo* treatments

To limiting dilution assays, tumor cells isolated from WD-SCCs and PD/S-SCCs were serially diluted, mixed with 1×10^6 newborn dermal fibroblasts, and subcutaneously injected in nude mice (Harlan Laboratories). Tumor growth was monitored for 8 to 12 weeks. The tumor-initiating cell frequency was calculated using ELDA software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda>). A similar frequency of tumor-initiating cells was obtained when Matrigel (BD Biosciences) was coinjected with tumor cells (1:1 v/v) instead of dermal fibroblasts (data not shown). To determine the effect of PDGFR α knockdown on tumor growth and metastasis, 4×10^3 sh-control and sh-PDGFR α PD/S cells were subcutaneously injected in immunodeficient mice, as described above. Tumors were excised when they reached a critical size, and the mice were sacrificed 20 days later. Lungs were recovered to quantify metastasis lesions. For pharmacologic inhibition of FGFR1 and PDGFR α , mice carrying orthotopically engrafted PD/S-SCCs were randomly assigned to a control or inhibitor treatment group. Imatinib (150 mg/kg; diluted in water; LC Laboratories) was orally administrated daily, and PD173074 (25 mg/kg; diluted in 50 mmol/L lactic acid; LC Laboratories) was daily intraperitoneally injected. Control groups were treated with the respective vehicle. OT-SCCs were excised, and resected mice were treated with their respective control or inhibitor solution and sacrificed 8 to 10 days later. Lungs and other organs were collected for the assessment of metastasis development.

***In vitro* invasion assays**

Invasion assays were performed in CIM-16 plates (ACEA Biosciences) coated with 5% Matrigel (Factor-Reduced; BD Biosciences). Bottom chamber wells with DMEM 10% FBS and top chamber wells with serum-free medium were assembled and equilibrated for 1 hour at 37 °C. PD/S cells (8×10^4), previously treated without (control) or with imatinib (4 μ mol/L) for 48 hours, and sh-control and PDGFR α -knockdown PD/S cells were seeded onto the top chamber and placed in the xCELLigence system. The cell index represents the capacity for cell invasion. In addition, sh-control, PDGFR α knockdown, and PD/S cells treated for 48 hours with different doses of imatinib were included in Matrigel and seeded in replicates on previously Matrigel-coated 96-well plates with 100 μ L of basic medium without or with imatinib. Images were captured 24 hours later using an inverted phase microscope, and spheres containing ≥ 4 invasion structures longer than 25 μ m were quantified.

Histology, IHC, and immunoblotting assays

Tumor samples were fixed in 4% formaldehyde overnight at 4 °C, paraffin-embedded, and sectioned at 4 µm. For immunofluorescence or immunohistochemical staining, we followed the protocols previously described in ref. 19. Whole-cell extracts for Western blot assays were prepared from tumors and isolated cells as previously described (see Supplementary Methods; ref. 20).

Reverse transcription, qPCR, and microarray analysis

Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen), and reverse transcription and qPCR were carried out as previously described (see Supplementary Methods; ref. 19). cDNA amplification by picoprofiling was performed as previously described (21). Seven micrograms cDNA was used for hybridization in an Affymetrix Mouse Genome 430 PM Strip Array. Data array analyses are described in Supplementary Methods.

Sequencing analysis

Mutations in Hras (Q61L) and Kras (G12V, G12A, G12D, G13R, G13D, Q61L, and Q61H) were analyzed by pyrosequencing assays. The set of primers for PCR amplification and sequencing were designed with PyroMark Assay Design Software (Qiagen). PCR products were pyrosequenced and allele mutations were quantified with the Pyromark Q24 System (Qiagen), following the manufacturer's instructions.

Accession number

The gene expression data described in this study have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database under accession number GSE59439.

RESULTS

Generation and characterization of lineages of skin SCC progression

To determine whether the aggressive growth and enhanced metastasis of advanced SCCs are associated with changes in CSC features, we generated mouse models of skin SCC progression based on tumors developed in K14-HPV16 mice. K14-HPV16 mice express E6 and E7 oncoproteins from the HPV16 papillomavirus in basal keratinocytes, and 30% of them develop spontaneous SCCs during their first year (3, 19), 27% of which were undifferentiated and/or spindle tumors. To promote SCC development, these mice were treated with DMBA/TPA. At the end of the treatment, all mice developed multiple invasive SCCs, most of them showing epithelial traits, while spindle-shaped tumors were more infrequent (4.65%), as previously reported in other

mouse strains (22). Single small pieces from several SCC samples (spontaneous or DMBA/TPA-induced) were orthotopically grafted onto the back skin of nude mice. Samples of each OT-SCCs were serially engrafted in nude mice over several passages, generating SCC lineages (Supplementary Table S1). After the first engraftment, OT-SCCs recapitulated the histopathologic features of the parental tumors (Supplementary Fig. S1A). However, after serial engraftments, 62.5% of the WD-SCCs showing epithelial differentiation features (tumor cells organized in nests containing keratin pearls) progressed to moderated SCCs (MD-SCC), which evolved to PD-SCCs that frequently contained focal spindle regions, and finally to mesenchymal-shaped spindle tumors, in which the epithelial phenotype was completely lost (Supplementary Fig. S1A; Supplementary Table S1). Therefore, PD and spindle SCCs can be generated by the malignant advance of WD-SCCs.

K14 expression was strongly reduced and K8 expression was upregulated in PD-SCCs and spindle tumors (Supplementary Figs. S1C and S1D; (3)). On the basis of keratin expression and histopathologic features, SCCs from each lineage were classified as WD-SCCs or PD and spindle SCCs (PD/S-SCCs). PD/S-SCCs grew significantly faster than their respective WD-SCC precursors in all tumor lineages (Supplementary Fig. S1E). Nude mice carrying PD/S-SCCs showed reduced survival due to more frequent lower-latency metastasis occurring mainly in the lungs and occasionally in regional lymph nodes, kidney, and liver (Supplementary Figs. S1F–S1H).

Analysis of *Ras* genes showed that *Hras* was frequently mutated in primary DMBA/TPA-induced SCCs (*Hras* Q61L; 75% of tumors; refs. 23, 24). This mutation was infrequent in spontaneous SCCs, but 57.14% of them instead exhibited a distinct percentage of alleles with activating mutations in the *Kras* gene (G13R, G12A, G12D, and Q61L; Supplementary Fig. S1B; ref. 25). The intratumor genetic heterogeneity was frequently maintained in the respective OT-SCCs (data not shown), and some WD-SCCs (OT14 lineage) were able to progress to PD/S-SCCs in the absence of previously described *Hras*- or *Kras*-activating mutations.

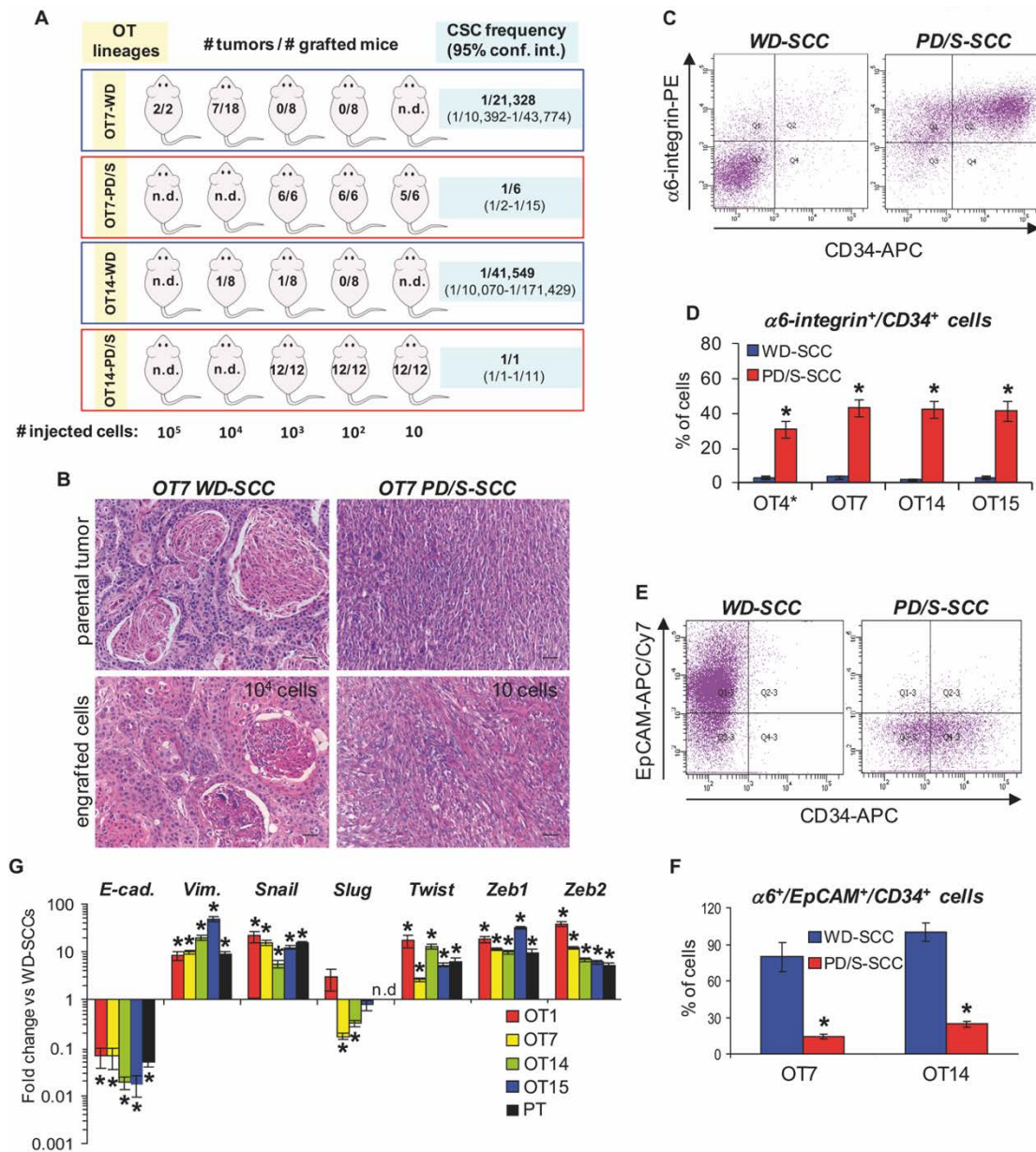


Figure 1. Strong induction of EMT and expansion of CSCs is observed in advanced SCCs of different lineages of progression. **A**, serial dilutions of tumor cells isolated from WD-SCCs and PD/S-SCCs from the indicated lineages (OT) were injected into immunodeficient mice (6-18 mice per dilution). The number of mice developing tumors, frequency of CSCs, and confidence intervals (conf. int.) for each condition is shown (n.d., not determined). **B**, representative images showing histopathologic features of parental and regenerated tumors after the engraftment of the indicated number of tumor cells. Scale bar, 30 μ m. **C** and **D**, quantification of α 6-integrin⁺/CD34⁺ cells in OT WD-SCCs and PD/S-SCCs by flow cytometry. **D**, means (\pm SE) of the percentages of α 6-integrin⁺/CD34⁺ cells in the indicated tumors. OT4* is SCC lineage derived from a spontaneous WD-SCC. **E** and **F**, mean \pm SE of the percentages of α 6-integrin⁺/EpCAM⁺/CD34⁺ cells in WD-SCCs and PD/S-SCCs (6-8 tumors per group), as quantified by flow cytometry. **G**, qRT-PCR results showing the levels (mean \pm SE) of the indicated mRNAs in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs (six samples per group) in different lineages (OT) and in primary SCCs (PT) spontaneously developed in K14-HPV16 mice (four samples per group). *, significant differences between WD-SCCs and PD/S-SCCs (*t*-test; *P* < 0.05). E-cad., E-cadherin; Vim., vimentin.

Limiting dilution assays showed that the frequency of tumor-initiating cells was dramatically increased in OT7 and OT14 PD/S-SCCs compared with their WD-SCC precursors (Fig. 1A). SCCs with an epithelial and mesenchymal phenotype were respectively generated by tumor-initiating cells of parental WD-SCCs and PD/S-SCCs (Fig. 1B), suggesting that tumor-initiating cells of WD-SCCs, but not those of PD/S-SCCs, retained the ability to differentiate into an epithelial shape. As reported in other mouse models (11, 12), $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells (hematopoietic and endothelial lineage negative cells) isolated from orthotopic WD-SCCs were significantly enriched in tumor-initiating cells relative to $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻ cells or to the overall tumor cell population (Fig. 1A and Supplementary Fig. S2A). Moreover, tumors derived from PD/S-SCC $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ grew significantly faster than tumors generated from WD-SCC $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells (Supplementary Fig. S2B). These results indicate that the ability of CD34⁺-CSCs to promote tumor growth changes significantly during progression. Although a similar tumor-initiating capability and impaired epithelial differentiation was observed in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ and $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻ cells isolated from PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S2A; data not shown), previous reports demonstrated that, in contrast to CD34⁻ cells, CD34⁺-CSCs present long-term self-renewal capability in advanced SCCs and are considered as long-term tumor-propagating cells (12). Therefore, we compared the frequency and molecular features of the $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells from advanced tumors and from their respective WD-SCC precursors. We found that PD/S-SCCs of different lineages, derived from spontaneous or DMBA/TPA-induced WD-SCCs, showed a significant increase in the percentage of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells as compared with their respective precursors (Fig. 1C and D). A similar expansion in this cell population was observed in spontaneous PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S2C).

In accordance with the loss of epithelial traits, the expression of the EpCAM epithelial marker was significantly downregulated in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells of PD/S-SCCs (Fig. 1E and F and Supplementary Fig. S2C), implying that CSC features change during tumor progression. In addition, diminished expression of *Cdh1* (E-cadherin), and upregulation of *vimentin* and the EMT inducer transcription factors *Snail*, *Twist*, *Zeb1*, and *Zeb2* were detected in PD/S-SCCs from different lineages and in spontaneous PD/S-SCCs (Fig. 1G and Supplementary Figs. S2D and S2E), as reported in other mouse models (22). Thus, an expansion of CSCs and robust induction of EMT occur during OT-SCC progression, along with a switch from epithelial-to-mesenchymal features and enhanced metastasis capability.

It is important to highlight that the tumors that did not progress to PD/S-SCC during serial engraftment did not exhibit an expansion of CSCs or further induction of EMT (OT9 in Supplementary Fig. S2F), indicating that these events are not a consequence of long-term growth

in immunodeficient mice. These results validate the OT-SCC lineages as models for characterizing CSC alterations during tumor progression.

$\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ CSC features change during SCC progression

To determine whether alterations in features of CSCs can contribute to tumor progression, we compared the global gene expression profiles of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells isolated from PD/S-SCCs (late CSC, L-CSC) and their respective precursor WD-SCCs (early CSC, E-CSC) from different lineages. This analysis revealed 1,839 genes differentially expressed (by 2-fold or more; FDR < 5%) in L-CSCs compared with E-CSCs, giving rise to a gene signature for CSCs in advanced and mesenchymal SCCs (Fig. 2A; Supplementary Table S2). Genes overexpressed in this signature were mainly those associated with proliferation, morphogenesis, negative regulation of apoptosis, cytoskeleton organization, motility, and metastasis, whereas underexpressed genes were linked to cell differentiation, cell adhesion, and tight junction maintenance (Fig. 2B–D). *Sox2*, *Hmgn3*, and *Gas1* stem cell markers were overexpressed, whereas *Cdh3* (P-cadherin) was underexpressed in L-CSCs compared with E-CSCs. *Krt15* and *Lgr5* was undetectable in both populations of CSCs (Fig. 2B and D). In addition, E-cadherin expression was strongly downregulated and *vimentin*, *Twist*, and *Axl* significantly overexpressed in L-CSCs, indicating that stemness and EMT were enhanced in these CSCs relative to E-CSCs. The overexpression of self-renewal-promoting genes and the underexpression of differentiation-related genes (Fig. 2D), together with the impaired differentiation capability of tumor-initiating cells of advanced tumors, suggest that an imbalance between self-renewal and differentiation is produced in CSCs during late stages of progression. Some of the altered genes described in this signature were also similarly deregulated in unrelated skin PD-SCCs, as unsupervised clustering correctly identified skin SCCs with an EMT-like status in other mouse SCC models (Fig. 2E; ref. 22). Indeed, a large subset of genes overexpressed in L-CSCs (536/1,259 genes) and in E-CSCs (362/578 genes) was also upregulated in EMT-like SCCs and in epithelial like SCCs, respectively, in this DMBA/TPA-induced SCC model (Fig. 2F).

Furthermore, the expression of key factors related to WNT, FGFR, PDGFR, and EGFR pathways, which were previously associated with progression in other tumor types (26–28), was also significantly altered in our L-CSC signature (Fig. 2B). This suggests that alterations in these pathways may be associated with CSC expansion, aggressive tumor growth, and metastasis in advanced SCCs

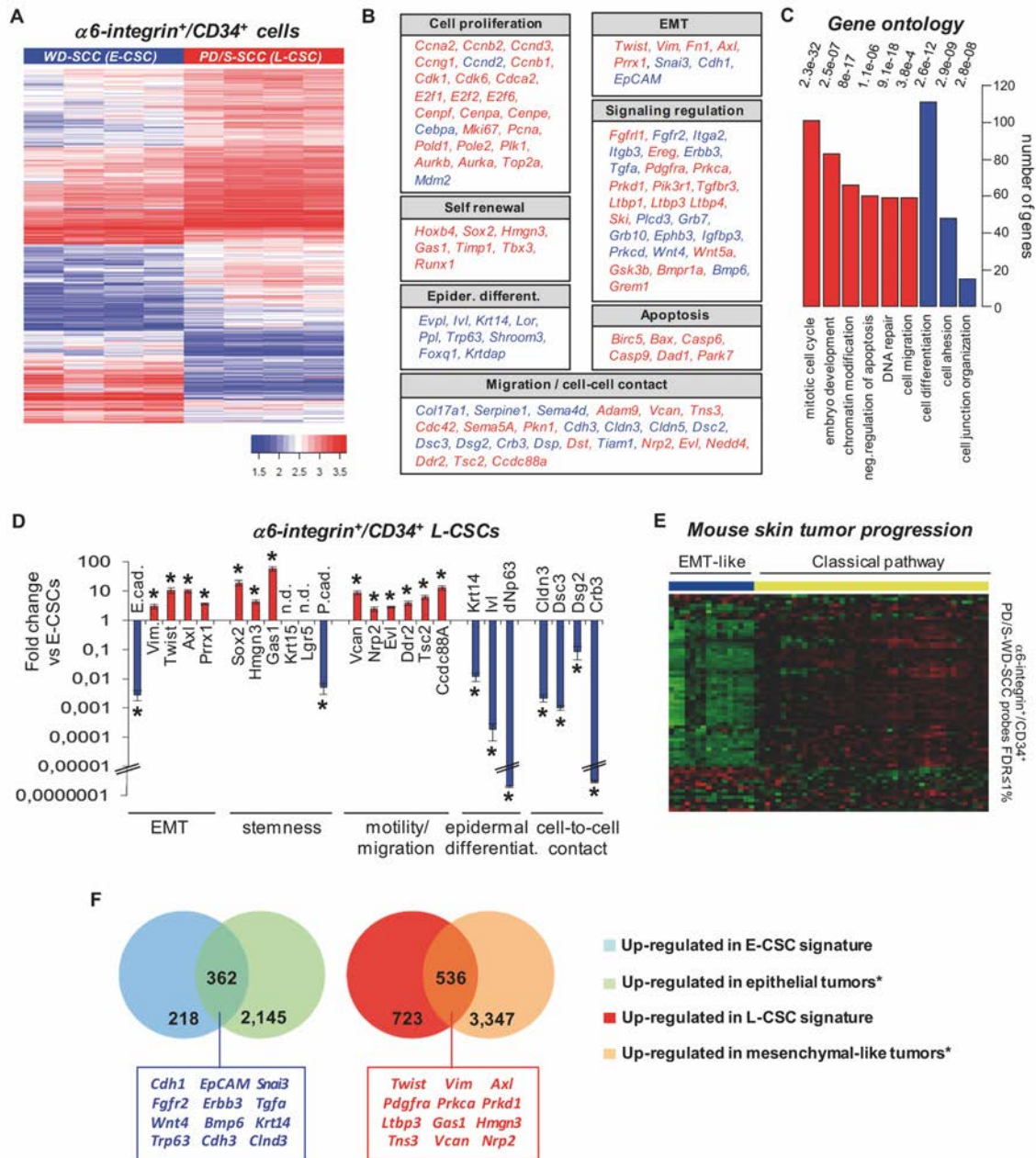


Figure 2. CSC gene signature changes during SCC progression. **A**, hierarchical gene-cluster analysis of genes differentially expressed (\log_2 FC ≥ 1 ; FDR $P < 0.05$) between $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ CSCs of PD/S-SCCs (L-CSC) and their respective WD-SCC precursors (E-CSC; four CSC samples per group) from three lineages. **B**, selected set of genes overexpressed (red) or underexpressed (blue) in L-CSCs relative to E-CSCs. **C**, gene ontology enrichment analysis of genes differentially expressed in L-CSCs compared with E-CSCs. **D**, mean (\pm SE) mRNA levels relative to *Gapdh* expression of the indicated genes in L-CSCs and E-CSCs (three samples per group). n.d., the expression of these genes was not detected in E-CSCs or L-CSCs. *, significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$). **E**, heatmap representation of differentially expressed genes in L-CSCs that identify genes in the previously reported EMT-like mouse SCC signature (22). **F**, Venn diagrams showing the overlap of genes from the L-CSC signature and those associated with epithelial-like SCCs and mesenchymal-like SCCs (22). A selected number of these overlapping genes is indicated.

β -Catenin signaling is downregulated in advanced skin SCCs

β -Catenin signaling is essential for sustaining CSC features in the early stages of skin SCCs (11), therefore we compared β -catenin expression in WD-SCCs and PD/S-SCCs. Most epithelial cells showed β -catenin labeling at the cell surface and more than 25% showed β -catenin nuclear staining in WD-SCCs (Fig. 3A and B). In contrast, there was considerable reduction of β -catenin overall and of its active form (non-phosphorylated Ser37/Thr41) in the respective PD/S-SCCs (Fig. 3C). Moreover, β -catenin transcriptional activity was analyzed by transducing tumor cells isolated from early and advanced SCCs (Supplementary Figs. S3A–S3C) with a β -catenin reporter construct (29). WD-SCCs and PD/S-SCCs were regenerated by engrafting transduced WD and PD cells into nude mice. We detected a subset of EGFP-expressing cells with β -catenin transcriptional activity at the base of the nest in WD-SCCs (Fig. 3D), where CD34⁺-CSCs reside (11, 15, 16). However, EGFP-expressing cells were absent from PD/S-SCCs (Fig. 3D). Therefore, although β -catenin activity plays an important role in SCC generation and growth in early SCCs, this pathway is switched off in advanced SCCs.

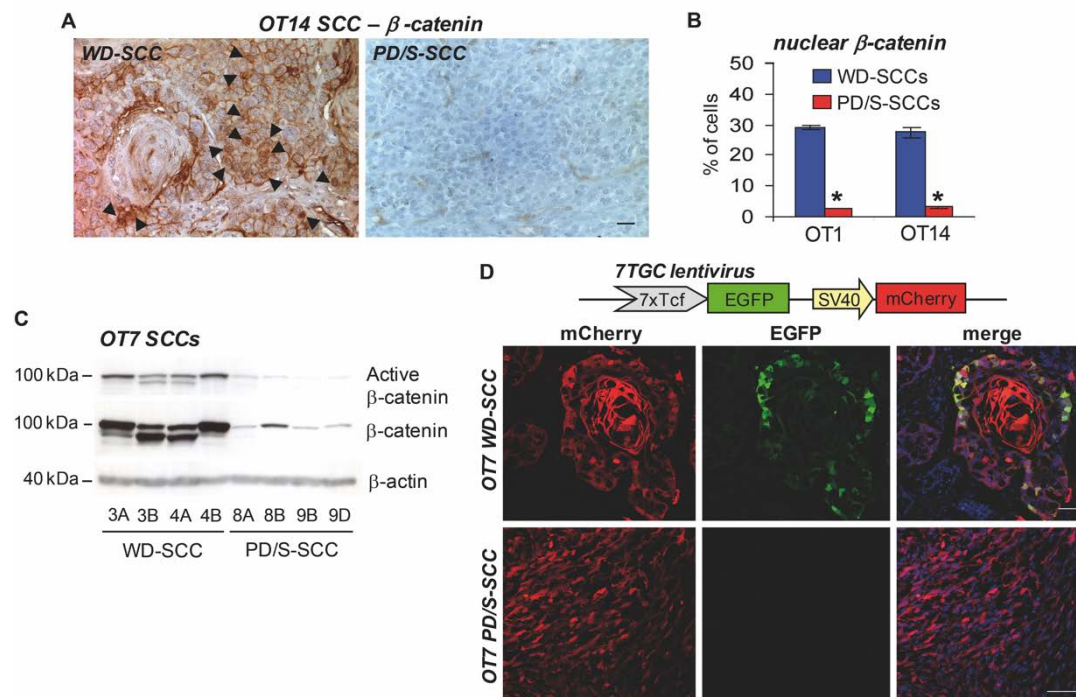


Figure 3. β -Catenin signaling is attenuated during late stages of SCC progression. **A**, β -catenin cell localization by IHC assays. Arrowheads, cells with β -catenin at nuclei. Scale bar, 30 μ m. **B**, quantification of cells (mean \pm SE; three samples per group) with β -catenin at nuclei in WD-SCCs and PD/S-SCCs of the indicated lineage. **C**, levels of β -catenin and its active form in WD-SCCs and PD/S-SCCs. β -Actin was used as a protein-loading control. Sample number identifies tumor passage and letters indicate independent tumor replicates. **D**, top, schema of the construct used to determine β -catenin transcriptional activity; bottom, representative images showing transduced cells (red) and cells with induced β -catenin signaling (green cells) in WD-SCCs and PD/S-SCCs. Scale bar, 30 μ m.

EGFR signaling is downregulated in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs of advanced SCCs

We investigated the relevance of the receptor tyrosine kinase (RTK)-dependent pathways that were identified in the L-CSC signature to promote tumor progression. EGFR signaling is necessary to maintain the proliferation and survival of basal cell compartment in the early stages of SCCs (30, 31). Previous studies showed that *Egfr* expression is downregulated in advanced SCCs (22). However, whether this pathway regulates CSC proliferation and survival and is altered during progression remains to be determined. Thus, we compared the expression of ErbB receptors and ligands in E-CSCs and L-CSCs isolated from various OT-SCC lineages. The expression of *Egfr*, *ErbB2*, and *ErbB3* receptors, as well as of the *Tgfa*, *Areg*, and *Hbegf* ligands was reduced in L-CSCs from most tumor lineages (Fig. 4A), consistent with the ErbB and ligand expression profiles observed in spontaneous and orthotopically derived PD/S-SCCs (Fig. 4B and C). These results, along with the substantially lower phosphorylated status of EGFR consistently observed in PD/S-SCCs (Fig. 4D), indicate that EGFR signaling is downregulated in advanced SCCs. To determine the role of EGFR signaling in CSC proliferation, we analyzed tumor cells isolated from WD-SCCs and their PD/S-SCC offspring and maintained in culture. Primary WD cells grew as adherent cells and had a typical epithelial shape, whereas PD/S cells grew as spheres (Supplementary Fig. S3A). These primary cultures were enriched in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs (50% and 90% in WD and PD/S cells, respectively), exhibited a similar expression profile of EMT inducer factors and ErbB and ligands to their respective parental tumors, and isolated CD34⁺-CSCs (Supplementary Figs. S3B–S3E). In accordance with the genetic profile of their parental tumors, no *Ras* mutations were detected in OT14 WD and PD/S cells, whereas 34% of *Hras* alleles were mutated (Q61L) in OT7 cells. $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ WD cells showed a higher level of expression of EGFR and *Tgfa* ligand than $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻ WD cells, whereas *Areg* and *Ep gn* expression were similar in both subpopulations of cells (Fig. 4E). Furthermore, EGFR was mainly activated in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ WD cells, as determined by the levels of phosphorylated EGFR (Fig. 4F). In contrast to PD/S cells, EGF treatment significantly increased the proliferation of WD cells (Fig. 4G) concomitantly with a stronger induction of EGFR, AKT, and ERK1/2 phosphorylation, which were inhibited in response to the EGFR inhibitor gefitinib (Fig. 4H and I and Supplementary Figs. S3F and S3G). In the absence of EGF, WD cells showed basal levels of pEGFR, which were inhibited along with the phosphorylation of downstream effectors and cell proliferation in response to gefitinib (Fig. 4H and I and Supplementary Fig. S3G). However, these effects were stronger in OT14 WD cells (*Ras* WT) than in OT7 WD cells, which present activating mutations in a subset of *Hras* alleles (Supplementary Fig. S3H). Together, these results indicate that autocrine and probably paracrine EGFR signaling promotes the growth of E-CSCs, and that this pathway is attenuated in L-CSCs.

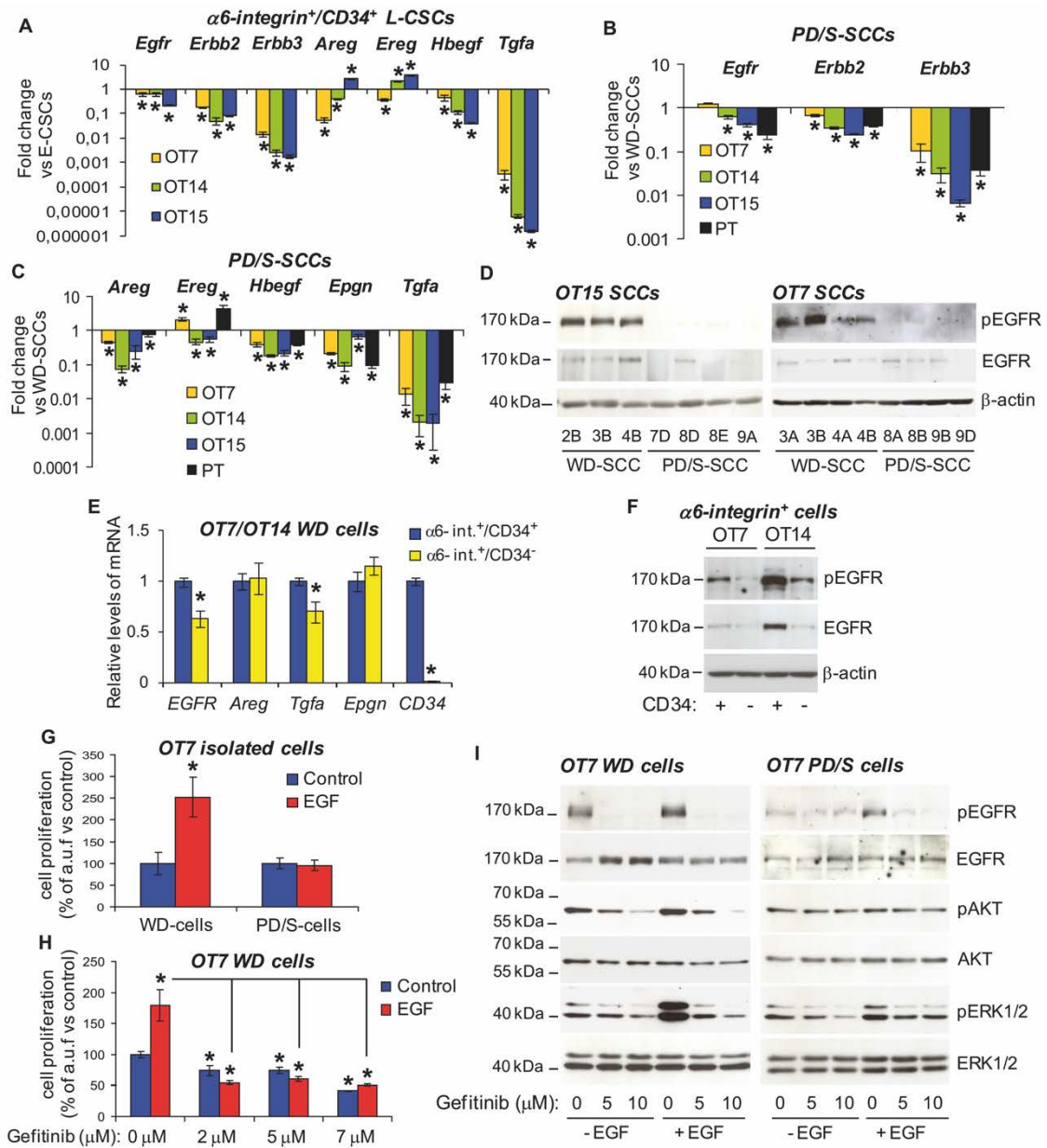


Figure 4. E-CSC-induced EGFR signaling is downregulated in CSCs of advanced SCCs. A-C, levels of the indicated mRNAs (mean ± SE) in L-CSCs relative to E-CSCs (A; three samples per group) and in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs (B and C; 6-8 samples per group) in the indicated tumor lineages (OT) and spontaneous primary SCCs (PT; four samples per group). D, EGFR and its phosphorylated form in WD-SCCs and PD/S-SCCs. E, mean (± SE) mRNA levels relative to *Gapdh* expression of the indicated genes and populations of WD cells (three samples per group). F, levels of EGFR and its phosphorylated form in the indicated populations of WD cells. G, cell proliferation upon EGF treatment, as measured by MTT. Means (± SE) indicate arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) in EGF-treated cells relative to cells growing without factor. H and I, effect of gefitinib on proliferation (H; mean ± SE of a.u.f.; two samples per group) of cells treated without or with EGF, and EGFR, AKT, and ERK1/2 phosphorylation (I). Note that the time of exposure was increased to detect EGFR and p-EGFR in PD/S cells. *, significant differences between groups (*t*-test; *P* < 0.05). β-Actin was used as a protein-loading control in D and F.

CSC-induced autocrine PDGFR α signaling promotes metastasis in advanced SCCs

PDGFR is not expressed in normal keratinocytes (32) and has not previously been associated with skin SCC CSCs. However, in accordance with our array data, *Pdgfra* expression was strongly induced in L-CSCs (Fig. 5A), correlating with the consistently observed stronger expression of this receptor in their respective PD/S-SCCs and in primary PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S4A). Although expression of *Pdgfrb* was also enhanced in PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S4A), $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs and isolated WD and PD/S cells showed a low level of expression of this receptor (Fig. 5A and Supplementary Fig. S4C), suggesting that PDGFR β is essentially associated with stromal cells. Most of the PD/S-SCC $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells expressed PDGFR α , in contrast to the sparse $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cell population exhibiting low levels of PDGFR α expression in WD-SCCs (Fig. 5C and D; Supplementary Figs. S4B and S4D). Furthermore, strong PDGFR α phosphorylation (Fig. 5B) and significant induction of *Pdgfa* and *Pdgfc* ligand expression were detected in PD/S-SCCs of different lineages, and specifically in their respective L-CSCs (Fig. 5A and Supplementary Fig. S4E), suggesting that CSCs of advanced SCCs may induce autocrine activation of PDGFR α signaling. These events were directly related to tumor progression, as no changes in *Pdgfra*, *Pdgfrb*, or *Pdgfc* expression were detected in WD-SCCs that never progress to PD/S-SCCs after serial engraftments (Supplementary Fig. S4F; OT9). As further evidence of autocrine activation of PDGFR α , we observed that PD/S cells growing in the absence of growth factors exhibited PDGFR α phosphorylation, which was blocked in response to the imatinib PDGFR inhibitor (Supplementary Fig. S4G). Despite PDGFR α phosphorylation was further induced in response to PDGFR ligands (Supplementary Fig. S4G), there were no significant changes in PD/S cell proliferation upon PDGF or imatinib treatment (Supplementary Figs. S4H and S4I), and PD/S cells with PDGFR α knockdown expression had a similar proliferation rate to PDGFR α -expressing control cells (Supplementary Figs. S5A and S5B). Furthermore, similar tumor growth was observed when PDGFR α knockdown cells and their respective control cells were engrafted in nude mice (Fig. 5E and Supplementary Figs. S5C and S5D), and when orthotopically implanted PD/S-SCCs were treated daily with imatinib, compared with the control treatment (Fig. 5F). Nevertheless, we observed a significant reduction in the number and size of lung metastases developed in imatinib-treated mice and in those carrying PDGFR α knockdown tumors (Fig. 5G and H and Supplementary Fig. S5E). Infrequent metastases developed from PDGFR α -interfered tumors showed a high receptor expression, indicating that these lesions may have arisen from tumor cells that eluded the *Pdgfra* interference (Supplementary Fig. S5F).

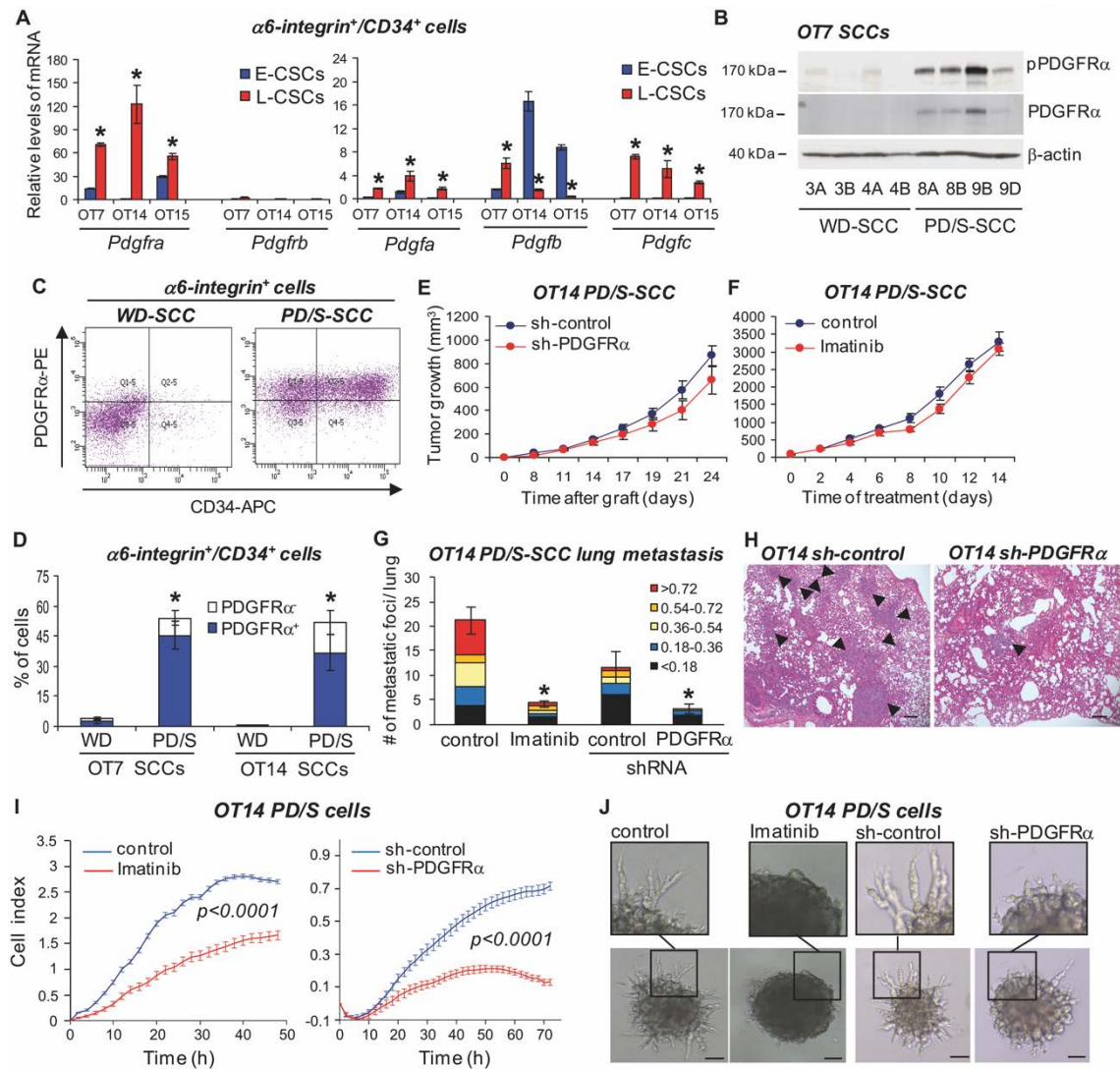


Figure 5. Autocrine PDGFR α signaling induced in CSCs of advanced SCCs promotes metastasis. **A**, expression of indicated genes relative to *Gapdh* mRNA (mean \pm SE) in E-CSCs and L-CSCs (two samples per group). **B**, PDGFR α protein and its phosphorylated form in WD-SCCs and PD/S-SCCs. β -Actin is shown as a protein-loading control. Sample number identifies the tumor passage and letters indicate independent tumor replicates. **C** and **D**, quantification of $\alpha 6$ -integrin⁺ cells expressing CD34 and PDGFR α in WD-SCCs and PD/S-SCCs by flow cytometry. **D**, percentage (mean \pm SE) of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells with or without PDGFR α expression in the indicated tumors (5-6 samples per group). **E** and **F**, growth kinetics (mean \pm SE of tumor size) of PDGFR α -expressing (sh-control) and PDGFR α -knocked-down (sh-PDGFR α) PD/S-SCCs (**E**; 8 tumors per group) and PD/S-SCCs treated with vehicle or imatinib (**F**; 10 mice per group). **G**, mean \pm SE of metastatic foci per lung section (categorized by size, mm²) in mice injected with sh-control or sh-PDGFR α PD/S tumor cells (4 mice per group) and in control and imatinib-treated mice (10 mice per group). *, significant differences between the groups (*t*-test; *P* < 0.05). **H**, metastatic lesions (indicated by black arrowheads) in the lungs of mice grafted with sh-control and sh-PDGFR α PD/S tumor cells. Scale bar, 200 μ m. **I**, comparison of the invasion capacity (indicated as cell index) in control and upon PDGFR α signaling inhibition in xCELLingence real-time cell analysis. **J**, effect of imatinib treatment and PDGFR α -knock-down on the formation of invasion structures in PD/S cells growing in Matrigel. Scale bar, 50 μ m.

Reduced metastasis observed after PDGFR α inhibition was not associated with a reduction of tumor angiogenesis because, although significantly fewer CD31⁺ vessels were observed in imatinib-treated PD/S-SCCs (Supplementary Fig. S5G), as previously reported (33, 34), the frequency of CD31⁺ vessels was unaltered in PDGFR α -interfered tumors (Supplementary Fig. S5G). These results demonstrate that PDGFR α signaling plays an important role promoting metastasis development, but not L-CSC proliferation. Reduction of metastasis mediated by PDGFR α signaling inhibition was not due to a decrease in the frequency of tumor-initiating cells or to an attenuation of the EMT program (Supplementary Figs. S5H-S5J). However, both knocking down of PDGFR α expression and imatinib treatment significantly reduced the invasion capability of PD/S cells (Fig. 5I and J). These results indicate that autocrine PDGFR α signaling promotes CSC motility and invasion, consequently favoring CSC dissemination and metastasis.

Autocrine FGFR signaling promotes CSC proliferation and survival in advanced SCCs

Our results showed that *Fgfr2* was underexpressed in L-CSCs compared with E-CSCs (Figs. 2B and 6A), indicating that FGFR signaling is altered in CSCs of advanced SCCs. FGFR1 and FGFR2 are expressed in normal keratinocytes and play an important role in the epidermal homeostasis (35). However, the role of FGFR in regulating CSC proliferation and survival during SCC progression was unexplored. Analysis of the expression of different members of the FGFR family and variants (IIIb and IIIc) showed that *Fgfr1-IIIc* (*Fgfr1c*) was the FGFR most prominently expressed in E-CSCs and L-CSCs (Fig. 6A). Upregulation of *Fgfr1c* was not consistently found in L-CSCs of different lineages (Fig. 6A), although a strong FGFR1 expression was observed in spontaneous and orthotopically derived PD/S-SCCs relative to their respective WD-SCCs, but not in those WD-SCCs that never progressed (Supplementary Figs. S6A, S6C-S6E). These results indicate that CD34⁺-CSCs express high levels of FGFR1c and that the stronger expression of this receptor in advanced SCCs is due to the CSC expansion in these tumors. Interestingly, most L-CSCs from different lineages strongly induced the expression of *Fgf2* and *Fgf7* (Fig. 6B), correlating with their significant induction in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs (Supplementary Fig. S6B). These results suggest that autocrine regulation of FGFR is induced in CSCs of advanced tumors.

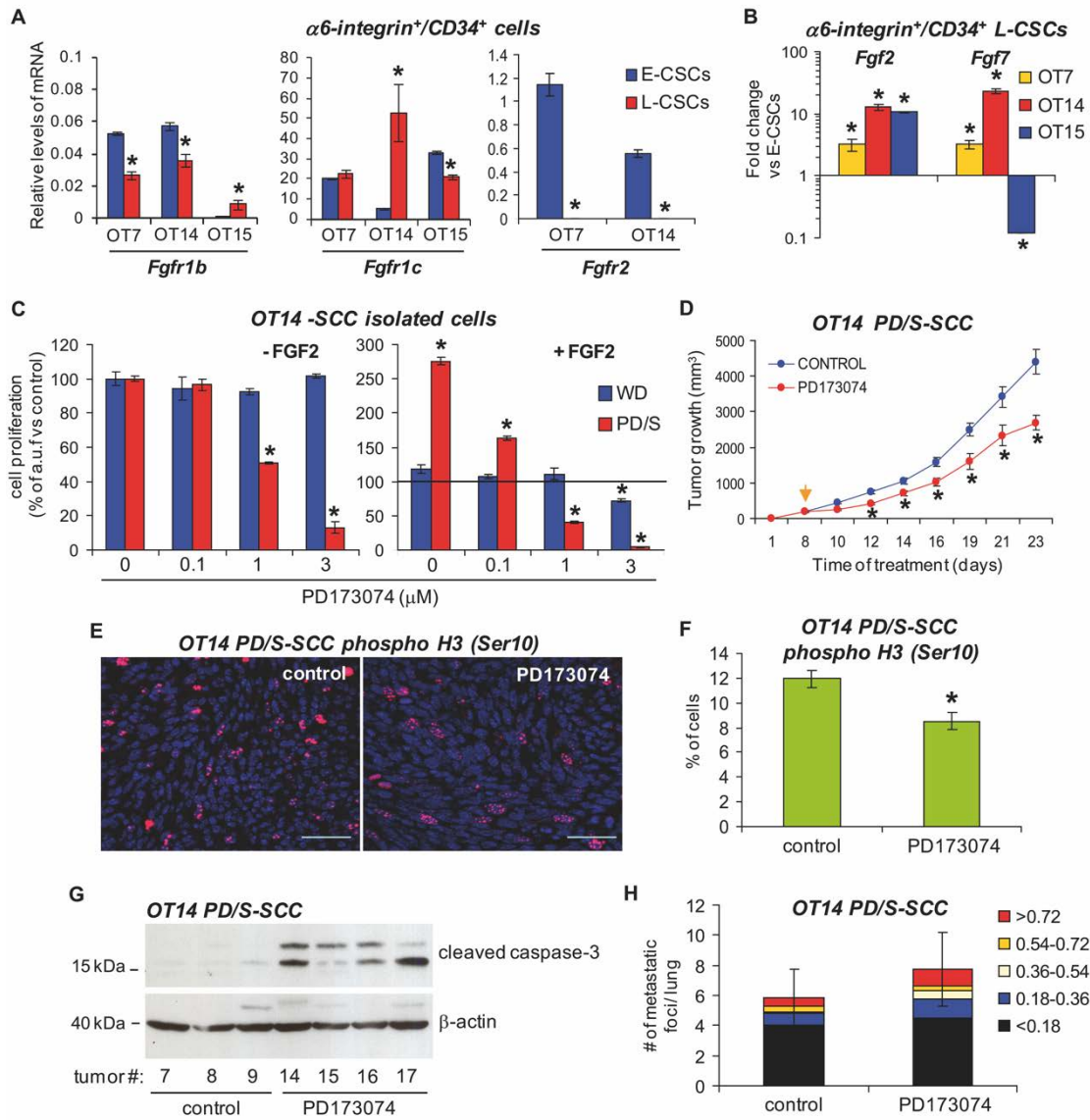


Figure 6. Autocrine FGFR1 signaling is upregulated in L-CSCs promoting tumor growth. **A** and **B**, mRNA quantification (mean ± SE) of the indicated genes in E-CSCs and L-CSCs (two samples per group) from three lineages. Results are represented as mRNA levels relative to *Gapdh* expression (**A**) and n-fold change in L-CSCs relative to E-CSCs for each lineage (**B**). **C**, mean ± SE of WD and PD/S cell proliferation after the indicated treatments, as measured by MTT. **D**, growth kinetics (mean ± SE of tumor size) of PD/S-SCCs treated with vehicle or PD173074 (10 mice per group). Arrow, the start of the treatment. **E**, immunodetection of phosphorylated histone H3 (Ser10) in control and PD173074 treated tumors. Scale bar, 30 μm. **F**, percentage (mean ± SE) of proliferating cells, as determined in **E**. **G**, levels of cleaved caspase-3 in mock and PD173074-treated tumors. β-Actin was used as a protein-loading control. **H**, mean ± SE of metastatic foci per lung section (categorized by size; mm²) developed in mock- and PD173074-treated mice (10 mice per group). *, significant differences between groups (*t*-test; *P* < 0.05).

Next, we evaluated the relevance of FGFR signaling to CSC proliferation and survival. $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ population showed stronger expression of *Fgfr1c* than the $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻ population in WD cells (Supplementary Fig. S6F), but the proliferation of these cells was unaltered in response to FGF2 or to the FGFR1 inhibitor PD173074 (36; Fig. 6C and Supplementary Fig. S6G). However, the response to FGF2 was significantly enhanced upon gefitinib-mediated EGFR inhibition (Supplementary Fig. S6G), indicating that the strong induction of the EGFR pathway attenuates FGFR signaling in WD cells. In contrast, the proliferation of PD/S cells was significantly induced upon FGF2 treatment (Fig. 6C, +FGF2), concomitantly with the induction of FGFR, AKT, and ERK1/2 phosphorylation, which were blocked in the presence of PD173074 similarly in *Ras* mutated or wild-type genetic backgrounds (Fig. 6C and Supplementary Fig. S6H). Furthermore, in the absence of growth factors, PD/S cell proliferation was significantly reduced in response to PD173074 (Fig. 6C; -FGF2). These results indicate that autocrine activation of FGFR1 signaling promotes CD34⁺-CSC proliferation in advanced SCCs. To analyze the effect of *in vivo* FGFR1 inhibition, mice carrying PD/S-SCCs were treated with PD173074. Tumor growth was significantly reduced in response to FGFR inhibition (Fig. 6D), coinciding with diminished tumor cell proliferation and induced apoptosis, as determined by phosphohistone H3 (Ser10) and cleaved caspase-3 levels, respectively (Fig. 6E-G). Despite the lesser tumor growth, no significant changes in the number and size of metastatic lesions were observed in PD173074-treated compared with mock-treated mice (Fig. 6H). These results indicate that autocrine FGFR1 signaling plays an important role promoting CSC survival and proliferation in PD/S-SCCs, although its inhibition does not impair the metastatic capability of these cells.

Advanced human skin SCCs recapitulate the molecular alterations described in mouse PD/S-SCCs

To determine the clinical relevance of our findings, we examined whether the molecular alterations described in mouse PD/S-SCCs were also associated with progression in human skin SCCs. The histopathologic grade of patient samples frequently showed intratumor regional heterogeneity, and they were classified as WD/MD-SCCs or PD/S-SCCs according to their main stage of progression and the percentage that this region represented in the overall sample (Supplementary Table S3). PD-SCCs and spindle SCCs exhibited more tumor cells with CD44 expression, which identifies CSCs in human skin SCCs (37, 38), than WD/MD-SCCs (Fig. 7A). In addition, the EMT program was induced (Fig. 7A and C) mainly in PD-SCCs with spindle tumor cell regions and a history of recurrence after surgical resection (Supplementary Table S3). Consistent with the downregulation of β -catenin in advanced mouse SCCs, the expression of β -catenin was reduced in PD/S-SCCs compared with low-grade SCCs (Fig. 7B). Similarly, the level

of expression of *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, and ligands was markedly lower in recurrent PD/S-SCCs (Fig. 7D and E), indicating that advanced human SCCs downregulate EGFR signaling. In contrast, the expression of *PDGFRA*, *PDGFRB*, *PDGFC*, *FGFR1b*, *FGFR1c*, and *FGF2* (Fig. 7F-H) was increased in most of the EMT induced and advanced tumors. These results suggest that the signaling pathways controlling CSC proliferation and survival in advanced mouse skin SCCs may also operate in advanced human SCCs.

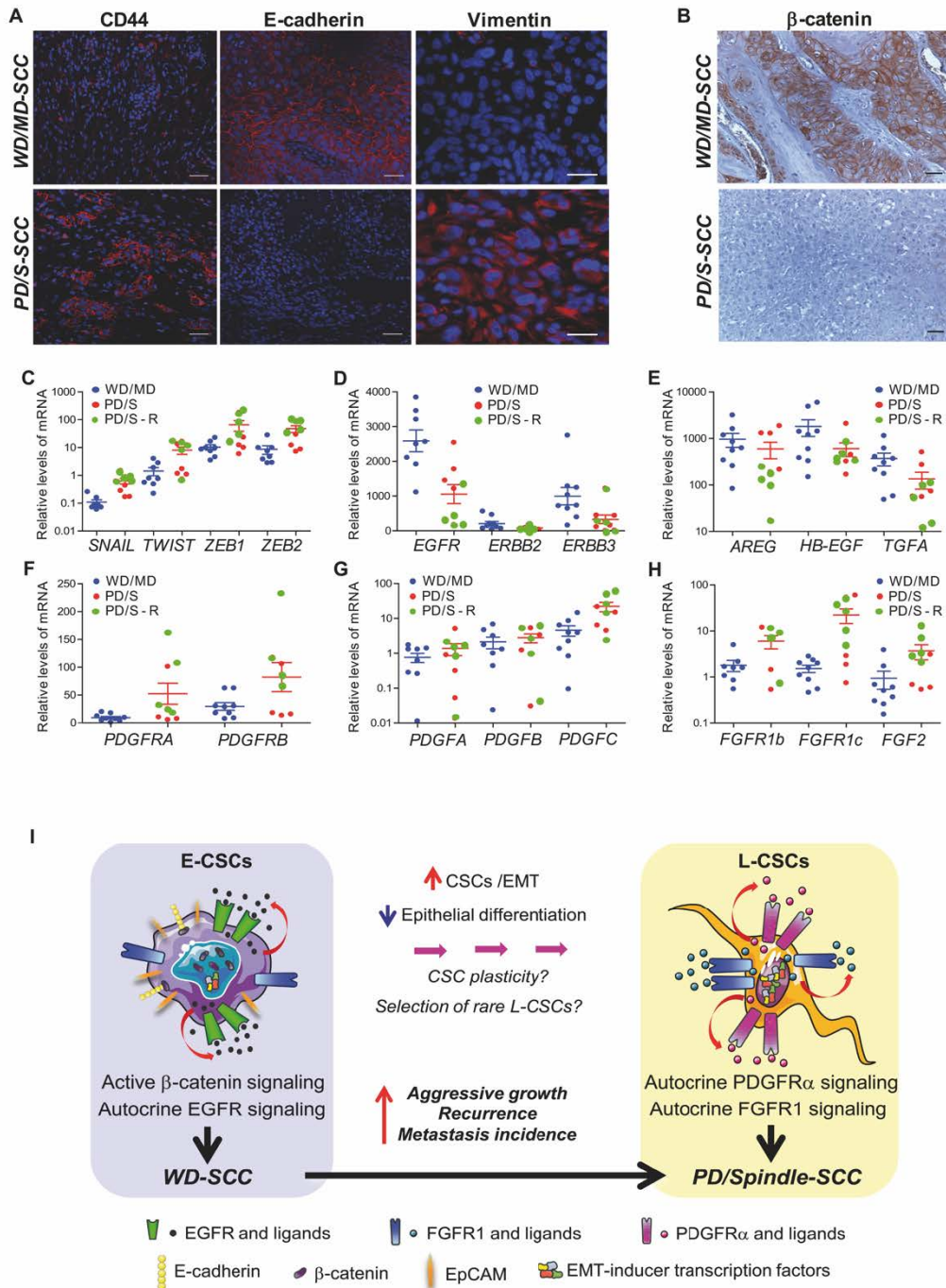


Figure 7. Advanced human skin SCCs with induced EMT recapitulate the changes in signaling pathways described in mouse PD/S-SCCs. **A**, representative images showing an expanded CD44⁺ cell population, lower E-cadherin, and higher vimentin expression levels in PD/S-SCCs compared with WD/MD-SCCs. Scale bar, 30 μ m. **B**, β -catenin expression and cell localization in WD/MD-SCC and PD/S-SCCs. Scale bar, 20 μ m. **C–H**, quantification of the indicated mRNAs in a set of human WD/MD-SCCs and PD/S-SCCs. Mean (\pm SE) mRNA levels of these genes relative to *GAPDH* mRNA are shown (individual data and mean \pm SE). Green dots, recurrent PD/S-SCCs. **I**, schema describing the identified changes in CSC features and regulatory mechanisms at different stages of mouse SCC progression.

The L-CSC signature described here in mouse skin SCCs may identify progression and poor prognosis in other human SCCs. Indeed, this L-CSC signature identified a subtype of lung SCCs that exhibit poorly differentiated features and are associated with poor prognosis (Supplementary Fig. S7, left; refs. 39, 40). A similar association was found when this L-CSC signature was compared with a large subset of head and neck SCCs (Supplementary Fig. S7, bottom right; ref. 41). This suggests that CSC features in advanced skin SCCs may be commonly associated with SCC progression and poor prognosis in humans.

DISCUSSION

Signaling pathways controlling the CSC function at early stages of skin SCC progression have been previously described (11, 15, 16). However, it was not known whether CSC regulatory mechanisms change during disease progression, correlating with the enhanced recurrence and metastasis of high-grade SCCs (1), which could influence the selection of the most efficient therapy. In the study reported here, we generated lineages of SCC progression and showed that a high percentage of WD-SCCs exhibiting epithelial features progressed to PD and mesenchymal SCCs with enhanced metastasis capability, recapitulating the skin SCC progression reported in other mouse models (42). In contrast, previous reports suggested that spindle and EMT-like skin SCCs might arise by a route other than WD-SCCs after DMBA/TPA treatment, relying on a different cell of origin and/or lower requirement for inflammatory stimuli (22). In this regard, K14-HPV16 mice, which show chronic inflammation in the skin (43), mainly developed WD-SCCs spontaneously or after DMBA/TPA treatment. Although inflammatory signaling might favor WD-SCC development, our results show that once these tumors are generated they can progress to PD/S-SCCs after serial engraftments in nude mice, which show a proficient inflammatory response (44). However, it remains unclear whether some mutated cell populations may evolve more rapidly or efficiently to PD/S-SCCs than do others.

WD- to PD/S-SCC transition was associated with a robust induction of the EMT program and an expansion of α 6-integrin⁺/CD34⁺-CSCs and tumor-initiating capability, which were similarly observed in primary PD/S-SCCs spontaneously developed in K14-HPV16 mice, as well in other

mouse models of advanced SCCs (12, 16). Cell hierarchy could be altered in advanced tumors, as $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ and $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁻ of PD/S-SCC showed a similar tumor-initiating capability and impaired epithelial differentiation after initial engraftments in immunodeficient mice. However, previous studies showed that the tumor-initiating capability of CD34⁻ was significantly reduced after multiple serial engraftments, and only CD34⁺ cells have long-term self-renewal capability and are long-term tumor propagation cells (12).

Comparison of gene expression profiles between $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs of WD- and PD/S-SCCs defined a CSC signature associated with highly malignant SCCs, which is characterized by the strong induction of stemness, the EMT program, cell proliferation, motility and metastasis, and reduced epidermal cell differentiation and cell adhesion-regulatory genes. Accordingly, tumor-initiating cells of PD/S-SCCs lose the ability to generate cells exhibiting epithelial traits. Therefore, CSC expansion may be the consequence of a sustained self-renewal and the inhibition of differentiation.

Furthermore, we found that the mechanisms that regulate CSC proliferation, survival, and dissemination change at different stages of progression. Indeed, β -catenin signaling, which plays a key role in regulating CD34⁺-CSC features in early SCCs (11), is downregulated in advanced SCCs. Moreover, EGFR signaling, which is strongly upregulated in E-CSCs to drive their proliferation, is similarly attenuated in L-CSCs, which instead induce autocrine FGFR1 signaling to promote tumor growth. Thus, although inhibition of EGFR signaling leads to WD-SCC regression and cancer cell differentiation (45), this treatment may be ineffective in advanced SCCs, which downregulated EGFR signaling. Although previous studies showed that the effectiveness of FGFR1 inhibitors is compromised in the presence of *Ras* mutations in other tumor types (46), FGFR1-dependent downstream signaling was similarly inhibited in PD/S cell with or without *Ras* mutations after PD173074 treatment, suggesting that the relevance of *Ras*-activating mutations promoting proliferation maybe reduced in advanced SCCs, as previously reported in EMT-like skin SCCs (22) and in lung and pancreatic cancer cells with induced EMT (47).

In addition, autocrine PDGFR α signaling is strongly induced in L-CSCs. In this regard, the strong induction of EMT in L-CSCs may promote the activation of both FGFR1 and PDGFR α signaling, as reported in other tumor types (48, 49). So, breast CSCs generated from cell lines that spontaneously induced EMT, activated PDGFR/PLC γ /PKC α signaling, which promoted cell proliferation (48). However, inhibition of PDGFR α signaling in SCCs did not block tumor growth but strongly reduced the invasion capability of PD/S cells and metastasis in advanced SCCs. In contrast, FGFR1 inhibition reduced tumor growth without blocking metastasis. These results

suggest that FGFR1 and PDGFR α signaling may act exclusively to promote tumor growth and metastasis, respectively.

The WD-to-PD/S-SCC transition may be induced by genetic, epigenetic, and/or, microenvironment alterations, which may modify the differentiation ability, frequency, and regulatory mechanisms of CSCs, promoting the generation and selection of a subset of tumor-initiating cells with strong growth advantages. Given the intratumor cell and clonal heterogeneity reported in some tumors (50), SCC progression may result from a selection and/or activation of rare cells with L-CSC features ($\alpha 6$ -integrin⁺/EpCAM⁺/CD34⁺/PDGFR α ⁺) residing in WD-SCCs. However, these cells were practically undetectable in WD-SCCs, as most of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells conserved EpCAM expression and exhibited low levels of PDGFR α . Thus, our results indicate that the CSC features and mechanisms that control tumor-initiating cell proliferation and dissemination change in later stages of SCC progression, promoting aggressive growth and enhanced metastasis (Fig. 7I).

Interestingly, advanced and recurrent human skin SCCs with an expanded CD44⁺-CSC population and enhanced EMT, downregulated EGFR and β -catenin expression, and induced PDGFR α/β and FGFR1 expression, thereby recapitulating the alterations detected in advanced mouse SCCs. These results suggest that the use of specific inhibitors of these pathways may be a possible therapy to block relapse and metastasis in recurrent and advanced human SCCs, in which classic chemotherapy is of limited clinical benefit (4). Thus, identifying the regulatory mechanisms controlling CSCs at specific stages of progression may guide the choice of the most suitable therapy for selectively targeting the signaling pathways that regulate this subset of cells.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: V. da Silva-Diz, P. Simón-Extremera, A. Bernat-Peguera, P. Muñoz

Development of methodology: V. da Silva-Diz, P. Simón-Extremera, A. Bernat-Peguera, A. Rodolosse, M. Esteller, A. Villanueva

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): V. da Silva-Diz, P. Simón-Extremera, A. Bernat-Peguera, J. de Sostoa, R.M. Penín, D. Pérez Sidelnikova, O. Bermejo, J.M. Viñals, A. Rodolosse, M. Esteller, A. Villanueva

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): V. da Silva-Diz, P. Simón-Extremera, A. Bernat- Peguera, J. de Sostoa, M. Urpí, E. González-Suárez, A. Gómez Moruno, M.A. Pujana, A. Villanueva, P. Muñoz

Writing, review, and/or revision of the manuscript: E. González-Suárez, F. Viñals, P. Muñoz

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): M. Esteller, P. Muñoz

Study supervision: P. Muñoz

Acknowledgments

The authors thank R. Alvarez, J. Comas, and E. Castaño (Universitat de Barcelona-SCT) for technical support with flow cytometry; the patients enrolled in this study for their participation; the Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Virgen de la Salud, Biobanco del Principado de Asturias, and Fundación Instituto Valenciano de Oncología, which are integrated in the Spanish Hospital Platform Biobanks Network; Y. Pérez (Tumor Bank, Hospital de Bellvitge) for help with human tumor sample collection; the IDIBELL animal facility service for mouse care; and David Monk for help with the manuscript preparation.

Grant Support

V. da Silva-Diz and P. Simón-Extremera are funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation fellowships; A. Bernat-Peguera received an IDIBELL fellowship. The research of P. Muñoz and colleagues is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2011-22894; SAF2014-55944R) and by the Catalan Department of Health (Generalitat de Catalunya).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

REFERENCES

1. Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg* 2002;28:268–73.
2. DiGiovanni J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther* 1992;54:63–128.
3. Coussens LM, Hanahan D, Arbeit JM. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol* 1996;149:1899–917.

4. Franco R, Nicoletti G, Lombardi A, Di Domenico M, Botti G, Zito Marino F, et al. Current treatment of cutaneous squamous cancer and molecular strategies for its sensitization to new target-based drugs. *Expert Opin Biol Ther* 2013;13:51–66.
5. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011;469:314–22.
6. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 2012;12:133–43.
7. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012;488:522–6.
8. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:497–512.
9. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–15.
10. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871–90.
11. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* 2008;452:650–3.
12. Lapouge G, Beck B, Nassar D, Dubois C, Dekoninck S, Blanpain C. Skin squamous cell carcinoma propagating cells increase with tumour progression and invasiveness. *EMBO J* 2012;31:4563–75.
13. Siegle JM, Basin A, Sastre-Perona A, Yonekubo Y, Brown J, Sennett R, et al. SOX2 is a cancer-specific regulator of tumour initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 2014;5:4511.
14. Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 2014;511:246–50.
15. Beck B, Driessens G, Goossens S, Youssef KK, Kuchnio A, Caauwe A, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 2011;478:399–403.
16. Schober M, Fuchs E. Tumor-initiating stem cells of squamous cell carcinomas and their control by TGF-beta and integrin/focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:10544–9.
17. Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol* 1994;68:4358–68.

18. Blanco R, Muñoz P, Flores JM, Klatt P, Blasco MA. Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 2007;21:206–20.
19. da Silva-Diz V, Sole-Sanchez S, Valdes-Gutierrez A, Urpí M, Riba-Artés D, Penin RM, et al. Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis. *Oncogene* 2013;32:3732–43.
20. Muñoz P, Blanco R, Flores JM, Blasco MA. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat Genet* 2005;37:1063–71.
21. Gonzalez-Roca E, Garcia-Albeniz X, Rodriguez-Mulero S, Gomis RR, Kornacker K, Auer H. Accurate expression profiling of very small cell populations. *PLoS One* 2010;5:e14418.
22. Wong CE, Yu JS, Quigley DA, ToMD, Jen KY, Huang PY, et al. Inflammation and Hras signaling control epithelial-mesenchymal transition during skin tumor progression. *Genes Dev* 2013;27:670–82.
23. Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 1986;322:78–80.
24. Nassar D, Latil M, Boeckx B, Lambrechts D, Blanpain C. Genomic landscape of carcinogen-induced and genetically induced mouse skin squamous cell carcinoma. *Nat Med* 2015;21:946–54.
25. Holderfield M, Lorenzana E, Weisburd B, Lomovasky L, Boussemart L, Lacroix L, et al. Vemurafenib cooperates with HPV to promote initiation of cutaneous tumors. *Cancer Res* 2014;74:2238–45.
26. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341–54.
27. Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, et al. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* 2006;116:1561–70.
28. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:116–29.
29. Fuerer C, Nusse R. Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway. *PLoS One* 2010;5:e9370.
30. Hansen LA, Woodson RL II, Holbus S, Strain K, Lo YC, Yuspa SH. The epidermal growth factor receptor is required to maintain the proliferative population in the basal compartment of epidermal tumors. *Cancer Res* 2000;60:3328–32.

31. Sibilía M, Fleischmann A, Behrens A, Stingl L, Carroll J, Watt FM, et al. The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* 2000;102:211–20.
32. Ponten F, Ren Z, Nister M, Westermarck B, Ponten J. Epithelial-stromal interactions in basal cell cancer: the PDGF system. *J Invest Dermatol* 1994;102:304–9.
33. Hwang RF, Yokoi K, Bucana CD, Tsan R, Killion JJ, Evans DB, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res* 2003;9:6534–44.
34. Ruan J, Luo M, Wang C, Fan L, Yang SN, Cardenas M, et al. Imatinib disrupts lymphoma angiogenesis by targeting vascular pericytes. *Blood* 2013;121: 5192–202.
35. Yang J, Meyer M, Muller AK, Böhm F, Grose R, Dauwalder T, et al. Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis. *J Cell Biol* 2010;188: 935–52.
36. Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, Schroeder MC, Panek RL, Lu GH, et al. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J* 1998;17:5896–904.
37. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, et al. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res* 2011;71:5317–26.
38. Geng S, Guo Y, Wang Q, Li L, Wang J. Cancer stem-like cells enriched with CD29 and CD44 markers exhibit molecular characteristics with epithelial mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol Res* 2012;305:35–47.
39. Wilkerson MD, Yin X, Hoadley KA, Liu Y, Hayward MC, Cabanski CR, et al. Lung squamous cell carcinoma mRNA expression subtypes are reproducible, clinically important, and correspond to normal cell types. *Clin Cancer Res* 2010;16:4864–75.
40. Network CGAR. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012;489:519–25.
41. Rickman DS, Millon R, De Reynies A, Thomas E, Wasylyk C, Muller D, et al. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene* 2008;27:6607–22.
42. White RA, Neiman JM, Reddi A, Han G, Birlea S, Mitra D, et al. Epithelial stem cell mutations that promote squamous cell carcinoma metastasis. *J Clin Invest* 2013;123:4390–404.

43. Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999;13: 1382–97.
44. Jacobson RH. Immunodeficiency models in characterization of immune responses to parasites—an overview. *Vet Parasitol* 1982;10:141–54.
45. Zhang L, Ge Y, Fuchs E. miR-125b can enhance skin tumor initiation and promote malignant progression by repressing differentiation and prolonging cell survival. *Genes Dev* 2014;28:2532–46.
46. Lamont FR, Tomlinson DC, Cooper PA, Shnyder SD, Chester JD, Knowles MA. Small molecule FGF receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma growth in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2011;104: 75–82.
47. Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 2009;15:489–500.
48. Tam WL, Lu H, Buikhuisen J, Soh BS, Lim E, Reinhardt F, et al. Protein kinase C alpha is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells. *Cancer Cell* 2013;24:347–64.
49. Zhu DY, Guo QS, Li YL, Cui B, Guo J, Liu JX, et al. Twist1 correlates with poor differentiation and progression in gastric adenocarcinoma via elevation of FGFR2 expression. *World J Gastroenterol* 2014;20:18306–15.
50. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014;14:275–91.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression

Victoria da Silva-Diz¹, Pilar Simón-Extremera¹, **Adrià Bernat-Peguera**¹, Jana de Sostoa¹, Maria Urpí¹, Rosa M. Penín², Diana Pérez Sidelnikova³, Oriol Bermejo³, Joan Maria Viñals³, Annie Rodolosse⁴, Eva González-Suárez¹, Antonio Gómez Moruno¹, Miguel Ángel Pujana⁵, Manel Esteller^{1,6,7}, Alberto Villanueva⁵, Francesc Viñals^{5,6}, and Purificación Muñoz¹

These authors contributed equally: Adrià Bernat-Peguera, Pilar Simón-Extremera.

Supplementary Figures S1-S7

Supplementary Tables 1-3

Supplementary Material and Methods

Supplementary References

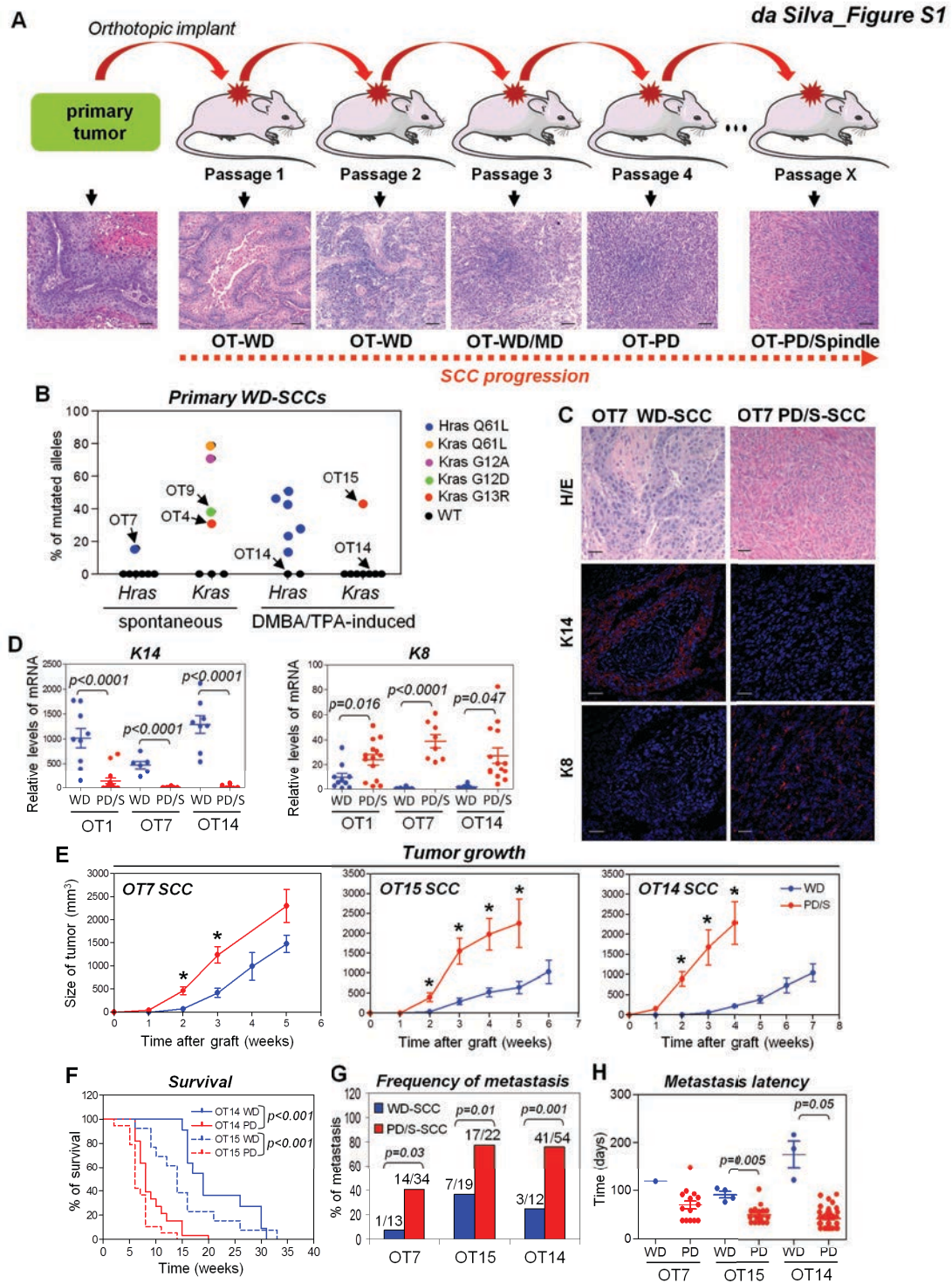
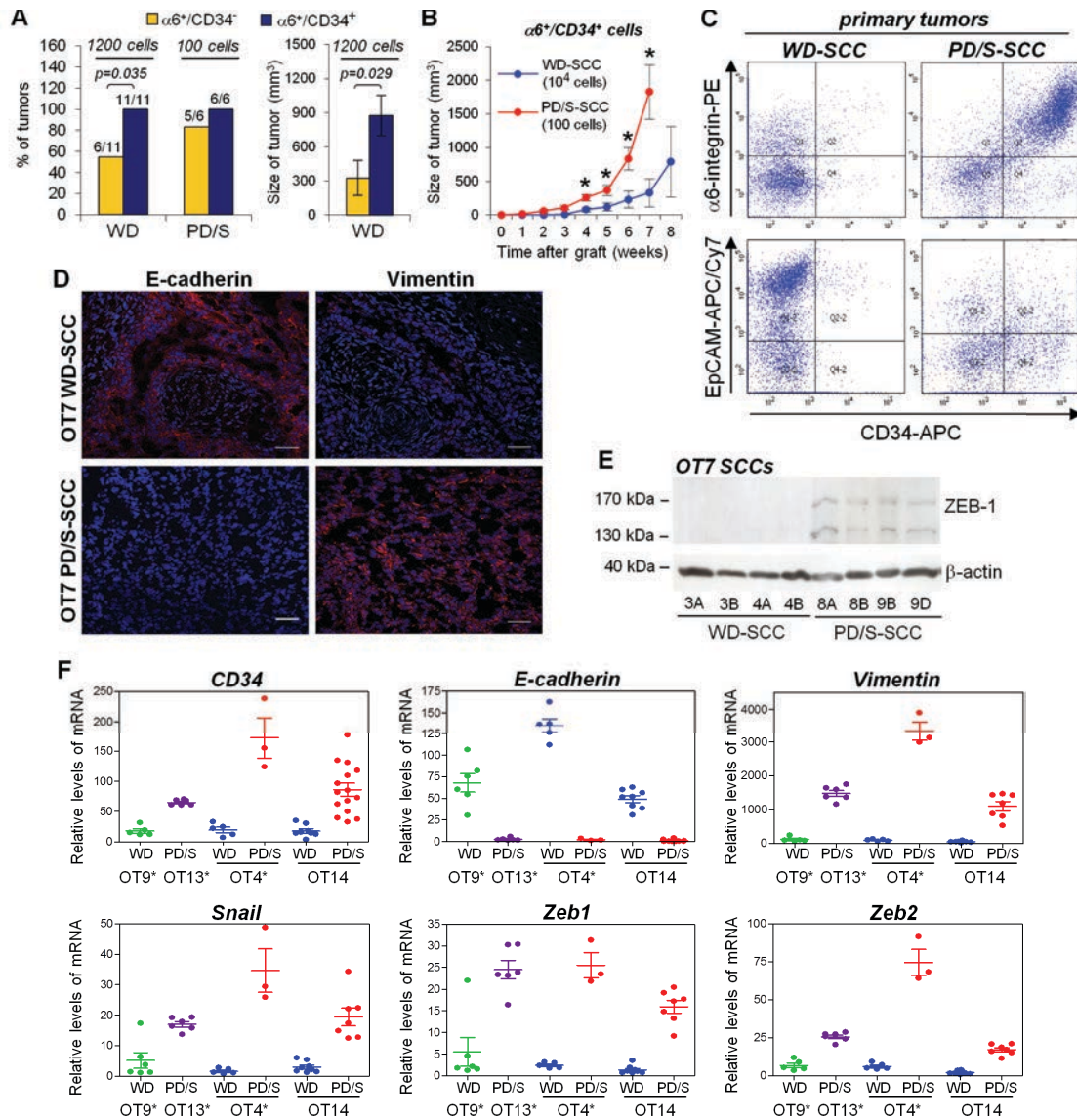


Figure S1. Characterization of serially progressing orthotopic skin SCCs for generating images with orthotopic skin SCCs. Ortho-SCCs (OT) were serially engrafted to allow tumor progression. Scale bar, 50 μ m. **B**, Percentage of alleles with the indicated *Hras* and *Kras* mutations, as analyzed by pyrosequencing assays. WT indicates the absence of the indicated mutations. **C**, Representative images showing histopathological features (H/E hematoxylin/eosin staining) and cells expressing K14 and K8 in WD-SCCs and PD/S-SCCs. Scale bar, 30 μ m. **D**, Levels of *K14* and *K8* mRNA relative to *Gapdh* expression (individual data and mean \pm SE) in WD-SCCs and PD/S-SCCs. **E**, Growth kinetics (mean \pm SE of tumor size) of PD/S-SCCs and their respective WD-SCC precursors of the indicated lineages. **F**, Kaplan-Meier curves comparing the survival of mice carrying WD-SCCs and PD/S-SCCs. **G**, Mice developing metastatic lesions indicated as percentage and frequency out of the total number of mice in each group and lineage. **H**, Latency time (individual data and mean \pm SE) of

metastasis development in the indicated groups. * indicates significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$).



Percentage, frequency and size of tumors generated after injection in nude mice of the indicated cells from WD-SCCs and PD/S-SCCs. **B**, Growth kinetics (mean \pm SE of tumor size) of tumors generated after engrafting the indicated number of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells isolated from WD-SCCs and PD/S-SCCs. * indicates significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$). **C**, Analysis by flow cytometry of CD34⁺ cells expressing $\alpha 6$ -integrin and EpCAM in primary WD-SCC and PD/S-SCC. **D**, Immunodetection of E-cadherin and vimentin-expressing cells in WD-SCC and PD/S-SCC. Scale bar, 30 μ m. **E**, Levels of ZEB-1 protein in WD-SCCs and PD/S-SCCs. β -actin was used as a protein-loading control. The sample number identifies the tumor passage and the letters indicate independent tumor replicates. **F**, Quantification (mean \pm SE) of the indicated mRNAs relative to *Gapdh* mRNA in WD-SCCs and PD/S-SCCs of lineages generated from spontaneous (OT4) and DMBA/TPA-induced tumor (OT14). Tumor samples of early and late passages of a lineage generated from WD-SCC that never progressed (OT9) and from a PD/S-SCC (OT13) are included. (*) indicates that tumors of origin of these lineages were spontaneously induced.

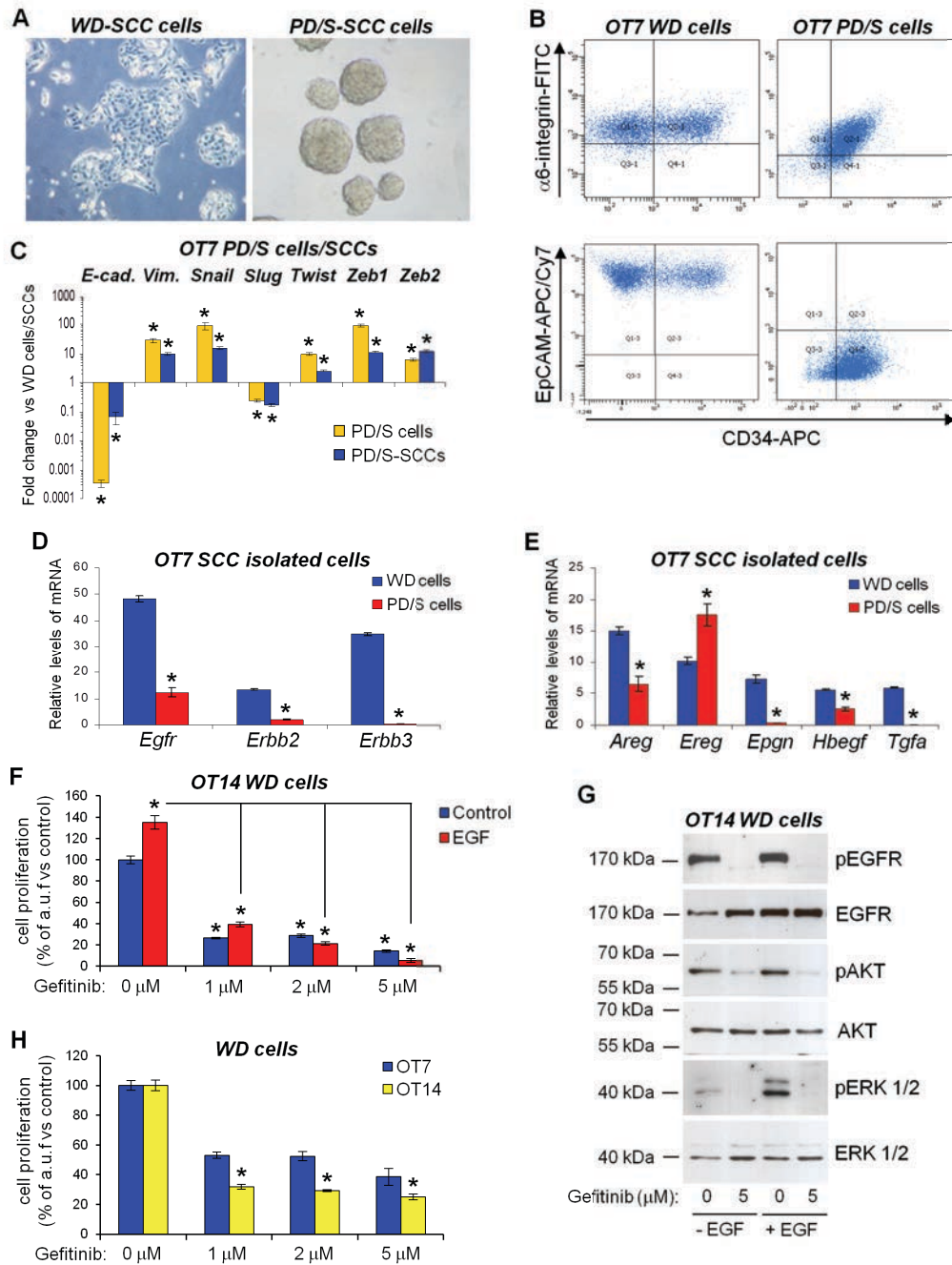
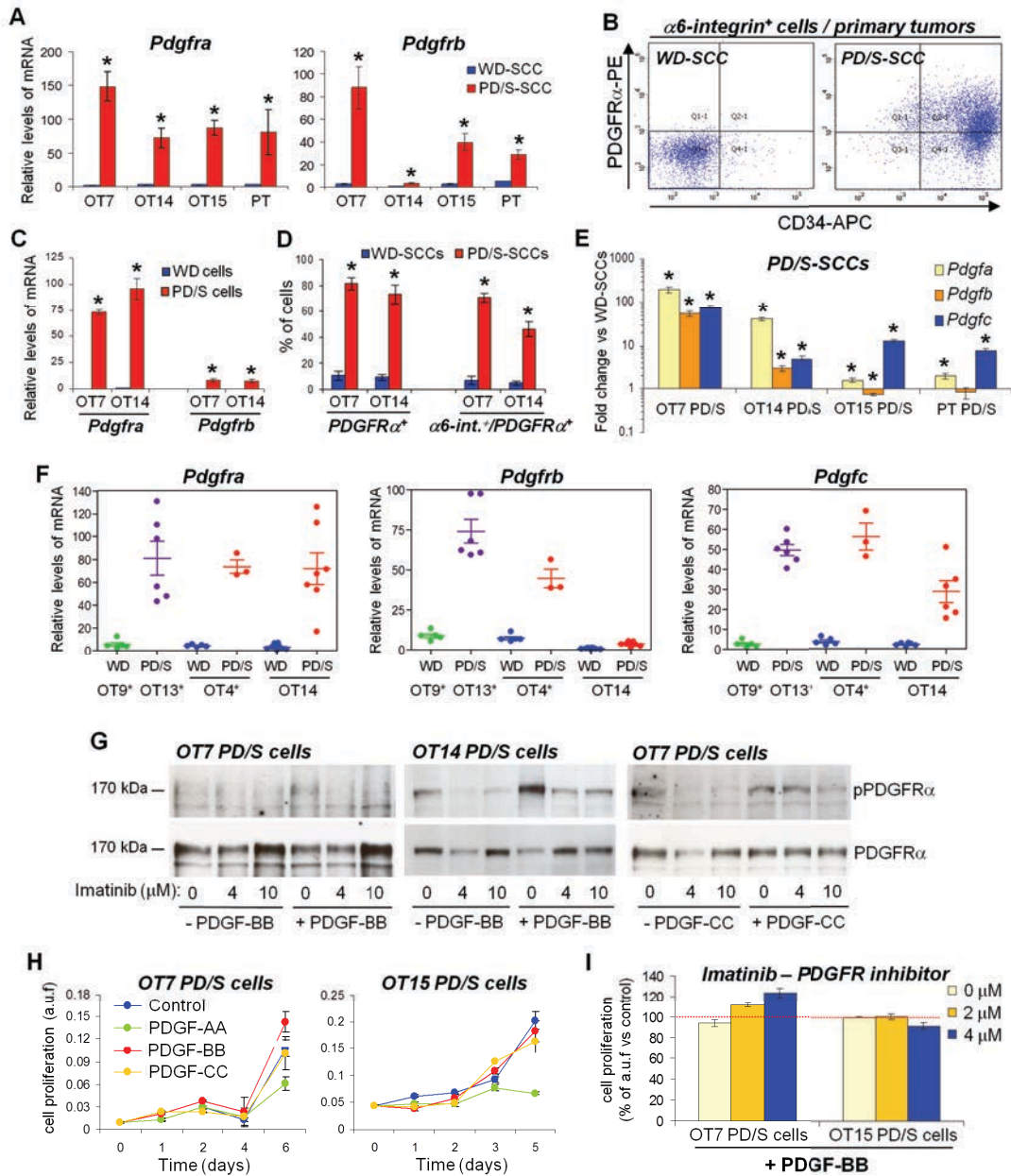


Figure S3. Primary cell cultures derived from WD-SCCs and PD/S-SCCs are enriched in CSCs and exhibit similar features to E-CSCs and L-CSCs. **A**, Cells derived from WD-SCCs (WD cells) grow *in vitro* as adherent cells and those derived from PD/S-SCCs (PD/S cells) grow as spheres. **B**, Analysis of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ and EpCAM⁺/CD34⁺ cells in WD and PD/S cells, by flow cytometry. **C**, mRNA quantification of EMT markers and EMT-inducer transcription factors. Mean (\pm SE) mRNA levels of these genes in PD/S cells and PD/S-SCCs relative to WD cells (2 samples per group) and WD-SCCs, respectively. **D**, **E**, Mean (\pm SE) mRNA levels of the indicated genes relative to *Gapdh* expression, quantified by qRT-PCR. **F**, **H**, Proliferation (mean \pm SE of a.u.f) of WD cells from the indicated lineages, after EGF and/or Gefitinib treatments, as measured by MTT. **G**, Effect of gefitinib and/or EGF treatment on EGFR, AKT and ERK1/2 phosphorylation in OT14 WD cells. * indicates significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$).



Quantification by flow cytometry of $\alpha 6$ -integrin⁺ cells expressing PDGFR α and CD34 in primary SCCs. **C**, Mean (\pm SE) levels of *Pdgfra* and *Pdgfrb* mRNA relative to *Gapdh* mRNA in WD cells and PD/S cells (2 samples per group). **D**, Percentage (mean \pm SE) of the indicated cells in WD-SCCs and PD/S-SCCs (6-8 tumors per group), as quantified by flow cytometry. **E**, Quantification of PDGFR ligand mRNAs (mean \pm SE) in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs in the indicated lineages (5-7 samples per group) and in primary SCCs (PT PD/S). * indicates significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$). **F**, mRNA levels (mean \pm SE) of the indicated genes relative to *Gapdh* expression in samples of SCC lineages that progressed (OT4 and OT14), lineages that did not show tumor progression (OT9) and those that conserved PD/S-SCC features (OT13) after serial engraftment. (*) indicates that tumors of origin of these lineages were spontaneously induced. **G**, Phosphorylation status of PDGFR α in PD/S tumor cells in the absence or presence of the indicated ligands and Imatinib. **H**, Proliferation kinetics (mean \pm SE of a.u.f.) of PD/S cells of the indicated lineages treated without (control) or with PDGF-AA (10 ng/ml), PDGF-BB (30 ng/ml) and PDGF-CC (30 ng/ml), as determined by MTT assays. **I**, PD/S cell proliferation in response of PDGF-BB (30 ng/ml) and increasing doses of imatinib. Results (mean \pm SE) represent cell proliferation (a.u.f.) upon these treatments relative to their respective cells growing without factors (red line).

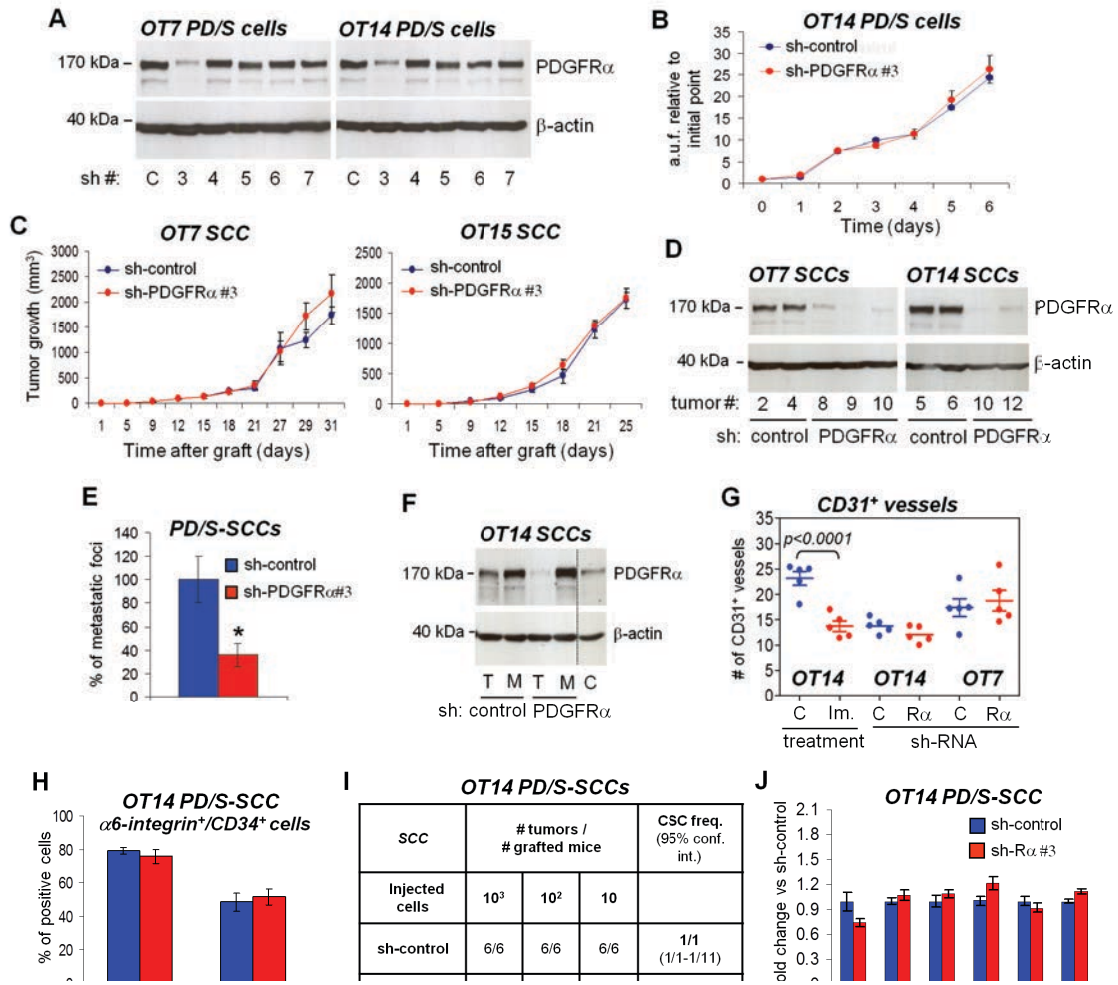


Figure S5. Inhibition of PDGFR α signaling reduces metastasis development, but not tumor growth. **A**, PDGFR α expression in the indicated cells after transduction with sh-control and sh-PDGFR α lentivirus. **B**, Proliferation kinetics (mean \pm SE of a.u.f. relative to day 0) of PDGFR α -interfered (sh-PDGFR α) and PDGFR α -expressing (sh-control) cells. **C**, Growth kinetics (mean \pm SE of tumor size; 8 tumors per group) of tumors generated from control and PDGFR α -knocked-down cells from the indicated PD/S-SCCs. **D**, Levels of PDGFR α protein in the indicated tumors from the assays described in **C**. **E**, Percentage of metastatic foci per lung section (mean \pm SE) developed from sh-PDGFR α tumors relative to control tumors (12 mice per group from 3 PD-SCC lineages). * indicates significant differences between groups (*t*-test; *P* < 0.05). **F**, Levels of PDGFR α protein in tumors (T) and their respective metastasis (M) of the indicated samples. A tumor-free lung sample (C) was included as a control of PDGFR α expression in this tissue. β -actin was included as a protein-loading control in **A**, **D** and **F**. Dotted line indicates that these samples were analyzed in the same gel but in distant lanes. **G**, Mean (\pm SE) frequency of CD31⁺ vessels per tumor section in the indicated groups. **H**, Quantification by flow cytometry of the percentage of α 6-integrin⁺/CD34⁺ cells (mean \pm SE) in the indicated tumor groups. **I**, Serial dilution of tumor cells isolated from PDGFR α -expressing and PDGFR α -interfered PD/S-SCCs were injected in immunodeficient mice. The number of mice developing tumors, frequency of CSCs and confidence intervals (conf. int.) for each condition are shown. **J**, mRNA levels (mean \pm SE) of EMT markers relative to *Gapdh* expression in the indicated tumors.

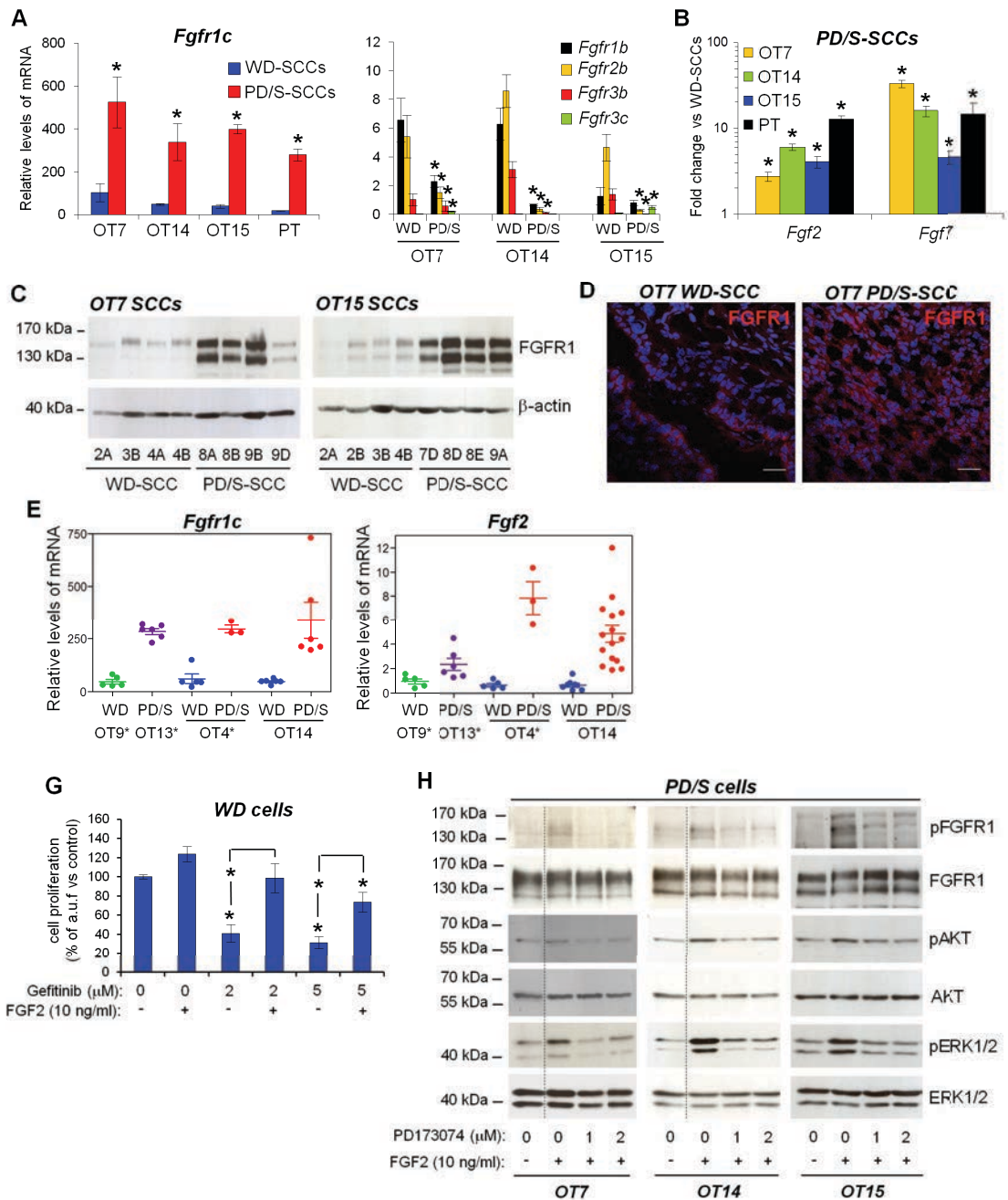


Figure S6. PD/S-SCCs show autocrine activation of FGFR1 signaling. **A**, mRNA levels of the indicated genes relative to *Gapdh* mRNA (mean \pm SE) in WD-SCCs and PD/S-SCCs of different lineages (6-8 samples per group) and primary tumors (PT) (4 samples per group). **B**, Quantification of *Fgf2* and *Fgf7* mRNA (mean \pm SE) in PD/S-SCCs relative to WD-SCCs. **C**, FGFR1 protein levels in WD-SCCs and PD/S-SCCs. β -actin was included as a protein-loading control. The sample number identifies the tumor passage and the letters indicate independent tumor replicates. **D**, Immunodetection of FGFR1-expressing cells in WD-SCCs and PD/S-SCCs. Scale bar, 30 μ m. **E**, Quantification of mRNA levels of the indicated genes relative to *Gapdh* mRNA (individual data and mean \pm SE) in SCC samples of lineages. (*) indicates that tumors of origin of these lineages were spontaneous SCCs. **F**, *FGFR1c* and *CD34* mRNA levels relative to *Gapdh* mRNA (mean \pm SE) in α 6-integrin⁺/CD34⁺ and α 6-integrin⁺/CD34⁻ populations isolated from WD cells. **G**, Results (mean \pm SE) represent WD cell proliferation (a.u.f.) in the absence or presence of FGF2 (10 ng/ml) and increasing doses of gefitinib, as determined by MTT assays. * indicates significant differences between groups (*t*-test; *P* < 0.05). **H**, Analysis of phosphorylation status of FGFR, AKT and ERK1/2 proteins upon FGF2 and PD173074 treatment in PD/S tumor

of the indicated lineages. Dotted line indicates that these samples were analyzed in the same gel but in distant lanes.

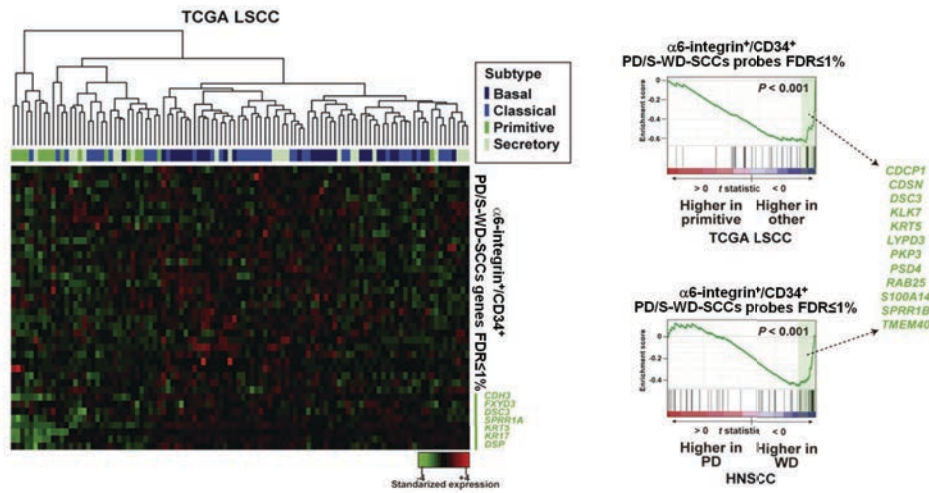


Figure S7. L-CSC signature identifies advanced and poor-prognosis human lung and head-neck SCC. Left, heatmap representation of differentially expressed genes (FDR ≤ 1%) in mouse L-CSCs that identifies a subgroup of human undifferentiated lung SCCs associated with poor prognosis. Right, GSEA enrichment plots showing a set of genes underexpressed in human lung SCCs (upper right panel) and in human HNSCCs (bottom right panel), which were also significantly downregulated in L-CSCs.

# tumor lineage	Primary tumor histopathology	Growth time (PI)	Engraftment																		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10									
OT1	WD/MD-SCC	9 w	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
OT2	WD/MD-SCC	5 w	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
OT4*	WD/MD-SCC	7 w	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
OT7	WD-SCC	18 w	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
OT8	WD/MD-SCC	21 w	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
OT9*	WD/MD-SCC	12 w	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
OT11	PD/spindle-SCC	2 w	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
OT12*	PD/spindle-SCC	2 w	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
OT13*	PD/spindle-SCC	2 w	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
OT14	WD/MD-SCC	12 w	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow

Table S1. Features of primary- and ortho-SCCs (OT) of different tumor lineages. The latency (weeks) to tumor growth after the first orthotopic implant (PI) is shown. * indicates spontaneous tumors, whereas the others SCCs were generated after DMBA-TPA treatment. The histopathology of the tumor sample at each engraftment is indicated by colors: yellow, WD/MD-SCCs; orange, MD-PD-SCCs; red: PD-SCC and spindle tumors. White boxes indicate that we interrupted the serial engraftment at this point.

Table S2. List of differentially expressed genes between E-CSCs and L-CSCs, which were isolated from WD-SCCs and PD/S-SCCs, respectively.

Sample	Classification/Grade	% of indicated tumor region in overall sample*			
		% WD-SCC	% MD-SCC	% PD-SCC	% spindle SCC
T1(R)	PD-SCC / G3	0%	0%	95%	5%
T2 (R)	PD-SCC / G3	0%	0%	40%	60%
T3 (R)	PD-SCC / G4	0%	0%	0%	100%
T5	PD-SCC / G3	0%	55%	45%	0%
T6	MD-SCC / G2	0%	100%	0%	0%
T7	MD-SCC / G2	0%	80%	20%	0%
T8 (M)	MD-SCC / G2	5%	85%	10%	0%
T9	MD-SCC / G2	40%	60%	0%	0%
T10	PD-SCC / G3	5%	55%	40%	0%
T16 (R)	PD-SCC / G4	0%	0%	0%	100%
T23	MD-SCC / G2	10%	90%	0%	0%
T24	WD-SCC /G1	100%	0%	0%	0%
T26	PD-SCC / G3	0%	0%	100%	0%
T30	PD-SCC / G3	0%	60%	40%	0%
T34	MD-SCC / G2	70%	30%	0%	0%
T39	MD-SCC / G2	0%	100%	0%	0%
T41	WD/MD-SCC / G2	40%	50%	10%	0%
T42 (R)	PD-SCC / G4	0%	0%	0%	100%

Table S3. Features of human skin SCC samples. Due to human samples frequently present intra-tumor heterogeneity in the histopathological grade, a pathologist determined the percentage represented by each region in the overall sample. Tumors that contain at least 40 % of PD component or spindle regions were classed as PD/S-SCCs. R: recurrent tumor; M: tumor with associated lymph node metastasis.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Isolation of SCC cells

Excised tumors were minced and incubated with collagenase I (60 U/ml; Sigma) and dispase (0.7 U/ml; Gibco) overnight at 37 °C. Cell suspensions were filtered and recovered after centrifugation. Tumor cells were incubated with anti-CD31 antibody (1:200; BD Bioscience) for 30 min at 4 °C, then with Dynabeads® anti-rat (1:50; Invitrogen) for 30 min at 4 °C to deplete the suspension of endothelial cells. The cells in the supernatant were used in flow cytometry assays, where CD45⁺ (1:50; eBioscience) cells were excluded.

Flow cytometry analysis and sorting

For flow cytometry analysis and sorting, isolated tumor cells in blocking buffer (5% FBS in PBS) were stained with biotin-labeled CD34 antibody (1:30; eBioscience) for 30 min at 4 °C, then with streptavidin-allophycocyanin (1:50; BD Bioscience) and phycoerythrin labeled α 6-integrin (CD49f) antibody (1:50; BD Bioscience) or FITC-labeled α 6-integrin (CD49f) antibody (1:50; BD Bioscience) for 30 min at 4 °C. In addition, isolated tumor cells were incubated for 30 min at 4 °C with anti-CD140a-PE antibody (1:50; eBioscience) and anti-EpCAM APC/Cy7 (1:50;

BioLegend) to identify PDGFR α ⁺ cells and EpCAM-expressing cells, respectively. Cells were finally resuspended in analysis buffer (2% FBS, 0.5 mM EDTA in PBS). The live cells excluded DAPI (Sigma). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) and analysis were done with BD Bioscience Aria equipment.

Cell cultures and treatments

All primary cell cultures used in this manuscript were established in our laboratory from orthotopically engrafted WD-SCCs and PD/S-SCCs during the development of these studies. For proliferation assays, 2×10^3 of WD cells were seeded per well in replicates on 96-well plates and starved in basic medium for 12 h. PD/S cells, already growing in basic medium, were seeded at the same density. Then, fresh basic medium without or with EGF (20 ng/ml), FGF2 (10 ng/ml) or PDGF-AA (10-30 ng/ml), PDGF-BB (10-30 ng/ml) or PDGF-CC (10-30 ng/ml) was added. Cell viability was measured using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. To evaluate the effect of Imatinib or PD173074 on the presence or absence of growth factors, 5×10^3 PD/S cells/well were seeded in replicates on 96-well plates and inhibitors were added in fresh basic medium 2 h before the growth factor treatments began. In these assays, medium with factors and/or inhibitors was refreshed every 3 days and cell proliferation and survival were measured by calculating the mean (\pm SE) absorbance at 560 nm after 6 days of treatment with MTT assays. To determine the effect of growth factors and inhibitors on the activation/inhibition of EGFR, PDGFR and FGFR signaling, 1.5×10^6 WD and PD/S cells/well were seeded in six-well plates. WD cells were starved for 12 h in the absence of factors before starting the treatments. Inhibitors were added 2 h before treatment with growth factors. Cells were then incubated for 10 min in the presence of respective factors. At the end of treatment, cells were placed on ice, washed twice with cold PBS and recovered for further analysis by western blot.

Short hairpin (sh) RNA and lentiviral transductions

To knock down PDGFR α expression, six TRC shRNA lentivirus vectors (Dharmacon) targeting the expression of this gene were initially tested. TCF/LEF reporter driving expression of EGFP (7TGC) (1) was used to compare the transcriptional activity of β -catenin in WD and PD/S cells and derivative SCCs. To carry out the transduction, lentivirus particles were produced in 293T using standard protocols and psPAX2 and pMD2.G as packaging vectors. WD cells growing as adherent cells were detached by trypsin treatment (Trypsin 2.5X/EDTA; Sigma) for 10 min at 37 °C, and 1×10^6 cells were seeded in plates 24 h before infection, whereas PD/S cells, growing as spheres, were mechanically disaggregated and 1×10^6 cells were plated as individual cells just

before infection. WD and PD/S cells were then incubated with 293T medium containing lentivirus particles and the standard infection protocol was followed.

Western blotting

Whole-cell extracts were prepared from tumors and isolated tumor cells in lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 350 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% glycerol, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 2 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, PhosSTOP (Roche), Complete (Roche), 0.1% SDS (Invitrogen) and 1% Triton X-100 (Thermo Scientific), as previously described (2). After transfer, proteins were incubated overnight with the antibodies anti- β -catenin (1:5000; BD Bioscience), anti-active β -catenin (1:400; Millipore), anti-EGFR (1:1000; Cell Signaling), anti-pEGFR (1:1000; Cell Signaling), anti-AKT (1:1000; Cell Signaling), anti-pAKT (1:1000; Cell Signaling), anti-ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling), anti-pERK1/2 (1:1000; Cell Signaling), anti-PDGFR α (1:500; R&D Systems), anti-pPDGFR α (1:1000; R&D Systems), anti-FGFR1 (1:1000; Cell Signaling), anti-pFGFR (1:1000; Cell Signaling), anti-ZEB1 (1:500; Abcam), anti-cleaved Caspase-3 (1:1000; Cell Signaling) and anti- β -actin (1:50.000; Sigma). Antibody binding was detected with a secondary antibody coupled to horseradish peroxidase using enhanced chemiluminescence detection reagents (Amersham).

Histology and immunohistochemistry

Tumors were fixed in 4% formaldehyde overnight at 4 °C, paraffin-embedded and sectioned at 4 μ m. For immunofluorescence or immunohistochemical staining, antigens were retrieved in 10 mM sodium citrate (pH 6.0). Tumor sections were blocked with 5% horse serum or 5% BSA in PBS for 1 h at room temperature and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. The primary antibodies used were anti- β -catenin (1:150; BD Bioscience), anti-E-cadherin (1:100; Cell Signaling), anti-Vimentin (1:500; Abcam), anti-K14 (1:400; Covance), anti-K8 (1:100; Covance), anti-FGFR1 (1:80; Cell Signaling), anti-phosphorylated H3 (Ser10) (1:200; Cell Signaling) and anti-CD31 (1:50; BD Bioscience). Tumor sections were then incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. The MOM Basic Kit (Vector Laboratories) was used for mouse monoclonal antibodies (following the manufacturer's instructions). To visualize EGFP or mCherry directly, tumors were previously fixed in 4% formaldehyde for 30 min, washed for 30 min with PBS and then embedded in OCT. Nuclei were stained using 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for immunofluorescence. Samples were imaged on a Leica DM6000B microscope and a Leica TCS SP5 confocal microscope.

Reverse transcription and quantitative PCR

RNA samples were DNase-treated with Turbo DNA-free (Ambion). The High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) was used for reverse transcription. Real-time PCR reactions were performed on an Applied Biosystems 7900HT System, using PCR Master Mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems) and TaqMan Gene Expression Assays, or were performed using SYBR Green Mix (Applied Biosystems). All data were normalized with respect to *Gapdh* and *Hprt1* expression for human and mouse samples.

cDNA amplification and microarray analysis

cDNA amplification by picoprofiling was performed as previously described (3). cDNA was purified using GeneElute PCR Clean-up columns (Sigma Aldrich). 7 µg cDNA was used for hybridization in an Affymetrix Mouse Genome 430 PM strip array. Summary expression values for all probe sets were calculated using the RMA algorithm as implemented in the affy package from Bioconductor, written in the R statistical language (4). To identify genes that were differentially expressed between L-CSCs and E-CSCs, whole gene expression profiles of L-CSC populations ($\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells isolated from four independent PD/S-SCCs) from three different lineages were compared with their respective E-CSC populations ($\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells isolated from their respective WD-SCCs). Genes differentially expressed in L-CSCs from all lineages were detected using the empirical Bayes (eBayes) adjusted *t*-test, as implemented in the Limma package. WD-SCC and PD/S-SCC conditions and the sample type were considered when the linear model was developed. Multiple testing was corrected by the Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) method. Differentially expressed genes were defined as those exhibiting an at least two-fold change and having an FDR *P*-value of < 5%. To identify the biological processes that are over- or under-represented by the differentially expressed genes, hypergeometric tests for association of Gene Ontology (GO) biological process categories and genes were performed using the GOSTats package (5). Hierarchical clustering of the expression profile was performed using the Euclidean distance and Ward's minimum variance as the agglomeration method.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Fuerer C, Nusse R. Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway. *PLoS One* 2010;5(2):e9370.

2. Muñoz P, Blanco R, Flores JM, Blasco MA. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat Genet* 2005;37(10):1063-71.
3. Gonzalez-Roca E, Garcia-Albeniz X, Rodriguez-Mulero S, Gomis RR, Kornacker K, Auer H. Accurate expression profiling of very small cell populations. *PLoS One* 2010;5(12):e14418.
4. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2004;20(3):307-15.
5. Falcon S, Gentleman R. Using GOSTATS to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2007;23(2):257-8.

ARTÍCULO 2: EGFR-targeted therapy blocks epithelial-like cutaneous carcinoma growth and FGFR signaling activation leads to therapy resistance

Adrià Bernat-Peguera¹, Juan Navarro-Ventura¹, Victoria da Silva-Diz^{1,2}, Laura Lorenzo-Sanz¹, Rosa M. Penin³, Mattia Bossio⁴, Diana Pérez Sidelnikova⁵, Oriol Bermejo⁵, Joan Maria Viñals⁵, Eva González-Suárez¹, Salvador Capella-Gutierrez⁴, Alberto Villanueva⁶, Francesc Viñals^{6,7} and Purificación Muñoz¹

1. Oncobell Program, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain; 2. Present Address: Rutgers Cancer Institute of New Jersey, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA; 3. Pathology Service, Hospital Universitario de Bellvitge/IDIBELL, Barcelona, Spain; 4. Plastic Surgery Unit, Hospital Universitario de Bellvitge/IDIBELL, Barcelona, Spain; 5. Barcelona Supercomputing Center, Barcelona, Spain; 6. Laboratory of Translational Research, Catalan Institute of Oncology (ICO/IDIBELL), Barcelona, Spain; 7. Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain

Manuscrito pendiente de publicación

RESUMEN EN CASTELLANO

Actualmente, los cSCC avanzados, localmente recurrentes y/o metastásicos, así como aquellos que no pueden ser eliminados quirúrgicamente, son tratados mediante radioterapia o quimioterapia, con escasos beneficios clínicos. Hasta el momento, no se han aprobado terapias dirigidas para el tratamiento de estos pacientes. Los ensayos clínicos realizados para evaluar la respuesta de los cSCCs avanzados y/o metastásicos a diferentes inhibidores de EGFR mostraron que un elevado porcentaje de los pacientes eran refractarios al tratamiento. Sin embargo, es importante destacar que en estos estudios no se realizó una caracterización molecular de los tumores, de forma que no fue posible determinar los mecanismos implicados en la resistencia, o qué pacientes podrían beneficiarse de estos tratamientos. Esto pone de manifiesto la necesidad de estudiar los mecanismos moleculares que controlan el crecimiento y metástasis de los cSCCs, con el objetivo de identificar posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de estos pacientes.

En este estudio, hemos generado modelos de ratón (*patient-derived xenograft*, PDX) a partir de muestras de pacientes de cSCC de diferentes estadios de progresión tumoral. Estos cSCC-PDXs recapitulan las características histopatológicas y moleculares de sus respectivos tumores primarios, lo cual les convierte en unos modelos preclínicos excelentes. Nuestros resultados demuestran que los cSCC-PDXs que conservan características de diferenciación epitelial (G2/G3-SCCs), como la expresión de E-Cadherina y EpCAM, inducen de forma autocrina la vía de EGFR, la cual promueve la proliferación y supervivencia de sus células tumorales. Contrariamente, esta vía de señalización está atenuada en las células tumorales de los cSCC-PDXs indiferenciados y que muestran características mesenquimales (G4-SCCs). El tratamiento con inhibidores de EGFR, como el gefitinib, no solo bloquea el crecimiento de los G2/G3-SCCs, sino que provoca una fuerte regresión de estos tumores. Sin embargo, alrededor del 30% de los cSCCs de tipo epitelial desarrollan resistencia después de una exposición prolongada al fármaco. La comparación de las secuencias de RNA (RNA-seq) de las células tumorales aisladas de cSCC-PDXs control y resistentes al gefitinib de tres pacientes diferentes, demuestra que la resistencia no es debida a la adquisición de mutaciones en EGFR, o en otros genes previamente asociados con resistencia a inhibidores de EGFR en otros tipos de tumores. Tampoco se han identificado mutaciones que sean adquiridas de forma común en los diferentes cSCC-PDXs resistentes al fármaco. Sin embargo, hemos observado que las células tumorales resistentes a gefitinib inducen la expresión de diferentes isoformas del receptor de FGF y de su ligando FGF2, y la inhibición farmacológica y genética de la vía de FGFR bloquea el crecimiento de los cSCC-PDXs resistentes. Estos resultados demuestran que la vía de FGFR controla la proliferación/supervivencia de células cuando la vía de EGFR está bloqueada, siendo un mecanismo de resistencia a la terapia dirigida a EGFR en los cSCCs. Por lo tanto, estos resultados

sugieren que la terapia dirigida contra EGFR podría ser una aproximación terapéutica apropiada para el tratamiento de los cSCCs con características epiteliales, y el tratamiento combinado con inhibidores de EGFR y FGFR podría ser efectivo para evadir la resistencia generada a los inhibidores de EGFR.

ABSTRACT

Most of cSCCs are successfully treated by surgery, but high-risk, recurrent and/or metastatic tumors are subsequently treated with radio or chemotherapy. Cisplatin-based therapies have a high toxicity and these strategies, along with radiotherapy give poor clinic responses. Clinical trials performed with small series of patients with advanced and metastatic cSCCs showed a limited response to EGFR-targeted therapies and disease progression in a high subset of cases. However, molecular traits associated with an optimal response to EGFR inhibitors, as well as mechanisms responsible of cSCC growth and resistance to EGFR-targeted therapies are still unclear. Here, we generated patient cSCC-derived xenografts (cSCC-PDXs), which recapitulate most of histopathologic and molecular features of parental patient cSCCs. We showed that cSCCs that conserve epithelial traits, as MD/PD-SCCs (G2/G3 grade) exhibit a strong activation of EGFR signaling, which promotes tumor cell proliferation and survival, in contrast to mesenchymal-like PD/S-SCCs (G4 grade). Gefitinib treatment strongly blocked epithelial-like cSCC-PDX growth, but resistance was acquired after long-term treatment in 30% of these tumors. Gefitinib resistance was not related to emerging *EGFR* or *RAS* mutations, and no gene alterations were commonly identified in resistant tumors from different cSCC-PDXs. We demonstrated that resistance to EGFR inhibitor is induced by a switch from EGFR to FGFR signaling, which bypass the therapy pressure, allowing tumor cell proliferation and survival upon gefitinib treatment. Pharmacological and genetic inhibition of FGFR signaling significantly overcomes resistance to EGFR inhibitor. Altogether, these findings suggest that EGFR-targeted therapy may be appropriate for the treatment of a large group of epithelial-like cSCCs, while a combined EGFR- and FGFR- targeted therapy may be used to treat refractory cSCCs to EGFR inhibitors.

INTRODUCTION

Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is the second most prevalent form of nonmelanoma skin cancer and its incidence has increased over the last decades (1). Most cSCCs conserve some epithelial differentiation features, being considered as well- and moderate-differentiated SCCs (WD/MD- or G2-SCCs). A subset of cSCCs exhibit poorly differentiated traits (PD- or G3-SCCs) and are eventually undifferentiated and spindle-shaped (PD/S- or G4-SCCs), being these histopathologic traits, along with tumor size, invasion grade and perineural invasion, associated with an enhanced recurrence and metastasis (2). Most of cSCCs are successfully treated by surgical excision. Advanced and non-resectable tumors are eventually treated with radiotherapy and chemotherapy (1, 3). However, these therapies have shown limited clinical outcome (4), and in most cases patients showed disease progression (5, 6). Immunotherapy based on interferon alpha combined with retinoic acid and/or chemotherapy has been tested in several clinical trials with still scarce results (7-9). Recently, FDA approved a treatment for advanced and metastatic cSCCs based on PD-1 blockade with Cemiplimab, an immune checkpoint inhibitor. Despite a response was reported in half of the treated patients, a considerable percentage of them suffered disease progression (10). Thus, the identification of mechanisms that control cSCC growth and metastasis is critical in order to design effective targeted therapies that enhance patient progression-free survival.

EGFR expression is frequently upregulated in solid tumors, as lung and colorectal carcinomas, glioblastomas and head and neck SCCs (HNSCCs) (11, 12) and more than 50% of advanced and/or metastatic cSCCs showed EGFR overexpression, but the relevance of this signaling pathway in this tumor type was unclear (13, 14). Activating mutations in EGFR are prevalent in lung cancers (15, 16), HNSCCs (17) and glioblastomas (18), while EGFR mutations or gene amplifications have been identified in a low percentage of cSCCs (14, 19, 39-41). Cetuximab, an antibody that blocks the activity of EGFR, was approved by FDA for the treatment of HNSCCs and colorectal carcinomas without RAS activating mutations (20-24). Tyrosine kinase inhibitors, such as gefitinib, erlotinib and lapatinib, which act blocking EGFR phosphorylation and signaling, were approved for the treatment of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Furthermore, gene amplification and mutations that lead to EGFR constitutive activation, increase the response to these inhibitors in lung tumors (25-29).

Therapies based in EGFR inhibitors have been tested for cSCCs in clinical trials (ClinicalTrials.gov Identifiers: NCT00240682, NCT01198028, NCT00054691, NCT00126555, NCT01059305). A low response ratio (complete and partial responses of 15-27%) was reported in small series of patients with advanced and metastatic skin SCCs who were treated with gefitinib, erlotinib or cetuximab as a first-line of treatment, with a median duration of response

of 6.8 months (30, 31). Disease progression was observed in 17-19% of these cases, even after an initial favorable response. However, predictive biological markers of response or even molecular traits of tumor cells were lacking in most of these studies, and only expression EGFR was previously analyzed in patient tumors (30). However, as previously reported in other tumor types (32-34), no correlation between EGFR expression and response to EGFR-targeted therapy was observed in advanced cSCCs (30).

Our previous studies demonstrated that EGFR is strongly expressed in cancer stem cells (CSCs) of mouse skin WD-SCCs, and an autocrine activation of this pathway promotes the proliferation and survival of these cells. In contrast, EGFR signaling was attenuated in CSCs of PD/S-SCCs, which strongly induced FGFR1 and PDGFR α signaling to promote the aggressive growth and enhanced metastasis, respectively, of these advanced tumors (35, 36). Furthermore, a strong expression of EGFR and ligands was observed in WD/MD-SCCs from patients, whereas this was strongly downregulated in patient PD/S-SCCs (33). However, it was unclear if EGFR signaling was activated in early cSCCs from patient and the relevance of this signaling pathway in tumor growth.

Here, we show that cSCCs that conserve epithelial traits, as MD/PD-SCCs (G2/G3 tumors), exhibit a strong activation of EGFR signaling, which promotes tumor cell proliferation and survival. Gefitinib treatment strongly blocked epithelial-like cSCC-PDX growth, but resistance was acquired after long-term treatment in 30% of patient-derived tumors. Pharmacological and genetic inhibition of FGFR signaling significantly overcomes resistance to EGFR inhibitor, suggesting that combined EGFR- and FGFR- targeted therapy may be used to treat refractory cSCCs to EGFR-targeted therapy.

MATERIAL AND METHODS

Human skin SCC samples

Fresh samples of human skin SCCs were supplied by the Plastic Surgery and Pathology Units of the Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL). Samples were recovered in RPMI 1460 (Life Technologies) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies), 2mM HEPES (Sigma) and 1% of antibiotic/antimycotic (Ab/Am) (Sigma) shortly after the surgery. Collection sample protocol was supervised and approved by the Ethical Committee of Clinical Research of Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL). All patients were informed beforehand and signed the consent to participate in this study.

Generation of patient-derived xenografts (PDX) of cSCCs

Fresh patient cSCC samples (2-4 mm³) were engrafted in the back skin of 6-week-old male NOD-*scid* IL2R γ ^{null} (NSG) mice. Tumor growth was monitored and volume was calculated every seven days ($V = \pi/6 \times L \times W^2$). Tumors with a critical size (1500-2000 mm³) were surgically excised and serially engrafted in new NSG mice. When resected mice presented symptoms of poor health, they were sacrificed and examined for metastatic lesions. Animal housing, handling, and all procedures involving mice were approved by the Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL) Ethics Committee (Barcelona, Spain), in accordance with the Spanish national regulations.

Isolation of SCC cells and flow cytometry assays

Patient cSCC and cSCC-PDX samples were minced and incubated in RPMI medium containing 10% FBS, 2mM HEPES, 1% Ab/Am, 60 U/ml collagenase I (Sigma) and 0.7 U/ml dispase (Life Technologies) overnight at 37 °C. Cell suspensions were filtered and then depleted of red blood cells by incubating with ACK lysis buffer (Lonza). For endothelial cell depletion, cell suspensions were incubated with anti-CD31 antibody for 30 min at 4 °C, and then with Dynabeads® anti-rat for 30 min at 4 °C. Isolated tumor cells were then plated and cultured as described below.

For flow cytometry analysis, isolated tumor cells were incubated in blocking buffer (5% FBS in PBS) were incubated with PE-labeled α 6-integrin (CD49f) and anti-EpCAM-FITC antibodies for 30 min at 4 °C (Supplementary Table S1). For FACS-sorting assays, isolated tumor cells were incubated with PE-labeled α 6-integrin (CD49f) in blocking buffer for 30 min at 4 °C. Cells were then washed with 0.5% BSA, 2 mM EDTA in PBS, and resuspended in analysis buffer (2% FBS, 2 mM EDTA in PBS). Live cells excluded DAPI (Sigma) staining. FACS-sorting and analysis were carried out with BD Bioscience Aria and Fusion II equipment.

Cell cultures and *in vitro* generation gefitinib-resistant cells

Tumor cells isolated from patient or PD/S-SCCs (SCC11 cells) were grown in basic medium, composed by DMEM-F12 medium (Life Technologies), B27 (Life Technologies) and penicillin/streptomycin (PAA Laboratories). Tumor cells isolated from patient samples (SCC10 and SCC24) or MD/PD-SCC-PDXs (SCC16 and SCC34 cells) were grown in basic medium alone (SCC10 and SCC34) or supplemented with EGF (20 ng/mL; Sigma) (SCC16 and SCC24). Cells were cultured and grew at 37 °C in a humidified, 5% CO₂ incubator, as previously reported (23). To generate gefitinib resistant cell cultures, SCC10, SCC16 and SCC24 cells were grown in basic medium with 2 μ M gefitinib and FGF2 (10 ng/mL; Peprotech) until they reached the confluence.

Then, surviving/tolerant cells were splitted and cultured with increasing doses of gefitinib in the presence of FGF2, until cells were able to exponentially grow in 10 μ M gefitinib.

Lentiviral cell transduction

To knockdown the expression of FGFR2B a TRIPZ sh-control and Doxycycline-inducible TRIPZ sh-FGFR2 lentivirus vector (Dharmacon) was used. Lentiviral particles were produced in 293T cells using standard protocols. SCC10, SCC16 and SCC24 control (Control) and gefitinib-resistant cells generated *in vitro* (iGefR cells), as well as tumor cells isolated from GefR1 SCC10-PDXs were plated and when reached a 50% of confluence, cells were incubated with 293T medium containing lentivirus particles, following standard infection protocols. Then, transduced cells (sh-control and sh-FGFR2 cells) were selected in presence of puromycin (1 μ g/ml; Sigma). To induce the expression of shRNA, transduced cells were incubated in presence of doxycycline (1 μ g/mL) for 48 or 72 h and FGFR2B interference was tested by qRT-PCR.

Cell proliferation assays and treatments

To analyze tumor cell proliferation, 4 x 10³ mesenchymal-like cells (from G4 PD/S-SCCs) or 1000-6000 epithelial-like cells were plated in six replicates on 96-well plates containing basic medium. To evaluate the effect of gefitinib in the absence or presence of EGF (20 ng/mL; Sigma), basic medium without or with gefitinib (LC Laboratories) or EGF was immediately added. To evaluate the effect of EGFR and FGFR inhibitors, epithelial-like cells (from G2/G3 MD/PD-SCCs) were incubated for 24 h with the basic medium. Then, medium was changed by basic medium without or with gefitinib, afatinib (Selleck Chem), cetuximab (Merck KGaA), PD173074 (LC Laboratories) or NVP-BGJ398 (MedChem), and without or with EGF (20 ng/mL), FGF2 (10 ng/mL) or FGF7 (10 ng/mL, Peprotech).

To determine the effect of FGFR2B knockdown on tumor cell proliferation, sh-control and sh-FGFR2B cell were previously incubated with doxycycline (1 μ g/ml) for 48 h. Then, 1000-2000 sh-control and sh-FGFR2B cells were plated in six replicates on 96-well plates in basic medium containing doxycycline (1 μ g/mL). FGF2 and FGF7, or these factor plus gefitinib (5 μ M; in the studies with iGefR cells) were added after 12 h. Culture medium containing factors and inhibitors was renewed every 3 days. Each assay was carried out 2-3 times. Cell proliferation/survival were measured by calculating the mean (\pm SE) absorbance at 560 nm after 6 days of treatment by using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma).

To evaluate the status of EGFR signaling, 1.5 x 10⁶ epithelial-like tumor cells were seeded and incubated for 24 h in basic medium. Then, cells were treated for 2 h with different doses of

gefitinib. During the last 10 min of treatment, EGF was added to the corresponding culture medium. In the experiments focused on comparing the status of EGFR signaling in control and iGefR cells, 1.5×10^6 iGefR cells were seeded and incubated for 24h with medium containing 10 μ M of gefitinib and FGF2. Then, gefitinib and FGF2 were removed 12 h before starting the treatments, and treated with the corresponding factors and inhibitors. At the end of treatments, plates were placed on ice, washed with cold PBS and recovered for analysis by western blot.

Western blot assays

Whole-cell extracts from tumor and culture cells were prepared in lysis buffer, containing 50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 350 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% glycerol, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 2 mM NaF, 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM DTT, PhosSTOP (Roche), Complete (Roche) and 0.1% SDS (Invitrogen), as previously described (22). After transfer, proteins were incubated overnight at 4 °C with antibodies anti-E-Cadherin, anti-Vimentin, anti-EpCAM, anti-ZEB1, anti-EGFR, anti-pEGFR, anti-AKT, anti-pAKT, anti-ERK, anti-pERK, anti-FGFR1, anti-PDGFR α , anti-PDGFR β and anti- β -actin-HRP (Supplementary Table S1). Antibody binding was detected with a mouse, rabbit or goat secondary antibody coupled to horseradish peroxidase using enhanced chemiluminescence detection reagents (Amersham).

Tumor cell grafting and *in vivo* treatments

For limiting-dilution assays, tumor cells isolated from MD/PD-SCCs and PD/S-SCCs were serially diluted in 100 μ l of DMEM and mixed with 100 μ l of DMEM containing 1×10^6 newborn dermal fibroblasts (1:1 v/v). Mixed tumor cells and fibroblast were subcutaneously injected in NSG mice. Tumor growth was monitored every 2-3 days until they reached a critical size, at which time they were surgically excised. ELDA software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda>) was used to calculate the tumor-initiating cell frequency.

To determine the effect of pharmacological inhibition of EGFR, cSCC-PDX samples were engrafted on NSG mice. When tumors were detectable (approximately 380 mm³), mice were randomly assigned to a control or inhibitor treatment group and were orally treated with gefitinib (LC Laboratories; 75 mg/kg; diluted in sterile water with 0.05% Tween 80), or vehicle every 48 hours. Tumor volume was monitored every 2 days. The treatment was continued until the mice received 21 doses of the drug and gefitinib-treated tumors exhibited a stable and significant reduction of tumor growth. Then, treatment was halted, allowing tumor relapse in the absence of

gefitinib. Samples of relapsed tumors were engrafted in new NSG mice and when they reached an approximate size of 380 mm³, mice were treated again with gefitinib to test the acquisition of gefitinib resistance. We repeated this process for one or two cycles more and the frequency of sensitive- and resistant-tumors was calculated after each treatment cycle, in each cSCC-PDX model.

To determine the effect of pharmacological inhibition of FGFR on resistant tumors, mice carrying detectable GefR tumors were randomly separated in two groups: Control group, which were treated every two days with gefitinib, following the above described regimen, or NVP-BGJ398 group, which were treated with gefitinib every two days and daily with NVP-BGJ398 (MedChem; 25 mg/kg; diluted in acetate buffer and PEG300 1:1 v/v).

To analyze the effect of FGFR2 knockdown on GefR tumor growth, 3 x 10⁶ sh-control and sh-FGFR2B iGefR SCC10 cells or sh-control and sh-FGFR2B GefR1 SCC10 cells, which were previously treated with doxycycline for 72 h, were injected in NSG mice, as above described. When tumors reached an approximate size of 380 mm³, mice were orally treated with gefitinib every 48 hours, and doxycycline (2 mg/mL) was continuously administered in the bottle water, which was renewed every 48-72 hours. Tumor volume was monitored every 2 days, and they when they reached a critical size were surgically excised.

Histology and immunohistochemistry assays

Tumor and lung samples were fixed in 4% formaldehyde overnight at 4 °C, paraffin-embedded, and sectioned at 4 µm. For histopathological analysis of tumors and lung metastatic lesions, tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. For E-Cadherin, Vimentin, ZEB1 and phosphorylated H3 immunodetection, tumor paraffin-embedded sections were used and antigens were retrieved in 10 mM sodium citrate solution (pH 6.0). Tumor sections were then blocked with 3% horse serum or 5% BSA in TBS for 1 h at room temperature and incubated with primary antibodies (Supplementary Table S1) overnight at 4 °C. Anti-rabbit or anti-mouse Alexa-488 or Alexa-568 secondary antibodies were used for 1h at room temperature to detect antigen-primary antibody binding. Nuclei were stained with 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and images were obtained from a Leica TCS SP5 confocal.

For tumor viability analysis, Image J Weka Training Segmentation Plugin was used. This plugin allows selecting reference viable and necrotic regions from each tumor section (training), previously checked by a pathologist, and provides a labeled result of whole tumor section, which allows calculating percentages of viable and necrotic areas.

Reverse transcription and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from tumors and cells using Trizol Reagent (Invitrogen). Reverse-transcription reactions were carried out with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). SYBR Green Mix (Applied Biosystems) and primers described in Supplementary Table S2 were used for real-time PCR reactions, by using Applied QuantStudio5 machine. *GAPDH*, *HPRT* and *GUSB* were used to normalize the gene expression for all samples. mRNA levels were shown as relative to *GAPDH* mRNA, or alternatively as fold change, in which mean of mRNA levels relative to three housekeeping was calculated.

RNA sequencing, gene expression and variant calling

Total RNA was isolated from FACS-sorted tumor cells by using RNAeasy Mini Kit (Qiagen). RNA-Sequencing assays were carried out at the Center for Genomic Regulation (CRG, Barcelona, Spain). Strand-specific 50-bp paired-end reads were generated using a HiSeq 2500 sequencer (Illumina). The quality of the fastq files was checked using the FastQC and the Qualimap (rnseq module – version 2.2.1) software. An estimation of ribosomal RNA in the raw data was obtained with riboPicker (version 0.4.3). Reads were aligned with the STAR mapper (version 2.5.2a) to release 88 of the Homo sapiens ENSEMBL version of the genome (GRCh38/hg38 assembly). A raw count of reads per gene was also obtained with STAR (quantMode GeneCounts option). The R/Bioconductor package DESeq2 (version 1.20.0) was used to assess differential expression between experimental groups (Wald statistical test + False Discovery Rate correction). Prior to processing the differential expression analysis, genes for which sum of raw counts across all samples were less than 2 were discarded. Genes with >2-fold change and *p*-value adjusted > 0.05 were considered differentially expressed. The lists of upregulated and downregulated genes were functionally classified according to the Gene Ontology (GO) database.

For variant calling and annotation, samples were processed using GATK v 3.6 RNA-Seq variant calling best practices (<https://gatkforums.broadinstitute.org/gatk/discussion/3892/the-gatk-best-practices-for-variant-calling-on-rnaseq-in-full-detail>) and annotated using ENSEMBL VEP (78). Rare (Allele Frequency < 1% in population [<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/531210v2>], well covered (coverage \geq 8) nonsynonymous variants were selected and variants with more than 5 supporting reads for alternative allele are kept (<https://wellcomeopenresearch.org/articles/2-6>).

For control cSCC-PDX mutation identification, we searched for variants affecting the same gene in the 3 control cSCC-PDX replicates from each model (SCC10, SCC16 and SCC24). Both heterozygous (0/1) and homozygous genotype (1/1) calls have been included in the analysis. For

GefR cSCC-PDX mutation analysis we searched for specific variants present in at least 2 of 3 GefR cSCC-PDX replicates (0/1 and 1/1) and absent in control cSCC-PDX from each model. Moreover, we selected those mutations identified as heterozygous (0/1) in control cSCC-PDX and heterozygous in GefR cSCC-PDX replicates from each model. In all analysis, at least 5 alternative reads were required for kept the mutation.

Genomic DNA isolation and Sanger sequencing assays

To isolate genomic DNA, frozen cSCC-PDXs and patient samples were lysed overnight at 55 °C in lysis buffer containing 1% SDS and 10 µg/mL proteinase K. DNA was extracted and precipitated using phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and then dissolved in 10 mM Tris and 1 mM EDTA. To validate some of the identified mutations, PCR amplification of exon regions containing the corresponding mutation was performed using primers shown in Supplementary Table S2. Resulting DNA fragments were checked using a 2% agarose gel. PCR products were cycle-sequenced using Big Dye Terminator chemistry (Applied Biosystems) and the same primers used for PCR amplification with DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

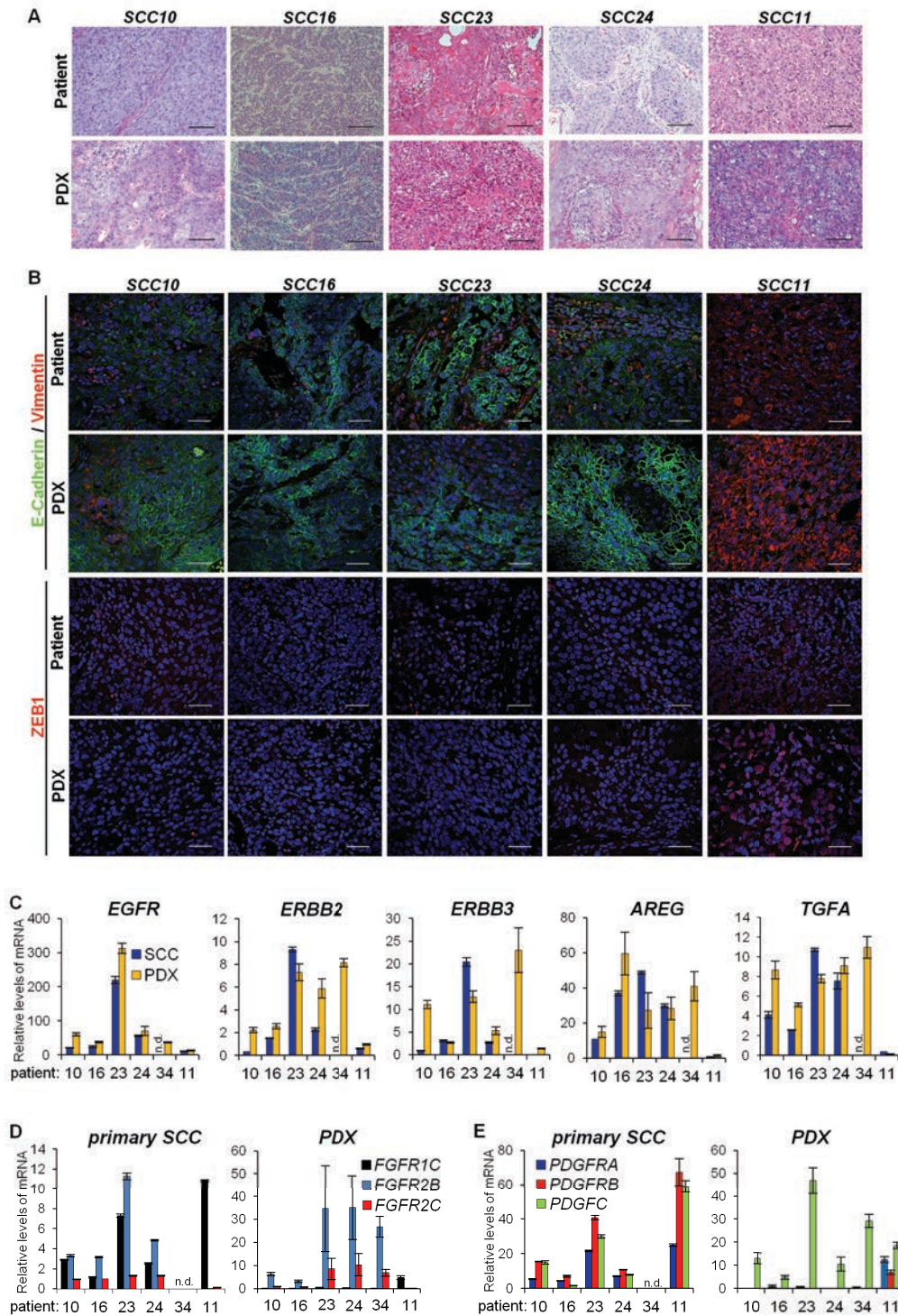
Prism 5.0 Software (GraphPad software, San Diego, CA) was used for statistical analysis. Student's *t*-test (two-tailed) was used to determine the significance of differences between groups in each experiment. Shapiro-Wilk Normality and F-Fisher tests were used to check the normal distribution of data and similarity of variances between compared groups, respectively. For differential gene expression analysis, Wald statistical test + False Discovery Rate correction were used and genes with *p*-value adjusted > 0.05 were considered differentially expressed between compared groups.

RESULTS

Generation and characterization of patient-derived xenografts of cutaneous SCCs (cSCC-PDXs)

To identify signaling pathways controlling patient cSCC growth, which may be the base of targeted therapies, we previously analyzed the expression of different tyrosine-kinase receptors and their ligands in a subset of patient samples of WD/MD-SCCs and advanced PD/S-SCCs of skin. These studies showed that *EGFR* and some of their ligands as *AREG*, *HB-EGF* and *TGFA* were strongly expressed in early cSCCs as compared to PD/S-SCCs (35). To determine the relevance of EGFR signaling in promoting tumor cell proliferation and survival in patient cSCCs at different stages of progression, as well as the effect of EGFR inhibitors on cSCC growth, we generated different cSCC-PDXs by engrafting surgical samples of patient cSCCs with different grades and histopathologic features in immunodeficient mice (see Material and Methods). This subset of patient samples included two MD-SCCs (G2 grade), three MD/PD-SCCs (G3 grade) and an undifferentiated and advanced PD/S-SCCs (G4 grade) (Supplementary Table S3). Most of PDXs conserved the histopathologic features of parental patient samples (Fig. 1A), although some showed a higher (SCC23-PDXs) or even a lower (SCC34-PDXs) grade than parental samples. These observations suggest that these patient tumors exhibited strong intra-tumor heterogeneity and specific tumor cell populations may be selected during PDX establishment (Supplementary Table S3). In accordance to our previous studies in patient tumors and lineages of mouse cSCC progression (35, 36), we observed that patient G2/G3 cSCCs conserved the expression of E-cadherin and EpCAM epithelial markers, whereas G4 SCC11 lost the expression of these markers and strongly induced the expression of EMT and mesenchymal markers, as Vimentin, ZEB1 and SNAIL. Furthermore, the expression of these epithelial and mesenchymal markers was conserved in their respective cSCC-PDXs (Fig. 1B; Supplementary Fig. S1A and S1B).

In addition, cSCC-PDXs recapitulated the expression profile of different tyrosine-kinase receptors and ligands of their respective parental samples, following a specific pattern in accordance to their epithelial- or mesenchymal-like features. In this regard, epithelial-like cSCC-PDXs (G2/G3 tumors) exhibited a strong expression of *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3* and ligands, as well as *FGFR2B* and *FGFR2C*, whereas these receptors were strongly downregulated in mesenchymal-like SCC11-PDX (Figs. 1C and 1D). In contrast, the expression of *FGFR1c*, which is mostly associated with fibroblast and mesenchymal cells (37) was upregulated along with *PDGFRA*, *PDGFRB* and *PDGFC* in SCC11-PDX and its respective parental tumor, in accordance with the mesenchymal features of these tumors (Figs. 1D and 1E) (35, 36).



To evaluate the expression of these receptors and ligands specifically in the cancer cell compartment, we established primary cultures from patient samples or cSCC-PDXs. Tumor cells from MD/PD-SCCs (G2/G3) grew as adherent cells, exhibiting strong cell-to-cell contacts and a strong expression of epithelial markers (Supplementary Figs. S2A-S2C). In contrast, tumor cells isolated from advanced PD/S-SCCs (G4) grew forming spheres, downregulated the expression of E-cadherin and EpCAM, induced the expression of EMT markers and were enriched in CSCs (Supplementary Figs. S2A-S2D). Indeed, limiting-dilution assays demonstrated that the frequency of tumor-initiating cells was significantly increased in mesenchymal-like cells derived from PD/D-SCCs (Supplementary Fig. S2D), in accordance with the aggressive growth of these tumors and their enhanced metastasis capability (Supplementary Table S3) (36), or that reported in advanced mouse skin SCCs (35, 38). Both, tumor cells derived from epithelial and mesenchymal-like cSCC-PDXs, recapitulated the expression of receptors and ligands of their respective cSCC-PDXs and parental patient samples (Supplementary Figs. S2E and S2F). These results suggest that the strong *FGFR1c* expression observed in parental epithelial-like SCC may be consequence of *FGFR1c*-expressing stromal fibroblast present in the patient samples (Fig. 1D). Altogether, our results indicate that, similarly to that described in mouse skin SCCs, signaling pathways controlling cancer cell proliferation and survival change during patient cSCC progression and therapy may be selected considering the epithelial or mesenchymal differentiation traits of cancer cells.

To determine the mutational and transcriptional landscape of these tumors, we performed RNA-Seq analysis of three epithelial-like cSCC-PDXs (SCC10-PDX, SCC16-PDX and SCC24-PDX). The number of genetic alterations (SNV), including missense variants, frameshifts, inframe insertions, deletions and stop gain ranged from 764 (SCC10-PDXs) to 856 (SCC24-PDXs), which affected from 501 up to 740 genes (Supplementary Table S4). Although these high mutation frequencies may be overvalued by contaminating germline events, they were in the range of those previously described in this tumor type (39-41). The comparison of gene alterations between these cSCC-PDXs showed strong differences in their genetic landscape (Fig. 2A), although 44 genes, including *FAT1*, *HAT1*, *KMT2A*, *KMT2D* and *RALA* were recurrently mutated in all these tumors (Fig. 2A), as previously reported in cSCCs (39-41). Mutations in *TP53* (66% of tumors) and *NOTCH* (mutations in *NOTCH1*, *NOTCH2* or *NOTCH3* in all PDXs) driver genes, besides a long subset of genes (Fig. 2B) were detected in a similar frequency as previously reported (39-41). No mutations were detected in *EGF*, *IGF1* and *FGF* receptor family members, neither in *RAS* genes (Fig. 2B; Supplementary Table S4), in accordance with the low frequency of these mutations detected in cSCCs (26-28). Analysis of a subset of mutations identified in each cSCC-PDX model were also detected in their respective parental patient tumors (Fig. 2C). Therefore, our cSCC-PDXs recapitulated most of the histopathological, molecular and regulatory pathways of primary

patient tumors, becoming exceptional pre-clinical models to evaluate the response of EGFR-targeted therapies to block cSCC growth.

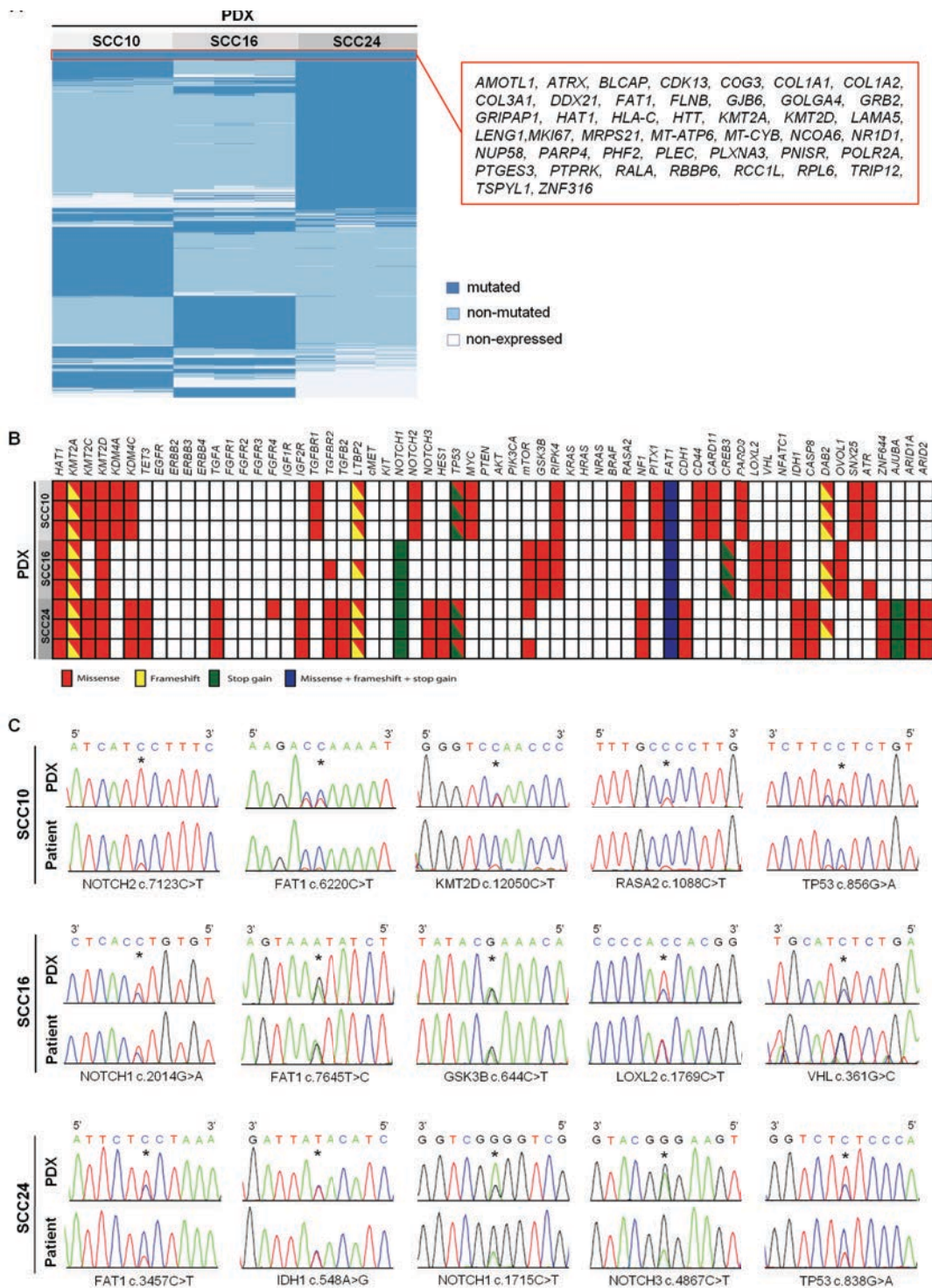


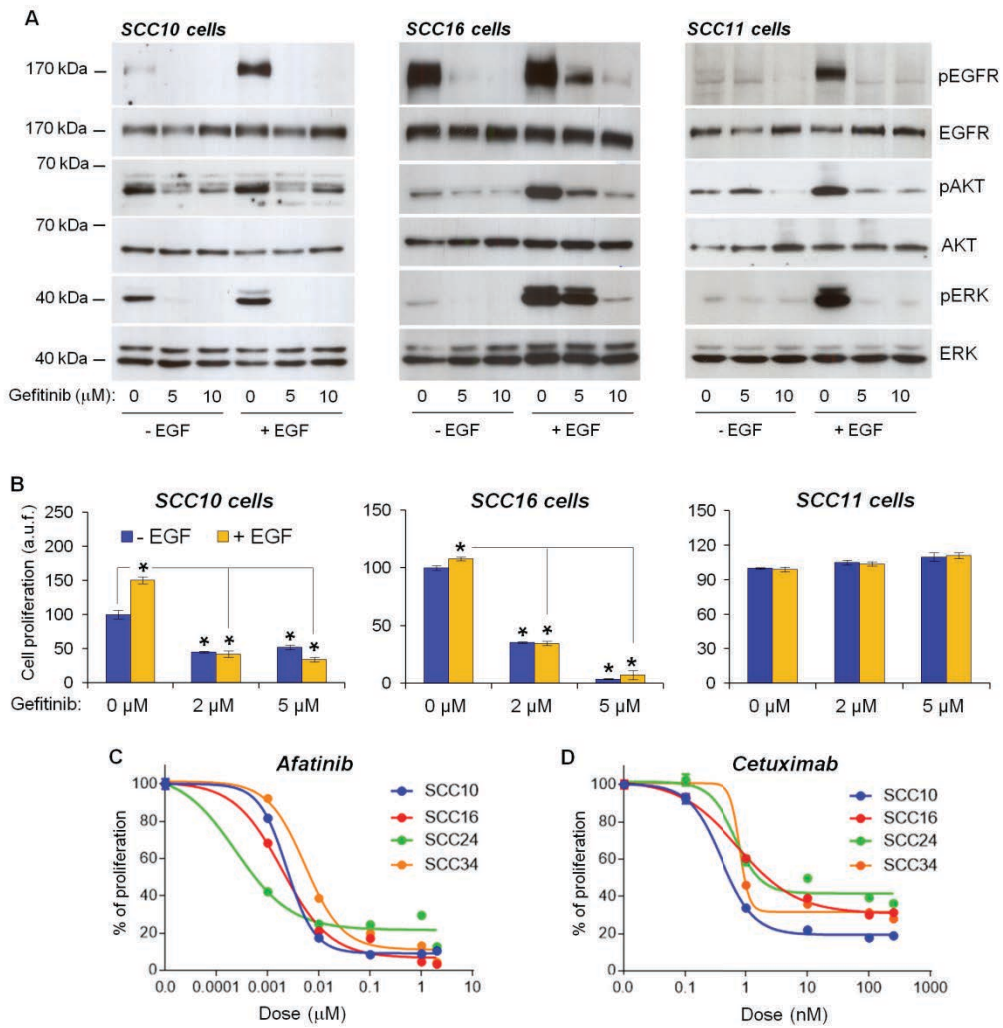
Figure 2. Genomic analysis of cSCC-PDX models. **A**, Heat map showing the comparison of mutated expressed genes in cSCC PDXs from three patient tumors, as analyzed from RNA sequencing data. Triplicates for each cSCC-PDXs are shown. Red box highlights genes commonly mutated in the three different cSCC-PDXs. **B**, Schematic representation of mutational status of a selection of genes in cSCC-PDXs from three patients. Gene selection was made in accordance with their previously reported implication in skin SCCs and in resistance to EGFR inhibitors in other tumor types. **C**,

Chromatograms showing the indicated mutation in DNA of cSCC10-PDX, cSCC16-PDXs and cSCC24-PDXs, and their respective patient cSCCs, as analyzed by Sanger sequencing. Analyses were performed in three samples of each cSCC-PDX model. Forward (5'-3') or reverse (3'-5') sequences are indicated on the top of each chromatogram. * shows the mutation position.

EGFR signaling pathway promotes epithelial-like cSCC-PDX growth

Most cSCCs are detected at early stage of progression, being diagnosed most of them as G2 MD/PD-SCCs and G3 PD-SCCs (42). Given the strong expression of EGFR and ligands in these epithelial-like tumors, we evaluated the relevance of this signaling pathway in cancer cell proliferation and cSCC growth. We observed a significant EGFR phosphorylation in epithelial-like cSCC cells that were grown upon basal culture conditions (without added EGF to the culture medium), which was inhibited, along with the phosphorylation of AKT and ERK1/2 downstream effectors, in response to gefitinib treatment (Fig. 3A; Supplementary Fig. S3A). In addition, gefitinib significantly blocked tumor cell proliferation and survival, both in basal culture condition and after EGF stimulation (Fig. 3B; Supplementary Fig. S3B). Similarly, these cells showed a strong sensitivity to other well-characterized EGFR inhibitors, such as afatinib and cetuximab, being cell proliferation strongly reduced in response to these therapeutic agents (Figs. 3C and 3D). These results indicate that autocrine activation of EGFR signaling promotes the proliferation and survival of epithelial-like cSCC cells. In contrast, mesenchymal-like cells from PD/S-SCCs exhibited a reduced EGFR expression and phosphorylation (Supplementary Fig. S2F), and gefitinib treatment did not affect the proliferation and survival of these cells (Figs. 3A and 3B).

To determine the effect of gefitinib on *in vivo* cSCC growth, samples of SCC10-, SCC16- and SCC24-PDXs were engrafted in immunodeficient mice. When tumors were detectable (200-400 mm³), mice were randomly distributed in the control group, which were treated with vehicle solution, and the gefitinib group, which were orally treated with gefitinib (75 mg/Kg) every two days (Fig 4A). Gefitinib treatment strongly blocked the growth of these cSCC-PDXs generated from three independent patient samples (Figs. 4B-4D). To evaluate the effect of EGFR inhibitor on tumor regression, mice carrying SCC10- and SCC24-PDXs with a size closed to ethical endpoint (1000-2000 mm³) were treated with gefitinib during 20 to 30 days. Our results demonstrated that EGFR inhibition induced a significant regression in these cSCC-PDXs (Supplementary Fig. S4A), coinciding with a diminished tumor cell proliferation, as determined by phosphohistone H3 (Ser10) labelling (Supplementary Figs. S4E and S4F, central panel). Therefore, these results indicate that gefitinib treatment blocks the growth, and even promotes a strong remission of patient-derived MD/PD-SCCs that conserved epithelial-differentiation traits.



indicated tumor cells upon *in vitro* treatment with or without gefitinib and EGF. **B**, Proliferation of the indicated cSCC cells upon gefitinib and/or EGF treatment, as measured by MTT. Bars represent mean (\pm SE) of arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) of treated cells relative to their respective control cells growing without gefitinib or EGF. *, significant differences between groups (t -test; $P < 0.05$). **C** and **D**, Effect of afatinib (**C**) and cetuximab (**D**) on cSCC cell proliferation, as measured by MTT. Results show means (\pm SE) of arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) relative to their respective control cells.

Long-term gefitinib treatment leads resistance acquisition and cSCC relapse

Intrinsic or acquired resistance to EGFR-targeted therapies has been described in an important percentage of NSCLC and HNSCC patients (43, 44). Despite the apparent complete gefitinib response observed in our epithelial-like cSCC-PDXs, we wanted to determine if these tumors might eventually acquire resistance. To test this hypothesis, the gefitinib administration was interrupted 4 weeks after treatment starting, when tumor growth was stably blocked, and we evaluated the ability of residual tumor cells to relapse tumor growth (Figs. 4B-4D). Despite the dramatic initial response to EGFR inhibition, all gefitinib-treated tumors regrew after treatment withdrawal, indicating that a subset of surviving tumor cells was able to drive tumor relapse. To determine if these residual/persistent tumor cells were resistant to gefitinib, relapsed tumors from each cSCC-PDX model were engrafted in several immunodeficient mice, which were submitted to a continuous gefitinib treatment (Fig. 4A; Supplementary Fig. S4B). The 68.4% of relapsed SCC10-PDXs were resistant to EGFR inhibitor after this second treatment cycle (Fig. 4E; Supplementary Fig. S4B). In contrast, only the 25% and 17% of relapsed SCC16-PDXs and SCC24-PDXs, respectively, grew in presence of gefitinib (Figs. 4F and 4G; Supplementary Fig. S4B). To corroborate the gefitinib resistance of these tumors, they were submitted to one or two additional treatment cycles. Resistant cSCC-PDXs conserved the capability to grow in presence of gefitinib during the subsequent treatment cycles (100% of SCC10; 95.5%-100% of cSCC16-PDXs and 87.5% of cSCC24-PDXs), demonstrating the resistance of these tumor cells to therapy (Supplementary Fig. S4B). Resistant SCC10-PDXs (GefR SCC10) showed a growth kinetic similar or even faster than their respective control tumors, already at the second treatment cycle, whereas the growth of resistant SCC16-PDXs (GefR SCC16) was approaching to those of their controls during subsequent treatment cycles (Figs. 4E and 4F). These findings suggest that relapsed SCC16 tumors were still heterogeneous and resistant tumor cells were enriched during the continuous therapy pressure. In contrast, resistant SCC24-PDXs (GefR SCC24) showed a slower growth than control tumors even after subsequent treatment cycle (Fig. 4G). Further characterization of GefR tumors showed that these exhibited a tumor cell viability and proliferation ratio similar than their respective untreated control tumors (Supplementary Figs. S4C-S4F). Therefore, these results demonstrate that, despite an initial strong response to gefitinib, epithelial-like cSCCs become resistant to this EGFR inhibitor after long-term treatment with a frequency that is dependent of the intrinsic features of these tumors.

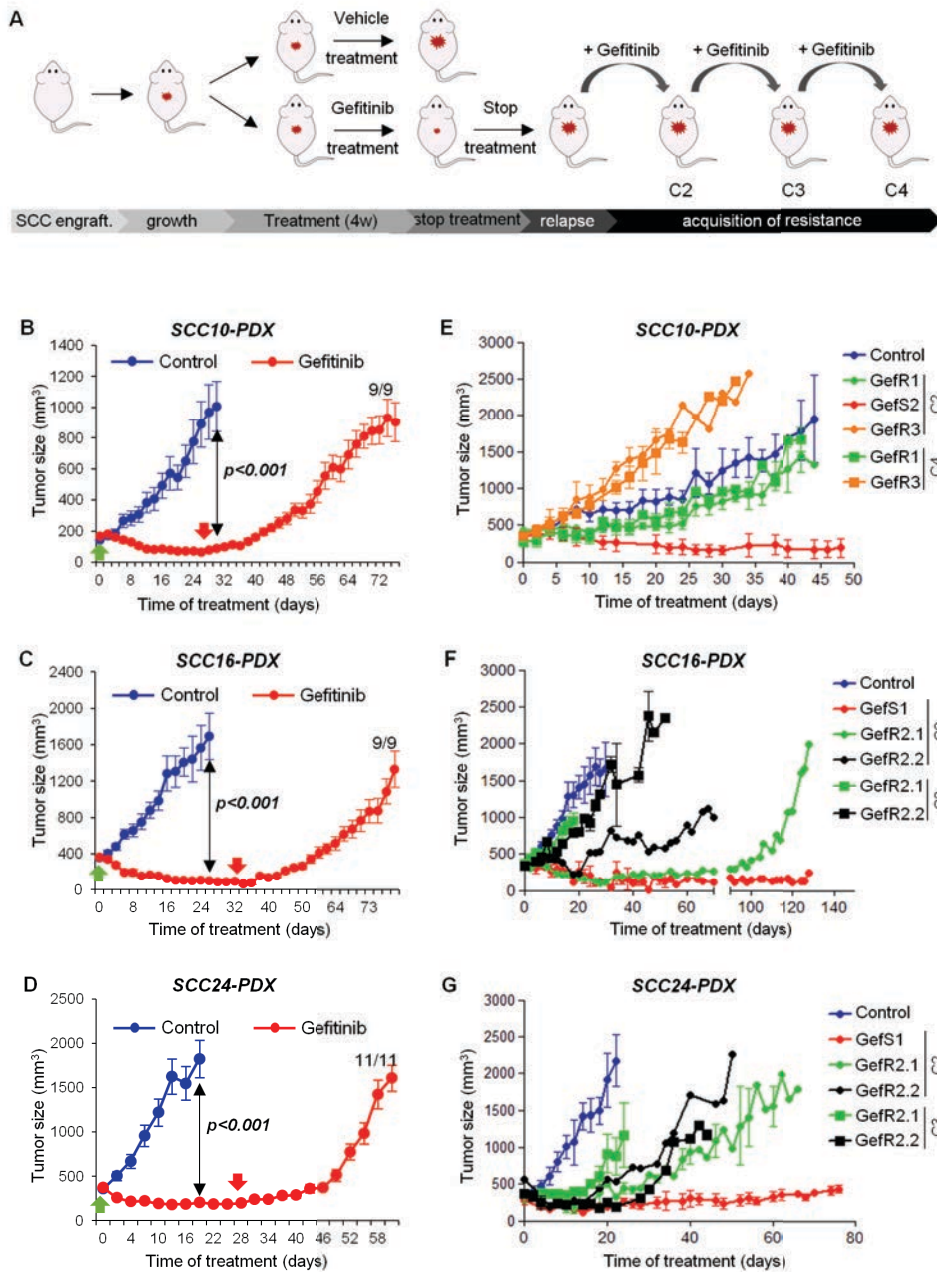


Figure 4. Gefitinib treatment strongly blocks epithelial-like cSCC-PDX growth, but resistance is acquired in a subset of tumors after long-term treatment. **A**, Schema of the experimental procedure to test the effect of EGFR inhibition in epithelial-like cSCC-PDXs and the generation of gefitinib-resistant (GefR) PDXs after several cycles of treatment. **B-D**, Growth kinetics (mean \pm SE of tumor size, mm³; 9-11 tumors per group) of the indicated cSCC-PDXs, which were treated with vehicle (Control) or gefitinib (75 mg/Kg). Green arrows indicate the treatment initiation and red arrows indicate treatment interruption. Number fraction indicates the frequency of relapsed tumors vs total gefitinib-treated tumors after treatment withdrawal. Black arrow indicates significant differences between the indicated groups (*t*-test; $P < 0.001$). **E-G**, Tumor growth kinetics (mean \pm SE of tumor size, mm³; 2-6 tumors per group) of indicated GefR and sensitive (GefS) PDXs after second, third and fourth treatment cycle (C2, C3 and C4) as compared to control PDXs treated with vehicle (Control).

A low number of common gene alterations are identified in gefitinib resistant cSCC-PDXs

In order to identify molecular mechanisms involved in resistance to EGFR inhibitor, we initially compared the global gene expression profiles between tumor cells isolated from control and GefR tumors from each of cSCC-PDX model (Supplementary Table S3). RNA sequencing analysis revealed that the expression of a long subset of genes was deregulated in resistant tumors compared to their respective control ones (1127 genes in GefR SCC10; 619 in GefR SCC16 and 884 genes in GefR SCC24) (Fig. 5A; Supplementary Table S5). The comparison of gene signatures of the three GefR cSCC-PDX models identified only one gene that was commonly upregulated (*ANKEF1*), and one common downregulated gene (*PDZK1*) (Supplementary Figs. S5A and S5B). *ANKEF1* was previously associated with recurrence in prostate cancer (45), but its function is currently unclear. On the other hand, *PDZK1* is a scaffolding protein that has been described as an oncogene or tumor suppressor, depending of tumor type. Indeed, *PDZK1* inhibits cell proliferation, migration and invasion in renal carcinoma (46) and suppress PI3K/AKT activation via PTEN phosphorylation in gastric cancer (47), whereas this protein promotes breast cancer cell proliferation. In this regard, Gene Ontology analysis showed that genes related to cell migration were commonly downregulated in the three analyzed GefR cSCC models (Figs. 5B and 5C). Therefore, although *PDZK1* downregulation may play a role in gefitinib resistance, its function as scaffolding protein may implicate the action of multiple unknown factors, which may even be different for each cSCC-PDX models. As no specific inhibitors of these proteins have been described, we focused on other factors or signaling pathways altered in GefR tumors, in order to identify a possible targeted therapy to overcome gefitinib resistance.

Given that amplification or acquisition of activating mutations of EGFR, downstream effectors or other tyrosine-kinase receptors genes has been associated with resistance to EGFR inhibitors in other tumor types (48), we analyzed gene mutations that were acquired in GefR SCCs. Analysis of RNA-Sequence data did not reveal alterations in *EGFR*, *RAS*, *RAF* or in other genes previously associated with resistance to EGFR inhibitors in the subset of expressed genes in GefR SCCs (Supplementary Table S6). The comparison of control and GefR tumors from each PDX model did not identify common genetic mutations that were acquired in resistant SCC10, SCC16 and SCC24 (Supplementary Fig. S5C). In contrast, a subset of mutations, absent in control SCC-PDXs, appeared in each GefR SCC model (Supplementary Fig. S5D). Acquired mutations, including stop-gain, and missense (altered reads $\geq 10\%$ of total reads) were identified in 13 genes that affected all GefR SCC10 replicates and 41 genes were detected in two of these three GefR tumors (Supplementary Fig. S5D; Supplementary Table S6). In contrast, a lower number of mutations were identified in GefR SCC16 (12 mutated genes that affected 2 of 3 replicates) and GefR cSCC24 (2 mutated genes in all replicates and 1 mutated gene affecting 2 of 3 replicates). It is important to highlight that *E542K PIK3CA*, which was previously associated with resistance

to EGFR inhibitors in lung and colorectal carcinomas (49-53), was identified in 2 of 3 GefR cSCC16 replicates (30% of altered vs total reads), and this mutation was absent in parental and non-treated cSCC16 (Supplementary Fig. S5E). These data suggest that although this genetic alteration may contribute to GefR SCC16 growth, it was not the main mechanism of the gefitinib resistance in cSCC16-PDXs.

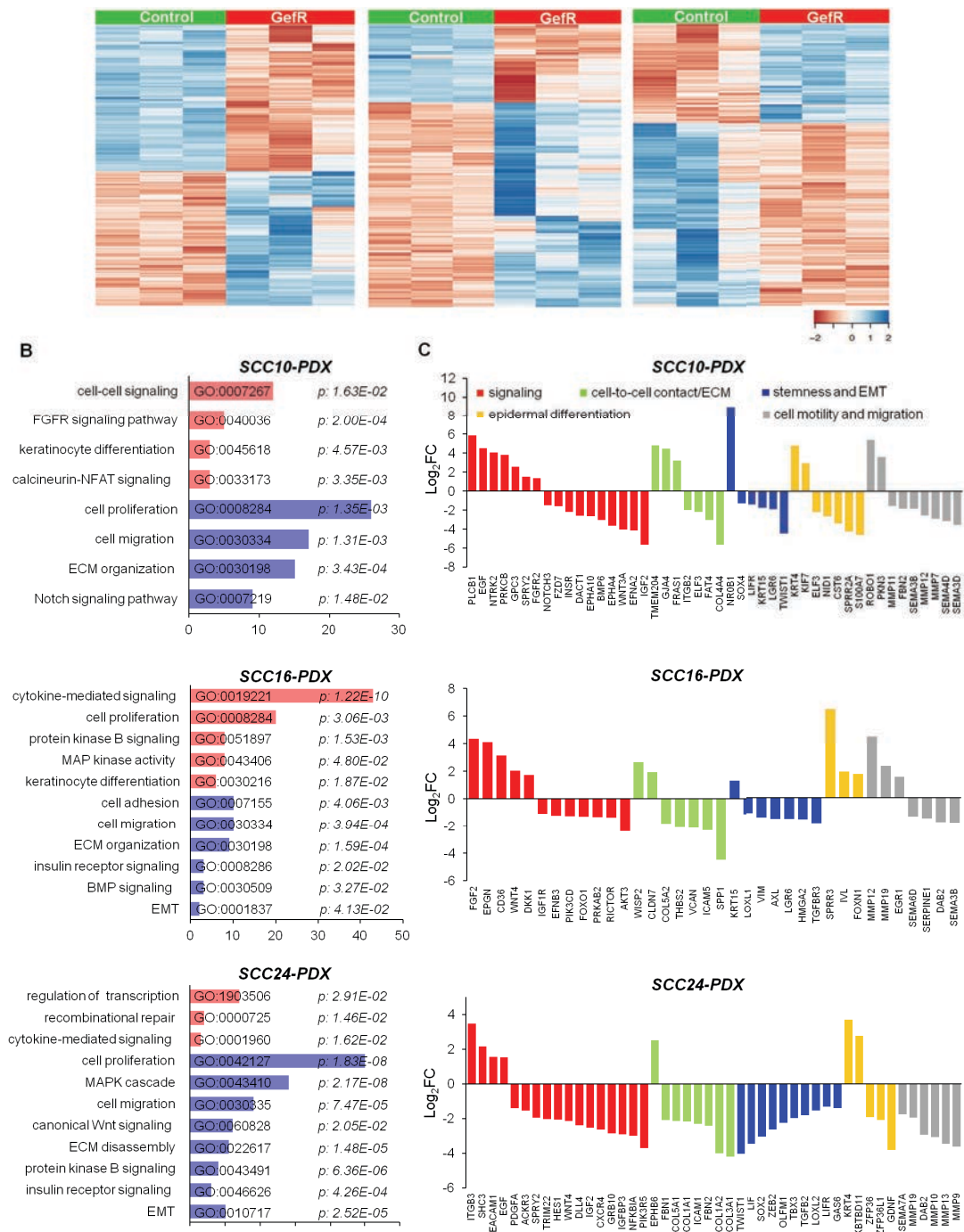


Figure 5. Analysis of gene expression alterations in GefR SCC-PDXs. **A**, Hierarchical gene-cluster analysis of differentially expressed genes ($\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$; Adjusted p -value $P < 0.05$) in tumor cells isolated by FACS-sorting from the indicated control and GefR SCC-PDXs (three samples per group). **B**, Gene ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes in the indicated control and GefR PDXs. P value and the code number from the selected GO are shown. **C**, Representation of a subset of differentially expressed genes ($\text{Log}_2 \text{FC}$) in GefR compared with their respective control cSCC-PDXs, which were grouped by biological functions.

To evaluate possible mechanisms involved in the acquisition of gefitinib resistance, we compared biological processes that were similarly deregulated in GefR SCCs. The expression of genes related to cell-to-cell contact and extracellular matrix remodeling were significantly downregulated in the three GefR SCC models. Similarly, genes related to stemness and EMT were significantly downregulated, whereas the expression of genes associated with keratinocyte and epidermal differentiation were commonly upregulated in GefR SCCs (Figs. 5B and 5C). These findings suggest that more undifferentiated tumor cells, as cancer stem cells, may be preferentially affected by EGFR inhibitors, in accordance with the higher expression of EGFR detected in cancer stem cells vs bulk tumor cells of mouse skin WD-SCCs (35). However, as GefR tumors grew after serial cycles of treatment, our results suggest that a switch of signaling pathways controlling tumor cell proliferation and survival may be induced in response to gefitinib in a subset of plastic tumor cells, in order to bypass the inhibition of EGFR pathway.

FGFR signaling pathway is activated in response to EGFR inhibition

GO analysis from RNA-sequence data identified several signaling pathways that may be deregulated in GefR tumors, as insulin receptor signaling that was downregulated in GefR SCC16 and SCC24, whereas genes related with protein kinase B signaling was upregulated (GefR SCC16) or even downregulated (GefR SCC24) (Fig. 5B). Similarly, few cytokines and growth factors were commonly up or downregulated in GefR tumors. In this regard, *EGF* expression was upregulated in GefR SCC10 and SCC24, probably as a response mechanism to EGFR inhibition, and *IGF2* was downregulated in both GefR models (Fig. 5C). However, we observed that *FGFR2* and *FGF2* expression was significantly upregulated in GefR SCC10 and GefR SCC16, respectively (Fig. 5C). A deeper characterization of the expression of FGFR isoforms by quantitative PCR revealed that the expression of *FGFR2B*, *FGFR2C*, but also of *FGFR1B* was significantly induced in tumor cells isolated from GefR SCC10, as compared to those isolated from control and untreated tumors (Fig. 6A). Furthermore, qPCR analysis demonstrated that *FGFR2B* and *FGFR3* was significantly upregulated in GefR SCC16 cells compared to their respective control cells (Fig. 6B). Given that these genes were not strongly expressed, significant changes in their expression may be missed in RNA-sequencing analysis.

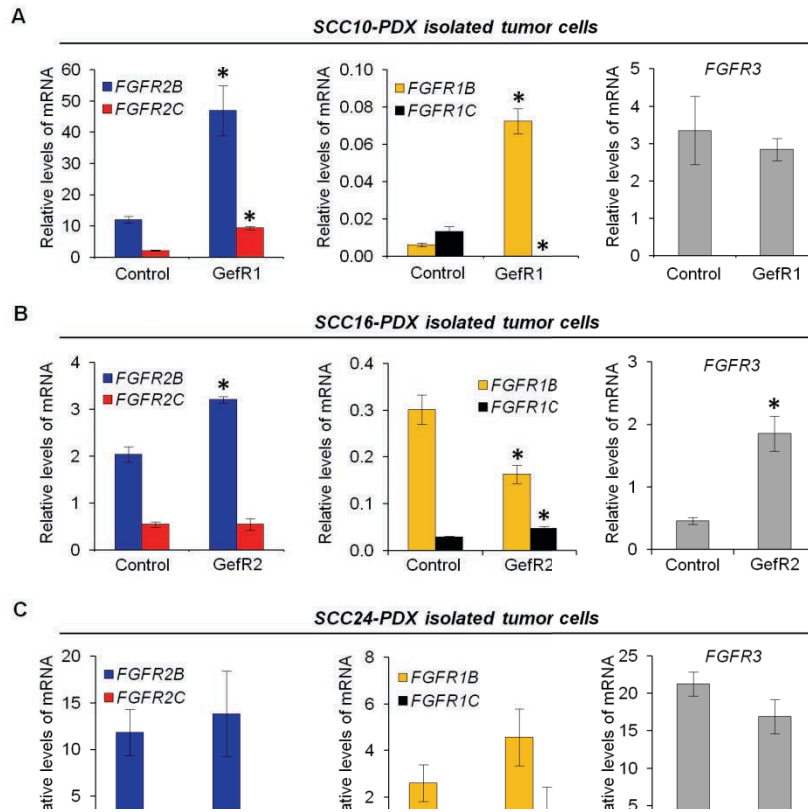


Figure 6. Analysis of the expression of genes related with FGFR signaling in tumor cells isolated from GefR SCC-PDXs. A-C, Mean levels (\pm SE; 2-3 samples per group) of the indicated mRNAs relative to *GAPDH* mRNA in tumor cells isolated from (A) GefR1 SCC10-PDXs, (B) GefR2 SCC16-PDXs and (C) GefR2 SCC24-PDXs and their respective control PDXs. *, significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$).

On the other hand, cSCC24 primary tumors, tumor cells and PDXs exhibited a strong expression of *FGFR2B* and *FGFR3* (Fig. 1D; Supplementary Fig. S2E). Despite the *FGFR* or ligand expression were not significantly altered in GefR SCC24, as determined by qPCR and RNA-sequencing (Figs. 5C and 6C), we observed that *ITGB3* was one of the top 10 genes upregulated in GefR tumors (Fig. 5C). Interestingly, a crosstalk between integrin $\beta 3$ (ITGB3) in complex with integrin $\alpha 5$ ($\alpha 5\beta 3$ integrin) and FGFR signaling was previously reported to promote proliferation in acute myeloid leukemia cells (54) and has been associated to resistance to EGFR inhibitors in breast cancer cells (55), suggesting that the upregulation of ITGB3 may enhance FGFR signaling in GefR SCC24.

To determine the relevance of FGFR signaling in promoting tumor cell proliferation and survival upon EGFR inhibition, SCC10, SCC16 and SCC24 cells were *in vitro* treated with gefitinib in the absence or presence of FGFR ligands. We observed that FGF2 and FGF7 rescued the proliferation of these tumor cells upon acute gefitinib treatment (Supplementary Fig. S6A). Furthermore, *in*

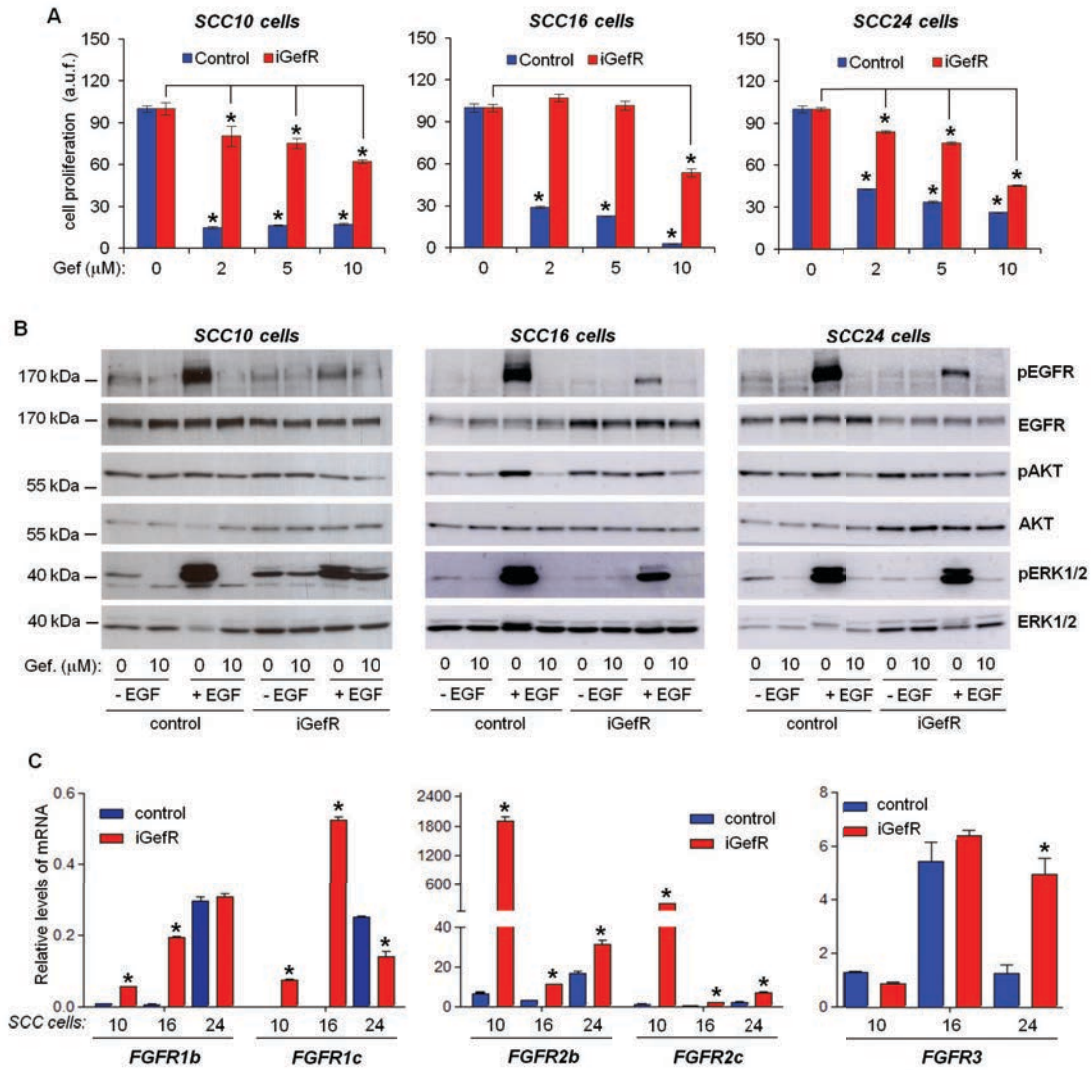
in vitro long-term treatment of SCC10, SCC16 and SCC24 cells with increasing doses of inhibitor gave rise gefitinib resistant cells (called here iGefR SCC10, iGefR SCC16 and iGefR SCC24 cells). In contrast to control cells, proliferation of iGefR cells was strongly inhibited only at high doses of gefitinib (5 μ M-10 μ M) in the absence of FGF2 (Fig. 7A). Furthermore, EGFR signaling was attenuated in iGefR cells, as phosphorylation of this receptor and downstream effectors was only slightly induced in response to EGF, in contrast to control tumor cells (Fig. 7B). Accordingly, tumors generated from iGefR SCC10 cells were resistant to *in vivo* gefitinib treatment, as compared to those generated from control cells (Fig. 8A).

Analysis of the expression of different FGFR isoforms demonstrated that similarly to that observed in tumor cells isolated from GefR tumors, *FGFR2B* and *FGFR2C* were strongly induced in the three iGefR cell types, whereas *FGFR1B/C* was upregulated in iGefR SCC10 and SCC16 and iGefR SCC24 strongly induced the expression of *FGFR3* (Fig. 7C). Altogether, these results suggest that FGFR signaling is induced in GefR SCC cells.

Inhibition of FGFR signaling pathway blocks GefR cSCC growth

To determine the relevance of FGFR signaling in regulating iGefR cell proliferation, we analyzed the effect of two FGFR inhibitors, PD173074 (inhibits FGFR3 and FGFR1) and NVP-BGJ398 (infigratinib; pan-inhibitor of FGFR) (36, 37). We observed that iGefR cells showed a strong sensitivity to FGFR inhibitors, as proliferation was significantly reduced in response to gefitinib and lower doses of FGFR inhibitors than control cells (Supplementary Figs. 6B-6D). The hypersensitivity of iGefR cells to FGFR inhibitors indicates that activation of FGFR signaling promotes iGefR cell proliferation, overcoming the resistance to EGFR inhibitor.

As *FGFR2B* expression was consistently induced in iGefR cells, we tested the impact of *FGFR2B* knock-down (Supplementary Figs. S7A and S7E) on the proliferation of iGefR cells, but also of tumor cells isolated from *in vivo* generated GefR1 SCC10-PDXs. In contrast to sh-control cells, *FGFR2B* mRNA interference inhibited the proliferation of GefR cells in the presence of gefitinib, being this effect higher in iGefR and GefR1 SCC10 cells than in iGefR SCC24 and SCC16 cells (Supplementary Figs. S7B-S7D and S7F). These differences may be related to the more moderate induction of *FGFR2B* expression in iGefR SCC16 and SCC24 cells (Fig. 7C), or even to the implication of other FGFR isoforms to overcome the resistance to EGFR inhibitor



control and *in vitro* generated gefitinib-resistant cells (iGefR), as measured by MTT. Mean (\pm SE) of arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) of the indicated treated cells relative to cells growing without gefitinib. **B**, Effect of gefitinib and EGF treatment on EGFR, AKT, and ERK1/2 phosphorylation status in the indicated control and iGefR cells. **C**, Mean levels (\pm SE) of indicated mRNAs relative to *GAPDH* mRNA in the indicated control and iGefR cells. *, significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$).

To determine the effect of FGFR2B abrogation on GefR SCC growth, we engrafted sh-control and sh-FGFR2B iGefR SCC10 cells in immunodeficient mice, and both mouse groups were treated with gefitinib. FGFR2 knocked-down strongly inhibited the growth of iGefR tumors, compared to sh-control tumors (Fig. 8B). Similarly, GefR1 SCC10 tumors exhibited an impaired growth upon FGFR2B knocked-down (Fig. 8C), concomitantly with a significant reduction of tumor cell proliferation (Fig. 8F). These findings demonstrate that upregulation of FGFR2B signaling overrides the resistance of cSCC10 to gefitinib.

In addition, we found that growth of GefR SCC10 and SCC16 tumors was significantly reduced in response to combined gefitinib and NBV-BGJ398 therapy (Figs. 8D and 8E), in accordance to the significant reduction of tumor cell proliferation observed in these tumors (Figs. 8G and 8H). Altogether, our results demonstrate that pharmacological inhibition of FGFR signaling blocks the growth of GefR cSCCs, and suggest that a switch from EGFR to FGFR signaling may be responsible of evading the resistance to EGFR inhibitor.

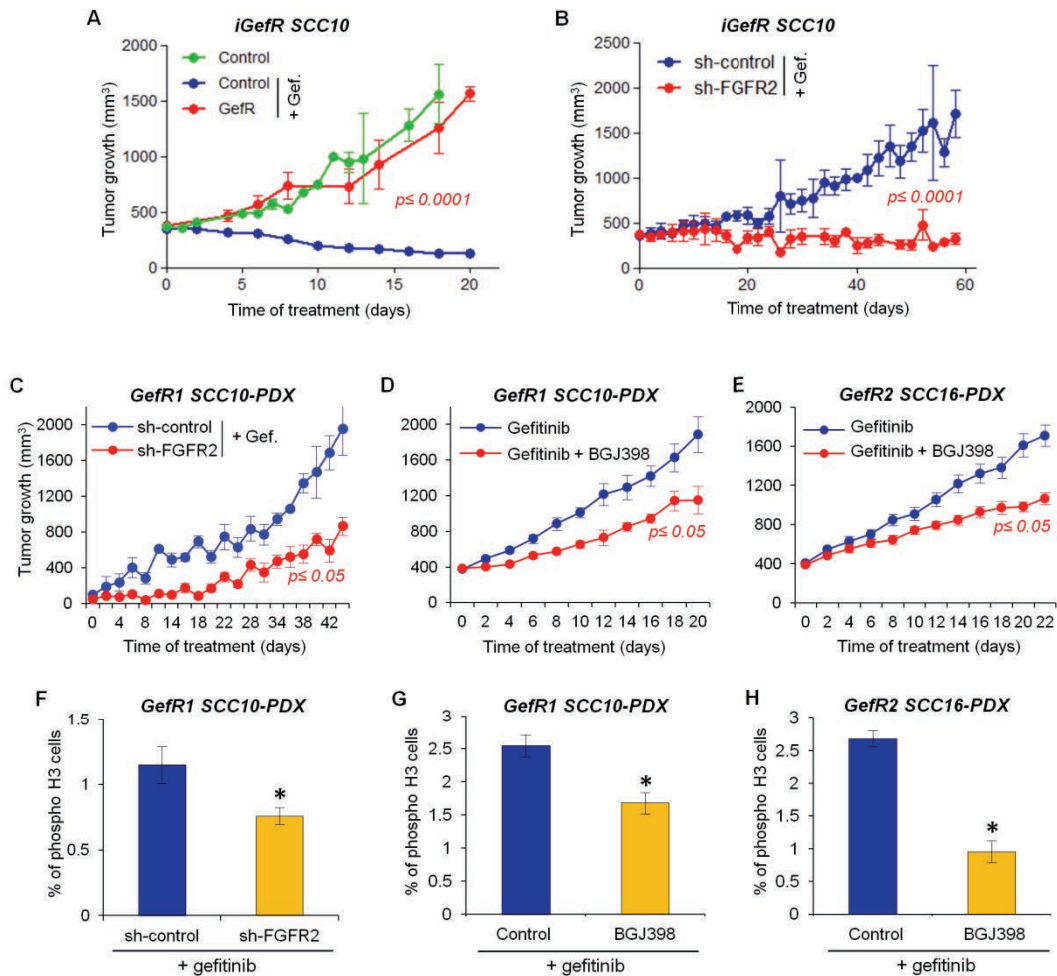


Figure 8. Inhibition of FGFR pathway blocks GefR cSCC-PDX growth. **A**, Growth kinetics (mean \pm SE of tumor size, mm³; 4-12 tumors per group) of tumors generated after engrafting control and iGefR SCC10 cells in immunodeficient mice. Control (blue line) and iGefR (red line) tumors were treated with gefitinib (75 mg/Kg), whereas control tumors (green lines) were treated with vehicle solution. **B-C**, Growth kinetics (mean \pm SE of tumor size, mm³; 6-8 tumors per group) of tumors generated after engrafting sh-control and sh-FGFR2 iGefR SCC10 (**B**) and GefR1 SCC10-PDX cells (**C**) in immunodeficient mice, which were continuously treated with doxycycline (2 mg/mL) and with gefitinib (75 mg/Kg) every two days. **D, E**, Growth kinetics (mean \pm SE of tumor size, mm³) of GefR1 SCC10-PDXs (7-11 tumors per group) (**D**) and GefR2 SCC16-PDXs (14-17 tumor per group) (**E**), which were treated with gefitinib or gefitinib plus NVP-BGJ398 (25mg/Kg). **F-H**, Mean percentage of proliferating cells (\pm SE; 5-6 tumor samples per group), as determined by immunodetection of phosphorylated H3 (Ser10) in the indicated tumors from **C-E**. *, significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$).

DISCUSSION

Currently, first line therapy for advanced and metastatic cSCCs is cisplatin-based chemotherapies, but the associated toxicity limits its administration (58). Radiotherapy gives local symptom control and IFN- α and 13cis-Retinoic acid combined therapy has been tested in several clinical trials with still limited results (4). Therefore, targeted therapies with reduced toxicity are necessities for advanced cSCC treatment.

Therapies based in EGFR inhibitors for cSCCs have been tested in some clinical trials. A low response was reported in small series of patients with advanced and unresectable cSCCs, and recurrence was observed in some of these cases, even after an initial response (30, 31). However, lack of the molecular characterization of these tumors impaired the identification of possible mechanisms responsible of resistance to EGFR inhibitors.

To determine the role of EGFR signaling in patient cSCC growth and evaluate the response of EGFR inhibitors, we generated a subset of cSCC-PDXs that included tumors at different stages of progression (G2 WD/MD-SCCs to G4 PD/S-SCCs). Characterization of cSCC-PDXs showed that most of histopathologic and molecular features of parental patient samples were conserved after their engrafting in immunodeficient mice. Analysis of RNA sequence of G2/G3 cSCC-PDXs revealed a mutation frequency of known drivers of cSCC that was consistent with that reported in previous studies (26, 28). However, no mutations in *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *FGFRs* or *IGF1R*, neither in *KRAS*, *HRAS* or *BRAF*, were identified in these tumors, in accordance with the low incidence of mutations in these genes described in cSCCs (39, 40, 59, 60). These data indicate that these tumors may be good candidates to receive EGFR-targeted therapy.

Characterization of primary samples, isolated tumor cells and cSCC-PDXs demonstrated that our cSCC collection could be stratified in epithelial-like cSCCs and mesenchymal-like cSCCs. Epithelial-like cSCCs comprise WD/MD-SCCs, MD/PD-SCCs and PD-SCCs, whose tumor cells conserved the expression of epithelial differentiation markers, while mesenchymal-like cSCCs (PD/S-SCC G4) contained tumor cells that lost the expression of epithelial markers, acquired a mesenchymal phenotype and strongly induced the expression of EMT markers. Interestingly, the expression and activity of EGFR correlated with the expression of epithelial markers. Indeed, epithelial-like cSCC cells exhibited a strong expression of EGFR and ligands and the autocrine activation of this signaling promotes tumor cell proliferation and survival, while mesenchymal-like cSCC cells downregulated the expression of EGFR and induced the expression of FGFR1 and PDGFR signaling, latter responsible of promoting mesenchymal-like tumor cell invasion and metastasis (36). Accordingly, EGFR inhibition did not have any effect on the proliferation and survival of mesenchymal-like tumor cells. *In vivo* assays demonstrated that tumor growth was

strongly blocked in the three analyzed epithelial-like cSCC-PDXs in response to a first cycle of gefitinib. Furthermore, gefitinib induced the regression of large-size growing cSCC-PDXs, indicating that cSCC exhibiting epithelial differentiation traits show a good response to EGFR-targeted therapy. In this regard, previous studies showed that treatment with AEE788, which inhibits EGFR and VEGFR reduced cSCC cell proliferation/survival and PDX growth. However, it was difficult to separate the effect on EGFR or VEGFR in this study (61). Therefore, patient cSCCs may be stratified in accordance with the epithelial or mesenchymal features of their tumor cells, along to the histopathologic or grade status, in order to obtain an optimal response to EGFR-targeted therapies.

Resistance to EGFR inhibitors has been described in lung SCC, HNSCC, colorectal carcinoma and brain cancer patients (43, 44, 62, 63). Resistance to EGFR inhibitors has been related to intra-tumor cell heterogeneity and the presence of tumor cells carrying mutations in *RAS* and *EGFR* genes, loss of PTEN function, or by other mechanisms, including activation of alternative pathways, as cMET, HGF or AXL signaling and phenotypic or histological transformation (64, 65). However, no mutations in *EGFR*, *RAS*, *RAF* and *MET* were identified in GefR SCCs. Previous reports indicated that EMT induction by activation of AXL or TGF α signaling was associated to acquired resistance to EGFR inhibitors in NSCLCs (66, 67). In contrast, we observed that genes related with keratinocyte differentiation were upregulated, whereas genes related with stemness and EMT were significantly downregulated in most of GefR SCCs, in accordance to the more differentiated phenotype induced by gefitinib treatment HNSCC cell lines (68).

Despite the strong response to gefitinib of epithelial-like cSCCs, we found that all gefitinib treated tumors relapsed after treatment interruption, as expected by the reversible activity of this EGFR inhibitor (68). However, residual tumors contained gefitinib resistant cells, as indicated by resistance that exhibited the relapsed tumors to subsequent cycles of treatment. The incidence of resistance was different in each of these cSCC-PDX models. Near to 70% of relapsed SCC10-PDXs become resistant to EGFR inhibition. In contrast, only 17 and 24% of relapsed cSCC24-PDXs and cSCC16-PDXs, respectively, were able to growth after a second treatment cycle. Difference in the resistance between cSCC-PDX models may be due to a variable frequency of resistant cells already present in initial untreated tumors, which become selected upon treatment pressure, or even to the acquisition of mutations in specific genes and activation of signaling pathways that may overcome the inhibition of EGFR. Comparison of RNA sequences between tumor cells of untreated control and GefR cSCC-PDXs revealed a subset of mutations emerging in resistant cSCC-PDXs of each model. *E542K PIK3CA*, which was previously associated with resistance to EGFR inhibitors in lung and colorectal carcinomas (49-53, 70) was identified in 2

on 3 GefR SCC16 samples in a percentage of reads, but not in untreated or parental patient cSCC16. Although we cannot discard that this genetic alteration may play a role in promoting tumor cell proliferation/survival upon EGFR inhibition, the fact that it was absent of some replicates of these GefR SCCs indicate that other molecular events are responsible to promote tumor growth in these tumors upon gefitinib treatment. Moreover, none common emerging gene mutation were identified in the three analyzed GefR cSCC models, suggesting that selection of tumor cells carrying specific gene mutations or even the novo acquisition of mutations were not the major drivers of gefitinib resistance in these cSCCs.

Our results indicated that FGFR signaling pathway was commonly upregulated in GefR cells. Indeed, GefR SCC10 and GefR SCC16 significantly induced the expression of different FGFR isoforms and FGF2 ligand, as compared to their respective control tumors, whereas control and GefR SCC24 exhibited a strong expression of FGFR2B and FGFR3. In this regard, cSCC10, cSCC16 and cSCC24 cells strongly induced the expression of FGFRs upon the continuous *in vitro* gefitinib treatment in order to proliferate upon EGFR inhibition. Accordingly, these *in vitro* induced GefR cells (iGefR cells) showed a strong sensitivity to FGFR inhibitors compared to control cells, and abrogation of FGFR2B or pharmacological inhibition of FGFRs significantly reduce the growth of tumors generated from iGefR cells, but also of *in vivo* generated GefR SCC10, upon continuous treatment with gefitinib. The strong response of GefR SCC16 cells to pan-FGFR inhibitor compared to FGFR2 abrogation indicates that other FGFR isoforms may be responsible of gefitinib resistance in these tumors.

Altogether, these findings demonstrated that GefR tumor cells activate FGFR signaling pathway in response to long-term EGFR inhibition. Although we cannot discard the implication of other molecular mechanisms in driving gefitinib resistance, our results indicate that inhibition of FGFR signaling may be a good therapeutic strategy to overcome the resistance of cSCC to EGFR-targeted therapy. An important question is how the switch of EGFR to FGFR signaling is induced during long-term gefitinib treatment. Our results indicate that EGFR signaling is responsible to drive epithelial-like cSCC growth, despite tumor cells already express FGFR2 and FGFR3 isoforms. However, upon a continuous inhibition of EGFR signaling, tumor cells acquire the capability to switch to FGFR signaling. In accordance, increased expression or activation of FGFR signaling was described in lung and breast tumor cells with acquired resistance to EGFR inhibitors (71-75).

The distinct incidence of gefitinib resistance observed in cSCC10 vs cSCC16 and cSCC24 indicate that not all tumor cells of these tumors showed a similar capability to switch toward FGFR signaling upon therapy pressure. In this regard, it was demonstrated that cancer cell showed a strong plasticity, defined as the ability to change their phenotypic and molecular traits to adapt

to tumor growth or therapy constrictions (77). We suggest that only a subset of cSCC cells present or even acquire a plastic capability to adapt to EGFR inhibition by inducing FGFR signaling, which become selected upon continuous therapy pressure. Indeed, frequency of these plastic cells may dictate the incidence of resistance of each patient sample, and in consequence the overall response to EGFR inhibitors.

Therefore, our results demonstrate that epithelial-like cSCC show an optimal response to EGFR-targeted therapies, although long-term treatment may lead to resistance to these treatments, which is overcome by FGFR inhibitors. Further studies will be necessary to identify markers of plastic cSCC cells with strong capability to switch from EGFR to FGFR signaling, in order to predict the acquisition of resistance to EGFR-targeted therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

ABP, JNV and LLS received an IDIBELL Fellowship, VdSD was funded by Spanish Ministry of Science and Innovation Fellowships; the research of PM's group is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness MINECO (SAF2014-55944R; SAF2017-84976R, co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)- a way to build Europa) and by the Catalan Department of Health (CERCA, Generalitat de Catalunya; 2017SGR595). We thank J. Comas (Universitat de Barcelona-SCT) for technical support with flow cytometry; the patients enrolled in this study for their participation; the Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Virgen de la Salud, Biobanco del Principado de Asturias and Fundación Instituto Valenciano de Oncología, which are members of the Spanish Hospital Platform Biobanks Network and Tumor Bank from Hospital de Bellvitge for help with human tumor sample collection; and the IDIBELL animal facility service for mouse care.

REFERENCES

1. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, *et al.* Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2015;51(14):1989-2007.
2. Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg* 2002;28(3):268-73.
3. Cranmer LD, Engelhardt C, Morgan SS. Treatment of unresectable and metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *The oncologist* 2010;15(12):1320-8.

4. Franco R, Nicoletti G, Lombardi A, *et al.* Current treatment of cutaneous squamous cancer and molecular strategies for its sensitization to new target-based drugs. *Expert Opin Biol Ther* 2013;13(1):51-66.
5. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* 2001;344(13):975-83.
6. Ashford BG, Clark J, Gupta R, Iyer NG, Yu B, Ranson M. Reviewing the genetic alterations in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: A search for prognostic markers and therapeutic targets. *Head Neck* 2017;39(7):1462-9.
7. Shin DM, Glisson BS, Khuri FR, *et al.* Phase II and biologic study of interferon alfa, retinoic acid, and cisplatin in advanced squamous skin cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(2):364-70.
8. Wollina U, Hansel G, Koch A, Kostler E. Oral capecitabine plus subcutaneous interferon alpha in advanced squamous cell carcinoma of the skin. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2005;131(5):300-4.
9. Brewster AM, Lee JJ, Clayman GL, *et al.* Randomized trial of adjuvant 13-cis-retinoic acid and interferon alfa for patients with aggressive skin squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25(15):1974-8.
10. Migden MR, Rischin D, Schmults CD, *et al.* PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2018;379(4):341-51.
11. Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials* 2013;34(34):8690-707.
12. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological research* 2014;79:34-74.
13. Maubec E, Duvillard P, Velasco V, Crickx B, Avril MF. Immunohistochemical analysis of EGFR and HER-2 in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the skin. *Anticancer research* 2005;25(2B):1205-10.
14. Canueto J, Cardenoso E, Garcia JL, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma. *The British journal of dermatology* 2017;176(5):1279-87.
15. Morgensztern, D., Politi, K., & Herbst, R. (2015). EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: Find, divide, and conquer. *JAMA Oncology*, 1(2), 146–148.
16. Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., Taron, M. (2009). Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *Abstract. N Engl J Med*, 361, 958–967.
17. Vatte, C., Al Amri, A. M., Cyrus, C., Chathoth, S., Acharya, S., Hashim, T. M., Al-Ali, A. K. (2017). Tyrosine kinase domain mutations of EGFR gene in head and neck squamous cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 10, 1527–1533.
18. Westphal, M., Maire, C. L., & Lamszus, K. (2017). EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise. *CNS Drugs*, 31(9), 723–735. <https://doi.org/10.1007/s40263-017-0456-6>

19. Ch'ng S, Low I, Ng D, *et al.* Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Human pathology* 2008;39(3):344-9.
20. Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Hartmann, J. T., de Braud, F., Schuch, G., Zobel, A., Koralewski, P. (2011). Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The OPUS study. *Annals of Oncology*, 22(7), 1535–1546.
21. Ghilardi, M., Cabiddu, M., Barni, S., Petrelli, F., & Borgonovo, K. (2011). Cetuximab and panitumumab in KRAS wild-type colorectal cancer: a meta-analysis. *International Journal of Colorectal Disease*, 26(7), 823–833.
22. Van Cutsem, E., Köhne, C. H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M. P., Cascinu, S., Ciardiello, F. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 2011–2019.
23. Patil, P., Gupta, V., Rangaraju, R., Abbas, W., & Bajpai, P. (2018). Prolonged survival with anti-epidermal growth factor receptor therapy in head and neck squamous cell carcinoma: A case series. *Journal of Current Oncology*, 1(2), 97.
24. Tian, Y., Lin, J., Tian, Y., Zhang, G., Zeng, X., Zheng, R., Yuan, Y. (2018). Efficacy and safety of anti-EGFR agents administered concurrently with standard therapies for patients with head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Cancer*, 142(11), 2198–2206.
25. Mok, T. S., Wu, Y., Thongprasert, S., Yang, C., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Fukuoka, M. (2009). Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma, 947–957.
26. Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Paz-Ares, L. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 13(3), 239–246.
27. Wu, Y. L., Zhou, C., Liang, C. K., Wu, G., Liu, X., Zhong, Z., Zuo, Y. (2015). First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: Analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Annals of Oncology*, 26(9), 1883–1889.
28. Yang, P.-C., Shih, J.-Y., Liu, Y.-N., Wen, Y.-F., Yang, J. C.-H., Yu, C.-J., Tsai, M.-F. (2016). The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget*, 7(11).
29. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, *et al.* Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *The New England journal of medicine* 2005;353(2):133-44.
30. Maubec E, Petrow P, Scheer-Senyarich I, *et al.* Phase II study of cetuximab as first-line single-drug therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin. *J Clin Oncol* 2011;29(25):3419-26.
31. Gold KA, Kies MS, William WN, Jr., Johnson FM, Lee JJ, Glisson BS. Erlotinib in the treatment of recurrent or metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: A single-arm phase 2 clinical trial. *Cancer* 2018;124(10):2169-73.

32. Burtneß B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2005;23(34):8646-54.
33. Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA, *et al.* Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(7):2205-13.
34. Tol J, Dijkstra JR, Klomp M, *et al.* Markers for EGFR pathway activation as predictor of outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with or without cetuximab. *Eur J Cancer* 2010;46(11):1997-2009.
35. da Silva-Diz V, Simon-Extremera P, Bernat-Peguera A, *et al.* Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression. *Cancer research* 2016;76(5):1245-59.
36. Bernat-Peguera A, Simon-Extremera P, da Silva-Diz V, *et al.* PDGFR-induced autocrine SDF-1 signaling in cancer cells promotes metastasis in advanced skin carcinoma. *Oncogene* 2019.
37. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(3):235-53.
38. Lapouge G, Beck B, Nassar D, Dubois C, Dekoninck S, Blanpain C. Skin squamous cell carcinoma propagating cells increase with tumour progression and invasiveness. *The EMBO journal* 2012;31(24):4563-75.
39. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, *et al.* Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014;20(24):6582-92.
40. South AP, Purdie KJ, Watt SA, *et al.* NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. *The Journal of investigative dermatology* 2014;134(10):2630-8.
41. Li YY, Hanna GJ, Laga AC, Haddad RI, Lorch JH, Hammerman PS. Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21(6):1447-56.
42. Yanofsky, V. R., Mercer, S. E., & Phelps, R. G. (2011). Histopathological Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Journal of Skin Cancer*, 2011(January 2011), 1-13.
43. Byeon HK, Ku M, Yang J. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer. *Experimental & molecular medicine* 2019;51(1):8.
44. Wu, S. G., & Shih, J. Y. (2018). Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, 17(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0777-1>
45. Jin HJ, Jung S, DebRoy AR, Davuluri RV. Identification and validation of regulatory SNPs that modulate transcription factor chromatin binding and gene expression in prostate cancer. *Oncotarget* 2016;7(34):54616-26.
46. Tao T, Yang X, Zheng J, *et al.* PDZK1 inhibits the development and progression of renal cell carcinoma by suppression of SHP-1 phosphorylation. *Oncogene* 2017;36(44):6119-31.
47. Zhao C, Tao T, Yang L, *et al.* Loss of PDZK1 expression activates PI3K/AKT signaling via PTEN phosphorylation in gastric cancer. *Cancer letters* 2019;453:107-21.
48. Liu Q, Yu S, Zhao W, Qin S, Chu Q, Wu K. EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Molecular cancer* 2018;17(1):53.

49. Campo, M., Gerber, D., Gainor, J. F., Heist, R. S., Temel, J. S., Shaw, A. T., Sequist, L. V. (2016). Acquired resistance to first-line afatinib and the challenges of prearranged progression biopsies. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(11), 2022–2026.
50. Thress, K. S., Paweletz, C. P., Felip, E., Cho, B. C., Dougherty, B., Lai, Z., Oxnard, G. R. (2016). Acquired EGFR C797S mediates resistance to AZD9291 in advanced non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Cancer*, 121(6), 560–562.
51. Yang, P.-C., Shih, J.-Y., Liu, Y.-N., Wen, Y.-F., Yang, J. C.-H., Yu, C.-J., Tsai, M.-F. (2016). The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget*, 7(11).
52. Ohashi, K., Sequist, L. V., Arcila, M. E., Moran, T., Chmielecki, J., Lin, Y.-L., Pao, W. (2012). Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), E2127–E2133.
53. Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-santagata, D., Turke, A. B., Fidias, P., Bergethon, K., Engelman, J. A. (2011). Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Journal of Clinical Oncology*, 29(75).
54. Shah CA, Bei L, Wang H, Altman JK, Plataniias LC, Eklund EA. Cooperation between AlphaVbeta3 integrin and the fibroblast growth factor receptor enhances proliferation of Hox-overexpressing acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* 2016;7(34):54782-94.
55. Seguin L, Kato S, Franovic A, *et al.* An integrin beta(3)-KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nature cell biology* 2014;16(5):457-68.
56. Miyake M, Ishii M, Koyama N, *et al.* 1-tert-butyl-3-[6-(3,5-dimethoxy-phenyl)-2-(4-diethylamino-butylamino)-pyrido[2,3 -d]pyrimidin-7-yl]-urea (PD173074), a selective tyrosine kinase inhibitor of fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3), inhibits cell proliferation of bladder cancer carrying the FGFR3 gene mutation along with up-regulation of p27/Kip1 and G1/G0 arrest. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2010;332(3):795-802.
57. Guagnano V, Kauffmann A, Wohrle S, *et al.* FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer discovery* 2012;2(12):1118-33.
58. Bejar C, Maubec E. Therapy of advanced squamous cell carcinoma of the skin. *Current treatment options in oncology* 2014;15(2):302-20.
59. Toll A, Salgado R, Yebenes M, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Experimental dermatology* 2009;19(2):151-3.
60. Mauerer A, Herschberger E, Dietmaier W, Landthaler M, Hafner C. Low incidence of EGFR and HRAS mutations in cutaneous squamous cell carcinomas of a German cohort. *Experimental dermatology* 2011;20(10):848-50.
61. Park YW, Younes MN, Jasser SA, *et al.* AEE788, a dual tyrosine kinase receptor inhibitor, induces endothelial cell apoptosis in human cutaneous squamous cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 2005;11(5):1963-73.
62. Zhao, B., Wang, L., Qiu, H., Zhang, M., Sun, L., Peng, P., Yuan, X. (2017). Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, 8(3), 3980–4000.

63. E. Taylor, T., B. Furnari, F., & K. Cavenee, W. (2012). Targeting EGFR for Treatment of Glioblastoma: Molecular Basis to Overcome Resistance. *Current Cancer Drug Targets*, 12(3), 197–209.
64. Matsuo N, Azuma K, Sakai K, *et al.* Association of EGFR Exon 19 Deletion and EGFR-TKI Treatment Duration with Frequency of T790M Mutation in EGFR-Mutant Lung Cancer Patients. *Scientific reports* 2016;6:36458.
65. Gao J, Li HR, Jin C, Jiang JH, Ding JY. Strategies to overcome acquired resistance to EGFR TKI in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* 2019.
66. Thomson S, Buck E, Petti F, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer research* 2005;65(20):9455-62.
67. Sato H, Shien K, Tomida S, *et al.* Targeting the miR-200c/LIN28B axis in acquired EGFR-TKI resistance non-small cell lung cancer cells harboring EMT features. *Scientific reports* 2017;7:40847.
68. Barnes CJ, Bagheri-Yarmand R, Mandal M, *et al.* Suppression of epidermal growth factor receptor, mitogen-activated protein kinase, and Pak1 pathways and invasiveness of human cutaneous squamous cancer cells by the tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Molecular cancer therapeutics* 2003;2(4):345-51.
69. Cataldo VD, Gibbons DL, Perez-Soler R, Quintas-Cardama A. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib. *The New England journal of medicine* 2011;364(10):947-55.
70. Ludovini V, Bianconi F, Pistola L, *et al.* Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011;6(4):707-15.
71. Azuma K, Tsurutani J, Sakai K, *et al.* Switching addictions between HER2 and FGFR2 in HER2-positive breast tumor cells: FGFR2 as a potential target for salvage after lapatinib failure. *Biochemical and biophysical research communications* 2011;407(1):219-24.
72. Terai H, Soejima K, Yasuda H, *et al.* Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC. *Mol Cancer Res* 2013;11(7):759-67.
73. Ware KE, Hinz TK, Kleczko E, *et al.* A mechanism of resistance to gefitinib mediated by cellular reprogramming and the acquisition of an FGF2-FGFR1 autocrine growth loop. *Oncogenesis* 2013;2:e39.
74. Azuma K, Kawahara A, Sonoda K, *et al.* FGFR1 activation is an escape mechanism in human lung cancer cells resistant to afatinib, a pan-EGFR family kinase inhibitor. *Oncotarget* 2014;5(15):5908-19.
75. Brown WS, Akhand SS, Wendt MK. FGFR signaling maintains a drug persistent cell population following epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget* 2016;7(50):83424-36.
76. Quintanal-Villalonga A, Molina-Pinelo S, Cirauqui C, *et al.* FGFR1 Cooperates with EGFR in Lung Cancer Oncogenesis, and Their Combined Inhibition Shows Improved Efficacy. *J Thorac Oncol* 2019;14(4):641-55.

77. da Silva-Diz V, Lorenzo-Sanz L, Bernat-Peguera A, Lopez-Cerda M, Munoz P. Cancer cell plasticity: Impact on tumor progression and therapy response. *Seminars in cancer biology* 2018;53:48-58.

78. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, Flicek P, Cunningham F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology* 2016;17(1):122.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

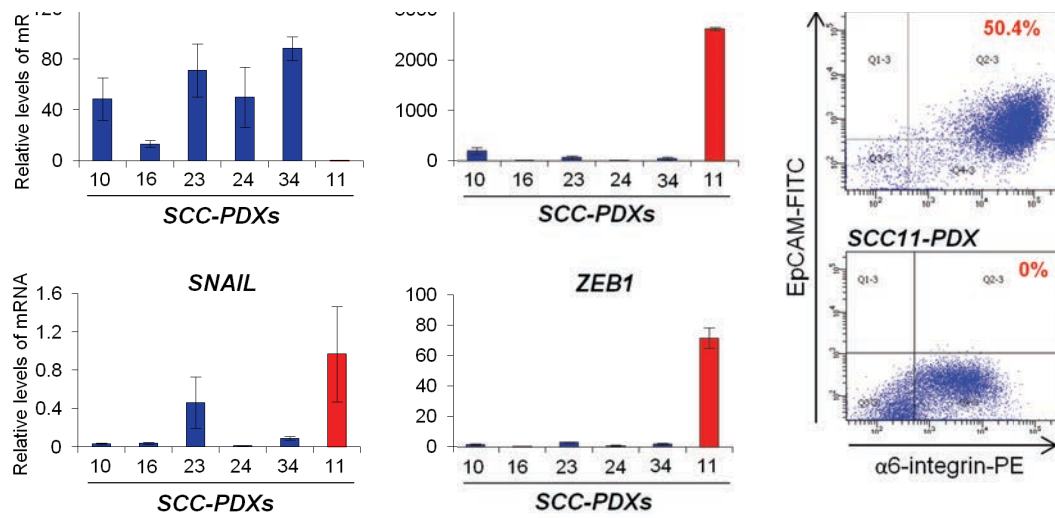
EGFR-targeted therapy blocks epithelial-like cutaneous carcinoma growth and FGFR signaling activation leads to therapy resistance

Adrià Bernat-Peguera¹, Juan Navarro-Ventura¹, Victoria da Silva-Diz^{1,2}, Laura Lorenzo-Sanz¹, Rosa M. Penin³, Mattia Bossio⁴, Diana Pérez Sidelnikova⁵, Oriol Bermejo⁵, Joan Maria Viñals⁵, Eva González-Suárez¹, Salvador Capella-Gutierrez⁴, Alberto Villanueva⁶, Francesc Viñals^{6,7} and Purificación Muñoz¹

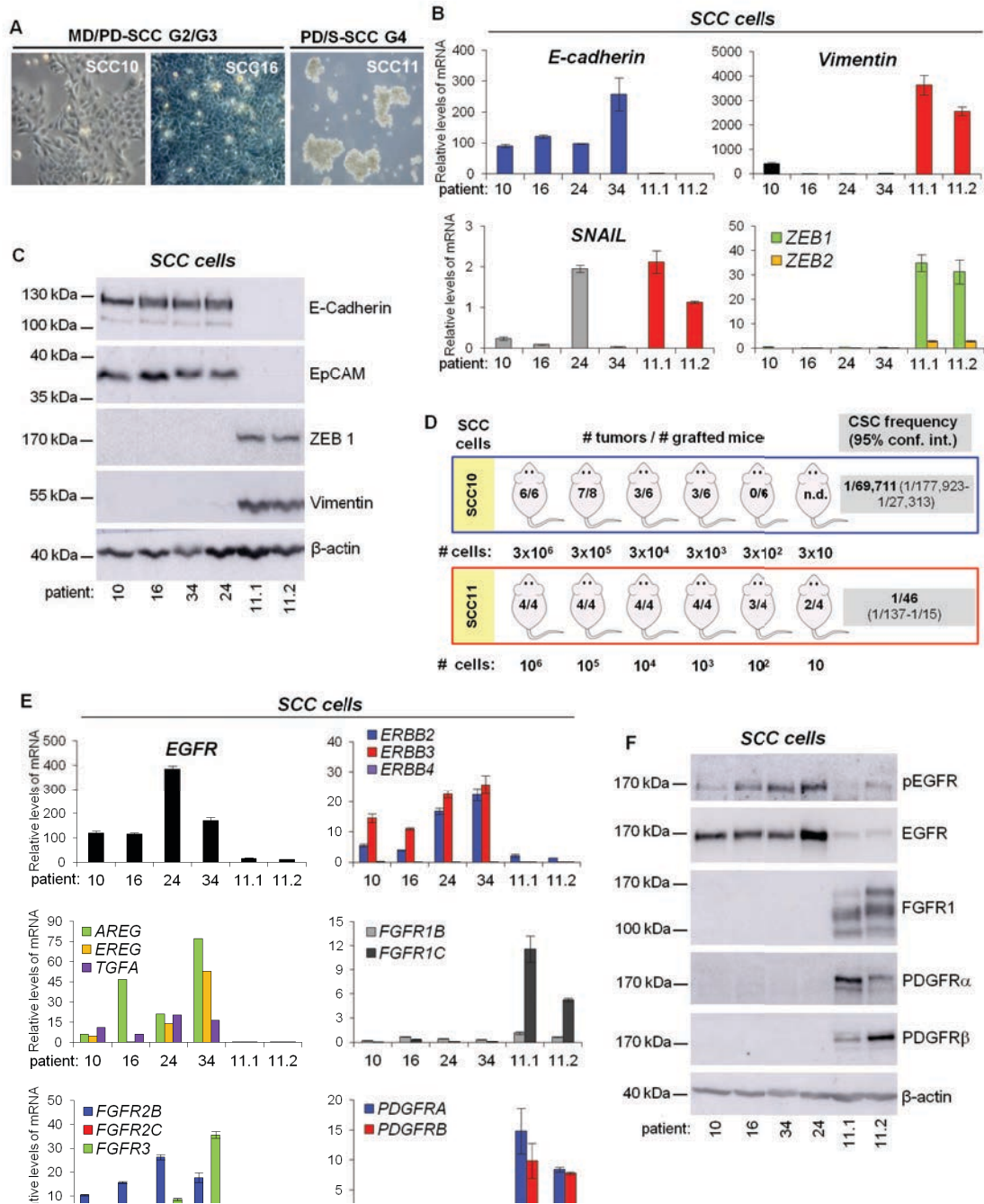
Supplementary Figures S1-S7

Supplementary Tables S1-3

*Supplementary Tables S4-6 are provided separately in a pen drive



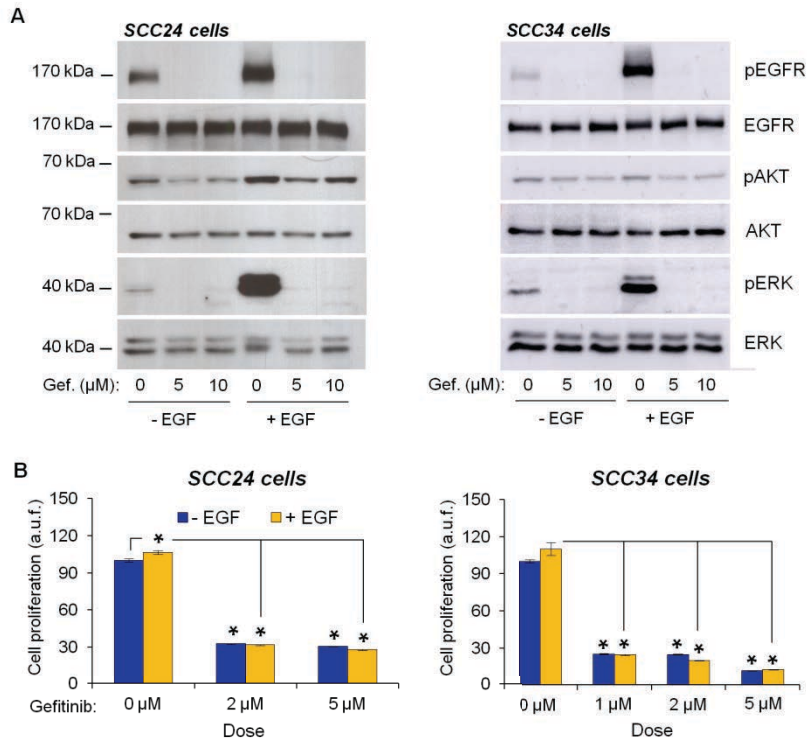
Supplementary Figure S1. MD/PD SCC-PDXs conserve epithelial-differentiation traits in contrast to PD/S SCC-PDXs, which induce the expression of mesenchymal-like markers. A, Mean levels (\pm SE; 2-3 samples per group) of mRNA of the indicated genes relative to *GAPDH* mRNA in a set of SCC-PDXs. **B,** Representative results of the quantification by flow cytometry of the percentage $\alpha6$ -integrin⁺/EpCAM⁺ tumor cells from MD/PD SCC23-PDX and mesenchymal-like SCC11-PDX.



Supplementary Figure S2. Characterization of phenotypic and molecular alterations of tumor cells during cSCC progression. **A**, Tumor cells isolated from MD/PD-SCCs (SCC10 and SCC16 cells) grow *in vitro* as adherent cells, exhibiting epithelial-shape morphology, whereas tumor cells isolated from a PD/S-SCC (SCC11 cells) grow in suspension by forming spheres. **B**, Mean levels (\pm SE) of mRNA relative to *GAPDH* mRNA of the indicated genes in primary culture cells isolated from the indicated patient and cSCC-PDXs. **C**, Representative images of E-Cadherin, EpCAM, ZEB1, and Vimentin expression in primary culture of the indicated cells. β -actin was used as a protein-loading control (**C** and **F**). **D**, Serial dilutions of tumor cells isolated from epithelial-like SCC10-PDXs and mesenchymal-like SCC11-PDXs were injected in immunodeficient mice. The number of mice developing tumors vs total tumor engrafted, frequency of cancer stem cells (CSCs), and confidence intervals (conf. int.) for each condition is shown (n.d., not determined). **E**, Results show mRNA levels (mean \pm SE) relative to *GAPDH* mRNA of the indicated genes in primary culture of tumor cells isolated from

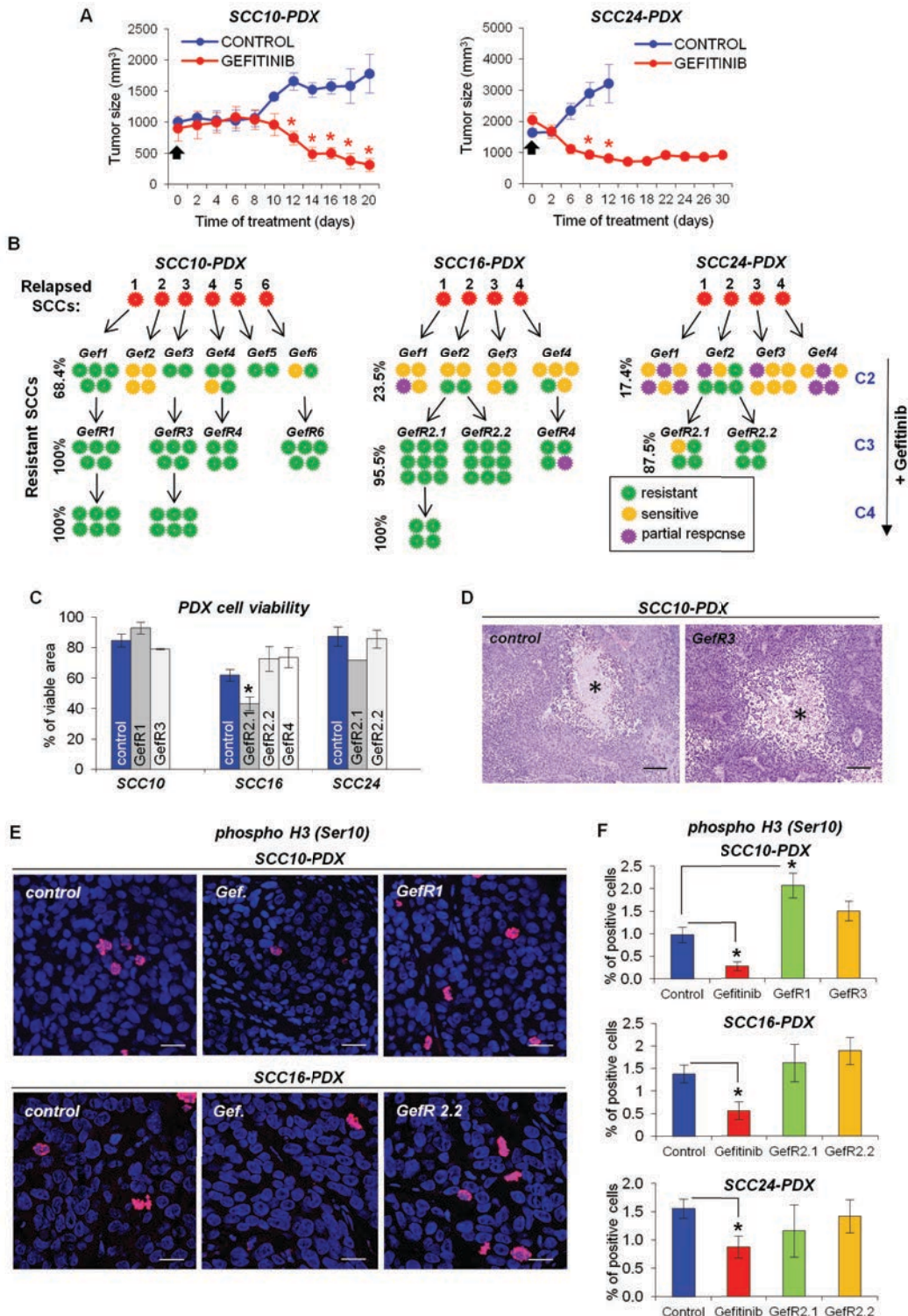
patient and cSCC-PDXs. **F**, Expression of FGFR1, PDGFR α and PDGFR β as well as EGFR phosphorylation status, was analyzed in primary culture of tumor cells isolated from the indicated patients and cSCC-PDXs. β -actin was used as a protein-loading control. The 11.1 and 11.2 samples are different primary cultures generated from the same patient sample (SCC11).

Bernat-Peguera et al. Supplementary Figure 3



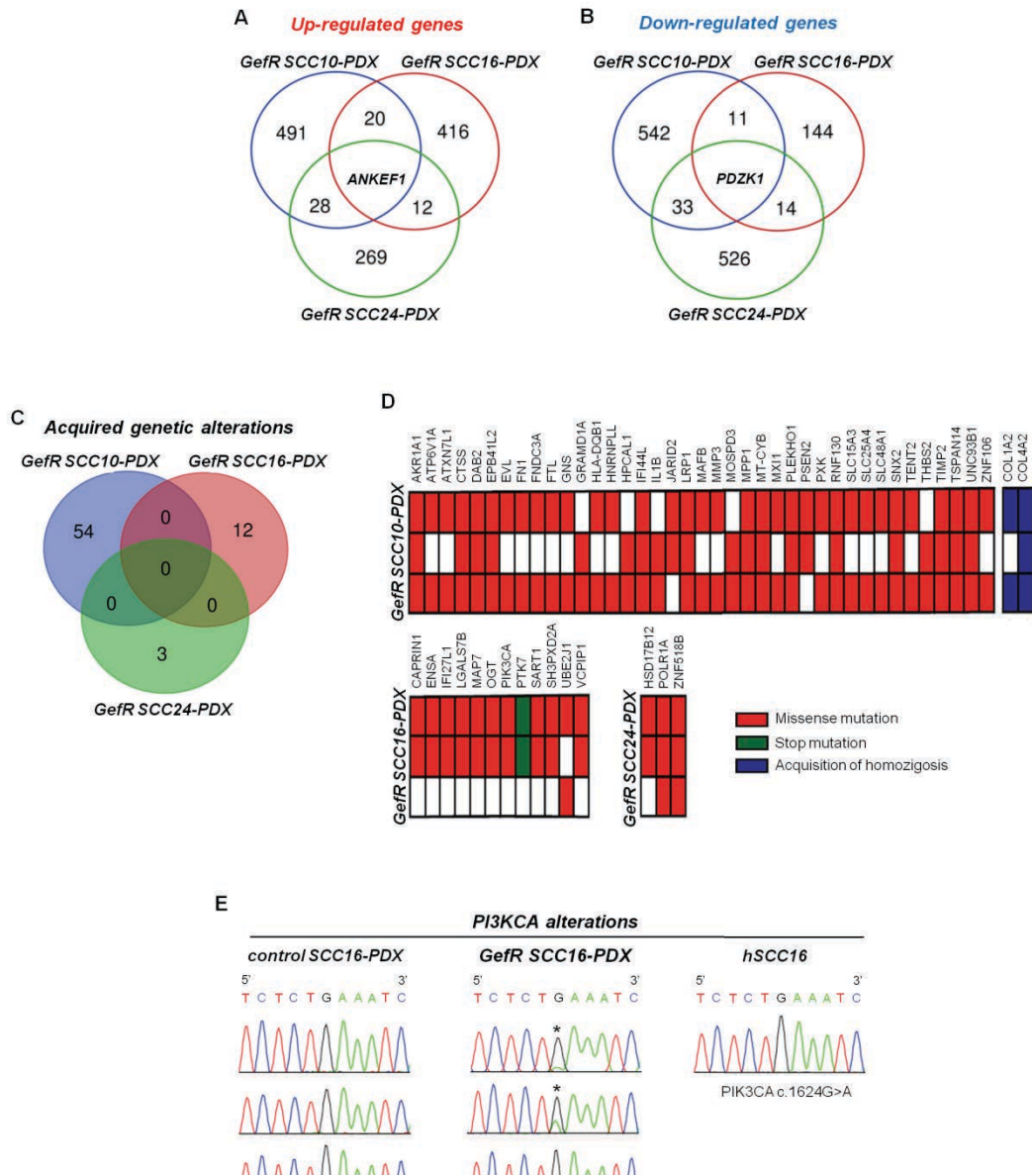
Supplementary Figure S3. Autocrine activation of EGFR signaling promotes proliferation of tumor cells isolated from epithelial-like cSCCs. **A**, Representative images of EGFR, AKT, and ERK1/2 phosphorylation status in SCC24 and SCC34 cells that were treated with or without gefitinib and EGF. **B**, Proliferation of the indicated tumor cells upon gefitinib and/or EGF treatment, as measured by MTT. Results show mean (\pm SE) of arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) of treated cells relative to cells growing upon basal conditions.

Bernat-Peguera et al. Supplementary Figure 4



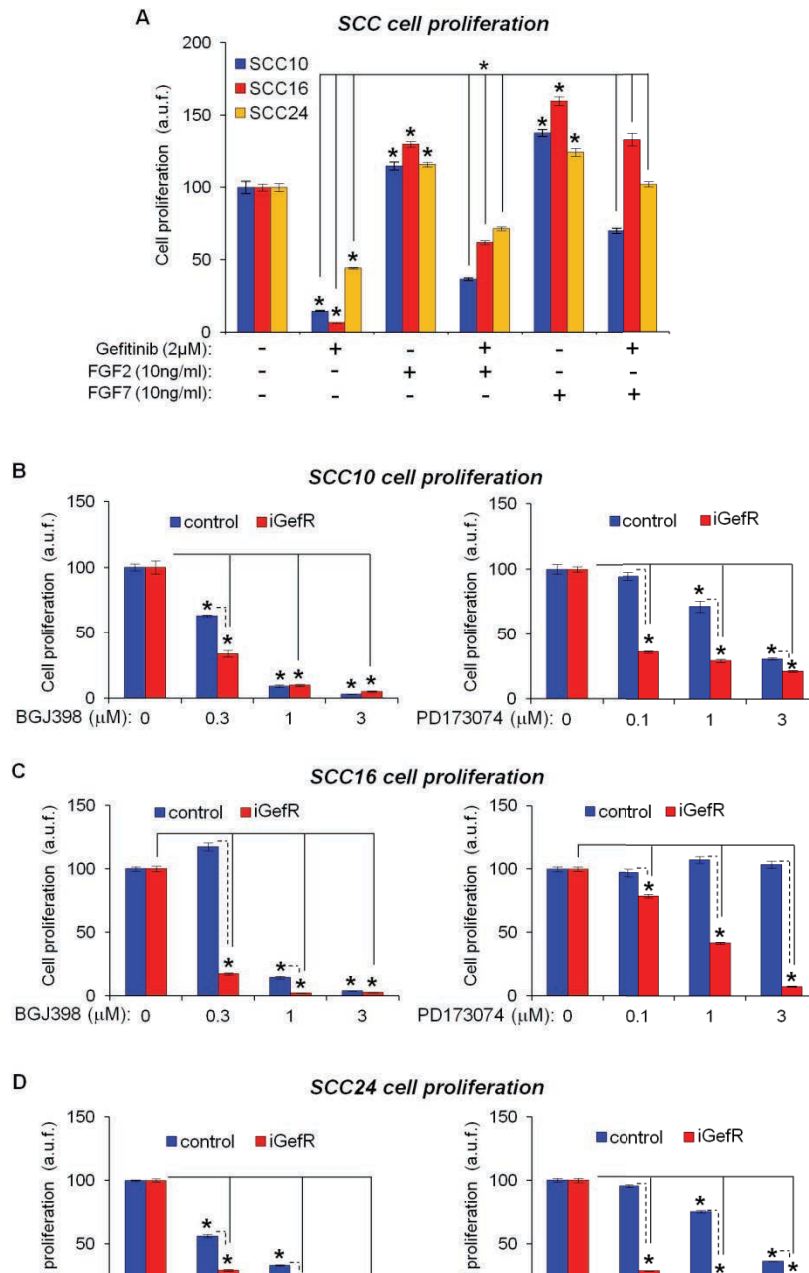
Supplementary Figure S4. Gefitinib therapy induces regression of epithelial-like cSCC-PDXs, but resistance is acquired after long-term treatment in a subset of tumors. **A**, Growth kinetics (mean \pm SE of tumor size, mm³; 3-4 tumors per group) of the indicated tumors, which were treated with vehicle (control) or gefitinib (75 mg/Kg) when tumors reached 1000-2000 mm³. Black arrow indicates start of the treatment. **B**, Schematic representation of the gefitinib response of the indicated relapsed cSCC-PDXs after several treatment cycles (C2, C3 and C4) in presence of gefitinib. The percentage of GefR tumors is shown for each PDX model. **C**, Results show the mean (\pm SE; 3-4 tumor samples per group) of the percentage of viable area in representative tumor sections of the indicated cSCC-PDXs, as quantified by ImageJ software. **D**, Representative images of tumor sections of control and GefR SCC10 PDXs that were quantified in (C). Necrotic areas are indicated by an

asterisk (*). Scale bar, 400 μ m. **E**, Representative images of the immunodetection of phosphorylated H3 (Ser10) in the indicated cSCC-PDXs. Scale bar, 20 μ m. **F**, Mean percentage of proliferating cells (\pm SE; 2-6 tumor samples per group), as determined in (**E**). *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$).

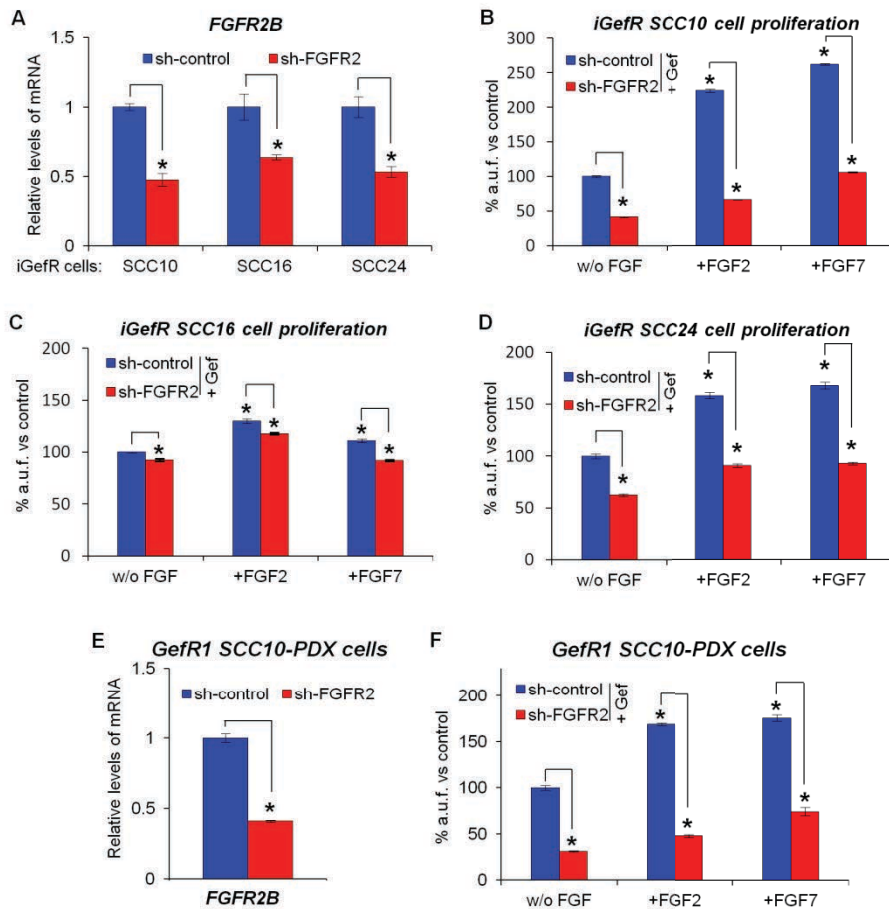


Supplementary Figure S5. A low number of genes with an altered expression or acquired mutations are commonly detected in the different GefR SCC-PDX models. **A** and **B**, Venn diagrams showing the overlapping of genes that are upregulated (**A**) and downregulated (**B**) in the indicated GefR SCC-PDXs compared to their respective control tumors. Common differentially expressed genes in the three PDXs are indicated. **C**, Venn diagrams showing the overlapping of mutated genes in the indicated GefR SCC-PDXs compared to their respective control tumors. **D**, Schematic representation of mutated genes detected in at least two of the three analyzed samples of the different GefR SCC-PDX models, as compared to their respective control tumors. **E**, Chromatograms showing the indicated mutation (*) in the DNA of three independent samples of control, GefR SCC16-PDX and parental patient tumor, as analyzed by Sanger sequencing. Forward (5'-3') sequences are indicated on the top of each chromatogram.

Bernat-Peguera et al. Supplementary Figure 6



Supplementary Figure S6. Activation of FGFR signaling stimulates the proliferation of epithelial-like SCC cells and iGefR cells upon EGFR inhibition. **A**, Proliferation of the indicated cells after six days of treatment with or without gefitinib, FGF2 or FGF7, as measured by MTT. Results show mean (\pm SE) of arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) of treated cells relative to their respective control cells growing in basal conditions. **B-D**, Proliferation of the indicated control and iGefR cells upon NVP-BGJ398 or PD173074 treatment during six days, as measured by MTT. iGefR cells were simultaneously treated with gefitinib, to block EGFR activity. Mean (\pm SE) of arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) of treated cells relative to their respective control cells are indicated. *, significant differences between groups (*t*-test; $P < 0.05$).



Supplementary Figure S7. FGFR2B abrogation blocks the proliferation of GefR cells. **A**, Mean levels (\pm SE) of *FGFR2B* mRNA in the indicated FGFR2 interfered (sh-FGFR2) iGefR cells relative to sh-control iGefR cells. **B-D**, Proliferation of (**B**) iGefR SCC10 cells, (**C**) iGefR SCC16 cells and (**D**) iGefR SCC24 cells expressing FGFR2B (sh-control) or FGFR2B knocked-down (sh-FGFR2) upon FGF2 or FGF7 treatment, as measured by MTT. These cells were grown in continuous presence of gefitinib. Means (\pm SE) of arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) of treated cells relative to their respective cells growing without factors are indicated. **E**, Mean levels (\pm SE) of *FGFR2B* mRNA in sh-FGFR2 relative to sh-control cells isolated from GefR1 SCC10-PDXs. **F**, Proliferation of sh-control and sh-FGFR2 cells from GefR1 SCC10-PDX upon FGF2 or FGF7 treatment in the presence of gefitinib, as measured by MTT. Means (\pm SE) of a.u.f. of treated cells relative to their respective cells growing without factors are indicated. *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$).

Antibody	Dilution	Source	Catalog number
<i>Primary antibodies</i>			
α 6-integrin (CD49f)-PE	1/50	BD Bioscience	555736
anti-EpCAM-FITC	1/350	Milteny Biotec	130-098-113
anti-CD31	1/100	BD Bioscience	550274
anti-phosphorylated H3 (Ser10)	1/200	Cell Signaling	9706S
anti-E-Cadherin	IF: 1/200 WB: 1/3000	BD Bioscience	610182
anti-Vimentin	IF: 1/200 WB: 1/8000	Abcam	ab45939
anti-Zeb1	IF: 1/400	Sigma	HPA027524
anti-Zeb1	WB: 1/1000	Santa Cruz Biotec	sc-10572
anti-PDGFR α	1/500	R&D Systems	AF-307-SP
anti-PDGFR β	1/1000	Santa Cruz Biotec	sc-374573
anti-EpCAM	1/1000	abcam	
anti-EGFR	1/2000	Cell Signaling	4267
anti-pEGFR	1/1000	Cell Signaling	2234
Anti-AKT	1/1000	Cell Signaling	9272
Anti-pAKT	1/1000	Cell Signaling	9271
Anti-ERK	1/3000	Cell Signaling	9102
Anti-pERK	1/1000	Cell Signaling	4376
Anti-FGFR1	1/1000	Cell Signaling	9740
Anti-actin-HRP	1/1000000	Abcam	ab49900
<i>Secondary antibodies</i>			
Dynabeads anti-rat	1/50	Invitrogen	11035
anti-rabbit-Alexa 488	1/400	ThermoFisher	A27034
anti-rat-Alexa 488	1/400	ThermoFisher	A11006
anti-rabbit-Alexa 568	1/600	ThermoFisher	A10042
anti-rabbit-HRP	1/1000	DAKO	P0448
anti-mouse-HRP	1/1000	DAKO	P0447
anti-goat-HRP	1/1000	DAKO	P0449

Supplementary Table S1. List of antibodies used in flow cytometry, immunofluorescence and western blot analysis

Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
qRT-PCR primers		
<i>GAPDH</i>	CAAGATCATCAGCAATGCCT	AGGGATGATGTTCTGGAGAG
<i>HPRT</i>	TGACACTGGCAAAACAATG	GGTCCTTTTCACCAGCAAG
<i>GUSB</i>	CTCATTTGGAATTTTGCCGATT	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA
<i>PDGFRA</i>	GTCTGGAGCGTTTGGGAAGGT	GATCTGGCCGTGGGTTTTAGC
<i>PDGFRB</i>	GGACATACCCCCGCAAAGAA	CTAACTCGGCACTGGGGATGT
<i>PDGFC</i>	ATATTAGGGCGCTGGTGTGGT	TGGCAAAGCTGAAGGGGGTAG
<i>FGFR1b</i>	GTGAATGGGAGCAAGATTGG	GCAGAGTGATGGGAGAGTCC
<i>FGFR1c</i>	GTGAATGGGAGCAAGATTGG	GCAGAGTGATGGGAGAGTCC
<i>FGFR2b</i>	GCAGAAAGTGCTGGCTCTGTT	TGTTTTGGCAGGACAGTGAG
<i>FGFR2c</i>	CACCACGGACAAAGAGATTG	CAACCATGCAGAGTGAAAGG
<i>FGFR3</i>	CCTCGGGAGATGACGAAGAC	CGGGCCGTGTCCAGTAAGG
<i>EGFR</i>	CCCACTCATGCTCTACAACCC	TCGCACTTCTTACACTTGCGG
<i>ERBB2</i>	AGCATGTCCAGGTGGGTCT	CTCCTCCTCGCCCTCTTG
<i>ERBB3</i>	GGTGATGGGGAACCTTGAGAT	CTGTCACTTCTCGAATCCACTG
<i>ERBB4</i>	GCAGATGCTACGGACCTTACG	GACACTGAGTAACACATGCTCC
<i>AREG</i>	GTGGTGCTGTCGCTCTTGATA	CCCCAGAAAATGGTTCACGCT
<i>EREG</i>	CACAGTTGTACTGAGGACTGCC	AGGAGGATGGAGATGCTCTG
<i>TGFA</i>	AGGTCCGAAAACACTGTGAGT	AGCAAGCGGTTCTTCCCTTC
<i>CDH1</i>	CAGAATTGCTCACATTTCC	GGATTTGATCTGAACCAGGT
<i>VIMENTIN</i>	GGCTCAGATTCAGGAACAGC	GCTTCAACGGCAAAGTTCTC
<i>SNAIL</i>	GCTGCAGGACTCTAATCCAGA	GACAGAGTCCAGATGAGCAT
<i>ZEB1</i>	TTTGGCTGGATCACTTTCAAG	GCCAATAAGCAAACGATTCTG
<i>ZEB2</i>	TGTAGATGGTCCAGAAGAAATG	CCATTGTTAATTGCGGTCT
Sanger sequencing primers		
<i>FAT1</i>	CCGCACTTCAGGAGTTCTGT	GGTAGTAATGCACTTCCCCGT
	TGCACAGTCTGCTTTCCTT	TTCACGGTGCAGAAAGCAAC
	TGCACCTCCCATTATTGGCT	TGTGGATTTCCACTTGTAATTTTGT
<i>NOTCH1</i>	AGATCAACCTGGATGACTGTGCC	ACAGCTCTGACCGGAGACAAG
	GGACCGGACCCAACACTTAC	GGCTGGAGCACTCGTTGA
<i>NOTCH2</i>	TGCCCACCATGTACCAGATT	GCAGAGTGGGGTGATGAACT
<i>NOTCH3</i>	TCGGTAGTAATGCTGGAGATTGA	ACCCAGGACGAGAATGACCAG
<i>TP53</i>	GGCCATCCTCACCATCATC	CTTCTTTGGCTGGGGAGAGG
<i>KMT2D</i>	GGCCTTTTAAACCAGAGTCGAAC	CTAACGGCCCTCCCTGATGT
<i>RASA2</i>	CAGAAGACTACGTGCTTCCCTC	TCAAGTCTAATTCAGCCACAGCA
<i>GSK3B</i>	ACTGTGAAAGGATAGCAGTCTAAGT	TGAGGTATGCCTATACATGTTTGC
<i>LOXL2</i>	GTCCTCAATGCGGAGATGGT	ACAGTCGTGCCAGATCCAC
<i>VHL</i>	ACCGGTGTGGCTCTTTAACA	CAGTGTGATATTGGCAAAAATAGGC
<i>IHD1</i>	GTAGGTCATTTGGTTGTGGTGG	CAGAGTGGTTTTGTTTCACTCCTG
<i>PIK3CA</i>	CATCTGTGAATCCAGAGGGGA	TTAGCACTTACCTGTGACTCCA

Supplementary Table S2. Primers used in qRT-PCR and Sanger sequencing.

Tumor	Classification /Grade (passage)	Perineural invasion	Treatment (adjuvant)	Recurrence (patient)	Metastasis		
					lung	lymph node	liv./kid.
SCC7 SCC7-PDX	MD-SCC/G2 MD-SCC/G2 (4)	no no	RT -	yes -	- 25%	yes -	- -
SCC10 SCC10-PDX	MD/PD-SCC/G3 MD/PD-SCC G2/G3 (8)	no no	no -	no -	no 0%	no 14.3%	no 0%
SCC11 SCC11-PDX	PD/S-SCC/G4 PD/S-SCC/G4 (13)	yes yes	no -	no -	no 77.5%	no 32.7%	no 32.7%
SCC16 SCC16-PDX	PD-SCC/G3 PD-SCC/G3 (9)	yes no	no -	no -	yes 0%	yes 0%	no 0%
SCC23 SCC23-PDX	MD-SCC/G2 Met MD/PD-SCC G2/G3 (6)	yes no	no -	yes -	no 25%	yes 8.3%	no 0%
SCC24 SCC24-PDX	MD-SCC/G2 MD-SCC/G2 (5)	yes no	RT -	no -	no 20%	no 40%	no 0%
SCC34 SCC34-PDX	MD/PD-SCC/G3 MD-SCC/G2 (5)	yes no	no -	yes -	no 66.6%	no 33.3%	no 0%

Supplementary Table S3. Histopathologic characteristics of generated cSCC-PDXs and their respective patient samples.

ARTÍCULO 3: PDGFR-induced autocrine SDF-1 signaling in cancer cells promotes metastasis in advanced skin carcinoma

Adrià Bernat-Peguera¹, Pilar Simón-Extremera¹, Victoria da Silva-Diz^{1,6}, Mikel López de Munain¹, Laura Díaz-Gil¹, Rosa M. Penin², Eva González-Suárez¹, Diana Pérez Sidelnikova³, Oriol Bermejo³, Joan Maria Viñals³, Francesc Viñals^{4,5}, Purificación Muñoz¹

These authors contributed equally: Pilar Simón-Extremera, Victoria da Silva-Diz

1. Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain; 2. Pathology Service, Hospital Universitario de Bellvitge/IDIBELL, Barcelona, Spain; 3. Plastic Surgery Unit, Hospital Universitario de Bellvitge/ IDIBELL, Barcelona, Spain; 4. Laboratory of Translational Research, Catalan Institute of Oncology (ICO/IDIBELL), Barcelona, Spain; 5. Unitat de Bioquímica I Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques, Universitat de Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain; 6. Present address: Rutgers Cancer Institute of New Jersey, Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA

Oncogene. Published Online March 15, 2019; doi:10.1038/s41388-019-0773-y

RESUMEN EN CASTELLANO

Los cSCC avanzados y de alto riesgo, junto con los cSCC metastásicos y los de difícil resección, son tratados con radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, estas terapias presentan pocos beneficios clínicos, y en muchos casos se produce una progresión de la enfermedad, frecuentemente asociada a la aparición de recurrencias y el desarrollo de metástasis, lo cual compromete significativamente la supervivencia de los pacientes. En este sentido, nuestros estudios previos demostraron que la vía de PDGFR se induce de forma autocrina en las CSCs de los SCCs avanzados de ratón, controlando su invasión y promoviendo la metástasis. Sin embargo, desconocíamos los mecanismos por los cuales la vía de PDGFR controla estos procesos, y si esta regulación se produce de forma similar en cSCC de pacientes.

Estudios recientes han demostrado que las citoquinas juegan un importante papel en la regulación de la metástasis en muchos tipos de cáncer. En este sentido, nuestros estudios demuestran que la expresión de la citoquina SDF-1 (CXCL12) está inducida en las L-CSCs de los PD/S-SCCs, comparado con la expresión detectada en las CSCs de los WD-SCCs (E-CSCs). Además, observamos que una población de las E-CSCs y L-CSCs expresan CXCR4 y CXCR7, los receptores de SDF-1.

El bloqueo de la vía de SDF-1/CXCR4, ya sea mediante la interferencia de SDF-1 o CXCR4, o mediante el tratamiento con el inhibidor AMD3100, consigue reducir de forma significativa la proliferación/supervivencia y la invasión de las L-CSCs *in vitro*, demostrando que la activación autocrina de la vía mediada por SDF-1 controla estos procesos en las CSCs de los SCC de piel avanzados de ratón. Sin embargo, la inhibición de la vía no afecta al crecimiento tumoral, sugiriendo que el SDF1 secretado por el estroma tumoral podría estimular de forma paracrina la vía de SDF-1/CXCR4, o bien que, alternativamente, otras citoquinas provenientes del estroma podrían promover la proliferación/supervivencia de las L-CSCs y el crecimiento de los PD/S-SCCs cuando la vía de SDF-1 está bloqueada en las células tumorales.

Sin embargo, la inhibición de la vía de señalización SDF-1/CXCR4 en L-CSCs reduce significativamente el desarrollo de metástasis, sugiriendo que esta vía podría estar cooperando con la vía de PDGFR regulando la invasión de las L-CSCs y promoviendo la metástasis. En este sentido, nuestros resultados han revelado una relación funcional entre las vías de SDF1 y PDGFR. La señalización PDGFR α induce la expresión de SDF-1 y *viceversa*, lo cual activa de forma autocrina la vía mediada por SDF-1/CXCR4 e induce la invasión de las L-CSC y promueve la metástasis.

La validación de estos resultados en muestras de pacientes de cSCC ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la expresión de *SDF1*, *PDGFRA* y *PDGFRB*, los cuales están

altamente expresados, junto con CXCR4, en las células tumorales de los cSCCs más avanzados. De forma similar a lo observado en ratón, PDGFR regula positivamente la expresión de SDF-1 y la inhibición de las vías SDF-1/CXCR4 y PDGFR bloquea la metástasis asociada a los PD/S-SCC de pacientes.

Todos estos resultados indican que los procesos de invasión y metástasis de los SCC avanzados están regulados por una relación funcional entre las vía de señalización de SDF1 y PDGFR, y sugieren que el tratamiento con AMD3100 y/o imatinib, inhibidores de CXCR4 y PDGFR, respectivamente, podría ser una aproximación terapéutica para bloquear la metástasis en los pacientes con tumores más avanzados y agresivos.

ABSTRACT

Advanced and undifferentiated skin squamous cell carcinomas (SCCs) exhibit aggressive growth and enhanced metastasis capability, which is associated in mice with an expansion of the cancer stem-like cell (CSC) population and with changes in the regulatory mechanisms that control the proliferation and invasion of these cells. Indeed, autocrine activation of PDGFR α induces CSC invasion and promotes distant metastasis in advanced SCCs. However, the mechanisms involved in this process were unclear. Here, we show that CSCs of mouse advanced SCCs (L-CSCs) express CXCR4 and CXCR7, both receptors of SDF-1. PDGFR α signaling induces SDF-1 expression and secretion, and the autocrine activation of this pathway in L-CSCs. Autocrine SDF-1/CXCR4 signaling induces L-CSC proliferation and survival, and mediates PDGFR α -induced invasion, promoting *in vivo* lung metastasis. Validation of these findings in patient samples of skin SCCs shows a strong correlation between the expression of *SDF1*, *PDGFRA*, and *PDGFRB*, which is upregulated, along CXCR4 in tumor cells of advanced SCCs. Furthermore, PDGFR regulates SDF-1 expression and inhibition of SDF-1/CXCR4 and PDGFR pathways blocks distant metastasis of human PD/S-SCCs. Our results indicate that functional crosstalk between PDGFR/SDF-1 signaling regulates tumor cell invasion and metastasis in human and mouse advanced SCCs, and suggest that CXCR4 and/or PDGFR inhibitors could be used to block metastasis of these aggressive tumors.

INTRODUCTION

Squamous cell carcinoma (SCC) is the second most common non-melanoma skin cancer in humans, accounting for 20% of cutaneous malignancies [1, 2]. Most invasive skin SCCs conserve epithelial differentiation traits and are considered to be well-differentiated SCCs (WD-SCCs). A subset of SCCs show poorly differentiated features and eventually become spindle-shaped (PD/S-SCCs), the latter characteristic being associated with enhanced recurrence, metastasis, and reduced patient survival [3–5]. Most skin SCC lesions are treated by surgical excision. Although high risk and metastatic skin SCCs are treated with adjuvant radiotherapy or chemotherapy, the clinical benefits of these treatments have been limited [6]. Therefore, it is important to design targeted therapies that efficiently block the aggressive growth and metastasis of advanced SCCs.

Mouse skin SCC cells expressing CD34 and $\alpha 6$ -integrin, or Sox2 are enriched in tumor-initiating or cancer stem-like cells (CSCs) relative to the bulk of tumor cells. This cell population is responsible for long-term SCC growth and metastasis [7–9]. Highly aggressive and metastatic mouse PD/S-SCCs arise from the malignant progression of WD-SCCs [10, 11] and during this process, the CSC population is dramatically expanded and regulatory mechanisms controlling CSC proliferation and dissemination change. FGFR1 signaling is induced in the CSCs of advanced PD/S-SCCs to promote aggressive growth. The PDGFR α pathway is also activated by an autocrine way in these CSCs, which promotes CSC invasion and enhances metastasis in PD/S-SCCs [11]. However, the mechanisms involved in PDGFR α -induced metastasis remain unclear.

The chemokine SDF-1 (CXCL12), which binds to G protein-coupled receptors CXCR4 and CXCR7, plays an important role in tumor growth and metastasis in different tumor types [12–15]. Stromal fibroblasts and cancer cells produce SDF-1 [16], which stimulates cancer cell proliferation and is responsible for recruiting CXCR4-expressing endothelial progenitor cells, thereby increasing tumor angiogenesis [17, 18]. CXCR4 is expressed by CSCs in various tumor types [19–21]. SDF-1/CXCR4 signaling increases the self-renewal of breast and brain CSCs [22–24], and the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) program and metastasis in sarcomas, breast, pancreatic, colon, and liver cancer cells [24–27]. CXCR7/RDC1 receptor is expressed by immune, endothelial, and tumor cells and binds SDF-1 with high affinity [28]. Although CXCR7 was thought to act as a scavenger receptor [29], it was recently demonstrated that SDF-1/ CXCR7 signaling induces CSC proliferation/survival and EMT [30, 31], supporting growth and metastasis in different tumor types.

SDF-1 is significantly upregulated in stromal fibroblasts of human skin SCCs relative to normal skin [32], and CXCR4 is upregulated in metastatic SCCs in comparison to normal skin and non-metastatic skin carcinomas [33], whereas CXCR7 expression is induced in 70% of patient skin

SCC samples and is associated with cancer cell survival [34]. However, the role of the SDF1/CXCR4/CXCR7 pathway in cutaneous SCCs has been unclear. Here, we demonstrate that functional crosstalk between PDGFR/SDF-1 pathways induces the autocrine activation of SDF-1/CXCR4 signaling in cancer cells of mouse and human PD/S-SCCs, which promotes distant metastasis.

MATERIAL AND METHODS

Mouse models and lineages of skin SCC generation

To generate the different lineages of skin SCC progression, small pieces (2–4 mm³) of spontaneous or DMBA/TPA-induced tumor that were developed in K14-HPV16^{Tg/+} mice (FVB/C57/B16 F1) [52] were engrafted in the back skin of 6-week-old male nude mice (Athymic Nude-Foxn1^{nu}; Harlan Laboratories). Each orthotopic tumor (OT-SCC) was serially engrafted in a new immunodeficient mouse, as previously described [11]. Animal housing, handling, and all procedures involving mice were approved by the Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL) ethics committee, in accordance with Spanish national regulations.

Human skin SCC samples

Samples of human skin SCCs were supplied by the Plastic Surgery and Pathology Units of the Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL) and the Spanish Hospital Platform Biobank Network (RetBioH; www.redbiobancos.es). The protocol of sample collection was supervised and approved by the Ethical Committee of Clinical Research of Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL). All patients were informed beforehand and their signed consent to participate was obtained.

SCC cell isolation and flow cytometry analysis

Tumor cells from skin SCCs were analyzed by flow cytometry, and specific cell populations were isolated by FACS-sorter, as described in Supplementary Methods.

Cell cultures

Tumor cells (hematopoietic lineage and endothelial negative cells) isolated from mouse WD-SCCs (WD cells) and PD/S-SCCs (PD/S cells) from different lineages, and tumor cells isolated from human PD/S-SCCs (hSCC11 cells) (see Supplementary Methods for detailed protocol) were grown in DMEM-F12 medium (GIBCO Life Technologies) with 1X B27 (GIBCO Life Technologies) and penicillin/streptomycin (PAA Laboratories) (basic medium). Tumor cells

isolated from human WD/MD-SCCs (hSCC24 cells) were grown in basic medium supplemented with EGF (20 ng/mL; Sigma). Cells were cultured at 37 °C in a humidified, 5% CO₂ incubator. Protocols for analyzing cell proliferation and for cell transduction are described in detail in the Supplementary Methods.

***In vitro* invasion assay**

To test the invasion capability of human and mouse tumor cells in response to inhibitor treatments, CIM-16 plates (ACEA Biosciences) coated with 5% Matrigel (Factor-Reduced; BD Biosciences) were used. PD/S cells were previously treated without (control) or with AMD3100 (1 and 5 µg/mL; Chemscone LLC) and imatinib (4 µM; LC Laboratories) for 48 h, and cells (8 x 10⁵, 4–6 replicates for sample) were seeded in the top chamber, and placed in the xCeLLigence system, maintaining the same concentration of inhibitors in the lower chamber. Each assay was performed twice. The cell index represents the cell invasion capacity.

ELISA assay

To carry out these analyses, 1.5 x 10⁶ of mouse and human WD and PD/S cells were incubated for 48 h at 37 °C in basic medium. The medium was then collected and centrifuged (13,000 r.p.m.) for 10 min and SDF-1 concentration in the supernatant was analyzed using the PeproTech ELISA kit (Mini ABTS ELISA Development kit) (three replicates per sample), following the manufacturer's recommendations. Substrate solution (TMB Liquid Substrate) was added and incubated for 20 min at room temperature. The absorbance was measured at 450 nm.

Tumor cell grafting and *in vivo* treatments

Sdf1, *Cxcr4*, and *Cxcr7* expression and tumor cell populations expressing these receptors were analyzed in skin SCCs spontaneously developed in male and female K14-HPV16^{Tg/+} mice (four samples per group), and in WD-SCCs and PD/S-SCCs generated after subcutaneous engrafting WD cells (1 x 10⁶ cells) and PD/S cells (1 x 10⁴ cells) from OT7 and OT14 lineages with Matrigel (1:1; BD Biosciences) in syngeneic immunocompetent mice (6-week-old C57Bl6/FVB F1 male mice; four samples for group). The impact of CXCR4, CXCR7, SDF1 knockdown on mouse tumor growth and metastasis was studied by subcutaneously co-injecting 4x10³ sh-control (n=10), sh-CXCR4 (n=11), sh-CXCR7 (n=11), and sh-SDF1 (n=11) mouse PD/S cells with Matrigel (1:1; BD Biosciences) in 6-week-old male nude mice. Following the same protocol, 4x10³ sh-control (n=6) and sh-CXCR4 (n=10) PD/S cells were injected in immunocompetent mice. To test the *in vivo* effect of CXCR4 and SDF1 knockdown on human PD/S-SCC growth and metastasis, 1 x 10⁶ of sh-control (n=15), sh-CXCR4 (n=10), and sh-SDF1 (n=5) hSCC11 cells were engrafted in

NOD-scid IL2R β null (NSG) mice. Tumor growth was monitored and tumors were excised after 25–27 days (mouse SCCs) or 30–32 days (human SCCs), when they reached a critical size. Mice were sacrificed 20 days (mouse PD/S-SCCs) or 10 days (human PD/S-SCCs) after tumor resection. The lungs were recovered and formalin-fixed to quantify the metastatic lesions (5–6 samples per group). For pharmacological inhibition of CXCR4 in mouse PD/S-SCCs, 4×10^3 OT14 PD/S cells were subcutaneously engrafted in syngeneic immunocompetent mice. For pharmacological inhibition of PDGFR and CXCR4 in human PD/S-SCCs, 1×10^6 of hSCC11 cells were engrafted in NSG mice. When the tumors were palpable, mice were randomly distributed between control and treated groups, in order that tumor size was similar in both groups at the start of the treatment. Then, mice were intraperitoneally treated with AMD3100 (Glentham Life Sciences; 15 mg/kg; diluted in sterile serum), or serum (n = 7 tumors per group for mouse and human SCCs), or orally administered with imatinib (LC Laboratories; 150 mg/kg; diluted in water) or water (n = 9 tumors per group), daily. Tumors were excised when they reached a critical size (20 days post-engraftment) and mice continued to be treated until sacrifice, 10–15 days (for human SCCs) or 20 days (for mouse SCCs) after tumor resection. Then, lungs were recovered and formalin-fixed to quantify the development of the metastatic lesions (5–6 samples per group). Tumors that did not grow after 4–5 weeks of the engraftment or mice that died before the experiment endpoint were excluded.

Histology, immunohistochemistry, and western blot assays

Tumor and lung samples were fixed in 4% formaldehyde overnight at 4 °C, paraffin-embedded, and sectioned at 4 μ m. For histopathological analysis and quantification of metastatic lesions, tumor and lung sections were stained with hematoxylin and eosin. Protocols for immunofluorescence assays and western blot analysis are described in detail in the Supplementary Methods.

Reverse transcription and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from tumors and cells using Trizol Reagent (Invitrogen). Reverse transcription reactions and quantitative real-time PCR were carried out as described in Supplementary Methods.

RESULTS

SDF-1 and CXCR4 expression is upregulated in mouse advanced SCCs

To determine the relevance of SDF-1 signaling in skin SCC growth and metastasis, we initially compared the expression of this chemokine and *Cxcr4* and *Cxcr7* receptors in early WD-SCCs and advanced PD/S-SCCs of two different lineages of mouse skin SCC progression (OT7 and OT14). In each of these lineages, PD/S-SCCs were generated after the serial engraftment of their WD-SCC precursors in immunodeficient mice [11]. We found that *Sdf1* expression, which was weakly detected in early SCCs, was upregulated in PD/S-SCCs (Fig. 1A). In WD-SCCs, *Sdf1* was expressed by fibroblasts (Fig. 1B) and immunodetected in stromal cells (Fig. 1C), as previously described [32, 35], whereas tumor cells and CD45⁺ immune cells (deficient in T-cell in nude immunodeficient mice) exhibited a faint or undetectable *Sdf1* expression (Fig. 1B). In contrast, SDF-1 was strongly upregulated in tumor cells of PD/S-SCCs (Fig. 1C), reaching similar levels to those expressed by fibroblasts (Fig. 1B).

Cxcr4 and *Cxcr7* expression was upregulated in advanced SCCs relative to WD-SCCs (Fig. 1D). An expansion of CXCR4-expressing tumor cells was detected by immunohistochemistry in PD/S-SCCs, as compared to WD-SCCs (Supplementary Fig. 1A). Flow cytometry analysis showed that around 3–7% of tumor cells expressed CXCR4 ($\alpha6$ -integrin⁺/CXCR4⁺ cells) in WD-SCCs, and this frequency was significantly increased in PD/S-SCCs (Fig. 1E, F). CXCR7⁺ cells were more frequent than CXCR4-expressing cells in early and advanced SCCs (Supplementary Fig. 1A and 1B). Accordingly, 60–70% of tumor cells expressed CXCR7 ($\alpha6$ -integrin⁺/CXCR7⁺ cells) in WD-SCCs and this frequency was not significantly increased in PD/S-SCCs (Fig. 1E, F). These results suggest that increased levels of *Cxcr7* mRNA detected in advanced tumors may be associated with a different stromal/tumor cells ratio in WD-SCCs and PD/S-SCCs [36, 37].

Analysis of the ligand and receptors in the CSC population ($\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells) showed that CSCs isolated from PD/S-SCCs (L-CSCs) strongly expressed *Sdf1*, whereas the expression of this chemokine was practically undetectable in CSCs of WD-SCCs (E-CSCs) (Fig. 1G). CXCR4 was mostly expressed by a subpopulation (5–20%) of E-CSCs (Fig. 1H, I), whereas CXCR7 was detected in CSC and non-CSC populations, and around 50–80% of E-CSCs expressed CXCR7. Furthermore, the percentage of CXCR4- or CXCR7- expressing $\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells was not significantly altered in PD/S-SCCs compared with WD-SCCs (Fig. 1H, I). Since the $\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSC population is expanded in advanced tumors (Fig. 1I; see [7, 11]), our results indicate that the global amount of CXCR4⁺-CSCs was increased in the PD/S-SCCs.

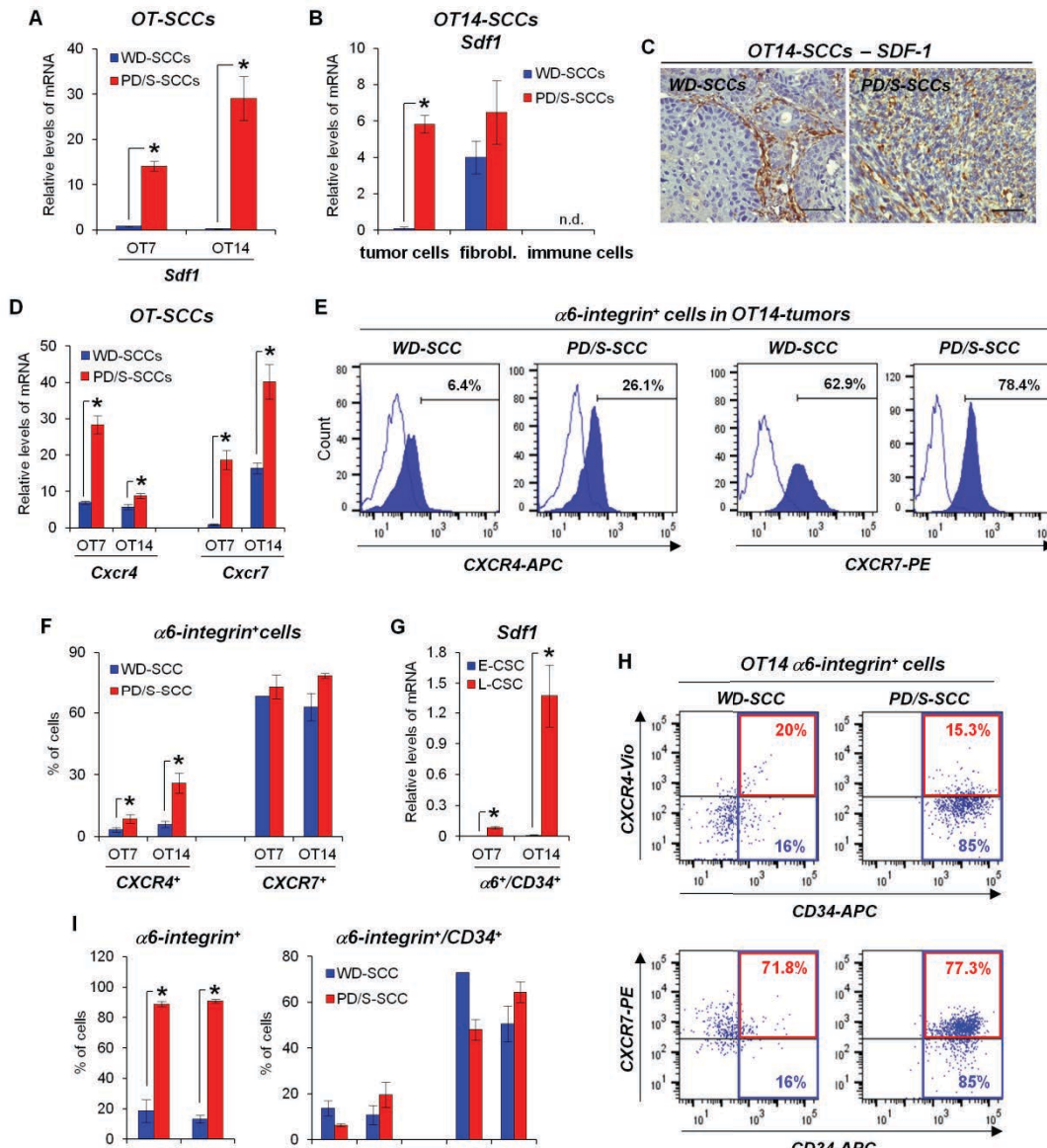


Fig. 1. CSCs of mouse advanced skin SCCs express CXCR4 and CXCR7 and up-regulate the expression of *Sdf1*. **A, B**, Mean (\pm SE) levels of *Sdf1* mRNA relative to *Gapdh*, as quantified by qRT-PCR in WD-SCCs and PD/S-SCCs (three different samples per group) of OT7 and OT14 lineages (**A**), and in tumor cells ($\alpha 6$ -integrin⁺/CD45⁻/CD31⁻ cells), immune cells ($\alpha 6$ -integrin⁻/EpCAM⁺/CD45⁺/CD31⁻ cells), and fibroblasts ($\alpha 6$ -integrin⁻/EpCAM⁻/CD45⁻/CD31⁻ cells) isolated from OT14 WD-SCCs and PD/S-SCCs (two different samples per group) by FACS-sorter (**B**). **C**, Representative images of the SDF-1 immunodetection in paraffin sections of WD-SCCs and PD/S-SCCs of OT14 lineage. Scale bar, 100 μ m. **D**, Mean (\pm SE) levels of the indicated mRNAs, relative to *Gapdh*, as quantified by qRT-PCR in WD-SCCs and PD/S-SCCs (three different samples per group) of OT7 and OT14 lineages. **E**, Representative results of quantification of the indicated cell populations in OT14 WD-SCCs and PD/S-SCCs by flow cytometry. Percentage of $\alpha 6$ -integrin⁺/CXCR4⁺ and $\alpha 6$ -integrin⁺/CXCR7⁺ cells is indicated in each panel. **F**, Mean percentages (\pm SE) of cell populations analyzed in **E** (3–10 different tumor samples per group). **G**, Mean (\pm SE) *Sdf1* mRNA levels relative to *Gapdh* in E-CSCs and L-CSCs (three different samples per group) isolated by FACS-sorter from the indicated tumors. **H**, Flow cytometry quantification of CXCR4⁺ and CXCR7⁺ cells (red numbers) into the $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ CSC population (blue numbers) of the indicated tumors. **I**, Mean percentage (\pm SE) of the indicated cell populations in WD-SCCs and PD/S-SCCs, as quantified in **H**. *, significant differences between compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$). n.d. not detected.

It is important to highlight that similar *Sdf1* and *Cxcr4* upregulation was observed in primary PD/S-SCCs (spontaneously developed in K14-HPV16 mice [11]) and in PD/S-SCCs that were engrafted in syngeneic immunocompetent mice, relative to their respective WD-SCCs (Supplementary Fig. 1C and 1D). SDF-1 expression was significantly induced in tumor and stromal cells (Supplementary Fig. 1E), and an expansion of CXCR4-expressing CSCs was detected in PD/S-SCCs generated in immunocompetent mice (Supplementary Fig. 1F–1H), indicating that SDF-1 signaling may be activated in CSCs of advanced tumors independently of the immune status of the mice.

Autocrine SDF-1 signaling promotes PD/S-SCC CSC proliferation and invasion

To determine whether an autocrine SDF-1 signaling is induced in L-CSCs, we isolated tumor cells from WD-SCCs (WD cells) and PD/S-SCCs (PD/S cells), which were maintained in culture. We previously demonstrated that these primary cultures were enriched in tumor-initiating cells that conserved the molecular traits of parental SCC CSCs [11]. In this regard, PD/S cells expressed and secreted higher levels of SDF-1 than WD cells (Fig. 2A, B). In addition, PD/S cells expressed *Cxcr4* and *Cxcr7*, showing a lower expression of *Cxcr4* than *Cxcr7* (Fig. 2C). Accordingly, 40–60% of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs in PD/S cell cultures expressed CXCR7, whereas 6–16% of $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺-CSCs expressed CXCR4 (Fig. 2D; Supplementary Fig. 2A and 2B), and most CXCR4⁺-CSCs expressed CXCR7 (Supplementary Fig. 2C).

To determine the impact of SDF-1 signaling on proliferation, PD/S cells growing in basal medium or supplemented with purified chemokine were treated with AMD3100, an antagonist of CXCR4 [38]. AMD3100 treatment significantly inhibited the proliferation/survival of PD/S cells under basal conditions, and addition of SDF-1 to the medium did not alter or only slightly induced the proliferation of PD/S cells (Fig. 2E; Supplementary Fig. 2D). Similarly, the proliferation of PD/S cells with interfered expression of SDF-1 (Supplementary Fig. 2E) was significantly reduced in comparison with that of PD/S control cells (Fig. 2F; Supplementary Fig. 2F), indicating that the autocrine activation of SDF-1 signaling promotes PD/S cell proliferation. The expression of *Cxcr4*, but not of *Cxcr7*, was significantly reduced in SDF-1 knocked-down cells (Supplementary Fig. 2G), suggesting that *Cxcr4* expression is regulated directly or indirectly by SDF-1 signaling.

PD/S cells showed *in vitro* a strong migration and invasion capacity, which was associated with enhanced distant metastasis in advanced SCCs [11]. We observed that AMD3100 treatment, as well as SDF-1 abrogation significantly reduced the invasive capability of PD/S cells (Fig. 2H, I). These results indicate that autocrine SDF-1 signaling promotes CSC motility and invasion, which may consequently favor CSC dissemination and metastasis.

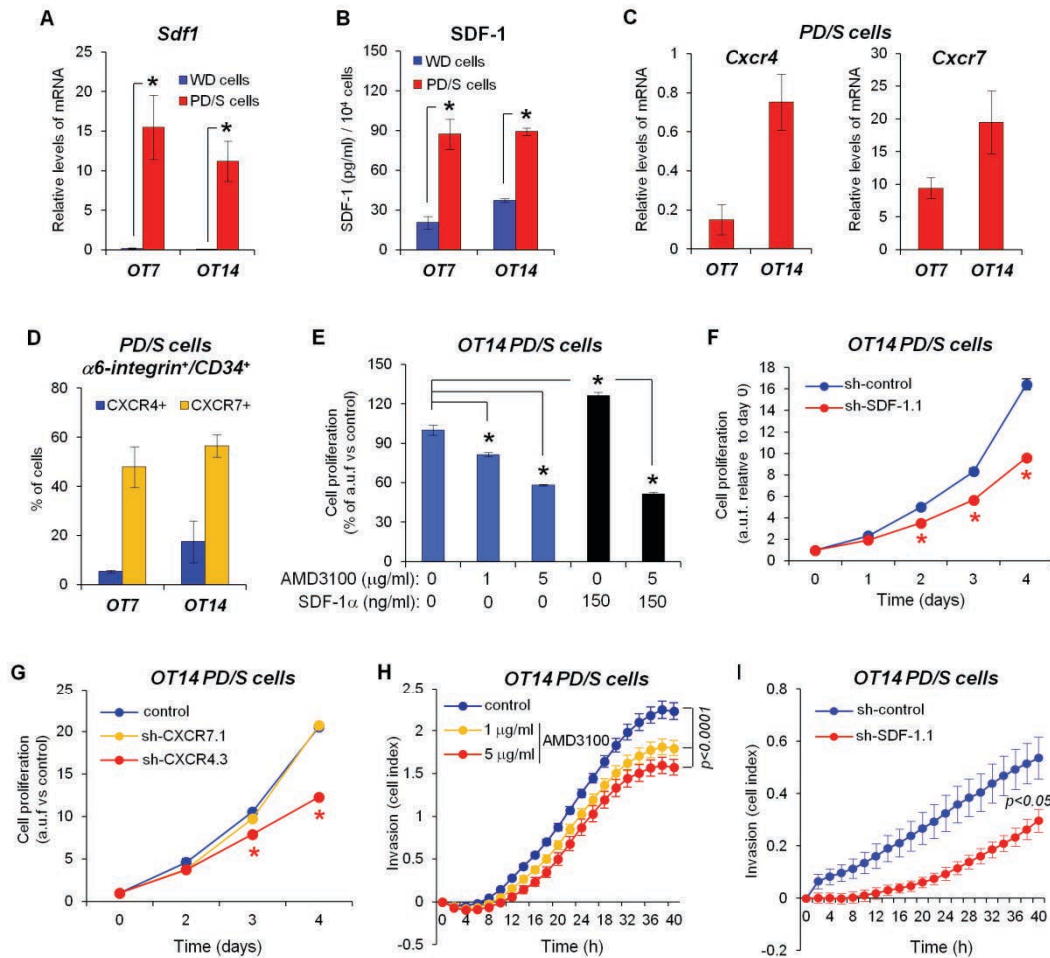


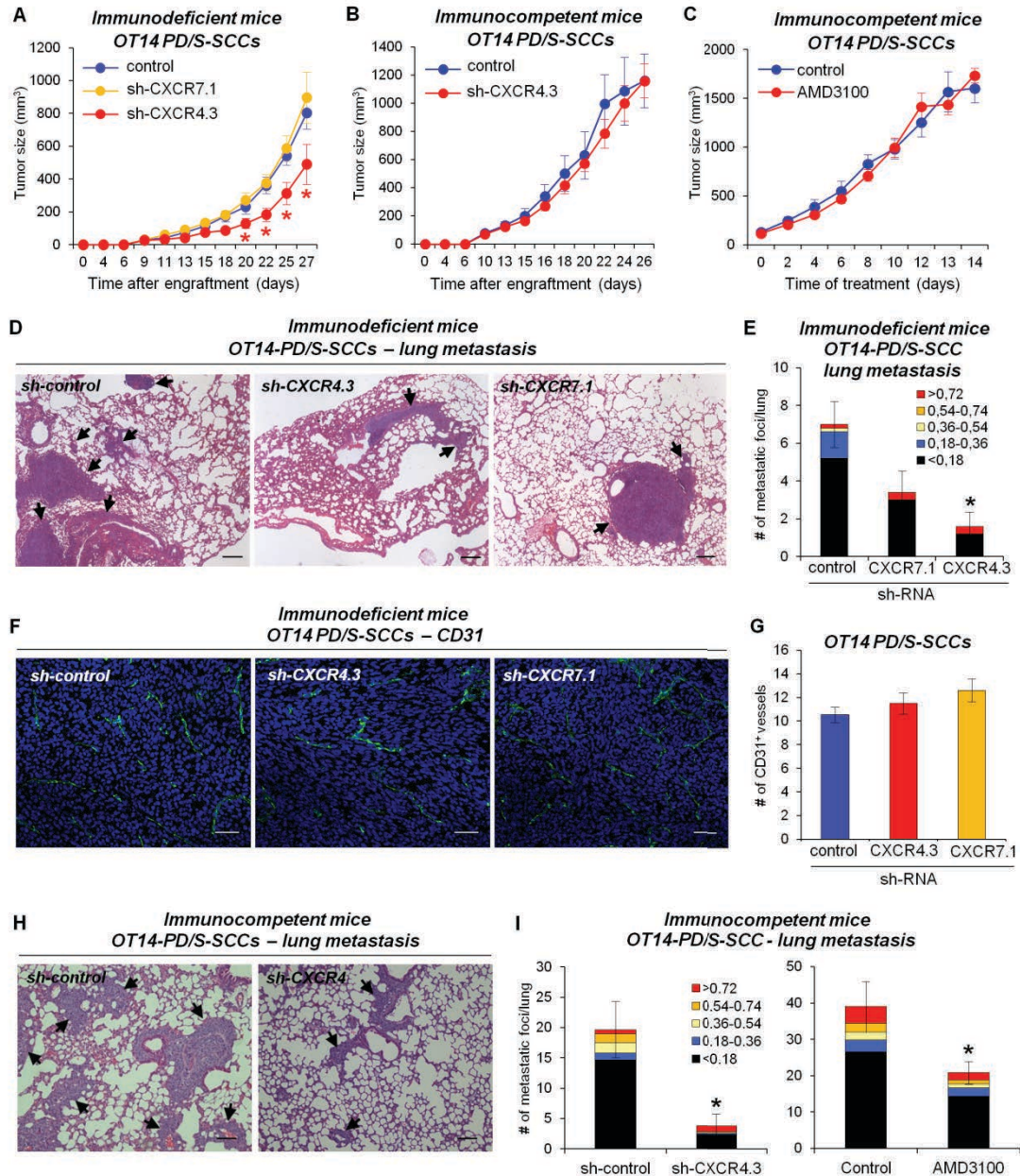
Fig. 2. Autocrine SDF-1 signaling promotes L-CSC proliferation and invasion. **A**, Mean (\pm SE) of *Sdf1* mRNA levels relative to *Gapdh*, as quantified by qRT-PCR in *in vitro* growing tumor cells isolated from WD-SCC (WD cells) and PD/S-SCCs (PD/S cells) of the indicated tumor lineages (two different primary cell cultures per tumor type and lineage). **B**, SDF-1 concentration in the culture medium of the indicated cells (two primary culture cells per group and lineage), as quantified by ELISA assays. **C**, Mean (\pm SE) *Cxcr4* and *Cxcr7* mRNA levels, relative to *Gapdh*, in PD/S cell cultures (three samples per group) of the indicated lineages. **D**, Mean percentages (\pm SE) of CXCR4- or CXCR7-expressing $\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺ cells (three samples per group) in PD/S cells of OT7 and OT14 lineages, as quantified by flow cytometry. **E**, Cell proliferation upon SDF-1 α and/or AMD3100 treatment, as measured by MTT. Results show means (\pm SE) of arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) in treated cells relative to cells growing without SDF-1 α and inhibitor. **F**, Proliferation kinetics (means \pm SE of a.u.f. relative to day 0) of control PD/S cells (sh-control) or SDF-1 interfered cells (sh-SDF-1.1), as measured by MTT. Representative results of two independent assays. **G**, Proliferation kinetics (means \pm SE of a.u.f.) of control PD/S cells (sh-control) and PD/S cells with CXCR4 (sh-CXCR4.3) or CXCR7 (sh-CXCR7.1) mRNA interference, as measured by MTT. Representative results of three independent assays. **H**, **I**, Comparison of invasion capacity (mean cell index \pm SE) of PD/S cells upon control or AMD3100 treatment (**H**), or in SDF-1 interfered PD/S cells (**I**) in x-CELLingence real-time analysis. Representative results of two independent assays. *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$)

CXCR4 inhibition blocks distant metastasis in mouse PD/S-SCCs

As SDF-1 signaling can be activated through CXCR4 and CXCR7, we evaluated the role of each of these receptors in regulating PD/S-SCC growth and metastasis. For this purpose, we knocked down the expression of *Cxcr4* and *Cxcr7* in PD/S cells of different SCC lineages (Supplementary Fig. 3A). Abrogation of CXCR4 did not affect the expression of *Cxcr7*, but did significantly reduce the expression of *Sdf1* (Supplementary Fig. 3B). In contrast, CXCR7 knockdown induced the downregulation of *Cxcr4*, whereas *Sdf1* expression was significantly reduced only in OT7 PD/S cells (Supplementary Fig. 3B). As OT7 cells showed a lower level of *Cxcr4* expression and a smaller percentage of CXCR4⁺-CSCs than OT14 cells (Fig. 2C, D), CXCR7 knockdown may lead to an almost complete abrogation of *Cxcr4* in OT7 cells, in turn causing a significant downregulation of *Sdf1*. Therefore, these data suggest that the expression of *Cxcr4* is finely regulated by the levels of SDF-1 and CXCR7 and, in turn, that CXCR4 regulates the expression of the ligand.

CXCR4 knockdown significantly reduced the proliferation of PD/S cells in both lineages, whereas CXCR7 knockdown only inhibited the proliferation of OT7 PD/S cells, in accordance with the strong downregulation of *Sdf1* observed in these cells (Fig. 2G; Supplementary Fig. 3C). In order to determine the impact of CXCR4 and CXCR7 on PD/S-SCC growth and metastasis, we engrafted sh-control, sh-CXCR4, and sh-CXCR7 PD/S cells from the OT14 lineage in immunodeficient mice. sh-CXCR4 tumors showed a reduced percentage of $\alpha 6$ -integrin⁺/CXCR4⁺ tumor cells, and specifically of CXCR4-expressing CSCs, compared with sh-control tumors, whereas the percentage of CXCR7-expressing CSCs was not affected (Supplementary Fig. 3D–3F). In contrast to CXCR7 knocked-down tumors, sh-CXCR4 tumors grew less than control tumors (Fig. 3A), in accordance with the significant reduction in the percentage of proliferating tumor cells observed in the CXCR4-deficient tumors (Supplementary Fig. 3G and 3H). To determine the impact of CXCR4 signaling on tumor growth under an immunocompetent background, sh-control and sh-CXCR4 PD/S cells were engrafted in syngeneic immunocompetent mice. In contrast to that observed in immunodeficient mice, tumor growth was not significantly blocked after CXCR4 abrogation (Fig. 3B; Supplementary Fig. 3I), or after AMD3100 treatment (Fig. 3C), suggesting that the effect of CXCR4 inhibition on tumor growth may be tumor microenvironment-dependent.

Bernat-Peguera et al_Figure 3



± SE of tumor size, mm³ of control (sh-control), CXCR4 (sh-CXCR4.3), and CXCR7 knocked-down (sh-CXCR7.1) PD/S-SCCs (eleven tumors per group) in immunodeficient mice (A), and of sh-control and sh-CXCR4.3 PD/S-SCCs (six and ten tumors, respectively) in syngeneic immunocompetent mice (B). C, Growth kinetics (means ± SE of tumor size, mm³) of control and AMD3100 treated PD/S-SCCs (seven tumors per group) growing in immunocompetent mice. D, Metastatic lesions (indicated by black arrows) in the lungs of immunodeficient mice carrying sh-control, sh-CXCR4.3, and sh-CXCR7.1 PD/S-SCCs. Scale bar, 200 μm. E, Mean of metastatic foci (± SE) per lung section (categorized by size, mm²) in mice with the indicated PD/S-SCC types (5–6 mice per group), as determined in D. F, Representative images of the immunodetection of CD31⁺ vessels in sh-control, sh-CXCR4.3, and sh-CXCR7.1 PD/S-SCCs. Scale bar, 40 μm. G, Mean frequency (± SE; 3–4 tumor samples per group) of CD31⁺ vessels per tumor section, as determined in F. H, Metastatic lesions (indicated by black arrows) in the lungs of immunocompetent mice carrying the sh-control and sh-CXCR4.3 PD/S-SCCs. Scale bar, 200 μm. I, Mean of metastatic foci (± SE) per lung section (categorized by size, mm²) in mice with the indicated PD/S-SCC types and treatments (six mice per group). *, significant differences between the compared groups (*t*-test; *P* ≤ 0.05).

Furthermore, immunodeficient mice carrying sh-CXCR4 PD/S-SCCs developed significantly less metastatic foci in the lungs than mice carrying sh-control tumors (Fig. 3D, E), in the absence of alterations in the tumor angiogenesis, as indicated by the unaltered frequency of CD31⁺ vessels (Fig. 3F, G) and the conserved expression of *Vegfr2*, a marker of endothelial cells (Supplementary Fig. 3J). Despite the number of metastases generated from CXCR7-interfered PD/S-SCCs was lower than from sh-control tumors, this difference was not significant (Fig. 3D, E) and could be associated with the downregulation of *Cxcr4* expression induced by CXCR7 knockdown.

Similarly, CXCR4 abrogation in L-CSCs and CXCR4 pharmacological inhibition by AMD3100 treatment significantly reduced lung metastasis development in immunocompetent mice (Fig. 3H, I). Taken together, these results indicate that CXCR4 inhibition blocks distant metastasis of PD/S-SCCs, independently of the immune status of mice.

SDF-1 abrogation in L-CSCs inhibits distant metastasis

To determine the impact of *Sdf1* upregulation in L-CSCs on PD/S-SCC growth and metastasis, we engrafted sh-control and sh-SDF-1 PD/S cells in immunodeficient mice. Tumor latency and growth kinetics were similar in sh-control and sh-SDF-1 PD/S-SCCs (Fig. 4A; Supplementary Fig. 4A), even though the interference of the chemokine expression in tumor cells was maintained during tumor growth (Supplementary Fig. 4B). Furthermore, a reduction in the percentage of $\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺/CXCR4⁺ CSCs, but not of $\alpha6$ -integrin⁺/CD34⁺/CXCR7⁺ CSCs, was observed in sh-SDF-1 tumors, compared with sh-control tumors (Fig. 4B; Supplementary Fig. 4C and 4D), in accordance with the downregulated expression of *Cxcr4* observed in sh-SDF-1-interfered PD/S cells (Supplementary Fig. 2G).

SDF-1 abrogation dramatically reduced the development of lung metastasis from PD/S-SCCs (Fig. 4C, D; Supplementary Fig. 4E). As stroma-derived SDF-1 promotes the recruitment of endothelial cells at tumors [39], SDF-1 interference in tumor cells might also alter tumor angiogenesis, blocking metastasis. However, a similar density of CD31⁺ vessels and *Vegfr2* expression were observed in control and SDF-1-interfered tumors (Fig. 4E–G). Metastasis blockage was not related to the attenuation of the EMT program, as the expression of EMT-inducer transcription factors (Supplementary Fig. 4F) and the repressed expression of *Cdh1* (E-Cadherin) (data not shown) was not altered in sh-SDF-1 tumor cells. No changes in the expression of SDF-1 were detected in the fibroblasts isolated from sh-SDF-1 PD/S-SCCs, as compared with the control tumors (Fig. 4H). These results suggest that a paracrine activation of SDF-1 signaling or the activation of other stroma-induced signaling pathways can support tumor cell proliferation, but not distant metastasis.

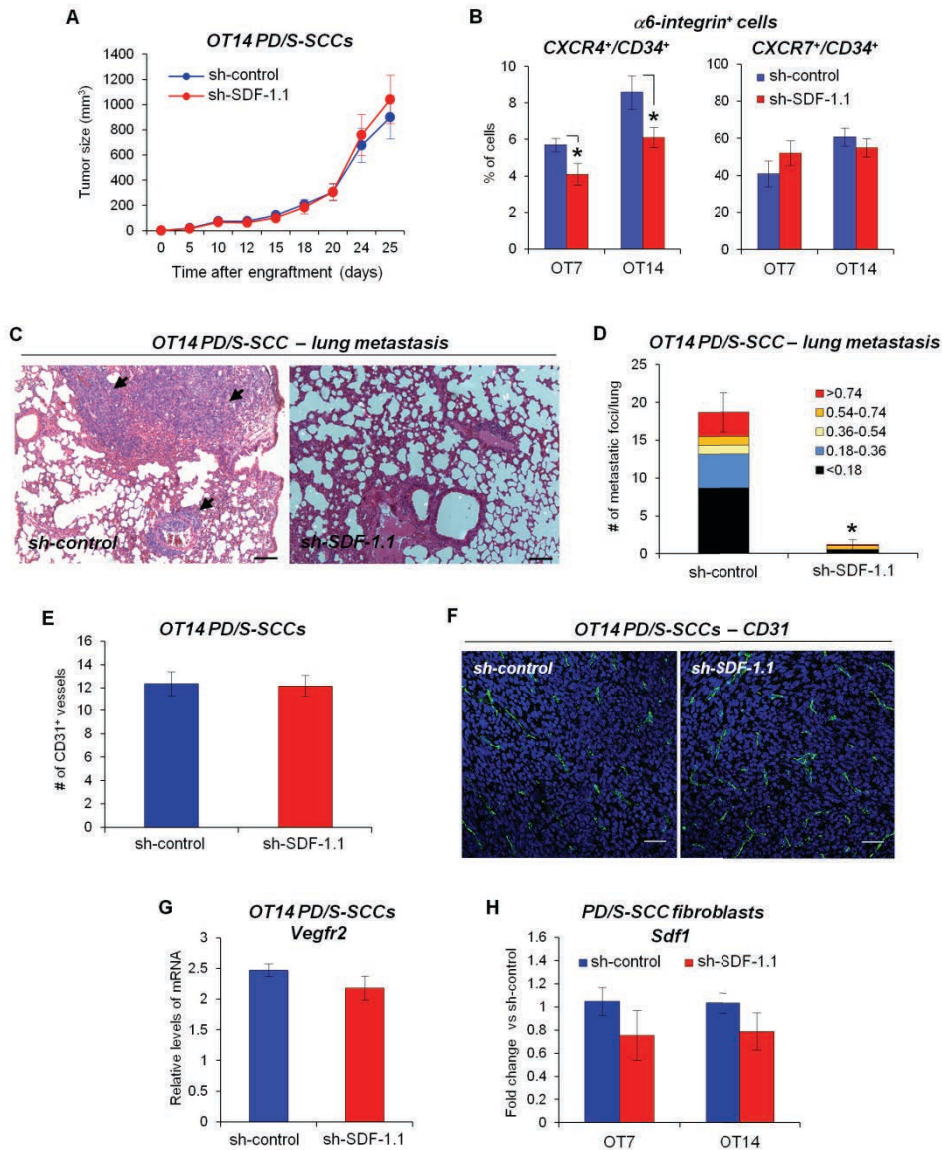


Fig. 4. Inhibition of autocrine SDF-1 signaling in L-CSCs blocks metastasis development. **A**, Growth kinetics (mean ± SE of tumor size, mm³) of SDF-1 expressing (sh-control) or SDF-1 knocked-down (sh-SDF-1.1) PD/S-SCCs (eleven tumors per group). **B**, Mean percentage (± SE) of CXCR4- or CXCR7-expressing α6-integrin⁺/CD34⁺ CSCs in the indicated tumor (7–9 samples per tumor group). **C**, Metastatic lesions (indicated by black arrow) in lungs of immunodeficient mice carrying sh-control or sh-SDF-1.1 PD/S-SCCs. Scale bar, 200 μm. **D**, Mean of metastatic foci (± SE) per lung section (categorized by size, mm²) in mice with the indicated PD/S-SCC types (six mice per group), as determined in **C**. **E**, Mean frequency (± SE; 4–6 samples per tumor group) of CD31⁺ vessels per tumor section in sh-control and sh-SDF-1.1 PD/S-SCCs. **F**, Representative images of the immunodetection of CD31⁺ vessels in the indicated tumors. Scale bar, 40 μm. **G**, Mean level (± SE) of *Vegfr2* mRNA, relative to *Gapdh* in the indicated tumors (4–6 samples per tumor group). **H**, Mean level (± SE) of *Sdf1* mRNA in fibroblasts of sh-SDF-1 PD/S-SCCs, relative to that detected in fibroblasts of sh-control tumors. *, significant differences between the compared groups (*t*-test; *P* ≤ 0.05).

Taken together, these results indicate that abrogation of autocrine SDF-1 signaling reduces the migration and invasion capacity of CSCs of PD/S-SCCs, blocking the development of metastasis of these advanced tumors.

Functional PDGFR α /SDF-1 signaling crosstalk promotes L-CSC invasion in mouse PD/S-SCCs

PDGFR α signaling promotes L-CSC invasion and PD/S-SCC metastasis [11], so we tested whether activation of this pathway regulates SDF-1 signaling in SCC CSCs. Flow cytometry assays demonstrated that whereas the scarce population of CXCR4⁺ WD cells did not express PDGFR α , most PD/S cells, including CXCR4⁺ PD/S cells, exhibited high levels of PDGFR α (Fig. 5A, B). PDGFR α knockdown (Fig. 5C) significantly reduced *Sdf1* expression in PD/S cells, as determined by quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assays (Fig. 5D, E). In turn, SDF-1 knockdown reduced the expression of PDGFR α (Fig. 5F; Supplementary Fig. 5A and 5B), whereas the ectopic expression of SDF-1 in PD/S cells (Supplementary Fig. 5C) further upregulated the expression of PDGFR α (Fig. 5G, H), indicating that the activity of each of these signaling pathways modulates the activity of the other. In order to determine whether PDGFR α -induced invasion of PD/S cells is mediated by SDF-1 signaling, we compared the invasion capability of these cells under control conditions, upon inhibition of PDGFR α signaling by treatment with imatinib, an inhibitor of PDGFR, and in imatinib-treated SDF-1 α -overexpressing PD/S cells.

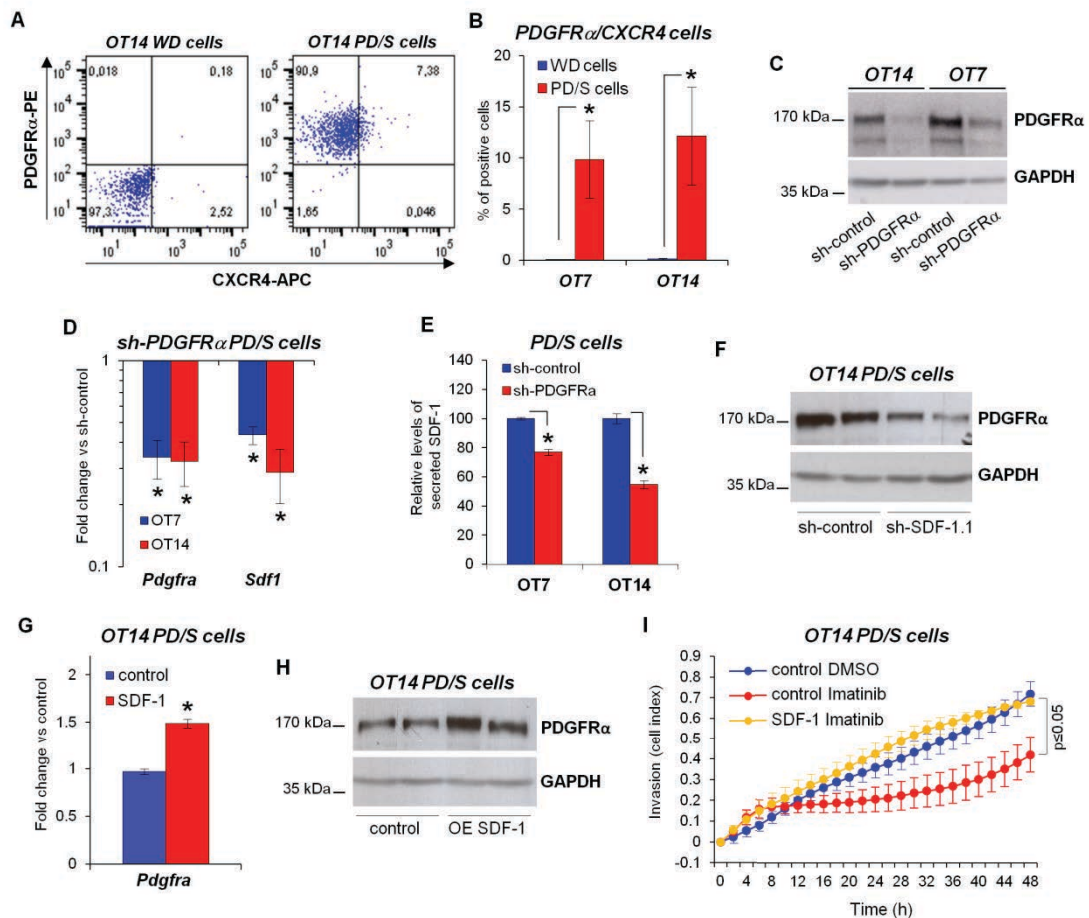


Fig. 5. PDGFR α -induced invasion in L-CSCs is mediated by SDF-1 signaling. **A**, Representative results of the quantification by flow cytometry of the percentage of PDGFR α ⁺/CXCR4⁺ cells in WD and PD/S cells. Percentage of each cell population is indicated. **B**, Mean percentage (\pm SE; 3–5 different cell cultures per group and lineage) of PDGFR α ⁺/CXCR4⁺ cells in the indicated cell cultures, as analyzed in **A**. **C**, Representative images of PDGFR α expression in the indicated cells after transduction with sh-control and sh-PDGFR α lentivirus. **D**, Mean mRNA levels (\pm SE) of the indicated genes in sh-PDGFR α PD/S cells relative to sh-control PD/S cells of OT7 and OT14 tumor lineages (three different samples per group). **E**, Quantification of SDF-1 concentration (mean \pm SE) in the culture medium of the indicated PD/S cells by ELISA assays (three samples per group). **F**, Representative images of PDGFR α expression in two independent samples of control and SDF-1-interfered PD/S cells. **G**, Mean *Pdgfra* mRNA levels (\pm SE) in SDF-1-overexpressing PD/S cells (SDF-1) relative to control cells (transduced with empty vector). **H**, Representative images of PDGFR α expression in two independent samples of control and SDF-1-overexpressing PD/S cells (OE SDF-1). **I**, Representative results of the invasion capability (mean cell index \pm SE) of control PD/S cells in the absence (control DMSO) or presence of imatinib (4 μ M) (control imatinib) and in imatinib-treated SDF-1-overexpressing PD/S (SDF-1 imatinib), as measured by x-CELLingence real-time analysis. GAPDH was used as a protein-loading control in **C**, **F** and **H**. *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$)

Our results demonstrated that whereas imatinib treatment significantly reduced the invasion of PD/S cells, the ectopic expression of SDF-1 restored the invasion of imatinib-treated PD/S cells (Fig. 5I), indicating that PDGFR α -induced invasion is mediated by SDF-1 signaling in PD/S cells. Therefore, these results demonstrated that PDGFR α and SDF-1 signaling crosstalk regulates the invasion capability of L-CSCs and promotes metastasis development in advanced PD/S-SCCs.

PDGFR/SDF-1 signaling crosstalk in cancer cells promotes metastasis in human advanced SCCs

Advanced and recurrent human PD/S-SCCs of skin induce the expression of *PDGFRA/B*, similarly to mouse PD/S-SCCs [11]. To determine whether SDF1 expression is upregulated in human PD/S-SCCs, we analyzed the expression of this chemokine in a subset of patient WD/MD-SCCs (G2 grade tumors) and advanced SCCs (G3-G4 grade tumors) (Supplementary Table 1). We found that *SDF1* and *CXCR4* expression was induced in human skin SCCs at late stages of progression, whereas the expression of *CXCR7* was not significantly affected (Fig. 6A, C; Supplementary Table 1). Furthermore, a high positive correlation was observed between *SDF1* and *PDGFRA* or *PDGFRB* expression in this subset of patient tumors (Fig. 6B). SDF-1 was mostly expressed by stromal cells of patient WD/MD-SCCs and was strongly induced in tumor cells of advanced SCCs (Fig. 6D), in accordance with that observed in mouse SCCs (Fig. 1C). A reduced population of tumor cells expressed *CXCR4* in early tumors and this population was expanded in the patient PD/S-SCCs (Supplementary Fig. 6A).

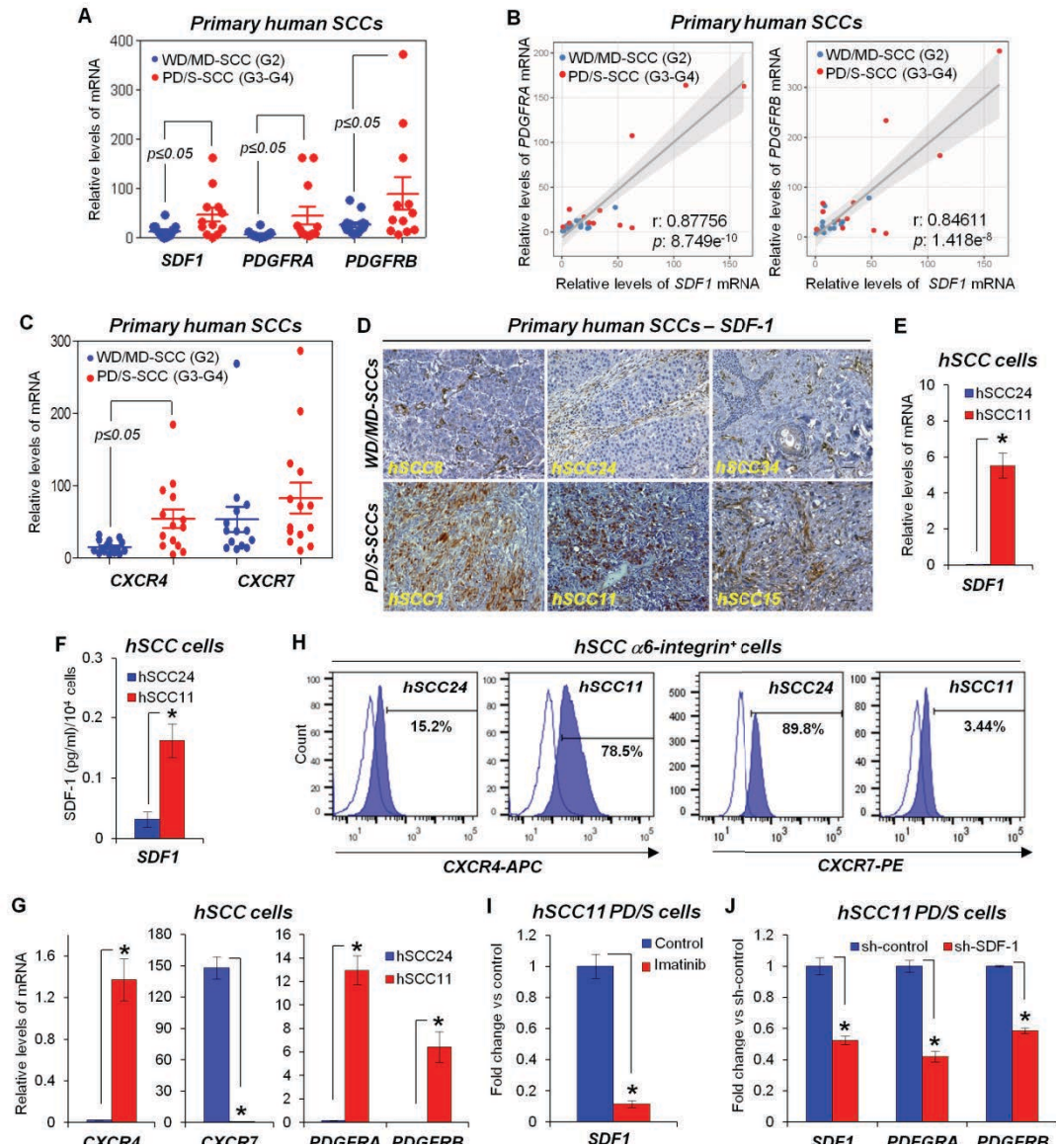


Fig. 6. Functional crosstalk between PDGFR and SDF1/CXCR4 signaling in cancer cells of human advanced SCCs. **A**, mRNA levels of the indicated genes relative to *GAPDH* (individual data and mean \pm SE) in WD/MD-SCC and PD/S-SCC patient samples. *P* value (*t*-test) of the compared groups is indicated. **B**, Correlation between *SDF1* and *PDGFRA* or *PDGFRB* mRNA levels in the indicated patient samples, as determined by Pearson's test. *P* value is indicated. **C**, mRNA levels of *CXCR4* and *CXCR7* (individual data and mean \pm SE) in the indicated patient samples. *P* value (*t*-test) of the compared groups is indicated. **D**, Representative images of the immunodetection of SDF-1 in paraffin sections of WD/MD-SCCs and PD/S-SCCs patient samples. Scale bar, 100 μ m. **E**, Mean (\pm SE) *SDF1* mRNA levels relative to *GAPDH*, in primary culture cells isolated from human WD/MD-SCC (hSCC24) and PD/S-SCC (hSCC11). **F**, Mean (\pm SE) of SDF-1 concentration in the culture medium of the indicated cells, as determined by ELISA assays. **G**, Mean (\pm SE) mRNA levels of the indicated genes, relative to *GAPDH*, in primary culture of hSCC24 and hSCC11 cells. **H**, Quantification of the indicated cell populations in hSCC24 and hSCC11 cells by flow cytometry. Percentage of $\alpha 6$ -integrin⁺/CXCR4⁺ and $\alpha 6$ -integrin⁺/CXCR7⁺ cells is indicated in each panel. **I**, **J**, Mean (\pm SE) of the indicated mRNA in imatinib-treated (4 μ M for 48 h) relative to those detected in untreated (control) hSCC11 PD/S cells (**I**), or in sh-SDF-1 relative to sh-control hSCC11 PD/S cells (**J**). *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$)

To determine the relevance of SDF-1 signaling in human SCCs, we established primary cultures of tumor cells from a patient WD/MD-SCC (hSCC24 cells) and from a patient PD/S-SCC (hSCC11 cells). hSCC24 WD cells grew as adherent cells and exhibited a typical epithelial shape, whereas hSCC11 PD/S cells grew forming spheres (Supplementary Fig. 6B). In accordance with the conserved epithelial differentiation traits of patient WD/MD-SCCs [11], hSCC24 WD cells expressed high levels of EpCAM and E-cadherin epithelial markers, whereas hSCC11 PD/S cells lost the expression of these epithelial markers and upregulated the expression of EMT-inducer transcription factors (Supplementary Fig. 6C and 6D). These observations indicate that the EMT program was strongly induced in these human PD/S cells. hSCC11 PD/S cells induced the expression and secretion of SDF-1 (Fig. 6E, F), as well as the *CXCR4* expression, as compared to hSCC24 WD cells (Fig. 6G). Furthermore, we observed an expansion of the $\alpha 6$ -integrin⁺/CXCR4⁺ cell population in hSCC11 PD/S cells (Fig. 6H), consistent with that observed by immunohistochemistry in patient samples. However, *CXCR7* expression was significantly downregulated in hSCC11 PD/S cells (Fig. 6G), in contrast to what was observed in mouse PD/S cells and in other human cutaneous SCC cell lines [34]. In this regard, whereas 89% of hSCC24 WD cells expressed *CXCR7*, this population of cells was strongly reduced in hSCC11 PD/S cells (Fig. 6H). These findings suggest that *CXCR7* expression in tumor cells may be dependent on intrinsic features and/or the stage of progression of patient tumors. Therefore, these results indicate that SDF-1/CXCR4 signaling is induced in tumor cells of advanced human SCCs.

In addition, a strong upregulation of PDGFR α and PDGFR β was detected in hSCC11 PD/S cells (Fig. 6G; Supplementary Fig. 6E), indicating that tumor cells from human advanced SCCs induce PDGFR signaling. Inhibition of PDGFR by imatinib treatment significantly reduced the expression of *SDF1* and in turn, SDF-1 knockdown reduced *PDGFRA* and *PDGFRB* expression in hSCC11 PD/S cells (Fig. 6I, J). Therefore, PDGFR signaling controls SDF-1 expression and *vice versa*, establishing a functional crosstalk between PDGFR/SDF-1 signaling in tumor cells of human advanced SCCs.

CXCR4 knockdown (Supplementary Fig. 6F–6H) or AMD3100 treatment blocked the proliferation of hSCC11 PD/S cells upon basal conditions (Fig. 7A, B). Similarly, abrogation of SDF-1 decreased hSCC11 cell proliferation (Fig. 7C). These findings indicate that an autocrine activation of SDF-1/CXCR4 signaling promotes proliferation of human PD/S-SCCs cells. In accordance with previous findings in mouse PD/S cells [11], no effect on hSCC11 cell proliferation was observed upon PDGFR inhibition by imatinib treatment (Fig. 7D). However, PDGFR and CXCR4 inhibition significantly reduced the invasion capability of hSCC11 PD/S cells (Fig. 7E, F), indicating that activation of both signaling pathways promotes tumor cell invasion in advanced SCCs.

Bernat-Peguera et al_Figure 7

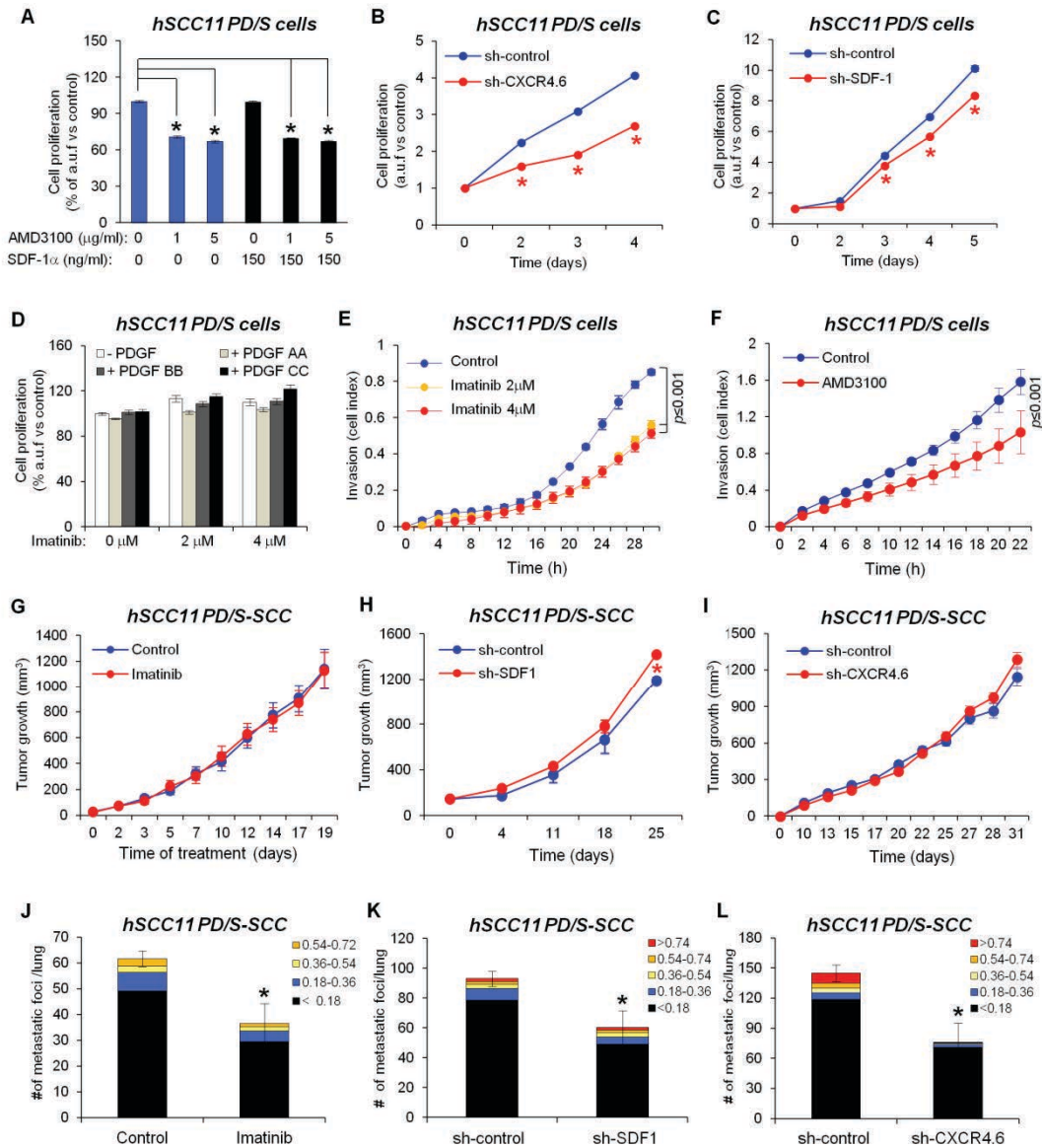


Fig. 7. Inhibition of PDGFR and SDF1/CXCR4 signaling pathways blocks distant metastasis in human PD/S-SCCs. **A, D**, *hSCC11* cell proliferation after the indicated treatments, as measured by MTT. Mean (\pm SE) of arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) of treated cells relative to cells growing without SDF-1 or AMD3100 (**A**), or without PDGF or imatinib (**D**). **B, C**, Representative proliferation kinetics (means \pm SE of a.u.f. relative to day 0) of control (sh-control) and CXCR4 knocked-down (sh-CXCR4.6) *hSCC11* cells (**B**), or of control and SDF-1 interfered *hSCC11* cells (sh-SDF-1) (**C**), as measured by MTT. **E, F**, Comparison of invasion capacity (mean cell index \pm SE) of *hSCC11* PD/S cells upon control or imatinib treatment (**E**), or after AMD3100 treatment (5 μ g/mL) (**F**) in x-CELLingence real-time analysis. **G–I** Growth kinetics (mean \pm SE of tumor size, mm³) of tumors generated after engrafting in immunodeficient mice: **G**, *hSCC11* cells, which were treated daily with vehicle (control) or imatinib (nine tumors per group); **H**, sh-control and SDF-1 knocked down (sh-SDF-1) *hSCC11* cells (five tumors per group); and **I**, sh-control and CXCR4 knocked-down (sh-CXCR4.6) *hSCC11* cells (ten tumors per group). **J–L**, Mean of metastatic foci (\pm SE) per lung section (categorized by size, mm²) developed in: **J**, control and imatinib-treated mice (six mice per group); **K**, sh-control and sh-SDF-1 PD/S-SCCs carrying mice (five mice per group); and **L**, sh-control and sh-CXCR4 PD/S-SCCs carrying mice (six mice per group). *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$)

To determine the impact of PDGFR/SDF-1 signaling in human PD/S-SCC growth and metastasis, hSCC11 PD/S cells were engrafted in immunodeficient mice and when tumor growth was detected, mice were treated with imatinib or AMD3100. In addition, sh-control, sh-CXCR4, and sh-SDF-1 hSCC11 PD/S cells were engrafted in immunodeficient mice. We found that PDGFR signaling inhibition, SDF-1 abrogation, or CXCR4 inhibition by RNA interference or AMD3100 treatment did not affect human PD/S-SCC growth (Fig. 7G–I; Supplementary Fig. 6I). However, inhibition of both PDGFR and SDF-1/CXCR4 signaling pathways significantly reduced the number and size of metastatic lesions developed in the lungs (Fig. 7J–L; Supplementary Fig. 6J).

Together, these results indicate that, similarly to what is described here for mouse advanced SCCs, PDGFR signaling promotes tumor cell invasion and metastasis in human advanced SCCs, which is mediated by the activation of SDF-1 signaling.

DISCUSSION

High risk and metastatic skin SCCs are occasionally treated with radiotherapy or conventional chemotherapy, but these treatments yield little clinical benefit [6]. Since long-term SCC growth is sustained by CSCs [7, 40], it is important to determine mechanisms controlling the proliferation and dissemination of this subset of tumor cells to block the aggressive growth and metastasis associated with advanced SCCs. Although previous studies have demonstrated that SDF-1 signaling promotes tumor growth and metastasis in other cancer types [22–24], the relevance of this signaling pathway in skin SCCs as well as the mechanisms regulating the pathway have been unknown. Here, we demonstrate that PDGFR signaling induces SDF-1 expression and the autocrine activation of SDF-1/CXCR4 signaling in cancer cells and L-CSCs, which promotes the invasion capability of these cells and lung metastasis in mouse and human PD/S-SCCs.

SDF-1 is expressed by stromal fibroblasts in mouse WD-SCCs and PD/S-SCCs, and its expression is significantly induced in CSCs of advanced SCCs. More than 50% of L-CSCs express CXCR7, whereas a subset of these cells expresses both CXCR4 and CXCR7 receptors. Therefore, SDF-1 signaling may be activated in these CXCR4/CXCR7-expressing CSCs not only by paracrine mechanisms, through SDF-1 secreted by the stroma fibroblasts, but also by autocrine mechanisms. We found that inhibition of SDF-1 and CXCR4 in L-CSCs blocks the *in vitro* proliferation of these cells upon basal conditions, indicating that autocrine activation of SDF-1 signaling promotes L-CSCs proliferation/survival, as previously reported in glioblastoma CSCs [23, 41]. CXCR4 knockdown in L-CSCs significantly reduced PD/S-SCC growth in immunodeficient mice, but not upon a proficient immune system, suggesting that impact of CXCR4 inhibition on tumor growth may be dependent of tumor microenvironment. In addition,

abrogation of SDF-1 in L-CSCs had non-effect on *in vivo* tumor growth. One possible explanation is that stroma-derived SDF-1 drives tumor growth through CXCR7 and/or the remaining CXCR4 receptors of L-CSCs in SDF-1-interfered tumors. Alternatively, under the strong reduction of tumor cell-derived SDF-1, other cytokines or growth factors, produced by stromal cells, may act promoting cancer cell proliferation/survival and the growth of SDF-1 interfered PD/S-SCCs. Therefore, our results reveal a complex system of tumor growth regulation, implicating not only autocrine and paracrine SDF-1 signaling in tumor cells, but also other pathways probably activated by stroma-derived signals (Fig. 8).

It was proposed that constitutive expression of chemokines in metastasis target tissues is essential for driving metastasis, as CXCR4-expressing cells can home to tissues secreting high levels of SDF-1, such as lymph nodes, bone marrow, or lung [12]. Here, we demonstrated that SDF-1 knockdown or CXCR4 inhibition significantly reduced the *in vitro* invasion capability of L-CSCs and dramatically reduced the development of lung metastasis, independently of the immune state of mice. Therefore, autocrine SDF-1/CXCR4 signaling is necessary to facilitate L-CSC migration and invasion and to promote distant metastasis (Fig. 8). Accordingly, autocrine activation of the SDF-1 pathway was reported in various aggressive tumor types with enhanced distant metastasis capability [42, 43]. In addition, ectopic expression of CXCR4 in low metastatic HNSCC cells enables these cells to metastasize to regional lymph nodes, but not to the distant organs [44], whereas the ectopic overexpression of SDF-1 in CXCR4⁺ HNSCC and breast cancer cells enhanced *in vitro* cell motility and metastasis in lung [45, 46]. The autocrine activation of SDF-1 signaling described here could be essential for maintaining CXCR4 expression in L-CSCs, although in this scenario the directional homing of these migrating cells to SDF-1-expressing tissues may be disrupted. Furthermore, as SDF-1/CXCR4 signaling induces tumor cell survival (reviewed in [47]), autocrine activation of this signaling may promote migrating cell survival during dissemination or sustain the proliferation of these cells at the distant tissues.

Previous reports described a functional crosstalk between PDGFR and CXCR4 signaling, as activation of PDGFR signaling promotes stability and phosphorylation of CXCR4 in medulloblastoma cells, inducing SDF-1/CXCR4 signaling [48, 49]. We found that PDGFR α signaling induces SDF-1 expression, which in turn regulates the expression of PDGFR α . It is important to highlight that normal keratinocytes and E-CSCs express PDGF ligands, but not PDGFR or SDF-1, which are restricted to stroma cells [36, 50, 51]. In contrast, L-CSCs acquire the expression of PDGFR α , allowing not only the autocrine activation of this pathway [11], but also the expression of SDF-1 and the activation of SDF-1/CXCR4 signaling, which promote L-CSC invasion and metastasis. Furthermore, we observed that L-CSC invasion blockage induced by imatinib was overridden by the ectopic expression of SDF-1, indicating that SDF-1 mediates

PDGFR α -induced invasion and metastasis. Although inhibition of PDGFR α reduces *Sdf1* expression, no significant alterations in tumor cell proliferation or tumor growth were observed following pharmacological or genetic inhibition of PDGFR α in PD/S-SCCs [11], in agreement with that described after SDF-1 knocking-down. Therefore, we suggest that other factors or pathways support tumor growth, but not metastasis, in the absence of PDGFR α /SDF-1 signaling activity.

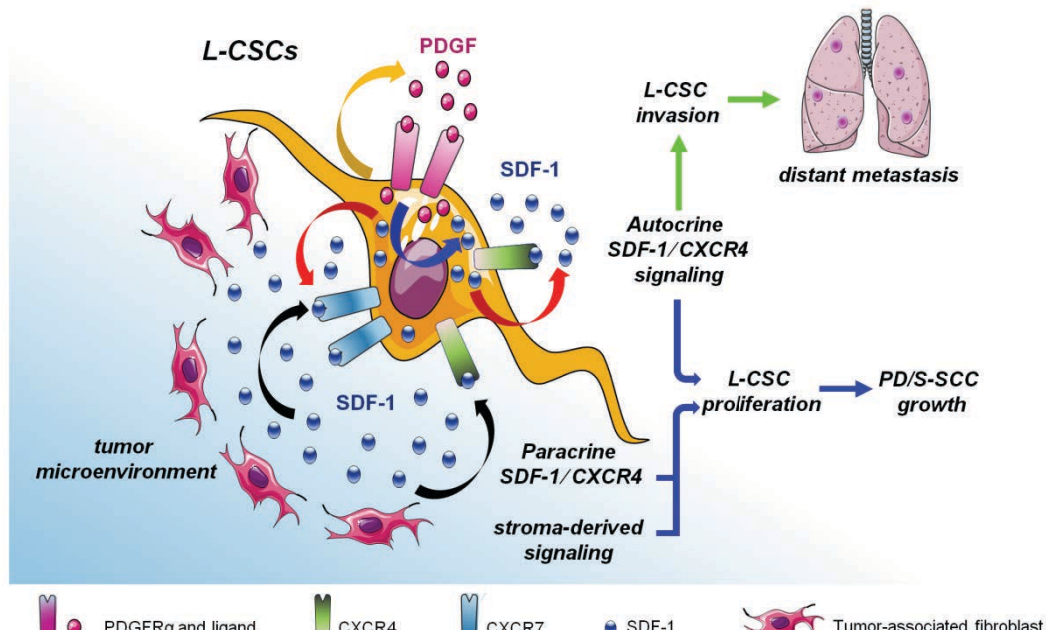


Fig. 8. Impact of PDGFR/SDF-1 signaling crosstalk on PD/S-SCC growth and distant metastasis. Our results indicate that autocrine PDGFR α signaling (orange arrow) induces the expression of SDF-1 (blue arrow) and the autocrine activation of CXCR4/CXCR7 signaling in L-CSCs (red arrows). Fibroblast and stroma-derived SDF-1 can also activate this signaling pathway by a paracrine way (black arrows). Autocrine SDF-1/CXCR4 signaling promotes L-CSC invasion, promoting distant metastasis development. PD/S-SCCs growth may be promoted by the activation of SDF-1/CXCR4 pathway through autocrine or paracrine mechanisms, but also by alternative pathways, which can be activated by stroma-derived factors in response to PDGFR/SDF-1 signaling inhibition. This model shows mouse SCC findings, but can be also applied in human advanced SCCs.

A similar functional crosstalk between PDGFR and SDF-1 was observed in human advanced SCCs. Strong induction of PDGFR α/β , as well as SDF-1 and CXCR4, was detected in tumor cells of patient PD/S-SCCs, and the inhibition of PDGFR signaling downregulated SDF-1 expression and *vice versa*. An autocrine activation of SDF-1/CXCR4 signaling promoted the *in vitro* proliferation and survival of these cells, although the inhibition of this signaling pathway did not affect human PD/S-SCC growth, following a similar pattern to that here described in mouse PD/S-SCCs growing in immunocompetent mice. However, the inhibition of PDGFR and SDF-1/CXCR4 signaling in human PD/S cells significantly reduced the invasive capacity of these cells and lung metastases development. Together, our results show that a functional crosstalk between

PDGFR/SDF-1 is induced in tumor cells at late stages of mouse and human skin SCC progression, in order to induce autocrine activation of SDF-1/CXCR4 signaling and to promote tumor cell invasion and metastasis. Therefore, the inhibition of PDGFR or/and SDF-1/CXCR4 pathways by currently available drugs, such as imatinib or AMD3100, may be a possible therapeutic strategy for blocking metastasis development in patients with advanced human skin SCCs.

ACKNOWLEDGEMENTS

AB-P received an IDIBELL Fellowship, VdS-D and PS-E are funded by Spanish Ministry of Science and Innovation Fellowships; the research of PM's group is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness MINECO (SAF2014-55944R; SAF2017-84976R, co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)—a way to build Europa) and by the Catalan Department of Health (Generalitat de Catalunya; 2017SGR595). We thank J. Comas (Universitat de Barcelona-SCT) for technical support with flow cytometry; the patients enrolled in this study for their participation; the Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Virgen de la Salud, Biobanco del Principado de Asturias and Fundación Instituto Valenciano de Oncología, which are members of the Spanish Hospital Platform Biobanks Network; Y. Pérez (Tumor Bank, Hospital de Bellvitge) for help with human tumor sample collection; and the IDIBELL animal facility service for mouse care.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AB-P, PS-E, VdS-D, MLdM and LD-G: study conception and design, acquisition, analysis, and interpretation of data; DPS, RMP, OB and JMV: sample collection, analysis, and interpretation; EG-S and FV: data analysis and interpretation; PM: study conception and design, data analysis and interpretation, and manuscript preparation.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access: This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a

link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

REFERENCES

1. Rogers HW, Weinstock MA, Harris AR, Hinckley MR, Feldman SR, Fleischer AB. et al. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Arch Dermatol.* 2010;146:283–7.
2. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer.* 2015;51:1989–2007.
3. Coussens LM, Hanahan D, Arbeit JM. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol.* 1996;149:1899–917.
4. Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg.* 2002;28:268–73.
5. Wong CE, Yu JS, Quigley DA, To MD, Jen KY, Huang PY, et al. Inflammation and Hras signaling control epithelial-mesenchymal transition during skin tumor progression. *Genes Dev.* 2013;27:670–82.
6. Franco R, Nicoletti G, Lombardi A, Di Domenico M, Botti G, Zito Marino F, et al. Current treatment of cutaneous squamous cancer and molecular strategies for its sensitization to new targetbased drugs. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13:51–66.
7. Lapouge G, Beck B, Nassar D, Dubois C, Dekoninck S, Blanpain C. Skin squamous cell carcinoma propagating cells increase with tumour progression and invasiveness. *EMBO J.* 2012;31:4563–75.
8. Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature.* 2014;511:246–50.
9. da Silva-Diz V, Lorenzo-Sanz L, Bernat-Peguera A, Lopez-Cerda M, Munoz P. Cancer cell plasticity: impact on tumor progression and therapy response. *Semin Cancer Biol.* 2018;53:48–58.

10. White RA, Neiman JM, Reddi A, Han G, Birlea S, Mitra D, et al. Epithelial stem cell mutations that promote squamous cell carcinoma metastasis. *J Clin Invest*. 2013;123:4390–404.
11. da Silva-Diz V, Simon-Extremera P, Bernat-Peguera A, de Sostoa J, Urpi M, Penin RM, et al. Cancer stem-like cells act via distinct signaling pathways in promoting late stages of malignant progression. *Cancer Res*. 2016;76:1245–59.
12. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410:50–6.
13. Liang Z, Wu T, Lou H, Yu X, Taichman RS, Lau SK, et al. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res*. 2004;64:4302–8.
14. Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnicka-Worms D, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2004;64:8604–12.
15. Gelmini S, Mangoni M, Serio M, Romagnani P, Lazzeri E. The critical role of SDF-1/CXCR4 axis in cancer and cancer stem cells metastasis. *J Endocrinol Invest*. 2008;31:809–19.
16. Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C987–95.
17. Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J*. 2004;18:1240–2.
18. Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, et al. Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res*. 2009;69:7243–51.
19. Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res*. 2007;67:3153–61.
20. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1:313–23.
21. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stemlike features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:16281–6.
22. Ehteshami M, Mapara KY, Stevenson CB, Thompson RC. CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett*. 2009;274:305–12.

23. Uemae Y, Ishikawa E, Osuka S, Matsuda M, Sakamoto N, Takano S, et al. CXCL12 secreted from glioma stem cells regulates their proliferation. *J Neurooncol.* 2014;117:43–51.
24. Kong L, Guo S, Liu C, Zhao Y, Feng C, Liu Y, et al. Overexpression of SDF-1 activates the NF-kappaB pathway to induce epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes of breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2016;48:1085–94.
25. Yang P, Liang SX, Huang WH, Zhang HW, Li XL, Xie LH, et al. Aberrant expression of CXCR4 significantly contributes to metastasis and predicts poor clinical outcome in breast cancer. *Curr Mol Med.* 2014;14:174–84.
26. Hu TH, Yao Y, Yu S, Han LL, Wang WJ, Guo H, et al. SDF-1/CXCR4 promotes epithelial-mesenchymal transition and progression of colorectal cancer by activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer Lett.* 2014;354:417–26.
27. Li X, Li P, Chang Y, Xu Q, Wu Z, Ma Q, et al. The SDF-1/CXCR4 axis induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2014;392:77–84.
28. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 2006;203:2201–13.
29. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleswar H, Raz E, Zerwes HG, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE.* 2010;5:e9175.
30. Tang X, Li X, Li Z, Liu Y, Yao L, Song S, et al. Downregulation of CXCR7 inhibits proliferative capacity and stem cell-like properties in breast cancer stem cells. *Tumour Biol.* 2016;37:13425–33.
31. Wu YC, Tang SJ, Sun GH, Sun KH. CXCR7 mediates TGFbeta1-promoted EMT and tumor-initiating features in lung cancer. *Oncogene.* 2016;35:2123–32.
32. Quan C, Cho MK, Shao Y, Miannecki LE, Liao E, Perry D, et al. Dermal fibroblast expression of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) promotes epidermal keratinocyte proliferation in normal and diseased skin. *Protein Cell.* 2015;6:890–903.
33. Basile J, Thiers B, Maize J Sr., Lathers DM. Chemokine receptor expression in non-melanoma skin cancer. *J Cutan Pathol.* 2008;35:623–9.
34. Hu SC, Yu HS, Yen FL, Chen GS, Lan CC. CXCR7 expression correlates with tumor depth in cutaneous squamous cell carcinoma skin lesions and promotes tumor cell survival through ERK activation. *Exp Dermatol.* 2014;23:902–8.
35. Chen SJ, Nakahara T, Kido M, Takahara M, Uchi H, Takeuchi S, et al. Stromal cell-derived factor 1 expression in various skin tumours. *Br J Dermatol.* 2009;160:710–3.

36. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2005;280:35760–6.
37. Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:15735–40.
38. Matthys P, Hatse S, Vermeire K, Wuyts A, Bridger G, Henson GW, et al. AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol.* 2001;167:4686–92.
39. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 2005;121:335–48.
40. Nassar D, Blanpain C. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. *Annu Rev Pathol.* 2016;11:47–76.
41. Gatti M, Pattarozzi A, Bajetto A, Wurth R, Daga A, Fiaschi P, et al. Inhibition of CXCL12/CXCR4 autocrine/paracrine loop reduces viability of human glioblastoma stem-like cells affecting self-renewal activity. *Toxicology.* 2013;314:209–20.
42. Wang JF, Liu ZY, Anand AR, Zhang X, Brown LF, Dezube BJ, et al. Alpha-chemokine-mediated signal transduction in human Kaposi's sarcoma spindle cells. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1691:129–39.
43. Wang X, Cao Y, Zhang S, Chen Z, Fan L, Shen X, et al. Stem cell autocrine CXCL12/CXCR4 stimulates invasion and metastasis of esophageal cancer. *Oncotarget.* 2016;8:36149–60.
44. Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Bando T, Almofti A, Yoshida H, et al. Acquisition of lymph node, but not distant metastatic potentials, by the overexpression of CXCR4 in human oral squamous cell carcinoma. *Lab Invest.* 2004;84:153846.
45. Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7:R402–10.
46. Uchida D, Onoue T, Tomizuka Y, Begum NM, Miwa Y, Yoshida H, et al. Involvement of an autocrine stromal cell derived factor-1/CXCR4 system on the distant metastasis of human oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res.* 2007;5:685–94.
47. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29:709–22.

48. Yuan L, Zhang H, Liu J, Rubin JB, Cho YJ, Shu HK, et al. Growth factor receptor-Src-mediated suppression of GRK6 dysregulates CXCR4 signaling and promotes medulloblastoma migration. *Mol Cancer*. 2013;12:18.
49. Sciacaluga M, D'Alessandro G, Pagani F, Ferrara G, Lopez N, Warr T, et al. Functional cross talk between CXCR4 and PDGFR on glioblastoma cells is essential for migration. *PLoS ONE*. 2013;8:e73426.
50. Ponten F, Ren Z, Nister M, Westermark B, Ponten J. Epithelialstromal interactions in basal cell cancer: the PDGF system. *J Invest Dermatol*. 1994;102:304–9.
51. Pablos JL, Amara A, Bouloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, et al. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol*. 1999;155:1577–86.
52. Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol*. 1994;68:4358–68.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

PDGFR-induced autocrine SDF-1 signaling in cancer cells promotes metastasis in advanced skin carcinoma

Adrià Bernat-Peguera¹, Pilar Simón-Extremera¹, Victoria da Silva-Diz^{1,6}, Mikel López de Munain¹, Laura Díaz-Gil¹, Rosa M. Penin², Eva González-Suárez¹, Diana Pérez Sidelnikova³, Oriol Bermejo³, Joan Maria Viñals³, Francesc Viñals^{4,5}, Purificación Muñoz¹

These authors contributed equally: Pilar Simón-Extremera, Victoria da Silva-Diz

Supplementary Figures S1-S6

Supplementary Tables 1-3

Supplementary Material and Methods

Supplementary References

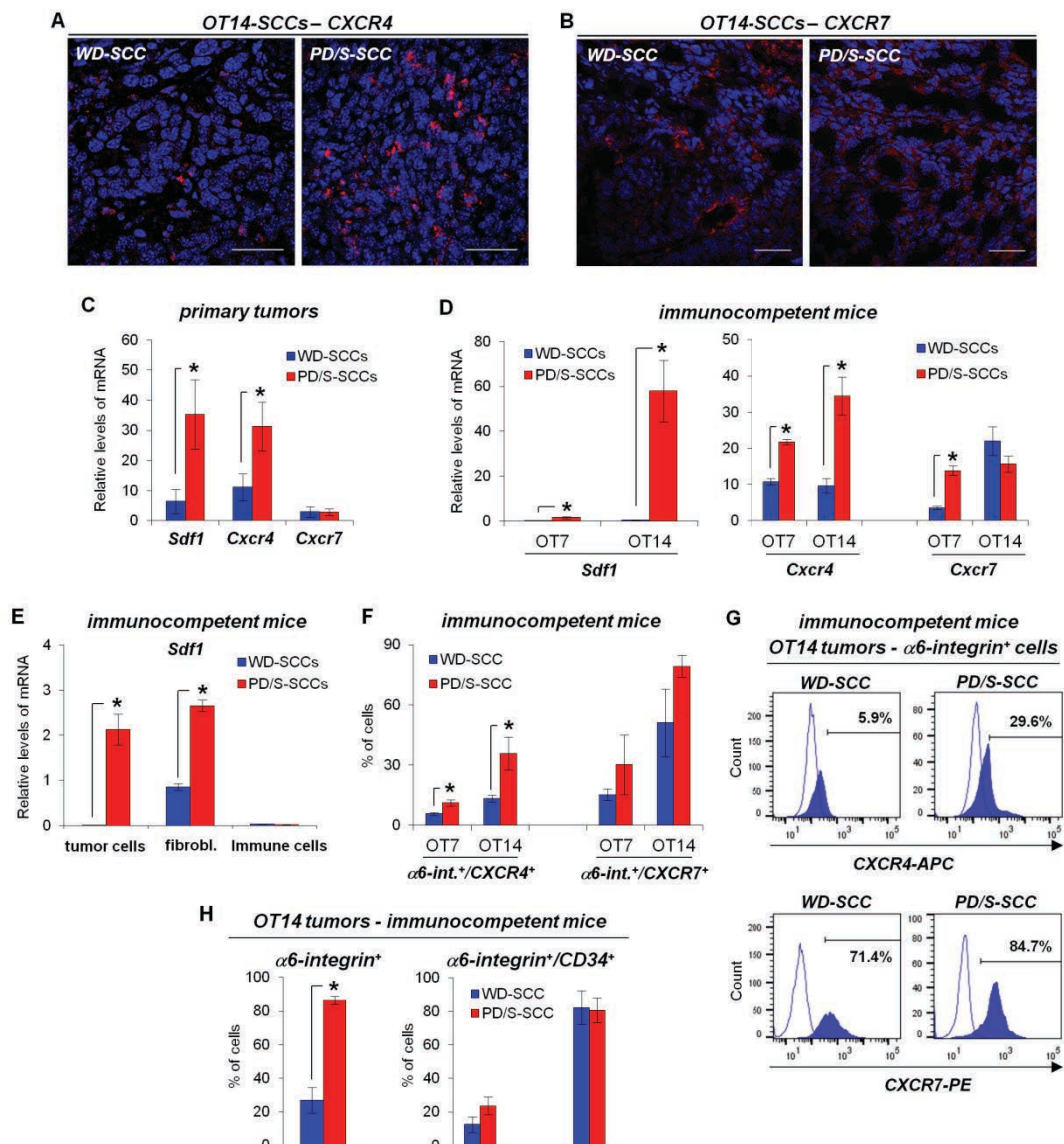


Figure S1. Induction of SDF-1 and CXCR4 expression in tumor cells of PD/S-SCCs of immunodeficient and immunocompetent mice. **A** and **B**, Representative images of the immunodetection of CXCR4 and CXCR7 in sections of mouse WD-SCCs and PD/S-SCCs that were developed in immunodeficient mice. Scale bar, 40 μ m. **C** and **D**, mean (\pm SE) mRNA levels of the indicated genes, relative to *Gapdh*, in WD-SCCs and PD/S-SCCs, which were generated (**C**) spontaneously in the skin of K14-HPV16^{Tg/+} mice (four tumor samples per group), and (**D**) after the engraftment of WD and PD/S cells of the indicated lineages in syngeneic immunocompetent mice (four samples per tumor type and lineage). **E**, mean (\pm SE) levels of *Sdf1* mRNA, relative to *Gapdh*, as quantified by qRT-PCR, in tumor cells ($\alpha6$ -integrin⁺/CD45⁺/CD31⁻ cells), immune cells ($\alpha6$ -integrin⁻/EpCAM⁻/CD45⁺/CD31⁻ cells) and fibroblasts ($\alpha6$ -integrin⁻/EpCAM⁻/CD45⁻/CD31⁻ cells) isolated from WD-SCCs and PD/S-SCCs developed in immunocompetent mice (2-3 samples per group) by FACS-sorter. **F**, mean percentage (\pm SE) of $\alpha6$ -integrin⁺/CXCR4⁺ and $\alpha6$ -integrin⁺/CXCR7⁺ cells in the indicated tumors (four tumor samples per group), as quantified by flow cytometry (**G**). **G**, representative results of the quantification by flow cytometry of the percentage of $\alpha6$ -integrin⁺/CXCR4⁺ and $\alpha6$ -integrin⁺/CXCR7⁺ cells (indicated in each panel) in WD-SCCs and PD/S-SCCs developed in immunocompetent mice. **H**, mean percentage (\pm SE) of the indicated cell populations in OT14 WD-SCCs and PD/S-SCCs developed in immunocompetent mice (four tumor samples per group). *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$)

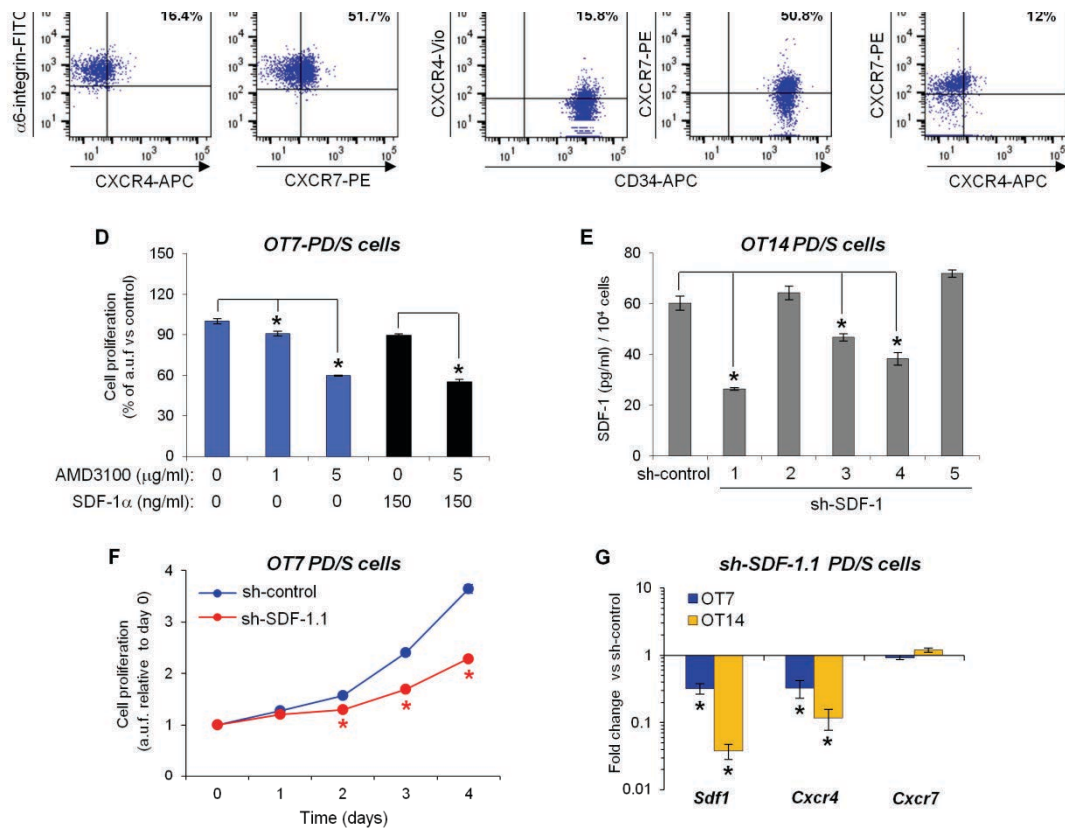


Figure S2. SDF-1 abrogation and inhibition of CXCR4 reduces the proliferation/survival of L-CSCs. A-C, quantification by flow cytometry of the percentage of indicated cell populations in tumor cells isolated from PD/S-SCCs (PD/S cells; three independent cell cultures) and maintained in culture, which are enriched in $\alpha 6$ -integrin⁺/CD34⁺ CSCs. D, cell proliferation upon SDF-1 α and/or AMD3100 treatment, as measured by MTT. Mean (\pm SE) arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) in treated cells relative to cells growing in basal conditions. E, quantification by ELISA assays of the SDF-1 concentration in the culture medium of PD/S cells transduced with sh-control or the indicated sh-SDF-1 lentivirus constructions (two samples per group). F, representative proliferation kinetics (mean \pm SE of a.u.f. relative to day 0) of PD/S cells transduced with sh-control and sh-SDF1.1 construct, as measured by MTT. G, mRNA levels (mean \pm SE; two samples of cell cultures per lineage) of the indicated genes in sh-SDF-1 PD/S cells, relative to control (sh-control) cells. *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$).

Bernat-Peguera et al. Supplementary Fig. 3

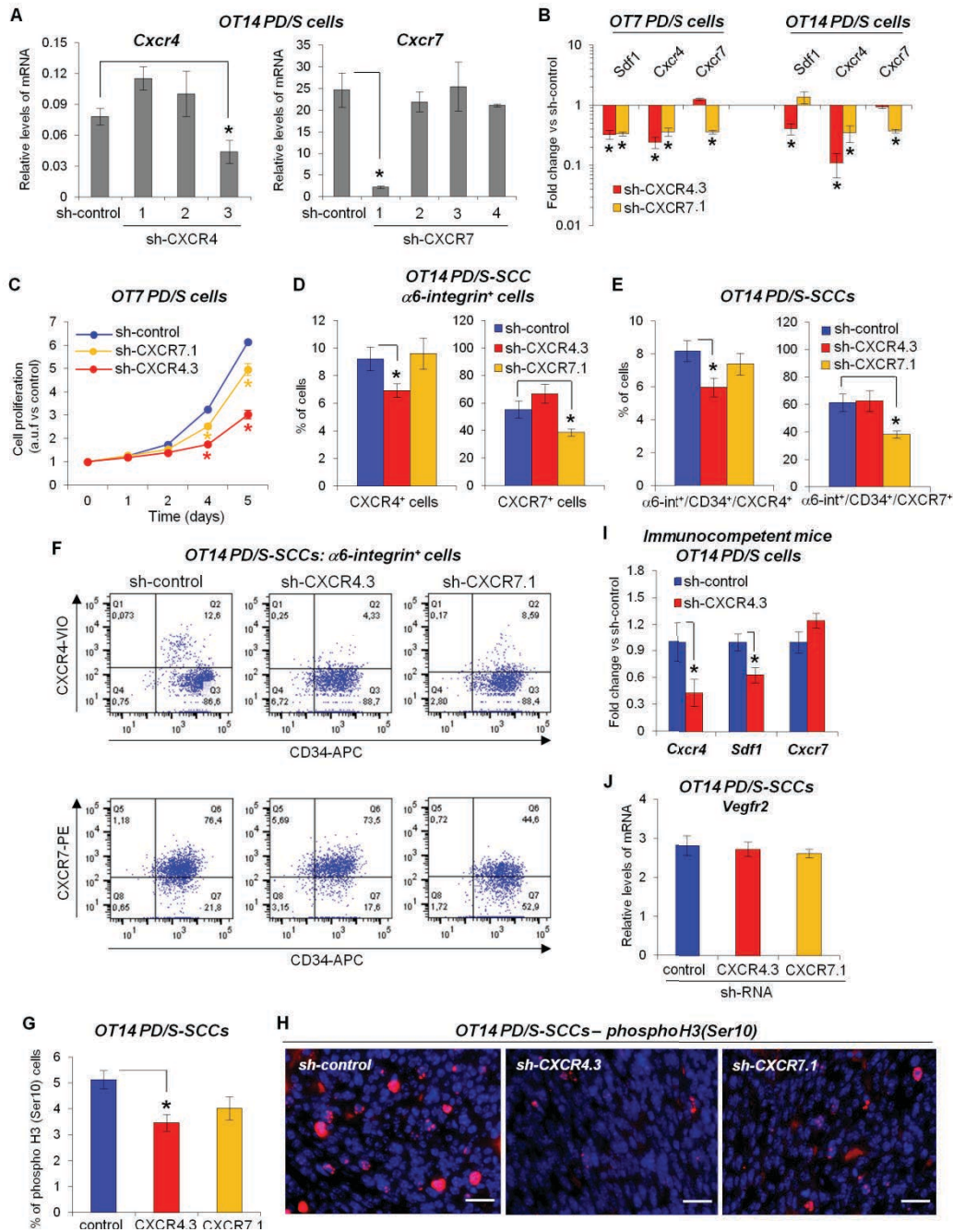
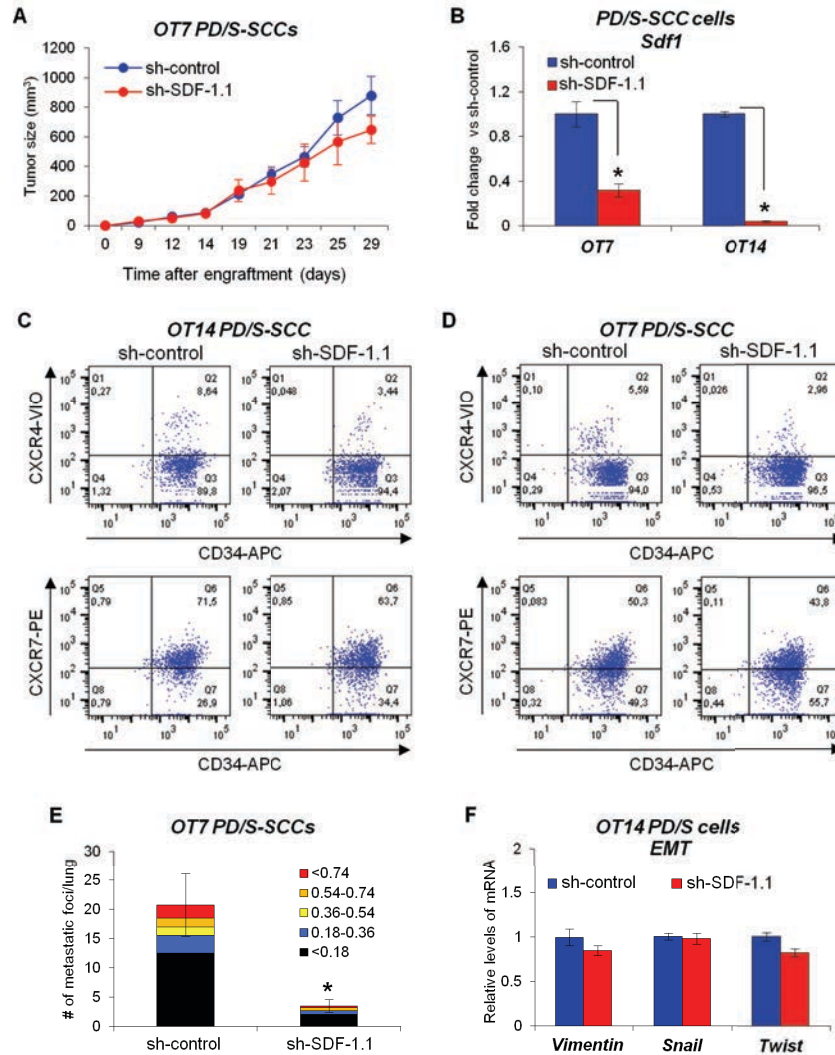


Figure S3. Abrogation of CXCR4 in L-CSCs reduces the growth of PD/S-SCC developed in immunodeficient mice. **A**, *Cxcr4* and *Cxcr7* mRNA levels (mean ± SE), relative to *Gapdh* in PD/S cells transduced with sh-control or different CXCR4 and CXCR7 sh-RNA lentivirus constructions. **B**, mean mRNA levels (± SE; three samples of cell cultures per lineage) of the indicated genes in sh-CXCR4.3 (transduced with sh-RNA number 3) and sh-CXCR7.1 (transduced with sh-RNA number 1) PD/S cells, relative to control (sh-control) cells. **C**, representative proliferation kinetics (mean ± SE of a.u.f. relative to day 0) of sh-control, sh-CXCR4.3 and sh-CXCR7.1 PD/S cells, as measured by MTT. **D** and **E**, mean percentage (± SE) of the indicated cell populations in sh-control, sh-CXCR4.3 and sh-CXCR7.1 PD/S-SCCs (6-10 tumor samples per group), as measured by flow cytometry. **F**, representative results of the quantification by flow cytometry of the percentage of CXCR4- and CXCR7-expressing α6-integrin+/CD34+ CSCs in the indicated PD/S-SCCs. **G**, mean percentage of proliferating cells (± SE; 3-4 tumor samples per group), as determined in (**H**). **H**, representative images of the immunodetection of phosphorylated H3 (Ser10) in the indicated PD/S-SCCs developed in immunodeficient

mice. Scale bar, 20 μm . **I**, mean (\pm SE) mRNA levels of the indicated genes in tumor cells isolated from sh-CXCR4 PD/S-SCCs relative to cells isolated from sh-control tumors generated in immunocompetent (3-4 samples per group). **J**, mean (\pm SE) of *Vegfr2* mRNA levels, relative to *Gapdh* in the indicated PD/S-SCCs (six tumor samples per group). *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$).

Demarciguera et al., Supplementary Fig. 7



growth. **A**, growth kinetics (mean \pm SE of tumor size, mm²) of control (sh-control) and SDF-1 knocked-down (sh-SDF-1.1) PD/S-SCCs (eleven tumors per group). **B**, mean (\pm SE) *Sdf1* mRNA levels in tumor cells isolated from sh-SDF-1.1 PD/S-SCCs, relative to sh-control tumor cells (four tumor cell populations per group). **C** and **D**, representative results of the quantification by flow cytometry of the indicated cell populations in sh-control and sh-SDF-1.1 PD/S-SCCs. **E**, mean frequency of metastatic foci per lung section (\pm SE, categorized by size, mm²) in mice carrying SDF-1 expressing (sh-control) and SDF-1 knocked-down (sh-SDF-1.1) tumors (six mice per group). **F**, mean (\pm SE) mRNA levels of the indicated genes in tumor cells isolated from sh-SDF-1.1 PD/S-SCCs, relative to sh-control tumor cells (four tumor cell samples per group). *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$).

Bernat-Peguera et al. Supplementary Fig. 5

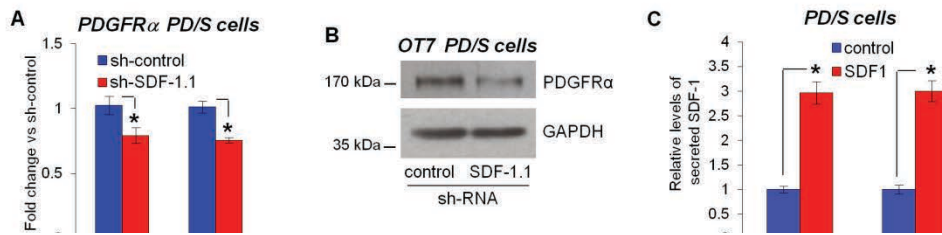


Figure S5. SDF-1 abrogation induces a down-regulation of PDGFR α expression. **A**, mean (\pm SE) *Pdgfra* mRNA levels in sh-SDF-1.1 PD/S cells relative to sh-control cells, as measured by qRT-PCR. **B**, PDGFR α expression in control and SDF-1-interfered PD/S cells. GAPDH was used as a protein-loading control. **C**, quantification by ELISA assays of SDF-1 concentration (mean \pm SE) in the culture medium of two independent populations of control or SDF-1 overexpressing PD/S cells. *, significant differences between the compared groups (*t*-test; $P \leq 0.05$)

Bernat-Peguera et al. Supplementary Fig. 6

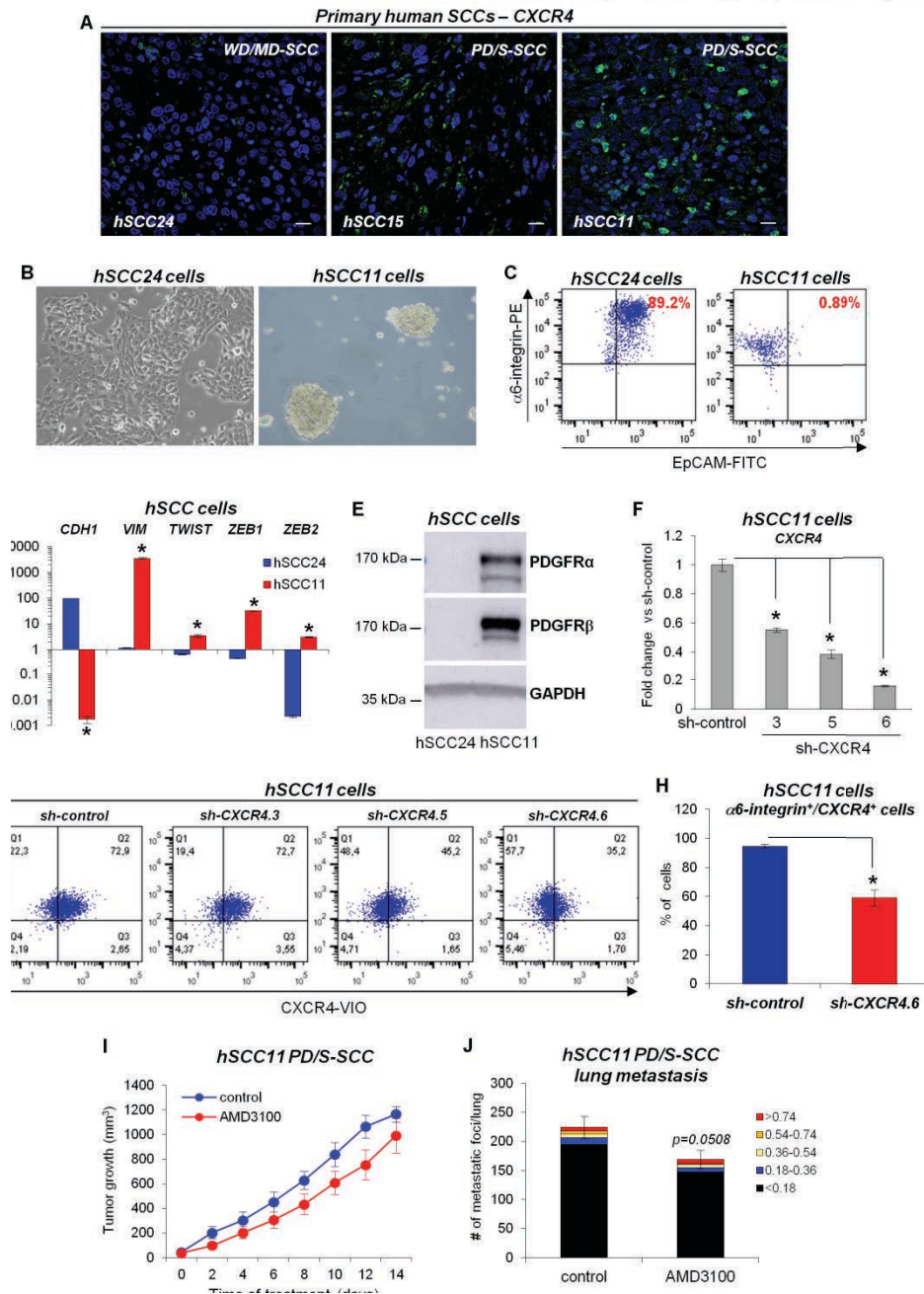


Figure S6. Inhibition of CXCR4 blocks distant metastasis in human advanced SCCs. **A**, Representative images of the immunodetection of CXCR4 in patient samples of WD/MD-SCCs and PD/S-SCCs. Scale bar, 60 μ m. **B**, tumor cells isolated from a patient WD-SCC (hSCC24 cells) grow *in vitro* as adherent cells, exhibiting a typical epithelial morphology, whereas tumor cells isolated from a PD/S-SCC (hSCC11 cells) grow in suspension, forming spheres. **C**, quantification by flow cytometry of the percentage of tumor cells expressing $\alpha6$ -integrin and EpCAM epithelial markers in the indicated cell cultures. **D**, mean (\pm SE) levels of mRNA of *CDH1*, *Vimentin* and EMT-inducer transcription factors, relative to *GAPDH* in the indicated cell cultures. **E**, representative images of the PDGFR α and PDGFR β expression in tumor cells from human WD-SCCs and PD/S-SCCs. GAPDH was used as a protein-loading control. **F**, mean (\pm SE) levels of *CXCR4* mRNA in hSCC11 PD/S-SCC cells transduced with different CXCR4 sh-RNA lentivirus constructions relative to sh-control cells, as measured by qRT-PCR (one sample per group). **G**, representative results of the quantification by flow cytometry of $\alpha6$ -integrin⁺/CXCR4⁺ cells in control (sh-control) and in the indicated CXCR4 knocked-down (sh-CXCR4) hSCC11 cells. **H**, mean percentage (\pm SE) of $\alpha6$ -integrin⁺/CXCR4⁺ cells in control (sh-control) and CXCR4 knocked-down (sh-CXCR4.6) PD/S-SCCs (seven tumor samples per group), as quantified by flow cytometry. **I**, growth

kinetics (mean \pm SE of tumor size, mm³) of tumors generated after hSCC11 cell engrafting in immunodeficient mice, which were treated with vehicle solution (control) and AMD3100 (seven tumors per group). *P* value (*t*-test) of the compared groups is indicated. **J**, mean of metastatic foci (\pm SE) per lung section (categorized by size, mm²) developed in control and AMD3100-treated mice (six mice per group). *, significant differences between the compared groups (*t*-test; *P* \leq 0.05).

Sample	Classification /Grade	% of indicated tumor region in overall sample*		mRNA/GAPDH	
		% MD-SCC	% PD-SCC / % spindle SCC	SDF1	CXCR4
T1	PD-SCC / G3	0%	95% / 5%	163.5	59.9
T2	PD-SCC / G3	0%	40% / 60%	62.7	184.2
T5	PD-SCC/ G3	55%	45% / 0%	24.1	84.1
T6	MD-SCC / G2	100%	0% / 0%	16.7	24.9
T9	MD-SCC / G2	60%	0% / 0%	16.4	9.8
T10	PD-SCC / G3	55%	40% / 0%	0.97	4.6
T16	PD-SCC / G4	0%	0% / 100%	6.6	102.3
T23	MD-SCC / G2	90%	0% / 0%	8.2	13.3
T24	WD-SCC /G1	0%	0% / 0%	7.6	4.5
T26	PD-SCC / G3	0%	100% / 0%	51.8	93.4
T30	PD-SCC / G3	60%	40% / 0%	n.d.	30.3
T34	MD-SCC / G2	30%	0% / 0%	22.9	n.d.
T39	MD-SCC / G2	100%	0% / 0%	6.2	9.2
T40	MD/PS-SCC G2	30%	0% / 0%	12.9	6.3
T41	WD/MD-SCC / G2	50%	10% / 0%	0.5	5.3
T42	PD-SCC / G4	0%	0% / 100%	n.d.	44.7
T44	PD-SCC / G3	0%	100% / 0%	62.7	16.5
T45	MD-SCC / G2	85%	15% /0%	24.1	31.9
T46	MD-SCC / G2	100%	0% / 0%	16.7	23.9
T47	MD-SCC / G2	100%	0% / 0%	22.8	28.5
T48	PD-SCC / G3	55%	40%/ 0%	19.8	16.9
T49	PD-SCC / G4	0%	0% / 100%	33.8	42.0
T51	MD-SCC / G2	70%	0% / 0%	4.6	21.4
T52	MD/PD-SCC G2/G3	70%	30% / 0%	n.d.	17.6
T53	MD-SCC / G2	75%	5% / 0%	6.6	8.1
T54	MD-SCC / G2	90%	10% / 0%	6.2	7.0
T55	MD-SCC / G2	95%	5% / 0%	47.6	10.5
T56	PD-SCC / G3 (M)	0%	100% / 0%	28.0	24.2

Supplementary Table 1. Features of patient skin SCC samples. (*) Human skin SCCs frequently show intra-tumoral heterogeneity. The histopathological grade of different regions and the percentage represented by each region in the overall sample of each tumor were determined by a pathologist. (M) Metastasis, n.d., no data.

Antibody	Dilution	Source	Catalog number
<i>Primary antibodies</i>			
anti-CD34-eFluor 660	1/100	eBioscience	50-0341-82
α 6-integrin(CD49f)-PE	1/50	BD Bioscience	555736
α 6-integrin(CD49f)-FITC	1/20	BD Bioscience	555735
anti-CXCR4-APC	1/50	Milteny Biotec	130-102-913
anti-CXCR4-VIO 615	1/100	Milteny Biotec	130-107-610
anti-CXCR7-PE	1/75	BioLegend	331104
anti-EpCAM-FITC	1/350	Milteny Biotec	130-098-113
anti-CD45-PE	1/200	BD Bioscience	50-0451-U100
anti-CD31 (IF)	1/200	BD Bioscience	550274
anti-CD31 (FACS)	1/100	BD Bioscience	550274
anti-phosphorylated H3 (Ser10)	1/200	Cell Signaling	9706S
anti-CXCR4	1/100	Sigma	C8352
anti-CXCR7	1/100	Acris	AP17961PU-N
anti-SDF-1	1/100	R&D Systems	MAB350
anti-PDGFR α	1/500	R&D Systems	AF-307-SP
anti-PDGFR β	1/1000	Santa Cruz Biotec	sc-374573
anti-GAPDH-HRP	1/6000	Cell Signaling	3683S
<i>Secondary antibodies</i>			
Dynabeads anti-rat	1/50	Invitrogen	11035
anti-rabbit-Alexa 488	1/400	ThermoFisher	A27034
anti-rat-Alexa 488	1/400	ThermoFisher	A11006
anti-rabbit-Alexa 568	1/600	ThermoFisher	A10042
anti-mouse EnVision-HRP	Ready-to-use	DAKO	K4063
anti-rabbit-HRP	1/1000	DAKO	P0448

Supplementary Table 2. Antibodies used in flow cytometry, immunohistochemistry, immunofluorescence and western blot analysis

Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
MOUSE		
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTC
<i>Ppia</i>	GTTTCATGCCTTCTTTACCTTCCC	CAAATGCTGGACCAAACACAA ACG
<i>Pdgfra</i>	CAGTCCACCCGTGTGCT	GAAAATTCAACAGCAGCTGGT
<i>Sdf1</i>	GGCGTCTGACTCACACCTCT	AGTGTGCATTGACCCGAAAT
<i>Cxcr4</i>	CCATGGAACCGATCAGTGTG	TTTTTCATCCCGGAAGCAGG
<i>Cxcr7</i>	CTGTCAGCTGGAGAATGTGC	TGCGGTTGATGAAGCTGTAG
<i>Snail</i>	CTTGTGTCTGCACGACCTGT	AGTGGGAGCAGGAGAATGG
<i>Twist</i>	AGCTACGCCTTCTCCGCT	TCCTTCTCTGGAAACAATGACA
<i>Vimentin</i>	AGAGAGAGGAAGCCGAAAGC	TCCACTTTCGGTTCAAGGTC
<i>Vegfr2</i>	ACGGGAGACGTCCTTCATAA	GTGCCGACGAGGATAATGAC
HUMAN		
<i>GAPDH</i>	CAAGATCATCAGCAATGCCT	AGGGATGATGTTCTGGAGAG
<i>HPRT</i>	TGACACTGGCAAAACAATG	GGTCCTTTTCACCAGCAAG
<i>GUSB</i>	CTCATTTGGAATTTTGCCGATT	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA
<i>PDGFRA</i>	GTCTGGAGCGTTTGGGAAGGT	GATCTGGCCGTGGGTTTTAGC
<i>PDGFRB</i>	GGACATACCCCGCAAAGAA	CTAACTCGGCACTGGGGATGT
<i>SDF1</i>	TGTGCCCTTCAGATTGTAGCC	TCGAGTGGGTCTAGCGGAAA
<i>CXCR4</i>	GCAAGGCAGTCCATGTCATC	TTGGCCTCTGACTGTTGGTG
<i>CXCR7</i>	ACATGCCCAACAAAAGCGTC	ACCACGGAGTTGGCAATCAT
<i>CDH1</i>	CAGAATTGCTCACATTCC	GGATTTGATCTGAACCAGGT
<i>VIMENTIN</i>	GGCTCAGATTCAGGAACAGC	GCTTCAACGGCAAAGTTCTC
<i>TWIST</i>	GGAGTCCGCAGTCTTACGAG	TCTGGAGGACCTGGTAGAGG
<i>ZEB1</i>	TTTGGCTGGATCACTTTCAAG	GCCAATAAGCAAACGATTCTG
<i>ZEB2</i>	TGTAGATGGTCCAGAAGAAATG	CCATTGTTAATTGCGGTCT

Supplementary Table 3. Primers used in qRT-PCR

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Isolation of SCC cells

Excised mouse tumors and fresh human skin SCC samples were minced and incubated with collagenase I (60 U/ml; Sigma) and dispase (0.7 U/ml; Gibco) overnight at 37 °C. Cell suspensions were filtered and depleted of red blood cells using ACK lysis buffer (Lonza). For endothelial cell depletion, mouse cell suspensions were incubated with anti-CD31 antibody for 30 min at 4 °C, and then with Dynabeads® anti-rat for 30 min at 4 °C. Isolated tumor cells were then plated and cultured as described in Methods.

Flow cytometry analysis and sorting

For flow cytometry analysis and sorting, isolated human and mouse tumor cells in blocking buffer (5% FBS in PBS) were incubated with anti-CD34-eFluor 660, PE-labeled α 6-integrin (CD49f) antibody or FITC-labeled α 6-integrin (CD49f) antibody, anti-CXCR4-APC or anti-CXCR4-VIO 615, anti-CXCR7-PE and anti-EpCAM-FITC antibody for 30 min at 4 °C (Supplementary Table 2). In addition, isolated tumor cells were incubated for 30 min at 4 °C with anti-CD45-PE antibody, to exclude immune cells in flow cytometry assays or to isolate CD45⁺ immune cells by FACS-sorter. Cells were then washed with 0.5% BSA, 2 mM EDTA in PBS, and resuspended in analysis buffer (2% FBS, 2 mM EDTA in PBS). Live cells excluded DAPI (Sigma) staining. FACS-sorting and analysis were carried out with BD Bioscience Aria and Fusion II equipment.

Cell proliferation assays and treatments

To analyze cell proliferation, PD/S cells were plated (2×10^3 mouse cells and 4×10^3 human cells per well) in six replicates on 96-well plates in basic medium, with a previous withdrawal of puromycin for 48 h in the case of transduced cells. To evaluate the effect of AMD3100, 4×10^3 mouse and human cells were seeded as described above. Then, fresh basic medium without or with AMD3100 (1 μ g/mL and 5 μ g/mL; Chemscene LLC) or with murine or human SDF-1 α (150 ng/mL; PeproTech) was added. To evaluate the effect of imatinib on human hSCC11 cells, 4×10^3 cells were seeded per well in six replicates on 96-well plates in basic medium. Then, fresh basic medium without or with imatinib (LC Laboratories) and without or with PDGF-AA (30 ng/ml), PDGF-BB (30 ng/ml) or PDGF-CC (100 ng/ml) was added. In these assays, fresh medium with factors and/or inhibitors was added every 3 days. Each assay was carried out 2-3 times. Cell proliferation/survival were measured by calculating the mean (\pm SE) absorbance at 560 nm after 6 days of treatment by using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay.

Lentiviral and retroviral cell transductions

To knock down mouse CXCR4, CXCR7, SDF-1 and PDGFR α and human CXCR4 and SDF-1 expression, different shRNA lentivirus vectors (from Dharmacon for mouse and Sigma for human) were tested. To perform the *in vitro* and *in vivo* experiments the most interfering shRNA was used. For SDF1 overexpression, PD/S cells were transduced with pBabe SDF-1 α retroviral vector (Addgene) or empty pBabe vector. To carry out cell transduction, lentivirus and retrovirus particles were produced in 293T cells using standard protocols. PD/S cells growing as spheres, were disaggregated by Accutase Solution (Sigma) for 10 min and 1×10^6 cells were incubated with 293T medium containing lentivirus particles, following standard infection protocols.

Histology, immunohistochemistry and immunoblotting assays

Tumors and lungs were fixed in 4% formaldehyde overnight at 4 °C, paraffin-embedded and sectioned at 4 μ m. For histopathological analysis and to quantify metastasis foci, tumor and lung sections were stained with hematoxylin and eosin, as previously described (1). For CXCR4, SDF-1 and phosphorylated H3 immunodetection, tumor paraffin-embedded sections were used and antigens were previously retrieved in 10 mM sodium citrate (pH 6.0). For CD31 and CXCR7 immunofluorescent staining, tumor cryosections were used. Tumor sections (3-4 samples for tumor group) were blocked with 5% horse serum or 5% BSA in PBS for 1 h at room temperature. The primary antibodies used were anti-phosphorylated H3 (Ser10), anti-CD31, anti-CXCR4, anti-CXCR7 or anti-SDF-1 antibodies (Supplementary Table 2). Tumor sections were then incubated with anti-rabbit or anti-rat Alexa-488 or Alexa-568 secondary antibodies for 1h at room temperature (Supplementary Table 2). Nuclei were stained with 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). For SDF-1 immunodetection sections were incubated with secondary anti-mouse EnVision antibody followed by the DAB developing system (Dako). Samples were counterstained with hematoxylin and visualized under light microscopy. Nikon Eclipse 80i, Leica DM6000B, Leica TCS SP5 confocal, and Zeiss Apotome microscopes were used.

For western blot analysis, whole-cell extracts from tumor and culture cells were prepared in lysis buffer, containing 50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 350 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% glycerol, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 2 mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT, PhosSTOP (Roche), Complete (Roche), 0.1% SDS (Invitrogen) and 1% Triton X-100 (Thermo Scientific), as previously described (2). After transfer, proteins were incubated overnight with the antibodies anti-PDGFR α ; anti-PDGFR β and anti-GAPDH-HRP (Supplementary Table 2). Antibody binding was detected with a secondary antibody coupled to horseradish peroxidase using enhanced chemiluminescence detection reagents (Amersham).

Reverse transcription and quantitative PCR

RNA samples were previously treated with DNase (Sigma). Reverse-transcription reactions were carried out with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Real-time PCR reactions were performed (three replicates for each sample) on an Applied QuantStudio5, using SYBR Green Mix (Applied Biosystems) and primers described in Supplementary Table 3. *Gapdh/GAPDH*, *Ppia*, *HPRT* and *GUSB* were used to normalize the gene expression for all human and mouse samples. mRNA levels were shown as relative to *Gapdh/GAPDH* mRNA, or alternatively as fold change. In this case, mean of mRNA levels relative to two or three housekeepings was calculated.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5.0 Software (GraphPad software, San Diego, CA). Normal distribution of data and similarity of variances between compared groups were checked using the Shapiro-Wilk Normality test and F-Fisher test, respectively. Student's *t*-test (two-tailed) was used to determine the significance of differences between groups, as detailed in legend figures. Data are presented as the means \pm SE. Scatter plot and Pearson coefficient were to correlate the relative gene expression of *CXCL12* and *PDFGRA/B* in patient samples. No statistical methods were used to predetermine sample size in *in vivo* experiments, which was estimated based on our previous experience and similar experiments reported in literature.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. da Silva-Diz V, Sole-Sanchez S, Valdes-Gutierrez A, *et al.* Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis. *Oncogene* 2013;32(32):3732-43.
2. da Silva-Diz V, Simon-Extremera P, Bernat-Peguera A, *et al.* Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression. *Cancer Res* 2016;76(5):1245-59.

RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Artículo 1: Las células madre del cáncer (CSCs) actúan a través de distintas vías de señalización para promover la progresión maligna hacia estadios avanzados.

Los estudios que dieron lugar a este artículo fueron realizados en colaboración con otros miembros del laboratorio. A continuación, describiré resumidamente los resultados del trabajo, para poner en contexto los estudios dónde yo tuve una participación más relevante, que serán discutidos en detalle en esta sección.

La mayoría de los SCC de piel (cSCC) son tratados con éxito mediante escisión quirúrgica. Sin embargo, en el 5-8% de los casos se producen recurrencias, las cuales han sido asociadas con tumores más agresivos y con mayor capacidad metastásica. Los cSCC avanzados y de alto riesgo, junto con los cSCC metastásicos y los de difícil o incompleta resección, son tratados con radioterapia y quimioterapia. Desafortunadamente, estas terapias convencionales presentan una gran toxicidad y tienen limitados beneficios clínicos (Franco et al., 2012). La baja supervivencia de estos pacientes con cSCCs recurrentes y/o metastásicos, hace necesario encontrar nuevas terapias para su tratamiento. Sin embargo, la escasa información sobre los mecanismos y vías de señalización que promueven el crecimiento y metástasis de los cSCCs, impide el desarrollo de terapias dirigidas para tratar estos pacientes.

Los estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que durante la progresión del cSCC de ratón se produce una transición de tumores con características de diferenciación epitelial a tumores con un fenotipo mesenquimal, los cuales presentan un crecimiento más agresivo y una incrementada capacidad metastásica. Los PD/S-SCCs con características mesenquimales presentan una expansión de la población CSC y una fuerte inducción del programa de EMT, comparados con los WD-SCCs. Además, de forma paralela se produce un cambio de los mecanismos que regulan la actividad de las CSCs. Así, las CSCs (E-CSCs) de los WD-SCCs presentan una activación de las vías de WNT/ β -catenina y de EGFR. En estos tumores, la vía de señalización de EGFR esta activada de forma autocrina y controla la proliferación y la supervivencia de las E-CSCs. Contrariamente, esta vía está atenuada en la CSCs de los PD/S-SCCs (L-CSCs), las cuales inducen de forma autocrina las vías de FGFR1 y PDGFR α para promover el crecimiento tumoral y la generación de metástasis de los PD/S-SCCs, respectivamente.

A partir de estos resultados, decidimos evaluar la expresión de estos receptores y sus ligandos en una batería de cSCCs de pacientes, que recapitulaban los diferentes estadios de progresión tumoral. Fue en estos estudios donde mi contribución fue más relevante. Estos análisis mostraron que los tumores más avanzados y, especialmente aquellos que eran recurrentes, presentan una expansión de las células tumorales que expresan CD44, un marcador de CSC en cSCCs (Biddle

et al., 2011; Geng et al., 2013), y una robusta inducción del programa de EMT, validando los resultados obtenidos en los modelos de progresión de cSCCs de ratón.

Es importante destacar que, a pesar de que el marcador CD44 permite identificar células tumorales con características CSCs en varios tipos de tumores, incluyendo el cSCC (Yan et al., 2015), era importante demostrar que se producía un aumento de la frecuencia de las CSCs en los tumores más agresivos mediante ensayos funcionales, como serían los ensayos de dilución límite (ver artículo 2). En este sentido, se ha estimado que la frecuencia de CSCs en otros tumores sólidos humanos es inferior al 1% de las células tumorales (Ishizawa et al., 2010), siendo más alta en los tumores pobremente diferenciados (o de mayor grado) que en los bien diferenciados o de menor grado (Pece et al., 2010; Roudi et al., 2014; Lathia et al., 2015). Aunque la frecuencia puede parecer muy baja, las consecuencias derivadas de su actividad son dramáticas, principalmente por su alta capacidad de diseminar y generar metástasis (Zeuner et al., 2014) y por su capacidad de resistir a las terapias convencionales (Creighton et al., 2009; Sprenger et al., 2013), lo que promueve finalmente la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos que regulan la proliferación y la metástasis de las células tumorales, y particularmente de las CSCs, es esencial para diseñar terapias más efectivas para el tratamiento del cáncer.

Nuestros resultados demostraron que, mientras que los WD/MD-SCCs de pacientes presentaban una fuerte la expresión de β -catenina, así como de EGFR y de algunos de sus ligandos, la expresión de estas proteínas disminuía en las muestras de pacientes de cSCCs avanzados y recurrentes, de forma similar a lo observado en los PD/S-SCCs de ratón. Estos tumores avanzados presentaban además una inducción de la expresión de *PDGFRA/B*, *PDGF-CC*, *FGFR1* y *FGF2*, comparado con los WD/PD-SCCs. Estos resultados demuestran que los cambios en las vías de regulación de las CSCs previamente descritos durante la progresión de los tumores murinos, también se producen en los cSCCs avanzados de pacientes que muestran características mesenquimales. Estas observaciones estarían de acuerdo con estudios previos que mostraron que las vías de señalización de WNT/ β -catenina, TGF- β y VEGF regulan la función de las CSCs de los SCCs de piel murinos en etapas tempranas de la progresión, promoviendo el crecimiento tumoral (Beck et al., 2011; Schober & Fuchs, 2011), así como la implicación de la vía de EGFR induciendo la proliferación de las células tumorales de los cSCCs de ratón (Zhang et al., 2014). Sin embargo, poco se conocía sobre las vías de señalización que controlan la proliferación y supervivencia de las células tumorales de los cSCC humanos.

En este sentido, estudios basados en la detección de EGFR mediante ensayos de inmunohistoquímica, entre otros, han observado que más del 50% de los cSCC avanzados y/o metastásicos presentan una sobreexpresión de EGFR (Maubec et al., 2005; Cañueto et al., 2017).

Sin embargo, en estos trabajos no están representados todos los estadios de la progresión del cSCC. Aquí, demostramos que la expresión de genes implicados en esta vía, como EGFR y alguno de sus ligandos está inducida en los WD/PD-SCCs y disminuye en los cSCC más avanzados (PD/S-SCCs). En este sentido, nuestros hallazgos indican que la vía de EGFR podría desempeñar un papel importante promoviendo el crecimiento tumoral en un grupo de cSCCs de pacientes.

Por otra parte, se ha descrito que la activación autocrina de la vía FGFR1-FGF2 controla la proliferación de las células tumorales de HNSCC (Becker & Wang, 1997; Marshall et al., 2011), y la expresión de FGFR1 en PDXs de HNSCC se ha asociado a sensibilidad a NVP-BGJ398, un inhibidor de FGFR (Göke et al., 2015). Sin embargo, la expresión de FGFR1, junto con la de FGFR2 y 3, parece tener un papel relevante en HNSCC de estadios tempranos de la progresión. (Vairaktaris et al., 2006; Freier et al., 2007). Contrariamente, en tumores de próstata avanzados se ha observado un aumento de la expresión de FGFR1 y una pérdida de FGFR2 respecto a los tumores de estadios tempranos (Acevedo et al., 2009), de acuerdo con nuestros resultados en cSCC de ratón. Además, en un modelo de ratón de cáncer de próstata, la inducción ectópica de FGFR1 conduce al desarrollo de tumores fusocelulares y sarcomatoides a través de la inducción del programa EMT, y la vía de FGFR1 regula la proliferación de las células tumorales y promueve el crecimiento tumoral (Acevedo et al., 2007).

Así, la inducción de la expresión de *FGFR1b*, *FGFR1c* y *FGF2* observada en los PD/S-SCCs podría conducir a la activación de esta vía y promover el crecimiento de los cSCCs avanzados de los pacientes. Los CAFs expresan FGFRs y FGFs (Katoh, 2016) y se ha descrito que son sensibles a inhibidores de esta vía de señalización (Procopio et al., 2015). El aumento de expresión de FGFRs en los tumores de los pacientes podría derivarse de cambios de expresión de estos receptores en los CAFs. Sin embargo, la expresión de estos receptores no cambia significativamente en los fibroblastos del estroma de cSCCs murinos durante la progresión tumoral (resultados no mostrados). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren en este punto que la inducción de FGFR1 y FGF2 en los cSCC avanzados podría deberse a un aumento de expresión de estas proteínas en las células tumorales.

Además, es importante destacar que los queratinocitos de la piel y las células tumorales de los WD-SCCs expresan PDGFs, pero no PDGFRs. La expresión de estos receptores está restringida a las células estromales (Pontén, et al., 1994; Akiyama, et al., 1996). Sin embargo, observamos que la expresión de PDGFR se inducía de forma significativa en las L-CSCs, coincidiendo con la adquisición de características mesenquimales, y esta vía de señalización fue responsable de promover la invasión de estas células y el desarrollo de metástasis. En este sentido, estudios previos demostraron que las células de cáncer de mama y colorrectal con EMT inducido activaban la vía de PDGFR, la cual jugaba un papel clave en la invasión de las células tumorales y la

metástasis (Tam et al., 2013; Steller et al., 2015; Jansson et al., 2018). Estas observaciones, junto con la inducción de la expresión de *PDGFR* y *PDGFC* en los PD/S-SCCs de pacientes, sugieren que esta vía de señalización podría estar también implicada en el desarrollo de metástasis en los PD/S-SCCs de pacientes, hipótesis que fue testada en el tercer artículo presentado en esta tesis.

Todas estas observaciones sugieren que las células tumorales pueden presentar una cierta plasticidad a lo largo de la progresión, desactivando y activando dinámicamente diferentes vías de señalización en función de los requerimientos autocrinos y/o dependencia del TME en cada contexto tumoral, y adaptando así, la maquinaria que controla el crecimiento tumoral y la metástasis en cada estadio de la progresión. Además, estos estudios identifican una serie de marcadores moleculares del grado de progresión del cSCCs, que podrían utilizarse como dianas terapéuticas para bloquear de forma selectiva las vías de señalización que regulan el crecimiento agresivo y la generación de metástasis en cada estadio de la progresión de los cSCCs. Sin embargo, en este punto, era necesario realizar más ensayos para evaluar la relevancia de estas vías de señalización en el control del crecimiento tumoral y la metástasis en los diferentes estadios del cSCC de pacientes.

Artículo 2: La terapia dirigida contra EGFR bloquea el crecimiento de los carcinomas cutáneos de tipo epitelial y la activación de la vía de FGFR induce resistencia a esta terapia.

Unos de los puntos clave para evaluar la relevancia de determinadas vías de señalización o factores en el crecimiento tumoral, así como su potencial como dianas terapéuticas, es disponer de modelos experimentales *in vivo* que recapitulen las características de los tumores de los pacientes. La mayor parte de los estudios en SCCs de piel se han basado en modelos de ratones transgénicos o modificados genéticamente (Lapouge et al., 2011; White et al., 2011), modelos de ratón de cSCCs inducidos mediante el tratamiento con DMBA/TPA (Huang & Balmain, 2014), o en modelos de progresión generados mediante el implante ortotópico seriado de cSCCs de ratón (da Silva-Diz et al., 2016). Además, algunos estudios se han realizado mediante el implante de líneas celulares de cSCC de pacientes, como A431 o SCC13, en ratones inmunodeficientes (Geng et al., 2013; Siegle et al., 2014). En este sentido, los modelos pre-clínicos (PDXs) y los cultivos primarios generados en este trabajo a partir de muestras de paciente de cSCC en diferentes estadios de la progresión, suponen herramientas excepcionales para estudiar posibles dianas terapéuticas. Nuestros estudios demuestran que estos cSCC-PDXs y cultivos primarios recapitulan las características histopatológicas y moleculares de sus respectivos cSCCs parentales. Los G2/G3-SCCs conservan características de diferenciación epitelial, como la expresión de E-Caderina y EpCAM, mientras que los cSCCs más avanzados e indiferenciados

(G4-SCCs) pierden la expresión de estos marcadores e inducen la de marcadores mesenquimales, como la Vimentina y factores inductores del programa de EMT. Además, mediante ensayos funcionales demostramos que las células aisladas de los G4-SCCs están enriquecidas en células iniciadoras de tumores, respecto a los G2/G3-SCCs epiteliales, coincidiendo con su fenotipo más indiferenciado, su crecimiento agresivo y su elevada capacidad metastásica. Estos resultados estarían de acuerdo con nuestras observaciones previas que indicaban que los cSCCs humanos más avanzados presentaban un enriquecimiento de células CD44⁺ con características CSCs (da Silva-Diz et al., 2016). Por lo tanto, la adquisición de características mesenquimales, la inducción del programa EMT y el aumento del *stemness* serían procesos que están estrechamente ligados y asociados a los cSCC avanzados de pacientes, tal y como se ha reportado en otros tipos de cáncer (Wellner et al., 2009) y en cSCC avanzados de ratón (Mani et al., 2008; Lapouge et al., 2012; da Silva-Diz et al., 2016).

Por otra parte, algunos trabajos basados en ensayos de inmunohistoquímica reportaron que la expresión de EGFR estaba inducida en más del 50% los cSCCs humanos (Maubec et al., 2005; Cañueto et al., 2017). En base a estos estudios, se llevaron a cabo ensayos clínicos con inhibidores de EGFR para tratar pacientes con cSCC de difícil resección, recurrentes y/o metastásicos, obteniendo resultados poco prometedores (Maubec et al., 2011; Gold et al., 2018) (ClinicalTrials.gov Identifiers: NCT00240682, NCT01198028, NCT00054691, NCT00126555, NCT01059305). Sin embargo, en estos estudios no se analizaron mutaciones en EGFR o otros genes, por lo que no fue posible correlacionar la falta de respuesta a los inhibidores con determinadas alteraciones moleculares o la actividad de la vía de EGFR.

En este estudio, hemos realizado un exhaustivo análisis molecular y funcional de la vía de EGFR en cSCC-PDXs. Nuestros resultados demuestran que la activación autocrina de esta vía promueve la proliferación y supervivencia de las células tumorales de los G2/G3-SCCs que conservan características de diferenciación epidermal (G2/G3-SCCs). Es más, la inhibición de la vía de EGFR no solo provoca una dramática reducción del crecimiento de los G2/G3-SCCs, sino que reduce significativamente el tamaño de tumores ya establecidos. Por lo tanto, el tratamiento anti-EGFR podría ser una excelente terapia para pacientes con cSCCs que presenten un perfil determinado, como sería la expresión de marcadores epiteliales. Además, este tipo de terapia se podría usar como primera línea de tratamiento en pacientes con tumores con características epiteliales que no sean candidatos para cirugía, con el objetivo de reducir considerablemente su tamaño, facilitar así su resección y reducir el riesgo de dejar márgenes afectados que podrían originar una posterior recurrencia.

Sin embargo, será necesario hacer estudios más exhaustivos (ensayos clínicos) donde, de forma complementaria al grado histopatológico y otros parámetros, como por ejemplo, el tamaño

tumoral, grado de invasión en la dermis, invasión perineural y grado de diferenciación, se analice la expresión de una batería de marcadores de diferenciación epidérmica, como por ejemplo K14, E-Cadherina y EpCAM, marcadores mesenquimales, como ZEB1/2 y Vimentina, así como la expresión de EGFR y la presencia de mutaciones en este receptor o en *RAS*. Estos estudios permitirían establecer una correlación entre la respuesta al fármaco y las características epiteliales del tumor.

Como se ha descrito en la introducción, algunos tumores como los NSCLCs portadores de amplificaciones y mutaciones activadoras de EGFR, carcinomas colorrectales sin mutaciones en *RAS* y los HNSCCs recurrentes y metastásicos son tratados con inhibidores de EGFR con mejores beneficios clínicos que la radioterapia y quimioterapia (Vermorken et al., 2008; Mok et al., 2009; Bokemeyer et al., 2011; Ghilardi et al., 2011; Van Cutsem et al., 2011; Licitra et al., 2011; Rosell et al., 2012; Wu et al., 2015; Yang et al., 2016; Tian et al., 2018; Patil et al., 2018). Sin embargo, en un porcentaje importante de los casos se desarrolla resistencia, limitando la efectividad de las terapias dirigidas contra EGFR. Actualmente, muchos estudios se centran en investigar los mecanismos de resistencia a estos fármacos, aunque la heterogeneidad genética y celular intra-tumoral y la capacidad plástica de las células tumorales, frecuentemente potenciada por la presión selectiva de la terapia (da Silva-Diz et al., 2018), puede jugar un papel crucial en la resistencia a los fármacos, aumentando la complejidad de estos estudios.

En este sentido, nuestros estudios demuestran que, a pesar de la respuesta inicial óptima al tratamiento, alrededor del 30% de los cSCCs epiteliales (SCC10 vs SCC16 y SCC24 que desarrollan resistencia con una baja incidencia) desarrollan resistencia tras un tratamiento prolongado con gefitinib. Tras la interrupción del tratamiento, el 100% de los tumores que mostraron un bloqueo de su crecimiento, vuelven a crecer. Esto indica que hay una población de células tumorales que han resistido al tratamiento, y que sin la presión del inhibidor son capaces de regenerar de nuevo el tumor. Sin embargo, no todos los tumores recedidos mostraron ser resistentes al fármaco tras sucesivos ciclos de tratamientos. La incidencia de resistencia resultó ser además diferente en los tres cSCC-PDXs testados. Esta diferencia entre los tres modelos de cSCC-PDX podría deberse a una frecuencia variable de células resistentes preexistentes en los tumores, que se seleccionan bajo la presión del tratamiento, o incluso a la adquisición de mutaciones en genes específicos y la activación de vías de señalización que pueden evadir la inhibición de EGFR.

En este sentido, la resistencia a terapias se ha clasificado como primaria (intrínseca) o secundaria (adquirida). En la resistencia primaria, los pacientes no responden desde el principio al tratamiento, mientras que en la resistencia secundaria los pacientes inicialmente responden al tratamiento, pero acaban desarrollando recidivas y progresan en la enfermedad. La resistencia

primaria a la terapia anti-EGFR ocurre en el 4-20% de los pacientes con NSCLC mutantes para EGFR (Maemondo et al., 2010; Mitsudomi et al., 2010; Zhou et al., 2011; Rosell et al., 2012; Sequist et al., 2013; Wu et al., 2014) y se ha asociado a la presencia de células tumorales con la mutación *EGFR T790M*, (Su et al., 2012; Costa et al., 2014; Yu et al., 2014), o a inserciones en el exón 20 de EGFR, que representa un 4-10% del total de mutaciones en EGFR (Arcila et al., 2013; Oxnard et al., 2013; Yang et al., 2015). Por otra parte, en el carcinoma colorrectal y en HNSCC los principales mecanismos de resistencia primaria descritos son mutaciones en *RAS* (Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008; Douillard et al., 2013) y *BRAF* (Di Nicolantonio et al., 2008), y en menor frecuencia, amplificaciones en *HER2* y *MET* (Bertotti et al., 2011; Yonesaka et al., 2011; Misale et al., 2014; Byeon et al., 2019).

Se han detectado mutaciones en *HRAS* y *NRAS* en un 20.5% y un 5.1% de los cSCCs de pacientes, respectivamente, mientras que *BRAF* está mutado en un 17.9% de los casos. Por otra parte, las mutaciones en el gen de *EGFR* son prácticamente inexistentes en los cSCCs primarios (Pickering et al., 2014), y se han detectado en un porcentaje muy bajo en muestras de metástasis en nódulo linfático (1 de 29 casos) (Li et al., 2015). De acuerdo con la baja prevalencia de estas mutaciones, no se detectaron mutaciones en *EGFR*, *RAS* y *BRAF* en los cSCC-PDXs generados en este estudio. Además, tampoco se detectó la presencia de estas mutaciones en los PDXs resistentes a gefitinib (GefR). Estas observaciones descartan que la resistencia esté mediada por la selección de subclones de células portadoras de estas mutaciones, que estuvieran presentes en los tumores antes del tratamiento en un porcentaje tan bajo que no hubieran sido detectadas. A pesar de que se identificaron diferentes mutaciones que aparecían o se enriquecían en cada uno de los cSCC-PDXs GefR respecto a sus correspondientes tumores control, no se encontraron mutaciones en genes comunes en los tumores GefR de los tres modelos analizados.

Diferentes estudios han descrito que la resistencia a inhibidores de EGFR en NSCLC, HNSCC y carcinoma colorrectal puede deberse a la adquisición de mutaciones secundarias en *EGFR*, así como en los genes de *RAS* y *PIK3CA*, entre otros (Bertotti et al., 2015; Rotow & Bivona, 2017; Byeon et al., 2019). Nosotros observamos que la mutación *PIK3CA E542K*, la cual se ha asociado a resistencia a la terapia anti-EGFR en NSCLC (Wu et al., 2016), aparecía en algunos cSCC16 GefR, mientras que estaba ausente en los cSCC16 controles y en la muestra del paciente. Sin embargo, el hecho de que algunas réplicas de estos tumores resistentes no mostraran esta mutación, indica que la activación de esta vía o la mutación *PIK3CA E542K* no sería el principal mecanismo de resistencia en estos tumores. Por lo tanto, nos centramos en investigar si la resistencia al gefitinib en nuestros cSCC-PDXs podría ser debida a la plasticidad celular y la capacidad de inducir mecanismos adaptativos en respuesta a la exposición prolongada al fármaco.

La aparición de recurrencias en el 100% de los cSCC tratados con gefitinib después de la retirada del tratamiento, podría deberse en parte al efecto reversible de este inhibidor (Barker et al., 2001). Así, en ausencia del fármaco, un grupo de células tumorales podrían recuperar la señalización a través de EGFR y promover de nuevo el crecimiento tumoral. Sin embargo, después del segundo ciclo de gefitinib se esperaba que el 100% de los cSCC recurrentes mostraran sensibilidad al tratamiento, lo cual no fue observado en ninguno de los tres cSCC-PDX analizados. Alternativamente, se ha propuesto el “modelo de evolución de célula persistente o tolerante” que postula que una pequeña subpoblación de células puede adoptar un estado inactivo y tolerante al fármaco, inducido por la exposición inicial a la terapia. Esta quiescencia permite la supervivencia de estas células y su posterior propagación. Las células persistentes podrían presentar una mayor capacidad para adquirir mecanismos de resistencia (más o menos reversibles después de la retirada del tratamiento) debido al aumento de su plasticidad (Sharma et al., 2010; Lin & Shaw, 2016; Jolly et al., 2018)

Esta hipótesis explicaría porque después de un segundo ciclo de gefitinib se generan tumores resistentes a la terapia. Además, es posible que la incidencia de resistencia dependiera de la frecuencia de estas células tolerantes y/o plásticas en cada modelo cSCC-PDX. Así, las células tolerantes/plásticas podrían ser más frecuentes en los SCC10-PDXs que en los SCC16-PDXs o SCC24-PDXs. Esto explicaría porque los primeros desarrollan tumores GefR con una frecuencia mayor tras una segunda exposición al fármaco que los SCC16 y SCC24.

Con el objetivo de determinar qué vías o mecanismos podrían ser responsables de promover el crecimiento de los cSCC-PDX GefR, se estudiaron los genes diferencialmente expresados en los tumores GefR comparado con sus respectivos controles en cada modelo cSCC-PDX, y se analizaron genes o vías que estuvieran comúnmente alteradas en los tres modelos. A pesar de que los tumores resistentes mostraron múltiples genes diferencialmente expresados, solo se identificó un gen que estaba *upregulado* o *downregulado* en los tres modelos. Dado que no se han descrito inhibidores específicos para ninguno de estas proteínas, nos centramos en estudiar vías y procesos biológicos que estuvieran comúnmente alterados en los tumores GefR.

En este sentido, se ha descrito que en cáncer de pulmón, la transformación histológica desde adenocarcinomas a carcinoma de célula pequeña (SCLC) se produce en un 3-10% de los pacientes que generan resistencia a la terapia anti-EGFR (Sequist et al., 2011; Yu et al., 2013; Yao. et al., 2018). Este proceso está estrechamente ligado a la adquisición de características indiferenciadas y a una inducción del programa EMT (Ito et al., 2017). Por lo tanto, podría ser que la resistencia adquirida en nuestros cSCC-PDXs estuviera medida por la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de características mesenquimales. De acuerdo con esta hipótesis, hemos observado que las vías que regulan la proliferación/supervivencia de las células tumorales de cSCC de ratón

y humanas, cambian cuando las células pasan de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal con el programa de EMT inducido. Así, mientras que las células tumorales epiteliales regulan su proliferación a través de la vía de EGFR, las células mesenquimales inactivan esta vía e inducen la vía de FGFR para promover su proliferación y el crecimiento de los PD/S-SCCs (da Silva-Diz et al., 2016). Esta transformación, podría provocar una desensibilización de los SCC-PDX tratados con gefitinib, generando resistencia al fármaco. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la expresión de genes relacionados con *stemness* y EMT están regulados negativamente, mientras que la expresión de los genes relacionados con la diferenciación epidérmica están comúnmente inducidos en los tumores GefR de los tres modelos de SCC-PDXs. Por lo tanto, la adquisición de características mesenquimales quedaba descartada como mecanismo de resistencia adquirida.

Por último, se han descrito que la activación de vías de señalización alternativas a EGFR podría facilitar la adquisición de resistencia a inhibidores del receptor en diferentes tipos tumorales (Martz et al., 2015). En este sentido, el análisis de expresión génica reveló que la expresión de genes de la vía de FGFR estaba inducida en las células de los SCC-PDX GefR respecto a los tumores control. Mientras que los SCC10-PDX GefR presentaban una inducción significativa de la expresión de *FGFR2*, los SCC16-PDX GefR inducían la expresión del ligando *FGF2*. Un análisis más amplio de la expresión de las isoformas de FGFR mediante qRT-PCR reveló que la expresión de *FGFR2B*, *FGFR2C* y *FGFR1B* se inducía significativamente en células aisladas de SCC10-PDX GefR, mientras que se inducía la expresión de *FGFR2B* y *FGFR3* en las células de SCC16-PDX GefR respecto a las células de los tumores de control. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la expresión de estos genes en el modelo SCC24-PDX.

Dado que las células tumorales presentan una elevada plasticidad (da Silva-Diz et al., 2018) y que estas vías mediadas por receptores tirosina quinasa comparten muchos de los efectores *downstream*, no es extraño que la activación de una vía de señalización alternativa pueda compensar procesos biológicos clave, como son la supervivencia y la proliferación, cuando la vía que regula preferentemente estos procesos está bloqueada durante un largo periodo de tiempo. De hecho, de forma similar a lo descrito en cSCCs de ratón (da Silva-Diz et al., 2016), la activación de la vía de FGFR, mediante un tratamiento agudo con FGF2 y FGF7, rescata el bloqueo de la proliferación de las células de G2/G3-SCCs humanos provocado por la inhibición de la vía de EGFR. Es más, nuestros resultados demuestran que la estimulación con FGF2 y la inhibición de la vía de EGFR con gefitinib durante un largo periodo de tiempo, provoca la adquisición de resistencia al fármaco, la cual está asociada a un incremento generalizado de la expresión de los receptores de FGF en las células de los tres G2/G3 humanos analizados. Por lo tanto, la adquisición de resistencia al gefitinib en SCC10 y SCC16 podría estar mediada por la inducción

de la vía de FGFR. Es importante destacar que en las células SCC24 GefR generadas *in vitro* se produce una inducción de *FGFR2B*, *FGFR2C* y *FGFR3*, mientras que en los SCC24-PDX GefR generados *in vivo* no se observan estas diferencias. Curiosamente, los niveles de expresión de algunos de los FGFRs son mucho más elevados en los cultivos y los PDXs generados a partir de la muestra del paciente SCC24 que en las células tumorales de los SCC16-PDXs y SCC10-PDXs. Esto indica que los niveles basales de los FGFRs en SCC24 podrían ser suficientes para activar alternativamente esta vía bajo la inhibición de EGFR, sin necesidad de inducir la expresión de los receptores. Además, uno de los genes más fuertemente inducido en las células de los SCC24-PDX GefR es *ITGB3* (gen que codifica para la integrina- β 3).

En este sentido, se ha descrito que la cooperación entre la integrina- β 3 y los FGFRs puede promover la proliferación de células de leucemia mieloide aguda (Shah et al., 2016). Además, se ha demostrado que la integrina β 3 interrumpe físicamente la interacción entre FGFR1 y E-cadherina, potenciando la señalización a través de FGF2 y promoviendo el crecimiento de células tumorales de mama en el nicho metastásico (Brown et al., 2016). Finalmente, la integrina- β 3 también se ha relacionado con resistencia a inhibidores de EGFR en células tumorales de mama (Seguin et al., 2014). Por lo tanto, estas observaciones sugieren que, como en los modelos SCC10 y SCC16, la activación de la vía de FGFR podía estar mediando la resistencia al gefitinib en SCC24.

Nuestros resultados demuestran que la interferencia de FGFR2B en las iGefR y en células aisladas de SCC10-PDX GefR, bloquea la proliferación de estas células y el crecimiento de los tumores GefR. Es importante destacar que a diferencia de las SCC10 y SCC24 iGefR, la interferencia de FGFR2B tuvo un efecto más leve sobre la proliferación de las células SCC16 iGefR. Estos resultados sugieren que la resistencia a gefitinib está mediada por otros receptores, como FGFR3, de acuerdo con lo descrito en líneas celulares de cSCC (A431) resistentes a cetuximab (Oliveras-Ferraro et al., 2012). En este sentido, nuestros resultados demostraron que el tratamiento farmacológico un inhibidor de FGFR (NVP-BGJ398) reduce de forma significativa el crecimiento de los SCC10-PDX y SCC16-PDX GefR, demostrando así que la vía de FGFR promueve la proliferación y la supervivencia de las células tumorales cuando la vía de EGFR está bloqueada.

De acuerdo con nuestros resultados, la activación de vía de FGFR se ha relacionado con la generación de resistencia a las terapias anti-EGFR en varios tipos tumorales (Hallinan et al., 2016). Un estudio reciente ha descrito que el 3% de los pacientes con tumores colorrectales resistentes a cetuximab presentaban una amplificación de FGFR1. Además, estos investigadores demostraron que el tratamiento combinado con cetuximab y NVP-provocaba una fuerte inhibición del crecimiento de PDXs generados a partir del tumor primario resistente a cetuximab (Bertotti et al., 2015). La amplificación de FGFR1 también se ha identificado en pacientes con

NSCLC *EGFR T790M* con resistencia adquirida a un inhibidor de EGFR de tercera generación (Kim et al., 2015), así como la activación del *loop* autocrino FGFR1-FGF2 en células de cáncer de pulmón resistentes a gefitinib y afatinib, la cual puede ser revertida mediante el tratamiento con inhibidores de FGFR o interfiriendo la expresión del receptor (Hamamoto et al., 2013; Ware et al., 2013; Azuma et al., 2014). Además, en NSCLC, la activación de la vía de FGFR2 y FGFR3 también pueden contribuir a la generación de la resistencia, promoviendo la activación de ERK (Ware et al., 2010). En HNSCC, se ha descrito que la activación de la proteína de fusión FGFR3-TACC3 promueve la proliferación de células de HNSCC resistentes a inhibidores de EGFR y ERBB3 a través de la activación de ERK (Daly et al., 2017)

En conjunto, nuestros resultados demuestran que las células tumorales de los cSCCs con características epiteliales (G2/G3-SCCs) presentan una fuerte inducción de la vía de EGFR, la cual promueve su proliferación y supervivencia. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la terapia anti-EGFR podría ser una buena aproximación terapéutica para aquellos pacientes con cSCC que conservan rasgos de diferenciación epitelial, y que el análisis de marcadores de diferenciación y la expresión de EGFR en los cSCC podría ser clave para seleccionar a los pacientes que podrían tener una mejor respuesta a este tratamiento. Sin embargo, un porcentaje importante de pacientes podría desarrollar resistencia a los inhibidores de EGFR. Según nuestro estudio, esta resistencia estaría dirigida inicialmente por una población de células tolerante/resistente al tratamiento con gefitinib que, tras un largo periodo bajo la presión del tratamiento, podría activar la vía de FGFR para dirigir el crecimiento tumoral y evadir la terapia. Por lo tanto, la terapia combinada con inhibidores de EGFR y de FGFR podría ser una posible estrategia para evadir la resistencia de los G2/G3-SCCs a la terapia contra EGFR.

Sin embargo, no podemos descartar que existan otros mecanismos, que junto con la activación de la vía de FGFR sean responsables de la resistencia. Además, nuestros resultados indican que la frecuencia o incidencia de resistencia podría depender de la presencia de células tolerantes o plásticas con capacidad de inducir vías de señalización alternativas bajo la presión de la terapia. Por lo tanto, sería interesante aislar y caracterizar esta población de células plásticas para identificar marcadores de resistencia, así como para determinar otros procesos que podrían participar en la evasión del bloqueo de EGFR. Una buena aproximación para llevar a cabo este objetivo sería realizar una secuenciación de RNA de célula única a partir de células aisladas de SCC-PDXs sensibles y resistentes al tratamiento con gefitinib, así como de los tumores residuales que quedan después del tratamiento. De esta manera, se podrían identificar los perfiles transcripciones específicos de subpoblaciones de células plásticas y/o resistentes a la terapia anti-EGFR, que podrían estar ya presentes en el tumor antes de la terapia y seleccionarse durante el tratamiento.

Artículo 3: La activación autocrina de la vía de SDF-1, inducida por PDGFR en las células tumorales promueve la metástasis en el carcinoma avanzado de piel

Nuestros estudios previos demostraron que la inducción autocrina de la vía de PDGFR α en las CSCs (L-CSCs) de los PD/S-SCCs de ratón promueve la invasión de estas células y el desarrollo de metástasis. El objetivo principal de este trabajo era determinar a través de qué mecanismos la vía de PDGFR promueve la metástasis en los cSCC avanzados de ratón, así como validar si estos procesos están igualmente regulados en los PD/S-SCCs de pacientes.

Diferentes estudios han demostrado que la vía de señalización SDF1/CXCR4 está estrechamente relacionada con la inducción del programa EMT y el desarrollo de metástasis en muchos tipos de cáncer, como sarcoma, cáncer de mama, páncreas, colon e hígado. (Li et al., 2014; Hu et al., 2014; Kong et al., 2016;). Sin embargo, se desconocía la relevancia de esta vía de señalización en los procesos de invasión y metástasis de los cSCCs.

Nuestros estudios demuestran que la expresión de *Sdf1* está inducida en los PD/S-SCCs murinos en comparación con sus precursores WD-SCCs. Mientras que el SDF-1 es expresado principalmente por las células del estroma tumoral, y concretamente por los fibroblastos en los WD-SCCs, en los PD/S-SCCs es expresado de forma abundante por las células tumorales y por los fibroblastos. En este sentido, se ha descrito que la expresión de SDF-1 en la piel normal humana está restringida a la dermis y que se induce tanto en el componente tumoral como en el estromal en los SCCs (Quan et al., 2015).

Además, observamos que la expresión de los receptores de SDF-1, *Cxcr4* y *Cxcr7* estaba inducida en los PD/S-SCCs respecto a sus precursores WD-SCCs. Sin embargo, el análisis de la población de células tumorales demostró que mientras que una población abundante de células tumorales expresaban CXCR7 en WD- y PD/S-SCCs, la expresión de CXCR4 estaba restringida a una subpoblación de células tumorales en los WD-SCCs ($\alpha6$ -integrin⁺/CXCR4⁺), y ésta se incrementaba en los tumores más avanzados. Cambios similares de expresión de SDF-1 y CXCR4 se observaron en WD-SCC y PD/S-SCCs generados de forma espontánea en ratones K14-HPV16, o generados tras el implante de células WD y PD/S en ratones singénicos inmunocompetentes. En este sentido, se ha descrito que la expresión de CXCR7 se induce en muchos tipos de tumores y que este receptor se expresa en células tumorales, pero también en células del sistema inmune y a las células endoteliales (Miao et al., 2007; J. Wang et al., 2008; Sun et al., 2010). Por lo tanto, el aumento de expresión de *Cxcr7* observado en los tumores PD/S-SCCs podría deberse al mayor número de vasos sanguíneos respecto a los WD-SCCs, como se ha reportado anteriormente (da Silva-Diz et al., 2016), o a otros componentes del estroma tumoral. Además, estos resultados sugieren que la población $\alpha6$ -integrina⁺/CXCR4⁺ se incrementa durante la progresión tumoral, y

que la vía de SDF-1/CXCR4 podría tener un papel relevante en la regulación de la proliferación e invasión de las células tumorales de los cSCC avanzados.

El análisis de los niveles de expresión de SDF-1, CXCR4 y CXCR7 en la población CSC, mostró que las L-CSCs presentan una fuerte expresión de *Sdf1*, mientras que la expresión de esta citoquina es prácticamente indetectable en las E-CSCs. Además, el porcentaje de CSCs que expresan los receptores CXCR4 y/o CXCR7 no resulta alterado entre los WD-SCCs y los PD/S-SCCs. Sin embargo, nuestro grupo de investigación, entre otros, demostró que durante la progresión del cSCC se induce una fuerte expansión de la población CSCs (Schober & Fuchs, 2011; Lapouge et al., 2012; da Silva-Diz et al., 2016), indicando que el número total de CSCs CXCR4⁺ estaba incrementado en los cSCC más agresivos y avanzados. Además esta población podría activar de forma autocrina la vía de señalización SDF-1/CXCR4, tal y como se ha reportado en glioblastoma (Gatti et al., 2013), en cáncer de esófago (Wang et al., 2017) y en cáncer de mama (Kong et al., 2016), la cual podría jugar un papel importante sustentando el crecimiento tumoral y/o regulando la invasión y el desarrollo de metástasis.

En este sentido, la inhibición de la vía mediante el tratamiento con AMD3100, así como la interferencia de SDF-1 o CXCR4, resultó en una reducción significativa de la proliferación de las L-CSCs. En cambio, la interferencia de CXCR7 no afectó de forma clara a la proliferación de las L-CSCs. Además, hemos observado que la interferencia de SDF-1 conduce a una reducción de la expresión de *Cxcr4* y *viceversa*, mientras que la interferencia de CXCR7 provoca una reducción de la expresión de *Cxcr4*. Estas observaciones evidencian que el eje SDF-1/CXCR4/CXCR7 está estrechamente regulado por los niveles de expresión de sus componentes mediante mecanismos todavía desconocidos. En este sentido, en otros tipos de cáncer se ha descrito que SDF-1 y CXCR4 pueden regularse mutuamente (Gatti et al., 2013; Miyanishi et al., 2010) y que CXCR7 podría estar secuestrando y degradando el SDF-1 secretado, sin afectar a su transcripción, afectando negativamente a la expresión de CXCR4. En este sentido, algunos estudios han descrito que CXCR4 y CXCR7 pueden formar heterodímeros cuando sus niveles de expresión son similares. Esta heterodimerización produce cambios conformacionales en CXCR4 que desestabilizan su unión con las proteínas G, provocando el reciclaje de ambos receptores y la internalización del ligando (Levoye et al., 2009; Würth et al., 2014). Como muestran los resultados, los niveles de CXCR7 en las L-CSCs son mucho más elevados que los de CXCR4, por lo que la tendencia de estos receptores sería la formación de homodímeros. Sin embargo, la interferencia de CXCR7 podría equilibrar el balance de expresión de ambos receptores facilitando así la formación de heterodímeros y provocar una regulación negativa del *loop* autocrino SDF-1/CXCR4. Esta hipótesis es compatible con el hecho que la interferencia de CXCR7 provoca una reducción de la proliferación respecto a las células control en las L-CSCs OT7 y no en las L-CSCs OT14. Así,

las L-CSCs OT7 tienen un nivel de expresión más bajo de *Cxcr4* y un porcentaje menor de CXCR4⁺-CSC que las células OT14, de forma que la abrogación de CXCR7 podría llevar a una reducción casi completa de la expresión de *Cxcr4* en las células OT7, lo que a su vez provocaría una disminución significativa de la expresión de *Sdf1*. Por lo tanto, estos datos sugieren que la expresión de CXCR4 está finamente regulada por los niveles de SDF-1 y CXCR7 y, a su vez, que CXCR4 regula la expresión del ligando.

Además, el tratamiento con un inhibidor de CXCR4, así como la interferencia de SDF-1, disminuyó significativamente la capacidad invasiva de las L-CSCs. Del mismo modo, la activación de la vía de SDF-1/CXCR4 se ha demostrado que regula la capacidad de invasión de las CSCs en otro tipos de cánceres como el cáncer esofágico y nasofaríngeo (Yuan et al., 2017; Wang et al., 2017).

Todos estos resultados demuestran que la activación autocrina de la señalización mediada por SDF-1 promueve la proliferación/supervivencia y la invasión de las L-CSCs *in vitro*, que en consecuencia podría favorecer el crecimiento tumoral y la metástasis de los PD/S-SCCs.

La interferencia de CXCR4 en las L-CSCs disminuyó significativamente el crecimiento de los PD/S-SCCs, cuando estas eran implantadas en ratones inmunodeficientes. Sin embargo, ni la abrogación de CXCR4 en las L-CSCs, ni el tratamiento con AMD3100 afectó al crecimiento de los PD/S-SCCs en un contexto inmunocompetente, sugiriendo que el impacto de la inhibición de CXCR4 en el crecimiento tumoral puede depender del infiltrado inmune o del microambiente tumoral. Estos resultados sugieren que la inhibición de CXCR4 en combinación con inmunoterapia podría ofrecer grandes beneficios en el bloqueo del crecimiento agresivo de los PD/S-SCCs. En este sentido, un grupo de investigación demostró en modelos ortotópicos de carcinoma hepático (HCC) que el tratamiento con sorafenib, el único fármaco aprobado para el tratamiento de los HCC avanzados, provocaba un aumento de la hipoxia. Este ambiente hipoxico inducía un estado de inmunosupresión caracterizado por un aumento de la expresión del ligando 1 de muerte programada (PD-L1) en las células tumorales y la acumulación de células T reguladoras y macrófagos de tipo M2, así como una inducción de SDF1 derivado de las células del estroma. En este contexto, la terapia con sorafenib combinada con anticuerpos anti-PD1 y la inhibición de CXCR4 consiguió reducir el crecimiento tumoral, la metástasis pulmonar y mejorar la supervivencia de los ratones (Chen et al., 2015).

Aunque la interferencia de SDF-1 afectaba significativamente a la proliferación de las L-CSCs, el crecimiento tumoral no se vio afectado cuando estas células eran implantadas en ratones inmunodeficientes. Esta discrepancia entre la reducción de la proliferación *in vitro* y la no afectación del crecimiento tumoral *in vivo* podría tener varias explicaciones. Nuestros resultados

demuestran que los fibroblastos del estroma tumoral secretan SDF-1 de forma abundante. Así, la proliferación de las L-CSCs con SDF-1 interferido, y por tanto el crecimiento de los PD/S-SCCs podría estar soportado por el SDF-1 derivado del estroma que actuaría de forma paracrina sobre las L-CSCs. Alternativamente, otras citoquinas y/u otros factores de crecimiento secretados por las células tumorales o estromales podrían activar otras vías de señalización promoviendo el crecimiento de los PD/S-SCCs cuando la vía de SDF-1/CXCR4 está inhibida.

En consonancia con los efectos de la inhibición de SDF-1/CXCR4 en la invasión de las L-CSCs *in vitro*, la interferencia de la expresión de SDF-1 y de CXCR4, o el tratamiento con AMD3100 provocaron un bloqueo significativo del desarrollo de metástasis en el pulmón, independientemente del estado inmunitario de los ratones. Estos resultados demuestran que la activación autocrina de la señalización SDF-1/CXCR4 induce la invasión de las L-CSCs y promueve la metástasis de los PD/S-SCCs en órganos distales. Así, algunos investigadores han demostrado que la activación autocrina de la vía de SDF-1 juega un papel clave en el desarrollo de metástasis distales en algunos tipos de cáncer agresivos. En SCC oral, el sistema paracrina SDF-1/CXCR4 potencia la metástasis a los ganglios linfáticos, mientras que la metástasis a órganos distantes requiere de la inducción autocrina de la vía SDF-1/CXCR4 (Uchida et al., 2007).

SDF-1 es producido por las células estromales de órganos donde comúnmente se producen las metástasis, incluidos los pulmones, ganglios linfáticos, médula ósea e hígado, así como en células tumorales circulantes (Müller et al., 2001; Phillips et al., 2003). En este sentido, se ha demostrado que las células tumorales que expresan CXCR4 se dirigen y anclan en órganos donde el ligando se produce abundantemente, siguiendo un gradiente quimiotáctico (Kucia et al., 2004; Gros et al., 2012; O'Boyle et al., 2013). Sin embargo, nuestros resultados indican que la actividad autocrina sería necesaria para promover el desarrollo de metástasis a órganos distantes. La activación autocrina de esta vía podría promover la supervivencia de las células tumorales durante el proceso de diseminación en el torrente sanguíneo, y/o su proliferación en los tejidos pre-metastásicos, procesos que favorecerían la colonización de las L-CSCs y la generación de lesiones metastásicas en los órganos distales.

Dado que la activación de la vía de PDGFR α promueve la invasión de las L-CSCs y la metástasis de los PD/S-SCCs, nuestros resultados sugerían que esta vía y la de SDF-1/CXCR4 podrían estar cooperando para regular estos procesos en los cSCCs avanzados. En este sentido, nosotros hemos demostrado que la señalización de PDGFR α induce la expresión de SDF-1 y, a su vez SDF-1 regula la expresión de PDGFR α . Además, la sobre-expresión de SDF-1 consiguió restaurar la capacidad de invasión de las L-CSCs inhibida por el tratamiento con imatinib, lo cual demuestra que la invasión de las L-CSCs inducida por PDGFR α está mediada por la vía de señalización de

SDF-1/CXCR4, promoviendo ambas vías el desarrollo de metástasis en los PD/S-SCCs. En este sentido, la activación de PDGFR en células tumorales de meduloblastoma condujo a la estabilización y fosforilación de CXCR4, lo cual inducía la activación de la vía de SDF-1/CXCR4 y la migración de estas células (Sciaccaluga et al., 2013; Yuan et al., 2013). Por otra parte, la sobreexpresión de PDGF-DD en un modelo de cáncer de mama condujo a un aumento del crecimiento tumoral y la metástasis linfática a través de la activación de PDGFR β y un aumento de la expresión de CXCR4. El bloqueo de la señalización de CXCR4 consiguió revertir la metástasis inducida por la sobre-expresión de PDGF-DD (Liu et al., 2011), demostrando que ambas vías de señalización están funcionalmente cooperando regulado el desarrollo de metástasis.

Es importante destacar que la interferencia de SDF-1 conduce a una reducción significativa de la proliferación de las L-CSCs, además de reducir la expresión de PDGFR α . Sin embargo, en el artículo 1 presentado en esta tesis se demostró que el bloqueo farmacológico o la interferencia de PDGFR α no tiene ningún efecto sobre la proliferación de las L-CSCs ni el crecimiento tumoral de los PD/S-SCCs (da Silva-Diz et al., 2016). Estos resultados sugieren que la vía de SDF-1/CXCR4 podría controlar la proliferación de forma independiente a PDGFR α mientras que su papel regulando la invasión y la metástasis podría depender de la activación de PDGFR α . Así, PDGFR α podría tener un papel importante regulando la vía de SDF-1/CXCR4 durante la invasión y diseminación de aquellas células que co-expresan PDGFR α y CXCR4.

De forma similar a lo descrito en ratón, los PD/S-SCCs de pacientes (G3/G4-SCCs) presentaban una fuerte inducción de la expresión de *PDGFRA/B*, así como de SDF-1 y CXCR4, comparado con los WD/MD-SCCs. Además, observamos una fuerte correlación entre la expresión de *SDF1* y *PDGFRA* y *PDGFRB*, sugiriendo que el *crossstalk* funcional entre las vías de señalización de SDF-1 y PDGFR también podría ocurrir en las células tumorales de los cSCC más avanzados y agresivos de pacientes. Nuestros resultados demuestran que la expresión de SDF-1 en los WD/MD-SCCs está limitada al estroma tumoral mientras que en los PD/S-SCCs se expresa tanto en las células estromales como en las células tumorales. La caracterización de la expresión de estos receptores y factores en células tumorales derivadas de WD/MD- y PD/S-SCCs desmotró que las células PD/S presentan una fuerte inducción de la expresión de *SDF1*, *PDGFRA*, *PDGFRB* y *CXCR4* comparado con las células WD/MD. En contraposición a lo observado en ratón, las células PD/S pierden la expresión de CXCR7, sugiriendo que los niveles de expresión de CXCR7 observados en los PD/S-SCCs podrían estar asociados a células inmunes y/o células endoteliales (Burns et al., 2006). Además, la activación autocrina de SDF-1/CXCR4 inducía la proliferación *in vitro* de las células PD/S, pero la inhibición de esta vía no afectó al crecimiento de los PD/S-SCCs. A pesar de que la inhibición de la vía de PDGFR provoca una fuerte reducción de la expresión de SDF-1, y *viceversa*, la vía de PDGFR no parece estar implicada en la regulación

de la proliferación *in vitro* ni del crecimiento de los PD/S-SCCs de pacientes. Así mismo, el tratamiento con AMD3100 y la interferencia de CXCR4 no afectó el crecimiento de los PD/S-SCCs. Podríamos pensar que una posible falta de reacción cruzada entre el SDF-1 murino secretado por los fibroblastos del estroma y CXCR4 de las células tumorales humanas podría evitar la activación de esta vía. Sin embargo, las proteínas SDF-1 y CXCR4 humanas y de ratón presentan un porcentaje de homología del 92 y el 98%, respectivamente (Shirozu et al., 1995; Döring et al., 2014), con lo cual el SDF-1 secretado por el estroma murino podría estimular de forma paracrina las células tumorales CXCR4⁺ de los PD/S-SCCs deficientes en SDF-1, para promover el crecimiento tumoral. Por lo tanto, de forma similar a lo propuesto en los PD/S-SCCs de ratón, el crecimiento tumoral podría estar regulado por otras citoquinas y/o factores de crecimiento que activan vías de señalización alterativas cuando la vía de SDF-1/CXCR4 está bloqueada.

Finalmente, los resultados han demostrado que de forma similar a lo descrito en ratón, la inhibición de las vías de PDGFR y SDF-1 reduce de forma significativa la capacidad de invasión de las células aisladas de los PD/S-SCCs, y bloquea el desarrollo de metástasis a pulmón. En este punto, es importante destacar que existe una pequeña diferencia entre la regulación de la invasión y la metástasis en las células de PD/S-SCCs de ratón y de pacientes. Mientras que estos procesos están controlados por el receptor PDGFR α en ratón, ya que las L-CSCs expresan niveles muy bajos de PDGFR β (da Silva-Diz et al., 2016), las células PD/S humanas expresan altos niveles de PDGFR α y PDGFR β . Por lo tanto, no podemos descartar que uno de los dos receptores, o la cooperación de ambos pudiera estar regulando la invasión y la metástasis en los PD/S-SCCs humanos.

En conjunto todos estos resultados indican que la inhibición de las vía de PDGFR y SDF-1/CXCR4 con fármacos disponibles en clínica, como el imatinib y el AMD3100, podrían bloquear la metástasis asociada a cSCCs más avanzados y agresivos, mejorando así la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes.

CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados de esta tesis doctoral podemos concluir:

1. El análisis de muestras de cSCCs de pacientes demuestra que los tumores avanzados y recurrentes presentan una inducción del programa de EMT y un aumento de la población de células tumorales con características CSC. Además, estos tumores presentan un aumento de la expresión de *FGFR1*, *FGF2*, *PDGFRA*, *PDGFRB* y *PDGFC* y reprimen la expresión de receptores de la familia de EGFR y sus ligandos, comparado con los WD/MD-SCCs. Estos resultados validan los resultados previamente descritos en WD-SCCs y PD/S-SCCs de piel de ratón.
2. Los *patient-derived xenografts* (PDXs) generados a partir de cSCCs de pacientes recapitulan las características histopatológicas y moleculares de sus respectivos cSCCs primarios. Así, los PDXs generados de MD/PD-SCCs (G2/G3) conservan características de diferenciación epitelial, como la expresión de E-Caderina y EpCAM, y presentan una elevada expresión de los receptores de la familia de EGFR y de sus ligandos. Los PDXs generados a partir de PD/S-SCCs (G4) pierden la expresión de marcadores epiteliales, inducen la expresión de marcadores mesenquimales y el programa EMT y están enriquecidos en CSCs. Además, estos tumores avanzados inducen la expresión de *FGFR1*, *PDGFRA* y *PDGFRB*.
3. La activación autocrina de la vía de EGFR induce la proliferación de las células tumorales y el crecimiento de los cSCC-PDXs epiteliales. Aunque esta vía puede ser estimulada en las células tumorales de los cSCC-PDXs mesenquimales, su inhibición no afecta la proliferación de estas células.
4. La inhibición de la vía de EGFR mediante gefitinib inhibe el crecimiento de los cSCC-PDXs de tipo epitelial que no presentan mutaciones en los genes de *EGFR* y *RAS*, causando incluso la regresión de estos tumores. Nuestros resultados sugieren que la terapia anti-EGFR podría ser una estrategia apropiada para el tratamiento de pacientes con este tipo de tumores.
5. La interrupción del tratamiento con gefitinib provoca la recidiva del 100% de los tumores epiteliales que inicialmente mostraban una buena respuesta al inhibidor. La administración continuada de gefitinib demuestra que el 70% de los cSCC10 recidivos desarrollan resistencia al gefitinib, mientras que la incidencia de tumores resistentes es del 20% en los cSCC16 y cSCC24. Una subpoblación de células tumorales que resiste/tolera un primer ciclo de tratamiento, y cuya frecuencia puede ser diferente en cada cSCCs, puede acabar generando tumores resistentes a la terapia.

6. Las células resistentes a gefitinib no presentan mutaciones en *EGFR* u otros genes previamente relacionados con resistencia a terapias anti-EGFR en otros tipos tumorales. Aunque se han identificado mutaciones específicas en cada uno de los cSCC-PDXs resistentes, no se han encontrado alteraciones génicas comunes en los tres tumores analizados.
7. Las células tumorales de los cSCC10 y cSCC16 resistentes a gefitinib inducen la expresión de diferentes isoformas de FGFR o de FGF2. De forma similar, la expresión de los FGFRs se induce en las células tumorales SCC10, SCC16 y SCC24 que adquieren resistencia a gefitinib, tras un tratamiento prolongado con el inhibidor *in vitro*. La inhibición farmacológica o genética de FGFR bloquea el crecimiento de los cSCC-PDXs resistentes al inhibidor de EGFR. Estos resultados indican que la activación de la vía de FGFR promueve la proliferación de las células tumorales bajo la inhibición de la vía de EGFR, conduciendo a la adquisición de resistencia, y sugieren que la terapia combinada con inhibidores de EGFR y FGFR puede ser efectiva para el tratamiento de cSCCs resistentes a terapias dirigidas contra EGFR.
8. La activación autocrina de la vía de SDF-1/CXCR4 estimula *in vitro* la proliferación y la invasión de las CSCs (L-CSCs) de PD/S-SCCs de ratón. Sin embargo, la inhibición de esta vía no inhibe el crecimiento de los PD/S-SCCs, pero bloquea significativamente el desarrollo de metástasis en pulmón. Por lo tanto, la activación autocrina de la vía de SDF-1/CXCR4 en las L-CSCs promueve la metástasis de los PD/S-SCCs.
9. La activación de la vía de PDGFR α induce la expresión de SDF-1 y la activación autocrina de la vía de CXCR4. Nuestros resultados demuestran que ambas vías cooperan funcionalmente para inducir la invasión de las L-CSCs y promover el desarrollo de metástasis en los PD/S-SCCs de ratón.
10. La señalización mediada por PDGFR promueve la invasión de células tumorales y la metástasis en cSCC avanzados de pacientes, que de forma similar a lo descrito en ratón están mediados por la activación autocrina de la vía SDF-1/CXCR4 en las células tumorales. Así, la inhibición de vía PDGFR y/o SDF-1/CXCR4 mediante imatinib o AMD3100 podría ser una buena estrategia para bloquear el desarrollo de metástasis en pacientes con cSCCs avanzados y recurrentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, V. D., Gangula, R. D., Freeman, K. W., Li, R., Zhang, Y., Wang, F. Spencer, D. M. (2007). Inducible FGFR-1 Activation Leads to Irreversible Prostate Adenocarcinoma and an Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Cell*, 12(6), 559–571.
- Acevedo, V. D., Ittmann, M., & Spencer, D. M. (2009). Paths of FGFR-driven tumorigenesis. *Cell Cycle*, 8(4), 580–588.
- Akiyama, M., Smith, L. T., & Holbrook, K. A. (1996). Growth factor and growth factor receptor localization in the hair follicle bulge and associated tissue in human fetus. *Journal of Investigative Dermatology*, 106(3), 391–396.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Sean J. Morrison, A., & Clarke, M. F. (2003). Hoon Ryu, Junghee Lee, Beatrix A. Olofsson, Aziza Mwidau, Alpaslan Dedeoglu, Maria Escudero, Erik Flemington, Jane Azizkhan-Clifford, Robert J. Ferrante, and Rajiv R. Ratan, 100(11).
- Alam, M., & Désirée, R. (2001). Cutaneous squamous cell carcinoma, 344(13), 865–875.
- Albanese, C., Hulita, J., Sakamaki, T., & Pestell, R. G. (2002). Recent advances in inducible expression in transgenic mice. *Cell & Developmental Biology*, 13(02), 129–141. <https://doi.org/10.1016/S1084>
- Alisi, A., Cho, W. C., Locatelli, F., & Fruci, D. (2013). Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 24706–24725.
- Amado, R. G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D. J. Chang, D. D. (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(10), 1626–1634.
- Anderberg, C., Li, H., Fredriksson, L., Andrae, J., Li, X., Eriksson, U., & Pietras, K. (2010). Paracrine signaling by Platelet Derived Growth Factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts Charlotte. *Cancer*, 69(1), 369–378.
- Arai, H., Ueno, T., Tangoku, A., Yoshino, S., Abe, T., Kawauchi, S. Sasaki, K. (2003). Detection of amplified oncogenes by genome DNA microarrays in human primary esophageal squamous cell carcinoma: Comparison with conventional comparative genomic hybridization analysis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 146(1), 16–21.
- Arcila, M. E., Nafa, K., Chaft, J. E., Rekhtman, N., Lau, C., Reva, B. A. Ladanyi, M. (2013). EGFR Exon 20 Insertion Mutations in Lung Adenocarcinomas: Prevalence, Molecular Heterogeneity, and Clinicopathologic Characteristics. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(2), 220–229.
- Arcila, Maria E., Oxnard, G. R., Ladanyi, M., Miller, V. A., Azzoli, C. G., Pao, W., & Robson, M. E. (2012). Screening for Germline EGFR T790M Mutations Through Lung Cancer Genotyping. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(6), 1049–1052.
- Arielle, A. N., Arpey, C. J., Hruza, G., Olbricht, S. M., & Bennett, R. (2015). Consensus for Nonmelanoma Skin Cancer Treatment, Part II: Squamous Cell Carcinoma, Including a Cost Analysis of Treatment Methods. *Dermatologic Surgery*, 41(11), 1214–1240.
- Arteaga, C. L., & Engelman, J. a. (2014). ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 25(3), 282–303.
- Ashford, B. G., Clark, J., Gupta, R., Iyer, N. G., Yu, B., & Ranson, M. (2017). Reviewing the genetic alterations in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: A search for prognostic markers and therapeutic targets. *Head and Neck*, 39(7), 1462–1469.
- Auffinger, B., Tobias, A. L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Ahmed, A. U. (2014). Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death and Differentiation*, 21(7), 1119–1131.
- Azuma, K., Kawahara, A., Sonoda, K., Nakashima, K., Tashiro, K., Watari, K., Hoshino, T. (2014). FGFR1 activation is an escape mechanism in human lung cancer cells resistant to afatinib, a pan-EGFR family kinase inhibitor. *Oncotarget*, 5(15).
- Baab, K. T., Zhang, R., Loughran, T. P., Ryland, L. K., Liu, X., Irby, R., Jarbaban, N. R. (2009). Platelet-derived growth factor mediates survival of leukemic large granular lymphocytes via an autocrine regulatory pathway. *Blood*, 115(1), 51–60.
- Babina, I. S., & Turner, N. C. (2017). Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(5), 318–332.

- Bagnyukova, T. V., Serebriiskii, I. G., Zhou, Y., Hopper-Borge, E. A., Golemis, E. A., & Astsaturov, I. (2010). Chemotherapy and signaling. *Cancer Biology & Therapy*, *10*(9), 839–853.
- Balak, M. N., Gong, Y., Riely, G. J., Somwar, R., Li, A. R., Zakowski, M. F., Pao, W. (2006). Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clinical Cancer Research*, *12*(21), 6494–6501.
- Balmain, A., Ramsden, M., Bowden, G. T., & Smith, J. (1984). Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*, *307*(5952), 658–660.
- Barker, A. J., Gibson, K. H., Grundy, W., Godfrey, A. A., Barlow, J. J., Healy, M. P., Richards, L. (2001). Studies leading to the identification of ZD1839 (IressaTM): An orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *11*(14), 1911–1914.
- Bartholomeusz, C., Hortobagyi, G. N., Doihara, H., Masuda, H., Ueno, N. T., & Zhang, D. (2012). Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *136*(2), 331–345.
- Basile, J., Thiers, B., Maize, J., & Lathers, D. M. R. (2008). Chemokine receptor expression in non-melanoma skin cancer. *Journal of Cutaneous Pathology*, *35*(7), 623–629.
- Baumeister, S. H., Freeman, G. J., Dranoff, G., & Sharpe, A. H. (2016). Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annual Review of Immunology*, *34*(1), 539–573. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112049>
- Bean, J., Riely, G. J., Balak, M., Marks, J. L., Ladanyi, M., Miller, V. A., & Pao, W. (2008). Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, *14*(22), 7519–7525.
- Beck, B., Haigh, J. J., Dekoninck, S., Blanpain, C., Candi, A., Sotiropoulou, P. A., Lapouge, G. (2011). A vascular niche and a VEGF–Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature*, *478*(7369), 399–403.
- Beck, B., Lapouge, G., Rorive, S., Drogat, B., Desaedelaere, K., Delafaille, S., Blanpain, C. (2015). Different levels of Twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression. *Cell Stem Cell*, *16*(1), 67–79.
- Becker, D., & Wang, Y. (1997). Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth, *J*, 887–893.
- Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J., & Siu, L. L. (2013). Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*, *501*(7467), 355–364.
- Beer, H. D., Gassmann, M. G., Munz, B., Steiling, H., Engelhardt, F., Bleuel, K., & Werner, S. (2000). Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, *5*(1), 34–39.
- Beerling, E., Vrisekoop, N., van Rheezen, J., van Oudenaarden, A., Kester, L., Voest, E., van der Velden, D. (2016). Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell Reports*, *14*(10), 2281–2288.
- Berg, D., & Otley, C. C. (2002). Skin cancer in organ transplant recipients: Epidemiology, pathogenesis, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *47*(1), 1–20.
- Bernard-Pierrot, I., Brams, A., Dunois-Lardé, C., Caillault, A., Diez de Medina, S. G., Cappellen, D., Radvanyi, F. (2006). Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis*, *27*(4), 740–747.
- Bertolini, G., Pratesi, G., Roz, L., Mariani, L., Fontanella, E., Calabro, E., Sozzi, G. (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(38), 16281–16286.
- Bertotti, A., Lantto, J., Li, Q. K., Cassingena, A., Trusolino, L., Sassi, F., Sausen, M. (2015). The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nature*, *526*(7572), 263–267.

- Bertotti, A., Migliardi, G., Galimi, F., Sassi, F., Torti, D., Isella, C., Trusolino, L. (2011). A molecularly annotated platform of patient- derived xenografts (“xenopatients”) identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discovery*, 1(6), 508–523.
- Bertran, E., Crosas-Molist, E., Sancho, P., Caja, L., Lopez-Luque, J., Navarro, E., Fabregat, I. (2013). Overactivation of the TGF- β pathway confers a mesenchymal-like phenotype and CXCR4-dependent migratory properties to liver tumor cells. *Hepatology*, 58(6), 2032–2044.
- Betsholtz, C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(4), 215–228.
- Bhowmick, N. a, Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Group*, 432(November), 332–337.
- Biddle, A., Liang, X., Gammon, L., Fazil, B., Harper, L. J., Emich, H., Mackenzie, I. C. (2011). Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Research*, 71(15), 5317–5326.
- Blencke, S., Zech, B., & Engkvist, O. (2001). Characterization of a Conserved Structural Determinant Controlling Protein Kinase Sensitivity to Selective Inhibitors, 11, 265–316.
- Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Hartmann, J. T., de Braud, F., Schuch, G., Zubel, A., Koralewski, P. (2011). Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The OPUS study. *Annals of Oncology*, 22(7), 1535–1546.
- Bonnomet, A., Gilles, C., Foidart, J.-M., Thompson, E. W., Syne, L., Polette, M., Noël, A. (2011). A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene*, 31(33), 3741–3753.
- Boström, H., Willetts, K., Pekny, M., Levéen, P., Lindahl, P., Hedstrand, H., Betsholtz, C. (1996). PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*, 85(6), 863–873.
- Boumahdi, S., Marmol, V. del, Lenglez, S., Nassar, D., Le Mercier, M., Fuks, F., Delatte, B. (2014). SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature*, 511(7508), 246–250.
- Brantsch, K. D., Breuninger, H., Meisner, C., Wehner-Caroli, J., Röcken, M., Schönfisch, B., & Trilling, B. (2008). Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *The Lancet Oncology*, 9(8), 713–720.
- Bremner, R., & Balmain, A. (1990). Genetic changes in skin tumor progression: Correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell*, 61(3), 407–417.
- Brennan, C., Momota, H., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Tandon, A., Pedraza, A., & Holland, E. (2009). Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS ONE*, 4(11).
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S. R., TCGA Research Network. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155(2), 462–477.
- Brewster, A. M., Lee, J. J., Clayman, G. L., Clifford, J. L., Jo, M., Reyes, T. N., Lippman, S. M. (2007). Randomized Trial of Adjuvant 13- cis -Retinoic Acid and Interferon Alfa for Patients With Aggressive Skin Squamous Cell Carcinoma, 25(15), 1974–1978.
- Brinkman, J. N., Hajder, E., Van Der Holt, B., Den Bakker, M. A., Hovius, S. E. R., & Mureau, M. A. M. (2015). The effect of differentiation grade of cutaneous squamous cell carcinoma on excision margins, local recurrence, metastasis, and patient survival: A retrospective follow-up study. *Annals of Plastic Surgery*, 75(3), 323–326.
- Brown, W. S., Tan, L., Smith, A., Gray, N. S., & Wendt, M. K. (2016). Covalent Targeting of Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibits Metastatic Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(9), 2096–2106.
- Buchmann, A., Ruggeri, B., Klein-Szanto, A. J. P., & Balmain, A. (1991). Progression of Squamous Carcinoma Cells to Spindle Carcinomas of Mouse Skin Is Associated with an Imbalance of H-ras Alleles on Chromosome 7. *Cancer Research*, 51(15), 4097–4101.
- Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P. J., Leahy, D. J., Yokoyama, S.

- (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular Cell*, 12(3), 541–552.
- Burns, J. M., McMaster, B. E., Miao, Z., Wang, Y., Schall, T. J., Penfold, M. E. T., Berahovich, R. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(9), 2201–2213.
- Byeon, H. K., Ku, M., & Yang, J. (2019). Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(1), 8.
- Cabrera, M. C., Hollingsworth, R. E., & Marina, E. M. H. (2015). Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World Journal of Stem Cells*, 7(1), 27.
- Cañueto, J., Cardeñoso, E., García, J. L., Santos-Briz, Castellanos-Martín, A., Fernández-López, E., Román-Curto, C. (2017). Epidermal growth factor receptor expression is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 176(5), 1279–1287.
- Cao, Y. (2013a). Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell Metabolism*, 18(4), 478–489.
- Cao, Y. (2013b). Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends in Molecular Medicine*, 19(8), 460–473.
- Celià-terrassa, T., Meca-cortés, Ó., Mateo, F., Paz, A. M. De, Rubio, N., Arnal-estapé, A., Kang, Y. (2012). Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *Cell*, 152(5), 1035–1047.
- Chandarlapaty, S., Sawai, A., Scaltriti, M., Rodrik-Outmezguine, V., Grbovic-Huezo, O., Serra, V., Rosen, N. (2011). AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell*, 19(1), 58–71.
- Chell, V., Balmanno, K., Little, A. S., Wilson, M., Andrews, S., Blockley, L., Cook, S. J. (2013). Tumour cell responses to new fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and identification of a gatekeeper mutation in FGFR3 as a mechanism of acquired resistance. *Oncogene*, 32(25), 3059–3070.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T. S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., & Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488(7412), 522–526.
- Chen, Yitian, Chen, L., Tao, L., Song, H., & Huang, G. (2017). Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. *Oncology Letters*, 14(3), 2611–2620.
- Chen, Yunching, & Ramjiawan, R. R. (2015). CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti- PD-1 immunotherapy in sorafenib-treated HCC in mice. *Hepatology*, 61(5), 1591–1602.
- Cheng, J. W., Sadeghi, Z., Levine, A. D., Penn, M. S., von Recum, H. A., Caplan, A. I., & Hijaz, A. (2014). The role of CXCL12 and CCL7 chemokines in immune regulation, embryonic development, and tissue regeneration. *Cytokine*, 69(2), 277–283.
- Cheng, J., Ye, H., Liu, Z., Xu, C., Zhang, Z., Liu, Y., & Sun, Y. (2013). Platelet-derived growth factor-BB accelerates prostate cancer growth by promoting the proliferation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(7), 1510–1518.
- Cherpelis, B. S., Marcusen, C., & Lang, P. G. (2002). Prognostic Factors for Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Skin, 268–273.
- Chong, C. R., & Jänne, P. A. (2013). The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nature Medicine*, 19(11), 1389–1400.
- Cirri, P., & Chiarugi, P. (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: A diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1–2), 195–208.
- Citri, A., & Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: Towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), 505–516.
- Clay, M. R., Tabor, M., Owen, J. H., Carey, T. E., Bradford, C. R., Wolf, G. T., Prince, M. E. (2010). Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head and Neck*, 32(9), 1195–1201.
- Clayman, G. L., Lee, J. J., Holsinger, F. C., Zhou, X., Duvic, M., El-Naggar, A. K., Lippman, S. M. (2005). Mortality risk from squamous cell skin cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(4), 759–765.

- Costa, C., Santos, M., Martínez-Fernández, M., Dueñas, M., Lorz, C., García-Escudero, R., & Paramio, J. M. (2013). E2F1 loss induces spontaneous tumour development in Rb-deficient epidermis. *Oncogene*, *32*(24), 2937–2951.
- Costa, Carlota, Molina, M. A., Drozdowskyj, A., Gimeñez-Capitán, A., Bertran-Alamillo, J., Karachaliou, N., Rosell, R. (2014). The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-Mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. *Clinical Cancer Research*, *20*(7), 2001–2010.
- Craene, B. De, & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer*, *13*(2), 97–110.
- Cranmer, L. D., Endgelhart, C., & Morgan, S. S. (2010). Treatment of Unresectable and Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma, 1320–1328.
- Creighton, C. J., Li, X., Landis, M., Dixon, J. M., Neumeister, V. M., Sjolund, A., Chang, J. C. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(33), 13820–13825.
- Cuevas, P., Carceller, F., Angulo, J., González-Corrochano, R., Cuevas-Bourdier, A., & Giménez-Gallego, G. (2011). Antiglioma effects of a new, low molecular mass, inhibitor of fibroblast growth factor. *Neuroscience Letters*, *491*(1), 1–7.
- da Silva-Diz, V., Sidelnikova, D. P., Rodolosse, A., Gonzalez-Suarez, E., Urpi, M., Pujana, M. A., Esteller, M. (2016). Cancer Stem-like Cells Act via Distinct Signaling Pathways in Promoting Late Stages of Malignant Progression. *Cancer Research*, *76*(5), 1245–1259.
- da Silva-Diz, V., Solé-Sánchez, S., Viñals, F., Paramio, J. M., Riba-Artés, D., Muñoz, P., Penin, R. M. (2012). Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis. *Oncogene*, *32*(32), 3732–3743.
- da Silva-Diz, Victoria, Lorenzo-Sanz, L., Bernat-Peguera, A., Lopez-Cerda, M., & Muñoz, P. (2018). Cancer cell plasticity: Impact on tumor progression and therapy response. *Seminars in Cancer Biology*, *53*(August), 48–58.
- Dalerba, P., Clarke, M. F., Simeone, D. M., Dylla, S. J., Parmiani, G., Park, I.-K., Liu, R. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(24), 10158–10163.
- Daly, C., Castanaro, C., Zhang, W., Zhang, Q., Wei, Y., Ni, M., Thurston, G. (2017). FGFR3-TACC3 fusion proteins act as naturally occurring drivers of tumor resistance by functionally substituting for EGFR/ERK signaling. *Oncogene*, *36*(4), 471–481.
- Darash-Yahana, M., Karplus, R., Zeira, E., Galun, E., Pikarsky, E., Peled, A., Beider, K. (2004). Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *The FASEB Journal*, *18*(11), 1240–1242.
- De Thé, H. (2018). Differentiation therapy revisited. *Nature Reviews Cancer*, *18*(2), 117–127.
- De Vries, E., Trakatelli, M., Kalabalikis, D., Ferrandiz, L., Ruiz-De-Casas, A., Moreno-Ramirez, D., Proby, C. (2012). Known and potential new risk factors for skin cancer in European populations: A multicentre case-control study. *British Journal of Dermatology*, *167*, 1–13.
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., Bardelli, A. (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(35), 5705–5712.
- Didona, D., Paolino, G., Bottoni, U., & Cantisani, C. (2018). Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. *Biomedicines*, *6*(1), 6.
- Ding, H., Tsoi, B., Hart, T. C., Field, L. L., Nagy, A., Wong, N., Marazita, M. L. (2004). A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR- α signaling. *Nature Genetics*, *36*(10), 1111–1116.
- Döring, Y., Pawig, L., Weber, C., & Noels, H. (2014). The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Frontiers in Physiology*, *5* JUN(June), 1–23.
- Dougan, M., Dranoff, G., & Dougan, S. K. (2018). Cancer Immunotherapy: Beyond Checkpoint Blockade. *Annual Review of Cancer Biology*, *3*(1), 55–75.
- Douillard, J.-Y., Oliner, K. S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Patterson, S. D. (2013).

- Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer . *New England Journal of Medicine*, 369(11), 1023–1034.
- Driessens, G., Beck, B., Caauwe, A., Simons, B. D., & Blanpain, C. (2012). Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature*, 488(7412), 527–530.
- Du, Z., & Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*, 17(1), 1–13.
- Dutt, A., Salvesen, H. B., Chen, T.-H., Ramos, A. H., Onofrio, R. C., Hatton, C., Greulich, H. (2008). Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8713–8717.
- Ehtesham, M., Mapara, K. Y., Stevenson, C. B., & Thompson, R. C. (2009). CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Letters*, 274(2), 305–312.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death and Differentiation*, 15(3), 504–514.
- Eun, K., Ham, S. W., & Kim, H. (2017). Cancer stem cell heterogeneity: Origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Reports*, 50(3), 117–125. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.3.222>
- Fischbach, A., Rogler, A., Erber, R., Stoehr, R., Poulsom, R., Heidenreich, A., Gaisa, N. T. (2015). Fibroblast growth factor receptor (FGFR) gene amplifications are rare events in bladder cancer. *Histopathology*, 66(5), 639–649.
- Fischer, K. R., Sheng, J., Altorki, N. K., Schwabe, R. F., Li, F., Mittal, V., Gao, D. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527(7579), 472–476.
- Florin, L., Maas-Szabowski, N., Werner, S., Szabowski, A., & Angel1, P. (2005). Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 118(9), 1981–1989.
- Folkins, C., R., C., Hoffman, R. M., Tang, T., Kerbel, R. S., Zhu, Z., Man, S. (2009). Glioma Tumor Stem-Like Cells Promote Tumor Angiogenesis and Vasculogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor and Stromal-Derived Factor 1. *Cancer Research*, 69(18), 7243–7251.
- Franco, R., Botti, G., Nicoletti, G., Zito Marino, F., Lombardi, A., Di Domenico, M., & Caraglia, M. (2012). Current treatment of cutaneous squamous cancer and molecular strategies for its sensitization to new target-based drugs. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(1), 51–66.
- Freier, K., Schwaenen, C., Sticht, C., Flechtenmacher, C., Mühling, J., Hofele, C., Joos, S. (2007). Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Oral Oncology*, 43(1), 60–66.
- Ganzfried, B. F., Riester, M., Haibe-Kains, B., Risch, T., Tyekucheva, S., Jazic, I., Waldron, L. (2013). curatedOvarianData: Clinically annotated data for the ovarian cancer transcriptome. *Database*, 2013, 1–10.
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, O., Schultz, N. (2014). Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal Jianjiong, 6(269), 1–34.
- Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(21), 2018–2028.
- Gatti, M., Pattarozzi, A., Bajetto, A., Würth, R., Daga, A., Fiaschi, P., Barbieri, F. (2013). Inhibition of CXCL12/CXCR4 autocrine/paracrine loop reduces viability of human glioblastoma stem-like cells affecting self-renewal activity. *Toxicology*, 314(2–3), 209–220.
- Gauglhofer, C., Paur, J., Schrottmaier, W. C., Wingelhofer, B., Huber, D., Naegelen, I., Grasl-Kraupp, B. (2014). Fibroblast growth factor receptor 4: A putative key driver for the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 35(10), 2331–2338.
- Ge, Y., Gomez, N. C., Adam, R. C., Nikolova, M., Yang, H., Verma, A., Fuchs, E. (2017). Stem Cell Lineage Infidelity Drives Wound Repair and Cancer. *Cell*, 169(4), 636–650.e14.
- Geng, S., Guo, Y., Wang, Q., Li, L., & Wang, J. (2013). Cancer stem-like cells enriched with CD29 and

- CD44 markers exhibit molecular characteristics with epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Archives of Dermatological Research*, 305(1), 35–47.
- Ghilardi, M., Cabiddu, M., Barni, S., Petrelli, F., & Borgonovo, K. (2011). Cetuximab and panitumumab in KRAS wild-type colorectal cancer: a meta-analysis. *International Journal of Colorectal Disease*, 26(7), 823–833.
- Göke, F., Franzen, A., Hinz, T. K., Marek, L. A., Yoon, P., Sharma, R., Perner, S. (2015). FGFR1 expression levels predict BGJ398 Sensitivity of FGFR1-dependent head and neck Squamous cell cancers. *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4356–4364.
- Gold, K. A., Kies, M. S., William, W. N., Johnson, F. M., Lee, J. J., & Glisson, B. S. (2018). Erlotinib in the treatment of recurrent or metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: A single-arm phase 2 clinical trial. *Cancer*, 124(10), 2169–2173.
- Goyal, L., K. Saha, S., Locatelli, L., Cadamuro, M., Spirli, C., Fiorotto, R., Schuppan, D. (2017). Polyclonal secondary FGFR2 mutations drive acquired resistance to FGFR inhibition in patients with FGFR2 fusion- positive cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 63(3), 965–982.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Stratton, M. R. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446(7132), 153–158.
- Greulich, H., Bulmer, S. E., Feng, W., Frank, D. A., Jänne, P. A., Hahn, W. C., Chen, T.-H. (2005). Oncogenic Transformation by Inhibitor-Sensitive and -Resistant EGFR Mutants. *PLoS Medicine*, 2(11), e313.
- Gros, S. J., Graeff, H., Drenckhan, A., Kurschat, N., Blessmann, M., Rawnaq, T., & Izbicki, J. R. (2012). CXCR4/SDF-1 α -mediated chemotaxis in an in vivo model of metastatic esophageal carcinoma. *In Vivo*, 26(4), 711–718.
- Große, R., Fantl, V., Werner, S., Chioni, A. M., Jarosz, M., Rudling, R., Dickson, C. (2007). The role of fibroblast growth factor receptor 2b in skin homeostasis and cancer development. *EMBO Journal*, 26(5), 1268–1278.
- Grosse-Wilde, A., D'Hérouël, A. F., McIntosh, E., Ertaylan, G., Skupin, A., Kuestner, R. E., Huang, S. (2015). Stemness of the hybrid epithelial/mesenchymal state in breast cancer and its association with poor survival. *PLoS ONE*, 10(5), 1–28.
- Guasch, G., Schober, M., Pasolli, H. A., Conn, E. B., Polak, L., & Fuchs, E. (2007). Loss of TGF β Signaling Destabilizes Homeostasis and Promotes Squamous Cell Carcinomas in Stratified Epithelia. *Cancer Cell*, 12(4), 313–327.
- Gunasinghe, N. P. A. D., Wells, A., Thompson, E. W., & Hugo, H. J. (2012). Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3–4), 469–478.
- Guo, F., Wang, Y., Liu, J., Mok, S. C., Xue, F., & Zhang, W. (2016). CXCL12/CXCR4: A symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene*, 35(7), 816–826.
- Guthrie, B. T. H., Porubsky, E. S., Luxenberg, M. N., Shah, K. J., Wurtz, K. L., & Watson, P. R. (1990). Cisplatin-Based Chemotherapy in Advanced Basal and Squamous Cell Carcinomas of the Skin: Results in 28 Patients Including 13 Patients Receiving Multimodality Therapy, 8(2), 342–346.
- Gygi, S. P., Seo, H.-C., Nagiec, M., Kiyotsugu, Y., Reinherz, E. L., Zhai, B., Luna, R. E. (2014). Quantitative phosphoproteomic analysis reveals system-wide signaling pathways downstream of SDF-1/CXCR4 in breast cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), E2182–E2190.
- Hallinan, N., Finn, S., Cuffe, S., Rafee, S., O'Byrne, K., & Gately, K. (2016). Targeting the fibroblast growth factor receptor family in cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 46, 51–62.
- Hamamoto, J., Yoda, S., Arai, D., Yasuda, H., Sato, T., Ikemura, S., Naoki, K. (2013). Activation of the FGF2-FGFR1 Autocrine Pathway: A Novel Mechanism of Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC. *Molecular Cancer Research*, 11(7), 759–767.
- Hammerlindl, H., & Schaidler, H. (2018). Tumor cell-intrinsic phenotypic plasticity facilitates adaptive cellular reprogramming driving acquired drug resistance. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 12(1), 133–141.

- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322.
- Haraguchi, N., Utsunomiya, T., Inoue, H., Tanaka, F., Mimori, K., Barnard, G. F., & Mori, M. (2005). Characterization of a Side Population of Cancer Cells from Human Gastrointestinal System. *Stem Cells*, 24(3), 506–513.
- Harbinski, F., Yao, Y., Metz, T., Wilson, C. J., Porter, J. A., Graus-Porta, D., Hofmann, F. (2012). Rescue Screens with Secreted Proteins Reveal Compensatory Potential of Receptor Tyrosine Kinases in Driving Cancer Growth. *Cancer Discovery*, 2(10), 948–959.
- Hauschild, A., Grob, J. J., Demidov, L. V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Chapman, P. B. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet*, 380(9839), 358–365.
- Hayashi, H., Togashi, Y., Nishio, K., De Velasco, M. A., Sakai, K., Bannno, E., Mitsudomi, T. (2017). Efficacy of irreversible EGFR-TKIs for the uncommon secondary resistant EGFR mutations L747S, D761Y, and T854A. *BMC Cancer*, 17(1), 1–10.
- Heinzle, C., Sutterlüty, H., Grusch, M., Grasl-Kraupp, B., Berger, W., & Marian, B. (2011). Targeting fibroblast-growth-factor-receptor-dependent signaling for cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(7), 829–846.
- Heldin, C.H. (2013). Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 1–18.
- Heldin, C.-H., Kitadai, Y., Sasaki, T., Kuwai, T., Nakamura, T., Bucana, C. D., & Fidler, I. J. (2006). Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. *American Journal of Pathology*, 169(6), 2054–2065.
- Heldin, C.H. (2012). Autocrine PDGF stimulation in malignancies. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 117(2), 83–91.
- Helsten, T., Elkin, S., Arthur, E., Tomson, B. N., Carter, J., & Kurzrock, R. (2016). The FGFR landscape in cancer: Analysis of 4,853 tumors by next-generation sequencing. *Clinical Cancer Research*, 22(1), 259–267.
- Henriksson, M. L., Edin, S., Dahlin, A. M., Oldenborg, P. A., Öberg, Å., Van Guelpen, B., Palmqvist, R. (2011). Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. *American Journal of Pathology*, 178(3), 1387–1394.
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), 313–323.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Nuchtern, J. G., Jax, T. W., Gobel, U., Brenner, M. K. (2004). A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39), 14228–14233.
- Holcman, M., & Sibilio, M. (2015). Mechanisms underlying skin disorders induced by EGFR inhibitors. *Molecular and Cellular Oncology*, 2(4), 1–10.
- Hu, S., Yu, H.-S., Yen, F.-L., Chen, G.-S., Lan, C.-C. E., & Hu, S. C.-S. (2014). CXCR7 expression correlates with tumor depth in cutaneous squamous cell carcinoma skin lesions and promotes tumor cell survival through ERK activation. *Experimental Dermatology*, 23(12), 902–908.
- Hu, T. H., Yao, Y., Yu, S., Han, L. L., Wang, W. J., Guo, H., Nan, K. J. (2014). SDF-1/CXCR4 promotes epithelial-mesenchymal transition and progression of colorectal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Letters*, 354(2), 417–426.
- Huang, C., Park, C. C., Hilsenbeck, S. G., Ward, R., Rimawi, M. F., Wang, Y. chao, Schiff, R. (2011). B1 Integrin Mediates an Alternative Survival Pathway in Breast Cancer Cells Resistant To Lapatinib. *Breast Cancer Research*, 13(4), R84.
- Huang, P. Y., & Balmain, A. (2014). Modeling cutaneous squamous carcinoma development in the mouse. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(9), 1–23.
- Huang, R. Y. J., Wong, M. K., Tan, T. Z., Kuay, K. T., C Ng, A. H., Chung, V. Y., Thiery, J. P. (2013). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death*

- and Disease*, 4(11).
- Hwang, W. L., Jiang, J. K., Yang, S. H., Huang, T. S., Lan, H. Y., Teng, H. W., Yang, M. H. (2014). MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nature Cell Biology*, 16(3), 268–280.
- Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5), 341–354.
- Ibrahimi, O. A., Eliseenkova, A. V., Plotnikov, A. N., Yu, K., Ornitz, D. M., & Mohammadi, M. (2002). Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7182–7187.
- Ibrahimi, Omar A., Zhang, F., Eliseenkova, A. V., Itoh, N., Linhardt, R. J., & Mohammadi, M. (2004). Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. *Human Molecular Genetics*, 13(19), 2313–2324.
- Inukai, M., Toyooka, S., Ito, S., Asano, H., Ichihara, S., Soh, J., Date, H. (2006). Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 66(16), 7854–7858.
- Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemotherapy Research and Practice*, 2014, 1–9.
- Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Saya, H. (2011). CD44 Variant Regulates Redox Status in Cancer Cells by Stabilizing the xCT Subunit of System xc- and Thereby Promotes Tumor Growth. *Cancer Cell*, 19(3), 387–400.
- Ishizawa, K., Rasheed, Z. A., Karisch, R., Wang, Q., Kowalski, J., Susky, E., Matsui, W. (2010). Tumor-Initiating Cells Are Rare in Many Human Tumors. *Cell Stem Cell*, 7(3), 279–282.
- Ito, T., Kudoh, S., Ichimura, T., Fujino, K., Hassan, W. A. M. A., & Udaka, N. (2017). Small cell lung cancer, an epithelial to mesenchymal transition (EMT)-like cancer: significance of inactive Notch signaling and expression of achaete-scute complex homologue 1. *Human Cell*, 30(1), 1–10.
- Jackson, J. R., Patrick, D. R., Dar, M. M., & Huang, P. S. (2007). Targeted anti-mitotic therapies: Can we improve on tubulin agents? *Nature Reviews Cancer*, 7(2), 107–117.
- Janowski, M. (2009). Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adhesion & Migration*, 3(3), 243–249.
- Jansson, S., Aaltonen, K., Bendahl, P. O., Falck, A. K., Karlsson, M., Pietras, K., & Rydén, L. (2018). The PDGF pathway in breast cancer is linked to tumour aggressiveness, triple-negative subtype and early recurrence. *Breast Cancer Research and Treatment*, 169(2), 231–241.
- Jechlinger, M., Sommer, A., Moriggl, R., Seither, P., Kraut, N., Capodiecci, P., Grünert, S. (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1–10.
- Jechlinger, M., Sommer, A., Moriggl, R., Seither, P., Kraut, N., Capodiecci, P., Grünert, S. (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1561–1570.
- Jin, X., Jin, X., & Kim, H. (2017). Cancer stem cells and differentiation therapy. *Tumor Biology*, 39(10), 1–11.
- Jolly, K., Kulkarni, P., Weninger, K., Orban, J., & Levine, H. (2018). Phenotypic Plasticity, Bet-Hedging, and Androgen Independence in Prostate Cancer: Role of Non-Genetic Heterogeneity. *Frontiers in Oncology*, 8(March), 1–12.
- Junttila, M. R., & De Sauvage, F. J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467), 346–354.
- Kadokia, S., Ducic, Y., Marra, D., Chan, D., Saman, M., Sawhney, R., & Mourad, M. (2016). Cutaneous squamous cell carcinoma of the scalp in the immunocompromised patient: review of 53 cases. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 20(2), 171–175.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
- Kang, H. J., Nam, S. W., Kim, H., Rhee, H., Kim, N. G., Kim, H., Kim, H. (2005). Correlation of KIT and

- platelet-derived growth factor receptor α mutations with gene activation and expression profiles in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*, 24(6), 1066–1074.
- Karapetis, C., Tashkin, D. P., Celli, B., Senn, S., Burkhart, D., Kesten, S., Study, U. (2008). K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer, 359, 1543–1554.
- Karlsson, L., Bondjers, C., & Betsholtz, C. (1999). Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development (Cambridge, England)*, 126(12), 2611–2621.
- Karlsson, L., Lindahl, P., Heath, J. K., & Betsholtz, C. (2000). Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 127(16), 3457–3466.
- Karvela, M., Helgason, G. V., & Holyoake, T. L. (2012). Mechanisms and novel approaches in overriding tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12(3), 381–392.
- Katoh, M. (2016a). FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(1), 3–15. h
- Katoh, M. (2016b). Therapeutics Targeting FGF Signaling Network in Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(12), 1081–1096.
- Katoh, Y., & Katoh, M. (2010). FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 89–96.
- Kawaguchi, N., Zhang, T.-T., & Nakanishi, T. (2019). Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. *Cells*, 8(2), 185.
- Kawamoto, T., Tamaoki, N., Taniguchi, S., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Shibuya, M., & Fukui, Y. (2015). Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Molecular and Cellular Biology*, 8(4), 1816–1820.
- Kelly-Spratt, K. S., Gurley, K. E., Yasui, Y., & Kemp, C. J. (2004). p19 Arf suppresses growth, progression, and metastasis of hras-driven carcinomas through p53-dependent and -independent pathways. *PLoS Biology*, 2(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020242>
- Kim, M., Song, A., Kim, D.-W., Kim, S., Ahn, Y.-O., Keam, B., Heo, D. S. (2015). Mechanisms of Acquired Resistance to AZD9291. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(12), 1736–1744.
- Kim, Y., Kim, E., Wu, Q., Guryanova, O., Hitomi, M., Lathia, J. D., Rich, J. N. (2012). Platelet-derived growth factor receptors differentially inform intertumoral and intratumoral heterogeneity. *Genes and Development*, 26(11), 1247–1262.
- Knuchel, S., Anderle, P., Werfelli, P., Diamantis, E., & Rüegg, C. (2015). Fibroblast surface-associated FGF-2 promotes contact-dependent colorectal cancer cell migration and invasion through FGFR-SRC signaling and integrin α v β 5-mediated adhesion. *Oncotarget*, 6(16).
- Koff, J. L., Ramachandiran, S., & Bernal-Mizrachi, L. (2015). A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 2942–2955.
- Kong, L., Guo, S., Liu, C., Zhao, Y., Feng, C., Liu, Y., ... Li, C. (2016). Overexpression of SDF-1 activates the NF- κ B pathway to induce epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes of breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 48(3), 1085–1094.
- Konga, D., Wanga, Z., Sarkara, S. H., & Yiwei Lia, Sanjeev Banerjeea, Allen Saliganana, Hyeong-Reh Choi Kima, Michael L. Chera, b, and F. H. S. (2008). Platelet-Derived Growth Factor-D Overexpression Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition of PC3 Prostate Cancer Cells, 71(11), 3831–3840.
- Koole, K., Brunen, D., Van Kempen, P. M. W., Noorlag, R., De Bree, R., Liefink, C., Willems, S. M. (2016). FGFR1 is a potential prognostic biomarker and therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 22(15), 3884–3893.
- Koole, K., van Kempen, P. M. W., Swartz, J. E., Peeters, T., van Diest, P. J., Koole, R., Willems, S. M. (2016). Fibroblast growth factor receptor 3 protein is overexpressed in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Medicine*, 5(2), 275–284.
- Kopetz, S., Hoff, P. M., Morris, J. S., Wolff, R. A., Eng, C., Glover, K. Y., Heymach, J. V. (2010). Phase

- II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: Efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *Journal of Clinical Oncology*, 28(3), 453–459.
- Korc, M., & Friesel, R. E. (2009). The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Current Cancer Drug Targets*, 9(5), 639–651.
- Korpai, M., Wei, Y., Kang, Y., Mercatali, L., Buffa, F. M., Ibrahim, T., Garcia, B. A. (2011). Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nature Medicine*, 17(9), 1101–1108.
- Kotani, H., Ebi, H., Kitai, H., Nanjo, S., Kita, K., Huynh, T. G., Yano, S. (2016). Co-active receptor tyrosine kinases mitigate the effect of FGFR inhibitors in FGFR1-amplified lung cancers with low FGFR1 protein expression. *Oncogene*, 35(27), 3587–3597.
- Krebs, A. M., Mitschke, J., Losada, M. L., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., Brabletz, T. (2017). The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nature Cell Biology*, 19(5), 518–529.
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14(3), 275–291.
- Kreso, A., O'Brien, C. A., Galen, P. van, Gan, O. I., Notta, F., Brown, A. M. K., Dick, J. E. (2013). Variable Clonal Repopulation Dynamics Influence Chemotherapy Response. *Science*, 339(February), 543–548.
- Kryczek, I., Wei, S., Liu, R., Zou, W., & Keller, E. (2007). Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(3), C987–C995.
- Kucia, M., Jankowski, K., Reza, R., Wyszczynski, M., Bandura, L., Allendorf, D. J., & Jin Zhang, J. (2004). CXCR4–SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion Magda. *Journal OfMolecular Histology*, 35(April 2004), 233–245.
- Kurth, I., Peitzsch, C., Baumann, M., & Dubrovskaja, A. (2014). The Role of Cancer Stem Cells in Tumor Radioresistance. *Cancer Stem Cells*, 37(6), E6.
- Kurzrock, R., Kantarjian, H., Druker, B., & Talpaz, M. (2003). Philadelphia chromosomepositive leukemias: From basic mechanisms to molecular therapeutics. *Annals of Internal Medicine*, 138(10), 819–830.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Dick, J. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*.
- Lapouge, G., Beck, B., Nassar, D., Dubois, C., Dekoninck, S., & Blanpain, C. (2012). Skin squamous cell carcinoma propagating cells increase with tumour progression and invasiveness. *EMBO Journal*, 31(24), 4563–4575.
- Lapouge, G., Blanpain, C., Michaux, C., Youssef, K. K., Sotiropoulou, P. A., Achouri, Y., & Vokaer, B. (2011). Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18), 7431–7436.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Wolchok, J. D. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 373(1), 23–34.
- Lathia, J., Mack, S., Mulkearns-Hubert, E., Valentim, C., & Rich, J. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma Justin. *Genes and Development*, 26(10), 758.
- Latil, M., Nassar, D., Beck, B., Boumahdi, S., Wang, L., & Blanpain, C. (2017). Cell-Type-Specific Chromatin States Differentially Prime Squamous Cell Carcinoma Tumor-Initiating Cells for Epithelial to Mesenchymal Transition, 20(2), 87–97.
- Lee, H. J., Seo, A. N., Park, S. Y., Kim, J. Y., Park, J. Y., Yu, J. H., Gong, G. (2014). Low prognostic implication of fibroblast growth factor family activation in triple-negative breast cancer subsets. *Annals of Surgical Oncology*, 21(5), 1561–1568.
- Leoncini, E., Ricciardi, W., Cadoni, G., Arzani, D., Petrelli, L., Paludetti, G., ... Boccia, S. (2014). Adult height and head and neck cancer: A pooled analysis within the INHANCE Consortium. *Head and Neck*, 36(10), 1391.
- Levitzki, A., & Klein, S. (2010). Signal transduction therapy of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(4), 287–329.

- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., & Lagane, B. (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, *113*(24), 6085–6093.
- Lewis, C. M., Glisson, B. S., Feng, L., Wan, F., Tang, X., Wistuba, I. I., ... Weber, R. S. (2012). A Phase II Study of Gefitinib for Aggressive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.
- Li, X., Li, P., Chang, Y., Xu, Q., Wu, Z., Ma, Q., & Wang, Z. (2014). The SDF-1/CXCR4 axis induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *392*(1–2), 77–84.
- Li, Y. Y., Hanna, G. J., Laga, A. C., Haddad, R. I., Lorch, J. H., & Hammerman, P. S. (2015). Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *21*(6), 1447–1456.
- Licitra, L., Mesia, R., Rivera, F., Remenár, É., Hitt, R., Erfán, J., Vermorken, J. B. (2011). Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study. *Annals of Oncology*, *22*(5), 1078–1087.
- Lieber, A., Urban, N., Pritchard, D., Strauss, R., Pesonen, S., Liu, Y., Tuve, S. (2009). Epithelial Phenotype Confers Resistance of Ovarian Cancer Cells to Oncolytic Adenoviruses. *Cancer Research*, *69*(12), 5115–5125.
- Lieber, André, Hemminki, A., Bartek, J., Pesonen, S., Li, Z.-Y., Persson, J., Sova, P. (2011). Analysis of Epithelial and Mesenchymal Markers in Ovarian Cancer Reveals Phenotypic Heterogeneity and Plasticity. *PLoS ONE*, *6*(1), e16186.
- Lin, J. J., & Shaw, A. T. (2016). Resisting Resistance: Targeted Therapies in Lung Cancer. *Trends in Cancer*, *2*(7), 350–364.
- Liu, J., Liao, S., Huang, Y., Samuel, R., Shi, T., Naxerova, K., Xu, L. (2011). PDGF-D improves drug delivery and efficacy via vascular normalization, but promotes lymphatic metastasis by activating CXCR4 in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *17*(11), 3638–3648.
- Liu, P., Cheng, H., Santiago, S., Raeder, M., Zhang, F., Isabella, A., Zhao, J. J. (2011). Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. *Nature Medicine*, *17*(9), 1116–1121.
- Logothetis, C. J., Corn, P. G., Varkaris, A., Dayyani, F., Gaur, S., & Gallick, G. E. (2011). The role of HGF/c-Met signaling in prostate cancer progression and c-Met inhibitors in clinical trials. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *20*(12), 1677–1684.
- M. Ornitz, D., & Itoh, N. (2015). The fibroblast growth factor signaling pathway. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, *20*(15), 2255–2264.
- Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Nukiwa, T. (2010). Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *New England Journal of Medicine*, *362*(25), 2380–2388.
- Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., Huelsken, J. (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*, *452*(7187), 650–653.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, *133*(4), 704–715.
- Marek, L., Ware, K. E., Alexa Fritzsche, P., Hercule, P., Helton, W. R., Smith, J. E., Heasley, L. E. (2009). Fibroblast Growth Factor (FGF) and FGF Receptor-Mediated Autocrine Signaling in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Molecular Pharmacology*, *75*(1), 196–207.
- Marshall, M. E., Raben, D., Hinz, T. K., Ware, K. E., Heasley, L. E., Singleton, K. R., Frederick, B. A. (2011). Fibroblast Growth Factor Receptors Are Components of Autocrine Signaling Networks in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research*, *17*(15), 5016–5025.
- Martínez-Cruz, A. B., Santos, M., Lara, M. F., Segrelles, C., Ruiz, S., Moral, M., Paramio, J. M. (2008). Spontaneous squamous cell carcinoma induced by the somatic inactivation of retinoblastoma and Trp53 tumor suppressors. *Cancer Research*, *68*(3), 683–692.
- Martz, C. A., Ottina, K. A., Singleton, K. R., Jasper, J. S., Wardell, S. E., Peraza-penton, A., Wood, K. C.

- (2015). Systematic identification of signaling pathways with potential to confer anticancer drug resistance, *7*(357).
- Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, *134*(2), 215–230.
- Matsumoto, K., Arai, T., Hamaguchi, T., Shimada, Y., Kato, K., Oda, I., Yamada, Y. (2012). FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *British Journal of Cancer*, *106*(4), 727–732.
- Maubec, E., Duvillard, P., Velasco, V., Crickx, B., & Avril, M.-F. (2005). Immunohistochemical Analysis of EGFR and HER-2 in Patients with Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Skin, *1210*, 1205–1210.
- Maubec, Petrow, P., Scheer-Senyarich, I., Duvillard, P., Lacroix, L., Gelly, J., Avril, M.-F. (2011). Phase II Study of Cetuximab As First-Line Single-Drug Therapy in Patients With Unresectable Squamous Cell Carcinoma of the Skin, *29*(25).
- McDermott, U., Ames, R. Y., Iafrate, A. J., Maheswaran, S., Stubbs, H., Greninger, P., Settleman, J. (2009). Ligand-dependent platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- α activation sensitizes rare lung cancer and sarcoma cells to PDGFR kinase inhibitors. *Cancer Research*, *69*(9), 3937–3946.
- McDonald, O. G., Wu, H., Timp, W., Doi, A., & Feinberg, A. P. (2011). Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature Structural and Molecular Biology*, *18*(8), 867–874.
- McDonnell, L. M., Kernohan, K. D., Boycott, K. M., & Sawyer, S. L. (2015). Receptor tyrosine kinase mutations in developmental syndromes and cancer: Two sides of the same coin. *Human Molecular Genetics*, *24*(R1), R60–R66.
- McGranahan, N., & Swanton, C. (2017). Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*, *168*(4), 613–628.
- Meacham, C. E., & Morrison, S. J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, *501*(7467), 328–337.
- Mel Greaves, PhD and Carlo C. Maley, P. (2012). Clonal Evolution in Cancer, *481*(7381), 306–313.
- Mellman, I., Hubbard-Lucey, V. M., Tontonoz, M. J., Kalos, M. D., Chen, D. S., Allison, J. P., Hwu, P. (2016). De-Risking Immunotherapy: Report of a Consensus Workshop of the Cancer Immunotherapy Consortium of the Cancer Research Institute. *Cancer Immunology Research*, *4*(4), 279–288.
- Mentré, F., Maubec, E., Duvillard, P., Certain, A., Adamski, H., Mansard, S., Scheer-Senyarich, I. (2011). Phase II Study of Cetuximab As First-Line Single-Drug Therapy in Patients With Unresectable Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(25), 3419–3426.
- Meyer, M., Muller, A.-K., Yang, J., Moik, D., Ponzio, G., Ornitz, D. M., Werner, S. (2012). FGF receptors 1 and 2 are key regulators of keratinocyte migration in vitro and in wounded skin. *Journal of Cell Science*, *125*(23), 5690–5701.
- Miao, Z., Luker, K. E., Summers, B. C., Berahovich, R., Bhojani, M. S., Rehemtulla, A., Schall, T. J. (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(40), 15735–15740.
- Migden, Michael R., Rischin, D., Schmults, C. D., Guminski, A., Hauschild, A., Lewis, K. D., Fury, M. G. (2018). PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, *379*(4), 341–351.
- Miki, J., Furusato, B., Li, H., Gu, Y., Takahashi, H., Egawa, S., Rhim, J. S. (2007). Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Research*, *67*(7), 3153–3161.
- Miller, V. A., Ou, S.-H. I., Cui, J., Schrock, A. B., Stephens, P. J., Goldberg, M. E., Ali, S. M. (2017). Emergence of novel and dominant acquired EGFR solvent-front mutations at Gly796 (G796S/R) together with C797S/R and L792F/H mutations in one EGFR (L858R/T790M) NSCLC patient who progressed on osimertinib. *Lung Cancer*, *108*(April), 228–231.
- Misale, S., Di Nicolantonio, F., Sartore-Bianchi, A., Siena, S., & Bardelli, A. (2014). Resistance to Anti-EGFR therapy in colorectal cancer: From heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discovery*, *4*(11), 1269–1280.

- Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., Okamoto, I., Tsurutani, J., Fukuoka, M. (2010). Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 11(2), 121–128.
- Mitsudomi, T., & Yatabe, Y. (2010). Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS Journal*, 277(2), 301–308.
- Miyaniishi, N., Suzuki, Y., Simizu, S., Kuwabara, Y., Banno, K., & Umezawa, K. (2010). Involvement of autocrine CXCL12/CXCR4 system in the regulation of ovarian carcinoma cell invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 403(1), 154–159.
- Mohammadi, M., Wortmann, A., Loch, D., Neubert, T. A., Blais, S. P., Dehkhoda, F., Gartside, M. G. (2015). The N550K/H Mutations in FGFR2 Confer Differential Resistance to PD173074, Dovitinib, and Ponatinib ATP-Competitive Inhibitors. *Neoplasia*, 15(8), 975–IN30.
- Mok, T. S., Wu, Y., Thongprasert, S., Yang, C., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Fukuoka, M. (2009). Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma, 947–957.
- Montagut, C., Dalmases, A., Bellosillo, B., Crespo, M., Pairet, S., Iglesias, M., Albanell, J. (2012). Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nature Medicine*, 18(2), 221–223.
- Moscatallo, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Wong, A. J. (1995). Frequent Expression of a Mutant Epidermal Growth Factor Receptor in Multiple Human Tumors. *Cancer Research*, 55(23), 5536–5539.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410, 98–101.
- Muranen, T., Gao, S., Brugge, J. S., Morales, F. C., Iwanicki, M. P., Mills, G. B., Song, L. (2012). Inhibition of PI3K/mTOR Leads to Adaptive Resistance in Matrix-Attached Cancer Cells. *Cancer Cell*, 21(2), 227–239.
- Naidoo, J., Ladanyi, M., Sima, C. S., Nafa, K., Rodriguez, K., Busby, N., Yu, H. A. (2015). Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: Clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer*, 121(18), 3212–3220.
- Nardi, V., Azam, M., & Daley, G. Q. (2004). Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL. *Current Opinion in Hematology*, 11(1), 35–43.
- Nassar, D., Latil, M., Boeckx, B., Lambrechts, D., & Blanpain, C. (2015). Genomic landscape of carcinogen-induced and genetically induced mouse skin squamous cell carcinoma. *Nature Medicine*, 21(8), 946–954.
- Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleswar, H., Raz, E., Zerwes, H. G., Thelen, M. (2010). CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE*, 5(2).
- Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A., & Thiery, J. P. P. (2016). Emt: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45.
- Nilsson, E. M., Brokken, L. J. S., & Härkönen, P. L. (2010). Fibroblast growth factor 8 increases breast cancer cell growth by promoting cell cycle progression and by protecting against cell death. *Experimental Cell Research*, 316(5), 800–812.
- Nogova, L., Sequist, L. V., Garcia, J. M. P., Andre, F., Delord, J. P., Hidalgo, M., Wolf, J. (2017). Evaluation of BGJ398, a Fibroblast growth factor receptor 1-3 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors harboring genetic alterations in fibroblast growth factor receptors: Results of a global phase I, dose-escalation and dose-expansion stud. *Journal of Clinical Oncology*, 35(2), 157–165.
- Nowell, P. (1976). The clonal evolution of Tumor Cell Populations. *Science*, 194(4260).
- O’Boyle, G., Swidenbank, I., Marshall, H., Barker, C. E., Armstrong, J., White, S. A., Lovat, P. E. (2013). Inhibition of CXCR4-CXCL12 chemotaxis in melanoma by AMD11070. *British Journal of Cancer*, 108(8), 1634–1640.
- Ocaña, O. H., Córcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Nieto, M. A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*, 22(6), 709–724.

- Oft, M., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (2002). Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nature Cell Biology*, 4(7), 487–494.
- Ohashi, S., Natsuizaka, M., Naganuma, S., Kagawa, S., Kimura, S., Itoh, H., Nakagawa, H. (2011). A NOTCH3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Research*, 71(21), 6836–6847.
- Ohgaki, H., Nobusawa, S., Stawski, R., Kim, Y.-H., & Nakazato, Y. (2011). Amplification of the PDGFRA, KIT and KDR genes in glioblastoma: a population-based study. *Neuropathology*, 31(6), 583–588.
- Okamoto, I., Kenyon, L. C., Emllet, D. R., Mori, T., Sasaki, J. I., Hirosako, S., Wong, A. J. (2003). Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Science*, 94(1), 50–56.
- Oliveras-Ferreros, C., Cufí, S., Queralt, B., Vazquez-Martin, A., Martin-Castillo, B., De Llorens, R., ...Menendez, J. A. (2012). Cross-suppression of EGFR ligands amphiregulin and epiregulin and de-repression of FGFR3 signalling contribute to cetuximab resistance in wild-type KRAS tumour cells. *British Journal of Cancer*, 106(8), 1406–1414.
- Olsen, S. K., Ibrahim, O. A., Raucchi, A., Zhang, F., Eliseenkova, A. V., Yayon, A., Mohammadi, M. (2004). Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(4), 935–940.
- Orimo, A., Weinberg, R. A., Carey, V. J., Naeem, R., Delaunay, T., Arenzana-Seisdedos, F., Gupta, P. B. (2005). Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell*, 121(3), 335–348.
- Ota, S., Zhou, Z. Q., Link, J. M., & Hurlin, P. J. (2009). The role of senescence and prosurvival signaling in controlling the oncogenic activity of FGFR2 mutants associated with cancer and birth defects. *Human Molecular Genetics*, 18(14), 2609–2621.
- Oxnard, G. R., Lo, P. C., Nishino, M., Dahlberg, S. E., Lindeman, N. I., Butaney, M., Jänne, P. A. (2013). Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring egfr exon 20 insertions. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(2), 179–184.
- Pabla, B. (2015). Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: Current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention. *World Journal of Clinical Oncology*, 6(5), 133.
- Padua, D., & Massagué, J. (2009). Roles of TGFβ in metastasis. *Cell Research*, 19(1), 89–102.
- Papadopoulos, N., & Lennartsson, J. (2018). The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Molecular Aspects of Medicine*, 62, 75–88.
- Pardal, R., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 895–902.
- Parikh, A. S., Mylvaganam, R., Faquin, W. C., Emerick, K. S., Lin, D. T., Rodman, C., Rocco, J. W. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell*, 171(7), 1611-1624.e24.
- Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V., & Girolomoni, G. (2008). The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(6), 1365–1374.
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 556(7702).
- Patel, G. K., Yee, C. L., Terunuma, A., Telford, W. G., Voong, N., Yuspa, S. H., & Vogel, J. C. (2012). Identification and characterization of tumor-initiating cells in human primary cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(2), 401–409.
- Patil, P., Gupta, V., Rangaraju, R., Abbas, W., & Bajpai, P. (2018). Prolonged survival with anti-epidermal growth factor receptor therapy in head and neck squamous cell carcinoma: A case series. *Journal of Current Oncology*, 1(2), 97.
- Paulsson, J., Sjöblom, T., Micke, P., Pontén, F., Landberg, G., Heldin, C. H., Östman, A. (2009). Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor β-receptor expression in human breast cancer. *American Journal of Pathology*, 175(1), 334–341.
- Pece, S., Tosoni, D., Confalonieri, S., Mazzarol, G., Vecchi, M., Ronzoni, S., Di Fiore, P. P. (2010). Biological and Molecular Heterogeneity of Breast Cancers Correlates with Their Cancer Stem Cell Content. *Cell*, 140(1), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.007>

- Peifer, M., Fernández-Cuesta, L., Sos, M. L., George, J., Seidel, D., Kasper, L. H., Thomas, R. K. (2012). Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nature Genetics*, *44*(10), 1104–1110.
- Peitzsch, C., Kurth, I., Kunz-Schughart, L., Baumann, M., & Dubrovskaya, A. (2013). Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiotherapy and Oncology*, *108*(3), 378–387.
- Pekny, M., Swolin, B., Leveen, P., Gebre-Medhin, S., Betsholtz, C., & Larsson, E. (2007). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes & Development*, *8*(16), 1875–1887.
- Perisanidis, C. (2017). Prevalence of EGFR tyrosine Kinase domain mutations in head and neck squamous cell carcinoma: Cohort study and systematic review. *In Vivo*, *31*(1), 23–34.
- Phi, L. T. H., Sari, I. N., Yang, Y.-G., Lee, S.-H., Jun, N., Kim, K. S., Kwon, H. Y. (2018). Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells International*, *2018*, 1–16.
- Phillips, R. J., Burdick, M. D., Lutz, M., Belperio, J. A., Keane, M. P., & Strieter, R. M. (2003). The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *167*(12), 1676–1686.
- Pickering, C. R., Zhou, J. H., Lee, J. J., Drummond, J. A., Peng, S. A., Saade, R. E., Frederick, M. J. (2014). Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *20*(24), 6582–6592.
- Pietras, K., & Östman, A. (2010). Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*, *316*(8), 1324–1331.
- Pires, P. R. R., De Amorim, Í. S. S., Souza, L. D., Rodrigues, J. A., & Mencialha, A. L. (2016). Targeting Cellular Signaling Pathways in Breast Cancer Stem Cells and its Implication for Cancer Treatment. *Anticancer Research*, *36*(11), 5681–5692.
- Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: Acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer*, *9*(4), 265–273.
- Pontén, F., Ren, Z., Nistér, M., Westermarck, B., & Pontén, J. (1994). Epithelial-stromal interactions in basal cell cancer: the PDGF system. *Journal of Investigative Dermatology*, *102*(3), 304–309.
- Postow, M. A., Callahan, M. K., & Wolchok, J. D. (2015). Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, *33*(17), 1974–1982.
- Prahallad, A., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Sun, C., Beijersbergen, R. L., Salazar, R., Bardelli, A. (2012). Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*, *483*(7388), 100–103.
- Prince, M. E., Kaczorowski, R. S. A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma, *104*(3).
- Procopio, M. G., Laszlo, C., Al Labban, D., Kim, D. E., Bordignon, P., Jo, S. H., Dotto, G. P. (2015). Combined CSL and p53 downregulation promotes cancer-associated fibroblast activation. *Nature Cell Biology*, *17*(9), 1193–1204.
- Quan, C., Cho, M. K., Shao, Y., Mianeki, L. E., Liao, E., Perry, D., & Quan, T. (2015). Dermal fibroblast expression of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) promotes epidermal keratinocyte proliferation in normal and diseased skin. *Protein and Cell*, *6*(12), 890–903.
- Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden*, M., & Balmain, A. (1986). Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis, *(13)*, 2546–2547.
- Raha, D., Wilson, T. R., Peng, J., Peterson, D., Yue, P., Evangelista, M., Settleman, J. (2014). The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Research*, *74*(13), 3579–3590.
- Ramos, P., & Bentires-Alj, M. (2015). Mechanism-based cancer therapy: Resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene*, *34*(28), 3617–3626. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.314>
- Rankin, E. B., & Giaccia, A. J. (2016). The receptor tyrosine kinase AXL in cancer progression. *Cancers*, *8*(11).

- Regad, T. (2015). Targeting RTK signaling pathways in cancer. *Cancers*, 7(3), 1758–1784.
- Reichert, M., Vonderheide, R. H., Mirek, E. T., Rhim, A. D., Rustgi, A. K., Bailey, J. M., Stanger, B. Z. (2012). EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell*, 148(1–2), 349–361.
- Rekhtman, N., Pao, W., Zakowski, M. F., Riely, G. J., Sima, C. S., Arcila, M. E., Ladanyi, M. (2013). Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 2240–2247.
- Reventa Arranz, F., Paricio Rubio, J. F., Vázquez Salvado, M. M., & del Villar Sordo, V. (2004). Descriptive epidemiology of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma in Soria (north-eastern Spain) 1998-2000: A hospital-based survey. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(2), 137–141.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Todaro, M., De Maria, R., Pilozi, E., Biffoni, M., & Peschle, C. (2006). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111–115.
- Robson, M., Phillips, L. G., Thomason, A., Robson, L., & Pierce, G. (1992). Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic. *The Lancet*, 339, 23–25.
- Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Paz-Ares, L. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 13(3), 239–246.
- Rosenkilde, M. M., Struyf, S., Teixeira, M. M., Franck, C., Boff, D., Proost, P., Larsen, O. (2016). Natural nitration of CXCL12 reduces its signaling capacity and chemotactic activity *in vitro* and abrogates intra-articular lymphocyte recruitment *in vivo*. *Oncotarget*, 7(38).
- Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*, 79, 34–74.
- Rotow, J., & Bivona, T. G. (2017). Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nature Reviews Cancer*, 17(11), 637–658.
- Roudi, R., Madjd, Z., Korourian, A., Mehrazma, M., Molanae, S., Sabet, M. N., & Sharifabrizi, A. (2014). Clinical significance of putative cancer stem cell marker CD44 in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Biomarkers*, 14(6), 457–467.
- Ruiz, S., Santos, M., Fernanda Lara, M., Segrelles, C., Ballestín, C., & Paramio, J. M. (2005). Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Research*, 65(21), 9678–9686.
- Ruscetti, M., Quach, B., Dadashian, E. L., Mulholland, D. J., & Wu, H. (2015). Tracking and functional characterization of epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal tumor cells during prostate cancer metastasis. *Cancer Research*, 75(13), 2749–2759.
- Sadek, H., Azli, N., Wendling, J. L., Cvitkovic, E., Rahal, M., Mamelle, G., Avril, M. F. (1990). Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the skin with cisplatin, 5-fluorouracil, and bleomycin. *Cancer*, 66(8), 1692–1696.
- Saiz-Ladera, C., Lara, M. F., Garín, M., Ruiz, S., Santos, M., Lorz, C., Paramio, J. M. (2014). P21 suppresses inflammation and tumorigenesis on pRB-deficient stratified epithelia. *Oncogene*, 33(37), 4599–4612.
- Sampson, V. B., David, J. M., Puig, I., Patil, P. U., De Herreros, A. G., Thomas, G. V., & Rajasekaran, A. K. (2014). Wilms' tumor protein induces an epithelial-mesenchymal hybrid differentiation state in clear cell renal cell carcinoma. *PLoS ONE*, 9(7).
- Sarrio, D., & Franklin, C. K. (2012). Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells*, 30(2), 292–303.
- Savagner, P., Yamada, K. M., Thiery, J. P., Jouanneau, J., & Valles, A. M. (2013). Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells. *Molecular Biology of the Cell*, 5(8), 851–862.
- Scheel, C., Eaton, E. N., Li, S. H. J., Chaffer, C. L., Reinhardt, F., Kah, K. J., Weinberg, R. A. (2011). Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell*, 145(6), 926–940.
- Schepers, A. G., Snippert, H. J., Stange, D. E., Born, M. van den, Es, J. H. van, Wetering, M. van de, & Clevers, H. (2010). Lineage Tracing Reveals Lgr5+ Stem Cell Activity in Mouse Intestinal

- Adenomas, 337(December), 1413–1416.
- Schlessinger, J. (2000). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases A large group of genes in all eukaryotes encode for, *103*, 211–225.
- Schmidt, J. M., Sass, S., Bartsch, H. S., Theis, F., Hirschi, B., Sotlar, K., Kari, V. (2015). Stem-Cell-like Properties and Epithelial Plasticity Arise as Stable Traits after Transient Twist1 Activation. *Cell Reports*, *10*(2), 131–139.
- Schneider, M. R., Werner, S., Paus, R., & Wolf, E. (2008). Beyond Wavy Hairs. The Epidermal Growth Factor Receptor and Its Ligands in Skin Biology and Pathology. *The American Journal of Pathology*, *173*(1), 14–24.
- Schober, M., & Fuchs, E. (2011). Tumor-initiating stem cells of squamous cell carcinomas and their control by TGF- β and integrin/focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(26), 10544–10549.
- Schwitalla, S., Fingerle, A. A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S. I., Ziegler, P. K., Greten, F. R. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, *152*(1–2), 25–38.
- Sciacaluga, M., Lopez, N., Mainiero, F., Warr, T., Pagani, F., Ferrara, G., Limatola, C. (2013). Functional Cross Talk between CXCR4 and PDGFR on Glioblastoma Cells Is Essential for Migration. *PLoS ONE*, *8*(9), e73426.
- Ségaly, A. I., Tellez-Gabriel, M., Heymann, M. F., & Heymann, D. (2015). Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *Journal of Bone Oncology*, *4*(1), 1–12.
- Seguin, L., Kato, S., Franovic, A., Camargo, M. F., Lesperance, J., Elliott, K. C., Cheresch, D. A. (2014). An integrin β 3-KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nature Cell Biology*, *16*(5), 457–468.
- Seiwert, T. Y., Burtneess, B., Mehra, R., Weiss, J., Berger, R., Eder, J. P., Chow, L. Q. (2016). Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *The Lancet Oncology*, *17*(7), 956–965.
- Sequist, L. V., Yang, J. C. H., Yamamoto, N., O’Byrne, K., Hirsh, V., Mok, T., Schuler, M. (2013). Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(27), 3327–3334.
- Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A. B., Fidias, P., Engelman, J. A. (2011). Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science Translational Medicine*, *3*(75), 75ra26.
- Shah, C. A., Bei, L., Wang, H., Altman, J. K., Plataniias, L. C., & Eklund, E. A. (2016). Cooperation between AlphasBeta3 integrin and the fibroblast growth factor receptor enhances proliferation of Hox-overexpressing acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, *7*(34).
- Shah, N. P., Nicoll, J. M., Nagar, B., Gorre, M. E., Paquette, R. L., Kuriyan, J., & Sawyers, C. L. (2002). Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*, *2*(2), 117–125.
- Shao, Z. M., Nguyen, M., & Barsky, S. H. (2000). Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene*, *19*(38), 4337–4345.
- Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Takahashi, F., Maheswaran, S., Settleman, J. (2010). A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell*, *141*(1), 69–80.
- Shimokawa, M., Ohta, Y., Nishikori, S., Matano, M., Takano, A., Fujii, M., Sato, T. (2017). Visualization and targeting of LGR5 + human colon cancer stem cells. *Nature*, *545*(7653), 187–192.
- Shin, B. D. M., Glisson, B. S., Khuri, F. R., Clifford, J. L., Clayman, G., Benner, S. E., Lippman, S. M. (2001). Phase II and Biologic Study of Interferon Alfa, Retinoic Acid, and Cisplatin in Advanced Squamous Skin Cancer, *20*(2), 364–370.
- Shirakihara, T., Horiguchi, K., Miyazawa, K., Ehata, S., Shibata, T., Morita, I., Saitoh, M. (2011). TGF- β

- regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Journal*, 30(4), 783–795.
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., & Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*.
- Siegle, J. M., Sennett, R., Yonekubo, Y., Basin, A., Schober, M., Sastre-Perona, A., Tsirigos, A. (2014). SOX2 is a cancer-specific regulator of tumour initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nature Communications*, 5(1), 1–12.
- Sleijfer, S., Wiemer, E., Seynaeve, C., & Verweij, J. (2007). Improved Insight into Resistance Mechanisms to Imatinib in Gastrointestinal Stromal Tumors: A Basis for Novel Approaches and Individualization of Treatment. *The Oncologist*, 12(6), 719–726.
- Smith, B., & Bhowmick, N. (2016). Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), 17.
- Smith, M. C. P., Luker, K. E., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., Prior, J. L., Luker, G. D., & Garbow, J. R. (2004). CXCR4 Regulates Growth of Both Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Research*, 64(23), 8604–8612.
- Smolle, V., Amberg, N., Holcman, M., Kislak, A., Harder, J., Boelke, E., Ansari, P. (2013). Epidermal EGFR Controls Cutaneous Host Defense and Prevents Inflammation. *Science Translational Medicine*, 5(199).
- Sok, J. C., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. L., Grandis, J. R. (2006). Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clinical Cancer Research*, 12(17), 5064–5073.
- Song, Y. H., Zhu, Y. T., Ding, J., Zhou, F. Y., Xue, J. X., Jung, J. H., Gao, W. Y. (2016). Distribution of fibroblast growth factors and their roles in skin fibroblast cell migration. *Molecular Medicine Reports*, 14(4), 3336–3342.
- Sorg, B. S., Dewhirst, M. W., Garcia-Blanco, M. A., Oltean, S., Albrecht, T., Brazas, R. M., & Bonano, V. I. (2006). Alternative inclusion of fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIc in Dunning prostate tumors reveals unexpected epithelial mesenchymal plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(38), 14116–14121.
- Soria, J. C., Reungwetwattana, T., Ramalingam, S. S., Su, W.-C., Lee, S.M., Chewaskulyong, B., Rukazenkov, Y. (2017). Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 378(2), 113–125.
- Soriano, P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor knockout mice. *Genes & Dev.*, 8, 1888–1896.
- Soriano, P. (1997). The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development (Cambridge, England)*, 124(14), 2691–2700.
- Sounni, N. E., & Noel, A. (2013). Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clinical Chemistry*, 59(1), 85–93.
- South, A. P., Purdie, K. J., Watt, S. A., Haldenby, S., Den Breems, N. Y., Dimon, M., Leigh, I. M. (2014). NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(10), 2630–2638.
- Sprenger, T., Conradi, L. C., Beissbarth, T., Ermert, H., Homayounfar, K., Middel, P., Liersch, T. (2013). Enrichment of CD133-expressing cells in rectal cancers treated with preoperative radiochemotherapy is an independent marker for metastasis and survival. *Cancer*, 119(1), 26–35.
- Stankic, M., Massagué, J., Brogi, E., Benezra, R., Chin, Y., Padua, D., Norton, L. (2013). TGF- β -Id1 Signaling Opposes Twist1 and Promotes Metastatic Colonization via a Mesenchymal-to-Epithelial Transition. *Cell Reports*, 5(5), 1228–1242.
- Stattin, P., Hammarsten, P., Bergh, A., Paulsson, J., Häggglöf, C., Josefsson, A., & Östman, A. (2010). Stromal PDGFR β Expression in Prostate Tumors and Non-Malignant Prostate Tissue Predicts Prostate Cancer Survival. *PLoS ONE*, 5(5), e10747.
- Steller, E. J. A., Raats, D. A., Koster, J., Rutten, B., Govaert, K. M., Emmink, B. L., Kranenburg, O. (2015). PDGFRB Promotes Liver Metastasis Formation of Mesenchymal-Like Colorectal Tumor Cells. *Neoplasia*, 15(2), 204–IN30.

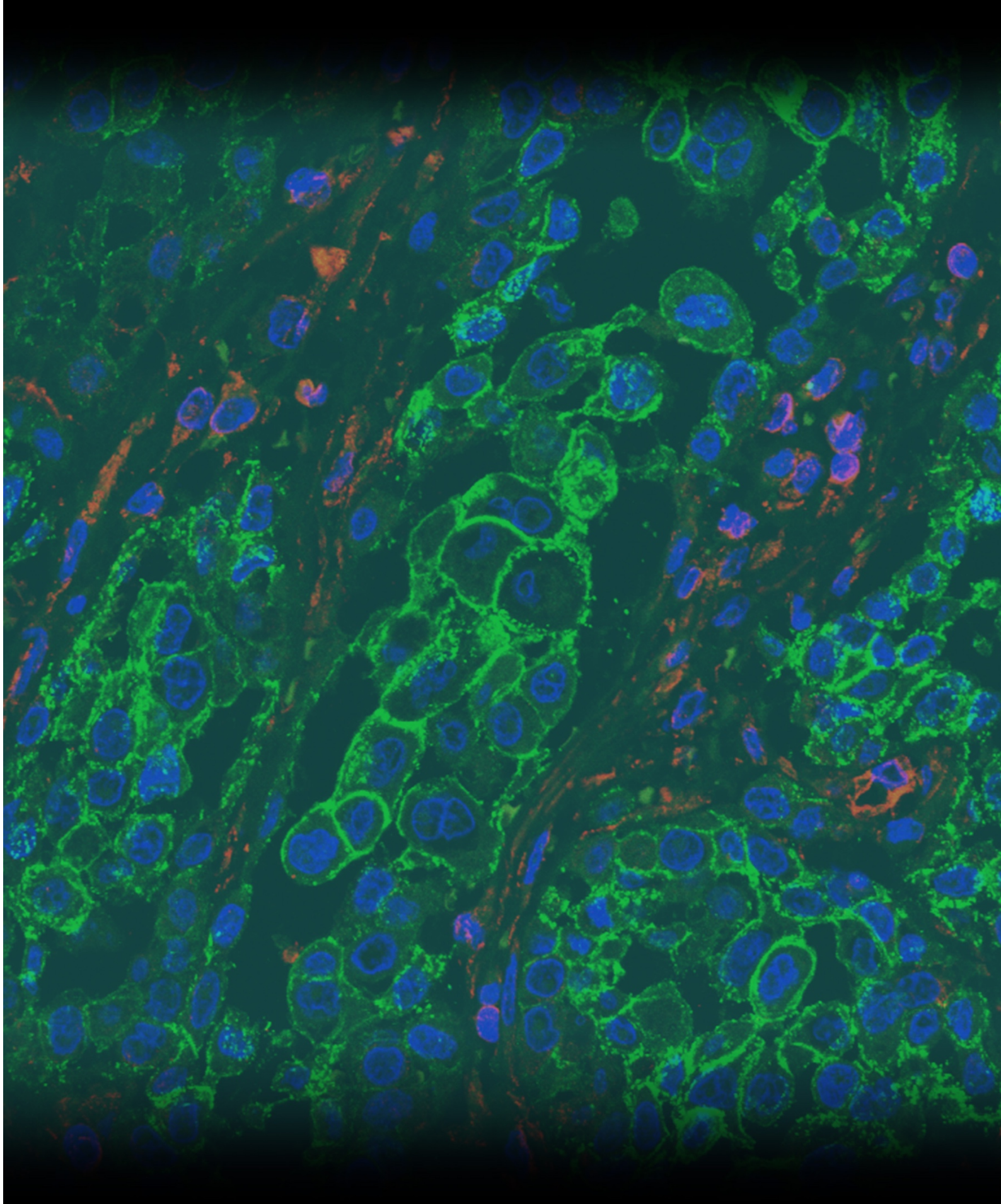
- Stoelben, E., Ligorio, C., Menon, R., Lorimier, P., Heideman, D., Peifer, M., Altmuller, J. (2010). Frequent and Focal FGFR1 Amplification Associates with Therapeutically Tractable FGFR1 Dependency in Squamous Cell Lung Cancer. *Science Translational Medicine*, 2(62), 62ra93–62ra93.
- Stordal, B., Madden, S. F., Mills, G. B., Broaddus, R., Clarke, C., Gallagher, W. M., Carey, M. S. (2014). OvMark: a user-friendly system for the identification of prognostic biomarkers in publically available ovarian cancer gene expression datasets. *Molecular Cancer*, 13(1), 241.
- Stratigos, A., Garbe, C., Lebbe, C., Malvehy, J., Del Marmol, V., Pehamberger, H., Grob, J. J. (2015). Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *European Journal of Cancer*, 51(14), 1989–2007.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z. R., Du, J., Golub, T. R. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 487(7408), 500–504. <https://doi.org/10.1038/nature11183>
- Su, K. Y., Chen, H. Y., Li, K. C., Kuo, M. L., Yang, J. C. H., Chan, W. K., Yang, P. C. (2012). Pretreatment Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30(4), 433–440. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.3224>
- Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., ... Wang, J. (2010). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(4), 709–722.
- Sunada, H., Magun, B. E., Mendelsohn, J., & MacLeod, C. L. (2006). Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 3825–3829.
- Taberero, J., Bahleda, R., Dienstmann, R., Infante, J. R., Mita, A., Italiano, A., Soria, J. C. (2015). Phase I dose-escalation study of JNJ-42756493, an oral pan-fibroblast growth factor receptor inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 33(30), 3401–3408.
- Tam, W. L., Lu, H., Buikhuisen, J., Soh, B. S., Lim, E., Reinhardt, F., Weinberg, R. A. (2013). Protein Kinase C α Is a Central Signaling Node and Therapeutic Target for Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Cell*, 24(3), 347–364.
- Tam, W. L., & Weinberg, R. a. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*, 19(11), 1438–1449.
- Tang, X., Li, X., Li, Z., Liu, Y., Yao, L., Song, S., Li, C. (2016). Downregulation of CXCR7 inhibits proliferative capacity and stem cell-like properties in breast cancer stem cells. *Tumor Biology*, 37(10), 13425–13433.
- Tejada, M. L., Yu, L., Dong, J., Jung, K., Meng, G., Peale, F. V., Ferrara, N. (2006). Tumor-driven paracrine platelet-derived growth factor receptor α signaling is a key determinant of stromal cell recruitment in a model of human lung carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 12(9), 2676–2688.
- Tenbaum, S. P., Ordóñez-Morán, P., Puig, I., Chicote, I., Arqués, O., Landolfi, S., Palmer, H. G. (2012). β -Catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nature Medicine*, 18(6), 892–901.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890.
- Thress, K. S., Paweletz, C. P., Felip, E., Cho, B. C., Dougherty, B., Lai, Z., Oxnard, G. R. (2016). Acquired EGFR C797S mediates resistance to AZD9291 in advanced non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nature*, 531(7601), 540–545.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & De Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 478(7368), 255–259.
- Tian, Yuan, Song, Y., Bai, W., Ma, X., & Ren, Z. (2017). CXCR4 knockdown inhibits the growth and invasion of nasopharyngeal cancer stem cells. *Oncology Letters*, 13(4), 2253–2259.
- Tian, Yunhong, Lin, J., Tian, Y., Zhang, G., Zeng, X., Zheng, R., Yuan, Y. (2018). Efficacy and safety of anti-EGFR agents administered concurrently with standard therapies for patients with head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Cancer*, 142(11), 2198–2206.

- Tomita, Y., Akiyama, M., & Shimizu, H. (2006). PDGF isoforms induce and maintain anagen phase of murine hair follicles. *Journal of Dermatological Science*, 43(2), 105–115.
- Tomlinson, D. ., Baldo, O., Hamden, P., & Knowles, M. . (2007). FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *Journal of Pathology*, 213(1), 91–98.
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450–461.
- Tran, H. D., Luitel, K., Kim, M., Zhang, K., Longmore, G. D., & Tran, D. D. (2014). Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer Research*, 74(21), 6330–6340.
- Trueb, B., Zhuang, L., Taeschler, S., & Wiedemann, M. (2003). Characterization of FGFR1, a Novel Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor Preferentially Expressed in Skeletal Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 33857–33865.
- Tsai, C.-M., Massey, D., Geater, S. L., Bennouna, J., Kato, T., Mok, T., Yamamoto, N. (2013). Phase III Study of Afatinib or Cisplatin Plus Pemetrexed in Patients With Metastatic Lung Adenocarcinoma With EGFR Mutations . *Journal of Clinical Oncology*, 31(27), 3327–3334.
- Tsai, J. H., Donaher, J. L., Murphy, D. a, Chau, S., & Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, 22(6), 725–736.
- Turner, N., Lambros, M. B., Horlings, H. M., Pearson, A., Sharpe, R., Natrajan, R., Reis-Filho, J. S. (2010). Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene*, 29(14), 2013–2023.
- Turner, Nicholas, & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 10(2), 116–129.
- Uchida, D., Onoue, T., Tomizuka, Y., Begum, N. M., Miwa, Y., Yoshida, H., & Sato, M. (2007). Involvement of an Autocrine Stromal Cell Derived Factor-1/CXCR4 System on the Distant Metastasis of Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecular Cancer Research*, 5(7), 685–694.
- Uemae, Y., Nakai, K., Matsumura, A., Takano, S., Yamamoto, T., Osuka, S., Sakamoto, N. (2014). CXCL12 secreted from glioma stem cells regulates their proliferation. *Journal of Neuro-Oncology*, 117(1), 43–51.
- Uras, I. Z., Kerzendorfer, C., Colinge, J., Duernberger, G., Gapp, B. V, Muellner, M. K., Smida, M. (2011). A chemical-genetic screen reveals a mechanism of resistance to PI3K inhibitors in cancer. *Nature Chemical Biology*, 7(11), 787–793.
- Uribe, P., & Gonzalez, S. (2011). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: Molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathology Research and Practice*, 207(6), 337–342.
- Ustach, C. V., Huang, W., Conley-LaComb, M. K., Lin, C. Y., Che, M., Abrams, J., & Kim, H. R. C. (2010). A novel signaling axis of matriptase/PDGF-D/ β -PDGFR in human prostate cancer. *Cancer Research*, 70(23), 9631–9640.
- Vairaktaris, E., Ragos, V., Yapijakis, C., Derka, S., Vassiliou, S., Nkenke, E., Patsouris, E. (2006). FGFR-2 and -3 play an important role in initial stages of oral oncogenesis. *Anticancer Research*, 26(6 B), 4217–4221.
- Van Cutsem, E., Köhne, C. H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M. P., Cascinu, S., Ciardiello, F. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 2011–2019.
- Vasudev, N. S., & Reynolds, A. R. (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer: Current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17(3), 471–494.
- Vatte, C., Al Amri, A. M., Cyrus, C., Chathoth, S., Acharya, S., Hashim, T. M., Al-Ali, A. K. (2017). Tyrosine kinase domain mutations of EGFR gene in head and neck squamous cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 10, 1527–1533.
- Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Hitt, R. (2008). Platinum-

- based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine*, 359(11), 1116–1127.
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314–322.
- Wang, J., Mikse, O., Liao, R. G., Li, Y., Tan, L., Janne, P. A., Hammerman, P. S. (2015). Ligand-associated ERBB2/3 activation confers acquired resistance to FGFR inhibition in FGFR3-dependent cancer cells. *Oncogene*, 34(17), 2167–2177.
- Wang, Jianhua, Shiozawa, Y., Wang, J., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K. J., Taichman, R. S. (2008). The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 4283–4294.
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761–773.
- Wang, W., Quan, Y., Fu, Q., Liu, Y., Liang, Y., Wu, J., Wang, Y. (2014). Dynamics between cancer cell subpopulations reveals a model coordinating with both hierarchical and stochastic concepts. *PLoS ONE*, 9(1), 1–9.
- Wang, X., Cao, Y., Zhang, S., Chen, Z., Fan, L., Shen, X., Chen, D. (2017). Stem cell autocrine CXCL12/CXCR4 stimulates invasion and metastasis of esophageal cancer. *Oncotarget*, 8(22), 36149–36160.
- Wang, Zhixiang. (2017). *ErbB Receptor Signaling* (Vol. 1652).
- Wang, Zongwei, Bråkenhielm, E., Zhao, X., Nissen, L. J., Funa, K., Cao, R., Hedlund, E.-M. (2007). Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 117(10), 2766–2777.
- Ware, K. E., Hinz, T. K., Kleczko, E., Singleton, K. R., Marek, L. A., Helfrich, B. A., Heasley, L. E. (2013). A mechanism of resistance to gefitinib mediated by cellular reprogramming and the acquisition of an FGF2-FGFR1 autocrine growth loop. *Oncogenesis*, 2(3), e39-9.
- Ware, Kathryn E., Marshall, M. E., Heasley, L. R., Marek, L., Hinz, T. K., Hercule, P., Heasley, L. E. (2010). Rapidly Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in NSCLC Cell Lines through De-Repression of FGFR2 and FGFR3 Expression. *PLoS ONE*, 5(11), e14117.
- Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*, 9(5), 1–45.
- Weissmueller, S., Manchado, E., Saborowski, M., Morris IV, J. P., Wagenblast, E., Davis, C. A., Lowe, S. W. (2014). Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor β signaling. *Cell*, 157(2), 382–394.
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Brabletz, T. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature Cell Biology*, 11(12), 1487–1495.
- Wesche, J., Lambert, D., Eaton, C. L., & Harrison, B. J. (2011). Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *World Journal of Surgery*, 22(6), 520–525.
- Westphal, M., Maire, C. L., & Lamszus, K. (2017). EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise. *CNS Drugs*, 31(9), 723–735.
- White, A., Tran, K., Khoo, J., & Lowry, B. (2011). Defining the origins of ras/p53 mediated squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 71(8 Supplement), 491–491.
- Wollina, U., Hansel, G., Koch, A., & Köstler, E. (2005). Oral capecitabine plus subcutaneous interferon alpha in advanced squamous cell carcinoma of the skin. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131(5), 300–304.
- Wong, C. E., Yu, J. S., Quigley, D. a., To, M. D., Jen, K. Y., Huang, P. Y., Balmain, A. (2013). Inflammation and Hras signaling control epithelial-mesenchymal transition during skin tumor progression. *Genes and Development*, 27(6), 670–682.
- Wu, K., Yu, S., Liu, Q., Chu, Q., Zhao, W., & Qin, S. (2018). EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Molecular Cancer*, 17(1), 1–9.
- Wu, S. G., Chang, Y. L., Yu, C. J., Yang, P. C., & Shih, J. Y. (2016). The role of PIK3CA mutations among lung adenocarcinoma patients with primary and acquired resistance to EGFR tyrosine kinase

- inhibition. *Scientific Reports*, 6(July), 1–9.
- Wu, Y. C., Tang, S. J., Sun, G. H., & Sun, K. H. (2016). CXCR7 mediates TGFβ1-promoted EMT and tumor-initiating features in lung cancer. *Oncogene*, 35(16), 2123–2132.
- Wu, Y. L., Zhou, C., Hu, C. P., Feng, J., Lu, S., Huang, Y., Geater, S. L. (2014). Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): An open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 15(2), 213–222.
- Wu, Y. L., Zhou, C., Liang, C. K., Wu, G., Liu, X., Zhong, Z., Zuo, Y. (2015). First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: Analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Annals of Oncology*, 26(9), 1883–1889.
- Wu, Y. M., Su, F., Kalyana-Sundaram, S., Khazanov, N., Ateeq, B., Cao, X., Chinnaiyan, A. M. (2013). Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer Discovery*, 3(6), 636–647.
- Würth, R., Bajetto, A., Harrison, J. K., Barbieri, F., & Florio, T. (2014). CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(May), 1–19.
- Yamaoka, T., Ohba, M., & Ohmori, T. (2017). Molecular-targeted therapies for epidermal growth factor receptor and its resistance mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11).
- Yan, G., McKeenan, W. L., Fukabori, Y., McBride, G., & Nikolaropoulos, S. (2015). Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Molecular and Cellular Biology*, 35(8), 4513–4522.
- Yan, W., Wistuba, I. I., R., E.-B. M., & S., E. H. (2011). Squamous Cell Carcinoma - Similarities and Differences among Anatomical Sites. *American Journal of Cancer Research*, 1(3), 275–300.
- Yan, Y., Zuo, X., & Wei, D. (2015). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *STEM CELLS Translational Medicine*, 4(9), 1033–1043. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0048>
- Yang, J. C.H., Sequist, L. V., Zhou, C., Schuler, M., Geater, S. L., Mok, T., ... Wu, Y. L. (2016). Effect of dose adjustment on the safety and efficacy of afatinib for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma: Post hoc analyses of the randomized LUX-Lung 3 and 6 trials. *Annals of Oncology*, 27(11), 2103–2110.
- Yang, J., Meyer, M., Müller, A. K., Böhm, F., Grose, R., Dauwalder, T., Werner, S. (2010). Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis. *Journal of Cell Biology*, 188(6), 935–952.
- Yang, J. C.H., Sequist, L. V., Geater, S. L., Tsai, C. M., Mok, T. S. K., Schuler, M., Wu, Y. L. (2015). Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: A combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *The Lancet Oncology*, 16(7), 830–838.
- Yang, W., Yao, Y. W., Zeng, J. L., Liang, W. J., Wang, L., Bai, C. Q., Song, Y. (2014). Prognostic value of FGFR1 gene copy number in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Journal of Thoracic Disease*, 6(6), 803–809.
- Yanofsky, V. R., Mercer, S. E., & Phelps, R. G. (2011). Histopathological Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Journal of Skin Cancer*, 1–13.
- Yao, Y., Zhu, Z., Wu, Y., & Chai, Y. (2018). Histologic transformation from adenocarcinoma to both small cell lung cancer and squamous cell carcinoma after treatment with gefitinib. *Medicine (United States)*, 97(18), 0–2.
- Yonesaka, K., Dimitrova, N., Zamudio, J. R., Jong, R. M., Soukup, D., Resnick, R., Jacks, T. (2011). Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *PLoS ONE*, 32(7), 736–740.
- Yu, H. A., Arcila, M. E., Hellmann, M. D., Kris, M. G., Ladanyi, M., & Riely, G. J. (2014). Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Annals of Oncology*, 25(2), 423–428.

- Yu, H., Arcila, M., Rekhtman, N., Sima, C. S., & Maureen, F. (2013). Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR TKI therapy in 155 patients with EGFR mutant Lung Cancers. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 2240–2247.
- Yu, Helena A., Arcila, M. E., Rekhtman, N., Sima, C. S., Zakowski, M. F., Pao, W., Riely, G. J. (2013). Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 2240–2247.
- Yu, M., Donaldson, M. C., Sequist, L. V., Ciciliano, J. C., Ting, D. T., Wittner, B. S., Toner, M. (2013). Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science*, 339(6119), 580–584.
- Yuan, L., Zhang, H., Liu, J., Rubin, J. B., Cho, Y. J., Shu, H. K., MacDonald, T. J. (2013). Growth factor receptor-Src-mediated suppression of GRK6 dysregulates CXCR4 signaling and promotes medulloblastoma migration. *Molecular Cancer*, 12(1), 1.
- Yun, C.-H., Mengwasser, K. E., Woo, M. S., Toms, A. V., Meyerson, M., Wong, K.-K., Eck, M. J. (2008). The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 2070–2075.
- Yuzawa, S., Kano, M. R., Einama, T., & Nishihara, H. (2012). PDGFR β expression in tumor stroma of pancreatic adenocarcinoma as a reliable prognostic marker. *Medical Oncology*, 29(4), 2824–2830.
- Zeuner, A., Todaro, M., Stassi, G., & De Maria, R. (2014). Colorectal cancer stem cells: From the crypt to the clinic. *Cell Stem Cell*, 15(6), 692–705.
- Zhang, B., Strauss, A. C., Chu, S., Li, M., Ho, Y., Shiang, K. D., Bhatia, R. (2010). Effective Targeting of Quiescent Chronic Myelogenous Leukemia Stem Cells by Histone Deacetylase Inhibitors in Combination with Imatinib Mesylate. *Cancer Cell*, 17(5), 427–442.
- Zhang, H., Beyer, T. A., Beyer, T. A., Krampert, M., Williams, L. T., Werner, S., & Grose, R. (2004). Fibroblast growth factor receptor 1-IIIb is dispensable for skin morphogenesis and wound healing. *European Journal of Cell Biology*, 83(1), 3–11.
- Zhang, L., Ge, Y., & Fuchs, E. (2014). miR-125b can enhance skin tumor initiation and promote malignant progression by repressing differentiation and prolonging cell survival. *Genes and Development*, 28(22), 2532–2546.
- Zhao, B., Wang, L., Qiu, H., Zhang, M., Sun, L., Peng, P., Yuan, X. (2017). Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, 8(3), 3980–4000.
- Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 527(7579), 525–530.
- Zhong, C., Modrusan, Z., Kasman, I., Wu, X., Crawford, Y., Kaminker, J., Yu, L. (2009). PDGF-C Mediates the Angiogenic and Tumorigenic Properties of Fibroblasts Associated with Tumors Refractory to Anti-VEGF Treatment. *Cancer Cell*, 15(1), 21–34.
- Zhou, C., Wu, Y. L., Chen, G., Feng, J., Liu, X. Q., Wang, C., You, C. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 12(8), 735–742.
- Zorniak, M., Treisman, D. M., Ebben, J. D., Kutty, R. G., Clark, P. A., & Kuo, J. S. (2010). The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(6), 621–632.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

IDIBELL 
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge