

**SUBPROJECT 7: Study of the role of tumor associated fibroblasts (TAFs) during invasion and metastatic colonization of melanoma.**

**Principal Investigator:** *Dimas Tadeu Covas*

**Abstract**

Although cutaneous melanoma accounts for only 4% of skin cancer cases, it is responsible for 80% of deaths associated to this class of neoplasia (Miller and Mihm, 2006). Such clinical aggressiveness is attributed to the high propensity of melanoma cells to invade and metastasize.

It was demonstrated that ectopic expression of the same set of oncogenes leads to formation of metastatic tumors in modified melanocytes, but the same is not observed for fibroblasts (Gupta *et al.*, 2005). Therefore, the active molecular circuitries that characterize the melanocytic lineage might contribute to the acquisition of metastatic traits in melanoma cells.

However, although cancer cells are obviously the protagonists of invasion and metastasis, they are incapable of executing these tasks alone. The biochemical signaling between cancer cells and tumor associated fibroblasts (TAFs), for instance, is essential for the development of virtually all hallmarks of cancer, including the capacity to invade and to form distant metastases (Hanahan and Coussens, 2012).

The TAFs consist of a heterogeneous population of fibroblastic cells that can be recruited from surrounding tissues and/or distant locations, or they may be derived from differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) (Spaeth *et al.*, 2009). Within tumor microenvironment, TAFs secrete a wide range of bioactive molecules such as hepatocyte growth factor (HGF), which stimulates the mobility of neoplastic cells, and transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), which activates the process known as epithelial-mesenchymal transition, inducing carcinoma cells to acquire a fibroblastic and invasive phenotype (Chaffer and Weinberg, 2011). In addition, clinical studies have shown that the gene expression profile of TAFs predicts the outcome of patients with cancer (Koukourakis *et al.*, 2003).

Recent studies have been demonstrating that TAFs also plays a pivotal role during metastatic colonization, which is one of the limiting steps of the metastatic cascade. Although primary tumors shed millions of cells daily in the blood stream, formation of metastases is disproportionately rare (Tarin *et al.*, 1984). This is because the majority of extravasating cancer cells does not encounter a permissive environment to proliferate at the colonization site and therefore did not form metastases (Koop *et al.*, 1995). It was recently shown that only the carcinoma cells capable of inducing the expression of periostin on lung fibroblasts were capable of forming metastases in an experimental model of breast cancer (Malanchi *et al.*, 2012). In another study, depletion of S100A4+ fibroblasts drastically reduced the formation of breast cancer metastases without affecting the growth of primary tumors (O'Connell *et al.*, 2011). These evidences illustrate the relevance of heterotypic signaling between TAFs and cancer cells during the formation of metastases, the main cause of death in patients with cancer.

Motivated by the relevance of TAFs during the metastatic dissemination, the objective of this subproject is to investigate the interaction between cancer cells and TAFs using clinical samples of melanomas in different stages of progression. We intend to dissect the heterogeneity of TAFs

through single cell transcriptomic analysis and to investigate molecules differentially expressed in TAFs obtained from benign and metastatic tumors. We also aim to evaluate the mechanisms involved in the support of TAFs during the metastatic colonization of melanoma.

## Goals

Investigate the role of tumor-associated fibroblasts (TAFs) during the acquisition of invasive properties and during the metastatic colonization of human melanoma.

## Specific Goals

*1. Comparison of gene expression profile of TAFs isolated from melanoma samples in different clinical stages of progression.*

First, TAFs and normal fibroblasts will be isolated from patients diagnosed with melanoma in different clinical stages (from benign tumors to metastatic tumors). Next, TAFs and normal fibroblasts will be processed on the C1™ Single-Cell Auto Prep System for preparation of RNA-seq and exome libraries from single cells.

With this strategy, we intend to identify differentially expressed genes on fibroblastic cells from tumor stroma that are potentially relevant for the acquisition of metastatic traits in melanoma cells. Furthermore, the elucidation of gene expression profile in single TAFs will allow us to define subpopulations of TAFs in each clinical sample. It will pave the groundwork to investigate the relative contribution of TAFs subpopulations during the progression and metastasis of melanoma.

*2. Study of the interaction between TAFs and melanoma cells during the acquisition of metastatic traits in vitro.*

TAFs obtained from metastatic and non-metastatic tumors will be co-cultured with benign melanoma cells to investigate the acquisition of metastatic traits. In addition, metastatic melanoma cells will be co-cultured with TAFs derived from non-invasive tumors to evaluate whether melanoma aggressiveness is dependent on the stimuli provided by tumor stromal cells. During these assays, melanoma cells will be tested for 1) their capacity to invade tridimensional matrices of collagen and basal lamina (Matrigel); 2) their motility in transwell assays; 3) their avidity to fibronectin-coated surfaces and for 4) their potential of anchorage-independent growth in soft agar.

The assays described in this session will also be used to functionally evaluate the molecular targets identified during the “goal 1”.

*3. Study of interaction between TAFs and melanoma cells during metastatic dissemination.*

Melanoma cells obtained from tumors in different clinical stages of progression will be genetically engineered to express the bioluminescent reporter firefly luciferase. Next, these luciferase-expressing melanoma cells will be co-implanted with TAFs in immunodeficient mice for



## Researchers

Cleide Araújo Silva

Lucas Eduardo Botelho de Souza

Maristela Delgado Orellana

Virgínia Picanço e Castro

Dimas Tadeu Covas

Luciano Neder Serafini

Simone Kashima Haddad

Wilson Araújo Silva Júnior

## References

Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331, 1559–1564.

Gupta, P.B., Kuperwasser, C., Brunet, J.-P., Ramaswamy, S., Kuo, W.-L., Gray, J.W., Naber, S.P., and Weinberg, R.A. (2005). The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat. Genet.* 37, 1047–1054.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309–322.

Koop, S., MacDonald, I.C., Luzzi, K., Schmidt, E.E., Morris, V.L., Grattan, M., Khokha, R., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1995). Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate. *Cancer Res.* 55, 2520–2523.

Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Brekken, R.A., Sivridis, E., Gatter, K.C., Harris, A.L., and Sage, E.H. (2003). Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer Res.* 63, 5376–5380.

Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., and Huelsken, J. (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 481, 85–89.

Miller, A.J., and Mihm, M.C. (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355, 51–65.

O’Connell, J.T., Sugimoto, H., Cooke, V.G., MacDonald, B.A., Mehta, A.I., LeBleu, V.S., Dewar, R., Rocha, R.M., Brentani, R.R., Resnick, M.B., et al. (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16002–16007.

Spaeth, E.L., Dembinski, J.L., Sasser, A.K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M., and Marini, F. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* 4.

Tarin, D., Price, J.E., Kettlewell, M.G., Souter, R.G., Vass, A.C., and Crossley, B. (1984). Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res.* 44, 3584–3592.

**SUBPROJETO 7:** Estudo do papel de fibroblastos associados ao tumor (FATs) durante a invasão e colonização metastática de melanoma.

**Coordenador:** *Dimas Tadeu Covas*

## Introdução

Embora o melanoma cutâneo represente 4% dos casos de câncer de pele, ele é responsável por 80% das mortes associadas a essa classe de neoplasias (Miller and Mihm, 2006). Tal agressividade clínica é consequência da elevada propensão das células de melanoma para invadir tecidos circunjacentes e formar metástases.

Foi demonstrado que a expressão ectópica de oncogenes leva à geração de tumores metastáticos após a modificação gênica de melanócitos, o que não ocorre com fibroblastos (Gupta *et al.*, 2005). Portanto, os circuitos moleculares ativos que caracterizam a linhagem melanocítica são importantes para conferir o fenótipo invasivo das células de melanoma após transformação oncogênica.

No entanto, embora as células tumorais sejam as protagonistas do processo de invasão e metástase, elas são incapazes de realizar esta tarefa sozinhas. A sinalização bioquímica entre células tumorais e fibroblastos associados ao tumor (FATs), por exemplo, é essencial para o desenvolvimento de todas as características do câncer, inclusive a capacidade de invadir e formar metástases distantes (Hanahan and Coussens, 2012).

Os FATs consistem em uma população heterogênea de células fibroblásticas que podem ser recrutadas de regiões circunjacentes e/ou distantes, ou ainda podem ser originadas a partir da diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSCs) (Spaeth *et al.*, 2009). No microambiente tumoral, os FATs secretam moléculas como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), o qual estimula a mobilidade de células neoplásicas, e o fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF $\beta$ ), o qual ativa o processo denominado transição epitélio mesenquimal, fazendo com que células de carcinoma adquiram um fenótipo fibroblástico e invasivo (Chaffer and Weinberg, 2011). Além disso, estudos clínicos demonstram a correlação entre expressão de moléculas produzidas por TAFs e a sobrevida de pacientes com câncer (Koukourakis *et al.*, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado que os FATs exercem papel fundamental durante a colonização metastática, uma das etapas limitantes para a formação de metástase. Embora tumores primários liberem milhões de células tumorais diariamente na corrente sanguínea, a formação de metástases é um evento desproporcionalmente raro (Tarin *et al.*, 1984). Isto ocorre porque a maioria das células tumorais que colonizam sítios secundários não encontram um microambiente favorável são incapazes de proliferar e formar novas metástases (Koop *et al.*, 1995). Recentemente, demonstrou-se que apenas as células de carcinoma mamário capazes de induzir a expressão de periostina nas células estromais dos pulmões são capazes de formar metástases em modelo experimental (Malanchi *et al.*, 2012). Em outro estudo, a depleção de fibroblastos S100A4+ reduziu drasticamente a formação de metástases de carcinoma mamário sem alterar o crescimento do tumor primário (O'Connell *et al.*, 2011). Estas evidências demonstram a relevância da sinalização

entre FATs e células tumorais durante a formação de metástases, as quais são as principais responsáveis pelas mortes causadas por câncer.

Tendo em vista a relevância dos FATs na disseminação metastática, nosso objetivo será investigar os mecanismos de interação entre células de melanoma e TAFs a partir de amostras clínicas de tumores em diferentes estágios de progressão. Pretende-se utilizar técnicas de análise de expressão gênica em células únicas para dissecar a heterogeneidade da população de FATs e investigar moléculas diferencialmente expressas em FATs obtido de tumores benignos e metastáticos. Além disso, utilizaremos técnicas de co-cultivo *in vitro* e co-implante *in vivo* para validar funcionalmente possíveis alvos moleculares relevantes para a disseminação metastática mediada pela interação entre células tumorais e estroma.

## **Objetivo Geral**

Investigar o papel de fibroblastos associados ao tumor (TAFs) durante a aquisição de propriedades invasivas e durante a colonização metastática de melanoma humano.

## **Metas:**

*1. Comparação do perfil de transcrição gênica de TAFs isolados de melanoma em diferentes estágios de progressão.*

Esta etapa consiste em isolar TAFs e fibroblastos normais de pacientes diagnosticados com melanoma em diferentes estágio de progressão tumoral. Em seguida, os TAFs e fibroblastos normais serão processados na plataforma C1™ Single-Cell Auto Prep System para preparação das bibliotecas de RNA-Seq e exoma de células únicas.

Com isso, pretende-se identificar genes diferencialmente expressos nas células fibroblásticas do estroma tumoral os quais podem ser relevantes para a aquisição de propriedades invasivas do melanoma. Além disso, a informação do perfil de transcrição gênica em células únicas nos permitirá definir possíveis subpopulações de TAFs presentes em cada amostra clínica. Isto abrirá caminho para investigar o papel de subpopulações de TAFs na progressão e metástase de melanoma.

*2. Estudo da interação entre TAFs e células de melanoma durante a aquisição de propriedades invasivas in vitro.*

TAFs obtidos de tumores metastáticos e não metastáticos serão co-cultivados com células de melanoma benigno para avaliar a aquisição de propriedades invasivas nas mesmas. Além disso, células de melanoma metastático serão co-cultivadas com TAFs obtidos de tumores não invasivos para avaliar se a agressividade do melanoma é dependente do estímulo provido pelo estroma tumoral. Durante os ensaios, as células de melanoma serão avaliadas quanto à 1) capacidade invasiva em matrizes tridimensionais de colágeno e lâmina basal (Matrigel), 2) capacidade migratória em ensaios de transwell, 3) adesão à superfícies recobertas com fibronectina, 4) potencial de crescimento independente de ancoragem utilizando ágar.

Os ensaios conduzidos nesta etapa também serão utilizados para avaliar funcionalmente os alvos selecionados durante a meta 1.

### *3. Estudo da interação entre TAFs e células de melanoma durante a disseminação metastática*

Células de melanoma humano obtidas de tumores em diferentes estágios de progressão serão modificados para expressar luciferase co-implantados subcutaneamente com TAFs em camundongos imunodeficientes. Em seguida, o crescimento tumoral e o estabelecimento de metástases serão monitorados por processamento de imagem baseado em bioluminescência. Durante estes ensaios, TAFs obtidos de tumores metastáticos e não metastáticos serão co-implantados com células de melanoma dotadas de capacidades invasivas distintas para investigar a relevância dos TAFs no comportamento das células tumorais *in vivo*.

Os ensaios *in vivo* realizados nesta fase servirão como plataforma para os testes funcionais de alvos moleculares selecionados nas metas 1 e 2.

### *4. Caracterização de células estromais presentes nos pulmões durante a formação de metástases de melanoma em modelo murino de colonização.*

O papel de TAFs na formação de metástases será estudado em modelo murino de colonização metastática. Neste modelo, células de melanoma humano serão infundidas por via intravenosa para que haja a formação de metástases pulmonares. Após a consolidação das metástases, as mesmas serão removidas cirurgicamente dos pulmões e submetidas ao protocolo de isolamento de TAFs. Os TAFs obtidos das metástases serão, em seguida, submetidos à análise de expressão gênica por meio da técnica de sequenciamento de RNA (RNA seq). O perfil de expressão gênica dos TAFs presentes nas metástases será comparado ao de fibroblastos normais dos pulmões e à TAFs isolados de tumores primários gerados em camundongos. Com isso pretende-se identificar potenciais alvos moleculares nas TAFs que sejam importantes no suporte à colonização metastática de melanoma.

### *5. Avaliação funcional de alvos moleculares identificados em TAFs em modelo de colonização metastática de melanoma.*

Após a seleção dos potenciais alvos terapêuticos feito (meta 4), estratégias de silenciamento gênico ou superexpressão serão empregados para avaliar o papel de cada candidato no modelo de colonização metastática de melanoma. Para tanto, pretende-se 1) alterar a expressão dos receptores nas células de melanoma específicos contra de moléculas produzidas pelos TAFs e 2) modular a expressão ou atividade dos alvos selecionados por meio do uso de anticorpos inibidores ou pequenas moléculas.

## Cronograma de execução referente a 6 anos de projeto:

Metas	Semestres											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	■	■	■	■								
2				■	■	■	■					
3								■	■	■	■	■
4	■	■	■	■	■	■						
5				■	■	■	■	■	■	■	■	■

## Pesquisadores

Cleide Araújo Silva

Lucas Eduardo Botelho de Souza

Maristela Delgado Orellana

Virgínia Picanço e Castro

Dimas Tadeu Covas

Luciano Neder Serafini

Simone Kashima Haddad

Wilson Araújo Silva Júnior

## Referências

Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331, 1559–1564.

Gupta, P.B., Kuperwasser, C., Brunet, J.-P., Ramaswamy, S., Kuo, W.-L., Gray, J.W., Naber, S.P., and Weinberg, R.A. (2005). The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat. Genet.* 37, 1047–1054.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309–322.

Koop, S., MacDonald, I.C., Luzzi, K., Schmidt, E.E., Morris, V.L., Grattan, M., Khokha, R., Chambers, A.F., and Groom, A.C. (1995). Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate. *Cancer Res.* 55, 2520–2523.

Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Brekken, R.A., Sivridis, E., Gatter, K.C., Harris, A.L., and Sage, E.H. (2003). Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer Res.* 63, 5376–5380.

Malanchi, I., Santamaria-Martínez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., and Huelsken, J. (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 481, 85–89.



Miller, A.J., and Mihm, M.C. (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355, 51–65.

O’Connell, J.T., Sugimoto, H., Cooke, V.G., MacDonald, B.A., Mehta, A.I., LeBleu, V.S., Dewar, R., Rocha, R.M., Brentani, R.R., Resnick, M.B., et al. (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16002–16007.

Spaeth, E.L., Dembinski, J.L., Sasser, A.K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M., and Marini, F. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* 4.

Tarin, D., Price, J.E., Kettlewell, M.G., Souter, R.G., Vass, A.C., and Crossley, B. (1984). Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res.* 44, 3584–3592.