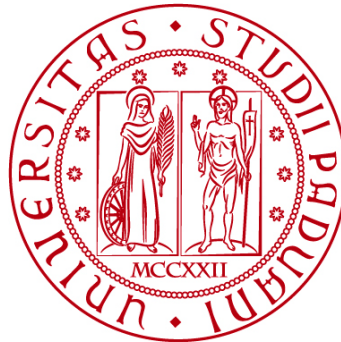


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**La perdita di espressione di FGFR4 promuove il fenotipo  
maligno nell'adenocarcinoma duttale del pancreas**

**Tutor**

Prof. Luigi Leanza  
Dipartimento di Biologia

**Co-tutor**

Dott.ssa Valentina Brillo  
Dipartimento di Biologia

**Laureando**  
Carlo Alberto Flora

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



# Indice

<b>1. ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2. STATO DELL'ARTE .....</b>	<b>3</b>
2.1. Adenocarcinoma duttale del pancreas .....	3
2.2. Classificazione molecolare dei sottotipi .....	4
2.3. Microambiente tumorale (TME) .....	5
2.3.1. Matrice extracellulare .....	6
2.3.2. Vascolarizzazione interna al tumore .....	6
2.3.3. Cancer Associated Fibroblasts (CAFs) .....	7
2.4. Transizione Epitelio-Mesenchimale .....	8
2.5. Fibroblast Growth Factor Receptor 4 .....	8
2.6. La via di segnale di mTOR .....	9
<b>3. APPROCCIO SPERIMENTALE .....</b>	<b>11</b>
3.1. Linee cellulari .....	11
3.2. Organoidi derivati da Paziente (PDOs) .....	11
3.3. Modelli murini .....	11
3.4. RNA <i>interference</i> .....	12
3.5. Ibridazione <i>in situ</i> .....	13
3.6. Western blot .....	14
3.7. Immunoistochimica .....	15
3.8. Single cell RNA sequencing .....	15
3.9. Kaplan-Meier plot .....	15
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>17</b>
4.1. FGFR4 è associato al sottotipo <i>classical</i> del PDAC .....	17
4.2. La perdita di FGFR4 promuove un fenotipo maligno nel PDAC .....	18
4.3. La perdita di FGFR4 è associata ad un aumento delle caratteristiche <i>basal-like</i> del tumore al pancreas .....	20
4.4. La perdita di FGFR4 genera un aumento del flusso nella via di segnale di mTOR .....	21
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>23</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>25</b>
<b>Appendice .....</b>	<b>27</b>



## 1. ABSTRACT

L'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) è una patologia di particolare interesse nel campo della ricerca oncologica vista l'elevata aggressività e mortalità: infatti presenta un tasso di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 10%, con una mediana minore di 11 mesi dalla diagnosi, divenendo, a partire dal 2030, la seconda causa di morte per tumore negli Stati Uniti. Vista l'elevata eterogeneità mutazionale inter-paziente, la classificazione risulta essere ardua e tuttora incompiuta. Tuttavia, mediante dati di RNA Sequencing, si sono potuti identificare due sottotipi molecolari, *classical* e *basal-like*, caratterizzati da differenti prognosi e comportamenti clinici. Inoltre, la loro identificazione è stata utile per lo sviluppo di terapie sottotipo-specifiche.

Nel presente studio, gli autori hanno analizzato il coinvolgimento del recettore FGFR4 e l'effetto della sua perdita di espressione in funzione dell'aggressività tumorale nel PDAC e del conseguente fenotipo.

Tale recettore è esclusivamente espresso a livello di cellule epiteliali, in maniera particolare nel sottotipo *classical*, e un'alta espressione dello stesso è associata ad una migliore prognosi.

Lo studio ha indagato inoltre gli effetti causati dalla deplezione di FGFR4, mostrando che tale condizione promuove un fenotipo maligno, determinando una più elevata crescita della massa tumorale oltre che del numero di metastasi disseminate. La perdita di FGFR4 è altresì associata ad una transizione del fenotipo da *classical* a *basal-like*; i risultati così suggeriscono che l'espressione di *FGFR4* limiti la sovra-regolazione di vie di segnale legate al sottotipo *basal-like* e dunque correlate all'aggressività del PDAC.

In ultima analisi, lo studio ha potuto osservare come la perdita di FGFR4 determini un'iperattivazione di mTORC1, un complesso chiave nella via di segnale mTOR, comportando una serie di effetti a valle, uno dei quali riguarda un aumento della sintesi proteica generale.

In conclusione, visti i risultati ottenuti e presentati nell'articolo, gli autori mostrano come i livelli endogeni di FGFR4 limitino il fenotipo maligno nel tumore al pancreas e propongono tale recettore come un possibile *marker* per la stratificazione prognostica dei pazienti affetti da PDAC.



## 2. STATO DELL'ARTE

### 2.1. Adenocarcinoma duttale del pancreas

L'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) è un tipo di tumore al pancreas considerato quello a più alta letalità tra le neoplasie comuni a causa della frequente diagnosi in stadio avanzato e della resistenza alle terapie (rappresenta l'85% di tutte le neoplasie del pancreas)<sup>1</sup>.

Il PDAC nello specifico è un tumore che colpisce le cellule epiteliali che costituiscono i dotti del pancreas, necessari per il trasporto dei succhi pancreatici.

A testimonianza di quanto sopra, negli Stati Uniti il PDAC rappresenta la terza causa principale di morte correlata a tumori, con un tasso di mortalità tra i più alti dei tumori solidi maligni, con una sopravvivenza a 5 anni minore del 10%<sup>2</sup>.

I tumori al pancreas si possono dividere in 2 gruppi, i neuroendocrini e gli esocricini: i primi si sviluppano a partire da cellule della componente endocrina (Isole di Langerhans) che sono responsabili della secrezione di enzimi quali insulina e glucagone e rappresentano meno del 5% di tutti i casi di tumori al pancreas; i secondi si sviluppano dalle cellule delle ghiandole esocrine e dei dotti pancreatici, rappresentano circa il 95% dei tumori pancreatici e tra questi tumori esocricini rientra anche il PDAC<sup>1</sup>.

I principali fattori di rischio sono fumo, diabete mellito (quando di lunga data), pancreatiti croniche, obesità e inattività in generale, inoltre si è stimato che tra il 5% e il 10% dei tumori del pancreas sia presente una componente ereditaria<sup>1</sup>.

Lo sviluppo tumorale è il risultato di instabilità genomica causata da mutazioni somatiche, riarrangiamenti cromosomici, alterazioni *copy-number* e variazioni epigenetiche, comportando la perdita di geni oncosoppressori o l'attivazione di oncogeni; tra le principali mutazioni, dette mutazioni somatiche semplici (mutazioni puntiformi e piccole inserzioni e delezioni), si ritrovano quelle a carico dei geni *KRAS* (90% dei casi di PDAC), *TP53* (80% dei casi), *CDKN2A* (60% dei casi) e *SMAD4* (40% dei casi)<sup>2</sup>. L'elevata frequenza di mutazioni in *KRAS* e la sua precoce attivazione implicano che la segnalazione oncogenica di Rat-sarcoma (RAS) sia la principale promotrice della carcinogenesi e anche nei tumori in cui *KRAS* è *wildtype* (non frequente) questo tipicamente supporta alterazioni in altri driver oncogenici della via RAS, tra cui *GNAS*, *BRAF* e *CTNGB1* o in alternativa un arricchimento di mutazioni che attivano la via di segnale di mTOR<sup>2</sup>.

Diversi studi hanno confermato il modello di progressione del PDAC come un modello multi-step con insorgenza e accumulo di alterazioni genetiche che determinano la formazione di lesioni neoplastiche intraepiteliali pancreatiche (PanINs) in un primo stadio, fino alla definizione di uno stadio invasivo dell'adenocarcinoma (figura 2.1).

La mutazione chiave di *KRAS* si è osservata nella maggior parte delle PanINs a basso grado, suggerendo che sia questa alterazione genetica l'evento iniziale che promuove tale neoplasia; insieme a questa mutazione si sono rilevate delle altre mutazioni a perdita di funzione in geni chiave (*TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*) che insorgono in uno stadio più tardivo, determinando delle PanINs di grado elevato<sup>2</sup>.

Queste quattro mutazioni chiave sono particolarmente rilevanti anche dal punto di vista clinico perché permettono di determinare in quale stadio dello sviluppo neoplastico si trovi ciascun paziente al momento dell'analisi genetica.

A queste principali mutazioni, si aggiunge un ampio pannello di ulteriori alterazioni genetiche che differiscono da soggetto a soggetto, dove tale divergenza di *pattern* mutazionale rende particolarmente complesso generare una corretta stratificazione dei pazienti.

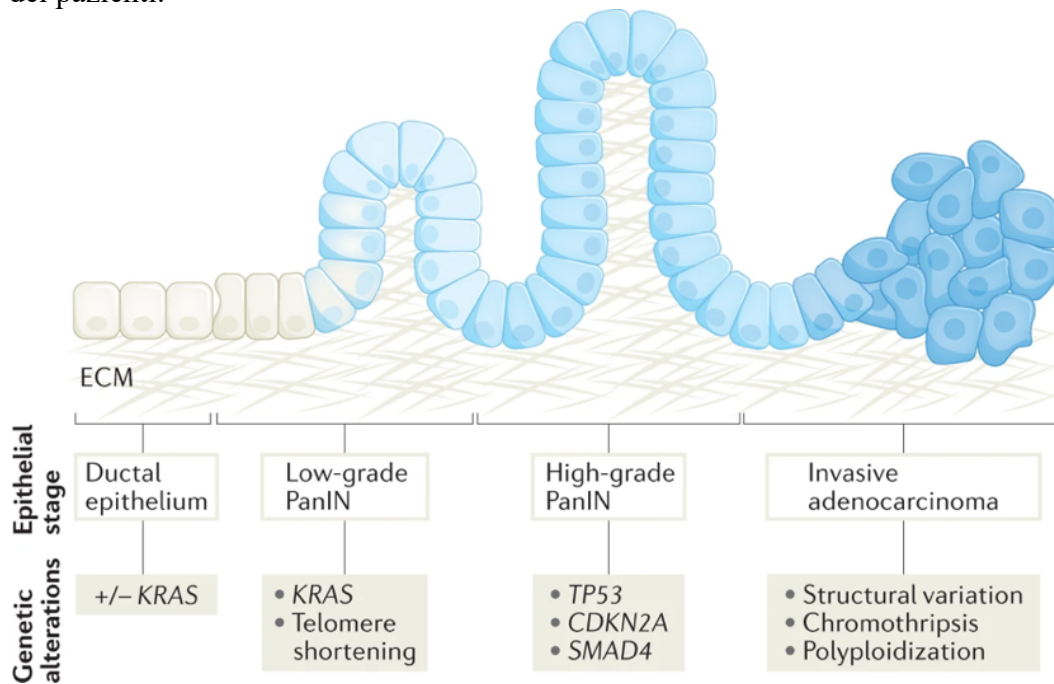


Figura 2.1. - Modello di progressione tumorale nel PDAC e relativi stage istologici<sup>2</sup>

## 2.2. Classificazione molecolare dei sottotipi

Lo sviluppo di classificazioni molecolari basate su differenti approcci omici ha permesso di classificare in maniera *unbiased* i vari sottotipi di PDAC, risultando robusti e riproducibili, come già applicato per altri tumori solidi (es. cancro al colon-retto).

Tra le classificazioni di maggior rilievo, ricordiamo quella di Collisson et al. (2011), che suddivide la neoplasia in 3 sottotipi: *Classical*, *Quasi-Mesenchymal* (QM-PDA) ed *Exocrine-like*. Inoltre, Bailey et al. (2016) ha definito quattro sottotipi, basandosi su dati di trascrittomica: *Squamous*, *Pancreatic Progenitor*, *Immunogenic* e *ADEX*<sup>3</sup>.

Infine, la classificazione più comunemente utilizzata è stata redatta da Moffitt et al. (2015). Essa, basata su analisi di tipo trascrittomico, suddivide il tumore in due principali sottotipi ovvero il “*classical*” e “*basal-like*”, suddividendo anche lo stroma circostante in due sottotipi (Normale e Attivato).

I due sottotipi si basano sulla presenza di caratteristiche diverse dell’epitelio neoplastico: il *classical* è considerato il sottotipo base del tumore pancreatico ed è caratterizzato dall’espressione di fattori di trascrizione coinvolti nella specificazione e nel mantenimento del destino delle cellule pancreatiche (es. GATA6, HNF1A, HNF4A), mentre il sottotipo *basal-like* è associato ad una perdita dell’identità endodermica nel pancreas, così come dall’espressione del principale regolatore del programma cellulare basale  $\Delta$ Np63, unito a un arricchimento dell’inattivazione di TP53 e di regolatori della cromatina, determinando una



prognosi peggiore rispetto al sottotipo *classical*. Sempre il sottotipo *basal-like* è inevitabilmente associato all'impoverimento dell'espressione di fattori di trascrizione che regolano il destino delle cellule pancreatiche, dove si è visto che il mantenimento di tale destino è garantito anche dalla segnalazione di fattori di crescita mediante recettori tirosin-chinasici<sup>3</sup>.

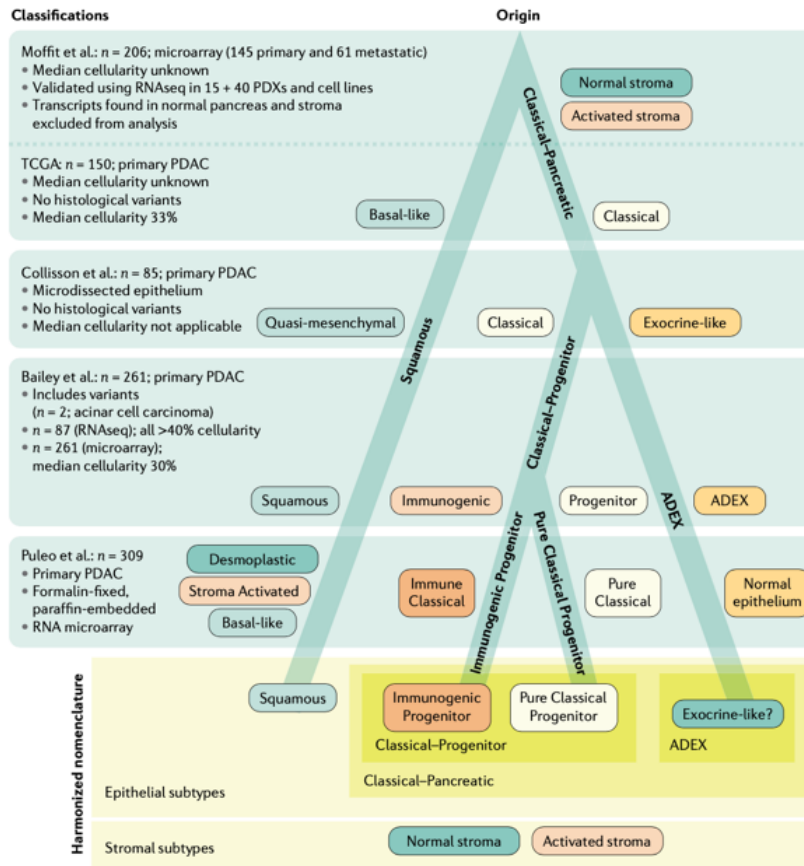


Figura 2.2. - Classificazione dei sottotipi tumorali nell'adenocarcinoma duttale del pancreas<sup>3</sup>

### 2.3. Microambiente tumorale (TME)

Il 90% dell'intera massa tumorale del PDAC è rappresentata da un denso stroma. All'interno di esso si trova una componente cellulare e una componente non cellulare. La prima è rappresentata da una peculiare tipologia di fibroblasti, i quali, per la loro funzione pro-tumorale, vengono denominati *Cancer Associated Fibroblasts* (CAFs), da cellule endoteliali, da periciti, da neuroni e da cellule del sistema immunitario infiltrate; la seconda, invece, comprende la matrice extracellulare (ECM) e le citochine prodotte dalle cellule del sistema immunitario<sup>4</sup>. Lo stroma gioca un ruolo chiave nel supportare la progressione del tumore, il quale è anche condizionato da una condizione di ipovascolarizzazione: i vasi sanguigni, infatti, risultano poco funzionali, compressi a causa dell'elevata pressione interstiziale e si sviluppano prevalentemente nella periferia del tumore, lasciando dunque la porzione centrale poco irrorata e in una condizione di ipossia<sup>4</sup>. Questo è dovuto a diversi fattori, alcuni estrinseci (dovuti a proprietà chimico-fisiche dell'ECM) e altri intrinseci (dovuti all'attivazione di cellule endoteliali e all'angiogenesi tumorale). Il ruolo chiave dei componenti dello stroma nella progressione tumorale fa sì che essi possano risultare potenziali target terapeutici,

il che risulta fondamentale considerando che la matrice extracellulare, ad esempio, rappresenta una barriera fisica che impedisce la penetrazione dei farmaci, rendendo quindi meno efficaci le potenziali terapie<sup>5</sup>.

### 2.3.1. Matrice extracellulare

Una caratteristica peculiare del PDAC a livello istologico è la desmoplasia, ovvero una reazione fibrotica indotta dalle cellule tumorali, le quali stimolano i fibroblasti (CAFs) ad incrementare l'espressione di geni della famiglia del collagene e della fibronectina attraverso un meccanismo paracrino, comportando un'eccessiva deposizione di ECM<sup>4</sup>. L'ECM è principalmente sintetizzata dalle cellule tumorali e dai CAFs, i quali sono reclutati per primi dalle cellule tumorali grazie alla secrezione di *Sonic Hedgehog* (Shh), *Transforming growth factor beta 1* (TGF- $\beta$ 1), *Fibroblast growth factor 2* (FGF2) e *Platelet-derived growth factor* (PDGF)<sup>5</sup>.

Le principali componenti dell'ECM sono i collagene di tipo I, III e IV, che fungono da proteine strutturali, dove quello di tipo IV ha un potenziale come biomarker predittivo della sopravvivenza post-operatoria<sup>4</sup>.

I collagene sono delle componenti biologicamente attive dello stroma tumorale, ovvero non fungono solo da proteine strutturali, bensì hanno un effetto diretto sulla proliferazione delle cellule tumorali, sulla sopravvivenza e sulle metastasi<sup>4</sup>.

Oltre al collagene e alla fibronectina, lo stroma è composto da elastina, acido ialuronico (HA) e altri glicosamminoglicani, che cooperano nella generazione di uno stroma rigido, la cui densità sta proprio alla base della caratteristica struttura di "barriera fisica" dell'ECM tumorale del PDAC<sup>5</sup>.

Aspetto fondamentale per gli studi farmacologici è considerare che l'ECM si comporti come una barriera verso i trattamenti chemioterapici anche a causa dell'aumento della pressione del fluido interstiziale (IFP) all'interno del TME<sup>4</sup>.

A dimostrazione di ciò, l'utilizzo di ialuronidasi come trattamento terapeutico contro l'ECM, nello specifico contro l'acido ialuronico, ha mostrato un'effettiva riduzione della quantità di HA e a sua volta determinando una diminuzione dell'IFP<sup>4</sup>; in maniera analoga sono in fase di studi preclinici anche inibitori di chinasi delle adesioni focali (FAKs) che dai dati preliminari sembrano determinare un maggiore sopravvivenza, così come mediante trattamento di inibitori delle protein-chinasi associate a Rho (ROCKs)<sup>4</sup>.

### 2.3.2. Vascolarizzazione interna al tumore

Sebbene lo stroma del PDAC sia ipovascolarizzato, si può osservare un'elevata variabilità in termini di Densità Micro-Vasale (MVD), la quale, quando poco rappresentata, è associata ad una bassa sopravvivenza, con una relazione inversa alla superficie stromale<sup>4</sup>. Il tessuto tumorale è oltretutto caratterizzato dalla presenza di una vascolatura con perdite di fluidi, limitata perfusione e ciò porta alla generazione di un ambiente ipossico, che rappresenta un aspetto fulcro nel PDAC; inoltre, lo stroma fibroso pare contribuisca alla riduzione del flusso ematico, la cui elevata pressione interstiziale sembra possa compromettere la capacità dei farmaci di raggiungere il tumore primario<sup>1</sup>; un approccio che sembra possa aiutare la corretta *delivery* del farmaco è attraverso la normalizzazione dei vasi sanguigni,

mediante il ripristino della corretta struttura vascolare, grazie alla somministrazione di precise concentrazioni di farmaco. Questa strategia permette di aumentare la copertura dei vasi tramite i periciti e ripristinare le giunzioni cellula-cellula, in questo modo riducendo la fuoriuscita di liquidi dai vasi e ripristinando la corretta perfusione all'interno del tumore primario<sup>4</sup>.

Come dimostrato da studi preclinici, l'angiogenesi gioca un ruolo chiave nel PDAC, così come in altre tipologie tumorali, infatti sono tuttora in analisi lo studio di farmaci che bersagliano i vasi sanguigni, ovvero lo sviluppo della terapia anti-angiogenica; nonostante i promettenti risultati iniziali, ad oggi non sono disponibili agenti anti-angiogenici per il trattamento terapeutico nel PDAC, poiché in seguito viene sviluppata chemoresistenza<sup>4</sup>.

### 2.3.3. Cancer Associated Fibroblasts (CAFs)

I fibroblasti sono, in generale, delle cellule di supporto di origine mesenchimale molto rappresentate in tutti gli organi solidi, dove in ogni distretto anatomico presentano un *pattern* di espressione genica tessuto-specifico; in contesto tumorale si è dimostrato che un sottotipo specifico di fibroblasti, i *Cancer Associated Fibroblasts* (CAFs), giocano un ruolo chiave nello sviluppo iniziale, nella progressione e nella metastatizzazione del tumore, rendendoli di fatto dei potenziali target per lo sviluppo di strategie terapeutiche<sup>4</sup>.

Questi CAFs possono derivare da altri tipi cellulari, come dall'attivazione di fibroblasti residenti, transdifferenziamento di cellule epiteliali/periciti, differenziamento di cellule progenitrici mesenchimali localizzate nel tumore, piuttosto che dal differenziamento di cellule stromali derivanti dal tessuto adiposo o ancora da cellule staminali tumorali<sup>5</sup>. In generale, i CAFs sembrano essere anche in grado di influenzare l'eterogeneità delle cellule del PDAC, promuovendone un fenotipo invasivo e proliferativo. Vari studi sono stati attuati per eseguire una caratterizzazione molecolare dell'eterogeneità dei CAFs, sfruttando co-culture 3D *in vitro* di *Pancreatic Stellate Cells* (PSCs) e organoidi tumorali pancreatici murini. Le PSCs sono caratterizzate dall'espressione differenziale di geni chiave e i CAFs che ne derivano assumono profili diversi a seconda della diversa localizzazione rispetto alla massa tumorale: l'espressione dell' $\alpha$ -actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA) porta all'assunzione di un profilo miofibroblastico (myCAFs), l'espressione di IL-6 determina invece un profilo infiammatorio (iCAFs), come l'espressione di MHC-II comporta un profilo di presentazione antigenica (apCAF) e da ultimi si identificano le "*bone marrow-derived mesenchymal stem cells*" (mscCAFs) caratterizzate dai marker CD44, CD49a, CD73 e CD90<sup>4</sup>.

In ultima analisi numerose evidenze mostrano che le proprietà pro-tumorigeniche svolte dagli iCAFs giocano un ruolo importante nella biologia dello stroma del PDAC, a differenza dei myCAFs che invece manifestano delle proprietà antitumorali<sup>4</sup>.

## 2.4. Transizione Epitelio-Mesenchimale

La Transizione Epitelio-Mesenchimale (EMT) rappresenta un programma di transdifferenziamento reversibile e transiente coinvolto in numerosi contesti come lo sviluppo embrionale, la riparazione tissutale e la tumorigenesi e controllato dalle interazioni di molteplici vie di segnalazione come TGF- $\beta$ , Wnt e Notch<sup>6</sup>. Durante questo processo, si verificano numerose alterazioni genetiche ed epigenetiche, dove il cambiamento fenotipico è permesso da una serie di fattori di trascrizione come Slug, Snail, Twist e Zeb; il fulcro dell'EMT è dato da una variazione del profilo trascrizionale cellulare quale ad esempio la repressione della E-caderina e l'attivazione della N-caderina, così come l'elevata espressione di metalloproteinasi di matrice (MMP). Questo meccanismo permette alle cellule neoplastiche di acquisire le caratteristiche di invasività e di metastasi. Nel PDAC, l'EMT è correlata con un profilo cellulare indifferenziato e con un alto livello di Snail; inoltre, cellule che vanno incontro a EMT risultano essere vicine alla staminalità, con conseguente incremento della capacità di tumorigenesi, e aumento del potenziale di metastatizzazione in organi secondari. Nel PDAC la proprietà pro-tumorale del microambiente gioca un ruolo chiave nell'attivazione dell'EMT, il quale mantiene un'uguale importanza durante tutti gli step della progressione neoplastica<sup>6</sup>.

## 2.5. Fibroblast Growth Factor Receptor 4

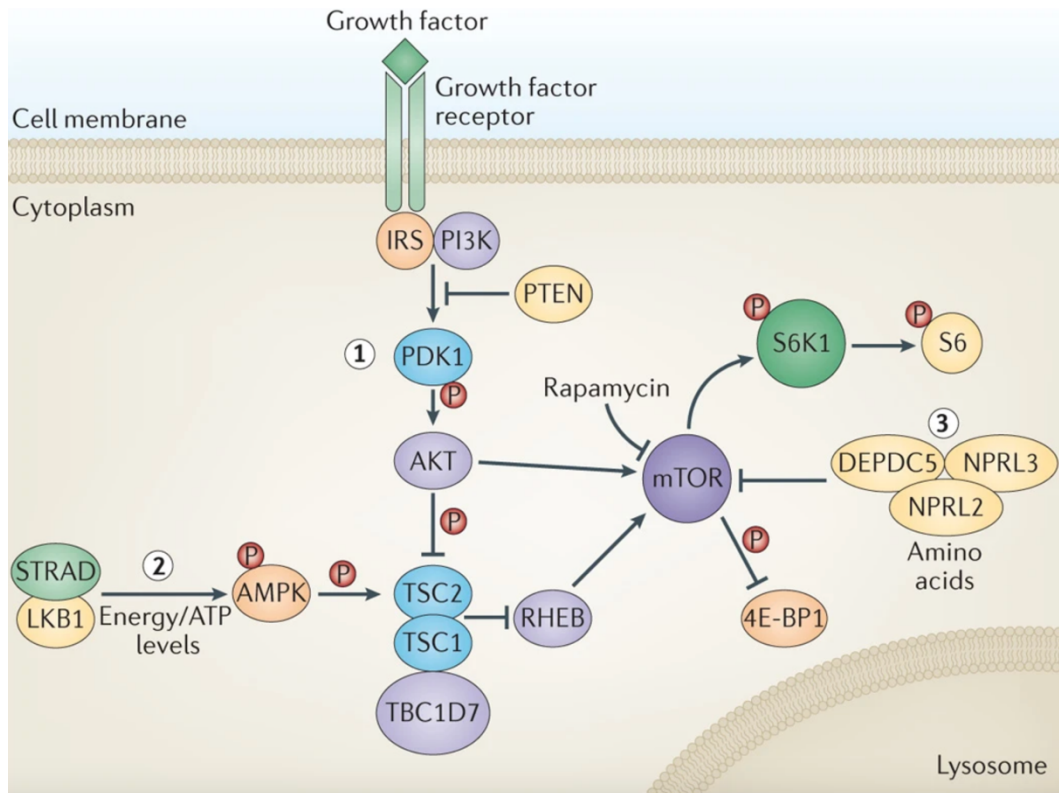
I *Fibroblast Growth Factor Receptors* (FGFRs) sono una famiglia di recettori tirosin-chinasici coinvolti in molteplici processi quali lo sviluppo embrionale, la proliferazione cellulare, il differenziamento e la riparazione tissutale<sup>7</sup>.

I recettori tirosin-chinasici giocano un ruolo centrale nella determinazione del destino cellulare, permettendo la trasduzione intracellulare dei segnali e comportando variazioni del *pattern* trascrizionale della cellula; nello specifico si è visto come l'asse *Fibroblast Growth Factors* (FGFs)-FGFRs sia coinvolto nella maturazione del profilo pancreatico a partire da quello endodermico e per questo motivo in questo studio gli autori si sono focalizzati nell'esplorare il coinvolgimento di FGFR4 nella determinazione del sottotipo molecolare di PDAC. FGFR4 è un recettore della stessa famiglia e consiste in un recettore tirosin-chinasico, il cui ligando principale è FGF19<sup>7</sup>. Nei tumori del pancreas FGFR4 risulta essere sovra-espresso, come anche in molti altri tumori, e la sua interazione con FGF19 porta all'attivazione di quattro differenti vie di segnale: la prima è la *Rat-sarcoma* (Ras)/*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* (Raf)/*Mitogen-Activated protein kinase* (MAPK), segue la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/*Protein-kinase B* (Akt), oltre all'EMT e alla via *Signal transducer and activation of transcription* (STAT)<sup>7</sup>. Ciò ha dimostrato come FGFR4 sia in particolare coinvolto nello sviluppo neoplastico e nella progressione tumorale, rendendolo così un possibile futuro target terapeutico<sup>7</sup>.

## 2.6. La via di segnale di mTOR

*Mechanistic Target Of Rapamycin* (mTOR) è una serina/treonina protein-chinasi che si trova nella maggioranza delle vie di segnale, giocando un ruolo chiave nell'organizzazione della fisiologia cellulare e dell'organismo di tutti gli eucarioti; inizialmente si è osservato avere un ruolo cruciale nel controllo della crescita cellulare, dove è in grado di integrare le informazioni riguardo la biodisponibilità di nutrienti ed energia, così da coordinare la sintesi (es. sintesi proteica) e la degradazione di biomolecole (figura 2.3). A conferma di questo si è rilevato che una deregolazione della sua via comporta l'alterazione dell'omeostasi cellulare e può promuovere l'eccessiva crescita nel contesto tumorale e nelle patologie associate all'invecchiamento e al metabolismo<sup>8</sup>. mTOR costituisce la subunità catalitica dei complessi mTORC1 e mTORC2, i quali differiscono per le proteine accessorie con cui interagiscono, così come per i substrati e le funzioni.

Nel contesto neoplastico mTOR è raramente mutata, sebbene la sua attività sia facilmente modulabile mediante variazioni delle vie di segnale a monte, come PI3K-Akt e Ras-driven MAPK. Infatti, la segnalazione di mTOR si trova iperattivata fino all'80% dei tumori umani, giocando un ruolo centrale nel sostenere la crescita delle cellule cancerose e la loro sopravvivenza<sup>8</sup>.



**Figura 2.3.** - Via di segnalazione di mTOR; tratto da Crino et al., *Nature Review Neurology* (2016)



### 3. APPROCCIO SPERIMENTALE

#### 3.1. Linee cellulari

In questo articolo sono state utilizzate 12 diverse linee cellulari 2D, alcune delle quali sono state acquistate attraverso canali commerciali come l'*American Type Culture Collection* (ATCC), mentre altre sono state ottenute da colleghi di altri gruppi di ricerca.

Di queste linee, HPAF-II, PANC1, SUIT-2 e AsPC-1 sono state cresciute in DMEM medium con 10% siero bovino fetale (FBS) e 1% Penicillina-Streptomicina (Pen-Strep), mentre le linee hM1, hF2, Hs766T e hT1 in RPMI medium, arricchito con 10% FBS e 1% Pen-Strep; ambedue i gruppi sono stati mantenuti a 37°C in incubatore umidificato e al 5% di CO<sub>2</sub>.

HPAF-II, ovvero la principale linea cellulare utilizzata, deriva da PDAC umano e rappresenta una linea stabilizzata del sottotipo *classical*, mentre PANC1 deriva da paziente affetto da carcinoma epitelioide ed è classificabile come sottotipo *basal-like*.

#### 3.2. Organoidi derivati da Paziente (PDOs)

Gli organoidi sono una tipologia di coltura cellulare 3D molto utilizzata e con un elevato potenziale perché in grado di ricreare i principali aspetti morfologici, fisiologici e ambientali di un normale organo (umano) ma *in vitro*, permettendo così di investigare la progressione di una patologia; essi sono inoltre capaci di auto-organizzarsi e di auto-rinnovarsi permettendo così il mantenimento e la propagazione *in vitro* in piastra di coltura<sup>9</sup>.

Nel contesto del pancreas, gli organoidi possono essere rapidamente generati a partire da resezioni chirurgiche e biopsie, sia da tessuto pancreatico sano che maligno; inoltre, si è dimostrato come il trapianto ortotopico di organoidi pancreatici murini *wildtype* sia in grado di rigenerare la normale architettura duttale nel pancreas, non realizzabile con altre colture 3D<sup>9</sup>.

Un aspetto innovativo di possibile applicazione degli organoidi in futuro riguarda la possibilità di sviluppare degli approcci terapeutici personalizzati per il singolo paziente affetto da PDAC, proprio grazie alla possibilità di stabilizzare una coltura di organoidi a partire già dalla sua biopsia<sup>9</sup>.

In questo lavoro, D'Agosto et al., si sono avvalsi dell'utilizzo di cinque linee di organoidi derivanti da pazienti, che sono stati utilizzati per vari esperimenti spiegati in seguito.

#### 3.3. Modelli murini

I modelli murini sono ampiamente utilizzati per studiare molteplici patologie (es. tumori, malattie neurodegenerative, malattie mitocondriali) grazie alla capacità di ricapitolare *in vivo* quello che avviene durante la malattia umana e ciò è possibile grazie alla complessa rete di interazioni tra vari tipi cellulari e la matrice circostante tipica di un modello sperimentale; l'ulteriore vantaggio di tali modelli deriva dalla

vicinanza filogenetica tra i due organismi (*Homo sapiens* – *Mus musculus*) che permette un'ottima modellizzazione delle patologie.

Questa modellizzazione non è invece applicabile in modelli *in vitro*, dove è possibile studiare una sola linea cellulare alla volta, perdendo quindi tutte le interazioni con le altre tipologie cellulari e l'ambiente circostante (es. ECM).

Per questo lavoro sono stati utilizzati dei modelli murini NOD *scid* gamma (NSG) (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>;Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>), caratterizzati da un'elevata compromissione del sistema immunitario, per questo definiti immunodeficienti visto il *background* genetico; la scelta di tali modelli *scid* immunocompromessi deriva dal fatto che, se così non fosse, il sistema immunitario dei topi riconoscerebbero come *non-self* le cellule/organoidi umani che vengono trapiantati nel topo.

Questi modelli murini sono portatori di 2 mutazioni NOD/ShiLtJ e una condizione di completa disfunzionalità degli alleli codificanti la catena gamma del recettore per IL-2 (*IL2rg*<sup>null</sup>), nonché un'immunodeficienza combinata grave (*scid*), ovvero una mutazione del gene *Prkdc* che codifica una proteina facente parte il complesso di riparazione del DNA. Tale condizione rende questi modelli deficienti in linfociti T e B, nonostante risultino fertili, di taglia normale e non presentino alcuna anomalia fisica o comportamentale.

Nello studio sono stati considerati un minimo di cinque innesti riusciti per ciascun esperimento al fine di identificare delle solide differenze in termini di crescita tumorale tra i gruppi. Per i trapianti ortotopici sono state iniettate 1x10<sup>6</sup> cellule/organoidi a livello della coda del pancreas con l'utilizzo di siringhe da insulina, in topi precedentemente anestetizzati mediante isoflurano, grazie ad un'incisione eseguita sul lato addominale sinistro a livello della milza; la parete addominale è stata poi suturata con suture assorbibili *vicryl*, mentre la cute è stata chiusa con delle clip.

In ultima analisi i modelli murini sono stati sacrificati circa dopo 4-5 settimane, nel momento in cui la massa tumorale aveva raggiunto i 10 mm di diametro.

### 3.4. RNA interference

L'interferenza dell'RNA (RNAi) è un complesso di metodiche utilizzate in biologia molecolare che derivano dall'osservazione di meccanismi endogeni di silenziamento genico post-trascrizionale; queste metodiche vengono applicate su cellule, tessuti o modelli animali per la generazione di modelli *knock-down* (KD), ossia modelli che esprimono una ridotta quantità della proteina di interesse grazie al silenziamento opportuno del relativo mRNA codificante tale proteina. Queste tecniche sperimentali risultano particolarmente efficaci soprattutto quando ci si interfaccia a dei geni la cui delezione completa (es. *knock-out*) determina letalità nel modello.

Dal punto di vista metodologico esistono diversi approcci sperimentali di RNAi, dove alcuni dei principali sono lo *small-interfering RNA* (siRNA) e lo *short-hairpin RNA* (shRNA): il primo è caratterizzato da frammenti a doppio filamento di RNA (dsRNA) di 21 paia di basi (bp) con estremità 3' sporgenti, dove il filamento antisense rappresenta il filamento inverso in polarità e complementare all'mRNA target di interesse, mentre lo shRNA consiste in due filamenti complementari di 19-22 bp connessi da un corto loop di 4-11 nucleotidi.



Nello studio, i modelli *knock-down* (KD) generati mediante silenziamento con siRNA, sono stati realizzati attraverso la trasfezione mediante lipofectamine delle cellule con concentrazioni di 25 o 50 pmol di siRNA. Inoltre, è stato utilizzato un siRNA *non-targeting* (chiamato *scramble RNA*) come controllo negativo alla concentrazione di 25 pmol.

Gli shRNA sono stati utilizzati invece per la generazione di modelli KD stabili mediante infezione lentivirale delle linee cellulari e di organoidi; tale metodica ha visto l'uso del vettore lentivirale pLKO.1-puro-CMV-tGFP per bersagliare l'mRNA del gene di interesse (*FGFR4*) e del vettore TRC2 pLKO.5-puro *non-targeting* come controllo (NTC) dell'infezione.

Le particelle lentivirali sono state sintetizzate nella linea cellulare HEK293T mediante trasfezione di plasmidi contenenti la cassetta GFP e un'ulteriore plasmide VSV-G codificante le componenti del capsid virale e dell'*envelope*; in seguito, dopo 48 ore dalla trasfezione è stato raccolto il surnatante contenente le particelle lentivirali, dal quale sono stati rimossi gli eventuali detriti cellulari restanti. È stata poi eseguita la trasduzione di monostrati cellulari, al 50-60% di confluenza, mediante l'aggiunta del surnatante virale, precedentemente concentrato, con l'aggiunta di 1 µg/mL di Polibrene come agente trasfettante e dopo 48 h dall'infezione è stata aggiunta puromicina (concentrazione finale 2 µg/mL) per la selezione antibiotica delle cellule effettivamente trasdotte.

Riguardo la realizzazione di linee di organoidi *knock-down* stabili con shRNA il primo step chiave è stato quello di rimuoverli dal Matrigel mediante incubazione con una soluzione di Dispasi I a 37°C per 20 minuti e seguito da digestione enzimatica con TripLE con addizione di Dispasi I e 0.1 mg/mL di DNAasi per 20 minuti. In seguito,  $1 \times 10^5$  cellule sono state risospese con un medium di trasduzione arricchito di 1 µg/mL di Polibrene, seguito da spinoculazione a 600 g per 1 h a temperatura ambiente, al termine del quale è seguita un'incubazione per 16 h a 37°C. Il giorno seguente la sospensione cellulare è stata seminata in Matrigel e dopo 48 ore dall'infezione le cellule sono state trattate con 2 µg/mL puromicina per la selezione antibiotica.

L'effettiva trasduzione è stata validata mediante visualizzazione di positività alla GFP e la selezione antibiotica è stata bloccata quando il trattamento ha determinato la completa estinzione delle cellule non trattate.

### **3.5. Ibridazione *in situ***

L'ibridazione *in situ* (ISH) è una tecnica di rilevazione specifica per localizzare sequenze di acidi nucleici a livello cellulare o tissutale e si basa sulle proprietà di ibridazione di un filamento di DNA o RNA con un secondo filamento, permettendo così la rilevazione di quest'ultimo. Le sonde possono essere cromosoma-specifiche in grado di evidenziare l'intero cromosoma (*painting* cromosomico), piuttosto che specifiche contro regioni di cromosoma o sequenze per identificare la localizzazione di specifici RNA nel citoplasma. Le sonde possono essere marcate con isotopi radioattivi o più frequentemente con fluorocromi, dove in quest'ultimo caso si parla di ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH). La FISH rappresenta ad oggi la tecnica più diretta per la mappatura genica in quanto può facilmente definire la posizione sui cromosomi di qualunque gene clonato, nonché la presenza di eventuali aberrazioni cromosomiche (es. delezioni, duplicazioni, traslocazioni).

Nello studio tale metodica è stata condotta su sezioni tissutali di PDAC umano di 4 µm di spessore e sezioni di xenotrapianti: tali sezioni sono state sottoposte a deparaffinizzazione mediante incubazione in xylene per 10 minuti, seguito da un trattamento con Etanolo (Et-OH) al 100% per 2 minuti e lasciate poi ad asciugare a temperatura ambiente per 5 minuti. I campioni sono stati in seguito incubati con perossido d'idrogeno per 10 minuti, seguito da un lavaggio in acqua distillata e incubati poi per 20 minuti a 99°C con reagenti di recupero; a seguito di ciò le sezioni sono state lavate con acqua distillata e disidratate in Et-OH al 100% per 10 minuti e lasciate poi ad asciugare a temperatura ambiente.

I campioni sono stati poi incubati a 40°C per 10 minuti con *RNAscope Protease Plus*, a cui è seguito un lavaggio in acqua distillata e un'incubazione con le specifiche sonde per 2 ore a 40°C, al termine del quale è seguito un trattamento con un tampone di lavaggio. Al termine, le sezioni sono state incubate per 10 minuti a temperatura ambiente con *ImmPACT DAB Substrate Kit* (per evidenziare i target) e poi sottoposte a colorazione con ematossilina per evidenziarne i nuclei, poste a 60°C per 15 minuti e al termine di ciò le sezioni sono state montate con un medium di montaggio.

### 3.6. Western blot

Il Western blot, detto anche *Immunoblotting*, è una tecnica sperimentale ampiamente utilizzata in biochimica e biologia cellulare che permette di identificare proteine d'interesse da un estratto proteico proveniente da lisati di cellule o tessuti. La tecnica sfrutta un'iniziale separazione tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti con sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE), seguita da un trasferimento mediante applicazione di un campo elettrico su membrane inerti e porose, che possono essere di diversa natura, come nitrocellulosa o polivinilidenefluoruro (PVDF); queste membrane vengono poi sottoposte ad incubazione con anticorpi che permettono l'analisi delle componenti proteiche specifiche che vengono separate. Per la rivelazione viene utilizzato un sistema basato su due tipologie di anticorpi (metodo indiretto): un anticorpo primario che vada a riconoscere specificatamente la proteina d'interesse mediante gli idiotipi e un anticorpo secondario che riconosce il frammento costante (Fc) del primario e che è coniugato con un fluoroforo o un enzima, il quale ne permette la successiva rilevazione amplificata. La rilevazione può avvenire mediante varie metodiche come l'autografia, se l'anticorpo è marcato con traccianti radioattivi, oppure la fluorescenza, se vi è legato un fluoroforo, oppure tramite chemiluminescenza, tecnica mediante la quale si rileva l'emissione di fotoni grazie ad un *photodetector*; quest'ultimo approccio è spesso sfruttato usando un anticorpo secondario coniugato con un enzima (es. perossidasi di rafano) il quale, in presenza di uno specifico substrato (aggiunto poi dallo sperimentatore - es. luminolo), porta all'emissione di fotoni.

Nello studio, a partire dai lisati proteici, sono stati caricati i campioni in un gel di poliacrilammide a gradiente di concentrazione 4-12% e in seguito trasferiti su membrana di PVDF. È stata poi eseguita l'incubazione con gli anticorpi, un primario e un secondario, quest'ultimo associato a perossidasi di rafano, così da effettuare una rilevazione mediante chemiluminescenza. È stato utilizzata la  $\beta$ -actina come *housekeeping* per la normalizzazione.

### 3.7. Immunoistochimica

L'immunoistochimica è una tecnica in grado di rilevare specifiche proteine e studiarne la distribuzione spaziale in cellule e tessuti; si basa sul principio di interazione antigene-anticorpo e su sistemi di rilevazione (enzimatici, fluorescenti) che rendono l'identificazione *in situ* dell'antigene di interesse tramite l'utilizzo delle tecniche di microscopia. Tale metodica prevede l'incubazione dell'anticorpo su sezioni sottili di tessuto o monostrati di cellule in coltura, adesi e fissati su vetrino. Nell'articolo la metodica è stata applicata su sezioni tissutali fissate in formalina al 10% e poi incluse in paraffina, in seguito incubate con gli anticorpi specifici che permettono la colorazione dell'antigene d'interesse.

### 3.8. Single cell RNA sequencing

Il *single-cell RNA sequencing* (scRNA-Seq) è un approccio di valutazione del trascrittoma attraverso tecnologie di *Next Generation Sequencing* (NGS). L'approccio è simile all'*RNA sequencing* (RNA-Seq) con la fondamentale differenza che la prima tecnica è in grado di determinare qualità e quantità di RNA presenti a livello di singole cellule, riuscendo così a discriminare diverse popolazioni cellulari dal punto di vista trascrittomico. Queste metodiche basate sulla singola cellula rappresentano le tecnologie più all'avanguardia in ambito omico con un elevato potenziale applicativo per l'identificazione di nuove mutazioni in cellule neoplastiche, esplorazione di variazioni epigenomiche che si alternano durante lo sviluppo embrionale, oltre alla valutazione di come popolazioni cellulari apparentemente simili esprimano in realtà diversi *pattern* genici.

Nell'articolo i dati di scRNA-Seq provenienti da dataset di tessuto tumorale pancreatico sono stati integrati attraverso l'algoritmo *Harmony* grazie al pacchetto *harmony* di R così da identificare le differenze tra i 4 dataset utilizzati per l'analisi (Peng et al., Lin et al., Chang-Seng-Yue et al. e Steele et al.), i quali sono stati precedentemente pre-processati individualmente mediante l'uso di *Seurat* per il controllo della qualità e lo step di filtraggio dei dati. In seguito, i dati relativi alle singole cellule sono stati annotati con il pacchetto *singleR* usando il dataset dello *Human Primary Cell Atlas* (HPCA) precaricato, così da determinare la stratificazione dell'espressione genica delle popolazioni cellulari.

### 3.9. Kaplan-Meier plot

Il grafico di Kaplan-Meier è un'analisi molto utilizzata in ambito bio-medico allo scopo di rappresentare una curva di mortalità/sopravvivenza di individui coinvolti in una sperimentazione, in funzione del tempo. Durante la raccolta dei dati, per ciascun individuo, vengono definite tre variabili: tempo seriale (durata temporale di partecipazione all'analisi), stato alla fine del tempo seriale (es. vivo/deceduto), gruppo di appartenenza (es. sperimentale/controllo). Per la costruzione della curva di sopravvivenza i tempi seriali dei diversi individui vengono organizzati dal più corto al più lungo, indipendentemente da quando essi sono entrati nello studio e, applicando poi dei test statistici, vengono calcolate le probabilità di sopravvivenza,

verificando la presenza/assenza di significatività tra le curve delle diverse condizioni in analisi. La curva di Kaplan-Meier è necessaria per stabilire la probabilità di sopravvivenza relativa a ciascun gruppo in esame, permettendo dunque di comprendere, nel caso di soggetti affetti da neoplasia con specifica mutazione, quanto l'up o la down-regolazione di tale gene possa impattare sulla sopravvivenza dell'individuo e dunque risultare un parametro prognostico positivo o negativo per la malattia.

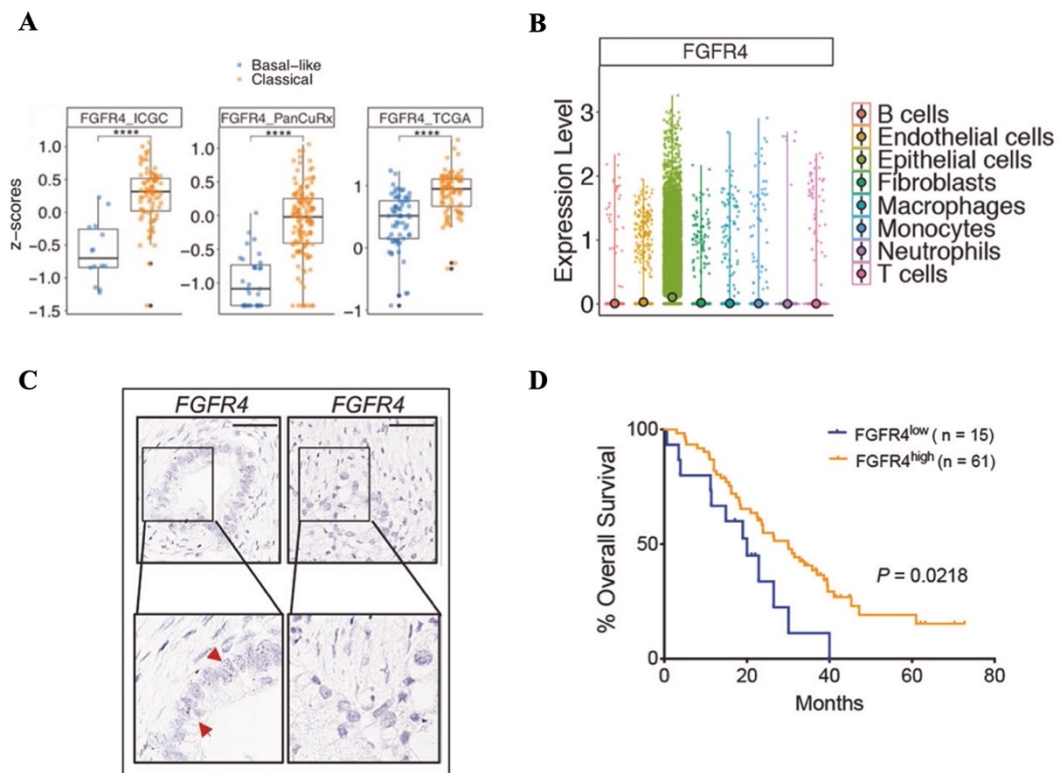
Nel caso di *FGFR4*, questo strumento è stato usato proprio per valutare la sopravvivenza generale di individui appartenenti ad una coorte dell'*International Cancer Genome Consortium* (ICGC), oltre che valutare lo stesso parametro per pazienti con una diversa espressione di *FGFR4* (valutata mediante ISH).

## 4. RISULTATI

### 4.1. FGFR4 è associato al sottotipo *classical* del PDAC

Per comprendere l'importanza dei recettori tirosin-chinasici nella tumorigenesi del pancreas, con una particolare attenzione per FGFR4, gli autori hanno analizzato i dati di trascrittomici provenienti da campioni di tumore umano resi disponibili dal consorzio TCGA trovando effettivamente un arricchimento di questo recettore tirosin-chinasico (FGFR4) nel sottotipo *classical*; per rendere più robusta tale osservazione, queste analisi sono state riprodotte anche per altre due coorti, PanCuRx e ICGC, trovando il medesimo risultato (figura 4.1A).

Nello studio essi hanno dunque cercato di comprendere a livello di quale tipologia cellulare il recettore FGFR4 fosse principalmente espresso; gli autori, basandosi su dati di scRNA-Seq provenienti da differenti datasets sia di pazienti affetti da PDAC sottoposti a trattamenti chemioterapici che non sottoposti ad alcun trattamento, hanno rilevato essere significativamente più espresso a livello di cellule epiteliali (figura 4.1B), dato poi confermato da analisi di ISH (figura 4.1C).



**Figura 4.1.** **A** Boxplot rappresentante la differenza di espressione di FGFR4 tra i sottotipi *classical* e *basal-like* nelle 3 coorti di riferimento (ICGC, PanCuRx, TCGA) con significatività  $p < 0.0001$ ; **B** Grafico relativo all'espressione di FGFR4 nei diversi tipi cellulari attraverso dati di scRNA-Seq di tessuto pancreatico tumorale; **C** Analisi di ISH rappresentanti l'espressione di FGFR4 in due diversi tessuti di neoplasia pancreatico; **D** la curva di Kaplan-Meier mostra come gli individui FGFR4<sup>low</sup> presentino una minore sopravvivenza rispetto agli individui FGFR4<sup>high</sup>

Questo risultato di fatto rende FGFR4 un *marker* specificatamente epiteliale, poiché non è stato riscontrato in altri tipi cellulari e nello stroma tumorale, al contrario di altri recettori della stessa famiglia (es. FGFR1, dati non mostrati).

Per verificare il valore prognostico di *FGFR4*, è stata presa in esame la curva di Kaplan-Meier relativa al gene in esame ed è stato osservato che la ridotta espressione di FGFR4 (FGFR4<sup>low</sup>) nel PDAC (dati ICGC) è associata ad una minore sopravvivenza dei soggetti in studio (figura 4.1D).

Nello studio sono state prese in analisi sei linee cellulari 2D e cinque linee di organoidi da pazienti, le quali sono state classificate, mediante analisi di RNA-Seq, nei due sottotipi *classical* e *basal-like*: è stata così evidenziata una linea di organoide (PDA9-O) con caratteristiche molto simili al fenotipo *basal-like* e si è rilevato, in accordo con le analisi dei dati provenienti dai consorzi (ICGC, PanCuRx, TCGA), avere la più bassa espressione di FGFR4, rappresentando così un ottimo modello per lo studio del sottotipo *basal-like* (dati non mostrati).

## 4.2. La perdita di FGFR4 promuove un fenotipo maligno nel PDAC

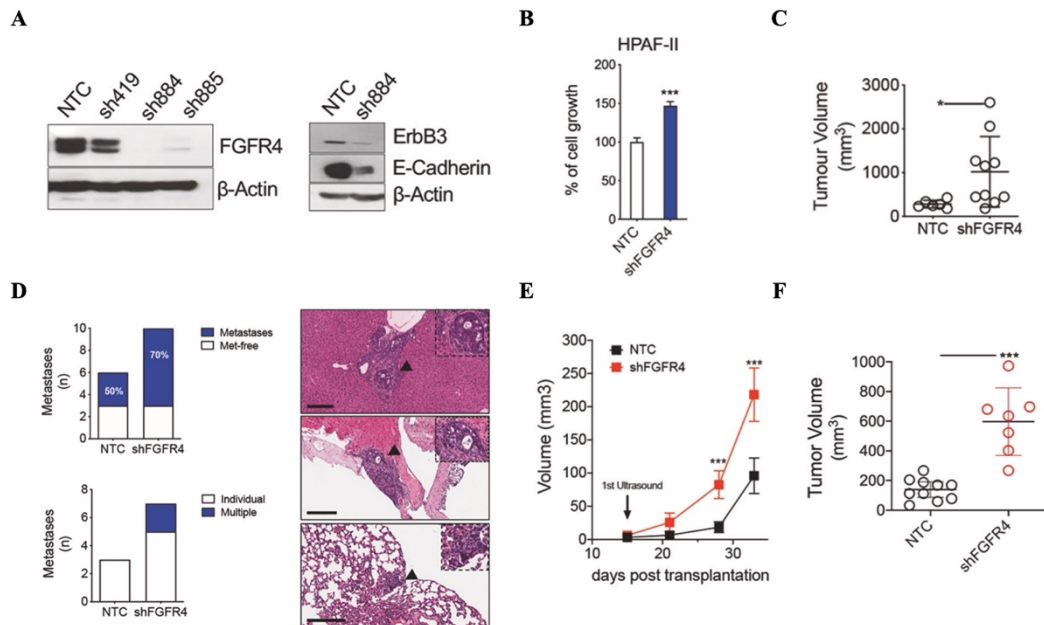
Per comprendere l'eventuale implicazione funzionale di FGFR4 nel definire il fenotipo del PDAC (*classical* vs *basal-like*), gli autori del lavoro hanno svolto una serie di esperimenti di manipolazione genetica e farmacologica. Un primo aspetto valutato riguarda la vitalità e la proliferazione cellulare: essi hanno riscontrato che, inibendo farmacologicamente FGFR4 mediante lo specifico inibitore BLU9331 (FGFR4i), non vi è alcuna inibizione significativa della vitalità, anche se a basse dosi di FGFR4i si osserva un minimo incremento della proliferazione di alcune linee cellulari tumorali (dati non mostrati). Questo esperimento, unito ad altri riguardanti ulteriori FGFRs, dimostra come l'inibizione farmacologica di questi recettori non sia una strategia percorribile per ridurre la proliferazione cellulare tumorale. Un aspetto cruciale è stato, in seguito, quello di *down-regolare* *FGFR4* nella linea cellulare HPAF-II (sottotipo *classical*), tramite RNA *interference* (shRNA): come si può vedere in figura 4.2A, sono stati utilizzati tre differenti shRNA con disuguali capacità di silenziamento e si è proseguito poi con i due shRNA più efficienti (sh884 e sh885) per i successivi esperimenti.

L'ablazione di FGFR4 tramite silenziamento è associata alla *down-regolazione* di marcatori epiteliali come E-Caderina e ErbB3 (figura 4.2A) e ad un aumento della proliferazione *in vitro* (figura 4.2B).

Per confermare questi primi risultati, si è dunque passati ad un approccio *in vivo*, dove sono stati effettuati trapianti ortotopici della linea tumorale HPAF-II silenziata (shFGFR4) o meno (NTC) per FGFR4 in topi immunocompromessi ed è stata monitorata la crescita tumorale per 4 settimane, osservando che la mancanza di espressione di FGFR4 nella linea cellulare causava un incremento nel volume della massa tumorale rispetto ai controlli (figura 4.2C) oltre che un aumento significativamente rilevante delle metastasi a carico dei polmoni e del fegato (figura 4.2D).

Questo dato non solo è coerente con i precedenti risultati *in vitro* (figura 4.2B), ma anche con i precedenti dati bioinformatici dove veniva mostrato che nel gruppo di pazienti FGFR4<sup>low</sup> (dataset PanCuRx), vi era un aumento significativo delle metastasi (14% di soggetti contro il 2% del gruppo FGFR4<sup>high</sup>, dati non mostrati).

Questo effetto pro-tumorigenico dovuto alla mancanza di espressione di FGFR4 osservato *in vivo* è stato ulteriormente validato attraverso trapianti ortotopici sia di organoidi di controllo derivati da paziente, che di organoidi silenziati per FGFR4.



**Figura 4.2.** *A* Western-blot per la validazione dell'effettiva down-regolazione di FGFR4 mediante shRNA e osservazione della conseguente down-regolazione di marker epiteliali E-Caderina e ErbB3; *B* Rilevazione dell'incremento della proliferazione cellulare in HPAF-II con shFGFR4; *C* Scatter dotplot che mostra le differenze dei volumi tumorali tra la condizione sperimentale (shFGFR4) e il controllo (NTC), la cui rilevazione è stata effettuata mediante ultrasuoni dopo 4 settimane; *D* A sinistra, è mostrata la percentuale di metastasi presenti in 2 diverse coorti di topi e la distribuzione degli stessi con lesioni metastatiche singole o multiple; sulla destra, è mostrata una colorazione Eosina ed Ematossilina di lesioni metastatiche nel fegato (in alto e in centro) e nei polmoni (in basso), in topi portatori di metastasi multiple; *E* grafico rappresentante il volume tumorale (mm<sup>3</sup>) delle masse tumorali derivanti da iniezioni ortotopiche di 1x10<sup>6</sup> cellule tumorali pancreatiche in modelli murini; *F* Scatter plot dimostrante la distribuzione dei volumi tumorali di topi trapiantati con organoidi PDA9-O trasdotti con un vettore di controllo (NTC) o con shFGFR4

Seguendo l'evoluzione della crescita tumorale a partire dal quindicesimo giorno post-trapianto, si è rilevato che i PDOs esprimanti alti livelli di FGFR4 mostrano una ridotta proliferazione *in vivo*, a differenza di quelli trasdotti con shFGFR4 che invece mostrano un maggiore volume tumorale (figura 4.2E). Ulteriore risultato convergente con quanto finora rilevato nello studio è stato ottenuto mediante down-regolazione di FGFR4 in un modello di organoide *basal-like* FGFR4<sup>low</sup> (PDA9-O), poi iniettato in un modello murino.

Alla fine dell'esperimento la massa tumorale è significativamente più estesa nei topi trapiantati con le linee mancanti di FGFR4 (figura 4.2F).

Complessivamente questi dati suggeriscono che il livello endogeno di FGFR4 limita il fenotipo maligno nel PDAC indipendentemente dal *background* genetico delle cellule.

### 4.3. La perdita di FGFR4 è associata ad un aumento delle caratteristiche *basal-like* del tumore al pancreas

Visti i precedenti risultati, gli autori hanno in seguito cercato di comprendere se la mancanza di FGFR4 in un sottotipo classico potesse portare ad una conversione dello stesso verso il sottotipo *basal-like*. In cellule FGFR4 KD si osservano delle profonde variazioni nel trascrittoma e nell'espressione di geni che guidano la definizione del sottotipo molecolare nel PDAC; infatti, le suddette cellule rientrano ora nel sottotipo *basal-like*.

Ulteriore osservazione si è focalizzata sui cambiamenti di espressione di geni marcatori per il sottotipo a seguito del silenziamento di *FGFR4*, trovando una ridotta espressione del gene *CDH1* (codificante E-Caderina), che è coerente con quanto si era trovato nel Western Blot (figura 4.2A), ovvero un ridotto livello della E-Caderina a seguito del silenziamento mediante shRNA.

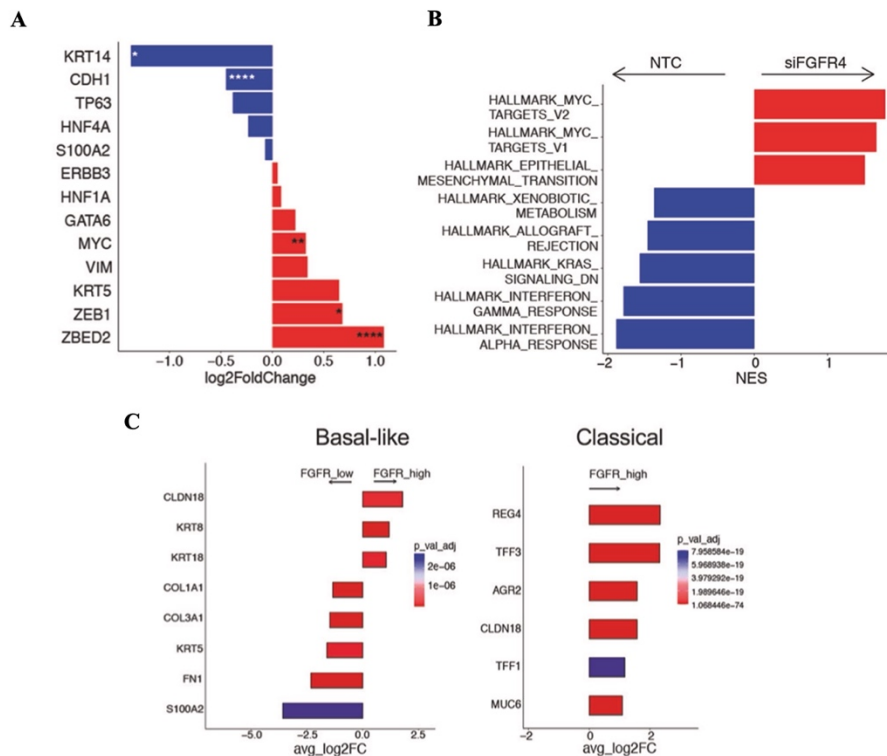
Si è andati, inoltre, ad indagare alcuni dei fattori di trascrizione noti per essere associati al fenotipo *basal-like* e si è rilevato come *ZBED2* mostri un'elevata *up*-regolazione in concomitanza con il silenziamento di *FGFR4*, oltre che osservare un aumento dell'espressione di *pattern* genici correlati all'attività di *c-Myc* (coinvolto nella rapida divisione cellulare e nell'inibizione di geni legati all'anti-proliferazione) e dell'EMT (figura 4.3A).

Il coinvolgimento di *ZBED2* è stato validato ulteriormente dall'analisi di dati di RNA-Seq su tessuti di pazienti, confermando di nuovo che *ZBED2* è il gene maggiormente espresso nei soggetti FGFR4<sup>low</sup> della coorte ICGC (dato non mostrato).

Ulteriori esperimenti con altre linee cellulari di sottotipo *classical* hanno dimostrato che in realtà la *down*-regolazione di *FGFR4* non porta ad un completo *switch* del sottotipo, anche se comunque determina una riduzione del programma genetico *classical*, del marcatore CDH1, un arricchimento trascrizionale del *pattern* di geni *basal-like* e di geni correlati all'aumento della proliferazione e dell'attività di *c-Myc* (figura 4.3B). Quindi, sebbene un completo *switch* fenotipico sembri dipendere dal contesto cellulare, i risultati ottenuti suggeriscono che FGFR4 limiti l'espressione di programmi genici legati all'aggressività del PDAC (es. *basal-like*).

In ultima analisi, sfruttando dati di scRNA-Seq dal dataset pubblicato da Peng et al., è emerso come cellule FGFR4<sup>low</sup> siano caratterizzate da programmi di espressione genica correlati al sottotipo *basal-like*, con un arricchimento dei geni EMT-correlati. In seguito sono state quindi selezionate e divise le cellule di sottotipo *classical* da quelle di sottotipo *basal-like* e comparato il trascrittoma delle linee che mostravano alti e bassi livelli di *FGFR4*: le cellule appartenenti al sottotipo *classical* con il maggiore livello di *FGFR4* mostravano anche elevata espressione di geni *classical*, così come cellule di sottotipo *basal-like* con elevati livelli di *FGFR4*, mentre le cellule di sottotipo *basal-like* che invece mostravano una ridotta espressione di tale gene, presentavano un aumento di espressione di *marker* genici *basal-like* (figura 4.3C).





**Figura 4.3.** *A* Espressione di geni classical e basal-like in cellule HPAF-II deficienti per FGFR4 (comparate a cellule wildtype) mediante dati di RNA-Seq; *B* Grafico rappresentante analisi di arricchimento delle vie up e down regolate in campioni di HPAF-II controllo (NTC) e deficienti per FGFR4 (siFGFR4); *C* A sinistra grafico rappresentante dati di espressione genica di campioni cellulari appartenenti al sottotipo basal-like sia FGFR<sup>low</sup>, sia FGFR<sup>high</sup> con relativi geni up e down-regolati; a destra dati di RNA-Seq derivanti da campioni cellulari del sottotipo classical con relativo pannello di geni up-regolati

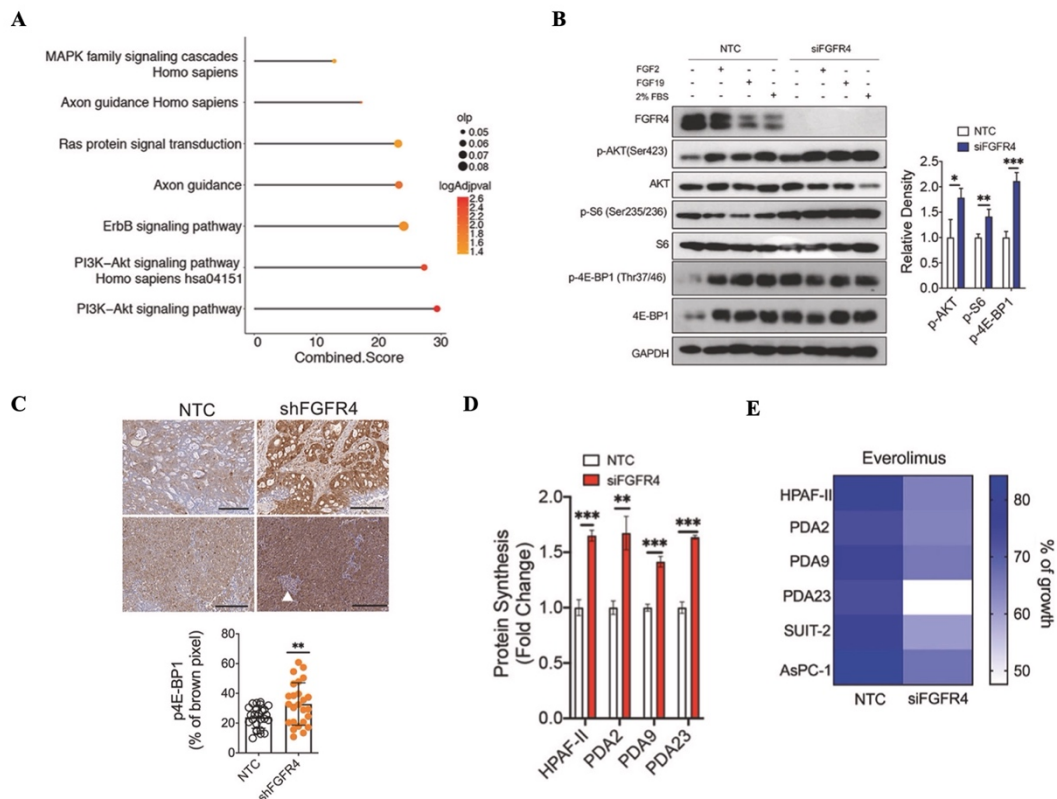
#### 4.4. La perdita di FGFR4 genera un aumento del flusso nella via di segnale di mTOR

Nel lavoro analizzato in questa tesi, gli autori hanno evidenziato la presenza di un'elevata deregolazione della via PI3K/AKT/mTOR a livello trascrizionale, sia nelle linee cellulari che nei campioni tissutali (figura 4.4A) e, visto il forte coinvolgimento di mTOR nella sintesi proteica, per valutare l'attivazione della via il gruppo di ricerca ha valutato tramite Western Blot il livello di fosforilazione di AKT e di alcuni effettori a valle di mTORC1 (es. 4E-BP1, S6K1): a livello cellulare è stato trovato che la mancanza di FGFR4 aumenta il flusso attraverso la via di mTORC1, specialmente mediante inibizione del repressore traduzionale 4E-BP1, il quale gioca un ruolo chiave nella proliferazione delle cellule di mammifero (figura 4.4B). Questo risultato ottenuto *in vitro* è stato validato *in vivo* iniettando la linea HPAF-II stabilmente trasfettata con shFGFR4 e anche in questo caso è visibile un aumento della fosforilazione di 4E-BP1 nei tessuti (figura 4.4C).

Visto il ruolo di "master regulator" di mTORC1 nella sintesi proteica, gli autori hanno misurato le variazioni di tale processo in quattro diverse linee cellulari KD per FGFR4: la perdita di FGFR4 porta ad un aumento della sintesi proteica generale, confermato anche dall'arricchimento dell'espressione genica correlata all'inizio della traduzione (figura 4.4D).

*In ultimis*, gli autori hanno voluto dimostrare che se l'aumento dell'attività della via di segnale di mTORC1 fosse il principale responsabile dell'aumento proliferativo nel PDAC in assenza di FGFR4, un'inibizione farmacologica di questa via potrebbe rappresentare una possibile strategia per revertire il fenotipo (da *basal-like* a *classical*): utilizzando un inibitore di mTORC1 (Everolimus) gli autori hanno osservato un'importante inibizione della proliferazione cellulare in cellule con bassa espressione di FGFR4 (mediato da siRNA), a differenza di quelle controllo (figura 4.4E).

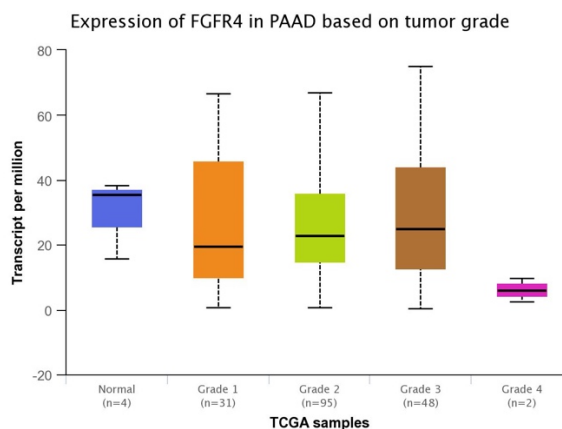
In conclusione, i risultati indicano che la mancanza di FGFR4 nel PDAC è associata ad un aumento della proliferazione cellulare mediata da mTORC1, indipendentemente dal *background* genetico delle cellule e dal loro profilo trascrittomico.



**Figura 4.4.** *A* Analisi di arricchimento delle vie di segnale significativamente over-esprese in cellule HPAF-II deficienti per FGFR4; *B* Immunoblotting di lisati cellulari derivante da cellule HPAF-II trasfettate con siRNA bersaglianti FGFR4 o con siRNA controllo (NTC). GAPDH rappresenta il controllo di caricamento. A destra bar-plot rappresentante la quantificazione dei livelli di proteine fosforilate rispetto alla loro forma non fosforilata tra la condizione di controllo e quella sperimentale; *C* Immunohistochemica contro fosfo-4E-BP1 in tessuti pancreatici derivanti da modelli murini trapiantati. Sono rappresentate le due condizioni di controllo (NTC) e silenziato (shFGFR4), dove le frecce bianche indicano le Isole di Langerhans, la cui colorazione negativa rappresenta un controllo interno. In basso, viene rappresentato uno scatter-plot della relativa quantificazione sulla base della percentuale di pixel marroni rilevati; *D* quantificazione dell'immunofluorescenza (dati non mostrati) mostrante un significativo aumento della sintesi proteica totale a seguito del silenziamento di FGFR4 in differenti linee cellulari; *E* Heatmap che rivela la vitalità di cellule tumorali pancreatiche trasfettate con siFGFR4 o un controllo per 48 h, seguito dall'inibizione di mTORC1 mediante Everolimus (1  $\mu$ M) per altre 48 h

## 5. DISCUSSIONE

Dagli studi condotti in questo articolo si è dimostrato come FGFR4 presenti una marcata espressione a livello delle cellule epiteliali del pancreas neoplastico e come sia fortemente associato al sottotipo *classical* in pazienti con PDAC. Inoltre, si è visto essere correlato ad una migliore prognosi nei pazienti. Un aspetto non indagato nello studio riguarda il valore basale di espressione di FGFR4 nel pancreas sano. Tramite database bioinformatici online, è possibile dedurre che il livello di FGFR4 segue un andamento decrescente correlato all'avanzamento della patologia, evidenziando nel tessuto sano un'espressione di FGFR4 maggiore rispetto al tessuto tumorale (figura 5.1).



**Figura 5.1.** - Boxplot raffigurante il livello di espressione di FGFR4 in pancreas sano e nei diversi stadi di progressione tumorale dell'adenocarcinoma pancreatico (TCGA database) (generato con [ualcan.path.uab.edu](http://ualcan.path.uab.edu))

Questo dato potrebbe far emergere nuovi interessanti quesiti e potrebbe risultare utile a fini diagnostici e prognostici, così da permettere l'identificazione dello stadio tumorale in cui il paziente si trova.

Da ulteriori analisi sperimentali è stato dimostrato che la perdita di espressione di FGFR4 promuove uno *switch* fenotipico da *classical* a *basal-like*. Infatti, si è rilevato che il silenziamento del recettore mostra un aumento della proliferazione cellulare *in vitro*, e *in vivo*, mediante trapianti ortotopici, si è riscontrato un aumento della metastatizzazione a livello epatico e polmonare.

Questi dati risultano particolarmente solidi *in primis* grazie alla numerosità dei replicati sperimentali, ma grazie anche al fatto che gli esperimenti condotti sono stati eseguiti in linee 2D, 3D e *in vivo*. In accordo con l'osservazione dello *switching* fenotipico promosso dal silenziamento di *FGFR4*, la *down*-regolazione del gene induce un arricchimento di *pattern* trascrizionali del sottotipo *basal-like*, un aumento del comportamento maligno e un aumento dell'espressione di geni EMT-correlati. Questa osservazione ha permesso agli autori di ipotizzare che la repressione delle caratteristiche *basal-like* sia una condizione intrinseca a FGFR4 e che quindi il suo livello endogeno abbia un ruolo di soppressione tumorale.

Visto quanto sopra, gli autori propongono FGFR4 come possibile *marker* per la stratificazione prognostica dei sottotipi molecolari del tumore; i dati riportati nell'articolo sembrano effettivamente sostenere questo possibile utilizzo di FGFR4, ma da alcuni dati presentati derivanti da coorti ICGC e PanCuRx, si evince la presenza di pazienti in cui la relazione tra il livello di espressione di FGFR4 e il

sottotipo molecolare è discordante con quanto osservato finora. Si osservano, infatti, pazienti FGFR4<sup>low</sup> ma appartenenti al sottotipo *classical* e viceversa, ovvero pazienti FGFR4<sup>high</sup> ma appartenenti al sottotipo *basal-like*. Seppur questi soggetti risultino una minoranza rispetto alla globalità dei dati oggetto dello studio, al fine di indagare ulteriormente questo aspetto sarebbe auspicabile condurre ulteriori analisi per comprenderne il motivo di tale divergenza, in modo da chiarire il potenziale ruolo di FGFR4 come *marker* per la stratificazione proposto dagli autori. In ultima analisi lo studio condotto ha permesso di rilevare come la sotto-regolazione di FGFR4 sia associata ad un aumento dei flussi attraverso le vie di segnale MAPK e mTORC1, indipendentemente dal *background* genomico e trascrittomico delle cellule. In accordo con questo, gli autori hanno osservato un generale arricchimento significativo della via PI3K/Akt/mTOR, così come della fosforilazione inibitoria di uno dei principali bersagli di mTORC1, ovvero 4E-BP1 e dove tale fosforilazione si è dimostrata avere un ruolo regolatorio nella proliferazione cellulare guidata da mTORC1 nelle cellule di mammifero. Il livello di tale fosforilazione risulta essere più alto nelle cellule sottoposte a silenziamento di *FGFR4*, comportando un aumento della proliferazione cellulare e della sintesi proteica. Vista la disponibilità di farmaci che bersagliano la via di mTOR, sarebbe auspicabile in futuro approfondire questo aspetto, in modo da identificare possibili trattamenti farmacologici che potrebbero altresì indurre una reversione del sottotipo da *basal-like* a *classical*. Dall'articolo non si evince perché la scelta sia ricaduta su FGFR4, ma, visto il suo coinvolgimento e l'elevato numero di membri della famiglia a cui appartiene, potrebbe risultare interessante indagare il ruolo degli altri recettori della famiglia FGF, al fine di poter identificare nuovi target prognostici e terapeutici per il trattamento del tumore al pancreas.

Visti i risultati ottenuti riguardo FGFR4 e il suo coinvolgimento nello *switching* fenotipico, numerose sono le prospettive future che si aprono allo scopo. Ad esempio, si potrebbero individuare trattamenti che permettano di stabilizzare il livello endogeno di FGFR4 in soggetti appartenenti al sottotipo *classical* e di sovra-esprimerlo invece in quelli appartenenti al sottotipo *basal-like*, in cui in genere è sotto-espresso, così da spingere verso la reversione fenotipica del sottotipo.

Nel primo caso, vista la presenza di un'ipermetilazione del gene nel sottotipo *basal-like* e una regolazione epigenetica dello stesso, si potrebbe pensare di condurre degli esperimenti in cui si vada ad attuare un'inibizione farmacologica/molecolare di metilasi nucleari, piuttosto che dei macchinari di modificazione della posizione dei nucleosomi, così da impedire una modificazione del suo livello di espressione e quindi un'eventuale *switch* verso il sottotipo *basal-like*. Al contrario, sfruttando linee cellulari *basal-like* (es. PANC1) si potrebbero condurre degli esperimenti di transgenesi condizionale mediante il sistema GAL4-UAS, inducendo un'espressione chimerica di FGFR4-GFP, così da poterne seguire l'espressione e, visto il basso livello di espressione di partenza del gene nelle linee *basal-like*, allestendo il transgene con UAS multimerizzato, così da promuoverne un'elevata espressione. L'utilizzo della transgenesi condizionale potrebbe inoltre risultare particolarmente utile per avere un controllo spaziale e/o temporale dell'espressione di *FGFR4*, potendo così indagare le conseguenze che derivano da una modificazione della sua espressione.

Comprendere in maniera integrale il coinvolgimento di FGFR4 nella tumorigenesi pancreatico potrà in futuro essere fondamentale per l'adozione di nuovi approcci terapeutici per curare la patologia.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Ryan, D. P., Hong, T. S. & Bardeesy, N. Pancreatic Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* **371**, 1039–1049 (2014).
2. Connor, A. A. & Gallinger, S. Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data. *Nature Reviews Cancer* vol. 22 131–142 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00418-1> (2022).
3. Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K. & Biankin, A. V. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* vol. 16 207–220 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0109-y> (2019).
4. Hosein, A. N., Brekken, R. A. & Maitra, A. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* vol. 17 487–505 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0300-1> (2020).
5. Ferrara, B. *et al.* The extracellular matrix in pancreatic cancer: Description of a complex network and promising therapeutic options. *Cancers* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers13174442> (2021).
6. Palamaris, K., Felekouras, E. & Sakellariou, S. Epithelial to mesenchymal transition: Key regulator of pancreatic ductal adenocarcinoma progression and chemoresistance. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).
7. Liu, Y. *et al.* Dissecting the Role of the FGF19-FGFR4 Signaling Pathway in Cancer Development and Progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00095> (2020).
8. Liu, G. Y. & Sabatini, D. M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 21 183–203 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y> (2020).
9. Boj, S. F. *et al.* Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* **160**, 324–338 (2015).



# Appendice

Si allega, di seguito, il lavoro oggetto di questo elaborato di tesi:

D'Agosto S, Pezzini F, Veghini L, Delfino P, Fiorini C, Temgue Tane GD, Del Curatolo A, Vicentini C, Ferrari G, Pasini D, Andreani S, Lupo F, Fiorini E, Lorenzon G, Lawlor RT, Rusev B, Malinova A, Luchini C, Milella M, Sereni E, Pea A, Bassi C, Bailey P, Scarpa A, Bria E, Corbo V.

**“Loss of FGFR4 promotes the malignant phenotype of PDAC”**

Oncogene. 2022 Sep;41(38):4371-4384. doi: 10.1038/s41388-022-02432-5. Epub 2022 Aug 13. PMID: 35963908; PMCID: PMC9481460.





## ARTICLE OPEN



## Loss of FGFR4 promotes the malignant phenotype of PDAC

Sabrina D'Agosto<sup>1,10,11</sup>, Francesco Pezzini<sup>1,11</sup>, Lisa Veghini<sup>1,11</sup>, Pietro Delfino<sup>1</sup>, Claudia Fiorini<sup>1</sup>, Gael D. Temgue Tane<sup>1</sup>, Anais Del Curatolo<sup>2</sup>, Caterina Vicentini<sup>2</sup>, Giorgia Ferrari<sup>1</sup>, Davide Pasini<sup>1</sup>, Silvia Andreani<sup>1</sup>, Francesca Lupo<sup>1</sup>, Elena Fiorini<sup>1</sup>, Giulia Lorenzon<sup>1</sup>, Rita T. Lawlor<sup>2</sup>, Borislav Rusev<sup>2</sup>, Antonia Malinova<sup>1</sup>, Claudio Luchini<sup>1</sup>, Michele Milella<sup>3</sup>, Elisabetta Sereni<sup>4</sup>, Antonio Pea<sup>4</sup>, Claudio Bassi<sup>4</sup>, Peter Bailey<sup>5,6,7</sup>, Aldo Scarpa<sup>1,2</sup>, Emilio Bria<sup>8,9,12</sup> and Vincenzo Corbo<sup>1,2,12</sup>✉

© The Author(s) 2022

Transcriptomic analyses of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) have identified two major epithelial subtypes with distinct biology and clinical behaviours. Here, we aimed to clarify the role of FGFR1 and FGFR4 in the definition of aggressive PDAC phenotypes. We found that the expression of *FGFR4* is exclusively detected in epithelial cells, significantly elevated in the classical PDAC subtype, and associates with better outcomes. In highly aggressive basal-like/squamous PDAC, reduced *FGFR4* expression aligns with hypermethylation of the gene and lower levels of histone marks associated with active transcription in its regulatory regions. Conversely, *FGFR1* has more promiscuous expression in both normal and malignant pancreatic tissues and is strongly associated with the EMT phenotype but not with the basal-like cell lineage. Regardless of the genetic background, the increased proliferation of FGFR4-depleted PDAC cells correlates with hyperactivation of the mTORC1 pathway both in vitro and in vivo. Downregulation of *FGFR4* in classical cell lines invariably leads to the enrichment of basal-like/squamous gene programs and is associated with either partial or full switch of phenotype. In sum, we show that endogenous levels of *FGFR4* limit the malignant phenotype of PDAC cells. Finally, we propose FGFR4 as a valuable marker for the stratification of PDAC patients.

*Oncogene* (2022) 41:4371–4384; <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02432-5>

## INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a malignancy arising from the exocrine pancreatic epithelium and is the deadliest cancer worldwide [1, 2]. The abysmal prognosis of PDAC is contributed by late diagnosis, its complex biology, and lack of effective treatments. The molecular taxonomy of PDAC has been redefined by multiple studies that have used transcriptomic profiling to analyse bulk tissues, cell lines, and microdissected epithelia [3–7]. All classifications have highlighted the existence of two major subtypes based on characteristics of the neoplastic epithelium, namely the classical/progenitor and the basal-like/squamous subtypes. The classical/progenitor PDAC subtype is often regarded as the default pancreatic cancer subtype [5, 8] as it is characterised by the expression of transcription factors involved in specification and maintenance of pancreatic cell fate [3, 9, 10]. Conversely, the basal-like/squamous subtype is associated with loss of pancreatic endodermal identity, and expression of the master regulator of basal-like cells program  $\Delta$ Np63 [3, 7, 11]. This subtype shows a significantly worse survival outcome and is enriched for inactivation of *TP53* and chromatin regulators, including *ARID1A* and *KDM6A* [3, 12]. Preclinical data have showed that the two subtypes differ also in the response to chemotherapy [6, 10, 13], to agents targeting the cell cycle [14], and further

display unique metabolic vulnerabilities [15]. While there is some clinical evidence for the predictive value of transcriptomic classifications [10, 16, 17], clinical investigations are ongoing to conclusively demonstrate the relevance of subtype-specific treatments. Previous works have elegantly demonstrated the causative involvement of pancreatic and endodermal transcription factors (e.g. GATA6, HNF1A, HNF4A) into the maintenance of subtype-specific gene programs [10, 15, 18, 19]. In particular, the emergence of the basal-like/squamous program is almost invariably associated with the loss of expression of transcription factors regulating pancreatic cell fates. Cell fate maintenance is also ensured by the signalling of growth factors through receptor tyrosine kinases (RTKs) [20, 21]. Following activation, RTKs transmit intracellular signals of varying qualities and quantities that alter the transcriptional landscape of a cell [20]. The fibroblast growth factors (FGFs) to Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) axis is reportedly involved in the maturation of pancreatic cells from the endoderm [22–25]. Here, we explored the involvement of FGFRs in the definition of molecular subtypes of PDAC. We report the downregulation of *FGFR4* in PDAC showing basal-like/squamous features. Integrating the analysis of transcriptomic, methylation, and chromatin accessibility datasets from patient-derived tissue specimens and cultures, we shed light on the mechanisms leading

<sup>1</sup>Department of Diagnostics and Public Health, University and Hospital Trust of Verona, Verona, Italy. <sup>2</sup>ARC-Net Research Centre, University and Hospital Trust of Verona, Verona, Italy. <sup>3</sup>Department of Medicine, Section of Oncology, University and Hospital Trust of Verona, Verona, Italy. <sup>4</sup>Department of Surgery, University and Hospital Trust of Verona, "Pancreas Institute", Verona, Italy. <sup>5</sup>Institute of Cancer Sciences, University of Glasgow, Glasgow, UK. <sup>6</sup>Cancer Research UK Beatson Institute, Glasgow, UK. <sup>7</sup>Department of General Surgery, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. <sup>8</sup>Comprehensive Cancer Center, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS, Rome, Italy. <sup>9</sup>Section of Medical Oncology, Department of Translational Medicine and Surgery, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy. <sup>10</sup>Present address: Human Technopole, Milan, Italy. <sup>11</sup>These authors contributed equally: Sabrina D'Agosto, Francesco Pezzini, Lisa Veghini. <sup>12</sup>These authors jointly supervised this work: Emilio Bria, Vincenzo Corbo.

✉email: [vincenzo.corbo@univr.it](mailto:vincenzo.corbo@univr.it)

Received: 8 February 2022 Revised: 28 July 2022 Accepted: 1 August 2022  
Published online: 13 August 2022

to downregulation of *FGFR4* in basal-like/squamous tumours. Conversely, we found that elevated expression of *FGFR1* is a functional marker of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) rather than of the basal-like/squamous subtype. To elucidate whether *FGFR4* is cause or consequence of more aggressive PDAC subtypes, we targeted the receptor using RNA interference approaches in both monolayer cell cultures and patient-derived organoids to show that its loss accelerates cell proliferation and in vivo growth regardless of the genetic and transcriptomic background of the models. Mechanistically, loss of *FGFR4* was associated with increased fluxes through the mTORC1 pathway and accordingly increased protein synthesis. Downregulation of *FGFR4* in classical/progenitor cell lines invariably led to the enrichment of basal-like/squamous gene programs which was associated with either partial or full switch of phenotype. Overall, our data provide direct evidence that the loss of *FGFR4* promotes aggressive phenotypes of PDAC.

## RESULTS

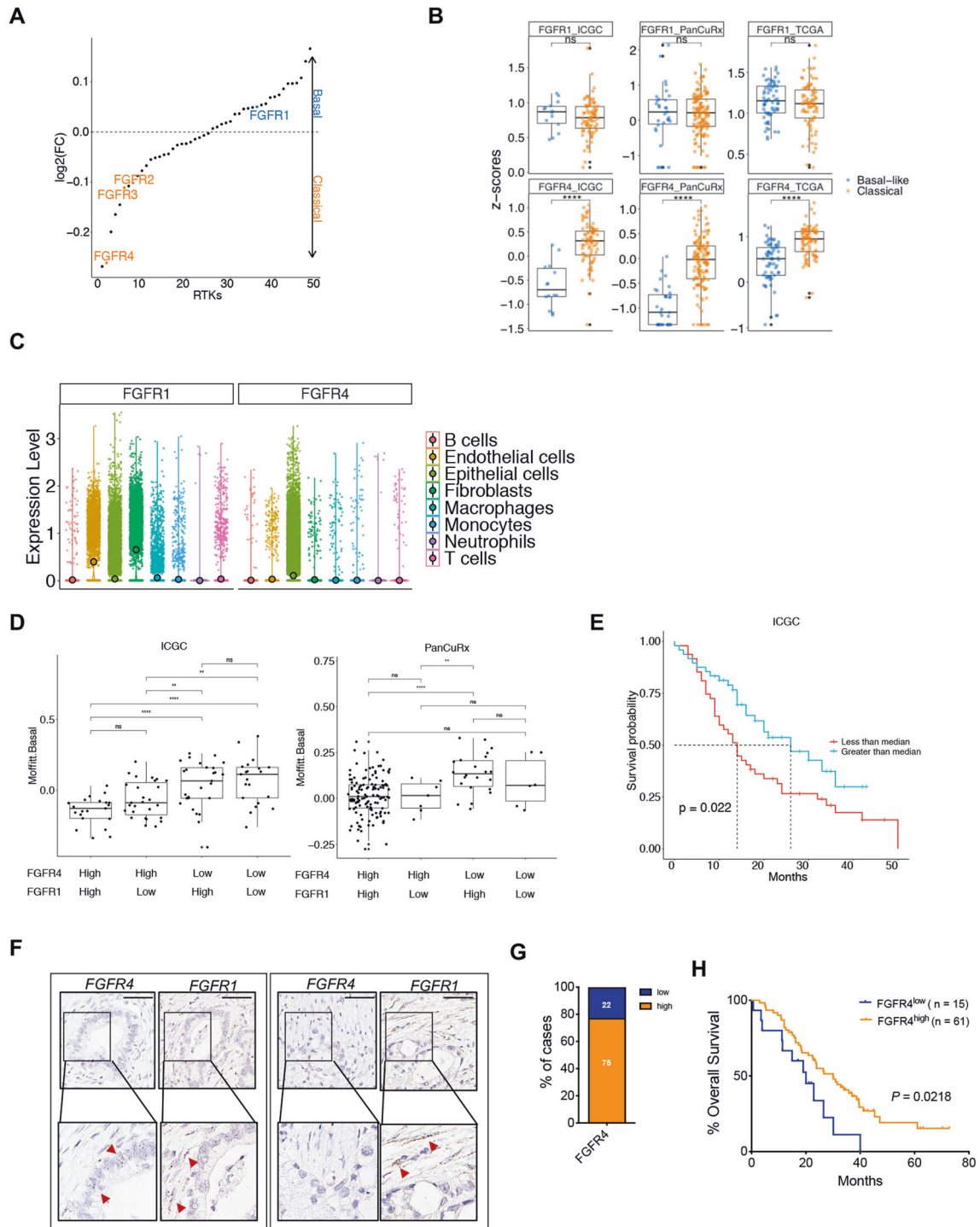
### **FGFR4 is associated with the classical phenotype of PDAC**

Receptor-Tyrosine Kinases (RTKs) initiated signaling is critical to cell fate determination [20, 21]. To investigate the functional relevance of RTKs in determining PDAC cell lineages and promoting its malignant phenotype, we started by exploring transcriptomic data of human PDAC specimens from the TCGA consortium [4] and found the selective enrichment of *FGFR4* in the classical subtype (Fig. 1A, B). We reproduced this finding in transcriptomic data from two additional cohorts [3, 5] (Fig. 1B). While relatively enriched in basal-like PDAC (Fig. 1A), the expression of *FGFR1* did not significantly discriminate basal-like from classical tumours in the 3 PDAC cohorts [3–5] investigated (Fig. 1B). Next, we explored available single-cell RNA-Seq (scRNA-Seq) data of human PDAC tissues to localise the expression of both *FGFR1* and *FGFR4*. We integrated four PDAC scRNA-seq data sets [5, 26–28] using Harmony [29] and performed cell type annotation to find that *FGFR4* is predominantly expressed by epithelial cells, while *FGFR1* could be detected in epithelial, stromal (fibroblasts, endothelial cells), and immune cells (i.e. macrophages) (Fig. 1C). Next, we explored scRNA-seq data from normal pancreas [30–32] (Supplementary Fig. 1A) and found that the expression of *FGFR4* is mostly restricted to the epithelial cells while *FGFR1* is detectable in many cell types. In situ hybridisation (ISH) analyses of normal pancreatic tissues confirmed scRNA-seq data (Supplementary Fig. 1B). To better understand the association of epithelial FGFRs expression with PDAC molecular subtypes, we then focused on transcriptomic datasets derived from either tissue with high neoplastic cellularity (i.e. ICGC [3], average qPure score > 60%) or microdissected neoplastic epithelia (i.e. PanCuRx [5]). First, we divided samples of the two cohorts in four different groups based on *FGFR1* and *FGFR4* expression statuses (see methods and Supplementary Fig. 1C). To explore the association of *FGFR1* and *FGFR4* with the aggressive basal-like and squamous molecular subtypes as defined by Moffitt [7] and Bailey [3] (Fig. 1D, Supplementary Fig. 1D), we calculated the basal-like and squamous signature scores for each sample of the ICGC and the PanCuRx cohorts [3, 5] (see methods). Tumours with low levels of *FGFR4* showed the highest basal-like/squamous scores regardless of the *FGFR1* status (either high or low); indeed, the signature scores between the *FGFR4*<sup>low</sup>*FGFR1*<sup>high</sup> and *FGFR4*<sup>low</sup>*FGFR1*<sup>low</sup> were not significantly different (Fig. 1D and Supplementary Fig. 1D). Accordingly, all the *FGFR4*<sup>high</sup> tumours of the ICGC cohort classified as classical, while only 9.7% (13/134) of the *FGFR4*<sup>high</sup> tumours of the PanCuRx were defined as basal-like (Supplementary Fig. 1E). These results were substantially similar to those obtained when tumours of the two cohorts were separated based on the expression level of the known classical driver *GATA6* (Supplementary Fig. 1F). When using the molecular classification

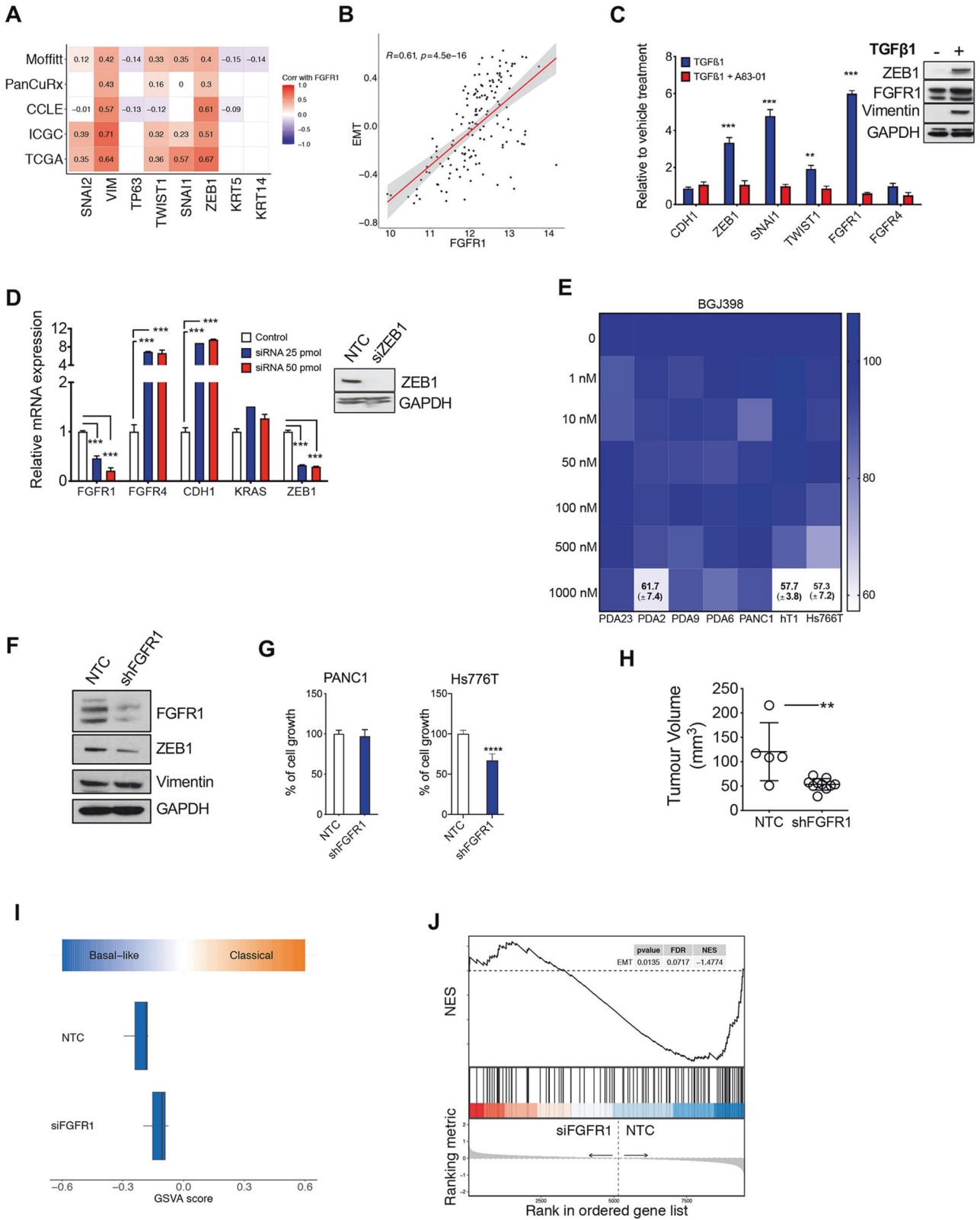
proposed in the PanCuRx study [5], the group of *FGFR4*<sup>low</sup> tumours was highly enriched for basal subtypes (Supplementary Fig. 1G). Reduced *FGFR4* expression in PDAC tissues from the ICGC [3] was associated with inferior overall survival (Fig. 1E). Conversely, the levels of *FGFR1* had no prognostic significance in different PDAC cohorts ( $n = 3$ , data not shown). To corroborate these findings, we used ISH to evaluate the expression of *FGFR1* and *FGFR4* in a cohort of 106 human pancreatic tissues from treatment naïve patients (Fig. 1F, Supplementary Fig. 2A, and Supplementary Table 1). A total of 97 tissues were suitable for evaluation of both FGFRs. We confirmed that *FGFR4* is expressed by epithelial cells while *FGFR1* is prominent in stromal elements (Fig. 1F and Supplementary Fig. 2A). Low expression of *FGFR4* was observed in 23% (22/97) of cases (Fig. 1G) and was significantly enriched in high grade tumours (Supplementary Fig. 2B). Furthermore, *FGFR4* was never detected in poorly differentiated areas while detectable with variable degree of expression in well-differentiated tumour glands (Supplementary Fig. 2C). Finally, low expression of *FGFR4* identified patients showing inferior overall survival in our cohort (Fig. 1H). To identify suitable human models for genetic manipulation of the two FGFRs, we screened an initial array of cell lines ( $n = 6$ ) and Patient-derived Organoids ( $n = 5$ ). In accordance with our results, ISH analyses of 6 human PDAC cell lines revealed high *FGFR4* in cells displaying an epithelial phenotype (Supplementary Fig. 2D–F), and higher levels of *FGFR1* in mesenchymal-like cells showing expression of ZEB1 and/or Vimentin (Supplementary Fig. 2D–F). For PDOs, RNA-seq was used to classify cultures as either classical or basal-like using single-sample Gene Set Variation Analysis (ssgsea method) [33]. Of note, the organoid culture with the highest basal-like/squamous identity (PDA9-O) showed the lowest expression of *FGFR4* (Supplementary Fig. 2G), thus representing a model for *FGFR4*<sup>low</sup> basal-like tumours.

### **FGFR1 is a functional marker of EMT in PDAC**

The interrogation of the genomic data from the ICGC [3] and TCGA [4] cohorts in cBioportal (<https://www.cbioportal.org>) revealed no recurrent genetic alteration affecting *FGFR1* in PDAC (Supplementary Fig. 3A, B). We then looked at the correlation between *FGFR1* and the established markers/drivers of PDAC cell phenotypes. In all the interrogated transcriptomic datasets ( $n = 5$ ) [3–5, 7, 34], *FGFR1* expression positively correlated with the expression of EMT genes, in particular with the master regulator *ZEB1*, yet not with expression of squamous lineage genes (*TP63*, *KRT5*, *KRT14*) (Fig. 2A). To corroborate the suggested link with EMT, we found a significant positive correlation between the Hallmark EMT signature and *FGFR1* in samples from the TCGA cohort [4] (Fig. 2B). Next, we investigated whether induction of EMT or downregulation of its master regulator *ZEB1* would affect expression of *FGFR1*. Following 48 h of TGFβ1 treatment, the SMAD4-proficient cell line hM1 displayed significant elevation in the expression of several EMT markers/drivers as well as of *FGFR1* both at mRNA and protein levels (Fig. 2C). The mRNA levels of *CDH1* and *FGFR4* were only moderately affected by the treatment. Furthermore, the transient downregulation of *ZEB1* in the PDAC cell line showing the more prominent mesenchymal-like phenotype (i.e. PANC1) led to a significant reduction in the expression of *FGFR1*, while increasing expression of *FGFR4* and the classical gene *CDH1* (Fig. 2D). Then, we sought to assess the functional consequences of *FGFR1* inhibition in PDAC. First, we treated 7 human PDAC cell lines with increasing concentrations of the *FGFR1* inhibitor BGJ398 [35] and measured cell viability using an ATP-based assay (Fig. 2E). Four out of the seven cell lines tested were primary cell lines (PDA2, PDA9, PDA23, PDA6), which were classified as either basal-like or classical based on RNA-Seq data (Supplementary Fig. 3D and data not shown). BGJ398 demonstrated poor activity and modestly affected proliferation of PDA2, hT1, and of Hs766T only at the highest dose (1 μM) (Fig. 2E). Then, we performed genetic



**Fig. 1** *FGFR4* is differentially expressed in PDAC molecular subtypes. **A** Receptor Tyrosine Kinases (RTKs) expression in basal-like and classical subtypes. The scatter plot shows the expressed RTK ranked by their mean  $\log_2$  fold change in basal-like versus classical for samples of the TCGA cohort [4]. Highlighted: *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4*. **B** Boxplot of *FGFR1* (left) and *FGFR4* (middle) Z-scores stratified by the Moffitt subtypes [7] in the TCGA [4], ICGC [3], and PanCuRx [5] datasets. \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; and ns, not significant as determined by Wilcoxon test. **C** Violin plots of the normalised expression of *FGFR1* (left panel) and *FGFR4* (right panel) in each annotated cell cluster from the integration of four different scRNA-seq datasets of PDAC tissues [5, 26–28] (see methods). **D** GSEA score (using ssgsea method) for the basal-like signature [7] for each sample of the ICGC [3] and PanCuRx [5] cohort according to the expression of *FGFR1* and *FGFR4*. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; and ns, not significant as determined by Wilcoxon test. **E** Kaplan–Meier plot comparing the overall survival of patients from the ICGC cohort [3] ( $n = 96$ ) according to the expression of *FGFR1* (left panel) and *FGFR4* (right panel) in each annotated cell cluster from the integration of four different scRNA-seq datasets of PDAC tissues [5, 26–28] (see methods). **F** Representative ISH images showing expression of *FGFR4* and *FGFR1* in two different pancreatic cancer tissues. Scale Bar, 50  $\mu\text{m}$ . Insets show magnification of selected areas, and red arrowheads indicate either epithelial or stromal cells. **G** Stacked bar plot showing the percentage of PDAC tissues ( $n = 97$ ) with either low (blue) or high (orange) expression of *FGFR4*. **H** Kaplan–Meier plot comparing the overall survival of patients according to *FGFR4* ISH status.  $p$ , Log-rank (Mantel–Cox) test.



depletion of FGFR1 by RNA interference approaches. Stable silencing of FGFR1 in PANC1 was associated with reduced protein expression of the EMT driver ZEB1 but not of the marker Vimentin (Fig. 2F). In vitro proliferation of Hs766T, but not of PANC1, was significantly reduced following downregulation of *FGFR1* (Fig. 2G).

However, orthotopically transplanted PANC1 cells deficient for FGFR1 generated smaller tumours compared to parental cells transduced with the empty vector (Fig. 2H), thus suggesting cell extrinsic effects of FGFR1 downregulation in this cell line. In addition, we performed RNAi-based competition assay in the

**Fig. 2 FGFR1 is a functional marker of EMT in PDAC.** **A** Heatmap showing correlation (Spearman's correlation) between *FGFR1* and the squamous lineage markers, and the EMT genes in five different transcriptomic datasets [3–5, 7, 34]. All annotated boxes,  $p < 0.001$  **B** Scatter plot showing the positive correlation between *FGFR1* mRNA expression and the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) signature score from MsigDB for the TCGA cohort [4]. **C** Changes in the expression level of the indicated genes in hM1 cell line treated with 5 ng/mL of TGF $\beta$ 1 alone or in combination with 500 nM of TGF $\beta$ 1 inhibitor (A83-01) for 48 h. On the right, immunoblot analysis of ZEB1, FGFR1, and Vimentin in whole-cell lysates from hM1 treated with 500 nM TGF $\beta$ 1 for 48 h. GAPDH was used as loading control. **D** Changes at 48 h in the expression level of the indicated genes in the Hs766T cell line transfected with either mock control or two different concentrations of siRNAs targeting ZEB1. On the right, immunoblot analysis of ZEB1 in whole-cell lysates of PANC1 transfected with non-targeting control (NTC) or 25 pmol of siRNA against ZEB1. GAPDH was used as loading control. In **(C and D)**, results shown as mean  $\pm$  SD of three replicates.  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$  as determined by Student's *t* test. **E** Cell viability of PDAC monolayer cultures treated with BGJ398 ( $n = 7$  cell cultures) as indicated. Data are displayed as heatmap of the percentage of inhibition at each dose of the drugs and presented as mean of three independent experiments. **F** Immunoblot analysis of FGFR1, ZEB1, and Vimentin in whole-cell lysates of PANC1 cells stably expressing the control vector (NTC) or the shRNA targeting FGFR1 (shFGFR1). GAPDH was used as loading control. **G** Relative growth (as percentage of cell proliferation) of PANC1 and Hs766T cells stably transduced with either the control vector (NTC) or the vector targeting FGFR1. Data presented as means  $\pm$  SD of three biological replicates. **H** Scatter dot plot showing differences in tumour volumes between tumour-bearing mice transplanted with PANC1/NTC ( $n = 5$  mice) or PANC1/shFGFR1 ( $n = 10$  mice). Tumour volumes were measured by ultrasound 5 weeks after transplantation.  $**p < 0.01$  as determined by Student's *t* test. **I** Boxplots of GSVA score (based on ssgsea method) for the Classical and the Basal-like signatures calculated for the Hs766T cell line transfected with non-targeting control or siRNA against *FGFR1*. **J** GSEA plot evaluating the EMT signature upon *FGFR1* knockdown in Hs766T cell line.

basal-like PDA9-O which displayed the highest protein levels of FGFR1 among the organoid cultures investigated. We observed the progressive drop-out of the vector targeting *FGFR1* (Supplementary Fig. 3E), suggesting that FGFR1 is advantageous for the proliferation of this organoid culture. We next sought to explore whether loss of *FGFR1* in a basal-like background could lead to changes in PDAC cell identity. Using RNAi, we targeted *FGFR1* in the basal-like Hs766T (PDX1<sup>-</sup>CK5<sup>+</sup>, Supplementary Fig. 2E) and performed RNA-Seq analysis (Supplementary Fig. 3F and Supplementary Table 2). GSEA demonstrated that the loss of *FGFR1* led to alteration of genes programs related to cell proliferation and Interferons' response (Supplementary Fig. 3G, Supplementary Table 3). However, the loss of *FGFR1* did not lead to significant changes in subtype expression signatures and accordingly *FGFR1*-deficient cells were classified as basal-like (Fig. 2I). Conversely, downregulation of *FGFR1* led to the significant reduction of the EMT transcriptional phenotype (Fig. 2J). In sum, our analysis reveals that FGFR1 is a functional driver of EMT in pancreatic cancer.

### FGFR4 is epigenetically downregulated in basal-like/squamous PDAC

The reduced expression of FGFR4 in aggressive subtypes of PDAC might be due to either genetic or epigenetic mechanisms. First, we explored the genomic data from the ICGC [3] and TCGA [4] cohorts and found no recurrent genetic alterations affecting *FGFR4* (Supplementary Fig. 3A, C). Therefore, we interrogated the available methylation data from the ICGC cohort [3] and found that the downregulation of *FGFR4* in the squamous subtype was associated with hypermethylation of the gene (Fig. 3A). Next, we reanalysed data from Diaferia et al. [36] that used ChIP-Seq to profile marks indicative of either active (e.g. H3K27ac) or inactive (e.g. H3K9me3) chromatin in PDAC cell lines representative of classical and basal-like tumours. We found that the genomic region proximal to the *FGFR4* transcription start site showed differential levels of H3K27ac between basal-like and classical cell lines, with changes that were concordant with higher level of transcripts in the classical cell line (Fig. 3B and Supplementary Fig. 4A). A broader peak of the active enhancer chromatin mark H3K4me1 was observed for the classical cell line in the intron 1 of *FGFR4* gene (Fig. 3B), which has been reported to contain an enhancer region [37]. In keeping with that, *FGFR4* expression positively correlated with the expression of endodermal transcription factors and epithelial genes (*CDH1* and *ERBB3*) (Fig. 3C) in 5 different transcriptomic datasets of PDAC [3–5, 7, 34]. In particular, *FGFR4* showed significant positive correlation with the transcription factor *HNF1A* in all datasets [3–5, 7, 34] (Fig. 3C). Accordingly,

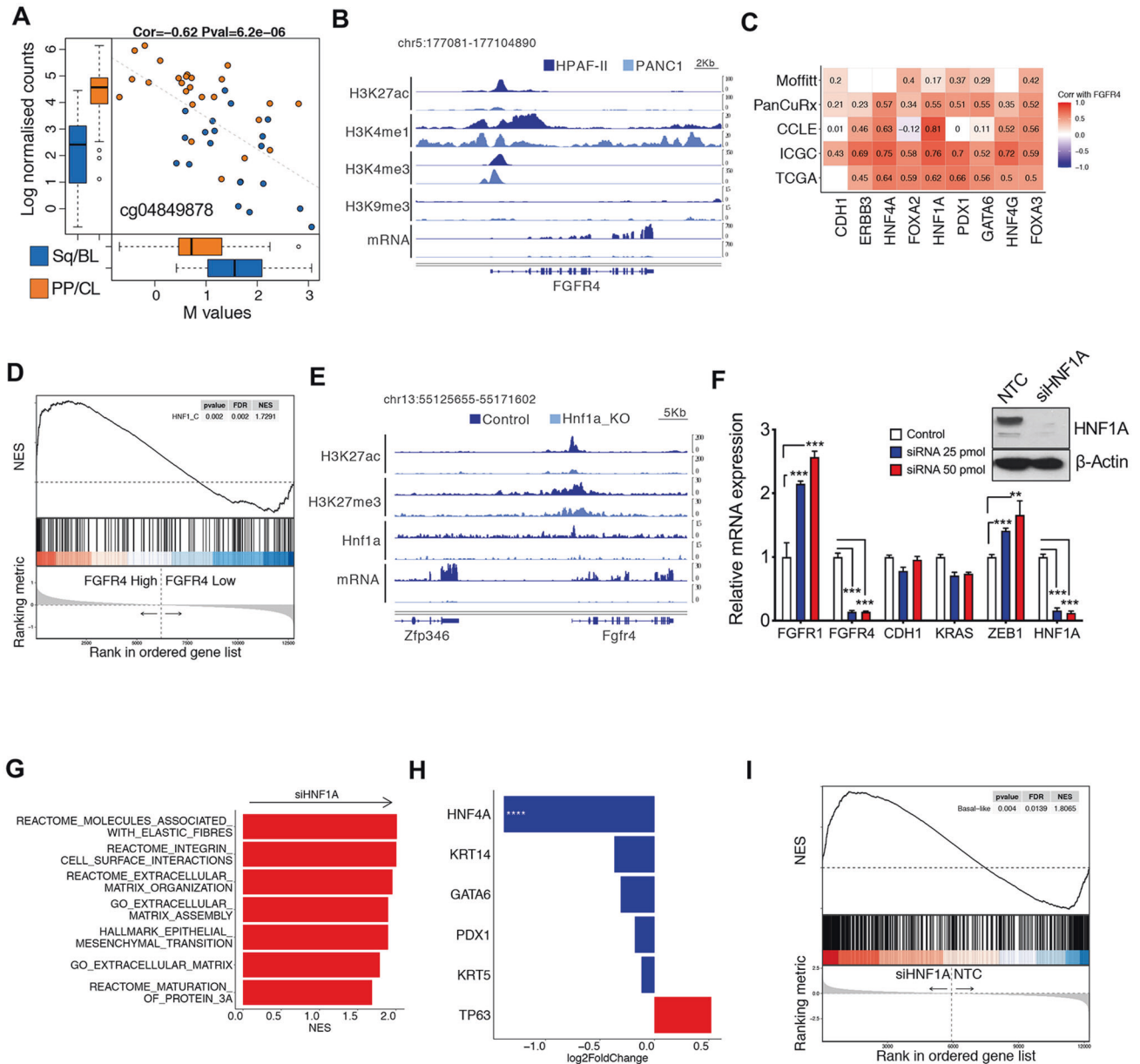
putative target genes of *HNF1A* were significantly enriched in *FGFR4* high tumours of the ICGC cohort (Fig. 3D). To prove direct regulation by the transcription factor, we reanalysed available data from pancreas-specific knockout of *Hnf1a* [19]. In *Hnf1a*-deficient versus proficient pancreatic cells, expression of *Fgfr4* was significantly reduced and this was concordant with genomic regions proximal to the transcription start site of *Fgfr4* showing reduced occupancy by *HNF1A* and reduced levels of H3K27ac (Fig. 3E). Overall, our analysis strongly suggests that *FGFR4* is a marker of the classical subtype whose expression is epigenetically reduced in basal-like PDAC cells.

### HNF1A blocks EMT in a classical PDAC cell line

To confirm the link between *HNF1A* and *FGFR4* in the human PDAC setting, we manipulated the expression of *HNF1A* by RNAi in HPAF-II, which has been reportedly used as a model of classical PDAC [36, 38]. The successful downregulation of *HNF1A* was associated with the reduced expression of *FGFR4* and increased expression of both *ZEB1* and *FGFR1* (Fig. 3F). Downregulation of *HNF1A* was associated with substantial changes in the transcriptome of the HPAF-II cell line (Supplementary Fig. 4B and Supplementary Table 4) and gene-set enrichment analysis (GSEA) [39] showed the enrichment of several pathways and terms related to extracellular matrix organization/deposition and the EMT (Fig. 3G, and Supplementary Table 5). Of the marker/drivers of PDAC epithelial subtypes, only *HNF4A* was significantly downregulated upon *HNF1A* knockdown (Fig. 3H). In keeping with a recent work [18], *HNF1A* downregulation was not sufficient to drive a full phenotype switch in HPAF-II cell line. Yet, *HNF1A* silencing significantly increased the expression of genes defining the basal-like signature [7] as assessed by GSEA (Fig. 3I).

### Loss of FGFR4 enhances the malignant behaviour of PDAC cells

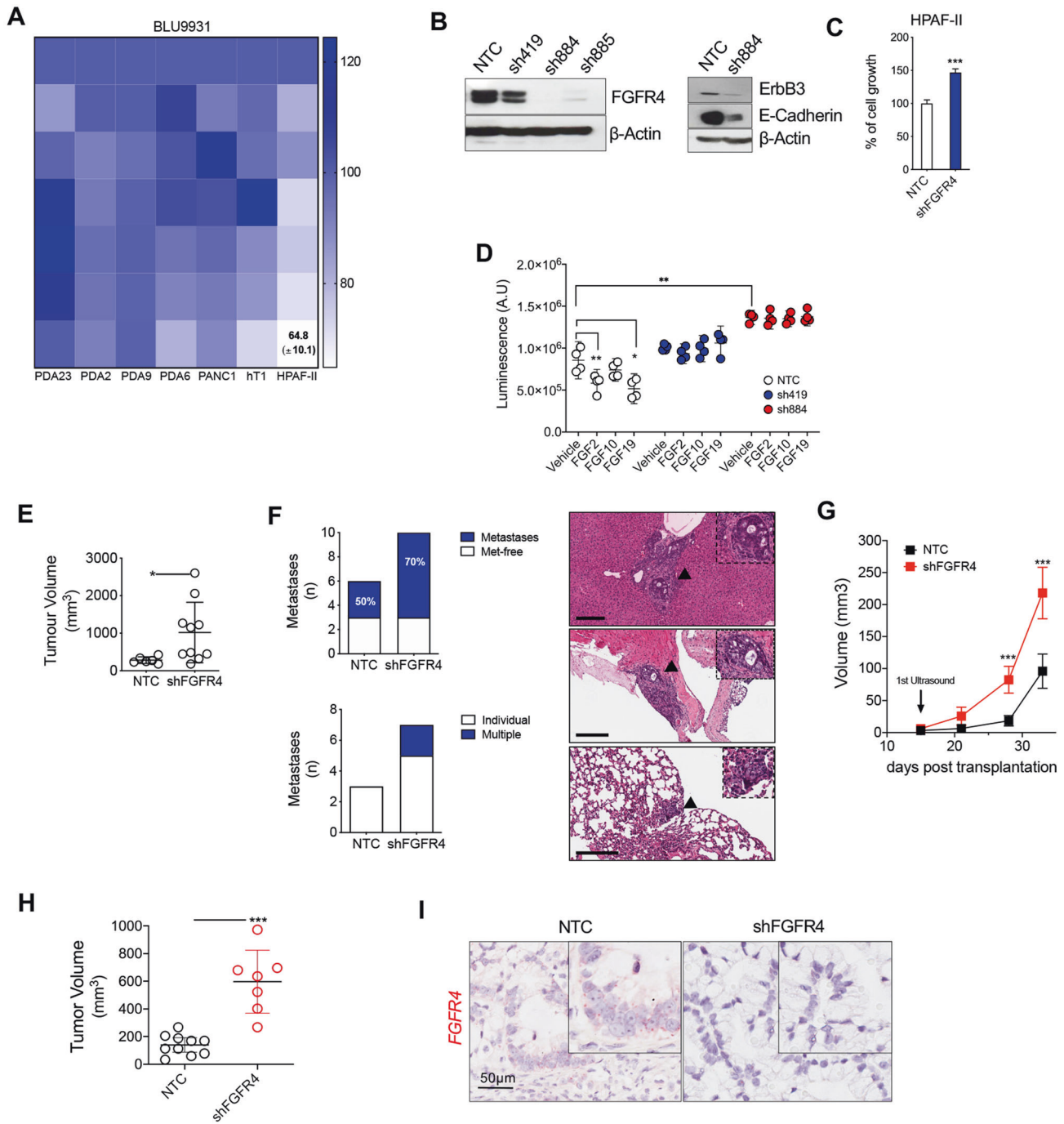
To evaluate the functional relevance of FGFR4 in dictating PDAC phenotypes, we performed genetic and pharmacological perturbation experiments (Fig. 4 and Supplementary Fig. 4). Cell viability of established cell lines and primary PDAC cells ( $n = 7$ ) was not significantly inhibited by the continuous treatment with the FGFR4 inhibitor BLU9331 [40] (FGFR4i) (Fig. 4A). Of note, low doses of FGFR4i slightly increased the proliferation of some PDAC cell lines. Also considering the dose-response analysis of PDAC cells with the FGFR1 inhibitor BGJ398 (Fig. 2E), our results show that pharmacological inhibition of FGFRs is not a viable strategy to reduce PDAC cells proliferation. Next, we targeted *FGFR4* in the classical cell line HPAF-II using three different shRNAs (Fig. 4B). *FGFR4* was successfully downregulated by all shRNAs with the #884 and the



**Fig. 3** Expression of *FGFR4* and determinants of molecular subtypes. **A** Hypermethylation of *FGFR4* in squamous/basal-like tumours (blue) from the ICGC cohort [3] is concordant with the downregulation of the gene. Indicated is the CpG probe showing the highest correlation. **B** Representative snapshot of the genomic region of *FGFR4* in PANC1 (high-grade, basal-like) and HPAF-II (low-grade, classical) from Diaferia et al. [36] showing histone modifications (H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3, H3K9me3) and RNA-seq data. **C** Heatmap showing correlation (Spearman's correlation) between *FGFR4* and the expressed endodermal transcription factors and epithelial genes in five different transcriptomic datasets [3–5, 7, 34]. All annotated boxes,  $p < 0.001$ . **D** GSEA plot evaluating the enrichment of the geneset containing putative HNF1A target genes when comparing *FGFR4* high versus *FGFR4* low tumours of the ICGC cohort [3]. **E** Representative snapshot of the genomic region of *Fgfr4* in mouse pancreatic cells proficient (control) or deficient (*Hnf1a\_KO*) for HNF1A from Klasniz et al. [19] showing histone modifications (H3K27ac, H3K27me3), HNF1A occupancy, and RNA-seq data. **F** Changes in the expression levels of the indicated genes in the HPAF-II cell line transfected with either mock control or two different concentrations of siRNA against *HNF1A*. Results are shown as mean  $\pm$  SD of three replicates.  $***p < 0.001$  as determined by Student's  $t$  test. On the right, immunoblot analysis of HNF1A in whole-cell lysates of HPAF-II transfected with either non-targeting control (NTC) or 25 pmol of siRNA targeting HNF1A.  $\beta$ -Actin was used as loading control. **G** Enrichment of selected pathways upon *HNF1A* knockdown. The GSEA analysis was performed using gene sets from REACTOME, GO, Hallmark, and REACTOME databases in MsigDB library. Displayed gene sets that passed false-discovery rate  $< 0.05$ . See also Supplementary Table 5. **H** Expression of classical and basal-like genes in HNF1A-deficient HPAF-II cells (compared to parental cells) from RNA-Seq data. Data are presented as mean  $\pm$  SD.  $****, p < 0.0001$  by Student  $t$  test. **I** GSEA plot evaluating the basal-like signature upon depletion of HNF1A in HPAF-II cell lines.

#419 showing the highest and lowest efficiency, respectively (Fig. 4B). The majority of results were obtained using the two most efficient shRNA, namely #884 and #885. Loss of *FGFR4* in HPAF-II cell line was associated with downregulation of the epithelial

markers E-Cadherin and ERBB3 (Fig. 4B) and increased in vitro proliferation (Fig. 4C). Interestingly, downregulation of *FGFR4* expression altered the proliferative response to three different FGF ligands (Fig. 4D). In particular, continuous treatment with FGF2



and FGF19 significantly reduced the proliferation of control HPAF-II cell line but did not affect the proliferation of cells displaying downregulation of *FGFR4* (Fig. 4D). Furthermore, we orthotopically transplanted HPAF-II transduced with non-targeting and targeting vectors into immunocompromised mice and monitored tumour growth for 4 weeks. At the experimental endpoint, loss of *FGFR4* in HPAF-II cell line generated larger tumours with increased number of mitotic figures (Fig. 4E, and data not shown), and significantly increased the metastatic burden at the lungs and the liver (Fig. 4F). In agreement with that, the group of *FGFR4*<sup>low</sup> tumours of the PanCuRx cohort [5] was significantly enriched for metastases (Supplementary Fig. 4C). The in vivo pro-tumorigenic effect driven by the loss of *FGFR4* was further validated in organoid-based xenografts with the classical PDO hT3 (Supplementary Fig. 2G).

Immunodeficient mice we orthotopically transplanted with equal number of cells from either parental PDOs ( $n=7$ ) or cultures stably transduced with the shRNA targeting *FGFR4* ( $n=7$ ) (Supplementary Fig. 4D). We monitored tumour growth with high-contrast ultrasound imaging starting at day 15 post transplantation. In agreement with the results obtained with established cell lines, PDOs expressing high levels of *FGFR4* displayed reduced proliferation in vivo (Fig. 4G) and less efficient engraftment rate at earlier time points as only 1 out of 7 transplanted mice showed a detectable mass at day 15 as opposed to the *FGFR4* deficient PDO (5/7 mice with detectable masses). Finally, we downregulated *FGFR4* in the organoid model of *FGFR4*<sup>low</sup> basal-like tumours (PDA9-O) prior to in vivo transplantation in immunocompromised hosts. At the endpoint,

**Fig. 4 Loss of FGFR4 is associated with an aggressive PDAC biological behaviour.** **A** Cell viability of PDAC monolayer cultures treated with BLU3391 ( $n = 7$  cell cultures) as indicated. Data are displayed as heatmap of the percentage of inhibition at each dose of the drugs and presented as mean of three independent experiments. **B** Immunoblot analysis of FGFR4, ErbB3, and E-Cadherin (loading control,  $\beta$ -Actin) in HPAF-II stably expressing the control vector (NTC) or the construct targeting FGFR4 (shFGFR4). **C** Relative growth (as percentage of cell proliferation) of HPAF-II cells stably transduced with either the control vector (NTC) or the vector targeting FGFR4 (#884). Data presented are means  $\pm$  SD of three biological replicates. **D** Proliferation (as total luminescence) of HPAF-II cell line stably transduced with NTC or two different short hairpin RNA against FGFR4 (#419 and #884) following 48 h stimulation with FGF2 (25 ng/mL), FGF10 (100 ng/mL), and FGF19 (100 ng/mL). Data presented as means  $\pm$  SD ( $n = 3$  biological replicates). \* $p < 0.05$ ; and \*\* $p < 0.01$  as determined by Student's  $t$  test. **E** Scatter dot plot showing differences in tumour volumes between tumour-bearing mice transplanted with HPAF-II/NTC ( $n = 6$  mice) and HPAF-II/shFGFR4 ( $n = 10$  mice). Tumour volumes were measured by ultrasound 4 weeks after transplantation. \* $p < 0.05$  as determined by Student's  $t$  test. **F** Stacked bar plot showing the distribution of mice with or without metastatic lesions in the two different cohort of mice from (E) (upper panel). Lower panel, stacked bar plot showing the number of mice with individual or multiple metastatic lesions in the two different cohort from (E). On the right, representative Hematoxylin and Eosin staining of metastatic lesions at the liver (top and middle) and at the lungs (bottom) from a mouse bearing multiple metastases. The black arrows indicate the areas shown in the insets. Scale bar, 200  $\mu$ m. **G** Line graph showing tumour volumes (mm<sup>3</sup>) of pancreatic masses detected upon the orthotopic injection of  $1 \times 10^6$  cells from hT3 PDO into immunodeficient mice ( $n = 7$ ). Means  $\pm$  SD are shown. Mice were screened at 15, 21, 27, 32 days following transplantation. \*\*\*\* $p < 0.001$  by two-way ANOVA with Sidak's test for multiple comparison. **H** Scatter plot showing the difference in tumour volumes between mice transplanted with PDA9 organoids either transduced with control vector ( $n = 10$  mice) or with shFGFR4 ( $n = 7$  mice). Tumour volumes were measured by ultrasound 4 weeks after transplantation. \*\*\* $p < 0.01$  as determined by Student's  $t$  test. **I** Representative in situ hybridisation staining of *FGFR4* in PDA9-O in mice from (H) and showing loss of *FGFR4* in vivo. Scale bar, 50  $\mu$ m.

the tumour masses were significantly larger in animals transplanted with FGFR4 deficient cells (Fig. 4H). ISH analyses of transplanted tissues confirmed the downregulation of *FGFR4* as opposed to control mice (Fig. 4I and Supplementary Fig. 4E). To further generalise our results, we transiently downregulated *FGFR4* in four PDAC cell lines (including HPAF-II) and observed increased proliferation regardless of the molecular subtype of the cells (Supplementary Fig. 4F). In agreement with that, GSEA comparing the transcriptomes of *FGFR4*<sup>low</sup> versus *FGFR4*<sup>high</sup> tumours in the ICGC cohort revealed the significant enrichment of terms related to "cell proliferation" and "cell cycle" in *FGFR4*<sup>low</sup> PDAC (Supplementary Fig. 4G). Overall, these data suggest that endogenous levels of FGFR4 limit the malignant phenotype of PDAC regardless of the genetic background of the cells.

#### Loss of FGFR4 is associated with increased basal-like/squamous features in PDAC

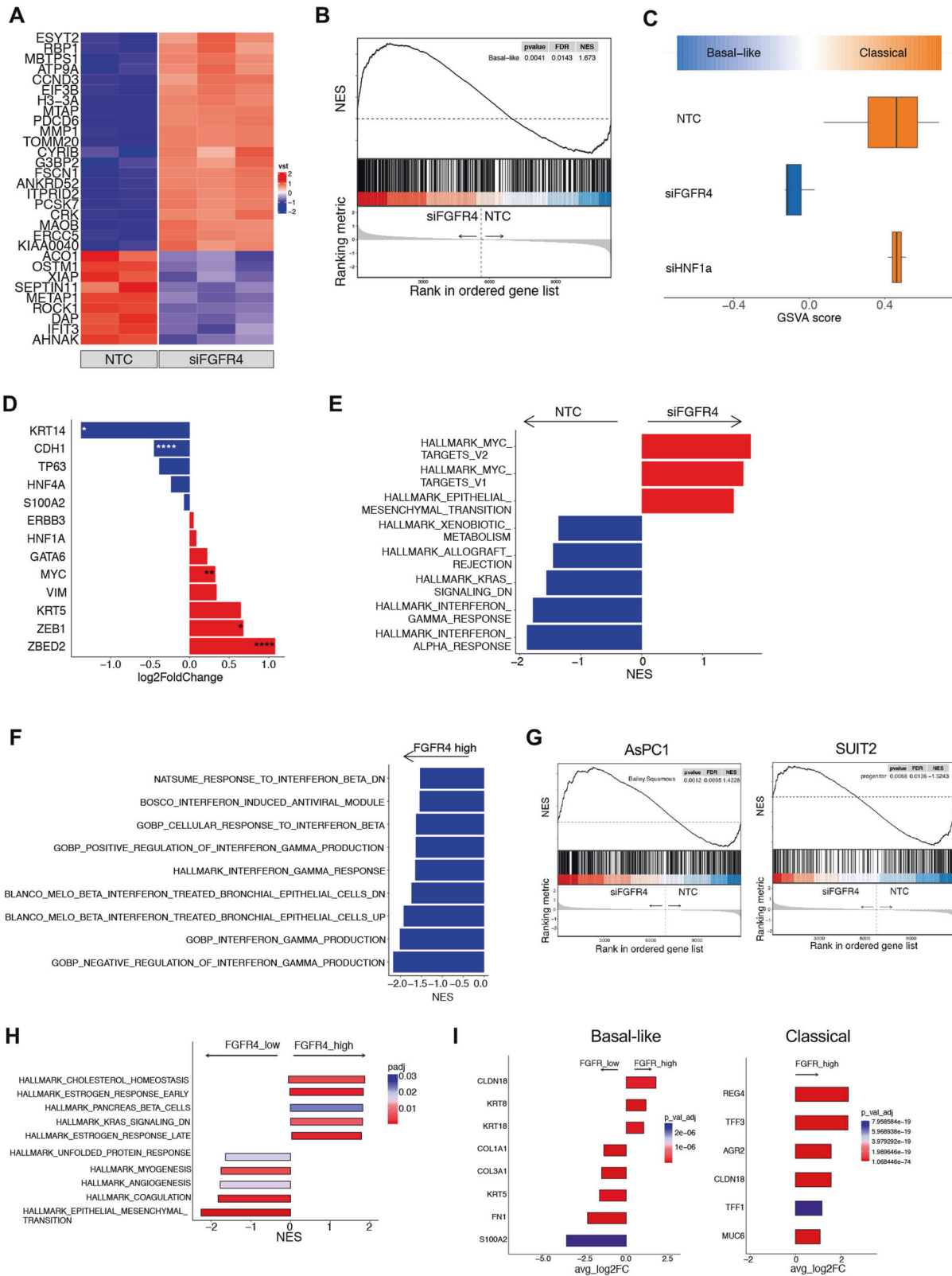
We next sought to explore whether loss of *FGFR4* in a classical background could lead to changes in PDAC cell identity. *FGFR4* knockdown in HPAF-II cells led to substantial changes in the transcriptome of this classical cell line (Supplementary Table 6 and Fig. 5A). Similarly, *FGFR4* knockdown led to profound changes in the expression of genes that drive the signatures of molecular subtypes of PDAC (Fig. 5B) and deficient cells were classified as basal-like (Fig. 5C) suggesting that, in this cell line, FGFR4 is a superior barrier to the expression of ectopic gene programs (i.e. basal-like) compared to HNF1A. We then looked at changes in the expression of markers/drivers of subtype following *FGFR4* silencing and found reduced expression of *CDH1* (Fig. 5D), which is consistent with the reduction of E-cadherin (protein level) following stable knockdown (Fig. 4B). Of transcription factors previously associated with the basal-like/squamous lineage, ZBED2 showed the most prominent upregulation upon *FGFR4* silencing (Fig. 5D). ZBED2 has been recently demonstrated to antagonise the action of interferon regulatory factor 1 (IRF1), to be selectively enriched in squamous tumours, and to prevent the growth arrest induced by Interferon in PDAC cells [41]. Accordingly, silencing of *FGFR4* led to downregulation of gene sets related to interferon pathway in HPAF-II (Fig. 5E, Supplementary Table 7) while increasing for the expression of gene programs related to c-Myc activity and EMT. To corroborate our findings, we interrogated RNA-seq from patients' tissues and found that ZBED2 is the gene whose expression is more prominent in *FGFR4* low tumours of the ICGC cohort (Supplementary Fig. 5A). Furthermore, GSEA comparing the transcriptomes of *FGFR4*<sup>low</sup> versus *FGFR4*<sup>high</sup> tumours in both the ICGC and PanCuRx cohorts revealed the significant downregulation of terms related to "Interferon" in

*FGFR4*<sup>low</sup> PDAC (Fig. 5F and Supplementary Fig. 5B). To further generalise our results and understand whether the effect of *FGFR4* downregulation on PDAC cell lineages is context dependent, we targeted the receptor by RNAi in two additional models of classical/progenitor (i.e. epithelial) PDAC: AsPC1 and SUIT2. These two cell lines have been extensively used to identify the molecular barriers to the expression of basal-like/squamous programs in PDAC [9, 38] and display high expression of *FGFR4* (Supplementary Fig. 5C). Differently from HPAF-II, the forced downregulation of *FGFR4* in these two models did not lead to a full switch of phenotype (Supplementary Fig. 5C). Nevertheless, the loss of *FGFR4* led to the reduction of classical/progenitor programs and of the epithelial marker E-cadherin, the enrichment of transcriptional signatures of basal-like/squamous PDAC and of genesets related to increased proliferation and c-Myc activity (Fig. 5G, Supplementary Fig. 5D–H). While suggesting that the effect on "full subtype switch" is cell-context dependent, our results strongly suggest that *FGFR4* limits the expression of gene programs of aggressive (i.e. basal-like/squamous) PDAC. To further ascertain whether *FGFR4* expression is associated with changes in the expression of gene and gene programs of the two PDAC subtypes in human tissues, we interrogated the scRNA-Seq data from Peng et al. [27]. First, we confirmed the enrichment for *FGFR4*<sup>high</sup> cells in the epithelial compartment of patients displaying the classical phenotype (Supplementary Fig. 5I). Then, we separated cases with lowest and highest expression of *FGFR4* (Supplementary Fig. 5J) to find that those with elevated epithelial expression of *FGFR4* accordingly displayed elevated expression of classical markers (Supplementary Fig. 5K). Furthermore, *FGFR4*<sup>low</sup> cells were characterised by gene expression programs of basal-like/squamous subtypes (Fig. 5H), which included EMT related gene sets. Finally, we sorted out basal-like and classical cells from those cases and compared the transcriptome of cells displaying high and low expression of *FGFR4*. In line with the suggested role for *FGFR4* in sustaining the classical phenotype, classical cells with the highest expression of *FGFR4* displayed elevated expression of classical genes (Fig. 5I). Similarly, even within basal-like cells those with the highest expression of *FGFR4* displayed elevated level of classical/epithelial PDAC while the ones with reduced expression of the gene showed increased expression of basal-like/squamous markers (Fig. 5I).

#### Loss of FGFR4 leads to increased fluxes through the mTORC1 pathway in PDAC cells

Next, we used Enrichr [42] on gene expression data to infer signalling pathways' dysregulation that might explain the increased aggressiveness observed in PDAC cells upon depletion





of FGFR4 (Supplementary Table 8). We found the significant enrichment of gene sets related to the PI3K/AKT, ERBB, Axon guidance, and RAS signalling pathways in PDAC cells depleted for *FGFR4* (Fig. 6A, Supplementary Table 8) as well as in the *FGFR4*<sup>low</sup> tumours of both the ICGC [3] and PanCuRx [5] cohorts (Fig. 6B,

Supplementary Table 8). First, we evaluated the effect of FGFR4 downregulation on the main signaling activated through the stimulation of FGFRs, the MAPK pathway. Serum-starved HPAF-II and SUIT2 cell lines were stimulated for 20 min with FGF ligands or 2% FBS, which induced the phosphorylation of ERK in both

**Fig. 5** **FGFR4 loss leads to the expression of basal-like/squamous programs in PDAC.** **A** Heatmap showing changes in the expression pattern of the 30 most differentially expressed genes in the comparison between: control and FGFR4 knock-down (siFGFR4). Z-scores derived from DESeq2-VST transformed counts. See also Supplementary Table 6. **B** GSEA plot evaluating the Basal-like signature upon *FGFR4* knockdown in HPAF-II cell line. **C** Boxplots of GSVA score (based on the ssGSEA method) evaluating the Basal-like and Classical signatures [7] upon FGFR4 knockdown. **D** Expression of classical and basal-like genes in FGFR4-deficient HPAF-II cells (compared to parental cells) from RNA-Seq data. Data are presented as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; and \*\*\*\* $p < 0.0001$  by Student *t* test. **E** Enrichment of selected pathways (GSEA) when comparing HPAF-II proficient (NTC) and deficient (siFGFR4) cells. GSEA was performed using gene sets from Hallmark database in MsigDB library. Displayed gene sets that passed false-discovery rate  $< 0.05$ . **F** Enrichment of Interferon related pathways when comparing *FGFR4* low versus *FGFR4* high tumours of the PanCuRx cohort [5]. GSEA was performed using gene sets from databases in MsigDB library. Displayed gene sets that passed false-discovery rate  $< 0.05$ . **G** GSEA plot evaluating the Bailey\_Squamous (left panel) and the Bailey\_Progenitor (right panel) signatures upon *FGFR4* knockdown in AsPC1 and in SUIT2 cell lines, respectively. **H** Enrichment of selected pathways (GSEA) when comparing *FGFR4* high versus *FGFR4* cells from the scRNA-Seq dataset of Peng et al. [27]. See also Supplementary Fig. 5I. GSEA was performed using gene sets from Hallmark database in MsigDB library. **I** Expression of classical and basal-like/squamous genes in *FGFR4* high cells (compared to *FGFR4* low cells) displaying either a basal-like (left panel) or a classical (right panel) phenotype.

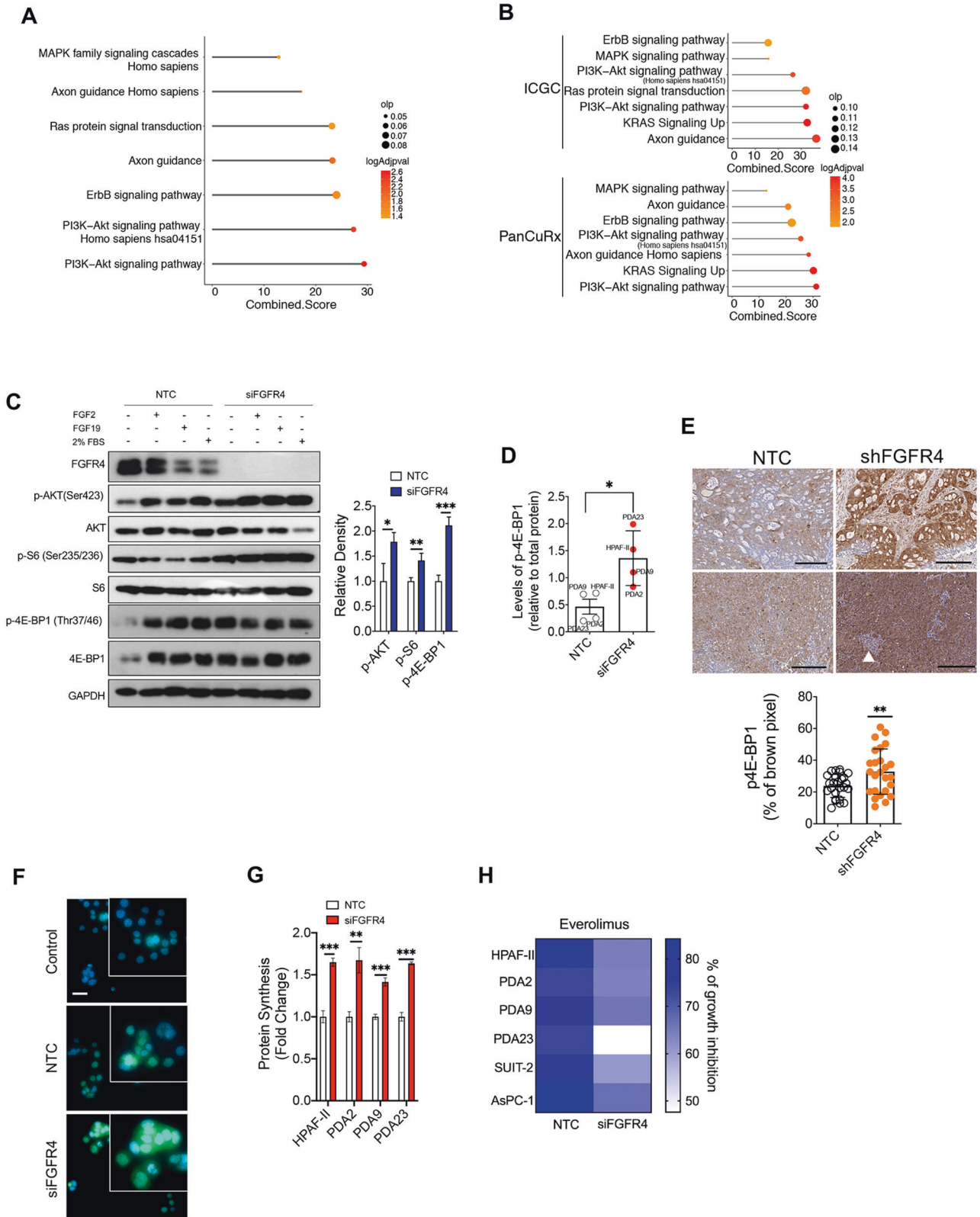
parental and FGFR4-depleted cells (Supplementary Fig. 6A, B). This suggests that the loss of FGFR4 does not compromise signaling through this pathway. Furthermore, the baseline level of phospho-ERK were elevated in both HPAF-II and SUIT2 cell lines upon FGFR4 knockdown, which is in line with the pathway analysis from RNA-seq data. A common single nucleotide polymorphism in the exon 9 of the *FGFR4* gene results in a nucleotide change (G388R), which has been shown to enhance STAT3 activation without altering MAPK/ERK pathway [43]. In our cohort, 7 out of 12 PDAC models carry the variant (see material and methods section). In line with a previous report [43], the polymorphic allele does not explain differences in *FGFR4* transcript levels between cell lines (data not shown). Then, we tested the effect of *FGFR4* knockdown on the activation of STAT3 in cell lines either wild-type (AsPC1) or carrying the polymorphic allele (HPAF-II and SUIT2). In line with the literature [43], the depletion of FGFR4 in SUIT2 and HPAF-II cell lines reduced the baseline and stimulated activation of STAT3 (Supplementary Fig. 6C). Conversely, the downregulation of FGFR4 in AsPC1 cell line did not dramatically affected the activation of STAT3, while consistently driving increased fluxes through MAPK at baseline (Supplementary Fig. 6C). Next, we sought to validate the inferred activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway, which resulted the most dysregulated pathway in both cell lines and tissues at transcriptomic level (Fig. 6A, B).

We assessed the baseline and stimulated activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway through the evaluation of the phosphorylated levels of AKT and of the downstream mTORC1 effectors (the inhibitory eIF4E-binding protein 4E-BP1, and the substrate of the S6 Kinase). Cells were serum-starved and then stimulated with FGF2, FGF19, and 2% of Fetal-bovine serum (FBS). In parental HPAF-II cell line, 20 min stimulation with either FGF ligands or FBS led to activation of AKT (Ser473), to increased phosphorylation of 4E-BP1, but not to increased phosphorylation of the S6K1 substrate S6 (Fig. 6C and Supplementary Fig. 6D). Strikingly, loss of FGFR4 in serum-starved condition was associated to increased activation of AKT, of S6K and phosphorylation of 4E-BP1 (Fig. 6C). As compared to the parental cell line, HPAF-II lacking FGFR4 showed higher induction of phosphorylated level of AKT, but no further increase in the phosphorylation of 4E-BP1, following stimulation with either FGFs or serum (Fig. 6C and Supplementary Fig. 6D). Overall, these data suggest that loss of *FGFR4* in HPAF-II cell line increases the flux through the mTORC1 pathway in particular through the inhibition of the translational repressor 4E-BP1, which is known to be required for mTORC1-dependent regulation of proliferation in mammalian cells [44]. We replicated these results in five additional cell lines (PDA2-9-23, SUIT2, and AsPC1) by showing that the loss of FGFR4 primarily increases the phosphorylation of 4E-BP1 at baseline (Fig. 6D and Supplementary Fig. 6E–H). In keeping with this, we found increased levels of phosphorylated 4E-BP1 in pancreatic cancer tissues from mice transplanted with HPAF-II stably expressing shFGFR4 (Fig. 6E). Given that mTORC1 is the master regulator of

protein synthesis [45], we measured changes in protein synthesis following FGFR4 knockdown in four different PDAC cell lines (see methods). Loss of FGFR4 significantly increased total protein synthesis (Fig. 6F, G) and coherently gene expression terms related to translational initiation were significantly enriched following *FGFR4* knockdown (Supplementary Fig. 6I). Finally, we reasoned that if elevation of mTORC1 pathway activity was primarily responsible for the increased proliferation of PDAC cells upon FGFR4 depletion, then pharmacological inhibition of the pathway could represent a viable strategy to reverse this phenotype. Indeed, we found that, compared to the vehicle-treated cells, the treatment with the mTORC1 inhibitor (Everolimus) resulted in a larger inhibition of cell proliferation in FGFR4 depleted cells as opposed to parental cells (Fig. 6H). Overall, our results indicate that loss of *FGFR4* in PDAC is associated to increased mTORC1-driven cell proliferation regardless of the genetic and transcriptomic background of the cells.

## DISCUSSION

Here, we show that the loss of *FGFR4* expression in PDAC is invariably associated with the acquisition of a more aggressive phenotype by cancer cells driven by hyperactivation of the mTORC1 pathway. Conversely, we found that FGFR1 is a functional marker of the EMT. Receptor-Tyrosine Kinases (RTKs) initiated signalling is critical to cell fate determination [20, 21]. Therefore, we reasoned to explore the involvement of RTKs into the definition of PDAC subtypes which display distinct biological and clinical behaviours. The FGF-FGFR axis has been reportedly involved in pancreatic cell specification [22–25] and, while an aberrant FGFR signalling is reported in several malignancies [46, 47], its involvement in PDAC has been largely neglected so far. Amplification and overexpression of FGFR1 are described in up to 10% of patients with advanced PDAC [48] but rarer in resectable cohorts [3, 4]. Expression of FGFR4 is reported in a substantial fraction of PDAC but its role in mediating tumorigenesis and therapy resistance has been seldomly explored [49, 50]. Here, we provide multiple lines of evidence that *FGFR4* expression is restricted to epithelial cells in both normal and diseased pancreata, selectively elevated in classical tumours, and correlated with better outcomes. As opposed to *FGFR4*, *FGFR1* showed more promiscuous expression in both normal and diseased pancreata, was strongly associated with the EMT phenotype but not with epithelial (i.e. classical or basal-like) PDAC subtypes. Accordingly, genetic manipulation of *FGFR1* in cells displaying mesenchymal traits and classified as basal-like based on transcriptomic profiling resulted in a reduced expression of markers/drivers of EMT and of the EMT gene program but did not lead to epithelial phenotype switch. Increased *FGFR1* expression could be observed in PDAC cells following prolonged exposure to TGF $\beta$ 1 and coherently reduced upon transient knockdown of the master-regulator ZEB1. Activation of FGFR1 is linked to EMT in prostate cancer [51], and



both EMT and upregulation of *FGFR1* has been linked to resistance to targeted therapies in lung cancers [52, 53]. In our study, selective inhibition of *FGFR1* with BGJ398 did not dramatically affect proliferation of PDAC cells. Differently from *FGFR1*, we found a defined relationship between *FGFR4* expression and the

classical subtype of PDAC. Loss of *FGFR4* in basal-like/squamous tumours was concordant with hypermethylation of the gene and reduced levels of active chromatin in its regulatory regions. Our results strongly suggest an epigenetic dysregulation of *FGFR4* expression in basal-like/squamous tumours which is similar to that

**Fig. 6 Loss of FGFR4 is associated to hyperactivation of mTORC1 in PDAC. A** Enrichr pathway analysis of significantly over-represented genes in FGFR4 deficient HPAF-II cells. See also Supplementary Table 8. **B** Enrichr pathway analysis of significantly over-represented genes in *FGFR4<sup>low</sup>* tumours of the ICGC [3] (top) and PanCuRx [5] (bottom) cohorts. See also Supplementary Table 8. **C** Immunoblot analysis in whole-cell lysates of HPAF-II cell line transfected with either control (NTC) or siRNA targeting FGFR4. GAPDH was used as loading control. Quantification of changes in the phosphorylated levels of selected proteins (p-AKT, p-S6, and p-4E-BP1) between NTC and siFGFR4 at baseline is provided in the bar plots on the right (data presented as means  $\pm$  SD of four biological replicates). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  by Student's *t* test. See also Supplementary Fig. 6D. **D** Scatter plot showing changes in the phosphorylated levels of 4E-BP1 in four different cell cultures (HPAF-II, PDA2, PDA9, PDA23) following transient knockdown of FGFR4. \* $p < 0.05$  by Student's *t* test. The quantification refers to the immunoblots of (C) and Supplementary Fig. 6E–G. **E** Representative images of the immunohistochemical staining for phospho-4E-BP1 in tissues from mice transplanted with either mock (NTC) or shRNA targeting FGFR4. Areas with different histologies were included in the analyses. White arrowhead refers to islet of Langerhans, which stained negative and used as internal control. The quantification is provided in the scatter dot plot (bottom panel) as percentage of brown pixel (mean intensity/nuclei). A minimum of five field of visualisation (FOVs, 20X areas) per mouse (5 mice/cohort) was analysed. Scale bars, 200  $\mu$ m. **F** Immunodetection of DAPI (blue), and newly synthesised protein (green) in cycloheximide-treated HPAF-II cells (top), and HPAF-II transfected with control (NTC, middle panel) and siRNA targeting FGFR4 (bottom panel). Scale bar, 20  $\mu$ m. **G** Quantitative Click-IT HPG Alexa Fluor 488 immunofluorescence labeling showed a significant increase in nascent protein synthesis following the silencing of FGFR4 in different monolayer cultures. Data presented as means  $\pm$  SD ( $n = 3$  biological replicates per cell culture). \*\* $p < 0.01$ ; and \*\*\* $p < 0.001$  as determined by Student's *t* test. **H** Cell viability of PDAC monolayer cultures transfected with either mock or siRNA targeting FGFR4 for 48 h and then challenged with 1  $\mu$ M of the mTORC1 inhibitor Everolimus for 48 h (see methods). Data are displayed as heatmap of the percentage of inhibition relative to the untreated control and presented as mean of three independent experiments.

observed for several endodermal transcription factors. We also demonstrated that *FGFR4* is a direct target of the classical transcription factor HNF1A. In line with recent reports, the silencing of *HNF1A* in the classical PDAC cell line HPAF-II was not sufficient to drive a subtype switch. In the same model, however, downregulation of *FGFR4* was sufficient to drive a full subtype switch thus suggesting that *FGFR4* has stronger “antibasal” function than HNF1A in this cell line. In other two well-established models of classical/progenitor PDAC, the forced downregulation of *FGFR4* was not sufficient to drive a full switch of phenotype towards the basal-like subtype but was invariably associated with the reduced expression of classical genes and the enrichment for transcriptional programs of basal-like/squamous PDAC. This suggests that *FGFR4* acts to maintain the classical phenotype and therefore to limit the expression of ectopic gene programs (i.e. basal-like/squamous) in PDAC. In keeping with that, the analysis of scRNA-Seq data demonstrated that, at individual cell level, *FGFR4* expression is elevated in cells with a more classical/epithelial phenotype.

We additionally showed that *FGFR4* loss is associated with enhanced malignancy of PDAC cells by increasing in vitro and in vivo proliferation as well as enhancing metastatization of a cell line of the classical background. This finding further corroborates the evidence that basal-like cells tend to accumulate in advanced stages of the disease. While repression of “basalness/squamousness” seems an intrinsic feature of *FGFR4*, we also showed that its silencing in *FGFR4<sup>low</sup>* basal-like models increases malignant behaviour suggesting a bona fide tumour suppressive role for endogenous levels of *FGFR4* in PDAC. Others have recently suggested that RTKs in PDAC might exert an oncogenic role only when overexpressed [54]. In keeping with this, acceleration of cell proliferation could be observed in established and primary cell lines regardless of their background and upon either transient or stable knockdown of *FGFR4*. Accordingly, gene programs related to cell cycle and proliferation were highly enriched in the comparison between low versus high *FGFR4* tumours of the ICGC and PanCuRx cohorts [3, 5]. Pharmacological inhibition of *FGFR4* had little to no effect on the short-term proliferation of several PDAC cell lines. Interestingly, stimulation of *FGFR4<sup>high</sup>* classical cells with FGF2 and FGF19 led to reduced cell proliferation, which partially agrees with results from Motoda et al. [50] that suggested a tumour suppressive role of FGF19 stimulation on cells expressing *FGFR4* in PDAC. Conversely, FGF ligands did not exert inhibitor effects on the proliferation of cells deficient for *FGFR4*. Mechanistically, downregulation of *FGFR4* was associated with increased basal fluxes through the MAPK and the mTORC1 signaling pathways regardless of the genomic and transcriptomic background of the

cells. Accordingly, PI3K/Akt/mTOR transcriptional signatures as well as the inhibitory phosphorylation of one of the best characterised mTORC1 substrate, 4E-BP1, were significantly enriched in both cell lines and tissues displaying reduced expression of *FGFR4*. Phosphorylation of 4E-BP1 by mTORC1 has been demonstrated to regulate mTORC1-driven proliferation in mammalian cells [44, 45] and accordingly its levels were higher in all cell lines tested following silencing of *FGFR4* and were concordant with increased cell proliferation and protein synthesis. In keeping with this, pharmacological inhibition of mTORC1 with Everolimus showed superior effect in reducing the proliferation of cells deficient for *FGFR4* as opposed to proficient cells. In summary, we show that endogenous levels of *FGFR4* limit the malignant phenotype of PDAC. In particular, the loss of *FGFR4* was associated with increased activity of the mTORC1 pathway in PDAC cells. Finally, we propose *FGFR4* as a valuable marker for the prognostic stratification of PDAC patients.

#### DATA AVAILABILITY

The primary RNA-Seq data generated for this study will be available in a public, open access repository. All other relevant data are already available as Supplementary material.

#### REFERENCES

1. Michl P, Lohr M, Neoptolemos JP, Capurso G, Rebours V, Malats N et al. UEG position paper on pancreatic cancer. Bringing pancreatic cancer to the 21st century: Prevent, detect, and treat the disease earlier and better. *United Eur Gastroenterol J.* 2021;9:860–71.
2. Rahib L, Wehner MR, Matrisian LM, Nead KT. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw Open.* 2021;4:e214708.
3. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature.* 2016;531:47–52.
4. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address aadhe, Cancer Genome Atlas Research N. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2017;32:185–203 e113.
5. Chan-Seng-Yue M, Kim JC, Wilson GW, Ng K, Figueroa EF, O’Kane GM, et al. Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution. *Nat Genet.* 2020;52:231–40.
6. Collisson EA, Bailey P, Chang DK, Biankin AV. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16:207–20.
7. Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SG, Hoadley KA, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet.* 2015;47:1168–78.
8. Hayashi A, Fan J, Chen R, Ho Y-j, Makohon-Moore AP, Lecomte N, et al. A unifying paradigm for transcriptional heterogeneity and squamous features in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Cancer.* 2020;1:59–74.

9. Kloesch B, Ionasz V, Paliwal S, Hruschka N, Martinez De Villarreal J, Öllinger R, et al. A GATA6-centred gene regulatory network involving HNFs and  $\Delta$ Np63 controls plasticity and immune escape in pancreatic cancer. *Gut*. 2021;0:1–12.
10. Martinelli P, Carrillo-De Santa Pau E, Cox T, Sainz B, Dusetti N, Greenhalf W, et al. GATA6 regulates EMT and tumour dissemination, and is a marker of response to adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. *Gut*. 2017;66:1665–76.
11. Somerville TD, Biffi G, Dassler-Plenker J, Hur SK, He XY, Vance KE, et al. Squamous trans-differentiation of pancreatic cancer cells promotes stromal inflammation. *Elife*. 2020;9:e53381.
12. Andricovich J, Perkill S, Kai Y, Casasanta N, Peng W, Tzatsos A. Loss of KDM6A Activates Super-Enhancers to Induce Gender-Specific Squamous-like Pancreatic Cancer and Confers Sensitivity to BET Inhibitors. *Cancer Cell*. 2018;33:512–526.e518.
13. Porter RL, Magnus NKC, Thapar V, Morris R, Szabolcs A, Neyaz A, et al. Epithelial to mesenchymal plasticity and differential response to therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116:26835–45.
14. Dreyer SB, Upstill-Goddard R, Paulus-Hock V, Paris C, Lampraki EM, Dray E, et al. Targeting DNA Damage Response and Replication Stress in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*. 2021;160:362–377.e313.
15. Brunton H, Caligiuri G, Cunningham R, Upstill-Goddard R, Bailey UM, Garner IM, et al. HNF4A and GATA6 Loss Reveals Therapeutically Actionable Subtypes in Pancreatic Cancer. *Cell Rep*. 2020;31:107625.
16. Aung KL, Fischer SE, Denroche RE, Jang GH, Dodd A, Creighton S, et al. Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial. *Clin Cancer Res*. 2018;24:1344–54.
17. Nicolle R, Blum Y, Duconseil P, Vanbrugge C, Brandone N, Poizat F, et al. Establishment of a pancreatic adenocarcinoma molecular gradient (PAMG) that predicts the clinical outcome of pancreatic cancer. *EBioMedicine*. 2020;57:102858.
18. Kloesch B, Ionasz V, Paliwal S, Hruschka N, Martinez de Villarreal J, Öllinger R, et al. A GATA6-centred gene regulatory network involving HNFs and  $\Delta$ Np63 controls plasticity and immune escape in pancreatic cancer. *Gut*. 2021;71:766–77.
19. Kalisz M, Bernardo E, Beucher A, Maestro MA, Del Pozo N, Millan I, et al. HNF1A recruits KDM6A to activate differentiated acinar cell programs that suppress pancreatic cancer. *EMBO J*. 2020;39:e102808.
20. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141:1117–34.
21. Neben CL, Lo M, Jura N, Klein OD. Feedback regulation of RTK signaling in development. *Dev Biol*. 2019;447:71–89.
22. Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thiery JP, Czernichow P, Bellucci S, et al. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development*. 2001;128:5109–17.
23. Elghazi L, Cras-Meneur C, Czernichow P, Scharfmann R. Role for FGFR2IIIb-mediated signals in controlling pancreatic endocrine progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:3884–9.
24. Goncalves CA, Larsen M, Jung S, Stratmann J, Nakamura A, Leuschner M, et al. A 3D system to model human pancreas development and its reference single-cell transcriptome atlas identify signaling pathways required for progenitor expansion. *Nat Commun*. 2021;12:3144.
25. Hebrok M, Kim SK, Melton DA. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev*. 1998;12:1705–13.
26. Lin W, Noel P, Borazanci EH, Lee J, Amini A, Han IW, et al. Single-cell transcriptome analysis of tumor and stromal compartments of pancreatic ductal adenocarcinoma primary tumors and metastatic lesions. *Genome Med*. 2020;12:80.
27. Peng J, Sun BF, Chen CY, Zhou JY, Chen YS, Chen H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Res*. 2019;29:725–38.
28. Steele NG, Carpenter ES, Kemp SB, Sirihorachai V, The S, Delrosario L, et al. Multimodal Mapping of the Tumor and Peripheral Blood Immune Landscape in Human Pancreatic Cancer. *Nat Cancer*. 2020;1:1097–112.
29. Korsunsky I, Millard N, Fan J, Slowikowski K, Zhang F, Wei K, et al. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat Methods*. 2019;16:1289–96.
30. Muraro MJ, Dharmadhikari G, Grun D, Groen N, Dielen T, Jansen E, et al. A Single-Cell Transcriptome Atlas of the Human Pancreas. *Cell Syst*. 2016;3:385–394.e383.
31. Grun D, Muraro MJ, Boisset JC, Wiebrands K, Lyubimova A, Dharmadhikari G, et al. De Novo Prediction of Stem Cell Identity using Single-Cell Transcriptome Data. *Cell Stem Cell*. 2016;19:266–77.
32. Segerstolpe A, Palasantza A, Eliasson P, Andersson EM, Andreasson AC, Sun X, et al. Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2016;24:593–607.
33. Hanzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinforma*. 2013;14:7.
34. Balli D, Rech AJ, Stanger BZ, Vonderheide RH. Immune Cytolytic Activity Stratifies Molecular Subsets of Human Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23:3129–38.
35. Guagnano V, Furet P, Spanka C, Bordas V, Le Douget M, Stamm C, et al. Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxyphenyl)-1-[6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl]-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J Med Chem*. 2011;54:7066–83..
36. Diaferia GR, Balestrieri C, Prosperini E, Nicoli P, Spaggiari P, Zerbi A, et al. Dissection of transcriptional and cis-regulatory control of differentiation in human pancreatic cancer. *EMBO J*. 2016;35:595–617.
37. Shah P, Ding Y, Niemczyk M, Kudla G, Plotkin JB. Rate-limiting steps in yeast protein translation. *Cell*. 2013;153:1589–601.
38. Somerville TDD, Xu Y, Miyabayashi K, Tiriac H, Cleary CR, Maia-Silva D, et al. TP63-Mediated Enhancer Reprogramming Drives the Squamous Subtype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell Rep*. 2018;25:1741–1755.e1747.
39. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:15545–50.
40. Hagel M, Miduturu C, Sheets M, Rubin N, Weng W, Stransky N, et al. First Selective Small Molecule Inhibitor of FGFR4 for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma with an Activated FGFR4 Signaling Pathway. *Cancer Disco*. 2015;5:424–37.
41. Somerville TDD, Xu Y, Wu XS, Maia-Silva D, Hur SK, de Almeida LMN, et al. ZBED2 is an antagonist of interferon regulatory factor 1 and modifies cell identity in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117:11471–82.
42. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W90–97.
43. Ulaganathan VK, Sperl B, Rapp UR, Ullrich A. Germline variant FGFR4 p.G388R exposes a membrane-proximal STAT3 binding site. *Nature*. 2015;528:570–4.
44. Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, et al. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science*. 2010;328:1172–6.
45. Thoreen CE, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*. 2012;485:109–13.
46. Frattini V, Pagnotta SM, Tala, Fan JJ, Russo MV, Lee SB, et al. A metabolic function of FGFR3-TACC3 gene fusions in cancer. *Nature*. 2018;553:222–7.
47. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:116–29.
48. Aguirre AJ, Nowak JA, Camarda ND, Moffitt RA, Ghazani AA, Hazar-Rethinam M, et al. Real-time Genomic Characterization of Advanced Pancreatic Cancer to Enable Precision Medicine. *Cancer Disco*. 2018;8:1096–111.
49. Sasaki N, Gomi F, Yoshimura H, Yamamoto M, Matsuda Y, Michishita M, et al. FGFR4 Inhibitor BLU9931 Attenuates Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Invasion While Inducing Senescence: Evidence for Senolytic Therapy Potential in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12:2976.
50. Motoda N, Matsuda Y, Onda M, Ishiwata T, Uchida E, Naito Z. Overexpression of fibroblast growth factor receptor 4 in high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2011;38:133–43.
51. Acevedo VD, Gangula RD, Freeman KW, Li R, Zhang Y, Wang F, et al. Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell*. 2007;12:559–71.
52. Raof S, Mulford UJ, Frisco-Cabanos H, Nangia V, Timonina D, Labrot E, et al. Targeting FGFR overcomes EMT-mediated resistance in EGFR mutant non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2019;38:6399–413.
53. Kitai H, Ebi H, Tomida S, Floros KV, Kotani H, Adachi Y, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Defines Feedback Activation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling Induced by MEK Inhibition in KRAS-Mutant Lung Cancer. *Cancer Disco*. 2016;6:754–69.
54. Meyers N, Gerard C, Lemaigre FP, Jacquemin P. Differential impact of the ERBB receptors EGFR and ERBB2 on the initiation of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2020;10:5241.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the Centro Piattaforme Tecnologiche (CPT - University of Verona, Verona, Italy) for granting access to the genomic facility of University of Verona. In addition, we acknowledge the assistance provided by Serena Pedron, Valerio Crestani, Claudia Parolini, e Paola Perfetti for the execution of immunohistochemical staining. VC is supported by Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (AIRC; Grant No. 18178). VC is also supported by the EU (MSCA project PRECODE, grant No: 861196) and the National Cancer Institute (NCI, HHSN26100008). EB is supported by the AIRC (Grant No. IG20583), and by Institutional funds of Università Cattolica del Sacro Cuore (UCSC-project D1). AS is supported by AIRC 5 × 1000, grant n 12182. SDa is supported by AIRC (24043). CF was supported for by the Fondazione Umberto Veronesi. AdC was supported by AIRC (19404, 20872). PD is supported by Fondazione Nadia Valsecchi Onlus. EF is supported by AIRC (25286). This study was

conducted with the support of the Ontario Institute for Cancer Research through funding provided by the Government of Ontario. The funding agencies had no role in the collection, analysis, and interpretation of data or in the writing of the paper.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

SDa, EB and VC designed the research; SDa, LV, CF, GTT, AdC, EF, CV, GF, FL, SA, GL and AM performed experiments; FP, PD, DP and PB analysed omics data and generated displays; RTL, AP, ES and CB collected samples and clinicopathological information; CL and AS performed histopathological evaluation of human tissues and xenografts; MM and EB analysed treatment data; VC, EB and AS acquired funding; SDa, FP, LV and VC wrote the paper; VC and EB supervised the study. All authors approved the final version of the paper.

### COMPETING INTERESTS

EB received speakers' and travels' fee from MSD, Astra-Zeneca, Pfizer, Eli-Lilly, BMS, Novartis and Roche. EB received institutional research grants from Astra-Zeneca, Roche. The other authors declare no competing interests.

### ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02432-5>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Vincenzo Corbo.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**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/>.

© The Author(s) 2022