

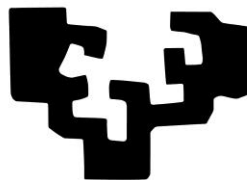
UPV/EHU

**MODULACIÓN DE SOX2 MEDIANTE LA
INHIBICIÓN DE mTOR Y SU IMPLICACIÓN EN
QUIMIORRESISTENCIA Y CÉLULAS MADRE
DEL CÁNCER EN GLIOBLASTOMA
MULTIFORME**

Laura Garrós Regúlez

2016

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Director: Ander Matheu Fernández

A mi madre

Agradecimientos

Tras esta importante etapa de mi vida ha llegado el momento de acordarme de todas aquellas personas que, de una manera u otra, han contribuido a que me encuentre ahora en este punto. Espero acordarme de todas, y en caso de que se me olvidase alguien, le pido disculpas por adelantado. Te haré llegar mi agradecimiento de otra forma ☺.

Para empezar, agradecer a mi director de tesis, el Dr. Ander Matheu, que me eligiera para formar parte de su equipo cuando yo aún era una estudiante inexperta. Te agradezco que me esperases el año entero que tuvo que pasar desde que contactamos por primera vez hasta que terminé el máster y por fin pude incorporarme, porque ha sido la oportunidad que necesitaba para llegar hasta aquí. Puede que hayamos tenido nuestros más y nuestros menos, como en todo trabajo que se precie, pero al final siempre me has demostrado tu confianza. De nuevo, muchas gracias por ello.

Gracias al Dr. Pedro Grandes, así como a todo su laboratorio de la UPV-EHU (Josune, Ianire, Leire, Nagore, Juan e Izaskun), a vuestro lado empecé a conocer lo que era realmente un laboratorio y me iniciasteis en los primeros pasos de la verdadera investigación científica.

El IIS Biodonostia ha sido testigo de mi evolución tanto profesional como personal. Por ello me gustaría agradecer a todas ellas en general todo lo que hayan hecho por mí en algún momento de mi andadura. En especial me gustaría nombrar a varias personas que verdaderamente han tenido una influencia directa en toda esta aventura. Gracias a la guía de Estefanía, a la meticulosidad de Paula, a la disciplina de Idoia, a las risas de Olatz y a la simpatía de Lidia. Gracias a Leire y a Mikel, por ser los primeros “tweens”. Gracias especialmente a Mikel, quien desde que le conocí en la carrera y a pesar de separarnos pronto en los estudios, siempre ha estado ahí para evitar perder el contacto hasta el punto en el que finalmente hemos llegado a trabajar en el mismo centro ☺. A ti sobre todo quiero agradecerte el gran apoyo que me brindaste en aquellos momentos en los que no podía más. El mismo agradecimiento quiero hacerle a Vir, nuestra Antonia particular. Sin esos cafés y esas charlas aquellos días de Agosto, hoy no estaría aquí. Muchísimas gracias a vosotros dos por

“obligarme” a llegar hasta este punto. No me olvido tampoco de las últimas incorporaciones, Juncal y Carla, gracias simplemente por estar ahí y darme grandes momentos de risas, que no es poco. Aunque tampoco me olvido de los vaciles que habéis tenido a mi costa, esos ya no os los agradezco tanto jajajajaja (¿Queréis un poco de pan con sal para comer mientras echáis espuma de afeitar? XD).

Pero hasta este punto no se llega sólo por el apoyo de tu entorno profesional. Mi entorno más cercano ha sido el que verdaderamente me ha dado fuerzas y ánimos para llegar a donde estoy ahora. Gracias Aita, por ayudarme en todo lo que has podido y por soportarme en todos mis malos momentos. Sé que muchas veces te echo las culpas de todo y que me pongo a rabiar, pero eso porque se me olvida todo lo que constantemente estás haciendo por mí. Te pido disculpas por ello y te agradezco de nuevo que estés ahí para lo que necesito. Gracias Mama Mila por estar ahí desde el principio. Por escucharme. Por contestarme. Por no juzgarme y darme ánimos continuamente. Por no dejarme caer y por creer en mí. Podría seguir hasta el infinito y siempre me quedarían cosas por agradecerte. Gracias por todo.

A pesar de que he tardado tanto en mencionarte, no pienses que es porque tengo menos cosas que agradecerte que al resto. Gracias a ti he podido afrontar este último año mejor que como lo hubiera hecho sola. Me has presentado a todo el que es importante para ti para que pueda formar parte de todos tus círculos. Me has hecho sonreír siempre que afloraban las lágrimas, me has distraído cuando el estrés no me dejaba pensar en otra cosa, has aguantado mis malos humos, mis manías, y siempre con alegría y asegurándome que no te importaba. A ti, Josu, quiero agradecerte tu confianza, tu cariño y tu compañía cuando más lo necesitaba. Eres increíble.

Por último, quiero dar las gracias a la persona que ha cuidado de mí y que me ha hecho ser quien soy hoy en día. A pesar de que te fuiste tan pronto siempre te recordaré con todo mi cariño y sabiendo que, estés donde estés, me cuidas, me proteges y velas por mí. Gracias Ama. Te quiero.

Resumen

SOX2 es un factor de transcripción ampliamente expresado en el Glioblastoma Multiforme (GBM) y que regula la actividad de las células madre de glioma (GSC). Se desconoce exactamente cuál es su papel en estas células, y su implicación en el tratamiento del GBM. Tras el estudio de muestras humanas de este tipo de tumor y ensayos de modificación génica de líneas celulares de glioma pudimos identificar que SOX2 presentaba una correlación en su expresión con el factor SOX9, además de que modulaba las características oncogénicas de las células de glioma. Adicionalmente, comprobamos también que altos niveles de SOX2 conferían a las células quimiorresistencia frente al tratamiento quimioterápico para el GBM, la temozolomida (TMZ), mientras que bajos niveles de este factor favorecían una mayor sensibilidad al tratamiento. Con la finalidad de reducir los niveles de SOX2 se testaron dos fármacos, de los cuales se comprobó que la rapamicina, cuya diana es mTOR, disminuía los niveles de SOX2. Este hecho correlacionaba con una mayor sensibilización de las células con niveles altos de SOX2 al tratamiento.

AGRADECIMIENTOS	16
RESUMEN	20
ÍNDICE	24
INTRODUCCIÓN	28
El cáncer	30
Tumores cerebrales: Glioblastoma Multiforma (GBM)	30
Abordajes terapéuticos para el GBM	34
Células madre	40
Células madre y cáncer	40
Factores de transcripción SOX	44
OBJETIVOS	52
MATERIALES Y MÉTODOS	56
Cultivos celulares	58
Ensayos funcionales	61
Extracción y cuantificación de proteínas y western blot	66
Extracción de ARN	68
Retro-transcripción	68
qRT-PCR	69
Ensayos de carcinogénesis <i>in vivo</i>	71
Evaluación estadística de los datos	72
RESULTADOS	74
Caracterización de SOX2 y SOX9 en GBM	76
La expresión de SOX2 y SOX9 se correlaciona en muestras de pacientes y líneas celulares	76
Elevados niveles de SOX2 y SOX9 están relacionados con las GSC y con un mayor potencial tumorigénico	78
El silenciamiento de SOX2 reduce las características tumorigénicas en GBM	80
La expresión de SOX9 restaura el fenotipo tumoral en células SOX2 silenciadas y es necesaria para mediar el efecto oncogénico de SOX2	82
	26

La sobreexpresión de SOX2 induce un fenotipo más tumorigénico	85
SOX2 y quimiorresistencia	87
SOX2 induce quimiorresistencia a la TMZ en GBM	87
El tratamiento con ciclopamina reduce los niveles de SOX2-SOX9 pero no incrementa la sensibilidad de las células a TMZ	89
La inhibición farmacológica y genética de mTOR disminuye los niveles de SOX2-SOX9	91
El tratamiento con rapamicina produce una sinergia en la citotoxicidad celular en combinación con TMZ en líneas con niveles elevados de SOX2, tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>	94
DISCUSIÓN	98
CONCLUSIONES	110
BIBLIOGRAFÍA	114
ANEXO I	136

El cáncer

Tumores cerebrales: glioblastoma multiforme (GBM)

El cáncer es la segunda causa de muerte por enfermedad no trasmisible a escala mundial, después de enfermedades cardiovasculares. Se estima que en 2012 alrededor de 8,2 millones de personas fueron víctima de algún tipo de cáncer, siendo los más prevalentes (en orden descendente) los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama (OMS, 2012). El número de incidencia continuará subiendo, y se estima que en el 2030, la cifra de afectados llegará a los 14,3 millones de personas (OMS, 2013).

En España el cáncer presenta el mismo patrón epidemiológico que a nivel mundial, con una incidencia en aumento desde la década de 1980. Dentro de todas las enfermedades que engloba el cáncer, los tumores de pulmón, colon y próstata; y mama, colon y pulmón son las primeras causas de muerte en hombres y mujeres respectivamente (Instituto Nacional de Estadística, 2013).

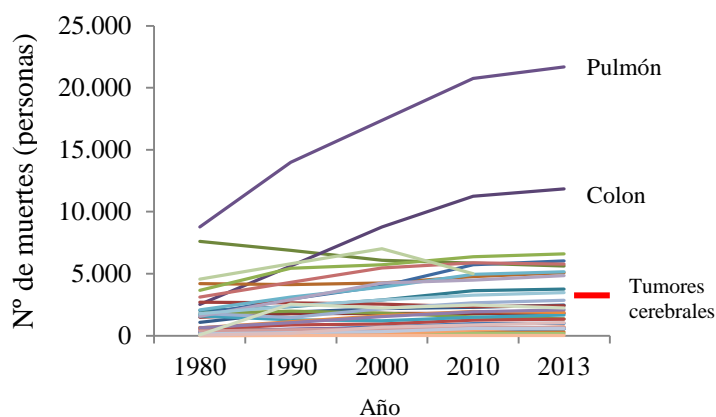


Gráfico 1. Número de defunciones en España entre los años 1980-2013 en función del tipo de cáncer. Fuente: Instituto Nacional de Estadística (INE)

Los tumores cerebrales pueden ser muy heterogéneos en cuanto a agresividad y tasa de mortalidad. Más concretamente, los tumores cerebrales primarios, y entre ellos los gliomas malignos, contribuyen de manera significativa a la morbimortalidad en todos los grupos de edad, pues son tumores que por lo general presentan muy baja tasa de supervivencia, a pesar de

que en valores absolutos no representan una amplia proporción de los casos de cáncer que se diagnostican en España (se calcula una incidencia de 8,73 por 100.000 habitantes / año en varones y 5,41 en mujeres, datos de la AECC del 2011). Este tipo de tumores merecen la atención por englobar algunos de los cánceres más letales que existen (*National Brain Tumour Society*). Se han descrito alrededor de 120 tipos diferentes de tumores cerebrales y del sistema nervioso central (SNC, Fuente: *National Brain Tumour Society*), los cuales han sido clasificados por la OMS atendiendo a las células de origen y a su malignidad, en orden ascendente de agresividad (*Louis et al., 2007*).

Los **gliomas** son tumores cerebrales que proceden de células de la glía, un tipo celular encargado del mantenimiento y protección de las neuronas, y constituyen más del 50% de los cánceres cerebrales y del sistema nervioso central. Son tumores muy heterogéneos, tanto en el aspecto histológico como en el aspecto clínico, pues existen desde tumores de baja proliferación y difusión hasta tumores muy agresivos. Histológicamente, los gliomas se han clasificado en 4 grupos:

- **Grado I**: Astrocitoma pilocítico, de aparición temprana y común en niños y adolescentes, constituye el 2% de todos los tumores cerebrales y presenta una supervivencia media variable dependiente de la localización del tumor, su total resección o no, y la edad de aparición (*Tibbetts et al., 2009, Stieber VW, 2001*). Aun así, la cura de este tipo de tumores es frecuente.
- **Grado II**: Astrocitoma difuso, de bajo grado, de lento crecimiento y poco infiltrante. Es común en mujeres y hombres de entre 20-50 años.
- **Grado III**: Astrocitoma anaplásico, más agresivo, de rápida formación y expansión e infiltrante que los de grado II, más frecuente en hombres de entre 30-50 años que en mujeres. Constituyen el 2% de todos los tumores cerebrales.
- **Grado IV**: Glioblastoma Multiforme (GBM), el más común y letal de los tumores cerebrales primarios, altamente invasivo y heterogéneo, y más frecuente en personas a partir de 50 años.

Tabla 1. Clasificación según la OMS de gliomas en función de su histología y otros datos característicos

Nombre	Grado	Edad diagnóstico	Supervivencia media (años)
Astrocitoma pilocítico	I	Niños y adolescentes	Variable, cura frecuente
Astrocitoma difuso	II	20-50 años	5
Astrocitoma anaplásico	III	30-50 años	2
Glioblastoma multiforme	IV	≥ 50 años	1

El glioblastoma multiforme constituye entre el 12-15% de todos los tumores cerebrales y alrededor del 50% de los gliomas. Está considerado como el tumor cerebral más agresivo y maligno con una incidencia anual de 2-3 personas por cada 100.000 en EEUU y Europa. Su origen puede ser primario, es decir, *de novo*, o secundario, esto es, como consecuencia de la evolución de un glioma previo de menor grado. Su prevalencia es mayor en individuos varones adultos, y la tasa de supervivencia media ronda los 15 meses, siendo la supervivencia a 5 años alrededor del 4% (Fuente: *National Brain Tumour Society*).

A este tipo de tumor se le denomina “multiforme” debido a su amplia heterogeneidad intratumoral e intertumoral a varios niveles: celular, genético, molecular, clínico, histopatológico, etc. Son altamente infiltrantes e invasivos, de patrón difuso, proliferación celular incontrolada, propensos a la necrosis y angiogénesis, resistentes a la apoptosis y de elevada inestabilidad genética (*Furnari et al., 2007; Patel et al., 2014*).

Dada la elevada heterogeneidad intertumoral y con el fin de identificar las mutaciones más frecuentes, en 2010 se llevaron a cabo estudios genéticos y de expresión en GBM, lo que ha permitido una clasificación molecular de estos tumores (*Verhaak et al., 2010*). Esta clasificación plantea la posibilidad de aplicar a los pacientes una terapia personalizada, presumiblemente más eficaz, atendiendo a la predicción de efectividad que tendrán los mismos en función a las características tumorales que presentan. La clasificación es la siguiente:

- **Clásico:** Se caracteriza por mutaciones, amplificación y/o sobreexpresión de EGFR, pérdida/mutación de PTEN; pérdida de CDKN2A, sobreexpresión de NES; y activación de las vías Notch y Shh.
- **Mesenchimal:** Son la clase que más áreas necróticas evidentes presenta, con expresión de genes asociados a inflamación como TNF y NF- κ B. Otras alteraciones comunes de este subtipo son la pérdida/mutación de NF1, TP53 y PTEN; y sobreexpresión de MET, CHI3L1, CD44 y MERTK.
- **Proneural:** Generalmente son GBM de origen secundario y se asocian con una aparición en edades más tempranas. En estos pacientes se observa además una tendencia a una supervivencia más larga. Se caracterizan por presentar una amplificación de PDGFRA, mutación de IDH1 y PIK3A/PIK3R1; pérdida/mutación TP53, CDKN2A y PTEN; expresión de marcadores proneurales y oligodendrocitos; y activación de las vías de HIF, PI3K y PDGFRA.
- **Neural:** Su patrón de expresión génica es el más similar al de muestras procedentes de cerebro sano y su firma sugiere la de una célula de fenotipo diferenciado, un dato confirmado por la asociación de firma genética con las firmas de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Presenta también una amplificación/sobreexpresión de EGFR.

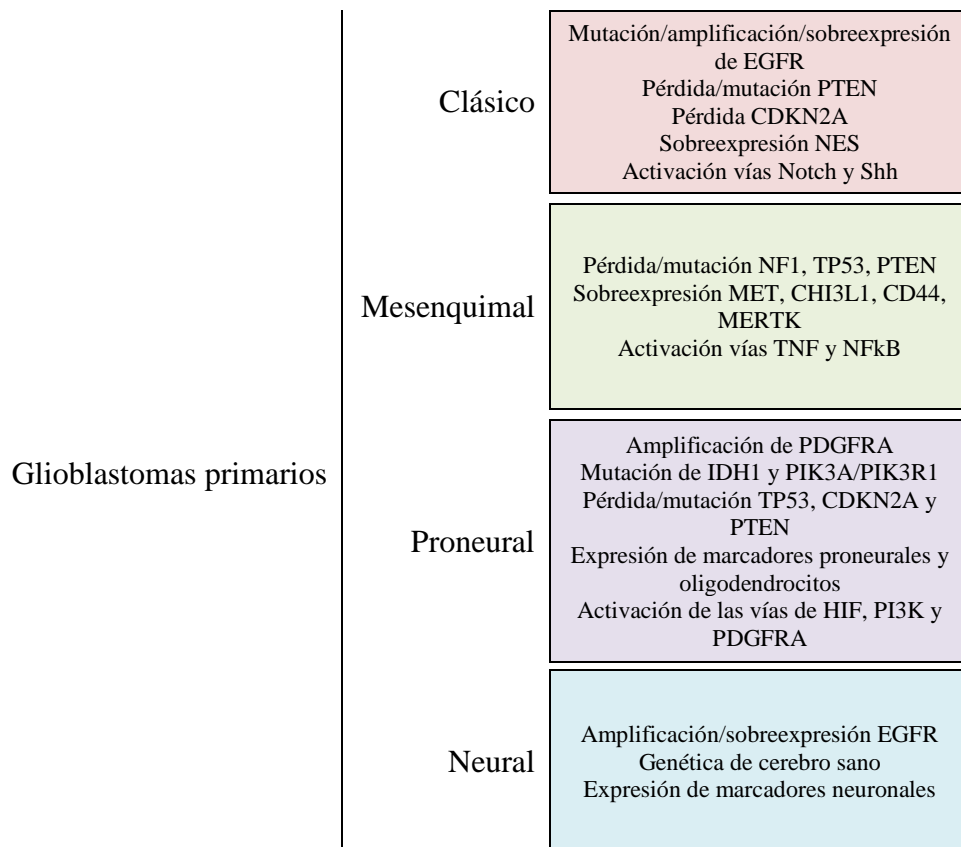


Diagrama 1. Subtipos de glioblastoma multiforme en función a sus alteraciones genéticas más destacables.

Abordajes terapéuticos para el GBM

El tratamiento establecido para el GBM es la mayor resección quirúrgica posible del tumor, seguido de un tratamiento combinado de radioterapia y temozolomida (TMZ), finalizado con TMZ adyuvante (*Stupp et al., 2005*). Las dificultades para el tratamiento del glioblastoma aparecen ya en el momento de la resección quirúrgica. La alta capacidad de infiltración del tumor y su patrón difuso hacen que sea muy difícil, por no decir imposible, la total eliminación del mismo. Tras la operación, los pacientes son tratados con TMZ y radioterapia, para terminar con un tratamiento de TMZ adyuvante.

La **temozolomida** (8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl) imidazo[5,1-d]-1, 2, 3, 5 tetrazin 4-(3-H) one) es una de las bases de tratamiento quimioterápico no solo para el glioblastoma, sino para la amplia mayoría de gliomas malignos. Este fármaco presenta el 100% de biodisponibilidad tras su administración oral debido a su capacidad de traspasar la barrera

hematoencefálica (*Brada et al., 1999; Ostermann et al., 2004*). La eficacia de la TMZ como principal agente quimioterápico viene demostrada tras el ensayo realizado en 2005 por Stupp y colaboradores, en el que determinaron que la administración de TMZ al tratamiento con radioterapia incrementaba la tasa de supervivencia de 12,1 meses a 14,6 meses (*Stupp et al., 2005*). El mecanismo de acción de la TMZ se basa en la metilación del ADN debido principalmente a la conversión espontánea de la TMZ en MTIC (5-(3-methyltriazen-4-yl)imidazole-4-carboximide), un activo agente metilante. Esta molécula continúa su metabolismo a catión metildiazonio, que transfiere su grupo metilo al ADN, (incluso puede hacerlo al ARN y a proteínas), y termina degradándose a AIC (5-aminoimidazole-4-carboxamide), un producto que se excreta del organismo vía renal (*Spassova and Golovinsky, 1985*).

La transferencia del grupo metilo al ADN no es aleatoria. El lugar predominante en el que ocurre este proceso químico es la posición N7 de la guanina, seguido por la posición O3 de la adenina y la posición O6 de la guanina; y no todos contribuyen de igual manera al efecto citotóxico de la TMZ (*Denny et al., 1994*). La citotoxicidad depende del correcto funcionamiento de los mecanismos celulares para la reparación del ADN: **1)** la actividad de la enzima MGMT (*O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*), responsable de la retirada de los grupos alquilo de la posición O6 de la guanina; **2)** el incorrecto funcionamiento de los sistemas MMR (*MisMatch Repair system*) de reparación del ADN, los cuales en condiciones normales reconocen la guanina metilada y la retiran (*Friedman et al., 2000*).

Otros abordajes que se incluyen en el tratamiento de GBM es la aplicación local de nitrosureas, agente alquilantes como BCNU (carmustina). Esta terapia, aplicada *in situ* durante la cirugía, aumenta la supervivencia media de los pacientes, aunque esto solo ocurre en el caso de tumores de primera aparición y no recidivas (*Hart et al., 2011*). En el caso de recurrencia del GBM el abordaje terapéutico varía, siendo el tratamiento principal el bevacizumab (*Norden et al., 2008; Agha et al., 2010*), un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y por tanto, un agente antiangiogénico. Intentando lograr mayores

tasas de supervivencia se han intentado combinar TMZ y bevacizumab, comprobando *in vivo* que una combinación de ambos aumenta la supervivencia de los ratones en comparación con el grupo control, además de presentar una menor angiogénesis, aunque no se ha observado un impacto positivo en la supervivencia media en humanos (*Grossman et al., 2014*).

Aunque la TMZ se considera el principal agente quimioterápico en el glioblastoma, se sigue investigando con el fin de obtener tratamientos que puedan ser más efectivos. Esa efectividad se busca en adecuar el tratamiento en función de la firma genética y mutaciones propias del tumor, tratando de lograr una terapia más personalizada y eficiente. Y como diana molecular de esas nuevas terapias se identifican moléculas pertenecientes a las principales vías de señalización alteradas en los diferentes tipos de glioblastoma: factores de crecimiento, PI3K/Akt/PTEN/mTOR, MAPK y Shh/PTCH (*Omuro et al., 2007, Verhaak et al., 2010; TCGA, 2008*).

La **diana mecánica de rapamicina (mTOR, mechanistic Target Of Rapamycin)** se ha postulado como diana para tratamientos alternativos, pues su vía juega un papel central en la regulación de procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, organización del citoesqueleto, transcripción, síntesis proteica y biogénesis ribosomal (*Dowling et al., 2010*). Se ha comprobado que la inhibición de mTOR por rapamicina reduce el crecimiento de líneas celulares de glioma y líneas derivadas de pacientes; *in vivo*, este tratamiento casi duplica la supervivencia media en ratones e inhibe el crecimiento del volumen tumoral en más del 95% (*Arcella et al., 2012*). Ensayos clínicos con rapamicina y sus análogos (*rapálogos*) han mostrado eficiencia antitumoral con una leve toxicidad de los pacientes. Ensayos en fase II sobre pacientes con GBM recurrente muestran que el 36% de los sujetos tratados presentan evidencias radiográficas y sintomáticas de mejora tras el tratamiento con temsirolimus; y un ensayo en fase I probó que tratamientos a corto plazo con rapamicina en pacientes de GBM recurrente con deficiencias en PTEN reducen la proliferación de las células tumorales en un sustancial número de casos (*Cloughesy et al., 2008*).

mTOR es una serin/treonin kinasa de 298kDa que se codifica en un único gen, *FRAP1*, y que pertenece a la familia de la fosfoinositido 3-kinase (*Kakumoto et al 2015; Maiese, 2015*). Esta proteína interacciona con otras proteínas para formar dos complejos diferentes, mTORC1 y mTORC2, cada uno con una sensibilidad diferente a determinados fármacos y diferentes funciones celulares. mTORC1 está formado por RAPTOR (*Regulatory Associated Protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*, necesaria para la activación), PRAS40 (*Proline-Rich AKT substrate of 40kDa*) y DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*); mTORC2 incluye RICTOR (*Rapamycin Intensive Companion of mTOR*), mSIN1 (*mitogen activated protein kinase associated protein 1*), DEPTOR, mLST8 y PROTOR (*proline rich protein 5*), responsable de la resistencia a la rapamicina de este complejo (*Duzgun et al., 2015; Kakumoto et al., 2015; Dowling et al., 2009, Sarbassov et al., 2006*).

Estos dos complejos también difieren en sus dianas de fosforilación, lo que produce que estos complejos tengan diferentes funciones celulares. mTORC1 estimula la proliferación y el crecimiento celular vía eIF4E *binding proteins* y kinasas S6, inhibe autofagia, regula la síntesis lipídica y el metabolismo mitocondrial, así como el proceso de traducción de proteínas relacionadas con el crecimiento celular, siendo estas las funciones más remarcables de este complejo (*Dowling et al., 2009; Laplante y Sabatini, 2012*). Por otro lado, mTORC2 controla el metabolismo, la supervivencia celular y la organización del citoesqueleto vía fosforilación de Akt, SGK1 y PKC (*Dowling et al., 2009, Sarbassov et al., 2004*) pero sus vías de señalización, y consecuentemente sus funciones, están menos estudiadas que en el caso de mTORC1. En el GBM la vía de PTEN se encuentra alterada en la mayoría de los casos (*Verhaak et al., 2010*), al mismo tiempo que su diana, Akt (*Jhawar-Uniyal et al., 2011*). Una de las principales dianas de Akt es mTOR (*Inoki et al., 2002; Sekulic et al, 2000; Sami et al., 2013*), por lo que es interesante considerar esta molécula como diana potencial del tratamiento antitumoral dada su implicación en la proliferación celular. De hecho, se ha comprobado que la aplicación de inhibidores de la vía de mTOR resultan en un descenso significativo de la proliferación de neurosféricas (*Jhawar-Uniyal et al., 2011*).

La **rapamicina** es un antibiótico purificado a partir de *Streptomyces hygroscopicus* en el laboratorio del Dr. Sehgal's (Canadá) en 1975 (Vézina *et al.*, 1975). Inicialmente se describió como un potente antifúngico, especialmente contra *Candida albicans*, pero tras comprobar sus efectos sobre las células de mamíferos se decidió su uso y aplicación en la clínica. De hecho, la rapamicina es un inhibidor alostérico de mTORC1, pues rompe el complejo RAPTOR-mTOR cuando se encuentra asociado a FKBP12 (FK 506-binding protein de 12kDa, el receptor intracelular de rapamicina) e interacciona con el FKBP12-rapamycin binding (FRB) domain en el extremo C-terminal de mTOR (Dowling *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2002, Oshiro *et al.*, 2004). mTORC2 muestra resistencia a rapamicina debido a que en él no se produce la interacción con rapamicina/FKBP12, aunque se piensa que una exposición prolongada a rapamicina puede afectar a la síntesis *de novo* de este complejo (Sarbasov *et al.*, 2006). El descubrimiento de la rapamicina como agente antiproliferativo e inmunosupresor (Kuo *et al.*, 1992) vía inhibición de mTORC1 la ha convertido en un tratamiento potencial interesante para pacientes con cáncer.

En el GBM, la aplicación de rapamicina *in vitro* deriva en una inhibición del crecimiento celular dependiente de dosis y de tiempo en comparación con las células control, además de retrasar la aparición de tumores en ratones inyectados con células de glioma mediante estereotaxia tratados con rapamicina en comparación a los ratones control (Arcella *et al.*, 2013). En ensayos clínicos, donde se usan análogos de la rapamicina como sirolimus o temsirolimus, a pesar de la tolerancia al compuesto, los resultados obtenidos hasta el momento no muestran un efecto antitumoral suficiente como para continuar con ensayos en los que éste sea el único quimioterápico (Reardon, D., 2010; Chang *et al.*, 2005; Galanis *et al.*, 2005)

La **vía de Sonic HedgeHog** (SHH) es una de las redes de señalización celular de mayor tráfico, encargada de regular eventos clave durante el desarrollo tales como el crecimiento, el patronaje de embriones multicelulares y la especificación de los tipos celulares en el tubo neural (Choudhry *et al.*, 2014; Ericson *et al.*, 1997; Strigini and Cohen, 1997; López-Ríos *et al.*, 2014). Además, la señalización Hedgehog (Hh) se ha visto implicada en el desarrollo de múltiples

órganos y estructuras: córtex adrenal, cerebelo, tracto gastrointestinal, glándula pituitaria y páncreas, entre otros. Se ha observado que también funciona como guía para los axones y juega un papel crucial tanto en la homeostasis tisular como en la regeneración de varios órganos tras una lesión (*Lee et al., 2016*).

La acción reguladora de esta vía está ligada a la secreción de la “proteína Shh”, una de las moléculas de señalización putativas implicada en la regulación del SNC, polarización y patronaje neural (*Echelard et al., 1993, Choudhry et al., 2014*). En el desarrollo normal, Hh actúa como un morfógeno para determinar la identidad de los distintos tipos celulares en la médula espinal ventral, y como mitógeno para inducir proliferación en GNP (*Granule Neuron Precursors*). El ligando Shh se une al receptor Patched (Ptch1) activa el receptor Smoothened (Smo), constitutivamente reprimido, que a su vez activa la familia de factores de transcripción de oncogén asociado a glioma (Gli), *Gli1*, *Gli2* y *Gli3*. La activación de *Gli2* y *Gli3* induce la transcripción de genes diana como *Gli1*, cuya expresión conduce a la activación de genes específicos de *Gli1*, muchos de los cuales son reguladores esenciales de la autorrenovación tanto en el desarrollo como en el cáncer. Entre ellos podemos encontrar SOX2 (*Manoranjan et al., 2012*). En modelos de ratón de meduloblastoma heterocigotos para Ptch1, se ha comprobado que células SOX2 positivas son células propagadoras del tumor que presentan mayor supervivencia, capacidad de autorrenovación y quiescencia, además de ser resistentes a las terapias tradicionales anti-Shh propias del meduloblastoma (*Vanner et al., 2014*). En el mismo estudio también comprueban que la mithramicina, un ácido aureólico contra células SOX2 positivas, produce una parada en el crecimiento de los tumores subcutáneos formados en estos ratones (*Vanner et al., 2014*), lo que hace de la vía Shh una atractiva diana para posibles terapias novedosas.

La **ciclopamina** es un alcaloide esteroideo derivado de las plantas del género *Veratrum*, sintetizado inicialmente a partir del *Veratrum californicum*. Se ha demostrado que es un potente teratógeno en mamíferos (*Dunn et al., 1995*) que además inhibe la ruta de señalización Shh mediante la inhibición del receptor Smo (*Incardona et al., 2000*). También se ha comprobado

que la ciclopamina inhibe el crecimiento de tumoral en diversos modelos murinos de cáncer de páncreas, próstata, digestivo y meduloblastoma (*Tremblay et al., 2009*). En GBM primarios y en líneas de GBM estables, los receptores Smo y Ptch se encuentran expresados, y se detectaron en las mismas muestras ARNm de Gli1, lo que se relaciona con la activación de la vía Shh. Además, la aplicación de la ciclopamina en líneas establecidas de glioma reduce los niveles de Gli1 hasta el 51% cuando se usa a una concentración de 10 μ M; e inhibe la capacidad de formación de colonias en un 90% utilizando la misma dosis (*Bar et al., 2007*). Y no solo eso, se ha comprobado que las poblaciones celulares CD133+ de muestras procedentes de GBM y de líneas celulares de glioma tratadas con ciclopamina incrementan la eficacia citotóxica de la TMZ (*Ulasov et al., 2011*). Estos datos tomados en conjunto hacen que la ruta de Shh sea considerada como una potencial diana terapéutica y la ciclopamina como principal agente inhibidor de la misma.

Células Madre

Células madre y cáncer

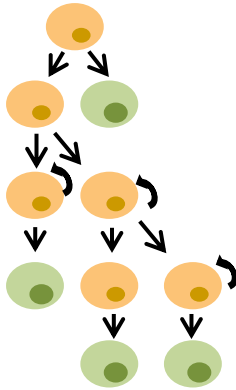
Existen tres teorías por las que se podría explicar la heterogeneidad celular intratumoral. El **modelo estocástico o de evolución clonal** es un modelo que propone que todas las células colaboran de igual manera a la formación tumoral mediante cambios genéticos y mutaciones aleatorias sucesivamente adquiridas, varias de las cuales proporcionarían una ventaja proliferativa. La selección y proliferación de clones resistentes son las que guiarían la progresión tumoral y la quimiorresistencia (*Nowell, P.C., 1976; Parker et al., 2015*).

La **teoría de las células madre del cáncer o CSC** postula que únicamente un grupo de células dentro del tumor posee la capacidad de auto-renovación y son ellas las encargadas de la proliferación y el mantenimiento tumoral. Este subgrupo celular tendría características semejantes a las células madre, y mediante divisiones asimétricas serían capaces de mantener las células cancerígenas que forman el grueso del tumor a la vez que mantienen el *pool* de

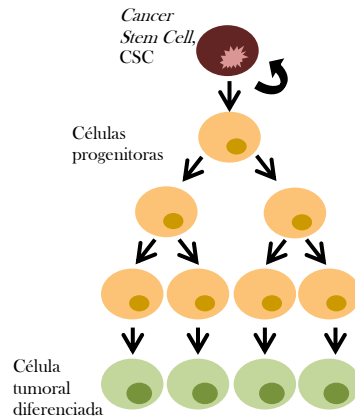
células indiferencias para asegurar la proliferación tumoral. Este modelo propone un sistema más jerarquizado en el que unas células son las encargadas de dirigir y mantener todo el proceso de tumorigénesis (*Parker et al., 2015; Reya et al., 2001*). Esta jerarquía, no obstante, no es unidireccional, pues no fluye únicamente desde un estado desdiferenciado a uno más especializado. Gracias a Takahashi y Yamanaka (*Takahashi and Yamanaka, 2006*) comenzaron las evidencias de que las células diferenciadas podían revertir su estado y volver a tomar características de célula madre bajo determinadas condiciones y/o en presencia de determinados factores. Estas células generadas en un laboratorio se denominan iPSC (*induced Pluripotent Stem Cells*). En el cáncer también sería factible este proceso de desdiferenciación hacia CSC, lo que permitiría e incrementaría la capacidad de adaptación de los diferentes tipos de cáncer a las terapias antitumorales (*Heddleston et al., 2009; Chaffer et al., 2011; Hjelmeland et al., 2011; Deheeger et al., 2014*).

Recientemente se está postulando una tercera teoría en la que se defiende una **cooperatividad interclonal**: diferentes clones dentro del tumor y factores inmunitarios y estromales (astrocitos reactivos, microvascularización aberrante e hipoxia entre otros) cooperan con el fin de crear un microentorno favorable (*Suzuki et al., 2006; Lauro et al., 1986; Weissenberger et al., 2004; Martorana et al., 1998; Peñuelas et al., 2009; Inda et al., 2010*). La retroalimentación desde ese microentorno, en el que encontramos también poblaciones celulares en diferentes estados del desarrollo, sería la que conduce a la progresión de la enfermedad, un fenotipo maligno y una resistencia a fármacos (*Parker et al., 2015, Bonavia et al., 2011, Heddleston et al., 2011*).

Modelo de evolución clonal o estocástico



Modelo célula madre del cáncer (CSC)



Modelo de cooperatividad

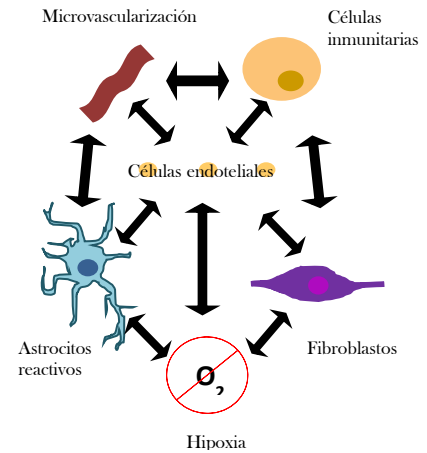


Ilustración 1 Modelos de origen y heterogeneidad tumoral. El modelo estocástico defiende la aleatoriedad en el proceso de formación tumoral; el modelo de CSC mantiene que existe una jerarquía entre las células que forman el tumor; el modelo cooperativo afirma que el proceso tumoral se da gracias a una colaboración entre múltiples factores.

Hoy en día abundan las evidencias que sostienen la idea de que los glioblastomas podrían proceder de las células madre cancerígenas o **GSC** (*Glioma Stem Cells*). Estas GSC, obtenidas mediante transformación de células madre neurales, células progenitoras o células diferenciadas del sistema nervioso (neuronas y oligodendrocitos), serían las encargadas de la formación y mantenimiento tumoral (Acanda de la Rocha et al, 2014), así como de su quimiorresistencia y recurrencia (Reya et al., 2001, Johannessen et al., 2009; Liu et al., 2006).

Las células madre son células presentes en todos los organismos multicelulares y que presentan dos características:

1. **Pluripotencia:** es la capacidad celular de diferenciarse a múltiples tipos celulares. En función a esa capacidad, existen diferentes niveles de “potencia”:
 - a. **Totipotencia:** capacidad de generar un organismo completo a partir de una célula. Las únicas células madre totipotentes son las células embrionarias.
 - b. **Pluripotencia:** capacidad de generar células de diferentes linajes celulares de las tres capas embrionarias (a excepción de la placenta) a partir de una única célula.

- c. **Multipotencia:** capacidad de generar células de diferentes tipos pero todas pertenecientes al mismo linaje. En este nivel se encuentran las células madre adultas, como las células madre neurales.
- d. **Unipotencia:** capacidad de generar un único tipo celular.

2. Capacidad de auto-renovación: es la capacidad que tienen las células para auto-perpetuarse usando para ello métodos de división tanto simétrica como asimétrica. Gracias a este proceso las células madre conservan su estado indiferenciado y mantienen o incrementan su número según la necesidad, a la vez que crean nuevas células más especializadas necesarias para el mantenimiento del organismo.

Las células madre adultas son células multipotentes, capaces de generar diferentes tipos celulares pero todos pertenecientes a un mismo tejido o linaje celular. Se encuentran distribuidas por todo el organismo adulto, localizadas en regiones muy concretas de los órganos denominados **nichos de célula madre**, y se encargan de la formación de nuevas células en sustitución de aquellas eliminadas por apoptosis, necrosis o procesos de senescencia. Son células, por tanto, imprescindibles para el mantenimiento de la homeostasis del organismo.

La capacidad de auto-renovación y la potencialidad de las células madre son propiedades que se comparten con las células cancerígenas, por lo que no parece descabellado pensar que algún tipo de célula madre, o la transformación de células somáticas en células madre, puedan estar implicados en el proceso de tumorigénesis.

Se han descrito varias vías de señalización que podrían estar involucradas en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre. Son vías que, además, han sido catalogadas de gran importancia durante el desarrollo embrionario, pues son las encargadas del mantenimiento de las células madre durante este proceso. Entre todas ellas, destacan la vía de Sonic Hedgehog (SHH), Notch, Jak/Stat, MAPK o PI3K/Akt (*Hambardzumyan et al., 2008; Dimov et al., 2010*). La inhibición de estas vías podría ser una importante diana terapéutica cuyo

objetivo final sería impedir o limitar el crecimiento de las CSC. De esta forma, y en combinación de tratamientos quimioterápicos tradicionales (TMZ) y radioterapia, se podría esperar una mayor efectividad en el tratamiento del tumor.

Factores de transcripción SOX

Los factores SOX son una familia de reguladores transcripcionales que desempeñan importantes funciones durante el desarrollo embrionario y que son clave para el mantenimiento de las células madre en tejidos adultos. Estos factores presentan un dominio HMG de alta movilidad altamente conservado entre especies que se une al ADN de manera específica, en secuencias ATTGTT o relacionadas, (*Kamachi and Kondoh, 2013; Badis et al., 2009; Harley et al., 1994*), y fueron inicialmente identificados con el descubrimiento en 1990 del factor *Sry*, imprescindible en la determinación del sexo masculino en mamíferos (*Gubbay et al., 1990, Sinclair et al., 1990*). Todos los factores que presentan un mínimo del 50% de homología entre sus dominios HMG son denominadas proteínas SOX (*Sry related HMG bOX*), y aquellas que comparten más del 80% de su secuencia se subdividen en grupos que van desde la A a la H. Los miembros de cada subdivisión se asignan atendiendo a criterios como sus propiedades bioquímicas o sus funciones biológicas dentro del organismo (*Wegner, 2010; Sarkar and Hochedlinger, 2013*), siendo éstas diferentes en cada subgrupo a pesar de reconocer un mismo motivo de ADN: el subgrupo SOXA, por ejemplo, únicamente formado por el factor *Sry*, determina el sexo masculino en mamíferos, mientras que miembros del subgrupo SOXF, como SOX7, participan en procesos de hematopoyesis, vasculogénesis y cardiogénesis durante el desarrollo embrionario (*Gandillet et al., 2009; Herpers et al., 2008; Zhang et al., 2005; Stovall et al., 2014*).

De manera general, los factores SOX cumplen diferentes funciones durante el desarrollo embrionario, como la determinación del sexo, la gastrulación temprana, la neurogénesis y la hematopoyesis. Durante estos procesos, los factores de transcripción SOX se encargan de

mantener el estado indiferenciado de las células madre que van a dar lugar al individuo, además de promover la diferenciación hacia un determinado tipo celular durante la formación de tejidos, como ocurre en el sistema nervioso central (SNC). Además, una vez en el estado adulto, los SOX también se ven implicados en el mantenimiento de la población de células madre adultas, participando en procesos de homeostasis tisular que se dan durante toda la vida del organismo adulto (*Sarkar and Hochedlinger, 2013*).

Crecientes evidencias en los últimos años han demostrado la implicación de estos factores SOX en una amplia variedad de enfermedades humanas, tanto de origen embrionario como de origen adulto. Por ejemplo, la inactivación heterocigota durante el desarrollo de SOX9 produce una reversión del sexo XY hacia XX, y la inactivación heterocigota de SOX2 provoca microftalmia sindrómica-3 (MCOPS3), una enfermedad genética en la que los individuos presentan anoftalmia, microftalmia, coloboma y, en ocasiones, dificultades de aprendizaje, convulsiones, disfunción motora y fallos en el crecimiento (*Wagner et al., 1994; Ragge et al., 2005*). Ya en la edad adulta, la desregulación de estos factores se asocia mayoritariamente con el cáncer.

Muchos genes implicados en cáncer (conocidos como oncogenes o supresores tumorales) son los mismos que se encuentran implicados en el desarrollo embrionario, lo que indica la estrecha relación que existe entre estos dos procesos. Ambos tienen como característica común la proliferación celular, descontrolada y aberrante en el caso del cáncer; vital y necesaria en el caso del desarrollo del organismo. Es lógico pensar, por tanto, que aquellos factores implicados en la proliferación durante el desarrollo sean también parcialmente responsables de los procesos de proliferación en la formación y el mantenimiento tumoral.

La razón por la que los SOX son capaces de otorgar esas capacidades proliferativas a células supuestamente diferenciadas y quiescentes, es que su expresión descontrolada es capaz de proporcionar a las células características de células madre, como ya se demostró en 2006 cuando se consiguió reprogramar células somáticas para convertirlas en iPSC, como hemos mencionado anteriormente. SOX2, entre otros factores, es una de los componentes necesarios

para revertir el estado de diferenciación celular y conseguir células desdiferenciadas (*Takahashi and Yamanaka, 2006*), y es capaz de otorgar a las células varios *hallmarks* del cáncer, esto es, características propias de las células cancerígenas, como inmortalidad replicativa y resistencia a la muerte celular (*Hanahan and Weinberg, 2011*). Hoy en día existen y continúan apareciendo numerosas pruebas y estudios que confirman la desregulación de factores SOX en diferentes tipos de tumores: sobreexpresión de SOX1 en oligodendroglioma y cáncer de pulmón, sobreexpresión de SOX4 en hepatocarcinoma celular, aumento de SOX10 en melanomas, elevado SOX5 y SOX6 en gliomas; menor expresión de SOX17 en carcinomas hepatocelulares, menores niveles de SOX2 en cáncer gástrico, etc. (*Ueda et al., 2004; Ueda et al., 2007; Khong and Rosenberg, 2002; Güre et al., 2000; Otsubo et al 2011; Liao et al., 2008; Jia et al., 2010*). Parece evidente que los factores SOX tienen gran relevancia en los procesos cancerígenos.

Entre los factores SOX encontramos dos que tiene una elevada implicación en el desarrollo del sistema nervioso central: SOX2 y SOX9.

SOX2 es un miembro del subgrupo SOXB1 altamente expresado durante los estadios más tempranos del desarrollo embrionario y que se encarga, junto con factores como OCT4, del mantenimiento de la pluripotencia en la células madre embrionarias (hESC) (*Rao et al., 2004*). En ensayos llevados a cabo en ratón, los primeros ARNs de SOX2 se detectan en algunas células en el estadio de mórula, correspondiente a 2,5 dpc (*days post-coitum*), y en el blastocisto, a 3,5 dpc, se observa su expresión específicamente en la masa celular interna. En el estadio de epiblasto su expresión continúa, pero en estadios más avanzados, 7-7,5 dpc, SOX2 reduce su expresión a la zona anterior del que será el futuro ectodermo. A continuación se expresa en el cono ectoplacental, y más adelante se mantiene en la porción del ectodermo extraembrionario del corion. A 9,5 dpc, SOX2 se observa en el cerebro, el tubo neural, placodas sensoriales, arcos branquiales y el endodermo gástrico, además de en las células germinales tanto masculinas como femeninas (*Avilion et al., 2003*), y mantiene su expresión hasta 18,5 dpc (*Scott et al., 2010*). Más avanzado el desarrollo, la expresión de SOX2 se limita a regiones más

concretas, como los SKP (*SKin derived Precursors*) de los tejidos epiteliales (*Biernaskie et al., 2009*), o el tejido neural, más concretamente la zona subventricular (SVZ) y el giro dentado (DG) (*Brazel et al., 2005; Annovazi et al., 2011*), regiones neurogénicas del cerebro adulto.

El gen SOX2 se localiza en el cromosoma 3q23.6-q27, un gen de un único exón que se traduce a una proteína de 317 aminoácidos (*Weina y Utikal., 2014*). Es una proteína que consta principalmente de 3 dominios: el dominio N-terminal; el dominio HMG (dominio de alta movilidad, en sus siglas en inglés); y el dominio de transactivación. Mutaciones heterocigotas en este gen resultan en un desarrollo anormal del ectodermo y tejidos endodérmicos (*Williamson et al., 2006*), así como las mutaciones en homocigosis producen letalidad embrionaria (*Avilion et al., 2003*). Las amplificaciones de este gen se han descrito en varios tipos de cáncer, incluidos el cáncer de pulmón de células pequeñas y muchas formas del carcinoma escamoso de pulmón, donde se ha visto que SOX2 es necesario para el inicio tumoral y que controla las funciones de las CSC en ese tipo de cáncer (*Hussenet et al., 2010; Singh et al., 2012; Boumahdi et al., 2014*).

En el caso de cáncer de mama, SOX2 es expresado en los estadios iniciales de tumorigénesis, pero en fases más avanzadas del desarrollo tumoral esa expresión se pierde, por lo que se piensa que en este tipo de cáncer, SOX2 proporciona un fenotipo menos diferenciado y que sus altos niveles podrían promover la metástasis. Adicionalmente se ha comprobado que líneas celulares de mama resistentes a tamoxifeno, un fármaco utilizado en este tipo de cáncer, presentan una mayor expresión de SOX2 en comparación con las células parentales de cáncer de mama, además de una mayor capacidad de autorrenovación (*Piva et al., 2014*). En tumores colorrectales, una reducción de la expresión de SOX2 en las células reduce su tasa de crecimiento y promueve la transición mesénquima-epitelial, mientras que su expresión se ha visto asociada a metástasis en nódulos linfáticos e hígado, un mayor grado tumoral y peor pronóstico (*Lundberg et al., 2014, Han et al., 2012*). En el cáncer de ovarios se ha observado sobreexpresión significativa del factor SOX2 en comparación con el tejido adyacente sano, mientras que su silenciamiento reduce la proliferación celular. Además, la elevada expresión de

SOX2 se ha asociado a resistencia frente a paclitaxel en este mismo tipo de cáncer, pues el silenciamiento de SOX2 en líneas de ovario resistentes a paclitaxel potencia de manera significativa la apoptosis inducida por él (*Li et al., 2015*)

La alteración en la expresión de SOX2 también se ha descrito en el sistema nervioso central. En oligodendrogliomas se ha comprobado que la delección de SOX2 en células de glioma de alto grado evita la formación de nuevos tumores *in vivo*, y que lidera una progresiva reducción de la proliferación celular, un aumento de muerte celular por apoptosis y una diferenciación aberrante (*Favaro et al., 2014*). En meduloblastomas, las células del subgrupo SHH de meduloblastoma SOX2 positivas son las mantienen un *bulk* de células quiescentes, una característica propia de poblaciones neurales *stem*. Además, estas células con mayor expresión de SOX2 presentan mayor capacidad de formación de colonias *in vitro*, es decir, una mayor capacidad de auto-renovación; y poseen mayor potencial de propagación tumoral que aquellas células SOX2 negativas que componen el grueso del tumor. También se ha visto que las células SOX2 positivas no responden a determinados tratamientos *in vitro* (*Vanner et al., 2014*). En el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) se ha comprobado que SOX2 se expresa de forma exacerbada, un hecho asociado además con la recurrencia tumoral y un pronóstico menos favorable. La expresión ectópica de este factor en células celulares de HNSCC induce proliferación, quimiorresistencia y capacidad de auto-renovación; su silenciamiento, por el contrario, atenúa esa capacidad, disminuye la resistencia a fármacos, la capacidad invasiva y la tumorigenicidad *in vivo* (*Lee et al., 2014*).

En el GBM SOX2 presenta niveles muy elevados, siendo la positividad celular para SOX2 de entre el 50% y el 100%, niveles asociados a su vez con alta expresión de Ki67, un marcador de proliferación celular (*Annovazzi et al., 2011, Gangemi et al., 2009*). En un ensayo realizado en 2011 por Alonso y colaboradores, se observó sobreexpresión de SOX2 en dos cohortes independientes, en el 100% de las muestras en una de ellas y en el 90% en la otra. Comprobaron también que SOX2 presentaba mayores niveles de expresión en células madre tumorales procedentes de pacientes en comparación con los niveles detectados en líneas de

glioma. Estos niveles se asociaron a la hipometilación del promotor de SOX2, un patrón que se repite en células precursoras neurales (*Alonso et al., 2011*). En este tipo de tumor, tal y como ya hemos comentado en otros casos, se han asociado altos niveles de SOX2 con un peor pronóstico y una mayor agresividad tumoral (*Ben-Porath et al., 2008*).

SOX9 pertenece al subgrupo SOXE junto con SOX8 y SOX10. Presenta una amplia expresión durante el desarrollo embrionario, pues participa en procesos tales como condrogénesis, desarrollo óseo, determinación del sexo masculino, organogénesis y desarrollo del SNC y cresta neural (*Jo et al., 2014; Martini et al., 2013; Kang et al., 2012; Cheung and Briscoe, 2003; Sekido and Lovell-Badge, 2008; Hattori et al., 2010; Barrionuevo et al., 2006; Pritchett et al., 2011*). Al igual que SOX2, SOX9 mantiene el estado desdiferenciado de las células madre durante el desarrollo, y también promueve la diferenciación hacia un determinado tipo celular (*Pritchett et al., 2011*). Ya en el organismo adulto, este factor es responsable del mantenimiento de las poblaciones de células madre en tejidos tales como SNC, páncreas, mama, hígado e intestino (*Scott et al., 2010; Furuyama et al., 2011; Guo W. et al., 2012; Matheu et al., 2012*). Relacionado con esa capacidad y al igual que ocurre con SOX2, SOX9 se ha asociado con las CSC en diferentes tipos de cáncer y unos niveles elevados de este factor se han relacionado con un peor pronóstico de los pacientes. En los núcleos de las células de carcinoma hepatocelular se ha visto expresión elevada de SOX9, mientras que su expresión estaba ausente en muestras de tejido sano adyacente. Además, las muestras con mayores niveles de expresión de SOX9 se correlacionaban con tumores de mayor grado y estadios tumorales más avanzados. La supervivencia media a los 5 años era significativamente menor en grupos de pacientes con mayor expresión de SOX9 que aquellos en los que este factor se expresaba en menor medida (*Guo X. et al., 2012*). En adenocarcinoma ductal de páncreas también se observa mayor expresión de SOX9 en comparación con tejido sano no tumoral y la tasa media de supervivencia en los pacientes con baja expresión de SOX9 duplicaba la de aquellos con mayores niveles de expresión de ese factor (*Xia et al., 2015*). En cáncer de mama se ha

observado que la expresión ectópica de SOX9 incrementa la capacidad de formación de organoides de células madre de mama (Guo W et al., 2013).

Dentro del SNC, SOX9 tiene gran importancia en el cerebro. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que SOX9 es necesario para la inducción y el mantenimiento de las NSC (células madre neurales, en sus siglas en inglés), no únicamente durante el desarrollo sino también durante la vida adulta del individuo, además de ser crucial para la diferenciación de ellas a células gliales (Stolt et al., 2003; Scott et al., 2010). SOX9 también tiene gran importancia en la formación de tumores cerebrales, entre los que destaca el GBM, donde se ha demostrado que las células tumorales presentan una expresión de SOX9 elevada respecto a células de tejido sano (Kordes and Hagel, 2006; Wang et al., 2012). Además, en este tipo de tumores la expresión de SOX9 también determina un peor pronóstico para los pacientes (Gao et al., 2015). La sobreexpresión ectópica de SOX9 muestra una disminución en los niveles de E-caderina (marcador epitelial) y aumento de los niveles de N-caderina, vimentina, fibronectina y α -SMA, todos ellos marcadores mesenquimales; datos que sugieren que SOX9 induce la transición epitelio-mesenquimal (EMT), lo que podría traducirse en un mayor potencial metastático (Liu et al., 2015). En cuanto a la ausencia de SOX9, se ha comprobado que el silenciamiento de este factor reduce la proliferación y capacidad de formación de colonias, además de provocar un arresto en la fase G₁/G₀ del ciclo celular y aumentar la tasa de apoptosis (Gao et al., 2015).

Diferentes estudios han demostrado la asociación que existe entre la expresión de SOX2 y SOX9 en el desarrollo del SNC, en áreas neurogénicas tales como retina o medula espinal (Scott et al., 2010; Poché et al., 2008). Esa asociación se ha descrito también en células madre adultas neurales de regiones neurogénicas (Scott et al., 2010; Carrasco-García et al., 2015). A pesar de ello, se desconoce si ambos factores están interrelacionados en el mantenimiento de las células madre del cáncer, y/o tienen alguna implicación en la quimiorresistencia del glioblastoma o la evolución clínica de los pacientes.

Objetivos

Considerando todos los datos anteriores, el objetivo principal de este trabajo es determinar la función que ejerce SOX2 en GBM. Dentro de este gran objetivo, se engloban los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la relación existente entre los factores SOX2 y SOX9 en muestras humanas y líneas celulares de GBM.
2. Relacionar SOX2 con las características de células madre de las GSCs.
3. Determinar la implicación de SOX2 en el potencial tumorigénico de las células de GBM.
4. Asociar el factor SOX2 con la quimiorresistencia a TMZ en GBM.
5. Buscar aproximaciones terapéuticas que mejoren la sensibilidad a TMZ en GBM.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

Líneas celulares y su cultivo

Las líneas celulares U87MG, U251MG, U373MG, A172 y T98G se obtuvieron de la ATCC (*American Type Culture Collection*). Las líneas GNS se obtuvieron gracias a la generosa cesión del Dr. Steven Pollard; las líneas de glioblastoma multiforme GB se produjeron en el laboratorio a partir de células procedentes de biopsias humanas. El origen y especificaciones de ellas se encuentran determinadas en la Tabla 2.

Las células en adhesión se cultivaron en Medio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM, Cat. No. 41966029, Gibco), suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS, Cat. No. 10270106, Gibco), 2mM L-Glutamina (Cat. No. 25030024, Gibco); 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Cat. No. 15140122, Gibco), a partir de ahora “medio completo”, en placas de cultivos estándar de 100mm (BD Bioscience). Para el levantamiento de estas células en adhesión se utilizó tripsina-EDTA 1X (Cat. No. 25300054, Gibco). Para los cultivos de tumorosferas o células con característica de célula madre, las células fueron cultivadas en suspensión en medio selectivo para célula madre DMEM/F12 (Cat. No. 11514436, Gibco) suplementado con 1% N2 (Cat. No. 11520536, Fisher), 2% B27 (Cat. No. 11514436, Fisher), 2mM L-Glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 1,34% glucosa 45% (Cat. No. G8769, Sigma), 10 ng/ml de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF-2, Cat. No. A15F0291, Sigma), y 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Cat. No. A15E9644, Sigma), a partir de ahora “medio *stem*”. Como excepción al cultivo en suspensión, las células GNS (*Glioma Neural Stem*), se cultivaron en adhesión con medio *stem* en placas de cultivo estándar de 100mm tratadas con 10µg/ml de laminina (Cat. No. L2020, Sigma) durante 3 horas. Para la disgregación (levantamiento en el caso de las GNS) de las células cultivadas con medio *stem* se utilizó acutasa (Cat. No. A1110501, Gibco).

Las líneas primarias de glioblastoma, GB1 y GB2, obtenidas de muestras de biopsias procedentes del Hospital Donostia (OSI Donostialdea), se disociaron con papaína (Cat. No. 10108014001, Roche) y DNasa (80 unidades, Cat. No. M6101, Promega) a 37°C durante un

máximo de 70 minutos en agitación, y dichas células se cultivaron en medio de tumorosferas consistente en medio *stem* pero con diferente concentración de factores de crecimiento EGF (20 ng/mL) y bFGF-2 (20 ng/mL). Posteriormente, las tumorosferas fueron disgregadas mecánica y enzimáticamente con acutasa, sembradas para la generación de esferas secundarias (Carrasco-García et al., 2015) y mantenidas en cultivo un mínimo de 9 pases. Los ensayos de diferenciación fueron llevados en medio *stem* en ausencia de bFGF y EGF y añadiendo 1% FBS.

Las células se mantuvieron en cultivo en un incubador de CO₂ Forma SteriCycle, en una atmosfera húmeda a 37°C, con 5% CO₂ y 21% de O₂.

Tabla 2. Relación de líneas celulares utilizadas. La composición específica del medio completo y medio *stem* se encuentra detallada en el texto. ATCC: Colección americana de cultivos tipo, en sus siglas en inglés; HUD: Hospital Universitario Donostia; GNS: *Glioma Neural Stem*.

Línea celular	Tipo celular	Origen	Medio de cultivo	Modo de cultivo	Procedencia	Número de catálogo
U87MG	Glioma	Astrocitoma	Medio completo	Adhesión	ATCC	ATCC HTBT-14
U251MG	Glioma	Glioblastoma	Medio completo	Adhesión	ATCC	
U373MG	Glioma	Glioblastoma	Medio completo	Adhesión	ATCC	ATCC HTB-17
A172	Glioma	Glioblastoma	Medio completo	Adhesión	ATCC	ATCC CRL-1620
GNS179	Célula madre de glioma	Glioblastoma	Medio <i>stem</i>	Adhesión	Cedida por Dr. Steve Pollard	-
GNS166	Célula madre de glioma	Glioblastoma	Medio <i>stem</i>	Adhesión	Cedida por Dr. Steve Pollard	-
GB1	Célula madre de glioma	Glioblastoma	Medio <i>stem</i>	En suspensión	Biopsia del HUD	-
GB2	Célula madre de glioma	Glioblastoma	Medio <i>stem</i>	En suspensión	Biopsia del HUD	-

Transfecciones transitorias e infecciones lentivirales

Las transfecciones se realizaron con el reactivo lipofectamina (Cat. No. 11668-019, Invitrogen) en medio completo en ausencia suero para U251 y U87, durante 6 horas y partiendo de un número inicial de células de $20 \cdot 10^4$. El proceso se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la inhibición transitoria de shSOX9 se realizaron transfecciones del plásmido Sox9 shRNA (Origene, sh1), usando como control células transfectadas con el plásmido shRNA no específico pRS. La selección de las células se realizó mediante la adición de puromicina (Cat. No. P8833, Sigma) durante 3 semanas a una concentración de $2 \mu\text{g/ml}$. Para la expresión transitoria de SOX9 se realizaron transfecciones transitorias con el plásmido pCAGGS-SOX9 (Matheu *et al.*, 2012).

Las infecciones lentivirales se han realizado a una MOI (*Multiplicity Of Infection*) de 10 durante 6 horas en medio completo en ausencia de suero y en presencia de $4 \mu\text{g/ml}$ de polibreno (Cat. No. H9268-5G, Sigma), partiendo de un número inicial de células de $20 \cdot 10^4$. Para la inhibición ectópica de SOX2 las células fueran infectadas con el vector vacío pLKO.1 puro (Addgene, #8453) a modo de control, y el vector pLKO.1 shSOX2 (*short hairpin* RNA SOX2, Addgene, #26352). Para la sobreexpresión de SOX9 las células fueron infectadas con el vector vacío pWPXL (Addgene, #12257) a modo de control, y el vector pWPXL-SOX9 (Addgene, #36979). Las células infectadas se seleccionaron en presencia de $2 \mu\text{g/ml}$ de puromicina (Cat. No. P8833, Sigma) y mantenidas con una dosis de $0,2 \mu\text{g/ml}$ de puromicina. Para la sobreexpresión estable de SOX2 se realizaron infecciones lentivirales con el constructo pLM-mCitrine-SOX2 (Addgene, #23242), usando como control el plásmido pWPXL. Se confirmó la eficiencia de la infección mediante la observación de fluorescencia en un microscopio Nikon Eclipse TS-100. Para la inhibición de mTOR, las células fueron infectadas con el vector vacío pLKO.1 puro como control, y mTOR_1 shRNA (Addgene, #1855) y mTOR_2 shRNA (Addgene #1856) como condiciones experimentales. Las células infectadas se seleccionaron en presencia de $2 \mu\text{g/ml}$ de puromicina y mantenidas con una dosis de $0,2 \mu\text{g/ml}$ de puromicina.

Tabla 3. Relación de plásmidos utilizados

Plásmido	Efecto del constructo	Marcadores de selección/inducción	Donado por
pLKO.1 puro	Vector vacío, control	Puromicina, 2 µg/ml	Addgene, #8453
pLKO.1 puro shSOX2	Inhibición de SOX2	Puromicina, 2 µg/ml	Addgene, #26352
pCMV p27	Sobreexpresión de p27	Ninguno	Addgene, #14049
pWPXL	Vector vacío, control	GFP	Addgene, #12257
pLM-mCitrine-SOX2	Sobreexpresión de SOX2	mCitrine	Addgene, #23242
pRS	shRNA inespecífico, control	Puromicina, 2 µg/ml	
shSOX9-1	Inhibición de SOX9	Puromicina, 2 µg/ml	Origene, sh1
pCAGGS-SOX9	Sobreexpresión de SOX9	-	Matheu et al, 2012
SOX9	Sobreexpresión de SOX9	-	Addgene, #36979
mTOR_1 shRNA	Inhibición de mTOR	Puromicina, 2 µg/ml	Addgene, #1855
mTOR_2 shRNA	Inhibición de mTOR	Puromicina, 2 µg/ml	Addgene, #1856

Ensayos funcionales

Proliferación

Se sembraron por duplicado $2,5 \cdot 10^4$ células, en placas de cultivo estándar de 6 pocillos, y se realizaron contajes celulares a día 1, día 3 y día 5 tras la siembra del ensayo. Los resultados fueron representados en gráficas indicando el número total de células a cada punto de tiempo indicado.

Ensayo de viabilidad celular MTT

Se sembraron 10^4 células y tras 24 horas se añadió el tratamiento con TMZ (Cat. No. T2577, Sigma), rapamicina (Cat. No. R8781, Sigma) y/o ciclopamina (Cat. No. C4116, Sigma) a las concentraciones indicadas en la tabla 3. Células tratadas con las correspondientes dosis de DMSO (dimethyl sulfoxide, Cat. No. D1650, Sigma) fueron utilizadas como control para los

tratamientos de TMZ y rapamicina; y células tratadas con las correspondientes dosis de etanol 100% (Cat. No. ET00111000, Scharlau) fueron utilizadas como control para los tratamientos de ciclopamina. Se realizaron seis réplicas de cada condición. Tras 72 horas se añadió la solución MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, Cat. No. M2128, Sigma) a una concentración de 1,9mg/ml durante 3 horas a 37°C. Una vez retirado el medio se añadió a cada réplica 150uL de DMSO con el fin de diluir los cristales de MTT formados por las células viables remanentes, y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. El porcentaje de células viables se determinó mediante colorimetría a 570nm en un colorímetro MultiSkan Ascent (Thermo Scientific) con su correspondiente software Ascent.

Tabla 4. Relación de fármacos utilizados. DMSO: dimetil sulfóxido.

Fármaco	Abreviatura	Concentraciones utilizadas	Disolvente	Casa comercial	Número de catalogo
Temozolomida	TMZ	100-200 μ M	DMSO	Sigma	T2577
Rapamicina	Rapa	1-10-100 nM	DMSO	Sigma	R8781
Ciclopamina	Ciclo	5-10 μ M	Etanol 100%	Sigma	C4116

Ensayo de capacidad de auto renovación de tumorosferas (*Cancer Stem cell assay*, CSC) y ensayos de dilución limitante

Para los ensayos de formación de tumorosferas se sembraron $0,05 \cdot 10^4$ células, con seis réplicas por condición en medio *stem* adecuado para tumorosferas. Las células se dejaron en cultivo durante 10 días, añadiendo medio fresco cada 3 días. Una vez finalizado el tiempo del ensayo se contó el número de esferas primarias formadas. Tras el conteo, las esferas se disgregaron con medios mecánicos y enzimáticos con acutasa, y se sembraron $0,05 \cdot 10^4$ células como se ha descrito anteriormente. Tras otros 10 días en cultivo, se contó la formación de esferas secundarias.

Para los ensayos de dilución limitante, se realizaron siembras de 100 y 1000 células por triplicado por condición en medio *stem* adecuado para tumorosferas. Las células se dejaron en

cultivo durante 10 días, añadiendo medio fresco cada 2 días. Una vez finalizado el tiempo del ensayo se contó el número de esferas primarias formadas.

Ensayo de *Soft-Agar* y de colonias

Para el ensayo de *soft-agar*, en una placa de 6 pocillos se añadió una capa de medio *stem* mezclado con *soft-agar* 2,4% al 26,31%. A las 24 horas se sembraron en esa misma placa $0,2 \cdot 10^4$ células por triplicado en medio *stem* mezclado con *soft-agar* 2,4% al 14,28%. Las células se dejaron en cultivo durante 15 días, añadiendo medio fresco cada 2 días. Una vez finalizado el tiempo del ensayo se contó el número de colonias formadas

Para el ensayo de colonias se sembraron $0,05 \cdot 10^4$ células por triplicado en medio completo. Las células se dejaron en cultivo durante 15 días, añadiendo medio fresco cada 3 días. Una vez finalizado el ensayo se fijaron las células mediante la adición de paraformaldehído 37% durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Tras descartar el medio se añadió una solución de tinción Giemsa en PBS al 5% durante 30 en agitación a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con agua destilada y se contaron las colonias resultantes.

Ensayo de senescencia

Se sembraron $2 \cdot 10^4$ células por triplicado y tras 24 horas se retiró el medio de cultivo y la placa fue lavada con PBS 1X (Cat. No. 10010-015, Gibco). Para medir la senescencia se realizó la tinción de β -galactosidasa asociada a senescencia usando un kit de tinción comercial (Cat. No. 9860S, Cell Signaling) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células senescentes, marcadas con un ligero tono azulado, fueron contadas y fotografiadas en un microscopio Eclipse TS100 (Nikon).

Ensayo de ciclo celular

Para el ensayo de ciclo celular, que nos permite determinar qué porcentaje de células de un cultivo se encuentran en cada uno de los diferentes estadios del ciclo celular, se recogieron 10^6 células y se lavaron dos veces con PBS 1X. Posteriormente al bloqueo con 2% de

paraformaldehído (Cat. No. 158127-5006, Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente, las células fueron fijadas de nuevo durante 30 minutos a temperatura ambiente con etanol 70% pre enfriado. Las células se centrifugaron y lavaron para eliminar el etanol, añadiendo después 0,5ml de PBS suplementado con 0,5% de tritón X-100 y 25µg/ml RNaseA (Ribonucleasa A de páncreas bovino, 100mg, Cat. No. 34390.02, Serva) y $25 \cdot 10^{-3}$ µg/ml de yoduro de propidio (Cat. No. P4170, Sigma). Se identificaron células aisladas mediante su paso por un citómetro y se midió la emisión de yoduro de propidio con un filtro de 605nm. El procesamiento de pulso fue utilizado para excluir dobletes celulares. Los resultados se analizaron con un software FACSDiva Versión 6.1.3.

Inmunocitoquímica

Se sembraron $2,5 \cdot 10^4$ células en cámaras de inmunocitoquímica (Lab-Tek II Chambers, Thermo Scientific). Tras 24 horas las células fueron fijadas durante 20 minutos con 4% de paraformaldehído y posteriormente bloqueadas y permeabilizadas con PBS-0,3% Tritón X-100 (Cat. No. T8787, Sigma) suplementado con 5% FBS durante una hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario contra fosfo-Histona H3 (P-H3, Cat. No. Ab14955, Abcam) durante 16 horas; tras 3 lavados con PBS 1X, las células pasaron a incubarse con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 Rabbit Anti- Mouse IgG Antibody (Cat. No. A21427, Invitrogen) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. La tinción del ADN nuclear y el montaje de las preparaciones se realizó usando Vectashield Mounting Medium with DAPI, Hard set (Cat. No. H-1400, Vector Laboratories). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Eclipse 80i y procesadas con el software NIS Elements Advances Research (Nikon).

Inmunohistoquímica

Los tumores generados en ratón fueron extraídos y fijados a temperatura ambiente en 10% de formalina durante 48 horas. A continuación, los tumores fueron embebidos en parafina y cortados con micrótopo en secciones de 4µm de grosor. Los cortes obtenidos fueron

desparafinados, rehidratados mediante baños sucesivos en alcoholes decrecientes y hervidos en *buffer* citrato durante 10 minutos para la recuperación antigénica. Tras la incubación en solución de bloqueo (PBS-0,3% Tritón X-100-5% FBS), las secciones fueron incubadas con los respectivos anticuerpos primarios anti-SOX2; anti-SOX9 y anti-Ki67 (Ver Tabla 4), a 37°C durante 2 horas. Los cortes fueron lavados e incubados con MACH 3 Rabbit Probe and MACH 3 Rabbit HRP-Polymer (Cat. No. M3R531, Biocare Medical). Las muestras fueron incubadas con 3,3'Diaminobenzidina (DAB, Cat. No. SPR-DAB-060, Spring Bioscience) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se contratiñeron los núcleos celulares con hematoxilina (Cat. No. 6765004, Shandon), a temperatura ambiente durante 10 segundos. Los cortes obtenidos se observaron en un microscopio Eclipse 80i y procesadas con el software NIS Elements Advances Research (Nikon).

Tabla 5. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las técnicas de IHC e ICC. IHC: inmunohistoquímica; ICC: inmunocitoquímica.

Anticuerpo	Dilución utilizada	Generado en	Casa comercial	Num Ref.
Anticuerpos primarios -IHC and ICC				
SOX2	1:500	Conejo	Millipore	AB5603
SOX9	1:1000	Conejo	Millipore	AB5535
Ki67	1:1000	Conejo	Abcam	Ab15580
Fosfo-histona H3	1:1000	Ratón	Abcam	Ab14955
Anticuerpos secundarios -IHC and ICC				
MACH 3 Rabbit HRP-Polymer	Instrucciones del fabricante	Conejo	BioCare Medical	M3R531
Alexa Fluor® 555 Rabbit Anti-Mouse IgG	1:500	Conejo	Invitrogen	A21427

Tinción de hematoxilina y eosina

Tras la extracción, fijación, inserción en parafina y corte de los tumores generados, los cortes fueron sometidos a una tinción de hematoxilina y eosina por medio de un teñidor Varistain Gemini ES (Cat. No. A78000014, ThermoFisher) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. De forma breve, los cortes fueron sometidos a un proceso de desparafinado y rehidratación por medio de alcoholes crecientes, y después se sumergieron en hematoxilina durante 2 minutos. Tras lavar las muestras con agua caliente, éstas se tiñeron con eosina (Cat. No. 6766008, Shandon) durante un segundo.

Extracción y cuantificación de proteínas y western blot

Aproximadamente $5 \cdot 10^4$ células fueron lisadas con tampón de lisis de proteínas (1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM Na_3VO_4 , 50 mM Tris-HCl pH 7.4) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (1:1000, Cat. No. P8340, Sigma), cóctel inhibidor de fosfatasa 2 (1:1000, Cat. No. P5726, Sigma) y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF, 1:1000, Cat. No. P7626, Sigma) durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C a 12.000 g para precipitar el material no solubilizado. El sobrenadante, constituido por las proteínas solubilizadas, fue trasvasado a nuevos tubos. Se realizó la cuantificación de proteínas según el método del ácido bicincomínico (Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat. No. 23227, Thermo Scientific), para el que se incubó 1 μL de muestra de proteínas con BCA durante 25 minutos a 37°C , y la intensidad colorimétrica de las muestras fue cuantificada a 570nm con el MultiSkan Ascent (Thermo Scientific) y el software correspondiente. Como control para determinar la concentración de proteínas, se realizó una recta patrón con soluciones de BSA (albúmina de suero bovino) a diferentes concentraciones conocidas (BSA 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BSA 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BSA 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BSA 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BSA 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), que se sometieron al mismo tratamiento que las muestras y de manera simultánea.

Tras determinar la concentración de las muestras de proteínas, se mezcló 20 μg de dichas muestras con una quinta parte de su volumen de tampón de carga 5x (312.5 mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerol, 0.5% (p/v) azul de bromofenol y 5% β -Mercaptoetanol). Tras su incubación a 95°C durante 5 minutos para una completa desnaturalización de las proteínas, éstas fueron separadas mediante Acrilamida SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, 125V durante 1 hora y 50 minutos) en geles de 7,5, 12 o 15% de acrilamida en función del tamaño de proteína a detectar, en tampón de electroforesis y con un equipo BioRad HC Power Pac. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran 0,2 μm NC; Cat. No 10600001, GE Healthcare, Life Science,) mediante transferencia húmeda en tampón de transferencia (90 minutos a 300mA), un proceso cuya eficacia se comprobó mediante la incubación de la membrana con

Rojo Ponceau S (Cat. No. P7170, Sigma). Tras el bloqueo de la membrana con Tris Buffer salino 0,01% Tween -20 (Cat. No. 8221840500, Merck Millipore) (TBST) y 5% de leche desnatada (Cat. No. 70166, Sigma) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación, se procedió a la incubación de la misma con el correspondiente anticuerpo primario (ver Tabla 5), durante 2 horas a temperatura ambiente o 15-18 horas a 4°C, en ambos casos con agitación. Posteriormente y después de tres lavados de 5 minutos cada uno con TBST, se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente (ver Tabla 5) conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Para la detección de las proteínas y revelado de la membrana se utilizó el sistema de quimioluminiscencia NOVEX ECL Chemi Substrate (Cat No. WP20005, ThermoFisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y films reactivos a quimioluminiscencia Amersham Hyperfilm ECL films (GE Healthcare). Los datos referentes a todos los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta memoria se encuentran recogidos en la Tabla 6.

Tabla 6. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la técnica de western blot

Anticuerpo	Dilución utilizada	Generado en	Casa comercial	Num Ref.
Anticuerpos primarios-WB				
SOX2	1:500	Conejo	Millipore	AB5603
SOX9	1:1000	Conejo	Millipore	AB5535
p27 [Kip1]	1:500	Ratón	BD Transduction Laboratories	BD610241
Phospho-S6 Ribosomal protein (Ser235/236) (D57,2,2E)	1:500	Conejo	Cell signalling	4858
Phospho -Akt (Ser473)	1:500	Conejo	Cell signalling	9271
β-Actin	1:1000	Ratón	Sigma	AC-15
Anticuerpos secundarios-WB				
Goat anti-rabbit HRP	1/2000	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2004
Goat anti- mouse HRP	1/2000	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2005
Donkey anti-goat HRP	1/2000	Asno	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2020

Extracción de ARN

Aproximadamente $2,5 \cdot 10^4$ células fueron recogidas, centrifugadas e incubadas un mínimo de 10 minutos con 1ml de la solución TriReagent (Cat. No. AM-9738, Life Technologies) a temperatura ambiente. Tras 10 minutos de incubación se añadió 200 μ L de cloroformo (Cat. No. C2432, Sigma), se mezcló vigorosamente mediante inversión y se dejó reposar otros 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó 10 minutos a 12.000 x g a 4°C y la fase acuosa se trasvasó a nuevos tubos tratados con DEPC (Diethyl pirocarbonato, Cat. No. 159220, Sigma). Se añadió 500 μ L de alcohol isopropílico (Cat. No. I9516, Sigma) y 5 μ m/ml de glicógeno (5mg/ml, Cat. No. AM9510, Ambion) para causar la precipitación del ARN, y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Tras otra centrifugación en las mismas condiciones que la anterior, se descartó el sobrenadante y se añadió alcohol etílico 75% para lavar el precipitado de ARN resultante, y se sometió a una última centrifugación en las mismas condiciones. Finalmente y tras descartar el sobrenadante se procedió a la resuspensión del ARN con agua libre de RNasas. La concentración del ARN resultante se midió a partir de 1 μ L de muestra mediante espectrofotometría, mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280nm, en un aparato Nanodrop-1000 (Thermo Scientific).

Retro-transcripción

Para el proceso de retro-transcripción y obtención de ADN de cadena simple (ADNc) se tomaron 2 μ g de ARN y se retro-transcribieron usando el método de cebadores aleatorios y el Kit MultiScribeTM Reverse Transcriptase (Cat. No. 4311235, Life Technologies), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se llevó a un volumen final de 20 μ L y se sometió a un proceso de determinadas temperaturas y tiempos en un BioRad C1000 Thermal Cycler. El protocolo de retrotranscripción está formado por una fase de incubación de 10 minutos a 25°C, una fase de calentamiento a 37°C durante 120 minutos, y una fase de calentamiento final a 85°C durante 5 minutos. El ADNc resultante se diluyó hasta llegar a una concentración final de 4ng/ μ l.

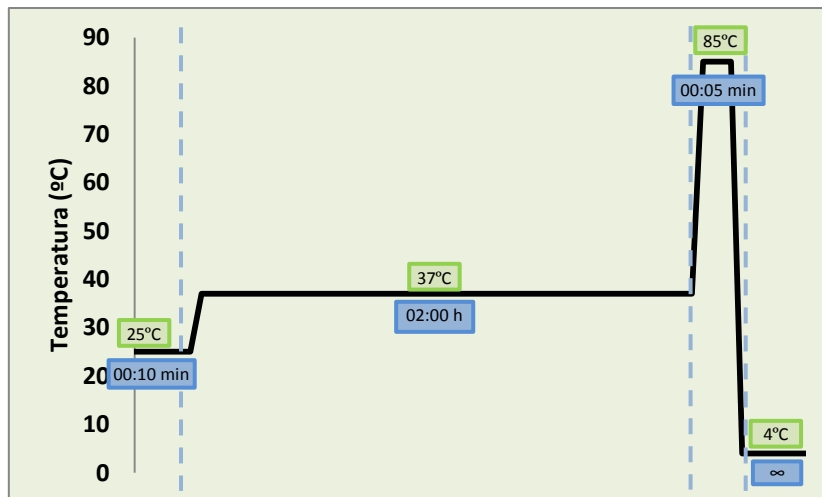


Diagrama 2. Representación gráfica del proceso de retro-transcripción

qRT-PCR

Para determinar los niveles de expresión génicos se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de 20ng de ADNc con duplicados de cada muestra. La reacción tuvo lugar en un volumen final de 12µl, constituidos por 6µL de Absolute SYBR Green mix (Cat. No. 4368706G, Applied Biosystem); 0,25 µL de cebadores (*forward* y *reverse*) correspondientes al gen de estudio a una concentración de 0,4µM; y 0,75µL de H₂O libre de RNasas. El proceso se llevó a cabo en el termociclador LightCycler 96 (Roche). Variaciones en los niveles génicos del ADNc se corrigieron mediante la resta de los ciclos de PCR obtenidos para el gen de control interno *GAPDH* (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa). El método de $\Delta\Delta C_t$ fue el seleccionado para realizar la cuantificación relativa de los niveles génicos. Las secuencias de los cebadores utilizados en esta memoria se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Relación de secuencias de plásmidos utilizados.

Gen	Secuencia <i>Forward</i> (5'→3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'→3')
<i>SOX2</i>	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
<i>SOX9</i>	AGCGAACGCACATCAAGAC	CTGTAGGCGATCTGTTGGGG
<i>IL1α</i>	GCAAGGGCTTCAGGCAGGCCGCG	GGTCATTCTCCTGGAAGGTCTGTGGGC
<i>CD133</i>	GCTCAGACTGGTAAATCCCC	GACTCGTTGCTGGTGAATTG
<i>OCT4</i>	CGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG	CCACATCGGCCTGTGTATATCCCAG
<i>mTOR</i>	TCCGAGAGATGAGTCAAGAGG	CGGAGTATCCTCACCTTCCAC
<i>GAPDH</i>	ATGGGGAAGGTGAAGGTCCG	GACGGTGCCATGGAATTTGC

El proceso de qRT-PCR consiste en: 1 ciclo de 120 segundos a 50°C; 1 ciclo de 600 segundos a 95°C, 41 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C y un último paso de disociación consistente en 10 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C y 1 segundo a 97°C.

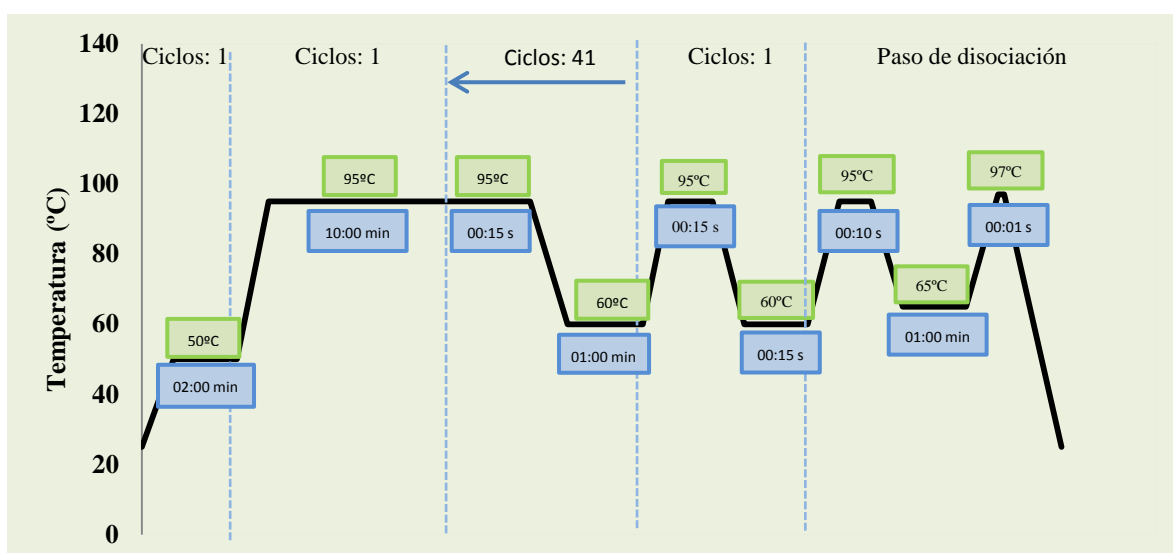


Diagrama 3. Representación gráfica del proceso de qRT-PCR.

Ensayos de carcinogénesis *in vivo*

Para la formación de tumores subcutáneos, se levantaron las células con tripsina y se resuspendieron en PBS 1X tras una centrifugación y lavado previo con PBS 1X de las mismas. 10^6 células fueron inyectadas de manera subcutánea en los 4 flancos de ratones inmunodeprimidos Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu} *nude* (8 semanas de edad, de sexo aleatorio). Los ratones fueron observados semanalmente durante 180 días, midiendo el tamaño de los tumores generados a los tiempos indicados.

Para la formación de tumores subcutáneos y su respuesta a un tratamiento farmacológico de administración intraperitoneal (IP), las células de glioma U251MG que iban a ser inyectadas fueron sometidas a un tratamiento previo de 48h con TMZ 0.1mM, rapamicina 1nM y una combinación de ambas drogas a las mismas concentraciones indicadas. Se recogieron y se resuspendieron en PBS 1X tras una centrifugación y lavado previo con PBS 1X. Ratones Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu} *nude* de 8 semanas de edad se dividieron en 4 grupos de 3 ratones cada uno, cada grupo correspondiente a una condición experimental: control (sin tratamiento), tratamiento con TMZ (10mg/kg), tratamiento con rapamicina (5mg/Kg) y tratamiento combinatorio TMZ + rapamicina (10mg/kg + 5mg/Kg respectivamente). Una semana después de la inyección subcutánea de 10^6 células en cada uno de los 4 flancos de los ratones, se procedió al inicio del tratamiento farmacológico utilizando como disolvente PBS 1X, realizándose el mismo dos veces por semana. El tratamiento se mantuvo durante 15 semanas durante las cuales se pesaron dos veces por semana. Tras ese periodo ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos.

Las GSC se inyectaron mediante estereotaxia en el córtex frontal de ratones NOD-SCID de 6-8 semanas de edad y sexo aleatorio. Las células GSC fueron levantadas con acutasa y resuspendidas en PBS tras una centrifugación y lavado previo. 10^5 células en un volumen final de 1 μ L fueron inyectadas en el putamen derecho mediante un aparato estereotáxico y de acuerdo a las siguientes coordenadas: Antero-posterior: Bregma+1; Lateral: Bregma -2; Dorso-

ventral: Bregma -2.5. El ritmo de inyección de las células se realizó mediante una bomba de infusión a un caudal constante de 0,05µL/min.

Evaluación estadística de los datos

Los datos son presentados como valores medios \pm error estándar (SEM), con el número de experimentos (n) indicado entre paréntesis, siendo 3 el mínimo de experimentos independientes realizados para cada ensayo. Si no se indica lo contrario, la significación estadística (p-valor) ha sido calculada mediante el test T de Student. Los asteriscos (*, **, y ***) indican los distintos grados de significación estadística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, y $p < 0,001$, respectivamente).

Resultados

Caracterización de SOX2 y SOX9 en glioblastoma multifome

La expresión de SOX2 y SOX9 se correlaciona en muestras de pacientes y líneas celulares

Se procedió al análisis de la expresión de los niveles de SOX2 y SOX9 en una cohorte de 27 muestras de GBM obtenidas de biopsias de pacientes, y se compararon estos niveles con los obtenidos en muestras de tejido cerebral sano (Figura 1A). SOX2 y SOX9 presentan una expresión significativamente elevada en glioblastoma: más del 70% de las muestras (19 de 27) presentaban una expresión de SOX2 por encima de 1,5, mientras que casi el 67% (18 de 27) mostraban una sobreexpresión de SOX9. Reforzando este hecho, se observa que SOX2 se encuentra sobreexpresado más de tres veces en el tejido tumoral en comparación con el sano, mientras que esta expresión aumentada llega a ser de hasta seis veces más en el caso de SOX9 (Figura 1B). Al realizar el análisis de correlación (*Fisher exact test*, $p=0,006^{**}$; *Spearman correlation test*, $p=0.02^*$) se ha demostrado que el 84% de las muestras con niveles altos de SOX2 también presentan niveles elevados de SOX9 (16 de 19); y que de las 8 muestras con niveles bajos o moderados de SOX2, el 75% tiene también niveles bajos de SOX9 (6 de 8) (Figura 1C). El conjunto de estos datos demuestra de forma plausible que SOX2 y SOX9 se encuentran relacionados en muestras humanas de GBM.

Posteriormente se analizó la expresión de los factores SOX2 y SOX9 en un grupo de líneas celulares de glioma y líneas celulares de células madre de glioma (GSC) obtenidas a partir de biopsias procedentes de pacientes tratados en el Hospital Donostia (OSI Donostialdea), a las que denominamos GB1 y GB2. El análisis por western blot muestra niveles bajos de expresión de SOX2 en las líneas U87 y A172, y niveles altos de expresión de SOX2 en las líneas U251 y U373 (Figura 1D). Al analizar mediante qRT-PCR las líneas celulares y las líneas GB1 y GB2, se observa que las líneas GSC expresan niveles muy altos de ambos factores, un hecho que, además de respaldar la correlación entre SOX2-SOX9, relaciona estos dos factores con las células madre del cáncer o GSC (Figura 1E-F). Adicionalmente, estas líneas de células madre de glioma GB1 y GB2 presentan potencial tumorigénico demostrado por la

formación de tumores en ensayos de estereotaxia sobre ratones inmunodeficientes, y es interesante observar cómo una mayor expresión de los factores SOX2 y SOX9, como es el caso de GB1, se correlaciona con una aparición de tumores más rápida y una menor supervivencia (Figura 1G).

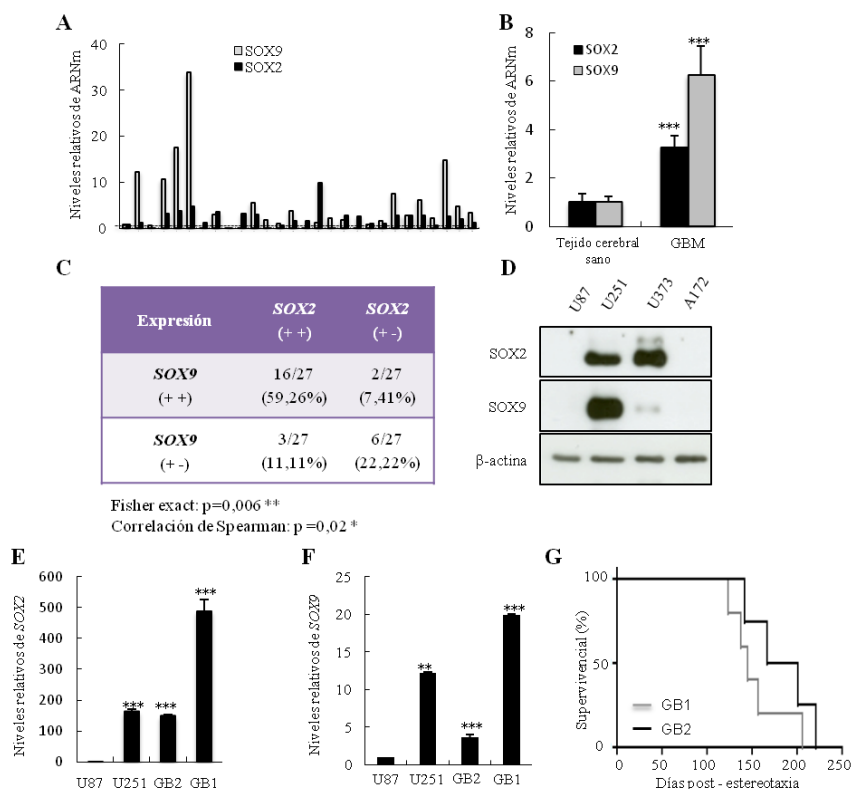


Figura 1. SOX2 y SOX9 se co-expresan en muestras humanas de GBM y líneas celulares de glioma. (A) Expresión de SOX2 y SOX9 mediante qRT-PCR en cada una de las 27 muestras humanas de GBM de la cohorte procedente del Hospital Donostia (OSI Donostialdea). (B) Los niveles de SOX2 y SOX9 en las muestras (n=27) se compararon respecto a tejido de cerebro sano como control (n=9) mediante qRT-PCR. (C) Análisis de correlación de la expresión de SOX2 y SOX9 en muestras humanas de GBM (Test exacto de Fisher=0,006^{**}; Correlación de Spearman=0,02^{*}). “+ +” hace alusión a niveles elevados (>1,5 veces respecto al control); “+ -” alude a bajos niveles (<1,5 veces respecto al control). (D) Western blot representativo de la expresión de SOX2 y SOX9 en líneas diferenciadas de glioma (n=5). (E-F) Comparación de los niveles expresión de SOX2 (E) y SOX9 (F) mediante qRT-PCR entre las líneas celulares U87 y U251 y las GSCs GB1 y GB2. Los valores indicados son la media de dos experimentos independientes, relativizados frente a U87. (G) Supervivencia de ratones NOD-SCID (%), curva de Kaplan-Meier) con xenotransplantes de líneas GB (n=5). Los datos de la qRT-PCR fueron normalizados respecto a la expresión de GAPDH. La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($P \leq 0,05^{*}$; $P \leq 0,01^{**}$; $P \leq 0,001^{***}$).

Elevados niveles de SOX2 y SOX9 están relacionados con las GSCs y un mayor potencial tumorigénico

Con el fin de extender la relación existente entre los niveles de expresión de SOX2 y SOX9 con las GSC, se procedió a la diferenciación de las líneas GSC GB1 y GB2 mediante su cultivo en ausencia de factores de crecimiento y la adición de 1% FBS. En estas condiciones, los niveles de SOX2 y SOX9, determinados tanto por western blot como por qRT-PCR, se vieron drásticamente disminuidos (Figura 2A-C): en el caso de GB1, los niveles de SOX2 y SOX9 disminuyeron alrededor de un 35% y 30% respectivamente; en el caso de GB2, la expresión de SOX2 y SOX9 se vio reducida en un 35% y 80% respectivamente.

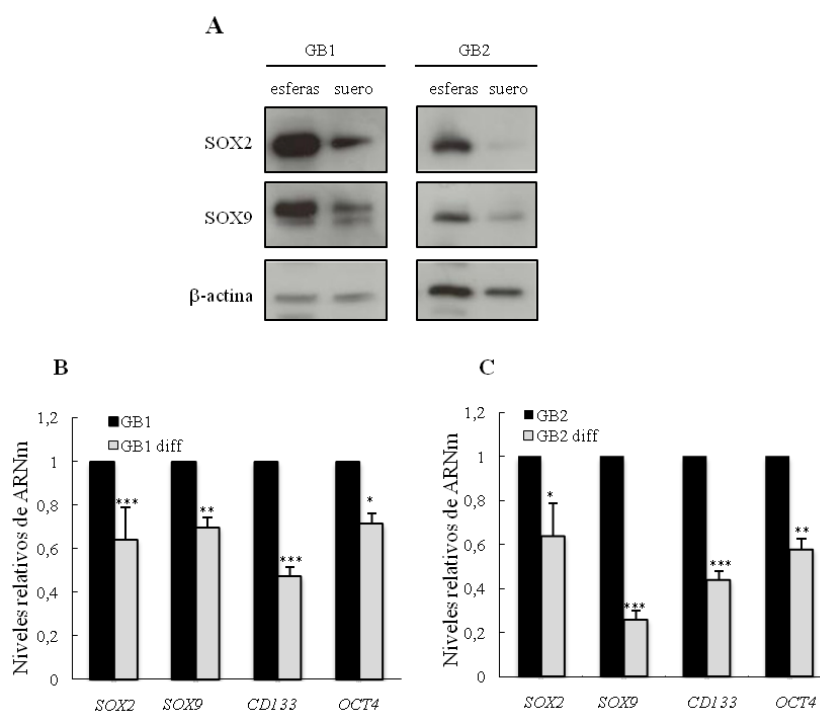


Figura 2. Los niveles de SOX2 y SOX9 se relacionan con un estado más indiferenciado. (A) Imagen representativa de mayores niveles de SOX2 y SOX9 en GB1 y GB2 crecidas en medio selectivo de célula madre en comparación con condiciones de diferenciación (medio selectivo de célula madre con 1% FBS). (B-C) Expresión comparada de los niveles de SOX2, SOX9, CD133 y OCT4 en condiciones selectivas de célula madre y condiciones de diferenciación en GB1 (B) y GB2 (C) mediante qRT-PCR. Los datos fueron normalizados respecto a la expresión de GAPDH y relativizados respecto a la condición célula madre. La significancia estadística se obtuvo con el test *T* de Student ($P \leq 0,05$ *; $P \leq 0,01$ **; $P \leq 0,001$ ***).

Se determinó a su vez por qRT-PCR que también disminuye la expresión de otros marcadores establecidos de célula madre, *CD133* y *OCT4* (Figura 2B-C), lo que indica la existencia de correlación entre los factores de transcripción *SOX2* y *SOX9* y las células madre del cáncer.

A continuación se procedió a comprobar el efecto de la desdiferenciación sobre los niveles de *SOX2*-*SOX9* en las líneas celulares de glioma, con el fin de identificar si éstos participan en la adquisición y mantenimiento de las características de célula madre. Para ello, se cultivaron las líneas U87 y U373, en condiciones de cultivo selectivo para célula madre, llamadas en este caso tumorosferas. El estudio de la expresión de los factores *SOX2* y *SOX9* así como de los marcadores de célula madre *CD133* y *OCT4*, mostró una expresión significativamente elevada de todos ellos en ambas líneas celulares cultivadas en condiciones de célula madre, determinado a nivel de ARNm y proteína (Figura 3A-C). Los niveles de *SOX2* eran 4 y 2 veces superior (línea U87 y U373 respectivamente) en las esferas secundarias (a partir de ahora, GSC) respecto a las líneas parentales; *SOX9* mostraba un aumento de 3 veces superior en la población de GSC derivada de la línea U87 (U87 GSC) y de 6 veces superior en la población de GSC derivada de la línea U373 (U373 GSC); la expresión de *CD133* se incrementaba 3 veces en las U87 GSC, mientras que en la U373 GSC aumentaba 9 veces; *OCT4* duplicaba su expresión tanto en la U87GSC como en la U373 GSC (Figura 3A-C). Con el fin de comprobar el potencial tumorigénico de las GSC generadas en comparación a las líneas parentales, ambos subgrupos de células fueron inyectadas de forma subcutánea en la cepa de ratones inmunodeprimidos *Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}*. La aparición de tumores procedentes de las GSCs ocurrió de forma mucho más rápida: en el caso de la U373, los tumores comenzaron a aparecer alrededor del día 40 mientras que los procedentes de líneas parentales no hicieron su aparición hasta el día 140 (Figura 3D); y el volumen de los mismos era significativamente mayor en comparación con los tumores procedentes de las líneas parentales. En la U87 los tumores generados a partir de las GSC casi cuadruplicaban el tamaño de los formados a partir de las células parentales (Figura 3D). Tras su extracción, dichos tumores fueron sometidos a inmunohistoquímica (IHC) de *SOX2* y *SOX9*, tras la cual se pudo comprobar que sus niveles se

veían aumentados en los tumores formados a partir de tumosferas en comparación con los formados a partir de las condiciones parentales (Figura 3E). Además, el marcador de proliferación Ki67 también aumentaba su nivel de expresión en la condición desdiferenciada, lo que respalda la conclusión de que las GSC presentan un mayor potencial proliferativo, además de mayor potencial tumorigénico (Figura 3E).

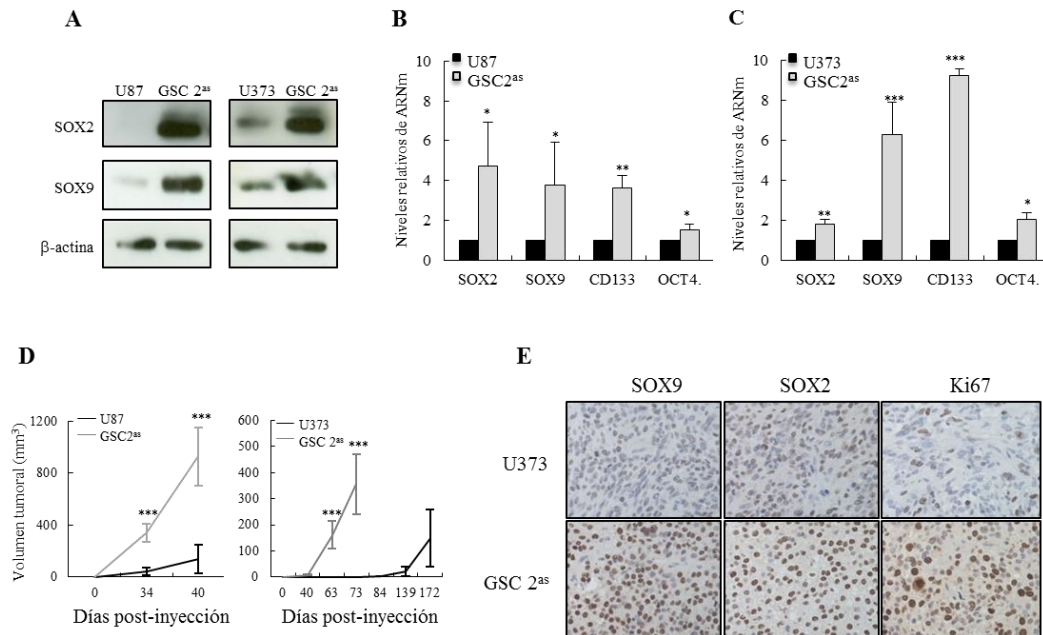


Figura 3. Los niveles de SOX2 y SOX9 aumentan en condiciones selectivas para célula madre. (A) Western blot representativo del los niveles de SOX2 y SOX9 en las líneas U87 y U373 crecidas en medio completo (líneas parentales) y medio stem (GSC 2^{as}). (B) Expresión comparada de los niveles de SOX2, SOX9, CD133 y OCT4 en líneas parentales y GSC 2^{as} de U87 (B) y U373 (C) mediante qRT-PCR (n=5). Los datos fueron normalizados respecto a la expresión de GAPDH y relativizados respecto a la condición parental. (D) Las líneas U87 y U373 parental y GSC 2^{as} fueron inyectadas de forma subcutánea en ratones inmunodeprimidos Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu} nude (n=8 por condición), registrando el crecimiento tumoral a los tiempos indicados. (E) Imágenes representativas de la IHC de SOX2, SOX9 y Ki67 en los tumores generados a partir de la línea U373 (condición parental y GSC 2^{as}). La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($P \leq 0,05^*$; $P \leq 0,01^{**}$; $P \leq 0,001^{***}$).

El silenciamiento de SOX2 reduce las características tumorigénicas en GBM

Con el fin de establecer el efecto que tiene SOX2 sobre la expresión de SOX9, se procedió a la inhibición de la expresión de SOX2 mediante el método de shRNA en células U251, la línea celular que mayores niveles endógenos de SOX2 y SOX9 presenta. La eficacia de la inhibición se aseveró por western blot, que al mismo tiempo nos permitió comprobar que

SOX9 también veía disminuida su expresión en la condición *shSOX2* (Figura 4A). Ensayos funcionales con estas células mostraron una menor capacidad proliferativa, determinada tanto por la proporción de células P-H3 positivas, donde se ve una reducción del marcaje positivo del 50% ($p \leq 0,001$), como por conteo celular a días 1, 3 y 5, donde se ve que las células *shSOX2* a día 5 crecen hasta 3 veces menos que la condición control ($p \leq 0,001$) (Figura 4B-C). Esta disminución del crecimiento celular podría explicarse mediante el arresto en fase G_0/G_1 que presentaban las células de la condición *shSOX2* en comparación con las células pLKO control (75% vs 63%), así como una disminución de la proporción en fase S (5% vs 9,5%) de las mismas, tal y como se determinó mediante el análisis del ciclo celular por citometría de flujo (Figura 4D). Adicionalmente, esta menor proliferación celular se acompaña del aumento en la proporción de células senescentes, determinado mediante el ensayo de β -galactosidasa y la expresión de *IL1 α* mediante qRT-PCR. La condición experimental *shSOX2* presentaba más del doble de células senescentes que la condición control (0,51% vs 2,36% de células senescentes) (Figura 4E), al igual que su expresión de *IL1 α* se incrementaba alrededor de 2,5 veces en las células con silenciamiento de SOX2 (Figura 4F). La inhibición de SOX2 se relaciona también con una menor capacidad de formación de esferas (70% menos de formación en la condición *shSOX2*) y menor capacidad de autorrenovación, comprobado mediante la formación de tumorosferas secundarias (60% menos de formación en la condición *shSOX2*). Además, las esferas formadas eran de menor tamaño que las que se formaban en la condición control (Figura 4G). En ensayos de diluciones limitantes se obtuvieron resultados similares (Figura 4H), lo que permite concluir que el silenciamiento de SOX2 reduce la capacidad de autorrenovación.

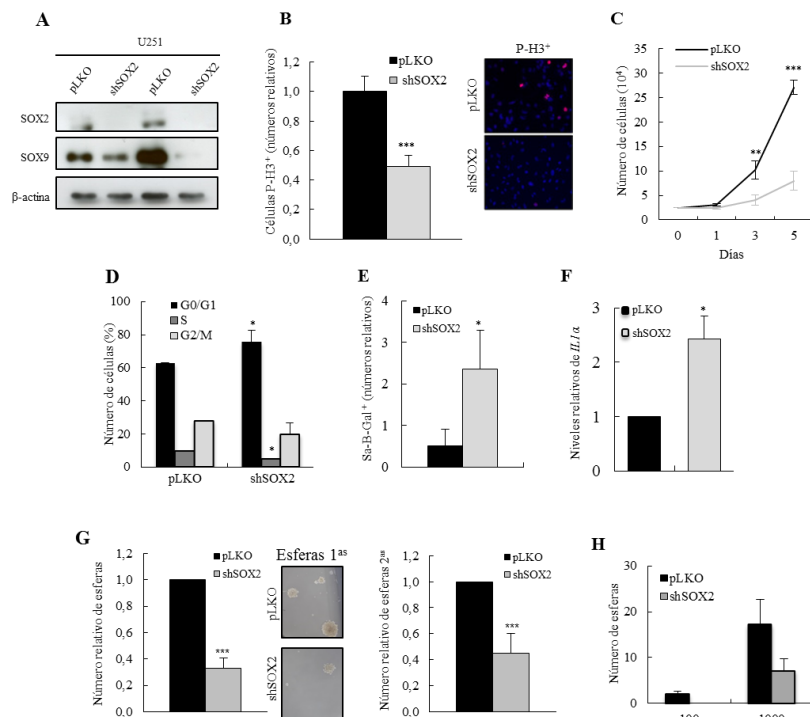


Figura 4. El silenciamiento de SOX2 resulta en una reducción de la capacidad tumorigénica. (A) Western blots representativos de SOX2 y SOX9 en dos infecciones lentivirales diferentes e independientes con el constructo shSOX2 (n=4). (B-C) El silenciamiento de SOX2 reduce la proliferación celular determinado por (B) niveles relativos de expresión del marcador de mitosis P-H3 e imagen representativa en las condiciones control y shSOX2 (n=4); y (C) conteo del número de células totales de las condiciones control y shSOX2 a los tiempo indicados (n=4). (D) Porcentaje de la población celular en las distintas fases del ciclo celular, determinado por citometría de flujo, en la condición control y shSOX2 (n=2). (E) Cuantificación relativa de células senescentes asociado a actividad β -galactosidasa en células control y shSOX2 (n=4). (F) Expresión de los niveles de IL-1 α en las células con SOX2 silenciado (n=3). Los datos fueron normalizados respecto a la expresión de GAPDH y relativizados respecto a la condición control. (G-H) Cuantificación de la capacidad de formación de esferas, primarias (1^{as}, n=4) y secundarias (2^{as}, n=3) con imagen representativa de esferas primarias (G), y en condiciones de dilución limitante (H, n=3). La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($P \leq 0,05^*$; $P \leq 0,01^{**}$; $P \leq 0,001^{***}$).

La expresión de SOX9 restaura el fenotipo tumoral en células SOX2 silenciadas y es necesaria para mediar el efecto oncogénico de SOX2

Se ha observado que los niveles de SOX9 disminuyen al inhibir la expresión de SOX2. Este efecto indica que SOX9 es un mediador del efecto de SOX2 y que actúa por debajo de él. Para poder caracterizar que SOX9 es un mediador de la función de SOX2, se procedió a la sobreexpresión de SOX9 en células en las que SOX2 había sido previamente inhibido por

medio de infecciones lentivirales estables. Mientras que la inhibición de SOX2 derivaba en el fenotipo previamente descrito, la restauración de SOX9 en esas células condujo a un incremento notable de la expresión de SOX2, comprobado mediante western blot (Figura 5A), además de restaurar parcialmente el fenotipo.

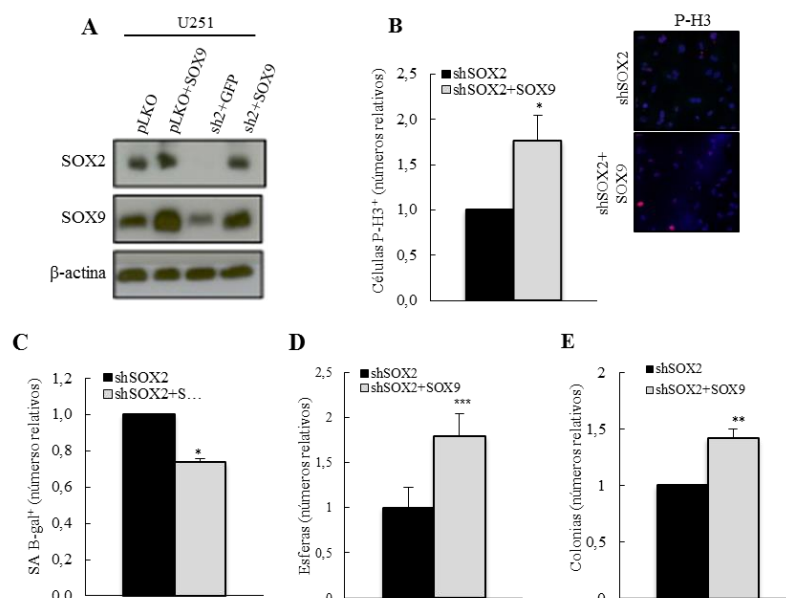


Figura 5. La expresión ectópica de SOX9 restaura parcialmente el fenotipo tumorigénico de las células con silenciamiento de SOX2. (A) Western blot representativo de los niveles de SOX2 y SOX9 tras la restauración ectópica de la expresión de SOX9 en células shSOX2 (n=3). (B) Niveles relativos de expresión del marcador de mitosis P-H3 e imagen representativa en las condiciones shSOX2 y shSOX2+SOX9 (n=3). (C) Cuantificación de la senescencia medida por actividad β -galactosidasa en células shSOX2 y shSOX2+SOX9 (n=4). (D) Cuantificación de las esferas formadas tras 7 días en cultivos por las células shSOX2 y shSOX2+SOX9 (n=4). (E) Capacidad de formación de colonias a partir de células aisladas de la condición shSOX2 frente a shSOX2+SOX9 tras 15 días en cultivos (n=4). La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($P \leq 0,05$ *; $P \leq 0,01$ **; $P \leq 0,001$ ***).

La proliferación celular, medida por células P-H3 positivas, aumenta 1,7 veces en comparación a la condición *shSOX2* (Figura 5B), al mismo tiempo que la senescencia disminuye un 27% (Figura 5C). La capacidad de formación de esferas (1 vs 1,79) así como la capacidad de formar colonias a baja densidad celular (1 vs 1,42) también se ven incrementadas en las células con expresión ectópica de SOX9 en comparación con las que únicamente tienen silenciado el SOX2 (Figura 5D-E).

El efecto observado sobre SOX2 tras la inducción de SOX9 podría indicar no sólo que SOX2 actúa por encima de SOX9, sino que existe un ciclo de retroalimentación entre ambos factores de transcripción. Debido a la posible existencia de este *loop*, se procedió a analizar el papel de SOX9, con el fin de identificar si éste es necesario para el fenotipo oncogénico asociado a SOX2 y caracterizar la función de SOX2-SOX9 como eje en el glioblastoma multiforme. Para ello se realizó una inhibición de SOX9 mediante el método de shRNA y se comprobó la efectividad del proceso mediante qRT-PCR, western blot e inmunofluorescencia (Figura 6A-C). La cuantificación de células P-H3 positivas en la condición experimental resultó ser menor que en las células control (5,3% vs 2,3%) (Figura 6D), al igual que la capacidad de formación de *foci* en *soft agar* (7 vs 2,5 *foci*) (Figura 6E), lo que es indicativo de una menor proliferación celular y capacidad de autorrenovación. El potencial tumorigénico de las células con silenciamiento de SOX9 también se veía disminuido. En ensayos de estereotaxia llevados a cabo con estas células en paralelo con su condición control, ratones inyectados con células deficientes en SOX9 presentaron una mayor supervivencia que ratones inyectados con células de la condición control (Figura 6F). La IHC de los tumores formados a partir de las células shSOX9, además, mostraban menor expresión de SOX9 que los tumores generados a partir de las células control (Figura 6G).

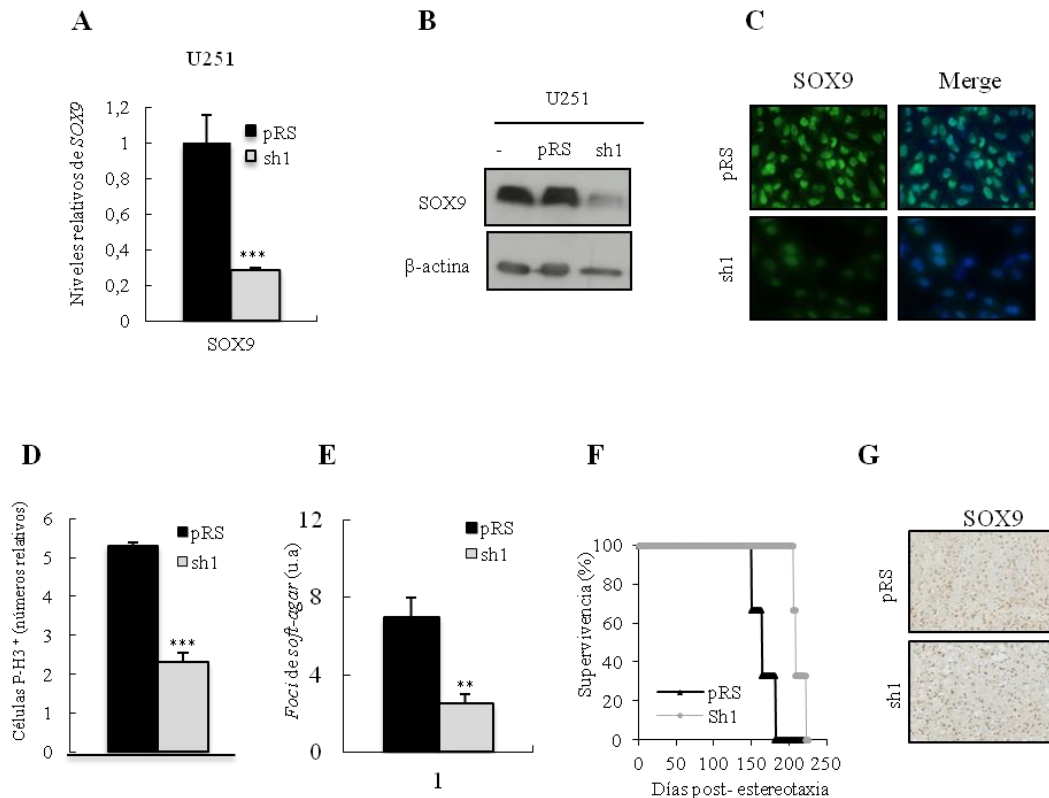


Figura 6. El silenciamiento de SOX9 disminuye la proliferación, capacidad de autorrenovación y potencial tumorigénico. (A) Expresión relativa de SOX9 de las células con SOX9 silenciado respecto a las células control mediante qRT-PCR. Los datos fueron normalizados respecto a la expresión de GAPDH y relativizados frente a la condición control. (B) Western blot representativo de SOX9 en las células pRS control y shSOX9. (C) Imagen representativa de inmunofluorescencia de SOX9 en las células control y shSOX9. (D) Cuantificación de células P-H3 positivas en la condición shSOX9 respecto al control. (E) Contaje de tumorosferas formadas en *soft-agar* de las células con silenciamiento de SOX9 y las células control. (F) Curva de Kaplan-Meier representando la supervivencia de ratones NOD-SCID tras la inyección estereotáctica de células pRS control y shSOX9 (n=4). (G) Imagen representativa de la IHC de SOX9 en los tumores derivados de células control y con SOX9 silenciado. *La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($P \leq 0,05^*$; $P \leq 0,01^{**}$; $P \leq 0,001^{***}$). u.a.: unidades aleatorias.*

La sobreexpresión de SOX2 induce un fenotipo más tumorigénico

A continuación se procedió a la sobreexpresión de SOX2 y SOX9 en células U87, donde la expresión de ambos factores es baja, con el fin de comprobar si un aumento de éstos trae consigo un mayor potencial tumorigénico. La sobreexpresión de SOX2, comprobada por medio de western blot (Figura 7A), provocaba un aumento en la expresión de SOX9 mientras que a nivel de ARN, por el contrario, no se apreciaron diferencias significativas en la expresión de SOX9 (datos no mostrados).

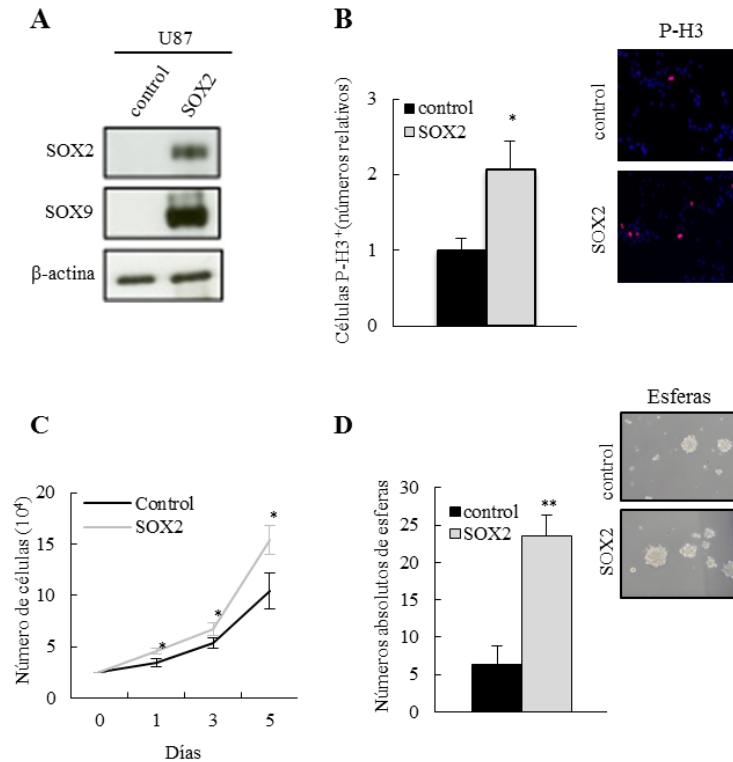


Figura 7. La sobreexpresión ectópica de SOX2 incrementa las propiedades tumorigénicas. (A) Western blot representativo de SOX2 y SOX9 en células U87 control y lentiviralmente infectadas con sobreexpresión SOX2. (B) Niveles relativos de expresión del marcador de mitosis P-H3, acompañados de una imagen representativa en las condiciones control y SOX2+ (n=3). (C) Cuantificación del número de células totales de las condiciones control y SOX2+ a los tiempo indicados (n=5). (D) Cuantificación de la capacidad de formación de esferas en la línea U87 control y con SOX2 ectópico (n=4), junto con una imagen representativa de la cantidad y el tamaño de las mismas en las dos condiciones. *La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($P \leq 0,05^*$; $P \leq 0,01^{**}$; $P \leq 0,001^{***}$).*

A nivel funcional, la sobreexpresión de SOX2 produce un aumento en la proliferación celular, demostrado por mayores tasas de crecimiento a días 1, 3 y 5 ($15,41 \cdot 10^4$ células vs $10,45 \cdot 10^4$ células), y mayor proporción de células P-H3 positivas (1 vs 2,06 veces más) (Figuras 7B-C). También se comprobó el efecto de SOX2 sobre el potencial tumorigénico y la capacidad de auto-renovación, pues células con sobreexpresión de SOX2 incrementaban su capacidad de formación de esferas hasta 4 veces en comparación con las células control (Figura 7D).

Se realizó la sobreexpresión de SOX9 y se observó que la sobreexpresión de SOX9 (Figura 8A) incrementa la capacidad de formación de esferas en un 60% (Figura 8B), y produce mayores tumores y más rápidamente que las células de la condición control, apareciendo éstos a día 20 tras la inyección en el caso de la sobreexpresión de SOX9 y a día 35 en el caso de las células control (Figura 8C).

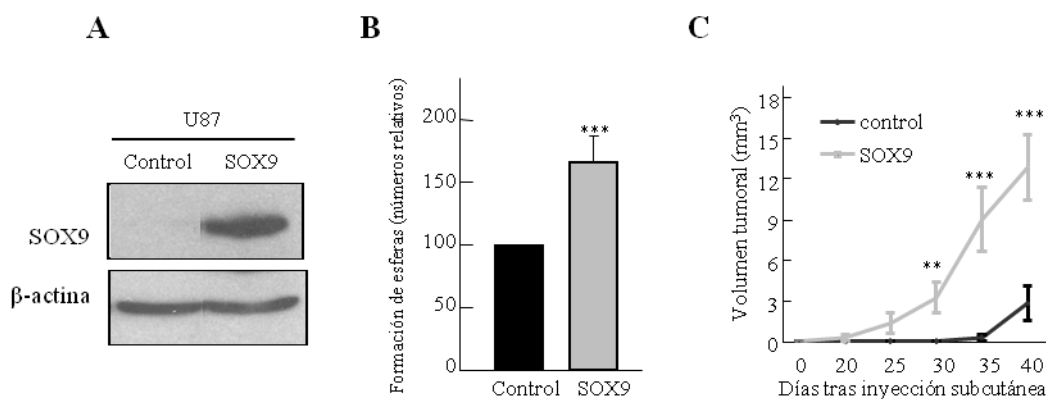


Figura 8. El incremento ectópico de SOX9 incrementa la capacidad de autorrenovación y aumenta la tumorigenicidad. (A) Western blot representativo de los niveles de SOX9 en las células U87 control y con sobreexpresión ectópica de SOX9. (B) Cuantificación relativa de la capacidad de formación de esferas en la línea U87 SOX9+ en comparación con las línea U87 control (n=4). (C) Registro del tamaño de los tumores generados tras la inyección subcutánea de las células control y SOX9+ en ratones *nude* a los tiempos indicados (n=6). La significancia estadística se obtuvo con el test *T* de Student ($P \leq 0,05^*$; $P \leq 0,01^{**}$; $P \leq 0,001^{***}$).

SOX2 y quimiorresistencia

SOX2 induce quimiorresistencia a la TMZ en GBM

Dada la implicación de las GSC en la quimiorresistencia a fármacos, y nuestros datos, que indican la asociación de los factores SOX2 y SOX9 con la actividad de las GSC, se planteó la hipótesis de que SOX2 y SOX9 podrían mediar la resistencia a TMZ. En primer lugar las líneas U87 y U251 fueron sometidas a tratamientos de 24 horas con dosis crecientes de TMZ, para posteriormente analizar la expresión de SOX2 y SOX9. Se comprobó que tanto SOX2 como SOX9 incrementaban su expresión entre 1,5 y 2,5 veces a 100µM y 200µM de TMZ, (Figura 9A), sugiriendo que este eje podría estar implicado en la resistencia a la actual

quimioterapia para el GBM. Con el objetivo de comprobar esta teoría se aplicó un tratamiento de TMZ a 100 μ M y 200 μ M durante 72 horas a un grupo de células de glioma, para posteriormente medir su viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. La toxicidad celular del fármaco en las líneas U373 y U251, con mayores niveles basales de SOX2 y SOX9, no excedía el 15% en ninguno de los casos, mientras que en las líneas U87 y A172, con niveles bajos de SOX2/SOX9, la toxicidad se encontraba entre el 30% y el 50% (Figura 9B). Es destacable el hecho de que las dos líneas celulares con elevados niveles de SOX2 y SOX9 sean más resistentes al tratamiento que aquellas cuyos niveles basales son bajos, un dato que sugiere que estos dos factores están implicados en mayor resistencia a fármacos.

Para reforzar esta hipótesis, células donde hemos manipulado genéticamente la expresión de SOX2 fueron sometidas a tratamientos de 72 horas con TMZ, usando 100 μ M, 250 μ M y 500 μ M de fármaco. En células U87 con sobreexpresión ectópica de SOX2, estos ensayos mostraron que la viabilidad celular aumentaba en comparación con la condición control (entre un 7-23% de aumento), una viabilidad que además era dosis-dependiente (Figura 9C). Cuando el tratamiento era aplicado a células U251 *shSOX2*, por el contrario, las células presentaban una supervivencia 15% menor que la condición control (Figura 9D). También se comprobó que el aumento de SOX2 por restauración ectópica de SOX9 proporcionaba resistencia al fármaco, pues las células *shSOX2* con sobreexpresión de SOX9 mostraban una supervivencia 35% superior al tratamiento que las células *shSOX2* (Figura 9E).

Estos datos en conjunto indicarían que SOX2 modula la resistencia a TMZ mediante regulación de la expresión de SOX9.

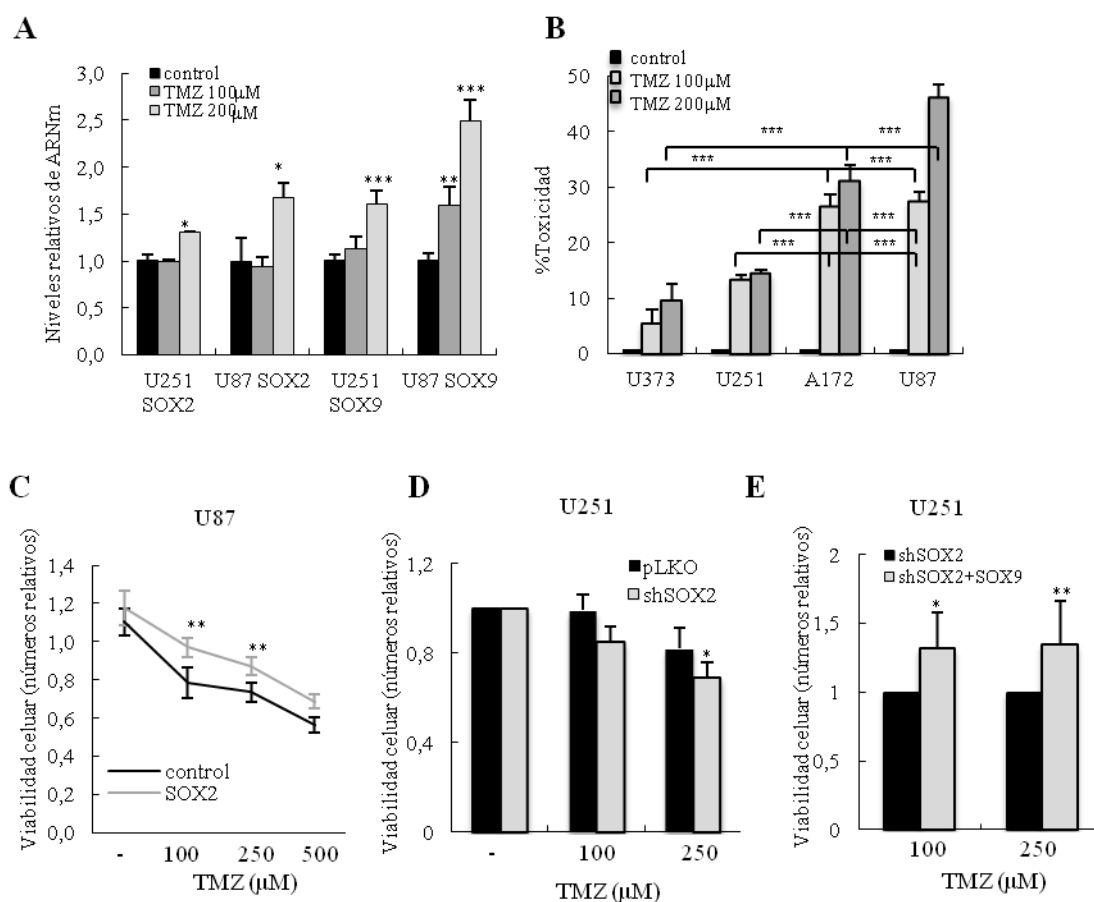


Figura 9. SOX2 media en la quimiorresistencia a TMZ. (A) Expresión de SOX2 y SOX9 en líneas U87 y U251 tras tratamientos de 24 horas y con diferentes dosis de TMZ (100μM y 200μM) mediante qRT-PCR (n=3). Los datos fueron normalizados respecto a la expresión de GAPDH y relativizados respecto a la condición control con DMSO. (B) Porcentaje de toxicidad celular analizado por ensayo MTT en un conjunto de células de glioma tras tratamientos de 72 horas con distintas dosis de TMZ (100μM y 200μM) (n=6). (C) Viabilidad celular de la línea U87 control y con SOX2 ectópico en respuesta a diferentes dosis de TMZ (100μM, 250μM y 500μM) tras 72 horas de tratamiento (n=3). (D-E) Viabilidad celular de la línea U251 control, con silenciamiento de SOX2 (D; n=5) y shSOX2 con re-expresión ectópica de SOX9 (E; n=3) tras 72 horas de tratamiento con dosis crecientes de TMZ (100μM y 250μM). La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($P \leq 0,05^*$; $P \leq 0,01^{**}$; $P \leq 0,001^{***}$).

El tratamiento con ciclopamina reduce los niveles de SOX2-SOX9 pero no incrementa la sensibilidad de las células a TMZ

La ruta Shh se encuentra activa en tumores cerebrales (Ulasov *et al.*, 2011), y se ha demostrado que el tratamiento con ciclopamina reduce la formación y proliferación de GSC y aumenta la apoptosis de las mismas (Clement *et al.*, 2007), además de inhibir el crecimiento de las líneas celulares convencionales de glioma (Bar *et al.*, 2007) y reducir los niveles de

expresión de SOX2 (Clement *et al.*, 2007). Inicialmente se trató la línea U251, de niveles basales altos de SOX2, con ciclopamina. Se comprobó que este agente, tras un tratamiento de 48 horas a 5µM, reducía los niveles de los factores SOX2 y SOX9 (Figura 10A), un resultado determinado por western blot. Los niveles de ARNm de SOX2 y SOX9 también se veían disminuidos entre un 20 y un 80% tras 24 y 48 horas de tratamiento con dosis crecientes de este agente (Figura 10B-C), por lo que se procedió a la realización de tratamientos, tanto aislados como combinados, en las líneas celulares.

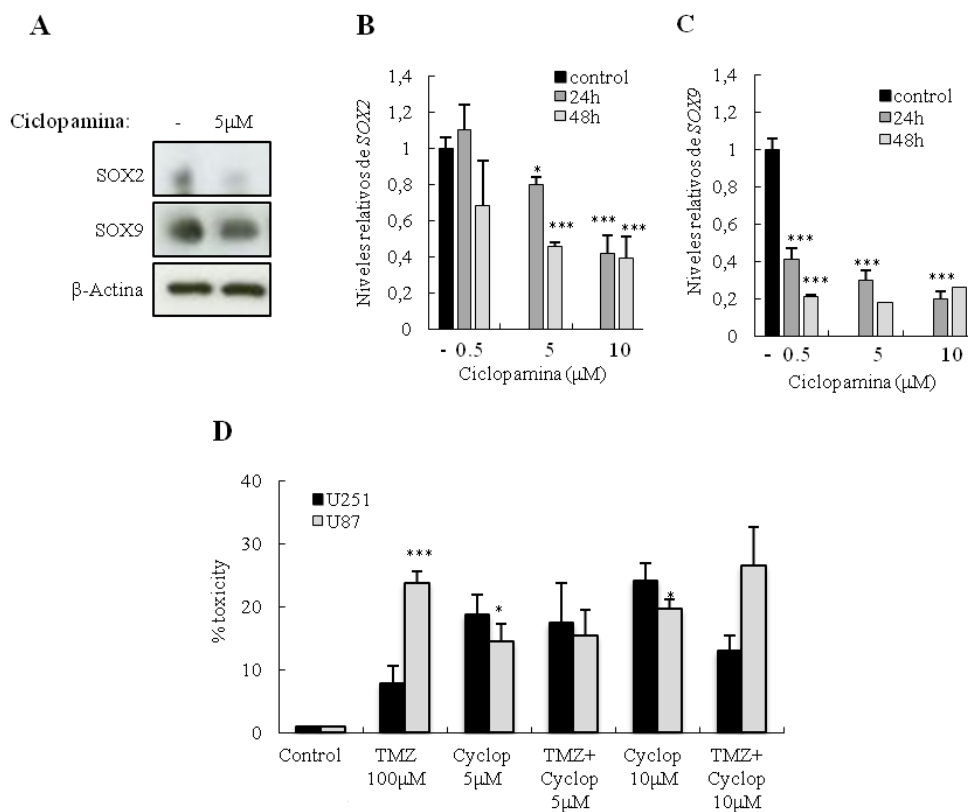


Figura 10. La ciclopamina reduce los niveles de SOX2 pero no incrementa la sensibilidad a TMZ. (A) Western blot representativo del efecto de la ciclopamina sobre los niveles de SOX2 y SOX9 en la línea U251 tras 48 horas de tratamiento con 5µM de fármaco. (B-C) Niveles de SOX2 (B; n=3) y SOX9 (C; n=3) en la línea U251 tras el tratamiento con ciclopamina a dosis crecientes (5µM y 10µM) y durante 24 y 48 horas, determinado por qRT-PCR. Los datos fueron normalizados respecto a la expresión de GAPDH y relativizados respecto a la condición control sin tratamiento. (D) Porcentaje de toxicidad frente a tratamientos de 72 horas con TMZ (100µM), ciclopamina (5µM y 10µM) y combinación de ambos en las líneas U251 y U87 (n=5). La significancia estadística se obtuvo con el test *T* de Student ($P \leq 0,05^*$; $P \leq 0,01^{**}$; $P \leq 0,001^{***}$).

Los ensayos se llevaron a cabo en las líneas U87 y U251, usando una dosis de 100 μ M de TMZ, y de 5 μ M y 10 μ M de ciclopamina. En el caso de la aplicación aislada de ciclopamina pudimos observar que su efecto citotóxico a 5 μ M y 10 μ M era mayor sobre la línea U251 (18% y 24% respectivamente) que el efecto de la propia TMZ (menor del 10%). No ocurría lo mismo en el caso de la línea U87, en la que los niveles de toxicidad de la TMZ rondaban el 25% mientras que los de la ciclopamina a 5 μ M y 10 μ M rondaban los 14% y 19% respectivamente. Es notable el hecho de que la línea U251, aunque más resistente a TMZ, sea más sensible a la ciclopamina que la línea U87 a las mismas concentraciones de fármaco. A pesar de ello, la combinación de ambos agentes quimioterápicos, realizada mediante la combinación de una dosis constante de 100 μ M de TMZ combinada con dosis de 5 μ M y 10 μ M de ciclopamina, no parece ejercer ningún efecto beneficioso o sinérgico a la toxicidad celular cuando se comparan con los tratamientos individuales (Figura 10D).

La inhibición farmacológica y genética de mTOR disminuye los niveles de SOX2-SOX9

Se ha comprobado que la rapamicina afecta a la viabilidad y proliferación de las células de glioma, e inhibe la expresión de SOX2 para reprogramación celular (*Wang et al., 2013; Pachow et al., 2014*). Con estos datos se decidió cultivar la línea U251, con elevados niveles basales de SOX2, en presencia de dosis crecientes de rapamicina durante 24 horas. Mediante western blot y qRT-PCR pudimos comprobar que la rapamicina inhibía SOX2 en la línea U251 (Figura 11). Apoyando nuestra idea de que SOX2 y SOX9 se encuentran en el mismo eje, los niveles de expresión de SOX9 también disminuían (Figura 11A-B). En los dos casos, la disminución de los niveles de los factores era dosis-dependiente, además de observarse también un efecto dependiente del tiempo (Figura 11C).

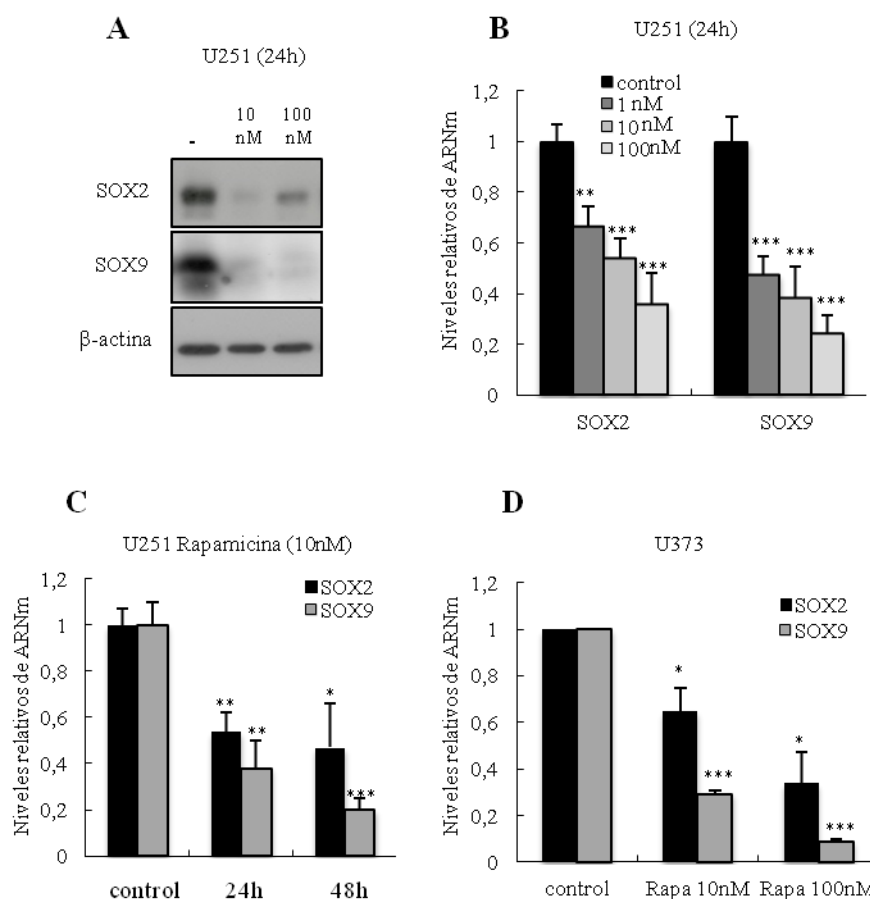


Figura 11. La rapamicina disminuye los niveles de SOX2 de manera dosis y tiempo dependiente en las líneas U251 y U373. (A) Western blot representativo del efecto de tratamientos de 24 horas con rapamicina a 10nM y 100nM sobre los niveles de SOX2 y SOX9 en la línea U251. (B) Expresión relativa de los niveles de SOX2 y SOX9 en respuesta a tratamientos de 24 horas con dosis crecientes de rapamicina (1nM, 10nM y 100nM) en la línea U251, determinados mediante qRT-PCR. (C) Niveles de SOX2 y SOX9 tras la aplicación de un tratamiento de rapamicina de 10nM a 24 y 48 horas en la línea U251, cuantificado por qRT-PCR. (D) Expresión de los niveles relativos de SOX2 y SOX9 tras tratamientos de 24 horas con diferentes dosis de rapamicina (10nM y 100nM) en la línea U373, por qRT-PCR (n=2). Todos los datos fueron normalizados respecto a la expresión de GAPDH y relativizados respecto a la condición control sin tratamiento. *La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($P \leq 0,05$ *; $P \leq 0,01$ **; $P \leq 0,001$ ***).*

Estos resultados se validaron en la línea U373, en la que mediante qRT-PCR también se observa disminución significativa dosis-dependiente de *SOX2* y *SOX9* (Figura 11D). Curiosamente, en ambos casos los niveles de *SOX9* disminuyen mucho más marcadamente que los de *SOX2*, lo que podría ser indicativo de que la rapamicina modula *SOX9* de manera independiente de *SOX2*.

Con el fin de comprobar si el efecto observado de la rapamicina sobre SOX2-SOX9 es debido al efecto de la inhibición directa de mTOR, se procedió a la inhibición genética de mTOR mediante el método del shRNA en la línea U251. Tras la infección lentiviral con el plásmido sh-mTOR se comprobó mediante qRT-PCR que los niveles de *mTOR* habían disminuido un 55% (Figura 12A), y que dianas bien establecidas y caracterizadas de mTOR, como P-S6k (forma activa de S6K) y P-Akt (forma activa de Akt), también veían claramente reducidos sus niveles. De forma similar, los niveles de proteína de SOX2 y SOX9 disminuían (Figura 12B). Este resultado indica que SOX2 y SOX9 son efectores de la vía de mTOR, corroborando los resultados obtenidos farmacológicamente con la aplicación de rapamicina. Se comprobó también qué papel juega esta vía de señalización en la actividad de las células de glioma. Células con disminución de mTOR mostraban una drástica reducción de la proliferación (4 veces menor) y capacidad de formación de esferas (más de 9 veces menor) en comparación con las células U251 control (Figura 12C-D), lo que parece indicar que mTOR se encuentra implicado en la capacidad de autorrenovación y mantenimiento de las GSCs. Además, la inhibición de mTOR emula fenotípicamente los efectos de la inhibición de las proteínas SOX2-SOX9, lo que demostraría la interconexión que existe entre estos tres factores.

Visto el efecto que la reducción de mTOR tiene sobre SOX2, se decidió comprobar si a la inversa, SOX2 ejercía también algún efecto sobre mTOR, para poder determinar la existencia de algún tipo de retroalimentación que conecte ambos factores. Analizamos los niveles de mTOR en células en las que habíamos modificado la expresión SOX2. Comprobamos que en células U251 con silenciamiento de SOX2 los niveles de mTOR aumentaban un 30%; por el contrario, en células U87 con sobreexpresión de SOX2 se observaban niveles de ARNm de mTOR 30% menores (Figura 12E-F, n=3).

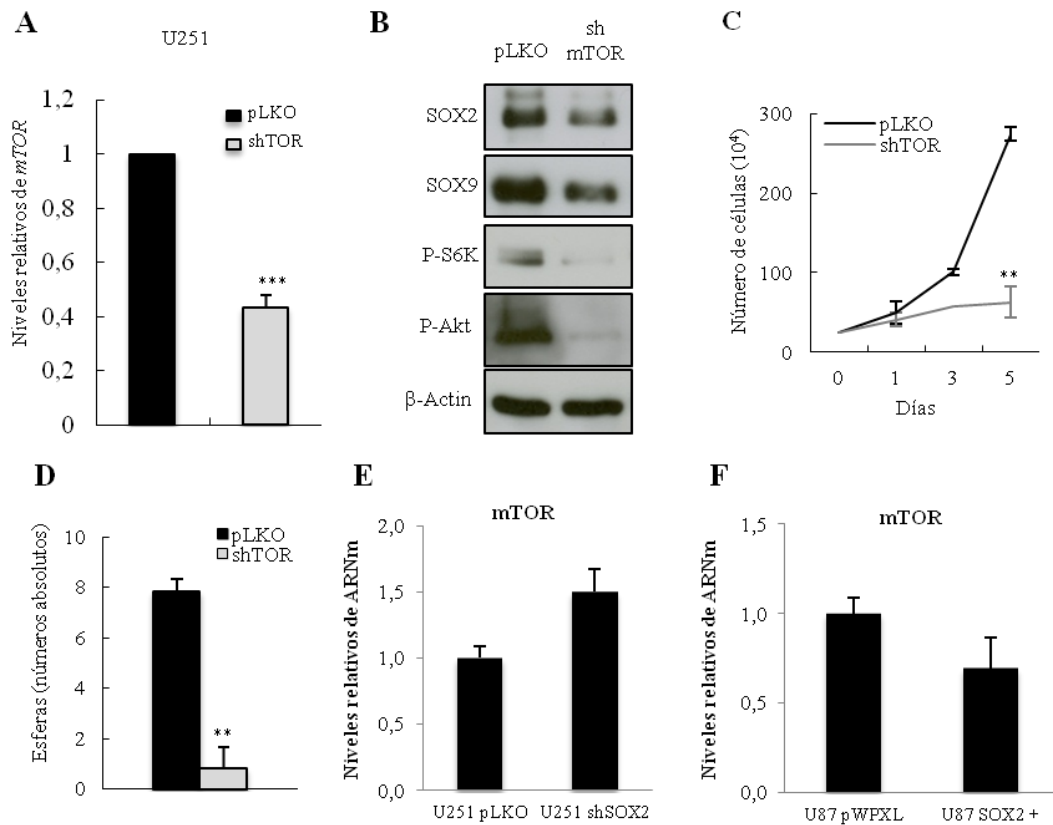


Figura 12. La inhibición genética de mTOR modula la expresión de SOX2-SOX9 y resulta en un fenotipo similar al de shSOX2. (A) Expresión relativa de mTOR en células U251 control y sh-mTOR determinada mediante qRT-PCR (n=2). (B) Western blot representativo de los niveles de SOX2, SOX9, P-S6K y P-Akt en células control y con silenciamiento de mTOR. (C) Cuantificación de la proliferación celular de las células control y con mTOR silenciado a los tiempos indicados (n=2). (D) Cuantificación de la capacidad de formación de esferas de las células sh-mTOR y células control (n=2). (E) Expresión relativa de mTOR en la línea U251 con silenciamiento de SOX2 mediante qRT-PCR (n=3). (F) Expresión relativa de los niveles de mTOR en la línea U87 con modulación positiva de SOX2 (n=3). Todos los datos de qRT-PCR fueron normalizados respecto a la expresión de GAPDH y relativizados respecto a la condición control. La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($P \leq 0,05^*$; $P \leq 0,01^{**}$; $P \leq 0,001^{***}$).

El tratamiento con rapamicina produce una sinergia en la citotoxicidad celular en combinación con TMZ en líneas con niveles elevados de SOX2, tanto *in vitro* como *in vivo*

Observada la reducción de los niveles de SOX2-SOX9 en respuesta a tratamientos con rapamicina, se procedió a la realización de ensayos de viabilidad celular de TMZ en combinación con este fármaco. Se comprobó que aunque la línea U87 era más sensible a los tratamientos individuales de TMZ y rapamicina, especialmente frente a este último; la

combinación de ambos no parece presentar mayor efecto citotóxico. Sin embargo, la línea U251, más resistente a TMZ que a rapamicina 1nM y 10nM (alrededor del 8% vs 25% y 30% respectivamente), aumentaba su sensibilidad a la combinación de ambos fármacos hasta casi el 60%, unos niveles muy superiores a los alcanzados por los tratamientos individuales (Figura 13A). Estos resultados sugieren mayor eficacia de esta combinación farmacológica en aquellos pacientes que presentan mayores niveles de SOX2 dentro del tumor.

También se quiso comparar el efecto que ejercía la combinación farmacológica sobre la expresión de SOX2 y SOX9. Células U251 fueron tratadas con TMZ 100 μ M, rapamicina 1nM y una combinación de ambas a las mismas concentraciones durante 72 horas y se midieron sus niveles de expresión mediante western blot. Los resultados demostraron que los niveles de ambos factores son menores en las condiciones en las que la rapamicina está incluida que en las células control o con únicamente TMZ (Figura 13B). Sorprendentemente, en el caso de la línea U87 tratada de la misma manera, la presencia de rapamicina incrementa los niveles de SOX9, un efecto favorecido aún más en el caso de la combinación de ambos fármacos (Figura 13C), lo que podría ser la causa de la resistencia de esta línea a la toxicidad de la combinación. También es digno de mención que tras el tratamiento con rapamicina, TMZ o ambas tanto en la línea U251 como U87 los niveles de expresión de mTOR se ven incrementados, siendo este aumento mayor en el caso del tratamiento combinado con TMZ (Figura 13C–D).

Para corroborar el efecto sinérgico de la combinación de rapamicina y TMZ en células con niveles basales elevados de SOX2 y SOX9, se procedió a la realización de un ensayo de formación de tumores *in vivo*. Se inyectaron células U251 de forma subcutánea en ratones atímicos inmunodeficientes; una semana más tarde se comenzaron a tratar intraperitonealmente con TMZ (10mg/kg), rapamicina (5mg/kg) y una combinación de TMZ y rapamicina (10mg/kg-5mg/kg respectivamente) dos veces por semana. Los ratones del grupo control, los cuales no recibieron tratamiento alguno, comenzaron a presentar tumores 30-40 días después de la inyección de las células y a los dos meses post-inyección el 100% de los ratones había desarrollado tumores. Sin embargo, los ratones sometidos al tratamiento de rapamicina o TMZ

mostraron una generación de tumores retrasada y reducida, siendo únicamente el 50% de los ratones los que presentaban tumores a los 2 meses. Estos números eran incluso menores en los ratones sometidos al tratamiento combinado, en el que únicamente el 25% generaron tumores a los dos meses desde el inicio del ensayo (Figura 13E).

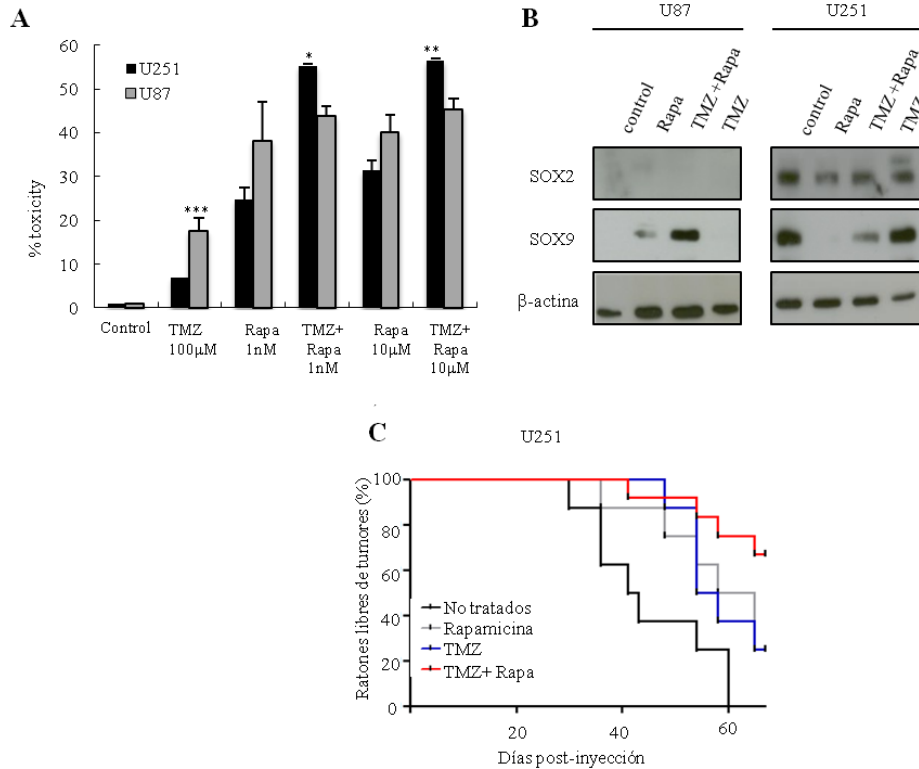


Figura 13. La combinación de TMZ y rapamicina incrementa la toxicidad del tratamiento en la línea U251 y reduce la formación tumoral. (A) Porcentaje de toxicidad frente a tratamientos de 72 horas con TMZ (100µM), rapamicina (1nM y 10nM) y combinación de ambos en las líneas U251 y U87 (n=3). (B) Niveles de proteína mediante western blot de SOX2 y SOX9 en las líneas U87 y U251 tras tratamientos de 72 horas con dosis de rapamicina 1nM, TMZ 100µM y combinación de ambas. (C) Curva de Kaplan-Meier mostrando la generación de tumores a partir de la línea U251 inyectada de forma subcutánea tras 12 semanas de tratamiento con TMZ (10mg/Kg; n=8), rapamicina (5mg/Kg; n=8) y la combinación de ambos (10mg/Kg u 5mg/Kg respectivamente; n=12). Como control se utilizaron ratones no tratados (n=8). El test LogRank es 0,0323 para TMZ, 0,040 para rapamicina y 0,0003 para la combinación de fármacos, comparado con los no tratados. *La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student (P≤0,05*; P≤0,01**; P≤0,001***).*

Todos estos datos analizados en conjunto demuestran que un tratamiento conjugado de rapamicina con TMZ incrementa el efecto citotóxico de esta última contra las células de glioma, especialmente en células que presentan mayores niveles de SOX2 y SOX9.

Discusión

Estudios previos han relacionado elevados niveles del factor de transcripción SOX2 (Annovazzi *et al.*, 2011) y SOX9 (Wang *et al.*, 2012) con el glioblastoma, pero siempre de forma independiente. Por primera vez se ha analizado la relación existente entre ellos dentro de este tipo de cáncer. Nuestros estudios realizados en una cohorte de 27 pacientes del Hospital Donostia (OSI Donostialdea) de San Sebastián, demuestran que estos dos factores se encuentran directamente correlacionados en el glioblastoma, siendo predominantes los casos en los que ambos factores se encuentran sobreexpresados. Analizando las líneas celulares de glioma se ha observado el mismo efecto, siendo aquellas líneas celulares con mayores niveles de SOX2 las que niveles más altos de SOX9 presentaban y viceversa, unos datos que refuerzan la correlación SOX2-SOX9. Como añadido, se ha estudiado la expresión de los factores SOX2 y SOX9 en la diferenciación de GSC, presumiblemente responsables del mantenimiento tumoral, y se comprobó que, en presencia de condiciones de diferenciación, la presencia de estos factores disminuye notablemente. Cuando las células diferenciadas son sometidas a condiciones selectivas para célula madre o medio *stem* expresan mayores niveles de SOX2 y SOX9. Estos datos demuestran que estos dos factores de transcripción correlacionan en el mantenimiento de las GSC.

Adicionalmente, *in vitro* se ha demostrado que el silenciamiento de SOX2 trae consigo una reducción en la proliferación y en la capacidad tumorigénica de las células (Gangemi *et al.*, 2009). Nuestros estudios, además de confirmar esos efectos, han demostrado que la regulación negativa de SOX2 induce senescencia celular en células diferenciadas. Los estudios de Gangemi y colaboradores, sin embargo, no han observado este efecto cuando realizaban el silenciamiento de SOX2 en GSC derivadas de muestras humanas. Este efecto diferencial podría deberse a que SOX2 ejerce diferentes acciones dentro de heterogeneidad celular: por un lado, la ausencia de SOX2 en las GSC produciría diferenciación celular; por otro lado, en células ya diferenciadas, la inactivación de SOX2 favorecería la detención del ciclo celular por inducción de senescencia y/o apoptosis. Como refuerzo a la inducción de senescencia, también se ha observado un incremento de los niveles de IL1 α , una citoquina asociada al fenotipo senescente

(Orjalo *et al.*, 2009). Además, el aumento en fase G₁/G₀ y la disminución de células en fase S del ciclo celular parece reforzar el hecho de la entrada en senescencia de las células con niveles reducidos de SOX2. En cuanto a la sobreexpresión de SOX2 hemos comprobado que produce un aumento en la proliferación y una mayor capacidad de formación de esferas. Estos resultados, en conjunto con los de otras investigaciones que han demostrado que la sobreexpresión de SOX2 es responsable de un aumento de la capacidad de invasión y migración (Alonso *et al.*, 2011), indicarían que altos niveles de SOX2 podrían ser cruciales para el mantenimiento del fenotipo tumoral.

En muestras de pacientes de glioblastoma se ha corroborado la relación que existe entre SOX2-SOX9, una relación que se ha demostrado directa debido a los ensayos de silenciamiento e inducción de la expresión de SOX2: en aquellos casos en los que SOX2 era silenciado, los niveles de SOX9 disminuían, al igual que el potencial tumorigénico de las células; por otro lado, expresión ectópica de SOX2 deriva en una sobreexpresión de SOX9, además de mostrar un mayor fenotipo tumoral. También se ha comprobado cómo el rescate de la expresión de SOX9 en células previamente SOX2 silenciadas recupera parcialmente el fenotipo normal de las células. No obstante, esta reactivación no consigue recuperar los mismos valores que los observados en la condición control. Este hecho, tomado en conjunto con los datos de la modulación de SOX9 en respuesta a la sobreexpresión e inhibición de SOX2, podría ser indicativo de que la función oncogénica de SOX2 está, parcialmente al menos, mediada por SOX9, y que además existiría un ciclo de retroalimentación entre ambos factores. Este ciclo de retroalimentación podría estar mediado por miRNA145, pues se ha visto por un lado, que la inactivación de SOX2 induce la expresión de miRNA145 (Fang *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2009), mientras que este miRNA inhibe SOX9, actuando de esa forma como supresor tumoral (Rani *et al.*, 2013). Además, se ha descrito como en los tumores gliales miRNA145 se expresa en menor medida (Lee *et al.*, 2013). Dados los datos que describen como SOX2 se encuentra sobreexpresado en muestras de glioma, este hecho vendría a reforzar la idea de que miRNA145 y SOX2/SOX9 se encuentran inversamente relacionados y que tienen un efecto en la

progresión/agresividad tumoral. Nuestros resultados también resaltan que SOX2-SOX9 actúan secuencialmente en la regulación de las GSC, un dato respaldado por la literatura (*Bergsland et al., 2011*), emulando el mismo papel que juegan en las células madre neurales durante el desarrollo del SNC o en el mantenimiento de la homeostasis de dicho sistema (*Brazel et al., 2005; Pritchett et al., 2011*), e indican que SOX2 es un factor regulador indispensable de las GSC que, junto a SOX9, podría ser un importante eje molecular de la progresión y mantenimiento tumoral.

El conjunto de datos y evidencias obtenidos lleva a la conclusión de que un silenciamiento de los factores SOX2 y/o SOX9 conduce a una reducción de la proliferación y del potencial tumorigénico de las células de glioma, lo que podría ser la base para establecer posibles nuevas dianas terapéuticas que mejoren los tratamientos de este tipo de tumores. También induce a pensar que SOX2 y SOX9, actuando en el mismo eje, favorecen y ayudan a la progresión tumoral incrementando la proliferación y la capacidad de autorrenovación de las células de glioma.

El actual tratamiento quimioterápico contra el glioblastoma es la TMZ, un tratamiento que ha aumentado la supervivencia media de los pacientes desde 12 a 15 meses (*Stupp et al., 2005*). La eficacia del fármaco correlaciona con la presencia de MGMT, un enzima encargado de reparar el daño inducido por esta droga. Mayores niveles de MGMT inducen resistencia al tratamiento, mientras que un silenciamiento de ella, generalmente por metilación de su promotor, es indicativo de una mayor efectividad y citotoxicidad de la droga. Los resultados obtenidos durante esta tesis han demostrado que la línea U251 y U373 son más resistentes a la TMZ que las líneas U87 y A172. Curiosamente, las líneas más resistentes son aquellas mayores niveles basales de SOX2 presentan, al igual que su incremento resulta en una mayor quimiorresistencia y que su silenciamiento produce que la viabilidad celular frente a esta droga disminuya. Vistos estos datos y teniendo en cuenta que las células utilizadas en el laboratorio presentan una muy baja o nula expresión de MGMT, presumiblemente por metilación del promotor de este gen (*Costello et al., 1994; He et al., 2014; Lan et al., 2015; Niffterik et al.,*

2010; Perazzoli et al., 2015;), SOX2 podría ser propuesto como uno de los puntos clave en la resistencia de las células del glioblastoma a la TMZ y podría ser tomado como posible diana terapéutica con el fin de que disminuyendo sus niveles se incremente la efectividad del actual tratamiento que los pacientes reciben en este tipo de tumores.

Con la finalidad de encontrar fármacos ya aprobados u otras moléculas susceptibles de disminuir la expresión de SOX2, de forma directa o indirecta, encontramos que inhibidores de la cascada de señalización SHH, como la ciclopamina, e inhibidores de la cascada de PI3K/mTOR, como la rapamicina, reducen los niveles de SOX2 y de SOX9 de forma significativa, quedando estos reducidos entre el 40-80%. Este resultado indica que la reducción de los niveles de SOX2 es factible mediante efectores farmacológicos. Estas dos vías, curiosamente, se encuentran mutadas y sobre-activadas en el glioblastoma (Verhaak et al., 2010), y vemos que su inhibición farmacológica repercute directamente sobre los niveles de SOX2 y SOX9. Estos datos parecen sugerir que esas dos vías están implicadas en la alta expresión de ambos factores, afectando de esta manera al efecto que tienen éstas sobre la quimiorresistencia. Adicionalmente hemos comprobado que SOX2 también tiene efectos sobre la expresión de mTOR, mediador de la vía PI3K/Akt, que comentaremos más adelante.

A pesar de que la ciclopamina es efectiva a la hora de reducir los niveles de SOX2, y generar con ello un fenotipo más diferenciado (Gopinath et al., 2013), no vemos que esta disminución tenga, sin embargo, efecto sobre la resistencia a TMZ. Otros trabajos sí que han demostrado que la combinación de ciclopamina con TMZ tiene efectos aditivos o presenta un aumento de apoptosis, comprobado mediante cuantificación de células caspasa-3, un marcador apoptótico, y P-H3 positivas (Clement et al., 2007) en células procedentes de pacientes de glioblastoma y en la línea celular U87. Los tratamientos de los fármacos en el trabajo de Clement y colaboradores fueron mantenidos durante 7 días, lo que contrasta con la duración de los tratamientos de TMZ y ciclopamina en esta tesis (72 horas), además de que la dosis de TMZ usada en ese estudio es inferior a la utilizada en nuestro trabajo, por lo que el efecto sinérgico

que podría existir entre ambos fármacos, en nuestro caso, se vería enmascarado debido a la toxicidad que la propia TMZ presenta dentro del cultivo celular a tales dosis.

El efecto de la inhibición de mTOR por acción farmacológica o genética sobre los niveles de SOX2 ya se había descrito en otros tipos de cáncer: en el carcinoma hepatocelular han observado que al inhibir mTOR también se inhibe la expresión de SOX2 (*Wen et al., 2013*); en carcinoma de pulmón, tratamientos con rapamicina inhiben la expresión de SOX2 en esferas formadas a partir de la línea humana de carcinoma pulmonar A549, además de que la expresión ectópica de SOX2 en esa misma línea reduce la sensibilidad a rapamicina (*Xie et al., 2015*). Nuestros datos confirman que este mismo efecto ocurre también en el caso del glioblastoma, y confirma a mTOR como diana atractiva para la terapia.

Es interesante remarcar que la rapamicina parece disminuir los niveles endógenos de SOX9 en mayor medida que los de SOX2, lo que podría ser indicativo de que mTOR ejerce su acción a través de SOX9 (Diagrama 4). La expresión de S6K1, diana de mTOR, se ha asociado con la expresión de SOX9 (*Ismail, HM., 2012*), y otros estudios en la bibliografía demuestran el efecto de mTOR sobre SOX9: la inhibición de mTOR mediante rapamicina resulta en una condro-osteogénesis reducida en el condroblastoma por disminución de SOX9 (*Yang et al., 2013*), además de que por reducción de mTOR, gracias al tratamiento con rapamicina, se da una menor poliposis y progresión hacia la displasia reducida (*Hardiman et al., 2014*). Pero también podemos observar un efecto sobre los niveles de mTOR cuando modulamos SOX2: en células con silenciamiento de SOX2 se da un aumento de 1,5 veces de los niveles de mTOR; en el caso de la sobreexpresión ectópica del factor, los niveles de mTOR disminuyen. Esto podría deberse a que SOX2 es un regulador negativo de la transcripción de mTOR y a la relación que se ha propuesto anteriormente entre SOX9 y mTOR (Diagrama 4): cuando SOX2 se expresa mTOR resultaría inhibido; mTOR a su vez, al ser efector positivo de SOX9, cuando se viese inhibido se reducirían los niveles de SOX9 que, gracias a la relación que existe entre los dos factores, también disminuyen los niveles de SOX2. En la bibliografía se encuentran evidencias de la relación de la relación entre SOX2 y mTOR. En el adenocarcinoma colorrectal se ha

comprobado que SOX2 inhibe la ruta de mTOR (Liu et al., 2013); y en el carcinoma nasofaríngeo también se ha observado este mismo efecto (Yang et al., 2015). Además, se ha comprobado que durante la reprogramación celular para la formación de iPSCs, la expresión ectópica de SOX2 suprime radicalmente la expresión de mTOR, y promueve la autofagia (Wang et al., 2013). Estos datos en conjunto con los resultados obtenidos indican que podría existir algún tipo de interacción de este tipo entre ambos factores.

Nuestros resultados indican que la regulación de SOX2 y/o SOX9 afecta a la sensibilidad de las células de glioma frente a estos dos tratamientos: la reducción de SOX2 hace que las células sean más sensibles a los tratamientos, tanto a los que tienen como diana la ruta SHH como los que afectan a la ruta de PI3K.

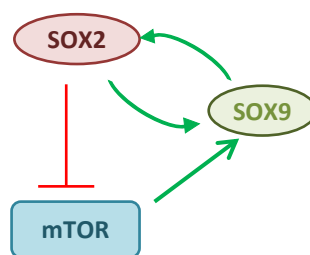


Diagrama 4. Representación de la posible interrelación entre SOX2, SOX9 y mTOR

Estudios recientes han silenciado SOX2 mediante vacunación de

péptidos (Favaro et al., 2014), y mediante inmunización frente a células tumorales con expresión elevada de SOX2 (Polakova et al., 2014). En ambos casos se ha visto reducido el crecimiento tumoral y/o se ha retrasado su aparición, lo que demuestra que SOX2 es una diana factible y accesible desde diferentes abordajes terapéuticos. Del mismo modo, también existen abundantes evidencias de que un mayor nivel de expresión de SOX2 proporciona resistencia a determinados fármacos. En el caso del GBM se ha comprobado que menores niveles de expresión de SOX2 hacen que las células sean más sensibles a tratamientos de inhibición de PDGFR e IGF1R (Hägerstrand et al., 2011); en meduloblastoma se han asociado elevados niveles de SOX2 con resistencia a inhibidores de la ruta Shh como dactinomicina, mithramicina y ciclopamina (Vanner et al., 2014), y en relación a otros tipos de cáncer, la alta expresión de SOX2 se asocia con quimiorresistencia al cisplatino en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, HNSCC (Lee et al., 2014), al tamoxifeno en el caso del cáncer de mama (Piva et al., 2013), o al paclitaxel en el caso de cáncer de ovario (Li et al., 2015).

Hanahan y Weinberg ya anticiparon en su trabajo del 2011 (Hanahan, D & Weinberg, R, 2011) que la combinación de diferentes fármacos para inhibir simultáneamente distintas rutas

alteradas en las células cancerígenas podría derivar en terapias más efectivas y duraderas contra el cáncer, y de hecho, la combinación de diferentes fármacos es una estrategia que se ha demostrado eficaz en ciertos casos *in vitro* (Friedman *et al.*, 2000; Happold *et al.*, 2014). Por ello puede ser importante realizar esfuerzos en encontrar combinaciones que puedan resultar en una mayor eficacia del tratamiento y mejor supervivencia de los pacientes. En este ensayo se ha demostrado que en líneas con niveles elevados de los factores SOX2-SOX9 la combinación de TMZ con rapamicina produce niveles de toxicidad significativamente mayores que los producidos por únicamente un solo fármaco de forma individual. Estos resultados, además, se han obtenido tanto *in vitro* como *in vivo*, donde la aparición de tumores en ratones tratados con ambos tratamientos ha sido más tardía y menos prolífica que en las condiciones control y de tratamientos individuales. La adición de rapamicina al tratamiento convencional con TMZ para pacientes con elevados niveles endógenos de SOX2 y SOX9 parece ser una forma de incrementar la eficacia de la quimioterapia y mejorar las expectativas clínicas de las terapias actuales. Tras los tratamientos con los fármacos rapamicina, TMZ o ambos los niveles de expresión de ARNm de *mTOR* en las líneas U251 y U87 aumentan, siendo éste mayor en el caso de la aplicación combinada de agentes quimioterápicos. Este aumento se puede deber a que dada la inhibición de los complejos mTOR por parte de rapamicina y/o TMZ, se generaran mayores niveles de ARNm de mTOR con el fin de intentar sobreponerse a ese efecto farmacológico.

Tras los resultados obtenidos podemos concluir que la expresión de SOX2-SOX9 puede ser inhibida farmacológicamente mediante la inhibición de mTOR con rapamicina, pudiendo ser factible un tratamiento previo de este fármaco con el fin de reducir SOX2 y SOX9 y sensibilizar de esa forma las GSC tumorales frente al tratamiento con TMZ. Los intentos de llevar a la clínica el tratamiento con rapamicina y sus análogos han sido variados y no siempre efectivos. Los primeros ensayos clínicos que se realizaron con inhibidores de mTOR (temsirolimus) en glioblastoma mostraban que la tolerancia al fármaco era buena pero que este compuesto no mostraba eficacia suficiente como para continuar los ensayos con él como único agente

farmacológico (*Chang et al., 2005*). La combinación de rapálogos como everolimus con fármacos como gefitinib (inhibidor de EGFR) tampoco mostraron beneficios a nivel global, pero sí dejaban entrever eficacia en un subgrupo de pacientes con niveles de mTOR elevados dentro del tumor (*Kreisl et al., 2008*). Posteriores ensayos en fase I han demostrado que la combinación de everolimus con TMZ y radiación, a pesar de incrementar el riesgo de infección, es bien tolerada y de una toxicidad aceptable para pacientes de glioblastoma, además de mostrar actividad metabólica, por lo que recomiendan pasar a ensayos de fase II (*Sarkaria et al., 2011*). En GBM recurrente, ensayos en fase I de sirolimus en combinación con vandetanib (inhibidor de EGFR y VEGFR2) muestran que se incrementa la supervivencia libre de progresión tumoral, además de no presentar elevada toxicidad, por lo que lo consideran aceptable para fase II (*Chheda et al., 2015*). Actualmente se están llevando a cabo ensayos en fase II de un inhibidor dual de mTORC1 y mTORC2, el CC-223, pues los ensayos de fase I han demostrado su seguridad y evidencias de actividad clínica (*Bendell et al., 2015*).

En ensayos clínicos con otros tumores también se ha visto que análogos de la rapamicina presentan beneficios. En el caso del sarcoma, tratamientos con ridaforolimus han demostrado que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, además de no generar toxicidad en exceso y ser bien tolerado, y es capaz de aumentar la supervivencia media, por lo que parece un buen candidato para continuar con los ensayos de fase II con pacientes que presumiblemente respondan bien al tratamiento (aquellos con elevados niveles de pS6K intratumorales) (*Reardon et al., 2012*). En astrocitomas subependimales de células gigantes se ha visto que el everolimus (ensayos en fase III) produce una reducción del volumen tumoral además de un aumento en el tiempo de progresión del tumor y de reducir la comorbilidad con lesiones de piel y aparición de tumores renales (*Franz et al., 2013*). En cáncer de mama metastático, un reciente ensayo de fase III de la combinación de everolimus y exemestano (inhibidor de aromatasas) ha demostrado una diferencia significativa en la supervivencia libre de progresión a las 6 semanas (*Reardon et al., 2012*).

A pesar de que los resultados de los ensayos clínicos hasta la fecha no hayan sido totalmente eficaces en GBM, muestran evidencias de que el uso de rapálogos, tanto solos como con otros agente quimioterápicos, puede ser una buena terapia, como están demostrando para otros tipos de cáncer. Los datos aquí presentados, junto con otros datos presentes en la bibliografía (*Burckel et al., 2015; Yu et al., 2015; Prasad et al., 2011; Sarkaria et al., 2011*) muestran la eficacia de la inhibición de mTOR junto con el tratamiento con TMZ en la supresión tumoral del GBM, más concretamente en el caso en el que SOX2 y SOX9 presentan niveles elevados. Por ello sería conveniente focalizar este tipo de terapia en aquellos pacientes cuyas biopsias presentan altos niveles de expresión de SOX2 y SOX9, consiguiendo que estos resultados puedan derivar en un tratamiento eficaz para al menos un subgrupo de pacientes, aumentando su esperanza y calidad de vida, y avanzando de esta forma en la gran batalla que es la lucha contra el cáncer.

Conclusiones

1. El factor de transcripción SOX2 se encuentra sobreexpresado en muestras de pacientes de GBM y su expresión se correlaciona con la expresión de SOX9.
2. SOX2 es un factor clave en el mantenimiento de las características de células madre de las GSCs, donde correlaciona también con SOX9.
3. La inhibición de SOX2 trae consigo una reducción de los niveles de SOX9, menor proliferación y arresto del ciclo celular en G₁/G₀, además de disminuir la capacidad de autorrenovación y producir un aumento de senescencia.
4. La re-expresión de SOX9 en células con SOX2 previamente silenciado recupera parcialmente el fenotipo tumoral, indicando que la función oncogénica de SOX2 está regulada, parcialmente al menos, por SOX9.
5. La sobreexpresión ectópica de SOX2 produce un incremento en la expresión de SOX9, aumenta los niveles de proliferación celular y la capacidad de formación de esferas.
6. SOX2 media en la quimiorresistencia frente a TMZ en GBM.
7. La adición de ciclopamina al tratamiento con TMZ, a pesar de reducir los niveles de SOX2 de forma tiempo y dosis-dependiente, no afecta a la sensibilidad de las células frente a la TMZ.
8. El silenciamiento farmacológico y genético de mTOR produce una reducción en los niveles de expresión de SOX2 y SOX9 de forma tiempo y dosis-dependiente y reproduce el fenotipo resultante al del silenciamiento de SOX2.
9. La adición de rapamicina al tratamiento con TMZ *in vitro* aumenta la citotoxicidad de éste en células donde SOX2 tiene niveles basales de expresión elevados.
10. Tratamientos combinados de TMZ y rapamicina *in vivo* en células con niveles endógenos altos de SOX2 y SOX9 resultan en una menor y más tardía aparición de tumores.

Bibliografía

- Agha, C.A., Ibrahim, S., Hassan, A., Elias, D.A. and Fathallah-Shaykh, H.M . (2010). Bevacizumab is active as a single Agent Against Recurrent Malignant Gliomas. *Anticancer Res* 30(2), pp. 609-611.
- Alonso, M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Urquiza, L., Jauregi, P., de Munain, A., Sampron, N., Aramburu, A., Tejada-Solís, S., Vicente, C., Odero, M., Bandrés, E., García-Foncillas, J., Idoate, M., Lang, F., Fueyo, J. and Gomez-Manzano, C. (2011). Genetic and Epigenetic Modifications of Sox2 Contribute to the Invasive Phenotype of Malignant Gliomas. *PLoS ONE*, 6(11), p.e26740.
- Annovazzi, L., Mellai, M., Caldera, V., Valente, G. and Schiffer, D. (2011). SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics*, 8(3), pp.139-47.
- Arcella, A., Biagioni, F., Antonietta Oliva, M., Bucci, D., Frati, A., Esposito, V., Cantore, G., Giangaspero, F. and Fornai, F. (2013). Rapamycin inhibits the growth of glioblastoma. *Brain Research*, 1495, pp.37-51.
- Avilion, A. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*, 17(1), pp.126-140.
- Badis, G., Berger, M., Philippakis, A., Talukder, S., Gehrke, A., Jaeger, S., Chan, E., Metzler, G., Vedenki, A., Chen, X., Kuznetsov, H., Wang, C., Coburn, D., Newburger, D., Morris, Q., Hughes, T. and Bulyk, M. (2009). Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science*. 324(5935), pp. 1720-3.
- Bar, E., Chaudhry, A., Lin, A., Fan, X., Schreck, K., Matsui, W., Piccirillo, S., Vescovi, A., DiMeco, F., Olivi, A. and Eberhart, C. (2007). Cyclopamine-Mediated Hedgehog Pathway Inhibition Depletes Stem-Like Cancer Cells in Glioblastoma. *Stem Cells*, 25(10), pp.2524-2533.
- Barrionuevo, F., Bagheri-Fam, S., Klattig, J., Kist, R., Taketo, M., Englert, C. and Scherer, G. (2006). Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY reversal in mice. *Biol Reprod*. 74(1), pp. 195-201.
- Ben-Porath, I., Thomson, M., Carey, V., Ge, R., Bell, G., Regev, A. and Weinberg, R.

- (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 40(5), pp.499-507.
- Bendell, J., Kelley, R., Shih, K., Grabowsky, J., Bergsland, E., Jones, S., Martin, T., Infante, J., Mischel, P., Matsutani, T., Xu, S., Wong, L., Liu, Y., Wu, X., Mortense, D., Chopra, R., Hege, K. and Munster, P. (2015). A Phase I Dose-Escalation Study to Assess Safety, Toxicity Pharmacokinetics, and Preliminary Efficacy of the Dual mTORC1/mTORC2 Kinase Inhibitor CC-223 in Patients With Advanced Solid Tumors or Multiple Myeloma. *Cancer*, 121(19), pp. 3481-90.
- Bergsland, M., Ramskold, D., Zaouter, C., Klum, S., Sandberg, R. and Muhr, J. (2011). Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes & Development*, 25(23), pp.2453-2464.
- Biernaskie, J., Paris, M., Morozova, O., Fagan, B., Marra, M., Pevny, L. and Miller, F. (2009). SKPs Derive from Hair Follicle Precursors and Exhibit Properties of Adult Dermal Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 5(6), pp.610-623.
- Bonavia, R., Inda, M., Cavenee, W. and Furnari, F. (2011). Heterogeneity Maintenance in Glioblastoma: A Social Network. *Cancer Research*, 71(12), pp.4055-4060.
- Boumahdi, S., Driessens, G., Lapouge, G., Rorive, S., Nassar, D., Le Mercier, M., Delatte, B., Caauwe, A., Lenglez, S., Nkusi, E., Brohée, S., Salmon, I., Dubois, C., Marmol, V., Fuks, F., Beck, B. and Blanpain, C. (2014). SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature*, 511(7508), pp.246-250.
- Brada, M., Judson, I., Beale, P., Moore, S., Reidenberg, P., Statkevich, P., Dugan, M., Batra, V. and Cutler, D. (1999). Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *Br J Cancer*, 81(6), pp.1022-1030.
- Brazel, C., Limke, T., Osborne, J., Miura, T., Cai, J., Pevny, L. and Rao, M. (2005). Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell*, 4(4), pp.197-207.
- Burckel, H., Josset, E., Denis, J., Gueulette, J., Slabbert, J., Noël, G. and Bischoff, P.

- (2015). Combination of the mTOR inhibitor RAD001 with temozolomide and radiation effectively inhibits the growth of glioblastoma cells in culture. *Oncol Rep*, 33(1), pp. 471-477.
- Carrasco-Garcia, E., Arrizabalaga, O., Serrano, M., Lovell-Badge, R. and Matheu, A. (2015). Increased gene dosage of Ink4/Arf and p53 delays age-associated central nervous system functional decline. *Aging Cell*, 14(4), pp.710-714.
- Chaffer, C., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A., Wiggins, P., Rodrigues, L., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., Arendt, L., Kuperwasser, C., Bieri, B. and Weinberg, R. (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), pp.7950-7955.
- Chang, S., Wen, P., Cloughesy, T., Greenberg, H., Schiff, D., Conrad, C., Fink, K., Robins, H., De Angelis, L., Raizer, J., Hess, K., Aldape, K., Lamborn, K., Kuhn, J., Dancey, J. and Prados, M. (2005). Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs*, 23(4), pp.357-361.
- Chen, J., Zheng, X., Brown, E. and Schreiber, S. (1995). Identification of an 11-kDa FKBP12- rapamycin- binding domain within the 289-kDa FKBP12- rapamycin - associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(11), pp.4947-4951.
- Cheung, M. and Briscoe, J. (2003). Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development*, 130(23), pp.5681-5693.
- Chheda, M., Wen, P., Hochberg, F., Chi, A., Drappatz, J., Eichler, A., Yang, D., Beroukhi, R., Norden, A., Gerstner, E., Betensky, R. and Batchelor, T. (2015). Vandetanib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma: results of a phase I and dose expansion cohort study. *J Neurooncol*. 121(3), pp. 627-34.
- Choudhry, Z., Rikani, A., Choudhry, A., Tariq, S., Zakaria, F., Asghar, M., Sarfraz, M., Haider, K., Shafiq, A. and Mobassarrah, N. (2014). Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *ANS*, 21(1), pp.28-31.
- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I. and Ruiz i Altaba, A. (2007). HEDGEHOG-GLI1 Signaling Regulates Human Glioma Growth, Cancer Stem

Cell Self-Renewal, and Tumorigenicity. *Current Biology*, 17(2), p.165-172.

Cloughesy, T., Yoshimoto, K., Nghiemphu, P., Brown, K., Dang, J., Zhu, S., Hsueh, T., Chen, Y., Wang, W., Younkin, D., Liau, L., Martin, N., Becker, D., Bergsneider, M., Lai, A., Green, R., Oglesby, T., Koletto, M., Trent, J., Horvath, S., Mischel, P., Mellinger, I. and Sawyer, C. (2008). Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med*, 5(1), pp. e8.

Costello, J., Futscher, B., Tano, K., Graunke, D. and Pieper, R. (1994). Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J Biol Chem*, 269(25), pp.17228-37.

de la Rocha, A., Sampron, N., Alonso, M. and Matheu, A. (2014). Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res*, 16;4(4), pp.312-24.

Deheeger, M., Lesniak, M.S. and Ahmed, A.U. (2014). Cellular plasticity regulated cancer stem cell niche: a possible new mechanism of chemoresistance. *Cancer Cell Microenviron*, 1(5).

Denny, B., Wheelhouse, R., Stevens, M., Tsang, L. and Slack, J. (1994). NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry*. 33(31), pp.9045-51.

Dimov, I., Visnjic, M. and Stefanovic, V. (2010). Urothelial Cancer Stem Cells. *The Scientific World Journal*. 10, pp. 1400-15.

Dowling, R., Topisirovic, I., Fonseca, B. and Sonenberg, N. (2010). Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(3), pp.433-439.

Dunn, M., Mercola, M. and Moore, D. (1995). Cyclopamine, a steroidal alkaloid, disrupts development of cranial neural crest cells in *Xenopus*. *Dev. Dyn.*, 202(3), pp.255-270.

- Duzgun, Z., Eroglu, Z. and Biray Avci, C. (2016). Role of mTOR in glioblastoma. *Gene*, 575(2), pp.187-190.
- Echelard, Y., Epstein, D., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. and McMahon, A. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7), pp.1417-1430.
- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V. and Jessell, T. (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 62, pp.451-66.
- Fang, X., Yoon, J., Li, L., Yu, W., Shao, J., Hua, D., Zheng, S., Hood, L., Goodlett, D., Foltz, G. and Lin, B. (2011). The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis. *BMC Genomics*, 12(1).
- Favaro, R., Appolloni, I., Pellegatta, S., Sanga, A., Pagella, P., Gambini, E., Pisati, F., Ottolenghi, S., Foti, M., Finocchiaro, G., Malatesta, P. and Nicolis, S. (2014). Sox2 Is Required to Maintain Cancer Stem Cells in a Mouse Model of High-Grade Oligodendroglioma. *Cancer Research*, 74(6), pp.1833-1844.
- Franz, D., Belousova, E., Sparagana, S., Bebin, E., Frost, M., Kuperman, R., Witt, O., Kohnman, M., Flamini, J., Wu, J., Curatolo, P., de Vries, P., Whittemore, V., Thiele, E., Ford, J., Shah, G., Cauwel, H., Lebwohl, D., Sahmoud, T. and Jozwiak, S. (2013). Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*, 381(9861), pp.125-132.
- Friedman, H., Kerby, T. and Calvert, H. (2000). Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research*, 6, pp.2585-2597.
- Furnari, F., Fenton, T., Bachoo, R., Mukasa, A., Stommel, J., Stegh, A., Hahn, W., Ligon, K., Louis, D., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. and Cavenee, W. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21(21), pp.2683-2710.

- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J., Behringer, R., Nakamura, T. and Uemoto, S. (2010). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature Genetics*, 43(1), pp.34-41.
- Galanis, E., Buckner, J.C., Maurer, M.J., Kreisberg, J.I., Ballman, K., Boni, J., Peralba, J.M., Jenkins, R.B., Dakhil, S.R., Morton, R.F., Jaeckle, K.A., Scheithauer, B.W., Dancey, J., Hidalgo, M. and Walsh, D.J. (2005). Phase II Trial of Temsirolimus (CCI-779) in recurrent Glioblastoma Multiforme: A North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol*. 23(23), pp. 5294-5304.
- Gandillet, A., Serrano, A., Pearson, S., Lie-A-ling, M., Lacaud, G. and Kouskoff, V. (2009). Sox27-sustained expression alters the balance between proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors at the onset of blood specification. *Blood*. 114(23), pp. 4812-22.
- Gangemi, R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M., Malatesta, P., Ravetti, G., Zona, G., Daga, A. and Corte, G. (2009). SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity. *Stem Cells*, 27(1), pp.40-48.
- Gao, J., Zhang, J., Li, Y. and Ren, F. (2015). Decreased expression of SOX9 indicates a better prognosis and inhibits the growth of glioma cells by inducing cell cycle arrest. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(9), pp.10130-8.
- Gopinath, S., Malla, R., Alapati, K., Gorantla, B., Gujrati, M., Dinh, D. and Rao, J. (2012). Cathepsin B and uPAR regulate self-renewal of glioma-initiating cells through GLI-regulated Sox2 and Bmi1 expression. *Carcinogenesis*, 34(3), pp.550-559.
- Grossman, R., Burger, P., Soudry, E., Tyler, B., Chaichana, K., Weingart, J., Olivi, A., Gallia, G., Sidransky, D., Quiñones-Hinojosa, A., Ye, X. and Brem, H. (2015). MGMT inactivation and clinical response in newly diagnosed GBM patients treated with Gliadel. *Journal of Clinical Neuroscience*, 22(12), pp.1938-1942.

- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346(6281), pp.245-250.
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zürcher-Härdi, U., Bell, G., Tam, W., Mani, S., van Oudenaarden, A. and Weinberg, R. (2012). Slug and Sox9 Cooperatively Determine the Mammary Stem Cell State. *Cell*, 148(5), pp.1015-1028.
- Guo, X., Xiong, L., Sun, T., Peng, R., Zou, L., Zhu, H., Zhang, J., Li, H. and Zhao, J. (2012). Expression features of SOX9 associate with tumor progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Pathology*, 7(1), p.44-50.
- Güre, A., Stockert, E., Scanlan, M., Keresztes, R., Jager, D., Altorki, N., Old, L. and Chen, Y. (2000). Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), pp.4198-4203.
- Hägerstrand, D., He, X., Bradic Lindh, M., Hoefs, S., Hesselager, G., Ostman, A. and Nister, M. (2011). Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile. *Neuro-Oncology*, 13(11), pp.1178-1191.
- Hambardzumyan, D., Squatrito, M., Carbajal, E. and Holland, E. (2008). Glioma Formation, Cancer Stem Cells, and Akt Signaling. *Stem Cell Rev*, 4(3), pp.203-210.
- Han, X., Fang, X., Lou, X., Hua, D., Ding, W., Foltz, G., Hood, L., Yuan, Y. and Lin, B. (2012). Silencing SOX2 Induced Mesenchymal-Epithelial Transition and Its Expression Predicts Liver and Lymph Node Metastasis of CRC Patients. *PLoS ONE*, 7(8), p.e41335.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646-674.
- Happold, C., Roth, P., Silginer, M., Florea, A., Lamszus, K., Frei, K., Deenen, R., Reifenberger, G. and Weller, M. (2014). Interferon- α Induces Loss of

- Spherogenicity and Overcomes Therapy Resistance of Glioblastoma Stem Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(4), pp.948-961.
- Hardiman, K., Liu, J., Feng, Y., Greenson, J. and Fearon, E. (2014). Rapamycin Inhibition of Polyposis and Progression to Dysplasia in a Mouse Model. *PLoS ONE*, 9(4), p.e96023.
- Harley, V., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res.* 22(8), pp. 1500-1.
- Hart, M.G., Grant, R., Garside, R., Rogers, G., Somerville, M., Stein, K. (2011). Chemotherapeutic wafers for High Grade Glioma. *Cochrane Database Syst Rev.* 16(3)
- Hattori, T., Muller, C., Gebhard, S., Bauer, E., Pausch, F., Schlund, B., Bosl, M., Hess, A., Surmann-Schmitt, C., von der Mark, H., de Crombrughe, B. and von der Mark, K. (2010). SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development*, 137(6), pp.901-911.
- He, W., Liu, R., Yang, S. and Yuan, F. (2015). Chemotherapeutic effect of tamoxifen on temozolomide-resistant gliomas. *Anti-Cancer Drugs*, 26(3), pp.293-300.
- Heddleston, J., Hitomi, M., Venere, M., A. Flavahan, W., Yang, K., Kim, Y., Minhas, S., N. Rich, J. and B. Hjelmeland, A. (2011). Glioma Stem Cell Maintenance: The Role of the Microenvironment. *CPD*, 17(23), pp.2386-2401.
- Herpers, R., van de Kamp, E., Duckers, H. and Schulte-Merker, S. (2008). Redundant roles of sox7 and sox18 in arteriovenous specification in zebrafish. *Circ Res.* 102(1), pp. 12-5.
- Hjelmeland, A., Wu, Q., Heddleston, J., Choudhary, G., MacSwords, J., Lathia, J., McLendon, R., Lindner, D., Sloan, A. and Rich, J. (2010). Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ*, 18(5), pp.829-840.
- Hussenet, T., Dali, S., Exinger, J., Monga, B., Jost, B., Denbelé, D., Martinet, N., Thibault, C., Huelsken, J., Brambilla, E. and du Manoir, S. (2010). SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous

cell carcinomas.. *PLoS One*. 5(1), e8960.

Incardona, J., Gaffield, W., Lange, Y., Cooney, A., Pentchev, P., Liu, S., Watson, J., Kapur, R. and Roelink, H. (2000). Cyclopamine Inhibition of Sonic Hedgehog Signal Transduction Is Not Mediated through Effects on Cholesterol Transport. *Developmental Biology*, 224(2), pp.440-452.

Inda, M., Bonavia, R., Mukasa, A., Narita, Y., Sah, D., Vandenberg, S., Brennan, C., Johns, T., Bachoo, R., Hadwiger, P., Tan, P., DePinho, R., Cavenee, W. and Furnari, F. (2010). Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes & Development*, 24(16), pp.1731-1745.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. and Guan, K. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, 4(9), pp.648-657.

Ismail, H. (2012). Overexpression of S6 Kinase 1 in Brain Tumours Is Associated with Induction of Hypoxia-Responsive Genes and Predicts Patients' Survival. *Journal of Oncology*, 2012, pp.1-10.

Jhawar-Uniyal, M., Albert, L., McKenna, E., Karsy, M., Rajdev, P., Braun, A. and Murali, R. (2011). Deciphering the signaling pathways of cancer stem cells of glioblastoma multiforme: Role of Akt/mTOR and MAPK pathways. *Adv Enzyme Regul.* 51, pp.164-170.

Jia, Y., Yang, Y., Liu, S., Herman, J., Lu F. and Guo, M. (2010). SOX17 antagonizes WNT/ β -catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Epigenetics*. 5(8), pp. 743-9.

Jo, A., Denduluri, S., Zhang, B., Wang, Z., Yin, L., Yan, Z., Kang, R., Shi, L., Mok, J., Lee, M. and Haydon, R. (2014). The versatile functions of Sox9 in development, stem cells and human diseases. *Genes Dis.* 1(2), pp. 149-161.

Johannessen, T., Wang, J., Skafnesmo, K., Sakariassen, P., Enger, P., Petersen, K., Øyan, A., Kalland, K., Bjerkvig, R. and Tysnes, B. (2008). Highly infiltrative brain tumours show reduced chemosensitivity associated with a stem cell-like phenotype. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, p.no-no.

- Kakumoto, K., Ikeda, J., Okada, M., Morii, E. and Oneyama, C. (2015). mLST8 Promotes mTOR-Mediated Tumor Progression. *PLOS ONE*, 10(4), p.e0119015.
- Kamachi, Y. and Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, 140(20), pp.4129-4144.
- Kang, P., Lee, H., Glasgow, S., Finley, M., Donti, T., Gaber, Z., Graham, B., Foster, A., Novitch, B., Gronostajski, R. and Deneen, B. (2012). Sox9 and NFIA Coordinate a Transcriptional Regulatory Cascade during the Initiation of Gliogenesis. *Neuron*, 74(1), pp.79-94.
- Kim, D., Sarbassov, D., Ali, S., King, J., Latek, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. (2002). mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell*, 110(2), pp.163-175.
- Khong, H. and Rosenberg, S. (2002). The Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10, is a novel tumor-associated antigen identified in a patient with a dramatic response to immunotherapy. *Cancer Res.* 62(11), pp. 3020-3.
- Kordes, U. and Hagel, C. (2006). Expression of SOX9 and SOX10 in central neuroepithelial tumor. *J Neurooncol.* 80(2), pp. 151-5.
- Kreisl, T., Lassman, A., Mischel, P., Rosen, N., Scher, N., Teruya-Feldstein, J., Shaffer, D., Lis, e. and Abrey, L. (2009). A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM). *J Neurooncol*, 92(1), pp. 99-105
- Kuo, C.J., Chung, J., Fiorentino, D.F., Flanagan, W.M., Blenis, J. and Crabtree, G.R. (1992). Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature Letters*, 358, pp.70-73
- Lan, F., Yang, Y., Han, J., Wu, Q., Yu, H. and Yue, X. (2015). Sulforaphane reverses chemo-resistance to temozolomide in glioblastoma cells by NF- κ B-dependent pathway downregulating MGMT expression. *Int J Oncol.*, 48, pp. 559-568
- Laplanche, M. and Sabatini, D. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell*, 149(2), pp.274-293.
- Lauro, G., Di Lorenzo, N., Grossi, M., Maleci, A. and Guidetti, B. (1986). Prostaglandin E2 as an immunomodulating factor released in vitro by human

- glioma cells. *Acta Neuropathologica*, 69(3-4), pp.278-282.
- Lee, H., Bier, A., Cazacu, S., Finniss, S., Xiang, C., Twito, H., Poisson, L., Mikkelsen, T., Slavin, S., Jacoby, E., Yalon, M., Toren, A., Rempel, S. and Brodie, C. (2013). MicroRNA-145 Is Downregulated in Glial Tumors and Regulates Glioma Cell Migration by Targeting Connective Tissue Growth Factor. *PLoS ONE*, 8(2), p.e54652.
- Lee, R., Zhao, Z. and Ingham, P. (2016). Hedgehog signalling. *Development*, 143(3), pp.367-372.
- Lee, S., Oh, S., Do, S., Lee, H., Kang, H., Rho, Y., Bae, W. and Lim, Y. (2014). SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 111(11), pp.2122-2130.
- Li, Y., Chen, K., Li, L., Li, R., Zhang, J. and Ren, W. (2015). Overexpression of SOX2 is involved in paclitaxel resistance of ovarian cancer via the PI3K/Akt pathway. *Tumor Biol.*, 36(12), pp.9823-9828.
- Liao, Y., Sun, Y., Chau, Y., Lai, T., Wang, J., Horng, J., Hsiao, M. and Tsou, A. (2008). Identification of SOX4 target genes using phylogenetic footprint-based prediction from expression microarrays suggests that overexpression of SOX4 potentiates metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 27(42), pp. 5578-89.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., ng, H., Abdulkadir, IR., Lu, L., Irvin, D., Black, K. and Yu, J. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*. 5, pp. 67
- Liu, H., Du, L., Wn, Z., Yang, Y., Li, J., Dong, Z., Zheng G., Wang L., Zhang, X. and Wang, C. (2013). Sex determining region Y-box 2 inhibits the proliferation of colorectal adenocarcinoma cells through the mTOR signaling pathway. *Int J Mol Med*. 32(1), pp. 59-66.
- Liu, H., Liu, Z., Jiang, B., Peng, R., Ma, Z. and Lu, J. (2015). SOX9 Overexpression Promotes Glioma Metastasis via Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cell Biochem Biophys*, 73(1), pp.205-212.
- Lopez-Rios, J., Duchesne, A., Speziale, D., Andrey, G., Peterson, K., Germann, P.,

- Ünal, E., Liu, J., Floriot, S., Barbey, S., Gallard, Y., Müller-Gerbl, M., Courtney, A., Klopp, C., Rodriguez, S., Ivanek, R., Beisel, C., Wicking, C., Iber, D., Robert, B., McMahon, A., Duboule, D. and Zeller, R. (2014). Attenuated sensing of SHH by Ptch1 underlies evolution of bovine limbs. *Nature*, 511(7507), pp.46-51.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W. and Kleihues, P. (2007). The 2007 Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*, 114, pp. 97-109.
- Lundberg, I., Löfgren Burström, A., Edin, S., Eklöf, V., Öberg, A., Stenling, R., Palmqvist, R. and Wikberg, M. (2014). SOX2 Expression Is Regulated by BRAF and Contributes to Poor Patient Prognosis in Colorectal Cancer. *PLoS ONE*, 9(7), p.e101957.
- Maiese K. (2015). Stem cell guidance through the mechanistic target of rapamycin. *World Journal of Stem cells*, 7(7), pp. 999-1009.
- Manoranjan, B., Venugopal, C., McFarlane, N., Doble, B., Dunn, S., Scheinemann, K. and Singh, S. (2012). Medulloblastoma stem cells: where development and cancer cross pathways. *Pediatr Res*, 71(4-2), pp.516-522.
- Martini, S., Bernoth, K., Main, H., Ortega, G., Lendahl, U., Just, U. and Schwanbeck, R. (2013). A critical role of SOX9 in notch-induced astrogliogenesis and stem cell maintenance. *Stem cells*. 31(4), pp. 741-51.
- Martorana, A., Zheng, G., Crowe, T., O'Grady, R. and Lyons, J. (1998). Epithelial cells up-regulate matrix metalloproteinases in cells within the same mammary carcinoma that have undergone an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 58(21), pp.4970-9.
- Matheu, A., Collado, M., Wise, C., Manterola, L., Cekaite, L., Tye, A., Canamero, M., Bujanda, L., Schedl, A., Cheah, K., Skotheim, R., Lothe, R., Lopez de Munain, A., Briscoe, J., Serrano, M. and Lovell-Badge, R. (2012). Oncogenicity of the Developmental Transcription Factor Sox9. *Cancer Research*, 72(5), pp.1301-1315.
- Norden, A.G., Young, G.S., Setayesh, K., Muzikansky, A., Klufas, R., Ross, G.L., Ciampa, A.S., Ebbeling, L.G., Levy, B., Drappatz, J., Kesari, S. and Wen, P.Y. (2008). Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and

- patterns of recurrence. *Neurology*, 70(10), pp. 779-87.
- Nowell, P.C. (1976). The Clonal Evolution of Tumor Cell Population. *Science*. 194(4260), pp. 23-8.
- Omuro, A., Faivre, S. and Raymond, E. (2007). Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(7), pp.1909-1919.
- Orjalo, A., Bhaumik, D., Gengler, B., Scott, G. and Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1 is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), pp.17031-17036.
- Oshiro, N., Yoshino, K., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J. and Yonezawa, K. (2004). Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes to Cells*, 9(4), pp.359-366.
- Ostermann, S. (2004). Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. *Clinical Cancer Research*, 10(11), pp.3728-3736.
- Otsubo, T., Akiyama, Y., Hashimoto, Y., Shimada, S., Goto K. and Yuasa, Y. (2011). MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis. *PLoS One*. 6(1), e16617.
- Pachow, D., Wick, W., Gutmann, D. and Mawrin, C. (2014). The mTOR signaling pathway as a treatment target for intracranial neoplasms. *Neuro-Oncology*, 17(2), pp.189-199.
- Parker, N., Khong, P., Parkinson, J., Howell, V. and Wheeler, H. (2015). Molecular Heterogeneity in Glioblastoma: Potential Clinical Implications. *Front. Oncol.*, 5, article 55.
- Patel, A.P., Tirosh, I., Trombetta, J.J., Shalek, A.K., Gillespie, S.M., Wakimoto, H., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Maruza, R.L., Louis, D.N., Rozenblatt-Rosen, O., Suvà, M.L., Regev, A. and Bernstein, B.E. (2014). Single-cell RNA-seq

- highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, 344(6190), pp. 1396-1401.
- Peñuelas, S., Anido, J., Prieto-Sánchez, R., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., García-Dorado, D., Poca, M., Sahuquillo, J., Baselga, J. and Seoane, J. (2009). TGF- β Increases Glioma-Initiating Cell Self-Renewal through the Induction of LIF in Human Glioblastoma. *Cancer Cell*, 15(4), pp.315-327.
- Perazzoli, G., Prados, J., Ortiz, R., Caba, O., Cabeza, L., Berdasco, M., González, B. and Melguizo, C. (2015). Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PLOS ONE*, 10(10), p.e0140131.
- Piva, M., Domenici, G., Iriando, O., Ráj̄bano, M., Simães, B., Comaills, V., Barredo, I., López-Ruiz, J., Zabalza, I., Kypta, R. and Vivanco, M. (2013). Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Molecular Medicine*, 6(1), pp.66-79.
- Poché, R., Furuta, Y., Chaboissier, M., Schedl, A. and Behringer, R. (2008). Sox9 is expressed in mouse multipotent retinal progenitor cells and functions in Müller Glial cell development. *The Journal of Comparative Neurology*, 510(3), pp.237-250.
- Polakova, I., Duskova, M. and Smahel, M. (2014). Antitumor DNA vaccination against the Sox2 transcription factor. *Int J Oncol.*, 45, pp.139-146.
- Prasad, G., Sottero, T., Yang, X., Mueller, S., James, C., Weiss, W., Polley, M., Ozawa, T., Berger, M., Aftab, D., Prados, M. and Haas-Kogan, D. (2011). Inhibition of PI3K/mTOR pathways in glioblastoma and implications for combination therapy with temozolomide. *Neuro-Oncology*, 13(4), pp.384-392.
- Pritchett, J., Athwal, V., Roberts, N., Hanley, N. and Hanley, K. (2011). Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: lessons from development. *Trends in Molecular Medicine*, 17(3), pp.166-174.
- Ragge, N., Lorenz, B., Scheneider, A., Bushby, K., de Sanctis, L., de Sanctis, U., Salt, A., Collin, J., Vivian, A., Free, S., Thompson, P., Williamson, K., Sisodiya, S., van Heyningen, V. and Fitzpatrick, D. (2005). SOX2 anophthalmia syndrome. *Am J*

- Med Genet A.* 135(1), pp. 1-7.
- Rani, S., Rathod, S., Karthik, S., Kaur, N., Muzumdar, D. and Shiras, A. (2013). MiR-145 functions as a tumor-suppressive RNA by targeting Sox9 and adducin 3 in human glioma cells. *Neuro-Oncology*, 15(10), pp.1302-1316.
- Rao, R., Calhoun, J., Qin, X., Rekaya, R., Clark, J. and Stice, S. (2004). Comparative transcriptional profiling of two human embryonic stem cell lines. *Biotechnol. Bioeng.*, 88(3), pp.273-286.
- Reardon, D. (2010). Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol.* 96(2), pp. 219-230
- Reardon, D., Wen, P., Yung, A., Berk, L., Narasimhan, N, Turner, C., Clackson, T., Rivera, V. and Vogelbaum, M. (2012). Ridaforolimus for patients with progressive or recurrent malignant glioma: a perisurgical, sequential, ascending-dose trial. *Cancer, Chemother Pharmacol*, 69(4), pp. 849-860.
- Reya, T., Morrison, S., Clarke, M. and Weissman, I. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), pp.105-11.
- Sami, A. and Karsy, M. (2013). Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in glioblastoma: novel therapeutic agents and advances in understanding. *Tumour Biol.* 34(4), pp. 1991-2002
- Sarbassov, D., Ali, S., Kim, D., Guertin, D., Latek, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14(14), pp. 1296-302.
- Sarbassov, D., Ali, S., Sengupta, S., Sheen, J., Hsu, P., Bagley, A., Markhard, A. and Sabatini, D. (2006). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, 22(2), pp.159-168.
- Sarkar, A. and Hochedlinger, K. (2013). The Sox Family of Transcription Factors: Versatile Regulators of Stem and Progenitor Cell Fate. *Cell Stem Cell*, 12(1), pp.15-30.
- Sarkaria, J., Galanis, E., Wu, W., Dietz, A., Kaufmann, T., Gustafson, M., Brown, P.,

- Uhm, J., Rao, R., Doyle, L., Giannini, C., Jaeckle, K. and Buckner, J. (2010). Combination of Temsirolimus (CCI-779) with Chemoradiation in Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme (GBM) (NCCTG trial N027D) Is Associated with Increased Infectious Risks. *Clinical Cancer Research*, 16(22), pp.5573-5580.
- Sarkaria, J., Galanis, E., Wu, W., Peller, P., Giannini, C., Brown, P., Uhm, J., McGraw, S., Jaeckle, K. and Buckner, J. (2011). NCCTG Phase I Trial N057K of Everolimus (RAD001) and Temozolomide in Combination with Radiation Therapy in Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81(2), pp. 468-475.
- Scott, C., Wynn, S., Sesay, A., Cruz, C., Cheung, M., Gaviro, M., Booth, S., Gao, B., Cheah, K., Lovell-Badge, R. and Briscoe, J. (2010). SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 13(10), pp.1181-1189.
- Sekido, R. and Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, 456(7223), pp.824-824.
- Sekulic, A., Hudson, C., Homme, J., Yin, P., Otterness, D., Karnitz, L. and Abraham, R. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res*, 60(13), pp.3504-13.
- Sinclair, A., Berta, P., Palmer, M., Hawkins, J., Griffiths, B., Smith, M., Foster, J., Frischauf, A., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), pp.240-244.
- Singh, S., Trevino, J., Bora-Singhal, N., Coppola, D., Haura, E., Altiok, S. and Chellappan, S. (2012). EGFR/Src/Akt signaling modulates SOX2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung carcinoma. *Mol Cancer*. 11, pp. 73.
- Spassova, M. and Golovinsky, E. (1985). Pharmacobiochemistry of arylalkyltriazenes and their application in cancer chemotherapy. *Pharmac. Ther.*, 27(3), pp. 333-352.
- Stieber V.W. (2001). Low-grade gliomas. *Curr Treat Options Oncol*, 2(6), pp. 495-506

- Stolt, C. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes & Development*, 17(13), pp.1677-1689.
- Stovall, D., Cao, P. and Sui, G. (2014). SOX7: from a developmental regulator to an emerging tumor suppressor. *Histol Histopathol*, 29(4), pp.439-45.
- Strigini, M. and Cohen, S. (1997). A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the Drosophila wing. *Development*, 124(22), pp.4697-705.
- Stupp, R., Mason, W., van der Bent, M., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M., Belanger, K., Brandes, A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R., Ludwin, S., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, G., Eisenhauer, E. and Mirimanoff, R. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), pp.987-96.
- Suzuki, M., Mose, E., Montel, V. and Tarin, D. (2006). Dormant cancer stem cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency. *Am J Pathol*. 169(2), pp. 673-81.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), pp.663-676.
- The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 455(7216), pp. 1061-1068.
- Tibbetts, K.M., Emnett, R.J., Gao, F., Perry, A., Gutmann, D.H., Leonard, J.R. (2009). Histopathologic predictors of pilocytic astrocytoma event-free survival. *Acta Neuropathol*, 117, pp.657-665.
- Tremblay, M., Lescarbeau, A., Grogan, M., Tan, E., Lin, G., Austad, B., Yu, L., Behnke, M., Nair, S., Hagel, M., White, K., Conley, J., Manna, J., Alvarez-Diez, T., Hoyt, J., Woodward, C., Sydor, J., Pink, M., MacDougall, J., Campbell, M., Cushing, J., Ferguson, J., Curtis, M., McGovern, K., Read, M., Palombella, V., Adams, J. and Castro, A. (2009). Discovery of a Potent and Orally Active Hedgehog Pathway Antagonist (IPI-926). *J. Med. Chem.*, 52(14), pp.4400-4418.

- Ueda, R., Yoshida, K., Kawayami, y., Kawase, T and Toda, M. (2004). Expression of a transcription factor, SOX6, in human gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 21(1), pp. 35-8.
- Ueda, R., Yoshida, K., Kawayami, y., Kawase, T and Toda, M. (2007). Preferential expression and frequent IgG responses of a tumor antigen, SOX5, in glioma patients.
- Ulasov, I., Nandi, S., Dey, M., Sonabend, A.M., and Lesniak, M.S. (2011). Inhibition of Sonic Hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133+ glioma stem cells to temozolomide therapy. *Mol Med*, 17(1-2), p.103-112.
- van Nifterik, K., van den Berg, J., van der Meide, W., Ameziane, N., Wedekind, L., Steenbergen, R., Leenstra, S., Lafleur, M., Slotman, B., Stalpers, L. and Sminia, P. (2010). Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *Br J Cancer*, 103(1), pp.29-35.
- Vanner, R., Remke, M., Gallo, M., Selvadurai, H., Coutinho, F., Lee, L., Kushida, M., Head, R., Morrissy, S., Zhu, X., Aviv, T., Voisin, V., Clarke, I., Li, Y., Mungall, A., Moore, R., Ma, Y., Jones, S., Marra, M., Malkin, D., Northcott, P., Kool, M., Pfister, S., Bader, G., Hochedlinger, K., Korshunov, A., Taylor, M. and Dirks, P. (2014). Quiescent Sox2+ Cells Drive Hierarchical Growth and Relapse in Sonic Hedgehog Subgroup Medulloblastoma. *Cancer Cell*, 26(1), pp.33-47.
- Verhaak, R., Hoadley, K., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M., Miller, C., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H., Hodgson, J., James, C., Sarkaria, J., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P., Wilson, R., Speed, T., Gray, J., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C. and Hayes, D. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), pp.98-110.
- Vézina, C., Kudelski, A. and Sehgal, S. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.*, 28(10), pp.721-726.

- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasante, J., Bricarelli, F., Keutel, J., Hustert, E., Wolf, U., Tommerup, N., Schempp, W. and Scherer, C. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the Sry-related gene SOX9. *Cell*. 79(6), pp. 1111-20.
- Wang, L., He, S., Yuan, J., Mao, X., Cao, Y., Zong, J., Tu, Y. and Zhang, Y. (2012). Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma. *Medical Oncology*, 29(5), pp.3484-3490.
- Wang, S., Xia, P., Ye, B., Huang, G., Liu, J. and Fan, Z. (2013). Transient Activation of Autophagy via SOX2-Mediated Suppression of mTOR is an Important Early Step in Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem cell*. 13(5), pp. 617-625
- Wegner, M. (2010). All purposes Sox: The many roles of SOX proteins in gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 42(3), pp. 381-90.
- Weina, K. and Utikal, J. (2014). SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med*, 3(1), p.19-28.
- Weissenberger, J., Loeffler, S., Kappeler, A., Kopf, M., Lukes, A., Afanasieva, T., Aguzzi, A. and Weis, J. (2004). IL-6 is required for glioma development in a mouse model. *Oncogene*, 23(19), pp.3308-3316.
- Wen, W., Han, T., Chen, C., Huang, L., Sun, W., Wang, X., Chen, S., Xiang, D., Tang, L., Cao, D., Feng, G., Wu, M., Ding, J. and Wang, H. (2013). Cyclin G1 Expands Liver Tumor-Initiating Cells by Sox2 Induction via Akt/mTOR Signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(9), pp.1796-1804.
- Williamson, K., Hever, A., Rainger, J., Rogers, R., Magee, A., Fiedler, Z., Keng, W., Sharkey, F., McGill, N., Hill, C., Schneider, A., Messina, M., Turnpenny, P., Fantès, J., van Heyningen, V. and FitzPatrick, D. (2006). Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Hum Mol Genet*. 15(9), pp. 1413-22.
- Xia, S., Feng, Z., Qi, X., Yin, Y., Jin, J., Wu, Y., Wu, H., Feng, Y. and Tao, M. (2014). Clinical implication of Sox9 and activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Medical Oncology*, 32(1), pp.358-368

- Xie, L., Sun, F., He, B., Zhan, X., Song, J., Chen, S., Yu, S. and Ye, X. (2015). Rapamycin inhibited the function of lung CSCs via SOX2. *Tumor Biol.*, 37(4), pp.4929-4937.
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. and Kosik, K. (2009). MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 137(4), pp.647-658.
- Yang, X., Yang, Z., Liu, F., Zeng, K., Qian, M., Chen, G., Shi, L. and Zhu, G. (2013). Inhibition of mTOR and HIF pathways diminishes chondro-osteogenesis and cell proliferation in chondroblastoma. *Tumor Biol.*, 34(5), pp.3111-3119.
- Yang, C., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., Peng, J., Li, Z., Han, L., You, Q., Chen, X., Rao, X., Zhu, Y. and Liao, Z. (2015). Downregulation of cancer stem cell properties via mTOR signaling pathway inhibition by rapamycin in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Oncol.* 47(3), pp. 909-917.
- Yu, Z., Xie, G., Zhou, G., Cheng, Y., Zhang, G., Yao, G., Chen, Y., Li, Y. and Zhao, G. (2015). NVP-BEZ235, a novel dual PI3K–mTOR inhibitor displays anti-glioma activity and reduces chemoresistance to temozolomide in human glioma cells. *Cancer Letters*, 367(1), pp.58-68.
- Zhang, C., Basta, T. and Klymkowsky, M. (2005). SOX7 and SOX18 are essential for cardiogenesis in *Xenopus*. *Dev Dyn.* 234(4), pp. 878-91.

Anexo I




mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance

Laura Garros-Regulez, Paula Aldaz, Olatz Arrizabalaga, Veronica Moncho-Amor, Estefania Carrasco-Garcia, Lorea Manterola, Leire Moreno-Cugnon, Cristina Barrena, Jorge Villanua, Irune Ruiz, Steven Pollard, Robin Lovell-Badge, Nicolas Sampron, Idoia Garcia & Ander Matheu

To cite this article: Laura Garros-Regulez, Paula Aldaz, Olatz Arrizabalaga, Veronica Moncho-Amor, Estefania Carrasco-Garcia, Lorea Manterola, Leire Moreno-Cugnon, Cristina Barrena, Jorge Villanua, Irune Ruiz, Steven Pollard, Robin Lovell-Badge, Nicolas Sampron, Idoia Garcia & Ander Matheu (2016) mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20:4, 393-405, DOI: [10.1517/14728222.2016.1151002](https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1151002)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2016.1151002>

 [View supplementary material](#) 

 Accepted author version posted online: 15 Feb 2016.
Published online: 23 Feb 2016.

 [Submit your article to this journal](#) 

 Article views: 35

 [View related articles](#) 

 [View Crossmark data](#) 

ORIGINAL RESEARCH

mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance

Laura Garros-Regulez^{a*}, Paula Aldaz^{a*}, Olatz Arrizabalaga^{a*}, Veronica Moncho-Amor^c, Estefania Carrasco-Garcia^a, Lorea Manterola^a, Leire Moreno-Cugnon^a, Cristina Barrena^b, Jorge Villanua^{a,b}, Irune Ruiz^{a,b}, Steven Pollard^d, Robin Lovell-Badge^c, Nicolas Sampron^{a,b}, Idoia Garcia^{a,e} and Ander Matheu^{a,b,e}

^aCellular Oncology group, Biodonostia Institute, San Sebastian, Spain; ^bNeuro-Oncology Committee, Donostia Hospital, San Sebastian, Spain; ^cStem Cell Biology and Developmental Genetics laboratory, The Francis Crick Institute, London, UK; ^dNeural Stem Cells and Brain Cancer group, MRC Centre for Regenerative Medicine, Edinburgh, UK; ^eIKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

ABSTRACT

Background: SOX2 and SOX9 are commonly overexpressed in glioblastoma, and regulate the activity of glioma stem cells (GSCs). Their specific and overlapping roles in GSCs and glioma treatment remain unclear.

Methods: SOX2 and SOX9 levels were examined in human biopsies. Gain and loss of function determined the impact of altering SOX2 and SOX9 on cell proliferation, senescence, stem cell activity, tumorigenesis and chemoresistance.

Results: SOX2 and SOX9 expression correlates positively in glioma cells and glioblastoma biopsies. High levels of SOX2 bypass cellular senescence and promote resistance to temozolomide. Mechanistic investigations revealed that SOX2 acts upstream of SOX9. mTOR genetic and pharmacologic (rapamycin) inhibition decreased SOX2 and SOX9 expression, and reversed chemoresistance.

Conclusions: Our findings reveal SOX2-SOX9 as an oncogenic axis that regulates stem cell properties and chemoresistance. We identify that rapamycin abrogate SOX protein expression and provide evidence that a combination of rapamycin and temozolomide inhibits tumor growth in cells with high SOX2/SOX9.

ARTICLE HISTORY

Received 27 May 2015
Accepted 2 February 2016
Published online
25 February 2016

KEYWORDS

Glioma stem cell; SOX2; SOX9; senescence; rapamycin and temozolomide

1. Introduction

Glioblastoma multiforme is the most common and malignant adult primary brain tumor with an incidence ranging from 2 to 10 cases per 100,000 people per year. The incorporation of temozolomide (TMZ) to clinical practice resulted in improved quality of life, delayed tumor progression, and extended patient survival.[1] Current standard treatment includes multimodal therapy of surgery followed by concomitant radiotherapy and TMZ. However, most patients develop refractory disease and tumor recurrence because of the intrinsic or acquired chemoresistance of glioma cells. There are several characteristics of glioblastoma that are responsible for difficulties of current therapies, including genetic, molecular and morphological heterogeneity,[2,3] the presence of a subpopulation of cancer cells [called glioma stem cells (GSCs)] that drives tumor formation and maintenance [4], and the resistance of GSCs to therapeutic treatments.[5,6] Therefore, it is critical to elucidate the molecular mechanisms underlying the chemoresistance of glioma cells to discover more efficient therapeutic treatments.

GSCs share phenotypic and functional characteristics with neural stem cells (NSCs), such as self-renewal and multipotency. Accumulating evidence indicates that dysregulation of genes and pathways controlling normal NSCs plays a role in the regulation of GSCs. SOX [sex-determining region Y (SRY)-box] are a family of

transcription factors characterized by a conserved high-mobility group DNA-binding domain. They control several developmental processes and are involved in the maintenance of stem cell activity in a wide range of tissues during embryogenesis and adult stages.[7] Their functions are particularly relevant in the central nervous system (CNS). Moreover, mutation and dysfunction of SOX factors are implicated in a broad variety of cancers, including glioblastoma.[8]

SOX2 is necessary at early stages of neurodevelopment, it is highly expressed in the areas where NSCs are present during embryogenesis and in the adult stages, and its genetic inactivation leads to NSC differentiation.[9,10] It is also one of the factors necessary for pluripotent and NSC reprogramming.[11–13] In regards to glioblastoma, SOX2 is highly expressed in clinical samples [2, 14–16], and these high levels identify a subset of patients with poor clinical outcome.[17] SOX2 activity is required to sustain stem cell identity with its knockdown, significantly impairing GSCs self-renewal and ability to form tumors *in vivo*. [18,19] SOX2 is also one of the master transcription factors responsible for the reprogramming of differentiated glioblastoma cells into induced GSCs,[20] together establishing a major functional relevance of SOX2 in the maintenance of GSCs and glioblastoma progression. However, its function in response to therapy remains poorly understood.

CONTACT Ander Matheu ✉ ander.matheu@biodonostia.org Biodonostia Institute, Paseo Dr. Beguiristain s/n, E-20014 San Sebastian, Spain

*These authors contributed equally to this work.

Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

Article highlights

- SOX2 has the potential to become a useful biomarker in the clinic for patient outcome and tumor recurrence.
- The expression of SOX2 might be used for patient stratification and for new therapeutic opportunities targeting it directly or through signals upstream or downstream.
- We postulate the combination of rapamycin with temozolomide in glioblastoma as a therapy strategy, particularly in the subset of patients whose biopsies express elevated SOX2 and SOX9.

This box summarizes key points contained in the article.

SOX9 belongs to the related SOXE subgroup, whose expression is also associated with NSCs.[21] It is essential for directing cells to late NSC stages when gliogenesis is prominent.[22] The activity of SOX9 has also been associated to brain primary tumors. Thus, SOX9 levels are more elevated in glioma than in healthy brain tissue and increasing expression correlates with higher WHO grade gliomas.[23] In glioblastoma, strong SOX9 staining is associated with lower Karnofsky score, lower disease-free and overall patient survival rates.[24,25] Functionally, ectopic expression of SOX9 cooperates to transform NSCs and form tumors.[26]

Different studies have shown an association between SOX2 and SOX9 expression within the developing CNS neurogenic areas in the retina, spinal cord, and dorsal telencephalon.[21,27] Similar effects have been shown in adult stem cells in the subventricular zone and cerebellum.[21,28,29] However, it is unknown whether these two SOX factors cooperate in GSC's self-renewal and/or in glioblastoma chemoresistance.

2. Patients and methods

2.1. Patients and tumor samples

The Basque Biobank for Research O+EHUN provided the human glioblastoma samples. The study included biopsies from 27 patients seen at Donostia University Hospital (San Sebastian, Spain) and diagnosed as primary glioblastoma grade IV according to the WHO criteria. The control group consisted of three healthy donors from the Basque Research Biobank for Research O+EHUN and mRNA was obtained from a mix of six adult brains (Ambion). All study participants signed the informed consent form approved by the Institutional Ethical Committee.

2.2. Cell lines and cultures

Glioma cell lines U251MG (U251), U87MG (U87), A172, and U373 were purchased from the ATCC (American Type Culture Collection). The cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin for traditional monolayer cultures or DMEM/F-12 supplemented with N2, B27 supplements (Fisher), and growth factors [20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) and 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF)] (Sigma, St. Louis, MO, USA) for spheres cultures. Cells were maintained at standard conditions of 37°C, 5% CO₂ in humidified atmosphere. Glioblastoma primary

tumors were dissociated and cells grown in sphere medium for 10 days. Then, spheres were mechanically and enzymatically disaggregated with accutase (Gibco), seeded for secondary spheres, and injected in mice at early passage. Moreover, they were maintained in culture for at least nine passages. Differentiation assays were performed by removing bFGF and EGF and by adding 1% FBS to the DMEM-F12 complete medium.

For spheres assays, U87 and U251 were grown in GSCs medium for 10 days. Then, these spheres were disaggregated with accutase and seeded for secondary and maintained in culture for another 10 days (2^{ry} GSCs). For quantification studies, 500 cells/well were seeded in nontreated 12-well flat-bottom plates and fresh media was added every three days to the plate. After 10 days, spheres were counted. For 2^{ry} GSC assay, the same procedure was repeated.

Lentiviral infections were performed as previously described.[30] For SOX2 or mTOR knockdown, cells were infected with *pLKO.1 shSOX2* (a gift from Matthew Meyerson, Addgene plasmid 26353), *shmtOR1* (a gift from David Sabatini, Addgene plasmid 1855), or empty vector. Infected cells were selected in the presence of 2 µg/ml puromycin and then maintained with 0.2 µg/ml puromycin (Sigma). For SOX9 knockdown, cells were transfected with a SOX9 shRNA (Origene, *sh1* or *sh75*) using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and selected in the presence of puromycin for 3 weeks. A nonspecific shRNA (*pRS*) was used as a control. For stable overexpression of SOX2, lentiviral transductions were performed with a *pLM-mCitrine-SOX2* construct (a gift from Ander Izeta, Biodonostia Institute) with *pWPLX-GFP* as control. Cells were infected at a multiplicity of infection of 10 for 6 h. SOX9 overexpression was achieved by transfection using Fugene with *pCAGGS-SOX9*. TMZ and rapamycin (Sigma) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and cyclopamine in ethanol.

2.3. Flow cytometry

For cell cycle assay, cells were fixed with ethanol and incubated with RNaseA and propidium iodide. Data were acquired in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and processed using FACSDiva software.

2.4. Senescence-associated β-galactosidase staining

Senescence-associated β-galactosidase staining was performed using a commercial staining kit (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), according to the manufacturer's guidelines.

2.5. RNA analysis

Total RNA was extracted with Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Reverse transcription was performed using random priming and Superscript Reverse Transcriptase (Life Technologies), according to the manufacturer's guidelines. Quantitative real-time PCR was performed using Absolute SYBR Green mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in an ABI PRISM 7300 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Variations in input RNA were corrected by subtracting the number of PCR cycles obtained for *GADPH*.

2.6. Western blot analysis

Immunoblots were performed following standard procedures. For SOX2 detection, AB5603 antibody (Millipore, Billerica, MA, USA) was used, for SOX9 AB5535 antibody (Millipore), and for β -actin AC-15 (Sigma). HRP-linked (Horseradish Peroxidase) anti-rabbit or anti-mouse (SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) secondary antibodies, both at a 1:2000 dilution, were used. Detection was performed by chemiluminescence using NOVEX ECL Chemi Substrate (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

2.7. Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and washed with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.3% Triton X-100 and 1% FBS for 5 min at 4°C. Subsequent to blocking for 1 h with PBS and 1% FCS, cells were incubated with p-Histone3 (P-H3) (Abcam, Cambridge, UK) or SOX9 (Millipore) antibodies for 2 h. Nuclear DNA was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma).

2.8. Immunohistochemistry

Tumors generated in mice were dissected, fixed in 10% formalin for 48 h and embedded in paraffin. Four-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin and eosin using the Varistain Gemini ES machine (ThermoFisher). For immunohistochemistry, sections were rehydrated and heated in citrate buffer for 10 min for antigen retrieval. Endogenous peroxidase was blocked with 5% hydrogen peroxide in methanol for 15 min. Anti-SOX2 (Abcam), SOX9 (Millipore), and Ki67 (Abcam) primary antibodies were used.

2.9. Cell viability MTT assay

Cells were seeded in 96-well plates at a density of 2.5×10^3 cells per well and treated 24 h later with the indicated concentrations of TMZ, rapamycin, and cyclopamine (Sigma) for 72 h in sextuplicates. Then, cells were incubated with MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 0.25 mg/ml (Sigma) for 3 h. Formazan produced by viable cells was dissolved in 150 μ l of DMSO and absorbance determined at 570 nm in a microplate reader (Multiskan Ascent Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).

2.10. In vivo carcinogenesis assays

For subcutaneous injection, glioma cells were harvested with trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and resuspended in PBS. 1×10^6 cells were injected subcutaneously into both flanks of Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu} nude mice (8 weeks old). Mice were observed on a daily basis and external calipers were used to measure tumor size at the indicated time points from which tumor volume was estimated. For therapy experiment, U251 were cultured for 48 h with TMZ 0.1 mM, rapamycin 1 nM, the combination of both drugs and vehicle (control), previous bilateral implantation in nude mice. One week later, mice were injected intraperitoneally with TMZ (10 mg/kg), rapamycin (5 mg/kg), and combination (10 and 5 mg/kg, respectively)

twice per week for 12 weeks. Tumors were considered positive when palpable and the diameter was bigger than 3 mm.

For xenotransplantation, GSCs were injected stereotactically into the frontal cortex of 6–8-week-old non-obese diabetic severe combined immunodeficiency (NOD-SCID) immunodeficient mice. Briefly, GSCs were disaggregated with accutase and resuspended in PBS. 1×10^5 cells were injected into the putamen using a stereotaxic apparatus.

2.11. Data evaluation

Data are presented as mean values \pm SEM with the number of experiments (*n*) in parenthesis. Unless otherwise indicated, statistical significance (*p*-values) was calculated using the Student's *t*-test. *, **, and *** indicate statistical significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

3. Results

3.1. SOX2 and SOX9 overexpression correlates in glioblastoma samples and GSCs

We analyzed the expression of SOX2 and SOX9 in a cohort of human glioblastoma samples and compared them with healthy brain tissue. The expression of SOX2 and SOX9 was significantly upregulated in glioblastoma. Indeed, 70% of the tumor biopsies showed overexpression (fold change higher than 1.5) of SOX2 (19 biopsies of 27), while 65% of them presented SOX9 upregulation (18 of 27). Moreover, SOX2 was increased by an average of more than threefold, while SOX9 was upregulated by sixfold in tumors compared to brain tissue (Figure 1A and B, and Supplementary Figure S1). Interestingly, the correlation analysis showed a significant association between SOX2 and SOX9 expression (Figure 1B). In fact, 85% of the biopsies with SOX2 overexpression also presented increased levels of SOX9 (16 out of 19), whilst 75% of cases with moderate or low SOX2 (6 out of 8) presented low SOX9 as well (Figure 1B). Similar results were observed in the publically accessible data from The Cancer Genome Atlas (Supplementary Figure S1). Together, these results demonstrate that high levels of SOX2 and SOX9 are associated in glioma biopsies.

Next, we determined the association between SOX2 and SOX9 in freshly derived GSCs cultures from human patients. For this, cells dissociated from glioblastoma biopsies were plated in serum-free medium in the presence of EGF and bFGF growth factors. Two independent cultures (GB1 and GB2) gave rise to long-term expanding cultures. These cultures were able to grow as tumorspheres, displayed multipotency, and generated tumors when injected orthotopically in the brain of immunodeficient mice (Figure 1C and Supplementary Figure S2). Importantly, both SOX2 and SOX9, in addition to CD133 and OCT4, were highly expressed in these nondifferentiating conditions, and their levels were higher in GB1 cells, which generated tumors earlier (Figure 1D, and E, and Supplementary Figure S2). When we checked their expression in differentiation conditions, in the absence of growth factors and addition of 1% serum, both SOX2 and SOX9 decreased significantly (Figure 1D and E). These results extend the correlation of SOX2 and SOX9 to GSCs.

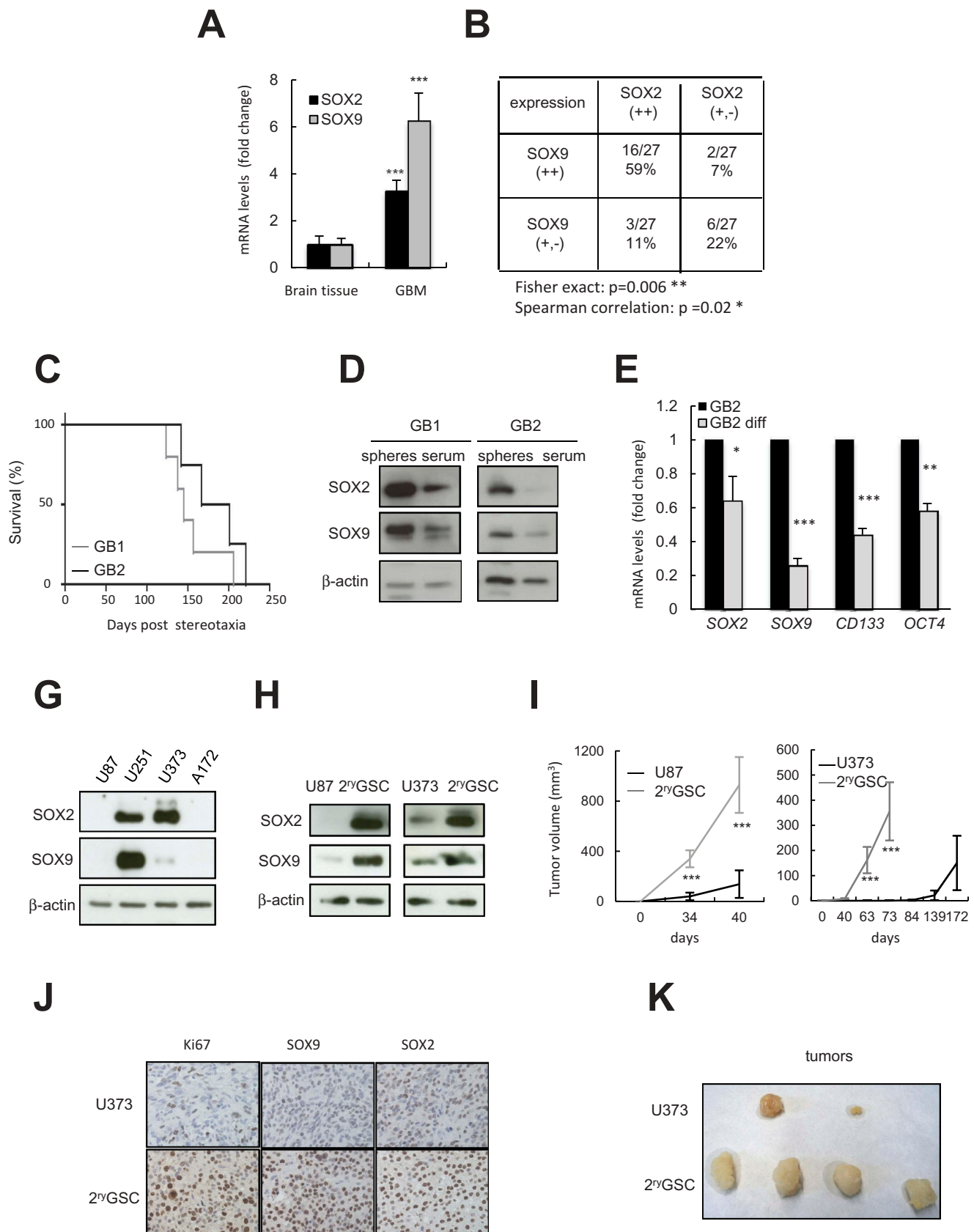


Figure 1. SOX2 and SOX9 are co-expressed in human glioblastoma samples, GSC and glioma cell lines.

(A) SOX2 and SOX9 mRNA levels were assayed in a set of healthy brain tissue as control ($n = 9$) and GBM ($n = 27$) samples. q-PCR data are normalized to GAPDH expression and expression in tumors is relative to healthy brain tissue (B) Analysis of the correlation of SOX2 and SOX9 expression in human glioblastoma samples (Fisher exact Test = 0.006; Spearman correlation = 0.02). (C) Kaplan-Meier curve representing the survival of NOD-SCID mice that were xenotransplanted with GB cell lines ($n = 5$) (D) Representative image of higher levels of SOX2 and SOX9 in GB1 and GB2 cells grown in stem cell medium compared to differentiation conditions ($n = 3$). (E) mRNA expression of the indicated GSC markers were analyzed in GB1 and GB2 cells ($n = 3$). (F) Representative immunoblots of SOX2 and SOX9 expression in different glioma cell lines ($n = 5$). (G) SOX2 and SOX9 expression levels in U87 and U373 grown in serum (parental cells) or in stem cells medium (2^y GSC) ($n = 5$). (H) U87 and U373 parental cells and those grown as tumorspheres were injected subcutaneously in nude mice ($n = 8$ for condition) and growth of the tumors was scored at the indicated time points. (I) Representative images of Ki67, SOX2 and SOX9 immunohistochemical staining in U373 derived tumors ($n = 4$). (J) Comparative of the size of the tumors generated by U373 parental and 2^y GSCs. Statistical significance was obtained with Student's T test ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$ ** $;$ $P \leq 0.001$ ***).

Then, we studied their expression in a set of glioma cell lines. Western blotting and quantitative PCR revealed that the expression of SOX2 was very high in U251 and U373, while U87 and A172 expressed low levels (Figure 1G). Interestingly, the levels of SOX9 correlated with SOX2 (Figure 1G). Moreover, their levels in U251 cells are within the range of expression observed in GSCs and tumor biopsies (Supplementary Figures S1 and S2), suggesting that these high levels are of biological relevance. Cells with stem cells characteristics have been isolated in several glioma cells lines.[31] Therefore, we cultured U87 and U373 cell lines under NSC growth conditions. These cells grew as tumorspheres and produced tumors faster and larger than parental cells when injected in immunodeficient mice (Figure 1I and K, and Supplementary Figure S3). In this context, the levels of SOX2 and SOX9 were strikingly elevated in the tumors and in the cultures of tumorspheres compared to U87 and U373 parental cells (Figure 1H and J, and Supplementary Figure S3). This evidence further demonstrates the correlation between their expression and together reveal that the SOX2-SOX9 axis might define an oncogenic signaling that predicts the presence of malignant GSCs.

3.2. SOX2-regulated proliferation, senescence, and self-renewal is mediated by SOX9

To directly address the impact of SOX2 on the regulation of glioma cells and SOX9 expression, we knocked down SOX2 by using RNA interference in U251, cell line with the highest levels of SOX2 and SOX9. Western immunoblotting confirmed effective inhibition of SOX2 and revealed a marked reduction of SOX9 protein levels in *shSOX2* cells (Figure 2A and Supplementary Figure S4), suggesting that SOX9 might act downstream of SOX2 in glioma cells. To further characterize the regulation of SOX9 by SOX2, we measured SOX9 mRNA levels in cells with SOX2 knockdown, not detecting significant differences in relation to control cells (data not shown). Thus, the effect of SOX2 seems to be at translational instead of transcriptional level.

To extend this finding, SOX9 was ectopically re-expressed in *shSOX2* cells. Western blot assay showed that SOX9 restoration in U251 cells re-established the expression of SOX9 and increased the levels of SOX2 (Figure 2B), indicating that the efficiency of silencing was not complete (Supplementary Figure S4). Moreover, we identified that ectopic SOX9 also increased the expression of SOX2 in control cells (Figure 2B), together suggesting that a feedback loop might exist between SOX2 and SOX9.

To determine whether SOX9 is necessary for SOX2 oncogenic activity, we next investigated the phenotypes associated to SOX2 silencing, and whether SOX9 reactivation restored them, SOX2 knockdown led to a significant decrease of more than twofold in cell growth and number of p-Histone3 (P-H3)-positive cells (Figure 2C and Supplementary Figure S4). Moreover, flow cytometry analysis showed increased number of cells in G0/G1 and decreased in S phase of *shSOX2* compared with control cells (Figure 2D and Supplementary Figure S4). This impairment in *shSOX2* cell proliferation was accompanied by a significant increase in senescence measured by cytoplasmic β -galactosidase activity and *IL1 α* , interleukin associated to senescence-associated secretory phenotype [32] both elevated by more than 2.5-fold in cells with SOX2 silencing (Figure 2E, F and Supplementary

Figure S4). Thus, impaired proliferation and increased senescence account for the reduction in cellular growth of SOX2-silenced cells. Moreover, SOX2 knockdown diminished sphere-formation and self-renewal activities (Figure 2G and H). Similar results were obtained in limiting dilution analysis (Supplementary Figure S4), further providing evidence for a decrease in self-renewal activity in the absence of SOX2.[19] When SOX9 was ectopically re-expressed in *shSOX2* cells, cell proliferation was significantly increased (Figure 2I), senescence-associated β -galactosidase activity significantly decreased (Figure 2J and Supplementary Figure S5), and the ability to form colonies at low density and spheres increased in SOX9 restored cells (Figure 2K and Supplementary Figure S5). However, SOX9 reactivation did not restore completely the numbers observed in control cells (data not shown), indicating that the oncogenic activity of SOX2 is, at least in part, mediated by SOX9.

In order to further characterize the significance of this axis in glioma cells, we knocked down SOX9 activity in U251 cells. *shSOX9* (*sh1*) transduced cells presented significantly lower number of P-H3-positive cells (Figure 3A and B, and Supplementary Figure S6) and generated lower number of foci in soft-agar and formed tumors later than control cells (Figure 3C and Supplementary Figure S6). Together, our results demonstrate that genetic silencing of SOX2 and SOX9 suppresses proliferation and tumorigenicity of glioma cells and indicate that their inhibition might be a novel therapeutic strategy for glioblastoma.

3.3. Overexpression of SOX2 and SOX9 promotes proliferation and stem cell activity

Next, we introduced ectopic SOX2 in U87 cells with the lowest levels of endogenous SOX2 and SOX9. We confirmed the overexpression of SOX2, and interestingly, SOX9 levels were also elevated (Figure 3D and Supplementary Figure S7). Together with the above data, these results strongly indicate that SOX2 modulates the activity of SOX9 expression. We also measured SOX9 mRNA levels in cells with SOX2 overexpression without detecting significant differences compared to control cells (data not shown). Phenotypically, cells with increased SOX2 expression exhibited higher cell growth curves and rates of proliferation compared to control cells (Figure 3E and F). Moreover, we assessed the effect of SOX2 on self-renewal and found that SOX2 overexpression led to an increase in the generation of tumorspheres. While control cells formed an average of 5 spheres, SOX2 overexpressing cells generated an average of over 20 spheres (Figure 3G). Similarly, transient overexpression of SOX9 was sufficient to increase the number of U87-derived spheres (Figure 3H and I) and induced the formation of larger tumors (Figure 3J). Collectively, our data revealed that SOX2 and SOX9, acting in the same axis, are not only necessary for the maintenance but their elevated activity also facilitates self-renewal activity and tumor growth in glioma cells.

3.4. SOX2 expression modulates TMZ sensitivity

The evidence of GSCs as responsible for resistance to therapeutic treatments,[33] together with our data of SOX2/SOX9 expression associated to malignant GSCs, prompted us to hypothesize that their high levels could be involved in cellular resistance to TMZ.

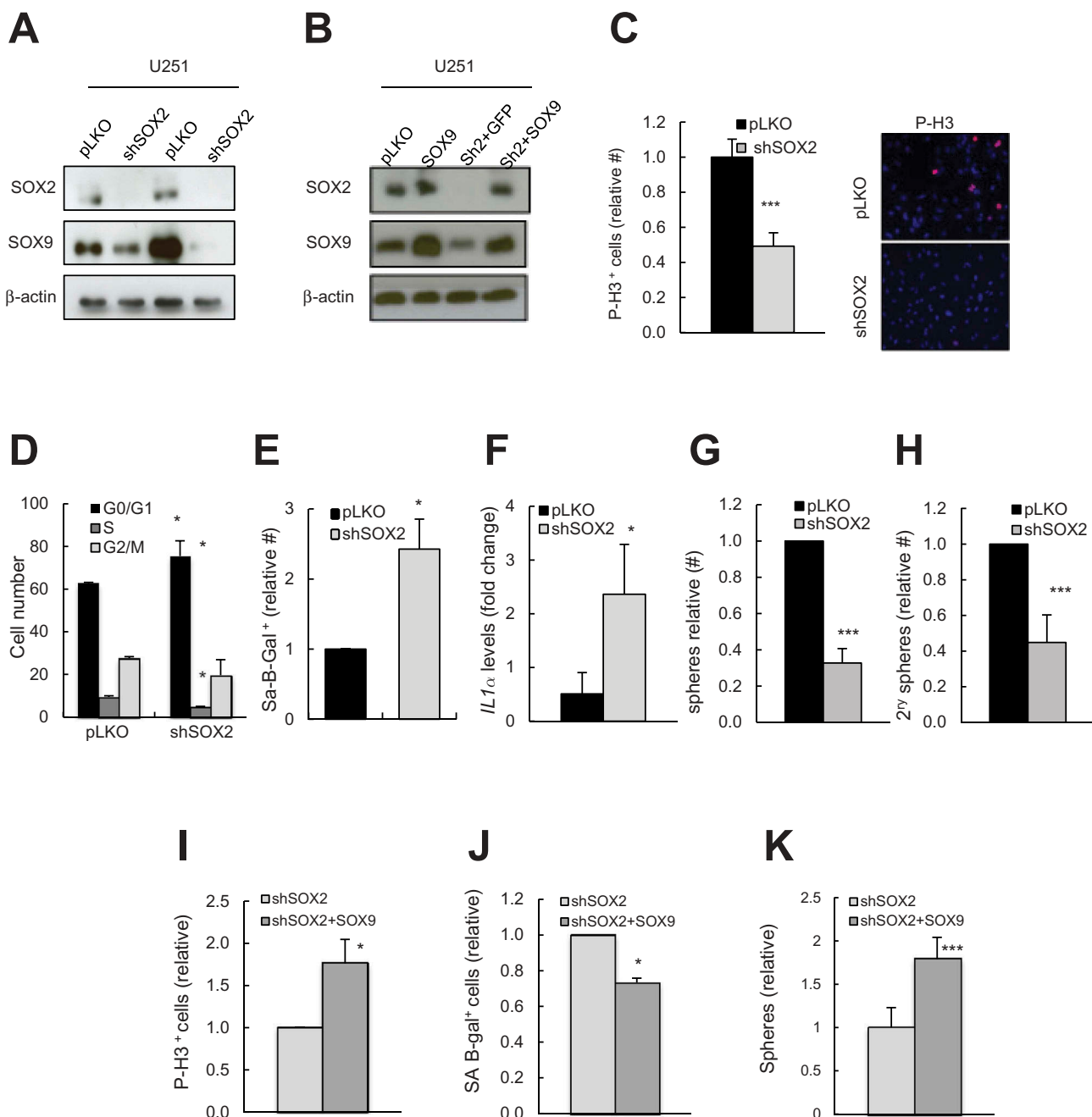


Figure 2. Downregulation of SOX2 leads to decreased proliferation and self-renewal in U251 cells via SOX9.

U251 cells were infected with a *shSOX2* or *shSOX9* and cells examined for protein expression and functional assays (at least $n = 4$). (A) Representative Immunoblots of SOX2 and SOX9 derived from two different and independent lentiviral infections with a *shSOX2* construct ($n = 4$). (B) Representative western blot of SOX2 and SOX9 in U251 cells transfected with the indicated conditions ($n = 3$). (C) *shSOX2* impairs proliferation as shown by the quantification and representative image of P-H3 positive cells ($n = 4$). (D) Cell number in each cell cycle phase in empty vector and *shSOX2* condition ($n = 2$). (E) Quantification of senescence associated β -galactosidase positive cells in *shSOX2* and control cells ($n = 4$). (F) Expression of *IL1 α* mRNA levels in *shSOX2* cells. qRT-PCR data are normalized to GAPDH expression and are expressed relative to the pLKO control condition ($n = 3$). (G) Quantification of spheres (1st) forming capacity in *shSOX2* cells after 10 days in culture. The numbers are relative to empty vector transfected cells ($n = 4$). (H) Number of 2nd spheres generated in both control and *shSOX2* conditions after 8 days in culture, and related to the control ($n = 3$). (I) Numbers of P-H3 positive cells were quantified in *shSOX2* and *shSOX2+SOX9* transfected U251 cells ($n = 3$). (J) SOX9 restoration decreases senescence associated β -galactosidase activity in U251 cells ($n = 4$). (K) Quantification of tumorspheres forming capacity in *shSOX2+SOX9* cells after 7 days in culture. The numbers are relative to U251 *shSOX2* cells ($n = 4$).

To test this idea, we first analyzed SOX2 and SOX9 expression in U251 and U87 cells cultured with increasing concentrations of TMZ for 24 h. We found that both SOXs were elevated in response to 100 and 200 μ M of TMZ, more markedly with the highest concentration (Figure 4A), suggesting that this axis may be involved in the underlying resistance to current chemotherapy. To further determine this hypothesis, cell lines with high and

low SOX2/SOX9 were exposed to different concentrations of TMZ for 72 h and cell chemosensitivity was measured by MTT assay. U251 and U373 cells, with high levels of both SOX factors, were more resistant (% of toxicity lower than 15% in both lines) than A172 and U87 cells (% of toxicity between 30 and 50%) (Figure 4B) Together, these findings confirm that high levels of SOX2 and SOX9 correlate with TMZ resistance.

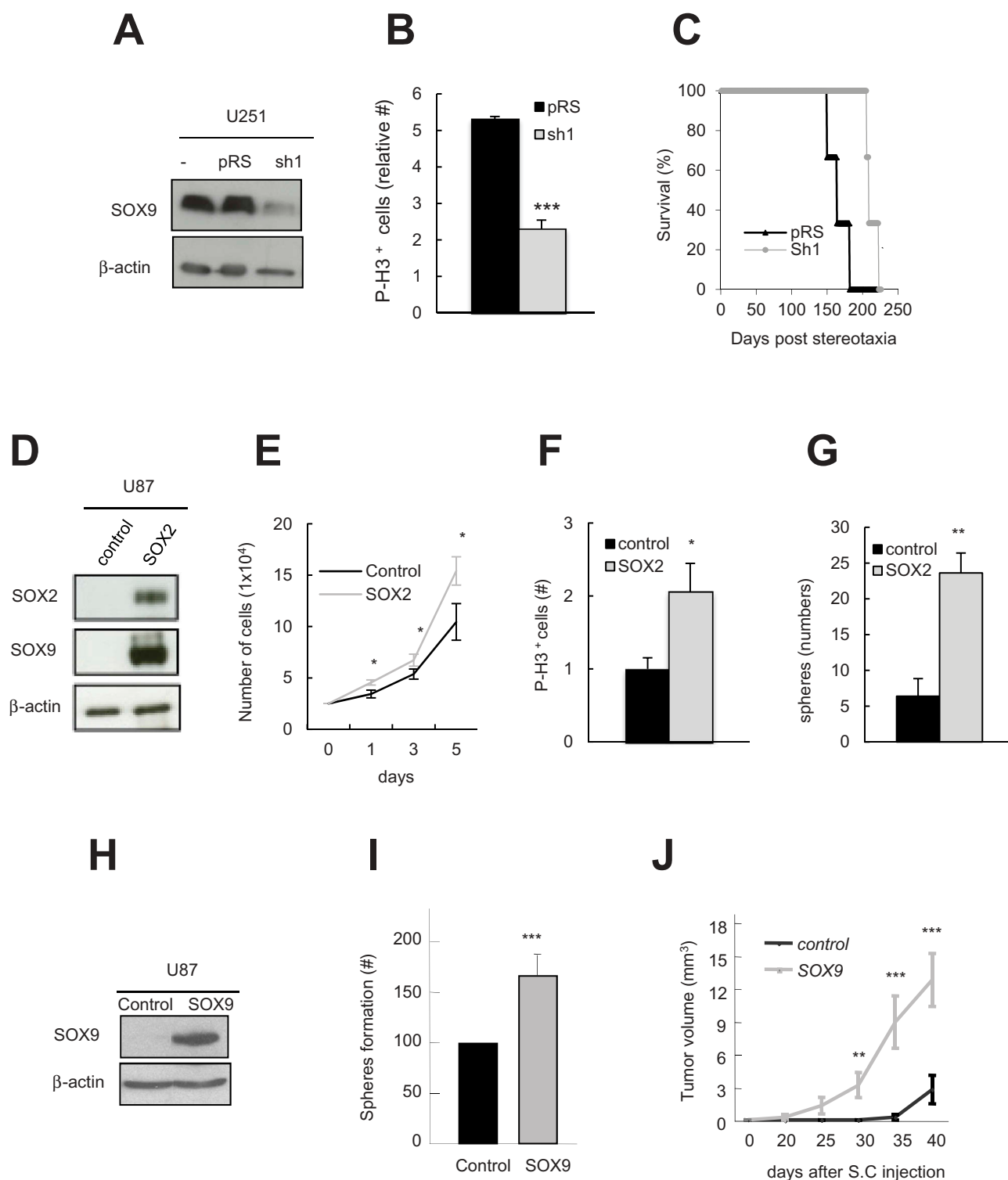


Figure 3. Effect of SOX2 and SOX9 gain of function in glioma cells.

(A) Representative image of SOX9 levels in pRS or *shSOX9* (sh1) cells (B) Quantification of P-H3 positive cells in pRS or sh1 cells. (C) Kaplan-Meier curve representing the survival of NOD-SCID mice that were xenotransplanted with pRS control or sh1 cells ($n = 4$). (D) Representative western blot of SOX2 and SOX9 in U87 cells lentivirally transduced with *pLM-mCitrine-SOX2* or control construct ($n = 3$). (E) Cell growth assay comparing control and SOX2 overexpressing U87 cells. ($n = 5$). (F) Number of P-H3 positive cells detected in the indicated U87 cells. ($n = 5$). (G) Quantification of tumorsphere formation capacity of cells with ectopic SOX2 compared to control cells ($n = 4$). (H) Representative western blot of SOX9 levels in U87 cells transfected with *pCAGGS SOX9* or empty vector (control). (I) Quantification of spheres generated in SOX9 and control U87 cells ($n = 4$). (J) Control and SOX9 U87 cells were injected subcutaneously (s.c) in nude mice ($n = 6$) and growth of the tumors was scored at the indicated time points.

Next, we characterized the role of SOX2 in response to TMZ performing additional MTTs assays. SOX2 overexpression significantly increased the resistance of U87 cells, as observed by

the enhancement of cell growth to increasing concentrations of TMZ (Figure 4C), whilst SOX2 knockdown increased the chemosensitivity of U251 glioma cells to TMZ (Figure 4D). To

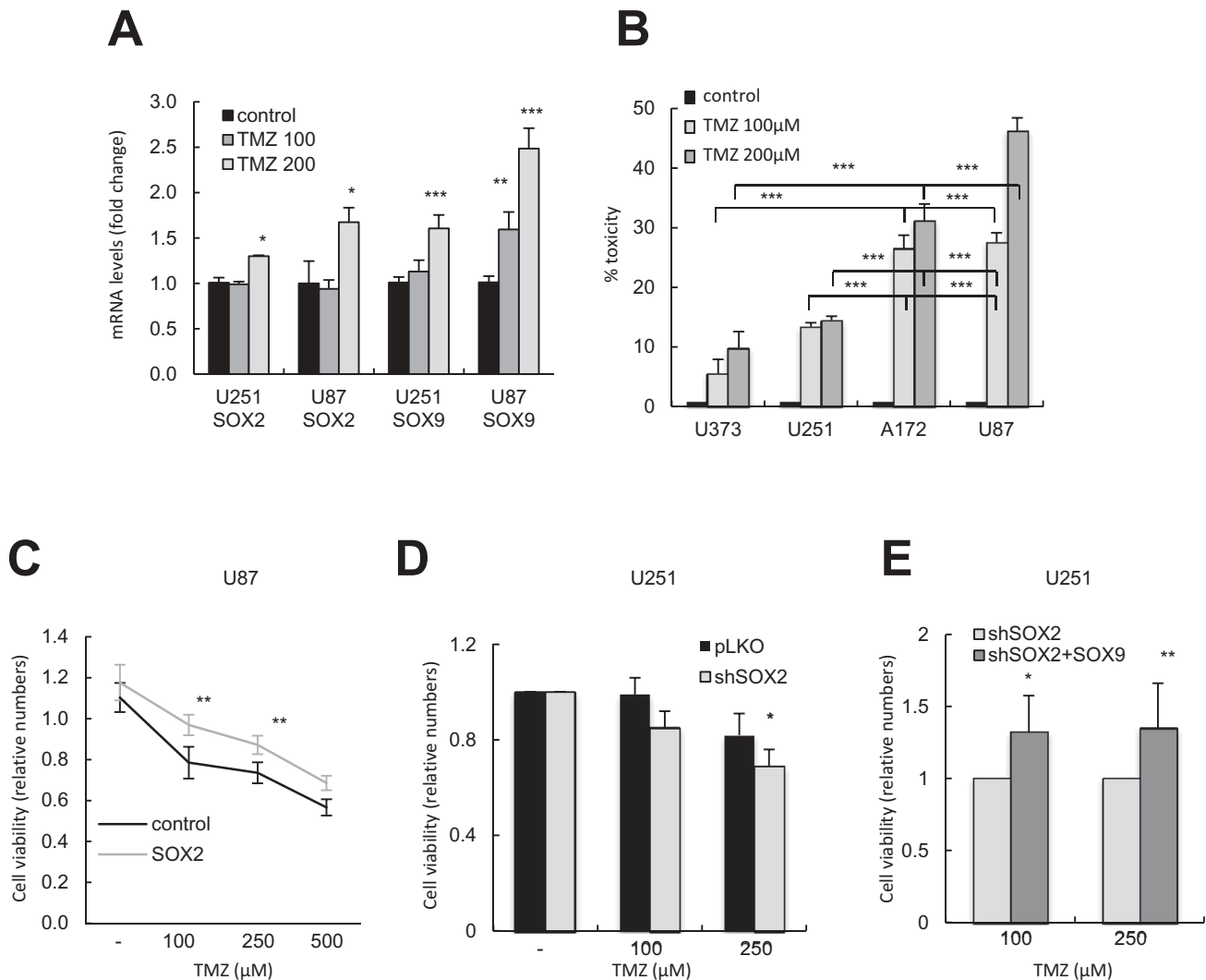


Figure 4. Effect of TMZ treatment in glioma cells with different activity of SOX2 and SOX9.

(A) SOX2 and SOX9 expression levels in U87 and U251 cells cultured with increasing doses (100 and 200 μM) of TMZ ($n = 3$). Data are relative to DMSO treated condition. (B) MTT assay of different glioma cell lines in the presence of increasing doses of TMZ for 72 h ($n = 6$). Values are relative to control cells treated with DMSO. (C) *pLM-mCitrine-SOX2* U87 infected cells were cultured with the indicated doses of TMZ for 72 h ($n = 3$). Cell viability was expressed as the percentage of MTT reduction, assigning the 100% value to the absorbance of the control cells. (D) *shSOX2* transduced U251 cells were treated with the indicated doses of TMZ and cell viability measured 72 h later ($n = 5$). (E) Cell viability in *shSOX2* and *shSOX2+SOX9* U251 cells ($n = 3$). Statistical significance was obtained with Student's T test ($P \leq 0.05^*$; $P \leq 0.01^{**}$; $P \leq 0.001^{***}$).

identify whether SOX9 regulated SOX2 response to TMZ, we repeated the MTT experiment with U251 *shSOX2* cells with or without SOX9 restoration. Interestingly, *shSOX2* with SOX9 exhibited a growth advantage in the presence of different doses of TMZ compared to *shSOX2* (Figure 4E). The above-mentioned data indicate that SOX2 activity modulates the sensitivity of glioma cells to TMZ by regulating SOX9 expression and suggest that pharmacological inhibition of SOX2 might be a novel strategy to overcome TMZ resistance in a subset of glioblastoma with high levels of SOX2-SOX9.

3.5. Rapamycin treatment decreases SOX2 expression and TMZ resistance

In an effort to identify agents that could silence the expression of SOX2 in glioma cells, we tested the effect of rapamycin, an inhibitor of the mTOR complex 1, which is known to affect

viability and proliferation of glioma cells, and has been shown to inhibit the expression of SOX2 for cell reprogramming. [34,35] First, we cultured several cell lines with 10 nM of rapamycin, noting that the expression of SOX2 was markedly reduced at protein and mRNA levels mainly in U251 and U373, cells with endogenous high levels of SOX2 (Fig 5A;B), extending the action of this agent on SOX2 protein from healthy to cancer cells. Similar effect was detected on SOX9 expression. The inhibitory effect of rapamycin was concentration-dependent (from 1 to 100 nM) and time-dependent (24–48 h) (Figure 5A and B, and Supplementary Figure S7). The reduction in SOX9 levels was more intense (between 60% and 80%) than in SOX2 (30–60%), suggesting that rapamycin-induced SOX9 inhibition is not exclusively directed through SOX2. The above concentration–response curves further reveal that rapamycin exerted a negative effect on SOX expression even at very low concentration (1nM). We, therefore, evaluated

whether the effect on SOX2 and SOX9 expression was directly mediated by mTOR signaling inhibition, and knocked down *mTOR* expression in U251 cells. Seventy-two hours after antibiotic selection, we observed a severe decrease in *mTOR* mRNA levels and a striking decline in phosphorylation of AKT and S6, well-established mTOR effectors (Figure 5C and D), demonstrating the efficient silencing of *mTOR* machinery in our U251 glioma model (Figure 5D). In this context, SOX2 and SOX9 protein levels were also reduced, identifying that SOX2 and SOX9 are downstream targets of mTOR pathway as shown by genetic and pharmacological studies.

To confirm the role of mTOR signaling in glioma cell activity, we further characterized the effect of mTOR silencing in functional studies. Interestingly, cell growth and the number of spheres were dramatically diminished (Figure 5E and F), further confirming the impact of mTOR in self-renewal and GSC maintenance.[36] Moreover, these studies revealed that genetic inhibition of mTOR and SOX2 displays the same cellular phenotype, further extending the association between them. In summary, our results show that SOX2/SOX9 expression can be silenced with the pharmacological inhibition of mTOR machinery. Similar results were obtained with cyclopamine, inhibitor of the Sonic Hedgehog (SHH) molecular pathway (Supplementary Figure S8), together demonstrating that pharmacological silencing of SOX2 and SOX9 activity is plausible with current agents.

Combined therapeutic approaches acting synergistically have been proven more effective than individual treatments. We, therefore, tested whether rapamycin (or cyclopamine) could represent a potential enhancer of the cytotoxic effects of TMZ and sensitize cells with elevated levels of SOX2. Accordingly, we performed MTT assays in which U87 and U251 cells were treated with a constant dose of 100 μ M TMZ together with 1 and 10 nM of rapamycin or 5 and 10 μ M of cyclopamine (concentrations that significantly inhibited SOX2 expression). First, we detected that the cytotoxic effect of 5 and 10 μ M of cyclopamine in U251 cells was higher (18% and 24%) than in U87 (14% and 19%), although we did not observe an additive effect of the combination of TMZ and cyclopamine treatment (Supplementary Figure S8). On the other hand, combined treatment of rapamycin and TMZ achieved a stronger cytotoxic effect than with single agents alone (Figure 5G). Moreover, the concomitant treatment of rapamycin and TMZ exerted a greater anti tumorigenic effect in SOX2-SOX9 high-expressing than in low-expressing cells (Figure 5G). Indeed, the percentage of toxicity in U251 cells was 55% and 57% in TMZ plus rapamycin 1 and 10 nM, respectively, compared to 43% and 46% in U87 cells. Of note, the synergistic action of rapamycin and TMZ was achieved even at the low concentration of 1 nM and was of similar degree than 10 nM. To determine whether this effect was mediated by SOX2 and SOX9, we measured their expression in cells cultured with TMZ (100 μ M), rapamycin (1 nM), or their combination for 48 h. Remarkably, SOX2 and SOX9 levels were much lower in rapamycin or in combination than in nontreated or TMZ alone cells

(Figure 5H). These results indicate a sensitization of TMZ-resistant cells by rapamycin likely through SOX2 and SOX9 downregulation.

To corroborate the synergistic effect of TMZ and rapamycin on cells with elevated SOX2 and SOX9 expression, we studied their efficacy in tumor formation *in vivo*. Thus, we injected U251 cells in athymic immunodeficient mice subcutaneously since 1 week later the mice received intraperitoneally TMZ (10 mg/kg), rapamycin (5 mg/kg), and combination (10 and 5 mg/kg, respectively) twice per week. In the case of untreated animals, tumors started to be detected 30–40 days after injection and 100% mice developed them after 2 months. In contrast, treatment with rapamycin or TMZ delayed the formation of the tumors, with around 50% of them presenting tumors 2 months after injection. Remarkably, these numbers were lower in the combined treatment group with only 25% of mice with tumors (Figure 5I). Together, these data demonstrate that combining rapamycin with TMZ enhances the efficacy of each one against glioma cells, particularly in the subset with high levels of SOX2 and SOX9.

4. Discussion

Different studies have shown that expression of SOX2 is often increased in glioblastoma and that this upregulation is due to genetic amplification and epigenetic mechanisms.[2, 14–16] Notably, beyond high expression of SOX2 in glioblastoma multiforme (GBM) biopsies, the genetic inhibition of SOX2 expression decreases tumor cell proliferation, causes depletion of self-renewal, and subsequently tumor regression.[18,19] In this study, we have identified that SOX2 inhibition induces cellular senescence in differentiated U251 cells. Moreover, the increased levels of IL1 α observed in *shSOX2* U251 cells suggest that SOX2 might be involved in paracrine senescence.[32] Gangemi and collaborators did not observe an increase in senescence-associated β -galactosidase activity when SOX2 was silenced in human-derived GSCs,[19] indicating that SOX2 might exert different actions within the cellular heterogeneity of the tumor bulk. These results suggest that inactivation of SOX2 in GSCs induces differentiation whilst in differentiated ones facilitates senescence or apoptosis. Moreover, we show that overexpression of SOX2, in addition to promote other relevant phenotypic properties such as invasiveness and migration,[16] is a necessary condition for maintaining GSCs and therefore essential for GBM propagation. Further supporting this notion, SOX2 belongs to the core set of transcription factors (with POU3F2, SALL2, and OLIG2), which are sufficient to reprogram differentiated cells into GSCs.[20] Altogether, these data confirm that tumor cells harboring high levels of SOX2 protein are addicted to it and have dependence on this factor to survive.

In this work, we have identified that SOX2 and SOX9 expression correlates in glioma cells and that the oncogenic activity of SOX2 is at least partially mediated by the latter. In support of these actions, it has been previously shown that SOX9 plays a key role in the regulation of cellular proliferation, senescence, and self-renewal.[26,37,38] Moreover, we show

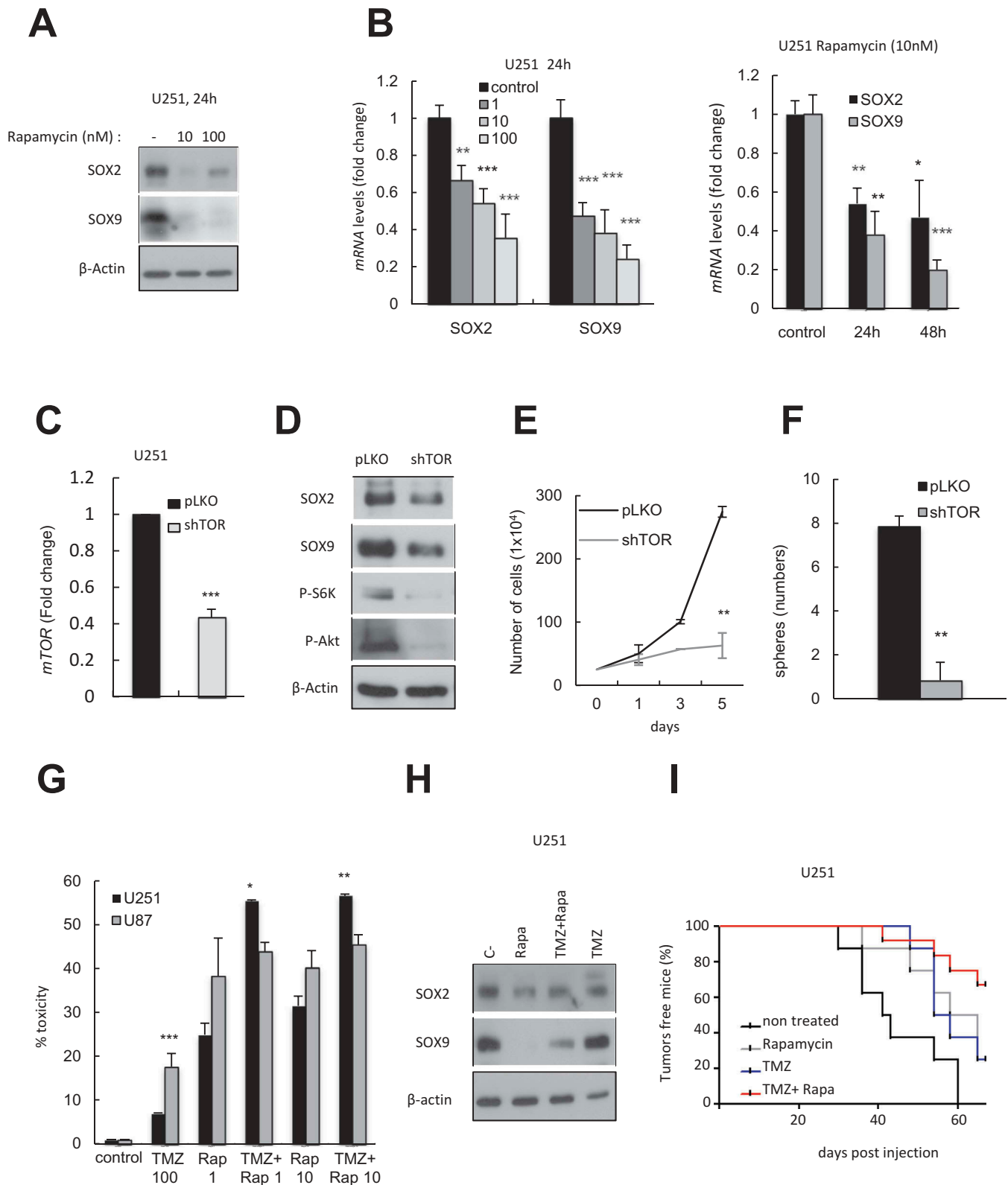


Figure 5. mTOR signaling inhibition reduces SOX2 and SOX9 and cooperates with TMZ.

(A) Representative western blot of the effect of 10 and 100nM doses of rapamycin in SOX2 and SOX9 in U251 cells. (B) Dose (1, 10 and 100nM) and time (24,48 h) dependent effect of rapamycin in SOX2 and SOX9 mRNA levels in U251 cells. (C) *mTOR* mRNA in U251 cells lentivirally transduced with pLKO or *mTOR* shRNA (*shTOR*) ($n = 2$). (D) Representative image of SOX2, SOX9, P-S6 K and P-Akt in the indicated U251 genotypes. (E) Cell growth assay comparing control and *shTOR* ($n = 2$). (F) Sphere formation capacity in *shTOR* and control cells ($n = 2$) (G) MTT assay of U87 and U251 cells cultured with TMZ (100 μ M), rapamycin (1-10nM) and combination of both for 72 h ($n = 3$). (H) Kaplan meier curve showing generation of tumors from subcutaneously injected U251 cells after 12 weeks of treatment with TMZ (10 mg/Kg) ($n = 8$), rapamycin (5 mg/Kg) ($n = 8$) and combination of both (10 mg/Kg and 5 mg/Kg respectively) ($n = 12$). Non-treated ($n = 8$) mice were used as control. LogRank Test is 0.0323 for TMZ, 0.040 for rapamycin and 0.0003 for the combination of both compared to non treated.

that this regulation occurs at post-transcriptional levels and that there is a feedback loop between them. A recent study observed that Sox2 regulates Sox9 protein at the level of mRNA translation in oligodendrocytes, identifying miR-145 as a candidate mediator in this process.[39] It is possible to surmise that the same pathway is acting in glioma cells. Indeed, it has been shown that SOX2 inactivation induces the expression of miR-145,[40] while this miRNA regulates and inhibits SOX9 to function as a tumor suppressor.[25] Our results also highlight that SOX transcription factors act sequentially in the regulation of GSCs, mimicking the action of those in neural lineage development,[18,41] and indicate that SOX2 is a master regulator of GSCs, which together with SOX9 might form a relevant molecular node that sustains tumor maintenance and progression.

TMZ is currently the most efficient chemotherapy for GBM. Indeed, its addition extended patient median survival from approximately 12 to 15 months.[42] Damage generated by TMZ can be repaired by O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), thus inducing treatment resistance, while methylation of the MGMT promoter leads to an increase in TMZ sensitivity. Our results show that cells with high levels of SOX2 are more resistant to TMZ and silencing it sensitizes against this chemotherapeutic agent *in vitro* and *in vivo*. Of note, the cell lines used in our experiments exhibit MGMT promoter hypermethylation status. Given that SOX2 is included in the proneural subset in different glioblastoma classifications [43,44], group that has been demonstrated to be resistant to the conventional therapeutic regimen of radiotherapy and TMZ, SOX2 might be postulated as one of the key terms responsible for resistance to current chemotherapy in glioblastoma. Therefore, targeting the activity of SOX2 may offer a new promising therapeutic treatment modality.

In an effort to identify drugs or molecules that might inhibit efficiently the expression of SOX2 (direct or indirectly), we found that inhibitors of the SHH signaling cascade (cyclopamine) and mTOR (rapamycin) reduced significantly, between 40% and 80%, the activity of SOX2 and SOX9, demonstrating that the pharmacological silencing of SOX2 is feasible using inhibitors of these signaling pathways. It is important to note that SHH and particularly PI3 kinase/mTOR pathways are aberrantly active in a high percentage of glioblastomas.[14] Our results indicate that their action might be modulated through SOX2 and SOX9. Consistent with the strategy to silencing SOX2 activity in glioma, downregulation of SOX2 conferred sensitivity to treatment with platelet-derived growth factor and IGF1 receptor inhibitors [44] and vaccination with Sox2 peptides elicited a response that significantly delayed tumor development in mice,[45] underscoring the feasibility of using SOX2 as a target in different therapeutic approaches. Furthermore, it has been shown that elevated expression of SOX2 protein desensitizes tumor cells to current therapies present in the clinic such as hormone therapy in breast cancer [46] and chemotherapy in medulloblastoma.[47]

A growing number of evidence indicates that combining drugs with chemotherapeutic agents is becoming a more effective therapeutic option in cancer. Our results identified

that the concomitant treatment of rapamycin and TMZ exerted a higher cytotoxic effect *in vitro* and *in vivo* in cells expressing endogenous high levels of SOX2-SOX9, suggesting that the addition of rapamycin to TMZ treatment could potentially enhance the efficacy of this therapy against human glioblastoma, particularly in the subset of patients whose biopsies express elevated levels of SOX2 and SOX9.

Clinically, we have observed that there is a strong correlation between SOX2 and SOX9 expression in patient biopsies. Independent studies demonstrated that elevated levels of SOX2 and SOX9 are associated with a subgroup of patients with lower median survival and also that they are part of a signature of stem cell markers related with worse prognosis in glioblastoma.[17,24] Our results, together with this evidence, demonstrate that the assessment of the activity of SOX2-SOX9 might be a useful prognostic and predictive marker in glioblastoma. Moreover, our results postulate the incorporation of the expression of SOX factors to patient stratification and the concept of personalized medicine, providing a rationale for the combination of rapamycin with TMZ in glioblastoma, particularly in the subset of patients with high levels of SOX2 and SOX9.

Acknowledgements

We thank the Histology and Biostatistics Platform of the Biodonostia Health Research Institute for their help.

Financial and competing interests disclosure

The authors were supported by grants from the Industry Department of Basque Government under grant numbers SAIO13-PC11BN002 awarded to A Matheu, 12-PE12BNO13 awarded to N Sampron and SAIO13-PC13BN011 awarded to I Garcia; the Association for International Cancer Research (AICR) under grant number 13-1270 awarded to R Lovell-Bade and A Matheu; the Spanish Ministry of Economy and Competition and FEDER Funds under grant numbers CP10/00539 and PI13/02277; and the European Union under Marie Curie Career Integration Grant 2012/712404, Pyrenees Biomedical Network 13/BIOD/009 and 13/BIOD/011 awarded to A Matheu. Authors Laura Garros-Regulez, Olatz Arrizabalaga and Leire Moreno-Cugnon are in receipt of a predoctoral fellowship from the Department of Education, University and Research of the Basque Government. Paula Aldaz is in receipt of a predoctoral fellowship from the Spanish Association Against Cancer (AECC Gipuzkoa). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
 - of considerable interest
1. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 [Mar 10];352(10):987–996.
 - **First evidence of the benefit of temozolomide in glioblastoma patient survival.**

2. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013 [Oct 10];155(2):462–477.
3. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014 [Jun 20];344(6190):1396–1401.
4. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004 [Nov 18];432(7015):396–401.
5. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006 [Dec 7];444(7120):756–760.
6. Chen J, Li Y, Yu T-S, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012 [Aug 23];488(7412):522–526.
7. Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*. 2013 [Jan 3];12(1):15–30.
- **This excellent review describing the functions of SOX genes in homeostasis and disease.**
8. De La Rocha AM, Sampron N, Alonso MM, et al. Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res*. 2014;4(4):312–324.
9. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003 [Jan 1];17(1):126–140.
10. Favaro R, Valotta M, Ferri AL, et al. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1248–1256.
- **This paper demonstrates the importance of Sox2 in neural stem cells.**
11. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 [Aug 25];126(4):663–676.
12. Eminli S, Utikal J, Arnold K, et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*. 2008 Oct;26(10):2467–2474.
13. Han DW, Tapia N, Hermann A, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*. 2012 [Apr 6];10(4):465–472.
14. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008 [Oct 23];455(7216):1061–1068.
- **This paper demonstrates the most common genetic mutations and molecular alterations in glioblastoma.**
15. Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, et al. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics*. 2011 May-Jun;8(3):139–147.
16. Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, et al. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One*. 2011;6(11):e26740.
17. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):499–507.
18. Ikushima H, Todo T, Ino Y, et al. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell*. 2009 [Nov 6];5(5):504–514.
19. Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, et al. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells*. 2009;27(1):40–48.
- **This paper was the first demonstration that SOX2 regulates the activity of glioma stem cells.**
20. Suva ML, Rheinbay E, Gillespie SM, et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*. 2014 [Apr 24];157(3):580–594.
21. Scott CE, Wynn SL, Sesay A, et al. SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2010 Oct;13(10):1181–1189.
22. Stolt CC, Lommes P, Sock E, et al. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev*. 2003 [Jul 1];17(13):1677–1689.
23. Kordes U, Hagel C. Expression of SOX9 and SOX10 in central neuroepithelial tumor. *J Neuro-Oncol*. 2006 Nov;80(2):151–155.
24. Wang L, He S, Yuan J, et al. Oncogenic role of SOX9 expression in human malignant glioma. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(5):3484–3490.
25. Rani SB, Rathod SS, Karthik S, et al. MiR-145 functions as a tumor-suppressive RNA by targeting Sox9 and adducin 3 in human glioma cells. *Neuro Oncol*. 2013 Oct;15(10):1302–1316.
26. Swartling FJ, Savov V, Persson AI, et al. Distinct neural stem cell populations give rise to disparate brain tumors in response to N-MYC. *Cancer Cell*. 2012 [May 15];21(5):601–613.
- **This paper describes the role of SOX9 in neural stem cell transformation and brain tumors.**
27. Poche RA, Furuta Y, Chaboissier M-C, et al. Sox9 is expressed in mouse multipotent retinal progenitor cells and functions in Muller glial cell development. *J Comp Neurol*. 2008 [Sep 20];510(3):237–250.
28. Vong KI, Leung CK, Behringer RR, et al. Sox9 is critical for suppression of neurogenesis but not initiation of gliogenesis in the cerebellum. *Mol Brain*. 2015;8(1):25.
29. Carrasco-Garcia E, Arrizabalaga O, Serrano M, et al. Increased gene dosage of Ink4/Arf and p53 delays age-associated central nervous system functional decline. *Aging Cell*. 2015 [May 20];14:710–714.
30. Etxaniz U, Perez-San Vicente A, Gago-Lopez N, et al. Neural-competent cells of adult human dermis belong to the Schwann lineage. *Stem Cell Reports*. 2014 [Nov 11];3(5):774–788.
31. Yu S-C, Ping Y-F, Yi L, et al. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett*. 2008 [Jun 28];265(1):124–134.
32. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013 Aug;15(8):978–990.
33. Carrasco-Garcia E, Sampron N, Aldaz P, et al. Therapeutic strategies targeting glioblastoma stem cells. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2013 Sep;8(3):216–227.
34. Wang S, Xia P, Ye B, et al. Transient activation of autophagy via Sox2-mediated suppression of mTOR is an important early step in reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2013 [Nov 7];13(5):617–625.
35. Pachow D, Wick W, Gutmann DH, et al. The mTOR signaling pathway as a treatment target for intracranial neoplasms. *Neuro Oncol*. 2015 Feb;17(2):189–199.
36. Galan-Moya EM, Le Guelte A, Lima Fernandes E, et al. Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway. *EMBO Reports*. 2011 May;12(5):470–476.
37. Matheu A, Collado M, Wise C, et al. Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Res*. 2012 [Mar 1];72(5):1301–1315.
38. Wang G, Lunardi A, Zhang J, et al. Zbtb7a suppresses prostate cancer through repression of a Sox9-dependent pathway for cellular senescence bypass and tumor invasion. *Nat Genet*. 2013 Jul;45(7):739–746.
39. Hoffmann SA, Hos D, Kuspert M, et al. Stem cell factor Sox2 and its close relative Sox3 have differentiation functions in oligodendrocytes. *Development*. 2014 Jan;141(1):39–50.
40. Fang X, Yoon J-G, Li L, et al. The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis. *BMC Genomics*. 2011;12:11.
41. Bergsland M, Ramsköld D, Zaouter C, et al. Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes Dev*. 2011 [Dec 1];25(23):2453–2464.
42. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):459–466.

43. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 [Jan 19];17(1):98–110.
44. Hagerstrand D, He X, Brdic Lindh M, et al. Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile. *Neuro Oncol*. 2011 Nov;13(11):1178–1191.
45. Favaro R, Appolloni I, Pellegatta S, et al. Sox2 is required to maintain cancer stem cells in a mouse model of high-grade oligodendroglioma. *Cancer Res*. 2014 [Mar 15];74(6):1833–1844.
46. Piva M, Domenici G, Iriondo O, et al. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2014 Jan;6(1):66–79.
47. Vanner RJ, Remke M, Gallo M, et al. Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma. *Cancer Cell*. 2014 [Jul 14];26(1):33–47.