

**IDENTIFICACIÓN DE LA FUNCIÓN Y EL MECANISMO
MOLECULAR DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX9 COMO
REGULADOR DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES.
PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS.**

PAULA ALDAZ DONAMARIA

DIRECTOR

ANDER MATHEU FERNÁNDEZ

TESIS DOCTORAL

2017

A mi ama y a mi aita

“Carpe diem, quam minimum credula postero”

Horacio (*Odas*, I, 11)

AGRADECIMIENTOS

Con estas palabras quería agradecer a aquellas personas que me han hecho llegar hasta aquí y que han estado acompañándome de una forma u otra en esta etapa de mi vida.

En primer lugar, gracias a mi director, Ander Matheu, por darme la oportunidad de empezar a trabajar en tu grupo. Gracias por haberme seleccionado como tu primera doctoranda cuando aún estabas formando el grupo, y haberme permitido ser parte de él y verlo crecer y mejorar durante estos años. Gracias por haber confiado en mí, por ser tan cercano y comprensivo y mostrar siempre esa motivación ante el trabajo. Espero haber estado a la altura de tus expectativas.

Quería agradecer a todo el personal de Biodonostia que de una manera u otra han colaborado para que este trabajo salga adelante. Al personal del Hospital Donostia del comité de neuro-oncología que ha colaborado en el proyecto, y agradecer también a la AECC Gipuzkoa por su contribución y buen hacer.

En cuanto a Biodonostia y empezando por la planta 0, gracias en especial a Marisabel, Andrea, Beñat y Amaia por haberme ayudado con los trámites que hubiera necesitado en su día. Gracias Puy por tu ayuda y por la alegría que transmites. No podía olvidarme del gran poeta y rockero Jose, gracias por toda la paciencia y ayuda, contribuyes a la ciencia mucho más de lo que imaginas, formando parte de los engranajes del centro que hace que todo funcione, además de aportar personalidad al centro y alegría con tus emails característicos.

Mencionar también al resto de grupos, Neurociencias, a los vecinos de Hepato y Bioingeniería y al personal de plataformas, gracias Goros, Aias, Mariasun, Vir, Nahikari y Maialen. Gracias a Pili, David e Izeta por vuestra profesionalidad, cercanía y buen humor y a Luci por tus consejos “naturales”. Gracias Haizea por tu “dulzura” personal y material. Siempre has estado ahí en la sombra y has aparecido con algún detalle en los momentos difíciles, eres encantadora. Gracias a todos los Prins, con los que tan buenos momentos compartí en los inicios, y a Erika e Ibai por sus bailes, risas y colegeo. Quería mencionar también a gente que ya no está en el centro pero con la que estoy encantada de haber coincidido y seguir manteniendo contacto, como Ane, Peio, Haritz y mi Belenzzita.

Gracias también a todo el grupo de Onco-Lawrie, en especial a Lorea y María por haberme ayudado sobre todo en los inicios. El dúo de Angela y María, espero que compartamos más carreras en el futuro. También a Sergio, por tu ayuda y enseñanza en las cirugías eternas. A Natalia y Arkaitz, por vuestra efectividad y simpatía, y por dejarme formar parte de vuestro gran equipo. Ahora ya me toca mencionar a mi grupo. Empezaré con Lidia, que es la persona que me acogió y me enseñó desde un principio. Gracias Lidi por esa acogida, por tu simpatía y personalidad que te caracterizan, y por hacerme los días más alegres con tus “buenos días princesa”. También mencionar a los “txikis” que os vais haciendo mayores; Laura, Leire, Juncal, Jaione, y mi querido Mr Firefly, gracias por la ayuda prestada cuando lo he necesitado. Gracias Ido y Olatz por vuestra ayuda a nivel laboral y por las risas y tantos buenos momentos que hemos compartido en la pecera, y los que espero que compartamos fuera de ella.

Estitxu, tú te mereces unas líneas exclusivas. Muchísimas gracias por todo, sabes que la mitad de esta tesis te pertenece. Eres igual de buena profesional que de buena persona. Me has ayudado desde el inicio a nivel laboral y a nivel personal. Prácticamente empezamos juntas y has estado cada día a mi lado para escucharme, asesorarme, para hacerme reír y sacar lo mejor de mí. Has sido mucho más que una compañera, has sido mi “cónyuge laboral” durante todo este tiempo. No tengo palabras suficientes para agradecerte. Sé que esta amistad “navarrika-alicantina” no acaba con esta tesis.

A pesar de no estar en el laboratorio, hay mucha gente que ha hecho que estos cinco años en Donosti sean inolvidables; Leire, Oihane, Petra y Guille, he compartido confidencias y buenos momentos con vosotros. Beñat y Maitane, gracias por haberme descubierto los secretos de esta ciudad maravillosa, por haberme hecho sentir como en casa y haberme presentado a gente tan maja y dejarme compartir con vosotros momentos de *Larramendi shore*.

Gracias también a mi cuadrilla de Atarrabia, por acompañarme en el camino, sobre todo a las *neskak*; Itzi, Sanz, Ekhi, Maite, Olaia, Iri, Jai, Maien y Amaia por preocuparos por mí todos estos años. También a Adrienne, Elena y Andrea, por las escapadas anuales que tanta vitalidad me aportan. No quiero dejar de mencionar a Julen, Friedemann y Alex, porque también me habéis acompañado en éste y muchos otros viajes.

Qué decir de mis Leires... Neri y Lei, gracias por comprenderme y asesorarme tan bien, en lo laboral y en lo personal. Estáis siempre ahí, en lo bueno y en lo malo, sabéis que sois muy importantes en mi vida. Espero que los *akelarres* sigan por muchos años. Gracias Azne por estar ahí a pesar de la distancia.

También quería mencionar a Patxi Arregui, a quien considero mi “padre profesional”, por apoyarme en mi andadura profesional y preocuparse de los pasos que doy.

A mis primas y tía Nati, por desgraciadamente darle valor personal a esta tesis, y hacerme ser consciente del valor de la investigación. A mi abuelo Tomás, que te despediste a mitad de camino, sé que estarías orgulloso de mí.

Andrea y Aritz, por ser tan buenos conmigo y porque siempre estáis ahí para acogerme y aguantarme. Adur, quien tantas alegrías me da y tantas sonrisas me saca solamente con su presencia. Algún día espero que seas consciente de todo lo que me has aportado en este tiempo. Y Arhane, que sigues el mismo camino. Gracias Andre, por acompañarme siempre, sabes que eres un pilar de mi vida.

Ama, gracias por tu colaboración particular con la ciencia.

Aita y ama, gracias por todos los valores que me habéis inculcado, por la educación que me habéis dado, por haberme ayudado a ser quien soy. Porque me habéis dado todo a cambio de nada. Gracias por vuestro amor incondicional. Sois mi ejemplo a seguir. Sólo os puedo dar las gracias una vez más.

Eskerrik asko

RESUMEN

A pesar de los avances en los tratamientos del cáncer, muchos tumores presentan resistencias, recurren y se diseminan, comprometiendo la supervivencia de los pacientes. Una de las características de los tumores que tiene un impacto directo muy relevante en la metástasis y en el fracaso de las terapias es la heterogeneidad tanto genética, molecular como celular. La heterogeneidad celular se debe fundamentalmente a la existencia de una subpoblación celular de células madre tumorales (CMT), que es la responsable de la iniciación tumoral, la metástasis, la resistencia a las terapias y la recurrencia.

La desregulación de genes esenciales en el desarrollo embrionario, fundamentales en el mantenimiento de las células madre, parece ser crítica en el mantenimiento de las CMT y en el desarrollo y progresión de los tumores.

En este trabajo hemos identificado que la expresión del factor de transcripción SOX9 está enriquecida en las CMT y que su elevada expresión en biopsias tumorales se asocia a menor supervivencia de los pacientes de glioblastoma (GBM). Mediante estudios de análisis de transcriptoma en CMT con silenciamiento de SOX9 hemos identificado que STAT3 y PML son dianas de SOX9. En línea con este resultado hemos identificado que la expresión de SOX9 está asociada a la de STAT3 y PML en CMT y en muestras de pacientes con cáncer de mama y GBM. El silenciamiento genético individual de cada uno de ellos reduce significativamente propiedades malignas como la proliferación, la capacidad de auto-renovación y la actividad tumorigénica, tanto de las células tumorales, como de las CMT, demostrando que son necesarios para el mantenimiento de las CMT. Además, hemos demostrado que existe un bucle regulatorio entre ellos.

Asimismo, hemos observado que inhibidores farmacológicos específicos de SOX9, STAT3 y PML suponen un detrimento en la actividad de las CMT, reduciendo la iniciación y progresión tumoral.

En global, nuestros resultados demuestran que SOX9-STAT3-PML es un eje de señalización crítico en el mantenimiento de las CMT, postulando que su inhibición es una estrategia prometedora para combatir la resistencia a la quimioterapia en el caso de GBM, y la progresión metastásica en el caso de cáncer de mama.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	17
RESUMEN	21
ÍNDICE.....	25
ABREVIATURAS.....	31
INTRODUCCIÓN.....	37
EL CÁNCER.....	39
HETEROGENEIDAD TUMORAL.....	39
HETEROGENEIDAD INTER-TUMORAL.....	40
HETEROGENEIDAD INTRA-TUMORAL.....	41
CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	45
HISTORIA DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	45
CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	48
MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN O AISLAMIENTO.....	52
ORIGEN DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	54
MODELOS TUMORALES PARA EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	56
GLIOBLASTOMA.....	56
CÁNCER DE MAMA.....	64
REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES.....	70
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SOX.....	70
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX9.....	72
OBJETIVOS.....	75
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
CULTIVO CELULAR.....	81
CULTIVO PRIMARIO DE MUESTRAS DE PACIENTES DE GLIOBLASTOMA.....	81
LÍNEAS CELULARES.....	83
MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE INFECCIÓN LENTIVIRAL.....	85
ENSAYOS FUNCIONALES.....	86
ENSAYOS <i>IN VIVO</i> DE CARCINOGENÉISIS.....	89
GENERACIÓN DE TUMORES SUBCUTÁNEOS.....	89

GENERACIÓN DE TUMORES CEREBRALES MEDIANTE ESTEREOTAXIA.....	90
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	91
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	91
WESTERN BLOT	92
INMUNOFLUORESCENCIA	94
INMUNOHISTOQUÍMICA.....	95
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	98
MUESTRAS HUMANAS DE PACIENTES DE GLIOBLASTOMA	98
EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	98
TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)	99
PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)	99
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE <i>MICROARRAYS</i>	101
INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP).....	101
BASE DE DATOS DE PACIENTES Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	102
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	103
CONSIDERACIONES ÉTICAS	103
RESULTADOS	105
NIVELES DE EXPRESIÓN DE SOX9 ELEVADOS EN MUESTRAS DE PACIENTES Y CÉLULAS MADRE DE GLIOMA	107
LA SOBRE-EXPRESIÓN DE SOX9 AUMENTA LAS CARACTERÍSTICAS TUMOROGÉNICAS EN GLIOBLASTOMA.....	113
EL SILENCIAMIENTO DE SOX9 REDUCE LAS CARACTERÍSTICAS TUMOROGÉNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES	118
IMPLICACIÓN DE LA VÍA JAK2/STAT3 EN LA REGULACIÓN DE SOX9 EN LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES	123
STAT3 REGULA LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES	127
NIVELES ELEVADOS DE EXPRESIÓN DE SOX9 CORRELACIONAN CON STAT3 Y PML EN CÉLULAS MADRE TUMORALES	131
EL SILENCIAMIENTO DE PML REDUCE EL POTENCIAL TUMOROGÉNICO	138
INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE PML.....	142
SILENCIAMIENTO CONJUNTO DE PML Y SOX9	146
LA RE-EXPRESIÓN DE SOX9 RESTAURA EL FENOTIPO TUMORAL.....	147
PML REGULA LA EXPRESIÓN DE SOX9 EN GLIOBLASTOMA Y EN CÁNCER DE MAMA	150

DISCUSIÓN.....	151
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA.....	179
ANEXO I	209
Publicaciones relacionadas con la tesis.....	209

ABREVIATURAS

ABTA: American Brain Tumor Association (Asociación Americana de Tumores Cerebrales)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AECC: Asociación Española Contra el Cáncer

ALDH1: Aldehído deshidrogenasa 1

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATCC: American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)

ATO: Trióxido de Arsénico (As_2O_3)

ATP: Adenosina trifosfato

BCA: Ácido bicinconínico

BCRP: Breast Cancer Resistance Protein (Proteína de resistencia en Cáncer de Mama)

BCSC: Breast Cancer Stem Cell (Célula Madre Tumoral de cáncer de mama)

BHE: Barrera hematoencefálica

BSA: Bovine serum albumin. Albúmina de suero bovino.

CAF: Cancer-Associated Fibroblast (Fibroblasto asociado al cáncer)

CD: Cluster de diferenciación

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

ChIP: Chromatin Immunoprecipitation (Inmunoprecipitación de cromatina)

CMT: Célula Madre Tumoral (Cancer Stem Cell o CSC)

CSC: Cancer Stem Cell (Célula madre del cáncer o célula madre tumoral)

DAB: 3,3'Diaminobenzidina

DAPI: 4,6-Diamino-2-fenil-indol

DDR: DNA Damage Response (Respuesta al Daño en el ADN)

D.E: Desviación Estándar

DEPC: Dietil pirocarbonato

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTPs: Desoxi nucleótidos trifosfatos

ECL: Enhanced Chemical Luminiscence (Luminiscencia química potenciada)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid (Acido Etileno Diamino Tetracético)

EEC: Consejo Comunidades Europeas

EGF: Epidermal Growth Factor (Factor de crecimiento epidérmico)

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)

ELDA: Extreme Limiting Dilution Analysis (Análisis de dilución extrema limitante)

EMC: Erasmus Medical Center

EMT: Epithelial to mesenchymal transition (Transición epitelio-mesenquimal)

ER: receptor de estrógeno

EUROCARE: EUROpean CANcer REgistry-based study on survival and CARE (Registro Europeo del cancer)

ESC: Embryonic Stem Cell (célula madre embrionaria)

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting (fluorescencia mediante citometría de flujo)

FGF: Fibroblast Growth Factor (Factor de crecimiento de fibroblastos)

FDA: Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa)

GBM: Glioblastoma Multiforme

GFP: Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente)

GNS: Glioma Neural Stem (Célula madre neural)

GSC: Glioma Stem Cell (Célula madre de glioma)

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis (Análisis de enriquecimiento en grupos de genes)

H-E: Hematoxilina – Eosina

HER2: Human Epidermal Growth Factor

Receptor 2 (Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano)

HIF: Factor Inducible por Hipoxia

HMG: High Movility Group (Grupo conservado de alta movilidad)

HSC: Hematopoyetic Stem cell (célula madre hematopoyética)

HUD: Hospital Universitario Donostia

IARC: International Agency for Research on Cancer (Agencia internacional para la investigación del cáncer)

IC: Intervalo de confianza

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

IFN: Interferón

IHQ: Inmunohistoquímica

IPA: Interactive Pathway Analysis (Análisis interactivo de vías)

iPSC: Induced Pluripotent Stem Cell (Célula madre pluripotente inducida)

JK: Janus kinasa

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

LPA: Leucemia Promielocítica Aguda

LIC: Leukemia Initiating Cell (Célula iniciadora de leucemia)

LIF: Leukemia inhibitory fator (Factor Inhibidor de Leucemia)

LSC: Leukemia Stem Cell (Célula madre de leucemia)

MACS: Magnetic-Activated Cell Sorting (Clasificación celular mediante separación magnética)

MET: Mesenchymal to Epithelial Transition (Transición mesénquima-epitelial)

MGMT: Metil Guanina Metil Transferasa

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin (diana de rapamicina en células de mamífero)

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio

M.O.I.: Multiplicity Of Infection (Multiplicidad de infección)

MRC: Centre for Regenerative Medicine and Edinburgh Cancer Research Centre, University of Edinburgh (Centro de Medicina Regenerativa del Consejo de Investigación Médica de Edimburgo)

MSK: Memorial Sloan Kettering Cancer Center

NB: Nuclear Bodies (Cuerpos nucleares)

NF1: Gen de Neurofibromatosis

NIH: National Institutes of Health (Instituto Nacional de Salud)

NOD-SCID: Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (Diabético no obeso con inmunodeficiencia combinada severa)

NSC: Neural Stem Cell (Célula madre neural)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la ADN polimerasa)

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor (Receptor de factores de crecimiento derivados de plaquetas)

PDX: Patient derived xenograft (xenotrasplante derivado de paciente)

PH3: Phospho Histone-3 (Fosfo histona-3)

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase (fosfatidilinositol 3 quinasa)

PMSF: Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo)

PML: Gen de la Leucemia promielocítica (Promyelocytic Leukemia gen)

PR: Receptor de Progesterona

PPAR- γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas)

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

Q-RT-PCR: Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (Reacción en cadena de la ADN polimerasa cuantitativa a tiempo real)

Rapa: Rapamicina

RAR α : Retinoic Acid Receptor (Receptor ácido retinoico)

RB: Retinoblastoma

RCF: Fuerza Centrífuga Relativa

RPM: Revoluciones Por Minuto

RTK: Receptor tirosina quinasa

RT-PCR: Real-Time Reverse Transcription PCR (Transcripción Reversa – Reacción en cadena de la ADN polimerasa)

SBF: Suero Bovino Fetal

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

SEM: Error estándar de la media

shARN: Short hairpin RNA

SHH: Sonic Hedgehog

SNC: Sistema Nervioso Central

SP: Side Population (Población lateral)

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription (Transductor de señales y activador de la transcripción)

SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier (Modificación por proteínas modificadoras similares a ubiquitina pequeñas)

SVZ: Subventricular Zone (Zona subventricular)

TA: Transient Amplifying cell (célula amplificadora transitoria)

TBS: Tris Buffered Saline (Tampón Tris Salino)

TCGA: The Cancer Genome Atlas (Atlas del Genoma del Cáncer)

TEM: Transición Epitelio-Mesenquimal

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletileno diamina

TGF- β : Transforming Growth Factor β (Factor de crecimiento transformante β)

TK: Tirosina quinasa

TMA: Tissue Microarray (*microarray* tisular)

TMZ: Temozolomida

TRIM: Tripartite Motif family (familia de motivos tripartitos)

T-TBS: Solución Tris-salino con Tween-20

USB: University Hospital of Basel (Hospital Universitario de Basel, Suiza)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)

WB: Western Blot

WHO: World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil b-D-galactósido

INTRODUCCIÓN

EL CÁNCER

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En 2012 se registraron 14 millones nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer [Figura 1]. Además, la incidencia del cáncer va en aumento y se prevé que el número de nuevos casos anuales alcance los 22 millones en los próximos 20 años (WHO, 2012).

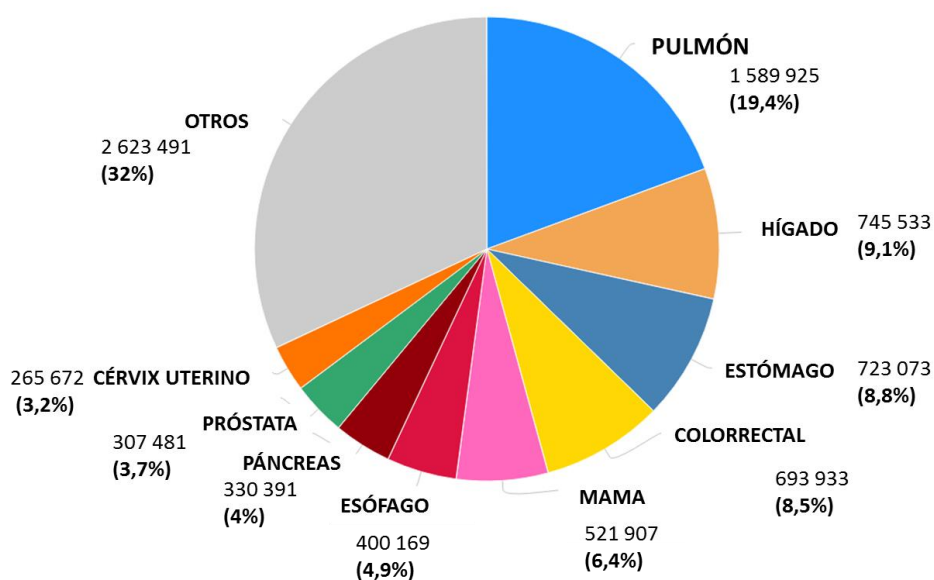


Figura 1. Mortalidad por cáncer en ambos sexos a nivel mundial en 2012. Fuente: Globocan 2012, IARC 2016.

HETEROGENEIDAD TUMORAL

El cáncer se origina por la transformación maligna de células normales. Esa transformación en célula tumoral es un proceso multifásico resultado de la interacción entre factores genéticos y agentes externos que producen la acumulación de alteraciones genéticas, epigenéticas y transcripcionales.

A pesar de que el cáncer es extremadamente heterogéneo a múltiples niveles, en el año 2000 Hanahan y Weinberg propusieron un modelo que define las seis propiedades que adquieren y caracterizan a las células tumorales: potencial replicativo ilimitado, independencia de señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores de crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida y capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000). Con posterioridad, los autores tuvieron en cuenta progresos conceptuales de la última década como son el esquema integrador de las redes de señalización intracelular implicadas en la regulación del sistema inmune y también las alteraciones del metabolismo energético tumoral. En consecuencia, incorporaron al modelo la reprogramación del metabolismo energético, la inestabilidad genómica, la inflamación y la inmunoevasión (Hanahan and Weinberg, 2011).

Conviene destacar que tras estos aspectos distintivos que las células tumorales comparten, subyacen mecanismos moleculares algunos de los cuales pueden ser comunes en diferentes tipos de cáncer y cuya identificación puede conducir a la validación de dianas moleculares de utilidad en varios tipos tumorales.

A pesar de los avances en los tratamientos del cáncer, muchos tumores presentan resistencias a tratamientos terapéuticos, recurren y se diseminan, comprometiendo la supervivencia de los pacientes. Una de las características de los tumores que tiene un impacto directo muy relevante en esos aspectos es la heterogeneidad fenotípica y funcional, tanto inter como intra-tumoral.

HETEROGENEIDAD INTER-TUMORAL

Existe una alta heterogeneidad molecular entre los tumores de un mismo tipo en diferentes pacientes. Esta heterogeneidad inter-tumoral radica en una amplísima variedad de alteraciones moleculares genéticas y epigenéticas, las cuales conllevan diferencias fenotípicas muy importantes que definen diferentes respuestas a los tratamientos y diferentes evoluciones y pronósticos.

El origen en sí del tumor es ya un factor que puede contribuir a la heterogeneidad, pues los tumores de un mismo tejido pueden proceder de diferentes tipos celulares (Visvader, 2011). Independientemente de ello, la evolución tumoral constituye una fuente fundamental de heterogeneidad, ya que es un proceso muy aleatorio y dinámico en el que se suceden infinidad de alteraciones moleculares diferentes, y que además, está influenciado por factores extrínsecos del microambiente tumoral como por ejemplo las interacciones entre las células tumorales y el estroma (Tlsty & Coussens 2006).

Esta heterogeneidad molecular implica diferencias muy importantes en la respuesta de los pacientes a los tratamientos, supone dificultades para la clasificación molecular de los tumores y subraya la necesidad de identificar biomarcadores para la estratificación de los pacientes y su tratamiento personalizado. Con este objetivo se estableció el Atlas del Genoma del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA), un consorcio de instituciones internacionales dedicado a identificar las alteraciones moleculares de los tumores para crear mapas multidimensionales completos de los cambios genómicos clave en los diferentes tipos y subtipos principales de cáncer (www.cancer.gov, NIH).

HETEROGENEIDAD INTRA-TUMORAL

Por otra parte, la heterogeneidad que se da dentro de un mismo tumor o heterogeneidad intra-tumoral, plantea dificultades en la caracterización del tumor y en el diseño de terapias efectivas, promueve el fenómeno de la resistencia a los tratamientos y en consecuencia contribuye a la recurrencia y a la progresión de la enfermedad. Los avances en la secuenciación del genoma han demostrado que el cáncer en un único paciente es una mezcla heterogénea de subclones celulares tumorales genéticamente distintos (Burrell et al., 2013) que presentan diferencias fenotípicas a múltiples niveles como la morfología celular, el metabolismo o la capacidad motil, proliferativa, angiogénica, inmunogénica o metastásica. Además, se ha observado que existen subclones genéticamente distintos en el tumor primario y en la metástasis de un mismo paciente, hecho que añade un grado mayor de complejidad para establecer estrategias terapéuticas efectivas (Ding et al., 2010; Vignot et al., 2013).

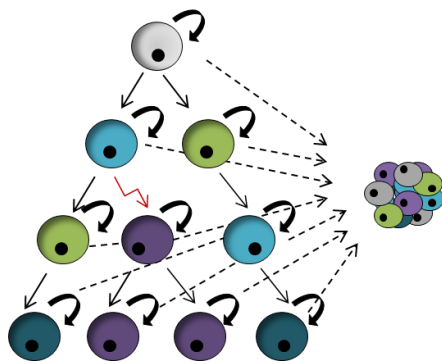
La distribución de estas poblaciones celulares heterogéneas en los tumores varía de una manera dinámica fruto de la **evolución clonal**, en la que cambios genéticos y epigenéticos aleatorios producen nuevos fenotipos que quedan sometidos a la presión de la selección natural. De esta manera, los clones tumorales que presentan las características más óptimas de acuerdo al medio, se expandirán y desplazarán a los demás, experimentando a su vez nuevos cambios que perpetuarán la heterogeneidad (Greaves and Maley, 2012; Nowell, 1976). En este proceso de evolución tumoral la *plasticidad celular* constituye una fuente de heterogeneidad no heredable que también promueve las diferencias fenotípicas entre las células tumorales (Marusyk and Polyak, 2010) y que tiene implicaciones muy importantes en la resistencia a las terapias y la diseminación metastásica (Marusyk et al., 2012). Otro aspecto importante en la evolución tumoral es el fenómeno de la *cooperatividad interclonal*, por la que diferentes clones establecen interacciones funcionales entre sí, que son clave para la promoción del crecimiento tumoral y el mantenimiento de la heterogeneidad (Bonavia et al., 2011; Lyons et al., 2008).

Dentro de la elevada heterogeneidad celular característica que presentan los tumores, se ha hallado una subpoblación celular de células tumorales con características de célula madre, las denominadas **células madre tumorales** (CMT).

Este hallazgo provocó el surgimiento del **modelo de las células madre tumorales (CMT)** de la iniciación y evolución del cáncer. Este modelo parte de la base de que las CMT son las células de origen de los tumores y propone una *organización jerárquica* en la cual el tumor es generado a partir de una CMT, la cual mediante divisiones simétricas y asimétricas auto-renueva su población y genera células hijas más diferenciadas y con propiedades de proliferación limitada que constituyen el grueso de tumor (Parker et al., 2015; Reya et al., 2001) [Figura 2]. Este modelo no invalida el concepto de la evolución clonal en la progresión tumoral, pero distingue además una jerarquía celular en la que las CMT constituyen el origen del tumor y son una gran fuente de heterogeneidad debido a que tienen capacidad de auto-renovación indefinida y elevada plasticidad, pudiendo producir células con diferentes grados de diferenciación y también experimentar procesos

de transdiferenciación dando lugar a células altamente invasivas con fenotipo mesenquimal (Liu et al., 2014; Ricci-Vitiani et al., 2008) o incluso células del estroma como pericitos o células endoteliales (Cheng et al., 2013). Dadas estas capacidades y otras características intrínsecas que se detallarán en el apartado posterior, las CMT constituyen dianas críticas en el tratamiento del cáncer, pues crecientes evidencias indican que son responsables de la iniciación, el mantenimiento y la progresión tumoral.

MODELO ESTOCÁSTICO O DE EVOLUCIÓN CLONAL



MODELO JERÁRQUICO DE CÉLULA MADRE TUMORAL (CMT)

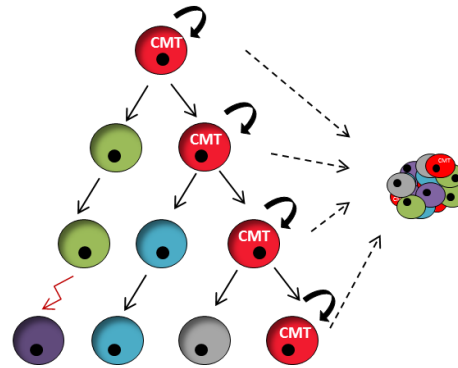


Figura 2. Modelos principales de heterogeneidad tumoral. (A) De acuerdo con la teoría de la evolución clonal, las alteraciones somáticas que afectan a la célula de origen inicial dan lugar a múltiples clones, con distinta sensibilidad a las terapias y capacidad para proliferar y sobrevivir. Estos clones celulares del tumor son genéticamente inestables, sufren alteraciones genéticas, y los clones con el fenotipo más agresivo serán los que resistan a las terapias. Todas las células del tumor tienen la capacidad de mantener y expandir el tumor. **(B)** El modelo de células madre defiende que solamente una población minoritaria conocida como células madre tumorales (CMT) posee la capacidad de auto-renovación y proliferación ilimitada que da lugar a clones de perfiles genéticos muy distintos.

Además de células cancerosas, los tumores contienen otros tipos celulares como células del sistema inmune, células endoteliales de los vasos sanguíneos circundantes y células del estroma como fibroblastos o pericitos, las cuales conforman el denominado **microambiente tumoral**, un ecosistema complejo en el que las células tumorales y las células no tumorales se comunican e influyen entre sí (Junttila & de Sauvage 2013). En la actualidad se conoce que el efecto del microambiente es muy relevante para la progresión del tumor. Un claro ejemplo es la inducción de angiogénesis que las células

tumorales promueven y que les permite abastecerse de nutrientes y oxígeno, además de diseminarse vía sanguínea (Hanahan and Weinberg, 2011). De hecho, existen actualmente ensayos clínicos con terapias dirigidas a inhibir esta neoangiogénesis mediante anticuerpos neutralizantes del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) emitido por las células tumorales (Jayson et al., 2016). Otra clara demostración de la relevancia del microambiente es el hecho de que a día de hoy algunas terapias antitumorales que se están estudiando están dirigidas a células del estroma como por ejemplo los denominados fibroblastos asociados al cáncer o *CAFs*, los cuales, como resultado de su contexto, son fenotípica y funcionalmente diferentes de los fibroblastos normales y promueven la proliferación y la capacidad invasiva de las células tumorales (Calgani et al., 2016).

Por lo tanto, diferentes mecanismos contribuyen a la heterogeneidad intratumoral, incluyendo mutaciones genéticas, el microambiente y la existencia de subpoblaciones de células tumorales con capacidad de auto-renovación y multipotencialidad, la subpoblación denominada célula madre tumoral (CMT).

CÉLULAS MADRE TUMORALES

HISTORIA DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

El concepto de las células madre tumorales no es novedoso. Las primeras conexiones entre el cáncer y la célula madre se remontan al siglo XIX, cuando se observaron similitudes histológicas entre los tumores y el tejido embrionario. Esto dio lugar a la teoría del “resto embrionario”, que postula que el cáncer es causado por células con propiedades similares a las células del embrión temprano (Askanazy 1907). Más adelante en 1930 hubo observaciones clínicas que sugerían que el meduloblastoma era originado a partir de restos embrionarios denominados meduloblastos, los cuales no se diferenciaban y formaban tumores que se agregaban en zonas germinales del cerebelo del embrión (Eisenhardt and Cushing, 1930). En 1941 los teratocarcinomas fueron reconocidos como estructuras malignas que contenían muchos tipos celulares diferenciados, sugiriendo que provenían de “células madre” tumorogénicas (Jackson and Brues, 1941). Además, a ese grupo de células indiferenciadas se les atribuyó una actividad mitótica superior (Pierce et al., 1960). Años más tarde, se demostró que el origen del teratocarcinoma de ratón procedía de una sola célula maligna multipotente (Pierce and Speers, 1988).

En la década de los 50 se especuló que todos los desórdenes mieloproliferativos compartían un origen común a partir de células madre hematopoyéticas (HSCs) multipotentes (Dameshek 1951), hecho que se evidenció experimentalmente con posterioridad, ya que inspirados por el concepto de las HSCs en adulto, Dick y sus colaboradores mostraron que en la leucemia aguda no todas las células eran capaces de propagar la leucemia al ser trasplantadas en ratones inmunodeprimidos (Lapidot et al., 1994). Las células que expresaban los mismos marcadores de superficie que las células madre adultas ($CD34^+CD38^-$) eran las más eficientes propagando la leucemia, por lo que se las denominó células iniciadoras de leucemia (LSC) o células madre tumorales (CMT) (Bonnet and Dick, 1997).

Tras los trabajos pioneros de Lapidot, Bonnet y Dick, muchos grupos han demostrado en tumores sólidos la capacidad que tiene la subpoblación de células no diferenciadas, las CMT, de recapitular el tumor de origen al ser trasplantadas en ratones inmunodeprimidos. Fue en 2003 y en cáncer de mama cuando Clarke y su equipo demostraron por primera vez que tumores sólidos humanos contienen células con elevado potencial de propagación tumoral. Mediante ensayos de xenotrasplante comprobaron que las células positivas para el marcador de superficie CD44 y negativas o con baja expresión de CD24 ($CD44^+CD24^{-/bajo}$) tenían la habilidad de generar tumores al ser trasplantadas en ratones inmunodeprimidos (Al-Hajj and Clarke, 2004). En este ensayo de xenotrasplante, sólo unas 100 células ($CD44^+CD24^{-/bajo}$) resultaron ser tumorigénicas mientras que el resto de decenas de miles de células con fenotipo diferente que fueron trasplantadas no lo eran. Esa subpoblación tumorigénica concreta podía mantenerse mediante pases seriados, y tras cada pase seguía conservando la capacidad de generar nuevos tumores que contenían tanto células tumorigénicas $CD44^+CD24^{-/bajo}$, como también células fenotípicamente diversas que estaban presentes en el tumor inicial.

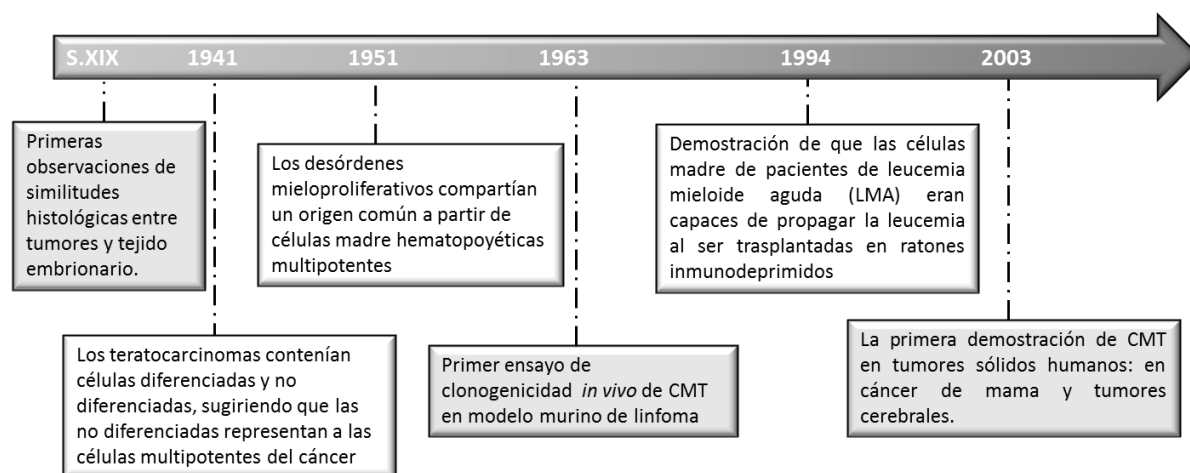


Figura 3. Eventos destacados en la historia del concepto de las CMT. Adaptado de Nguyen *et al.*, 2012.

A ese trabajo le siguieron estudios similares en otros tumores sólidos, como es el caso de algunos tipos de tumores cerebrales incluyendo el glioblastoma multiforme (GBM), donde se observó que la población propagadora tumoral estaba enriquecida en la expresión de CD133 (Galli et al., 2004; Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003, 2004; Yuan et al., 2004), así como también en cáncer colorrectal (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Con posterioridad se ha ido demostrando la existencia de una subpoblación de células tumorales con habilidad para propagar los tumores en ensayos de xenotrasplante en otros tipos de tumores sólidos como el carcinoma de células escamosas (Prince et al., 2007), el melanoma (Schatton et al., 2008) y tumores de pulmón (Bertolini 2009) entre otros, tal y como se muestra en la siguiente tabla [Tabla 1].

TUMOR	MARCADOR	REFERENCIA
Cáncer de mama	EPCAM (ESA) ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁻ , ALDH, CD29, CD133	Patrawala 2006; Al-Hajj 2003
Glioblastoma	CD133 ⁺ , CD15 ⁺	Singh 2004
Melanoma	CD20 ⁺ , CD271 ⁺	Fang 2005
Cáncer de próstata	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , CD49	Patrawala 2006
Cáncer de colon	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD26 ⁺ , ALDH	O'Brien 2007; Ricci-Vitiani 2007
Adenocarcinoma de páncreas	CD44 ⁺ , CD24 ⁺	O'Brien 2007
Carcinoma renal	CD133 ⁺	O'Brien 2007
Carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello	CD44 ⁺ , ALDH1	Boman 2008
Meduloblastoma	CD133 ⁺ , CD15 ⁺	Annabi 2008
Cáncer de ovario	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD117 ⁺ , CD24 ⁺	Klonisch 2008
Cáncer de pulmón	CD133 ⁺ , CD90, CD117, ALDH1	Bertolini 2009
Leucemia mieloide aguda	CD34 ⁺ , CD38 ⁻	Soltanian 2012; Maenhaut 2010
Carcinoma hepatocelular	CD45 ⁻ , CD90 ⁺	Kure 2012

Tabla 1. Algunos de los tumores sólidos en los que se ha descrito la existencia de CMT. Adaptado de Atena *et al.*, 2014.

CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

Para entender la biología de las CMT hay que empezar por definir las propiedades de una célula madre adulta. Una célula madre normal adulta se define como una célula somática no diferenciada que a través de división asimétrica posee la capacidad de diferenciarse en uno (unipotente) o múltiples (pluripotente) linajes celulares y de producir una célula idéntica a sí misma, es decir, con capacidad de auto-renovación (Lobo et al., 2007).

En tejido adulto, las células madre son responsables de la homeostasis y de la regeneración tisular (Blanpain and Fuchs, 2014; Larsimont et al., 2015). Estas células se encuentran predominantemente en estado quiescente (en fase G_0), sin dividirse, estado que son capaces de abandonar en respuesta a estrés para entrar en el ciclo celular, expandirse y diferenciarse (Arai et al., 2004). La célula madre puede dar lugar a poblaciones de células progenitoras amplificadoras transitorias (TA), las cuales tienen más restringido su potencial de auto-renovación, y tras ciclos de multiplicación se diferencian en tipos celulares concretos dando lugar a células maduras plenamente funcionales, mediante lo que se denomina diferenciación terminal (Blanpain et al., 2004). Las células madre presentan además otras características propias generalmente aceptadas que permiten distinguirlas y/o aislarlas. Se ha observado que las células madre son de menor tamaño y presentan una reducida actividad metabólica, aspectos que están relacionados con su estado quiescente. Además, presentan alta expresión de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), expresan marcadores de superficie específicos y desarrollan un alto eflujo de sustancias a través de transportadores de membrana ABCG, hecho por el que una baja acumulación de sustancias fluorescentes como Hoechst 3342 o Rodamina 123, las distingue (Dollé et al., 2015; Goodell et al., 1996; Jones et al., 1996; Leemhuis et al., 1996; Li et al., 2015a).

Al igual que las células madre normales, las CMT también presentan las características distintivas en lo relativo a tamaño, marcadores, metabolismo y eflujo de sustancias (Bleau et al., 2009; Li et al., 2015a). Se ha demostrado que las CMT son

particularmente resistentes a los tratamientos convencionales. Diversos factores o mecanismos participan en esta resistencia a los tratamientos como: mecanismos de reparación del daño al ADN, alteración del control del ciclo celular, procesos de expulsión de drogas, activación de determinadas vías de señalización o influencia del microambiente tumoral (Borovski et al., 2011).

- **Capacidad de auto-renovación:** las CMT tienen la capacidad de auto-renovarse dividiéndose para dar lugar a otra célula madre maligna y otra célula progenitora que dará lugar a células tumorales fenotípicamente diversas (Al-Hajj and Clarke, 2004). Esa capacidad de auto-renovarse tanto *in vitro* como *in vivo* es posible por la activación de vías que controlan la diferenciación y auto-renovación de las células madre en el desarrollo embrionario y la homeostasis en tejidos adultos. Estas vías incluyen Wnt/ β -catenin, Notch y Sonic Hedgehog (SHH) (Borah et al., 2015; Karamboulas and Ailles, 2013; Peitzsch et al., 2013).
- **Estado de quiescencia:** las CMT se encuentran en estado de quiescencia, fase G₀ del ciclo celular, en el cual no se dividen. Es un estado reversible del que pueden salir en respuesta a estímulos fisiológicos reincorporándose al ciclo celular. Varias moléculas participan en la regulación del estado de quiescencia, como los supresores tumorales p53 y RB, proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas como p21, p27 y p57, la vía de señalización Notch y numerosos micro ARN (miARN) y factores de transcripción (Cheung and Rando, 2013). Este estado de quiescencia es altamente relevante en cuanto a la susceptibilidad a las terapias, ya que gran parte de las mismas están dirigidas a células en proliferación y por ello no inciden en células en quiescencia como las CMT. Por este motivo, entre otros, las CMT suelen ser resistentes a tratamientos convencionales y son responsables de la recurrencia tumoral (Dick, 2008). Además, el estado de quiescencia podría explicar las recidivas y metástasis ya que las CMT podrían mantenerse en un estado quiescente durante largos periodos de tiempo y despertar produciendo la progresión tumoral en el mismo lugar o tras diseminarse (Clevers, 2011).

- **Menor ratio de proliferación:** se cree que la resistencia a la quimioterapia también se debe al lento avance en el ciclo celular de las CMT, hecho que las hace no susceptibles a muchas terapias dirigidas a células en división (Ajani et al., 2015). Diversos estudios han mostrado que mientras las células activas en el ciclo celular responden a los tratamientos, no se ven efectos en las CMT. Esto podría ser debido a que las CMT muestran menor ratio de proliferación (Stupp et al., 2007). Además, el hecho del lento avance a través del ciclo celular se relaciona con la eficaz reparación del ADN dañado.
- **Elevada actividad de reparación de daño en el ADN:** ha sido relacionada con la resistencia de las CMT a la radio y quimioterapia. Las lesiones inducidas en el ADN deben ser reparadas mediante las vías de respuesta al daño en el ADN (DDR), mecanismo que incluye arresto celular en diferentes puntos específicos del ciclo celular y reclutamiento de maquinaria de reparación del ADN que incluye distintas proteínas dependiendo de la lesión (Wang, 2015).
- **Plasticidad celular:** la plasticidad celular forma parte de la biología normal en el desarrollo y en la homeostasis adulta para responder a los estímulos y superar situaciones de estrés celular. Las células cancerosas tienen especial habilidad para activar la plasticidad celular. Se ha demostrado que las CMT disponen de plasticidad para realizar la transición entre dos estados fenotípicamente diferentes: uno más proliferativo de carácter epitelial y otro más quiescente e invasivo de carácter mesenquimal. Este proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT) o el contrario, mesenquima-epitelial (MET), han sido estudiados en el contexto de la biología del cáncer y en su relación con las CMT (Chaffer et al., 2006; Nieto et al., 2016). Las CMT en cada uno de estos estados son capaces de generar la respectiva progenie celular, pudiendo secretar señales para reforzar positivamente la auto-renovación de las CMT (Fillmore et al., 2010). La transición entre estos dos estados de CMT es mediada por alteraciones epigenéticas reguladas por el microambiente tumoral mediante señalización de citoquinas y quimioquinas, por regulación transcripcional incluyendo los microARNs (Pal et al., 2015) o combinación de ambas. El grupo de Weinberg demostró que la EMT dirigida por la sobre-expresión de factores de transcripción como

Snail, *Twist*, *Slug* y/o *Sox9* (Guo et al., 2012; Mani et al., 2008) es capaz de conferir características de célula madre. Esta plasticidad resulta en un reto para las terapias, ya que la EMT aumenta la capacidad de invasión y diseminación de las células, mientras que decrece la proliferación, confiriendo resistencia a la quimioterapia (Creighton et al., 2009). Por otro lado, la reversión a un fenotipo epitelial mediante MET permite a las células retomar la proliferación requerida para el crecimiento de los tumores en órganos distantes induciendo metástasis (Korpál et al., 2011; Ocaña et al., 2012; Somarelli et al., 2016; Tsai et al., 2012).

- **Incremento en transportadores ABC:** Las CMT presentan un incremento en la expresión de proteínas pertenecientes a la familia de transportadores con cassette de unión a ATP (ABC). Este aspecto les confiere una aumentada capacidad de eflujo activo de drogas, lo cual les hace más resistentes a las terapias, ya que impide que se alcancen concentraciones efectivas de los fármacos en las células (Di and Zhao, 2015).
- **Menores niveles de ROS:** también se ha asociado la resistencia a las terapias con menores niveles de especie reactivas de oxígeno (ROS) debido a una respuesta antioxidante de mayor eficacia por parte de las CMT (Singer et al., 2015).
- **Alta actividad ALDH:** se ha observado que las CMT presentan una alta actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Deng et al., 2010; Huang et al., 2009). ALDH ejerce una acción detoxificante mediante la oxidación de aldehídos celulares y también está implicada en la señalización del ácido retinoico (AR) a través de la oxidación del retinal hacia AR. En CMT, ALDH se relaciona con aspectos como la resistencia a drogas, la diferenciación celular o la respuesta a estrés (Marcato et al., 2011).
- **Alta expresión de proteínas anti-apoptóticas y baja expresión de proteínas pro-apoptóticas:** la expresión diferencial de proteínas relacionadas con la apoptosis es otra característica de las CMT. Por ejemplo, la sobre-expresión de BCL-2 y BCL-XL (Hata et al., 2005) y el inhibidor de apoptosis survivin, y la baja expresión de caspasa 8 (Capper et al., 2009; Jin et al., 2008).

Todas estas características de las CMT tienen gran relevancia, ya que les hacen ser las responsables de la progresión tumoral y la resistencia a las terapias.

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN O AISLAMIENTO

El hecho de que las CMT presenten características distintivas permite que existan varios métodos para su identificación y/o aislamiento. Sin embargo, conviene señalar que los diferentes métodos están basados en diferentes características de las CMT y por ello, no aíslan o identifican a la misma subpoblación celular exactamente. Además, dado que existen particularidades entre las CMT de diferentes orígenes, no todos son aplicables a los distintos tumores y algunos de ellos están más aceptados para algunos tipos tumorales concretos. Es frecuente que varios de estos métodos se empleen de manera complementaria.

- **Marcadores de membrana:** la expresión de antígenos de superficie celular se usa comúnmente para detectar las CMT de los tumores. En la LMA fue descrito que las CMT expresan CD34 y no expresan CD38 (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). La expresión de CD133 fue descrita y usada para aislar las CMT de varios tumores sólidos incluyendo el GBM (Singh et al., 2004), los tumores de colon (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007) y otros tumores sólidos [Tabla 1]. El marcador de adhesión molecular CD44 es otro marcador de superficie que ha sido asociado a las CMT, por ejemplo en cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003). La detección de estos marcadores específicos de superficie se realiza generalmente mediante citometría de flujo y su separación mediante *sorting* (*Fluorescence-activated cell sorting* o FACS) o separación magnética (MACS). Sin embargo, en muchos cánceres no existe un consenso en cuanto al valor y la especificidad de los diferentes marcadores de superficie, ya que la expresión de éstos puede variar durante el crecimiento tumoral y puede existir heterogeneidad en su expresión entre pacientes e incluso en el mismo tumor (Medema, 2013). Por esta razón se sugirió la combinación de marcadores de membrana con diferentes marcadores funcionales intrínsecos de las CMT como puede ser ALDH1.
- **Actividad ALDH:** las células con elevada actividad ALDH pueden ser identificadas y aisladas a través del ensayo ALDEFLUOR™, en el que a las células se les proporciona un sustrato de ALDH cuyo metabolismo por parte de la enzima genera

un producto fluorescente que queda retenido en el interior de la célula (Ginestier et al., 2007).

- **Perfiles de expresión de célula madre:** la expresión de proteínas como OCT4, los factores de transcripción SOX2 y NANOG, así como componentes de las vías de Wnt/ β -catenin, Notch y SHH han sido ligados al fenotipo de célula madre (Hadjimichael et al., 2015; Liu et al., 2013). No obstante, el análisis de estos marcadores ha de ser complementario a otros métodos dado que los marcadores *sine qua non* de célula madre tumoral no están definidos.
- **Exclusión de colorante/*side population* (SP):** las CMT pueden identificarse en función de su incrementada capacidad de eflujo de sustancias. Según esto, las células son cargadas con un colorante fluorescente y mediante citometría de flujo puede distinguirse la población celular que emite una señal fluorescente de menor intensidad, la designada SP, que es la que presenta mayor capacidad de excluir el colorante (Bleau et al., 2009; Charafe-Jauffret et al., 2009).
- **Cultivo de esferas en suspensión:** este método se implementó a partir del modelo de cultivo de neuroesferas para detectar células precursoras de cerebro adulto (Reynolds and Weiss, 1992). Parte de la premisa de que la población de células con capacidad de sobrevivir y proliferar en suspensión formando colonias flotantes en medios de cultivo definidos está enriquecida en CMT.
- **Potencial de diferenciación:** se evalúa valorando la capacidad de las células para desarrollar cambios morfológicos y en la expresión de marcadores específicos de célula madre y célula diferenciada cuando son expuestas a suero u otros factores de diferenciación concretos.
- **Xenotrasplante en modelos animales:** la valoración de la capacidad de las células para originar en ratones inmunodeficientes tumores fenotípicamente similares al tumor humano del que derivan es el ensayo por excelencia que valida las características fundamentales de las CMT. En estos ensayos se inyectan diluciones límite de células y se evalúa la capacidad consecutiva (trasplante seriado) de formación de tumores, los cuales han de recapitular las características genéticas y

moleculares, la complejidad y la heterogeneidad del tumor original del que proceden las células (Clevers, 2011; Lapidot et al., 1994) [Figura 4]. El modelo ortotópico mediante inyección intracraneal estereotáctica es el método habitual usado en GBM.

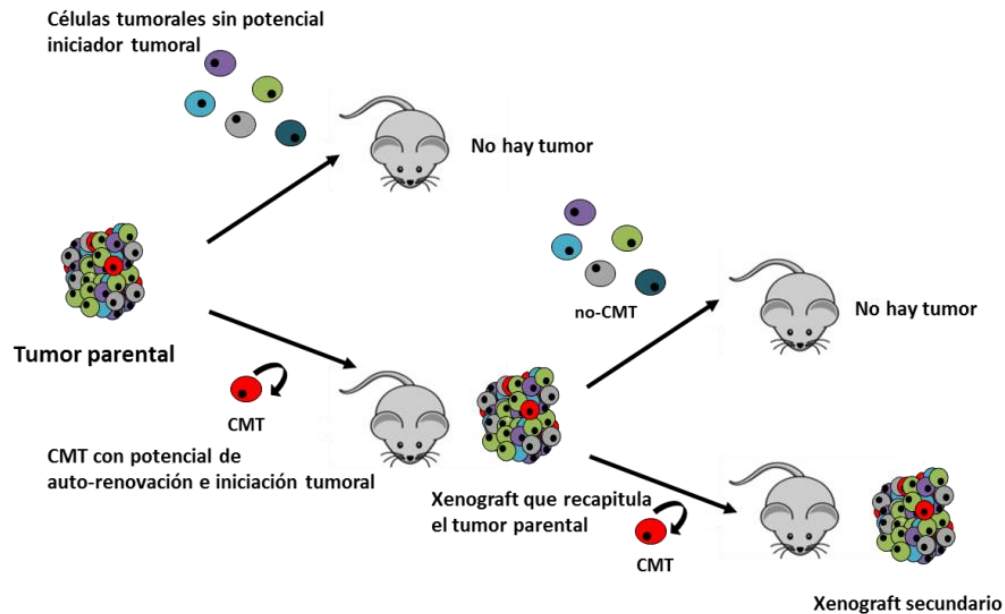


Figura 4. Dibujo esquemático de xenotrasplante seriado (adaptado de O'Brien 2010). El tumor jerárquicamente organizado contiene CMT que pueden aislarse del grueso del tumor y posteriormente ser inyectadas en ratones inmunodeprimidos. Mientras que la inyección de las células que no tienen las propiedades de CMT no formará tumor, la inyección de CMT formará el tumor que recapitulará la jerarquía y heterogeneidad del tumor parental. Teniendo en cuenta que sólo las CMT poseen capacidad de auto-renovación a largo plazo, para valorar esta capacidad es necesario separar las CMT del grueso del tumor y re-inyectarlas en ratones diana secundarios.

ORIGEN DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

Se conocen las características de las CMT, sin embargo, aún se desconoce la identidad de las células normales que adquieren los cambios que les proporcionan la capacidad de iniciación y progresión tumoral (Pal et al., 2015; Perez-Losada and Balmain, 2003; Visvader, 2011). A este respecto, se conoce que la malignización cancerosa de las

células requiere de acumulación de alteraciones y es improbable que todas las mutaciones pudieran ocurrir en la vida media de una célula madura. Por ello, se cree que las células madre tumorales derivan de células madre normales auto-renovadoras o de células progenitoras que adquieren la capacidad de auto-renovación gracias a mutaciones [Figura 5], lo cual se ha demostrado en varios tipos de cáncer (Alcantara Llaguno et al., 2009; Blanpain, 2013).

Otra hipótesis sugiere que las células del grueso del tumor son capaces de desdiferenciarse y convertirse en CMT. Los procesos de diferenciación celular se encuentran estrictamente regulados por mecanismos epigenéticos y generalmente se concibe que son procesos unidireccionales o irreversibles (Cantone and Fisher, 2013). Sin embargo, la capacidad de reprogramar células somáticas adultas completamente diferenciadas en las denominadas células madre pluripotentes inducidas (iPSC), con características de células madre, mediante la introducción ectópica de los factores Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc (Takahashi and Yamanaka, 2006), indica que la desdiferenciación es un proceso factible. En el caso de la desdiferenciación de células tumorales diferenciadas a CMT también existen evidencias de este proceso en gliomas, que serán presentadas con posterioridad. Se han identificado marcadores de células madre embrionarias (ESC) en las CMT y en consecuencia, también se ha postulado que las CMT podrían originarse a partir de las ESC como consecuencia de mutaciones en las primeras fases del desarrollo (Schoenhals et al., 2009).

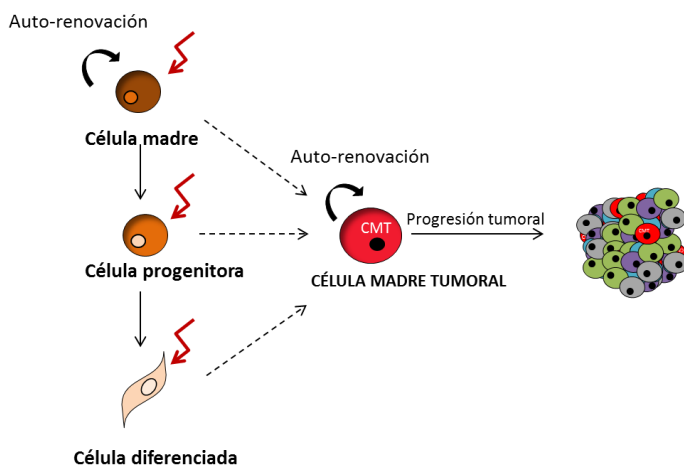


Figura 5. Las células madre tumorales podrían originarse a partir de mutaciones específicas en células madre, células progenitoras o incluso en células diferenciadas.

MODELOS TUMORALES PARA EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

Fue en el cáncer de mama donde se demostró por primera vez que los tumores sólidos humanos contienen células con características de célula madre (Al-Hajj et al., 2003). En ese estudio se demostró que las células $CD44^+CD24^{-/bajo}$ tienen una elevada capacidad de formar tumores al ser trasplantadas en ratones inmunodeprimidos. Además, al realizar pases seriados de los tumores formados, esta subpoblación celular mantenía la capacidad de auto-renovación y reproducía la heterogeneidad del tumor inicial (Al-Hajj et al., 2003). El fenotipo $CD44^+CD24^{-/bajo}$ ha sido posteriormente usado para el análisis y aislamiento de CMT mamarias tumorogénicas, además de otros perfiles como $CD24^+/CD29^{hi}$, $CD24^+/CD49f^{hi}$, $ALDH^+$ o $EpCAM^+$ (Ginestier et al., 2007; Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006; Munz et al., 2009;).

Otro tumor en el que se encuentra firmemente documentada la existencia y relevancia de las CMT es el GBM. Las células madre de glioma o *glioma stem cells* (GSC) fueron identificadas por primera vez por Ignatova y colaboradores, quienes hallaron en tumores gliales células con características de células madre neurales y expresión de marcadores neuronales y de astrogliá (Ignatova et al., 2002). La presencia de GSC se confirmó por otros trabajos que identificaron la capacidad tumoral de estas células y su similitud con el tumor original (Singh et al., 2003; Galli et al., 2004; Yuan et al., 2004).

GLIOBLASTOMA

El GBM representa a los gliomas de mayor malignidad (grado IV) según la clasificación de la OMS, basada en criterios histopatológicos y clínicos (Louis et al., 2007). Es el tumor más frecuente entre los gliomas, representando casi la mitad de los mismos (Ostrom et al., 2014), con una incidencia anual de entre 5-10 casos por cada 100.000 personas en España (AECC 2011). El GBM afecta a más hombres que a mujeres (ABTA, 2012) y puede manifestarse a cualquier edad pero se presenta preferentemente en adultos, con un pico de incidencia entre los 45 y 65 años. El GBM es uno de los cánceres

con peor prognosis, con una supervivencia media de los pacientes que no supera los 15 meses de vida (Stupp et al., 2009).

Estos tumores proceden de las células de la glía, las cuales modulan la homeostasis y función neuronal. Generalmente se localizan en los hemisferios cerebrales, aunque pueden encontrarse en cualquier región del cerebro o médula espinal. Son tumores muy infiltrantes dentro del cerebro, pero no es común que se propaguen a otras partes del cuerpo (ABTA, 2012). El GBM se caracteriza por una amplia diseminación celular dentro del cerebro, un patrón de distribución difuso en el tejido, y por la presencia de áreas muy vascularizadas y zonas necróticas. Además, estos tumores presentan una notable heterogeneidad inter e intra-tumoral, tal y como denota el término “Glioblastoma multiforme” con el que inicialmente se les denominó, y una jerarquía celular en cuanto a morfología. En cuanto a su diagnóstico, los primeros síntomas y signos que pueden aparecer son cefalea, convulsiones, pérdida de memoria y cambios de comportamiento, que se deben al aumento de la presión intracraneal por la presencia del tumor. Además, también pueden aflorar otros indicativos como la pérdida de movimiento, insensibilidad, disfunción en el lenguaje y otros trastornos cognitivos (ABTA, 2012).

El tratamiento convencional del GBM consiste en la resección quirúrgica del tumor, que frecuentemente es incompleta dada la infiltración y proximidad del tumor a estructuras vitales del cerebro, seguida de la combinación de radioterapia focal y quimioterapia (Stupp et al., 2005). En concreto, como fármaco quimioterápico se administra el agente alquilante Temozolomida (TMZ). Sin embargo, a pesar de que este tratamiento se ha mostrado parcialmente efectivo (2.5 meses de mejora en la supervivencia) (Stupp et al., 2005), los tumores reaparecen, generalmente en la misma ubicación y con un carácter más agresivo.

Desde el punto de vista clínico, los GBM históricamente se han diferenciado en dos grupos: primarios y secundarios. Los primarios o *de novo* se dan sin que existan evidencias clínicas de un precursor maligno y son los mayoritarios (90%), mientras que los secundarios proceden de la progresión de gliomas de bajo grado (Ohgaki and Kleihues,

2013). A lo largo del tiempo se han identificado diferentes alteraciones moleculares propias de los GBM y más recientemente se han llevado a cabo análisis moleculares de alto rendimiento que han permitido realizar una clasificación molecular de este tumor. En estos diferentes estudios moleculares se pone de manifiesto el destacado grado de heterogeneidad inter-tumoral presente en GBM (TCGA 2008; Brennan et al. 2013). En base a los resultados del TCGA se determinó que las alteraciones más frecuentes en GBM afectaban principalmente a 3 vías de señalización celular: la vía de señalización de los receptores celulares de tipo tirosina quinasa (TK), la vía de p53 y la de Retinoblastoma (Rb) (Brennan et al., 2013). De acuerdo al TCGA, los GBM se han clasificado en 4 subtipos moleculares teniendo en cuenta las alteraciones genéticas y epigenéticas, la respuesta a los tratamientos y el pronóstico (Verhaak et al. 2010). Según esta clasificación, se han descrito los siguientes cuatro subtipos de GBM: proneural, neural, clásico y mesenquimal [Figura 6].

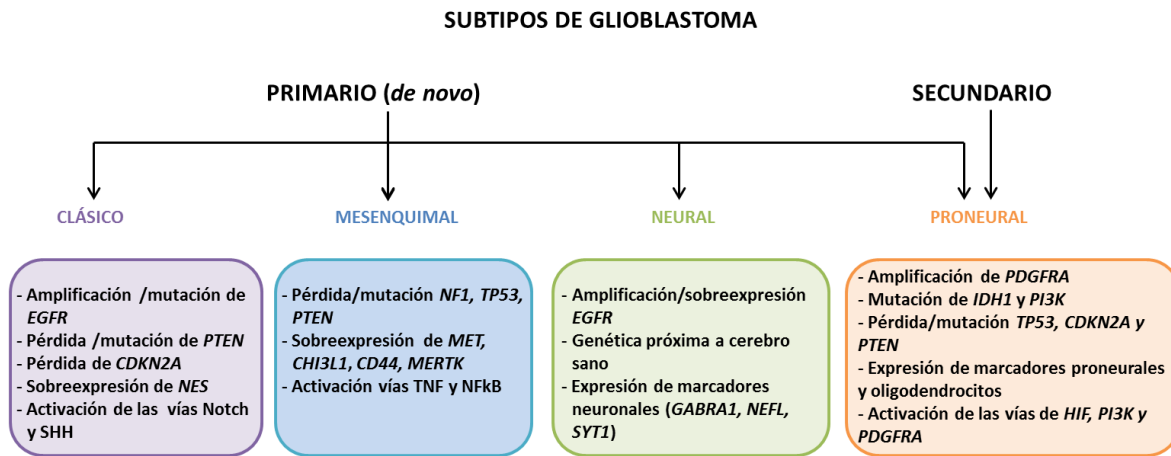


Figura 6. Clasificación de glioblastoma en función de sus alteraciones más destacables. Adaptado de Van Meir *et al.*, 2010.

Las alteraciones más frecuentes de cada subtipo son: proneural, sobre-expresión de PDGFR y mutaciones de *IDH1* y *TP53*; neural, expresión aumentada de NEFL y GABRA1; clásico, sobre-expresión de EGFR e inactivación de *INK4a*; y mesenquimal, inactivación de NF1 y PTEN (Verhaak, et al. 2010; Morokoff et al. 2015). La relevancia de estos subgrupos

viene dada por la supervivencia y la distinta respuesta a los tratamientos convencionales actuales, siendo los subtipos clásico y mesenquimal en los que la efectividad de las terapias es mayor (Verhaak et al., 2010b). Esta clasificación es similar a la presentada por Phillips años antes en la que también se distinguían varios de estos subgrupos con marcadores específicos (Phillips et al., 2006).

Por otro lado, más recientemente y en base a la información obtenida gracias a los análisis moleculares avanzados realizados en el último periodo, se ha actualizado la clasificación de la OMS para mejorar y hacer más preciso el diagnóstico de los tumores. Esta nueva clasificación [Tabla 2] tiene en cuenta tanto las características moleculares como las histológicas, por lo que integra los parámetros genotípicos y fenotípicos y clasifica los GBM dentro de los tumores astrocíticos y oligodendrocíticos en base a la mutación de *IDH*, en *IDH wildtype*, *IDH* mutante y un tercer grupo como GBM *NOS*, en los que el diagnóstico es reservado por la imposibilidad de evaluar completamente *IDH* (Louis et al., 2016).

	GBM <i>IDH-wild type</i>	GBM <i>IDH-mutado</i>
Lesión precursora	GBM primario, <i>de novo</i>	GBM secundario, a partir de astrocitoma difuso o anaplásico
Frecuencia	90%	10%
Edad media al diagnóstico	62 años	44 años
Ratio hombre: mujer	1.42:1	1.05:1
Supervivencia media tras tratamiento	15 meses	31 meses
Mutaciones principales	TERT promotor 72% TP53 27% EGFR amplificación 35% PTEN 24%	TERT promotor 26% TP53 81% ATRX 71%

Tabla 2. Tipos de GBM en base a la clasificación actual de la OMS que integra parámetros moleculares e histológicos. Adaptado de Louis *et al.*, 2016.

CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DE GLIOMA

Las CMT aisladas de gliomas de alto grado han sido caracterizadas a través del análisis del perfil de ARNm, diferenciándose GSC proneurales y mesenquimales, hallándose una alta correspondencia con los gliomas de alto grado de tipo proneural y mesenquimal, respectivamente (Bhat et al., 2013; Mao et al., 2013). Las CMT proneurales comparten similitudes con las células madre neurales (NSC) fetales, mientras que las CMT mesenquimales son más similares a las NSC de tejido adulto (Morokoff et al., 2015; Ricci-Vitiani et al., 2008). Las GSC mesenquimales son más agresivas, invasivas, angiogénicas y resistentes a radioterapia que las GSC proneurales. Las GSC mesenquimales son principalmente derivadas de GBM primarios o *de novo*, mientras que las proneurales se han hallado también en GBM secundarios y también en gliomas de grado III (Mao et al., 2013; Nakano, 2015).

ORIGEN DE LAS CÉLULAS MADRE DE GLIOMA

El origen de las GSC se ha esclarecido en los últimos años. Por un lado se ha postulado que las GSC pueden originarse a partir de las células madre neurales (NSC) presentes en el cerebro adulto, quienes presentan capacidad de auto-renovación y multipotencia para generar los principales tipos de células diferenciadas del sistema nervioso, incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Temple, 2001). Esta procedencia a partir de células madre neurales o progenitoras [Figura 7] se ha propuesto mediante aproximaciones en diferentes modelos genéticos murinos a través de la combinación de mutaciones en oncogenes y supresores tumorales habituales en astrocitomas humanos, así como por la introducción de oncogenes virales que causan cáncer. Se indujeron mutaciones de sobre-expresión de las formas activas de *Ras*, *Akt*, *EGFR*, *PDGF*, algunas en combinación con la delección de *Ink4A/Arf* o *Pten*, en células embrionarias o postnatales tempranas, que resultaron en la formación de astrocitomas en los ratones (Bachoo et al., 2002; Holland et al., 2000; Huse and Holland, 2009). Por otro lado, se generaron ratones *knockout* con inactivación de supresores tumorales como *p53/Pten/Nf1*, los cuales desarrollaron astrocitomas (Kwon et al., 2008; Zhu et al., 2005).

Análisis posteriores de esos ratones mostraron que las lesiones se generaban en la zona subventricular (SVZ), uno de los nichos de célula madre neural, lo que sugería que estos tumores se generaban a partir de las células madre neurales. Esta hipótesis se demostró dirigiendo las mutaciones de inactivación de los supresores tumorales a las células madre neurales y su progenie en el compartimento neurogénico mediante el sistema Cre-recombinasa (Alcantara Llaguno et al., 2009). Se observó que en consecuencia se generaban tumores, lo que demostró que las células madre neurales o progenitoras pueden dar lugar a astrocitomas malignos como resultado de mutaciones que han sido halladas en pacientes humanos de GBM.

Por otro lado, se ha propuesto que las GSC pueden originarse por la desdiferenciación de células normales maduras del cerebro como astrocitos, neuronas u oligodendrocitos (Acanda de la Rocha et al., 2014) [Figura 7]. El origen de las GSC a partir de células diferenciadas se ha postulado en varios trabajos en los que han inducido la desdiferenciación de astrocitos a GSC en ratones deficientes en *p53* mediante transducciones de oncogenes como *Ras* (Lee et al., 2007) o *Nanog* (Moon et al., 2011). La desdiferenciación también ha sido demostrada *in vivo* en gliomas mediante la inactivación de *NF1* y *p53* en astrocitos y neuronas (Friedmann-Morvinski et al., 2012).

Además, mediante el “mapeo epigenómico” del estado de la cromatina celular, Suvà identificó 4 factores de transcripción (POU3F2, SOX2, SALL2 y OLIG2) en GBM proneural capaces de reprogramar las células tumorales diferenciadas en GSC (Suvà, 2013). Estos factores transcripcionales eran necesarios para mantener la capacidad tumorigénica en esas células, sugiriendo que mediadores de programas de células madre pueden conferir las capacidades oncogénicas de las CMT.

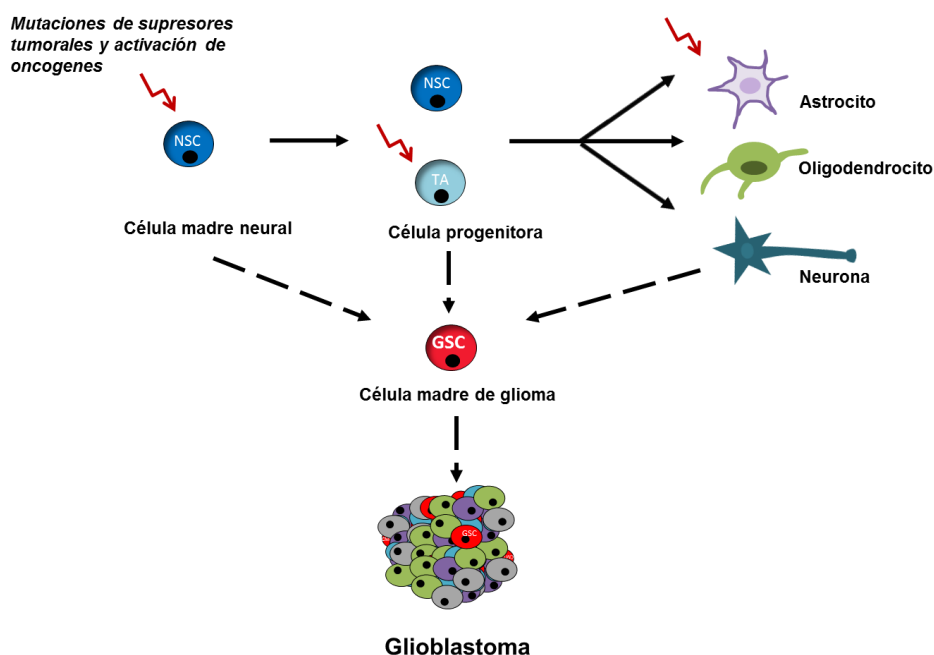


Figura 7. Origen de las células madre de glioma (GSC). Adaptado de Carrasco-García *et al.*, 2013. NSC: célula madre neural; TA: célula amplificadora transitoria ; GSC: célula madre de glioma.

PAPEL DE LAS CÉLULAS MADRE DE GLIOMA EN LA RESISTENCIA A LAS TERAPIAS

A pesar de la mejora en la eficacia y la administración de los tratamientos, éstos continúan siendo inefectivos para muchos pacientes, en los que, aunque inicialmente se produce regresión tumoral en respuesta a la terapia, los tumores recurren, hecho que está estrechamente relacionado con las CMT y su resistencia a las terapias (Ajani *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que las GSC son particularmente resistentes a los tratamientos convencionales de quimioterapia y radioterapia (Bao *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006). Diferentes trabajos han relacionado la actividad de reparación de daño en el ADN con la resistencia a la radioterapia (Bao *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2011; King *et al.*, 2017; Short *et al.*, 2011) y también a la quimioterapia con TMZ. En este sentido, se ha descrito que la elevada expresión de la enzima O-6 metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), quien elimina los grupos alquilo del ADN, contribuye a la resistencia de las GSC a la TMZ (Qiu *et al.*, 2014).

Varios estudios han mostrado que las GSC (CD133⁺) presentan una mayor activación de las quinasas ATM, Chk1 y Chk2, y ralentización del ciclo celular ante radiación, con lo que logran una eficaz reparación del ADN que se traduce en radorresistencia (Bao et al., 2006; Ropolo et al., 2009). También se ha demostrado que las GSC expresan niveles elevados de proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 y que son menos sensibles a moléculas inhibitoras de BCL-2 en comparación con las células tumorales diferenciadas (Tagscherer et al., 2008). Además, la elevada expresión de transportadores celulares de tipo ABCG2, que juegan un papel importante en el eflujo de drogas, se han relacionado con la quimiorresistencia de las GSC (An and Ongkeko, 2009).

Por otro lado, hay estudios que han mostrado que las GSC sobre-expresan genes que participan en las vías de señalización de Notch y SHH, y que la inhibición farmacológica de estas vías mediante inhibidores de gamma-secretasa y ciclopamina, respectivamente, induce la sensibilización de las GSC a tratamientos como la TMZ (Ulasov et al., 2011).

También en relación con la resistencia, cabe destacar que en GBM y otros tipos de tumores se han descrito fenómenos de plasticidad celular por los que células tumorales diferenciadas se convierten en CMT en respuesta a presión quimio-radio-terapéutica. En este sentido, el grupo de Auffinger observó que en respuesta al tratamiento con TMZ, la subpoblación de GSC de líneas celulares de glioma y células derivadas de pacientes aumentaba tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, mediante experimentos de trazado de linaje determinó que dicho aumento se debía a la conversión de células tumorales diferenciadas en GSC, las cuales expresaban marcadores de célula madre como CD133, SOX2, Oct4 y Nestin, y presentaban un fenotipo altamente tumorigénico (Auffinger et al., 2014). La conversión fenotípica y funcional tras el tratamiento también se ha demostrado en otros casos donde la aplicación de TMZ induce la expresión elevada de factores inducibles por hipoxia (HIF) y las células se convierten en GSC, mostrando expresión de CD133 (Lee et al., 2016). En concordancia con esta observación, también ha sido documentada la desdiferenciación hacia GSC en respuesta a contextos de estrés como la hipoxia (Safa et al., 2015). Además, se ha determinado que otros tratamientos como la

irradiación podrían regular la desdiferenciación de las células de GBM en un proceso que implica a la vía de señalización dependiente de survivina (Dahan et al., 2014).

En resumen, las evidencias presentadas indican que las GSC son las responsables no solo de la formación y el mantenimiento tumoral (Acanda de la Rocha et al., 2014), sino también de la resistencia a las terapias (Carrasco-Garcia et al., 2013; Liu et al., 2006).

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el más frecuente y el que más mortalidad produce en mujeres, siendo su incidencia creciente, probablemente debido al envejecimiento de la población y a la detección cada vez más temprana. La supervivencia de los pacientes ha mejorado en los últimos 20 años debido al diagnóstico precoz y la mejora en los tratamientos, alcanzando una supervivencia global a los 5 años de diagnóstico del 82.5 % (Rossi et al., 2015). Sin embargo, esta enfermedad continúa siendo la responsable del 6.4 % de la mortalidad por cáncer, lo que supuso más de medio millón de muertes en 2012 a nivel mundial.

El cáncer de mama es el tumor maligno que se origina en la glándula mamaria. Esta glándula se desarrolla a partir de células derivadas del ectodermo (Stingl et al., 2006) y su función principal es la producción de leche. El epitelio mamario es un tejido muy dinámico que atraviesa diferentes fases de desarrollo y diferenciación durante la morfogénesis en los diferentes periodos de la pubertad, embarazo, lactancia, involución y menopausia (Russo and Russo, 2004). Existe una jerarquía celular en la que las células del parénquima se componen de tres tipos de células epiteliales diferenciadas: las células luminales alveolares, que son las que producen leche, las células ductales luminales que delinear los ductos y las contráctiles mioepiteliales, que median la eyección de la leche (Hennighausen and Robinson, 2005) [Figura 8]. Estas células epiteliales experimentan distintos procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis, y son reemplazadas por progenitores más primitivos, que a su vez son reemplazados por células madre mamarias (Luo et al, 2010).

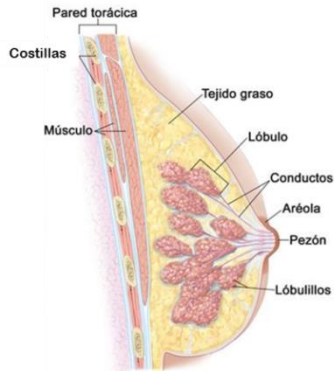


Figura 8. Anatomía de la mama femenina. Fuente (NIH, Instituto Nacional del Cáncer)

Los tumores de mama se clasifican en dos grupos según su origen: carcinomas ductales, los que se originan en los conductos mamarios que transportan la leche; y carcinomas lobulillares, los que se forman en los lóbulos mamarios que secretan leche a los conductos.

Además, pueden presentarse *in situ*, de forma no invasiva, o de forma infiltrante, es decir, con capacidad de invasión y metástasis (Sinn and Kreipe, 2013). Históricamente los tumores de mama se han clasificado también en base a características histológicas del tumor primario en tiempo de primer diagnóstico. Esta clasificación tiene en cuenta diferentes características como el tamaño de la lesión, el patrón de distribución celular, la presencia de necrosis y características celulares como atipia nuclear y actividad mitótica (Sinn and Kreipe, 2013).

Desde el punto de vista clínico, los tumores de mama pueden subdividirse en base a la expresión de distintos receptores celulares. Según esta clasificación podemos distinguir los siguientes principales subtipos:

- **HR+** (positivo en receptores hormonales): aquellos tumores que expresan receptores de estrógenos (ER) y/o receptores de progesterona (PR).
- **HER2+** (HER-enriquecido): tumores que presentan alta expresión del receptor 2 de factores de crecimiento epidérmicos.
- **TNBC** (triple negativos): tumores que carecen de expresión de los receptores; ER, PR y HER2.

Las terapias basadas en esta clasificación son fundamentales. Actualmente los tratamientos incluyen agentes cuya diana es el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) para los tumores que sobre-expresan HER2; inhibidores de la aromatasa y tratamientos hormonales de tercera generación para tumores positivos para el receptor de estrógeno (ER). En cuanto a los tumores triple negativos (TNBC), que son los de peor prognosis, en la actualidad no se emplean terapias dirigidas y la quimioterapia sigue siendo el tratamiento estándar (Bianchini et al., 2016).

Este mejor entendimiento de la biología del tumor de mama ha permitido además la identificación de un gran número de dianas moleculares para desarrollar distintas terapias. Entre ellas se encuentran los inhibidores de tirosina kinasa (TKIs) dirigidos a dianas como HER2, HER3, receptor de IGF, C-MET, receptor de FGFR; inhibidores de componentes de vías de señalización intracelulares (PI3K, AKT, mTOR, ERK), inhibidores de angiogénesis y agentes que interfieren con la reparación del ADN (Higgins and Baselga, 2011). En el caso de los tumores TNBC, actualmente también se están llevando a cabo estudios clínicos de terapias dirigidas a las alteraciones moleculares que presentan los tumores que persisten tras el tratamiento con quimioterapia, en este caso con distintos inhibidores de: poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), PI3K, MEK, proteína 90 de shock térmico (HSP 90) o deacetilasas de histonas (HDAC) (Balko et al., 2014).

HETEROGENEIDAD EN CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama no debe entenderse como una enfermedad, sino como diferentes enfermedades con distintos perfiles transcriptómicos, diferentes características clínico-patológicas, respuesta a terapias y supervivencia. En base al perfil molecular teniendo en cuenta la expresión de ARNm y las variaciones en el número de copias, se redefinió la clasificación. Inicialmente, Perou *et al.* analizando el patrón de la expresión génica identificaron los subtipos “intrínsecos” de los tumores de mama, que posteriormente se reforzaron con otros estudios incluyendo alguna modificación (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Sotiriou et al., 2003; Wirapati et al., 2008) [Tabla 3]. Según este análisis se clasificaron en los siguientes subtipos:

Subtipo	Frecuencia	Receptores hormonales	Grado histológico	Pronóstico
Basal	10-20%	ER-PR-HER2-	Alto	Malo
HER2-enriquecido	10-15%	ER-PR-HER2+	Alto	Malo
Normal	5-10%	ER-/+/HER2-	Bajo	Medio
Luminal A	50-60%	ER+PR+HER2-	Bajo	Bueno
Luminal B	10-20%	ER+/-PR+/-HER2+/-	Medio-alto	Medio-malo
Claudin-baja	12-14%	ER-PR-HER2-	Alto	Malo

Tabla 3. Clasificación de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama y sus características (Eroles et al., 2012).

Esta clasificación no está basada en la expresión de receptores celulares, pero también supone cierta segregación de los tumores en cuanto a este aspecto, pues la mayoría de los tumores luminales son ER/PR positivos, los tumores basales son triple negativos, e incluye un subtipo de tumores con sobre-expresión de HER2. Además, esta clasificación identifica los grupos con diferentes grados de supervivencia y respuesta a tratamiento (Eroles et al., 2012).

Más recientemente, gracias a tecnologías de alta resolución que incluyen el análisis de la expresión génica y secuenciación paralela masiva (MPS) se han podido definir subtipos moleculares relevantes. Se ha realizado un estudio a gran escala que integra el estudio genómico y transcriptómico dividiendo los tumores en 10 subgrupos con distintos comportamientos clínicos, aunque todavía no han sido clínicamente aceptados (Curtis et al., 2012). Además, gracias al TCGA, en 2012 se analizaron tumores primarios mediante seis plataformas diferentes (*arrays* del número de copias de ADN genómico, metilación de ADN, secuenciación del exoma, *arrays* de ARNm, secuenciación de microARN y *arrays* de proteína de fase reversa) con el objetivo de integrar la información en los diferentes subtipos de cáncer de mama descritos. Se identificó que los genes *TP53*, *PIK3CA* y *GATA3* se encuentran afectados a nivel mutacional en todos los tumores de mama. Atendiendo al resto de marcadores hallados, se destacaron cuatro tipos principales de tumores de

mama: Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido y Basal. Cada uno de ellos individualmente presentaba heterogeneidad molecular (TCGA et al. 2012).

Estos estudios de alto rendimiento han hecho evidente la alta heterogeneidad de esta enfermedad y destacan la necesidad de una medicina personalizada que permita aplicar la terapia más adecuada e individualizada a cada paciente.

CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES DE CÁNCER DE MAMA

Los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama descritos anteriormente están caracterizados por contener diferente frecuencia de CMT mesenquimales y epiteliales. El subtipo *claudin-baja* que típicamente es TNBC, está caracterizado por una alta proporción de CMT que expresan $CD44^+/CD24^{bajo/+}$ ALDH, como también células mesenquimales tumorales. Por el contrario, el subtipo basal, comúnmente TNBC y muchas veces asociado a la pérdida de función del gen BRCA1, contiene células epiteliales y mesenquimales junto con una alta proporción de CMT positivas para ALDH1. Estas CMT dan lugar a células de morfología epitelial que carecen de expresión de receptores hormonales (Perou, 2011). El subtipo HER2+ se caracteriza por una alta proporción de CMT ALDH1⁺ que dan lugar a poblaciones epiteliales en el tumor que no expresan ER ni PR (Korkaya and Wicha, 2013). El subtipo Luminal B presenta una proporción inferior de células que expresan marcadores de CMT en comparación con los subtipos HER2+ o TNBC. En estos tumores la mayoría de las células son de morfología epitelial y parte expresa ER y PR. Por último, los tumores del subgrupo Luminal A, que se caracterizan por ser los de mejor prognosis, tienen el menor número de células que expresan marcadores de CMT.

PAPEL DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES DE CÁNCER DE MAMA EN LA RESISTENCIA A LAS TERAPIAS Y METÁSTASIS

En el cáncer de mama también se postula que las CMT son las responsables de la resistencia a las terapias. Diferentes estudios han mostrado que las CMT de cáncer de mama presentan una mayor activación de la quinasa ATM, detectora de daños en el ADN, hecho que supone la inhibición del progreso en el ciclo celular y permite la reparación del

ADN durante más tiempo, confiriendo radiorresistencia (Yin and Glass, 2011). Por otro lado, se ha detectado alto contenido de transportadores BCRP en las CMT, que juegan un papel importante en el eflujo de drogas y quimiorresistencia (An and Ongkeko, 2009).

Además de ser las responsables de la resistencia a las terapias, existen varias evidencias que sugieren que las CMT son responsables de la metástasis en cáncer de mama (Li et al., 2007). Así, se han asociado altos porcentajes de células $CD44^+CD24^{-/bajo}$ en tumores primarios de mama con la presencia de metástasis óseas (Abraham et al., 2005). También se ha identificado que las células tumorales circulantes en pacientes metastásicos de cáncer de mama expresaban marcadores de célula madre (Aktas et al., 2009). En concordancia, se han realizado ensayos *in vivo* en modelos de metástasis en ratón donde han asociado la expresión de ALDH1 con pronóstico desfavorable en pacientes de cáncer de mama (Charafe-Jauffret et al., 2010). En este estudio se inyectaron en los ratones células ALDH⁺ de cáncer de mama que resultaron en la generación de metástasis múltiples en distintos órganos, recapitulando la heterogeneidad del tumor inicial. Sin embargo, las células ALDH⁻ únicamente metastatizaban en los nodos linfáticos y en proporciones muy inferiores (Charafe-Jauffret et al., 2010) determinándose así que la población celular ALDH1⁺CD44⁺CD24⁻ estaba enriquecida en células iniciadoras tumorales que mediaban la metástasis.

La relevancia de las CMT en estos dos modelos tumorales y su implicación en la resistencia a las terapias y la metástasis deja en evidencia la necesidad del estudio de los mecanismos de regulación de estas células.

REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

Se conoce que las CMT en comparación con las células diferenciadas presentan expresión diferencial de moléculas implicadas en vías de señalización que tienen importantes funciones en el desarrollo embrionario, como son la vía de Notch, SHH o WNT. Estas vías están relacionadas con la capacidad de auto-renovación de las CMT y por ello dirigirse a ellas podría ser importante para bloquear las propiedades de esta población celular (Takebe et al., 2015). En el estudio de la regulación de las CMT es importante determinar y comprender el papel de algunas proteínas como los factores de transcripción SOX, importantes reguladores durante el desarrollo embrionario, que también están involucrados en la regulación de poblaciones de células madre adultas (Castillo and Sanchez-Cespedes, 2012) y participan en las vías de señalización de SHH y WNT (Kamachi and Kondoh, 2013).

En el presente trabajo se abordará este estudio, en concreto, se determinará la participación del factor de transcripción SOX9 en la regulación de las CMT de GBM y cáncer de mama.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SOX

La familia SOX (*Sry related HMG box*) es una familia de factores de transcripción definida por tener un dominio HMG (grupo conservado de alta movilidad) de unión al ADN en la secuencia específica ATTGTT o secuencias relacionadas (Kondoh and Kamachi, 2010). Este dominio fue descubierto por primera vez en *Sry* (*Sex determining region Y*), un factor crucial en la determinación del sexo masculino en mamíferos (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990). Estas proteínas están filogenéticamente conservadas en especies como el pez cebra, mosca, ratón y humanos. En mamíferos se han identificado al menos 20 miembros divididos en 8 subgrupos (A-H) según la homología del dominio de HMG y otros dominios estructurales y la función en el organismo (Sarkar and Hochedlinger, 2013).

La actividad y la expresión de las proteínas SOX están reguladas a múltiples niveles. Son proteínas que interaccionan con otros factores para llevar a cabo su función. Sin embargo, la expresión de los genes *SOX* está muchas veces regulada por ellos mismos o por otros miembros de la familia. La expresión de *SOX* también está regulada post-transcripcionalmente mediante miARN y post-traduccionalmente mediante modificaciones como fosforilación, sumoilación, acetilación, metilación y glicosilación, las cuales afectan a su actividad, estabilidad y localización intracelular (Kamachi and Kondoh, 2013). Su actividad también está modulada por interacción con otras proteínas. En concreto, las proteínas *SOX* interactúan con componentes de las vías de señalización SHH y WNT, en las que las interacciones *SOX*-Gli y *SOX*- β -catenin, respectivamente, están implicadas en su actividad (Bernard and Harley, 2010; Malki et al., 2010; Oosterveen et al., 2012).

En el desarrollo embrionario los factores *SOX* desempeñan un papel importante durante la gastrulación temprana, en la determinación del sexo, la hematopoyesis o la neurogénesis. Durante estos procesos su función es necesaria para el mantenimiento de la población de células madre y para determinar el compromiso de determinadas poblaciones celulares en el desarrollo de tejidos diferenciados, destacando el papel prominente que desarrollan en el SNC. Históricamente se les ha identificado como genes cruciales en el desarrollo embrionario, sin embargo, trabajos recientes demuestran que su actividad no es exclusiva de este periodo y que también se expresan en células madre adultas y aseguran la homeostasis en una amplia variedad de tejidos (Sarkar and Hochedlinger, 2013).

Se cree que genes implicados en la progresión tumoral podrían coincidir con genes reguladores del desarrollo embrionario, por su actividad en las células madre y los nexos de éstas con el cáncer. En este sentido, los factores de transcripción *SOX* son claros candidatos que están siendo implicados en distintos tipos de cáncer (Castillo and Sanchez-Cespedes, 2012).

FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SOX9

SOX9 es un miembro del subgrupo SOXE de esta familia, al que también pertenecen SOX8 y SOX10 (Kamachi and Kondoh, 2013). El factor de transcripción SOX9 es necesario en procesos durante el desarrollo embrionario como la determinación del sexo masculino, la condrogénesis, el desarrollo de la cresta neural y la neurogénesis (Pritchett et al., 2011). La función de SOX9 en genes diana depende del contexto y de otros factores de transcripción con los que puede interactuar. Su expresión debe estar estrictamente controlada y tanto su inactivación como su sobre-expresión provoca letalidad embrionaria en ratón (Scott et al., 2010). En humanos, mutaciones heterocigotas en el gen de *SOX9* provocan Displasia Campomélica (Foster et al., 1994), un síndrome caracterizado por malformaciones esqueléticas, reversión del sexo, defectos en múltiples órganos incluyendo el SNC, y letalidad neonatal.

SOX9 se expresa en múltiples tejidos y tipos celulares durante la embriogénesis: condrocitos, testículo, corazón, pulmón, páncreas, vías biliares, folículo piloso, intestino, retina y SNC. Su función consiste en mantener las células en estado indiferenciado y determinar la diferenciación hacia distintos tipos celulares como melanocitos, células de Paneth o células gliales (Sarkar and Hochedlinger, 2013). En el caso del SNC, la expresión de SOX9 inducida por la vía de señalización SHH es necesaria para el mantenimiento de las NSC (Scott et al. 2010). Además de su implicación en el SNC, en los últimos años se ha identificado el papel de SOX9 en la homeostasis de otros órganos como la mama, el hígado, el intestino y el páncreas adulto, donde regula la población de células madre existente en esos tejidos (Furuyama et al., 2011; Guo et al., 2012; Jo et al., 2014).

Las mutaciones o disfunciones de este factor de transcripción se han visto implicadas en varios tipos de cáncer. Hay evidencias de que su función podría depender del contexto celular, ya que es específica de tejido. SOX9 se encuentra silenciado en algunos casos de melanoma (Passeron et al., 2009), y su expresión es baja en cáncer renal y linfomas (Matheu et al., 2012) (Cancer Genome Atlas Network et al., 2012). En cambio, en cáncer de páncreas, mama, pulmón, colon, cáncer gástrico, de próstata y

meduloblastoma, entre otros, se encuentra altamente expresado (Matheu et al., 2012), y ello se ha correlacionado con la mala evolución clínica de los pacientes (Gao et al., 2015).

Funcionalmente, se ha identificado que SOX9 tiene distintas actividades pro-oncogénicas incluyendo la promoción de la proliferación, la inhibición de la senescencia y la apoptosis y el fomento de la tumorigénesis y la progresión tumoral. Estas funciones oncogénicas, en cáncer de colon, las realiza activando la expresión del oncogén Bmi1, el cual reprime la expresión de los supresores tumorales p16^{Ink4a} y p19^{Arf} y p21^{cip} (Matheu et al., 2012). Además, SOX9 se ha asociado con la capacidad de auto-renovación y tumorigenicidad de las CMT en varios tipos de cáncer como el hepatocarcinoma, el cáncer de vejiga, el carcinoma de células basales o el cáncer gástrico (Larsimont et al., 2015; Ling et al., 2011; Liu et al., 2016; Santos et al., 2016).

Respecto al GBM, existen resultados contradictorios. Por un lado, se ha observado que su expresión a nivel de ARNm no está elevada en comparación con tejido cerebral normal adulto (Schlierf et al., 2007). Sin embargo, otros grupos han observado aumento en su expresión con incremento del grado de malignidad en gliomas y su sobre-expresión se ha asociado a la mala evolución clínica de los pacientes con gliomas (Wang et al., 2012). Consistente con este papel oncogénico, se ha observado que su inactivación inhibe la proliferación y adhesión celular en líneas celulares de GBM (Swartling et al., 2009), y su activación, mediada por la vía de SHH se ha asociado a la transformación maligna de células madre de cerebelo en tejido embrionario (Swartling et al., 2012). En cáncer de mama el papel de SOX9 se ha asociado con la tumorigénesis y con la expresión de SLUG, quien promueve la metástasis (Guo et al., 2012).

A pesar de los avances que se están realizando en el campo de la oncología y el estudio de las CMT, es crítico conocer con mayor precisión las características específicas que definen a estas células, así como los mecanismos moleculares que las regulan, por lo que este trabajo se ha centrado en identificar la función y el mecanismo molecular del factor de transcripción SOX9 como regulador de las CMT.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es profundizar en los mecanismos moleculares que regulan la actividad de las células madre en cáncer. En concreto, nos proponemos determinar el impacto del factor de transcripción SOX9 en la heterogeneidad intratumoral.

Para el desarrollo del estudio, hemos desglosado el objetivo general del trabajo en los siguientes objetivos específicos:

- 1.** Caracterizar la expresión de SOX9 en muestras humanas y líneas celulares de glioblastoma.
- 2.** Estudiar la participación de SOX9 en la regulación de las células madre tumorales y su potencial tumorigénico en glioblastoma y cáncer de mama como modelos de resistencia a terapia y metástasis, respectivamente.
- 3.** Identificar el mecanismo molecular mediador de la función de SOX9 en la regulación de las células madre tumorales de glioblastoma y cáncer de mama.
- 4.** Validar dianas moleculares implicadas en el mecanismo molecular de SOX9 como regulador de las células madre tumorales.
- 5.** Identificar y validar pre-clínicamente aproximaciones terapéuticas frente a SOX9 y sus dianas moleculares identificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

CULTIVO PRIMARIO DE MUESTRAS DE PACIENTES DE GLIOBLASTOMA

Tras las cirugías a los pacientes de GBM del Hospital Universitario Donostia (HUD), parte del tejido excedente tras el diagnóstico se almacenó en el Biobanco Vasco de investigación (<http://www.biobancovasco.org>) y el resto del tejido excedente se utilizó para el establecimiento de cultivos primarios de GSC, de acuerdo al flujo representado en el diagrama de la Figura 9.

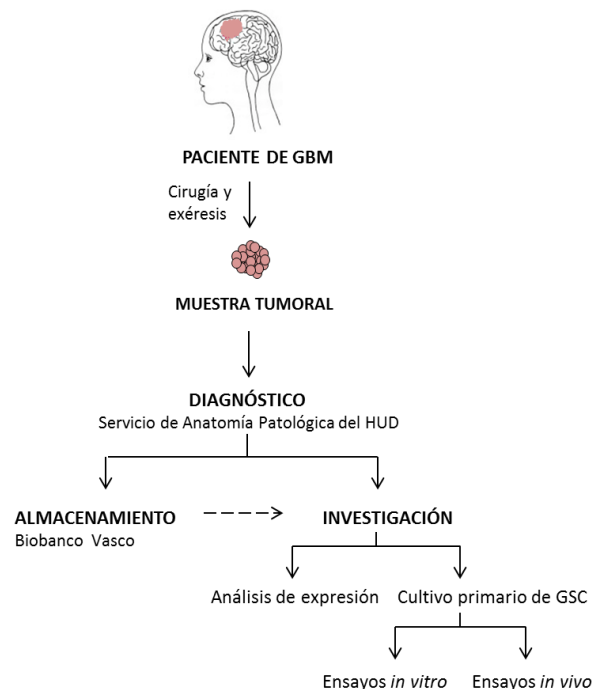


Figura 9. Diagrama del procesamiento de las muestras de los pacientes de GBM del Hospital Universitario Donostia (HUD).

Las muestras tumorales de los pacientes se procesaron de la siguiente manera para el establecimiento de cultivos: las piezas se trocearon en fragmentos con hojas de bisturí estériles y con ayuda de una pinza se retiró el tejido vascular y necrótico en el caso de haberlo. Algunos fragmentos tumorales se reservaron para estudios de expresión génica.

Los fragmentos troceados se recogieron en un tubo de poliestireno de 30mL (Esterilin, 11339133) con 8 mL de PBS (sin Mg y Ca) y se dejaron decantar. Tras la precipitación de los fragmentos se procedió a retirar 5 mL de PBS y se añadieron de nuevo 5 mL de PBS para lavar las muestras. Tras dejar decantar nuevamente los fragmentos, se eliminó el sobrenadante de PBS de la muestra y se añadieron 2,5 mL de tampón PIPES [5 mL Solución A (1,2M NaCl, 50mM KCl en 100mL H₂O MilliQ); 2 mL Solución B (0,5 M Pipes VWR (EMD Cat#1851) en 100 mL 1N NaOH) y 0,5 mL glucosa 45%]. A continuación se centrifugó la muestra durante 1 min a 1500 rpm (centrífuga Allegra X-15R, Beckman Coulter). Se descartó el sobrenadante y se añadieron 2,5 mL de solución de digestión constituida por 60 µL de papaína (Roche 10108014001) y 0,25 mL de L-cisteína en 2,5 mL de PIPES, que fue previamente activada durante 10 min a 37°C, filtrada con un filtro colador de 70 µm y a la que se añadieron 80 µL de DNAsa (Promega Cat. N° M6101).

La digestión enzimática de los fragmentos se realizó durante 30 minutos a 37°C y en agitación (1000 rpm). Tras ello, se centrifugó la muestra durante 5 min a 1500 rpm y se descartó el mayor sobrenadante posible. Posteriormente se añadió 1 mL de PIPES y 70 µL de DNAsa y tras disgregación mecánica mediante pipeteo con micropipeta durante 2 minutos, se incubó la muestra nuevamente durante 30 min a 37°C en agitación a 1000 rpm. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm, se descartó todo el sobrenadante posible y se añadieron 10 mL de DMEM/F12 (Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeco, Ham F12, Sigma). La mezcla fue nuevamente filtrada con un filtro colador de 70 µm y centrifugada durante 5 min a 1500 rpm. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 12 mL de solución de sacarosa al 60% en PBS. Se procedió a centrifugar la muestra 5 min a 1000 rpm, se retiró el sobrenadante y se reservó. El precipitado se resuspendió en 2 mL de medio DMEM/F12 suplementado con B27 10x (Gibco), N2 100 x (Gibco), glucosa 45% y 40 ng/mL de factores de crecimiento epidérmico (EGF, Sigma, St. Louis, MO, USA) y de fibroblastos (bFGF, R&D Systems). Se añadieron 2 µL de fungizona (1:1000) y se sembró en un pocillo de una placa de 6 pocillos no tratada (CorningTM, 3736). El sobrenadante anteriormente reservado fue centrifugado y con el precipitado se procedió de la misma manera por si pudiera contener células.

Los cultivos formaron esferas y cada 2-3 días se les cambió el medio. Cada 7 días se procedió a la disgregación enzimática de las esferas con acutasa (Invitrogen A1110501) y nueva siembra en suspensión en placas sin tratar [Figura 10].



Figura 10. Imágenes representativas del proceso de cultivo de biopsia humana.

LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares de glioma U373MG (U373), U251MG (U251), U87MG (U87), A172 y T98G, y la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estas células adherentes se cultivaron en medio DMEM (Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco, Gibco, Waltham, MA, USA) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Gibco), glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL).

La línea celular PDX44 derivada de un paciente de cáncer de mama fue establecida mediante xenoimplante en la glándula mamaria de ratones NOD-SCID por los doctores Ibrahim y Serra del Hospital Universitario Vall d´Hebron. Las líneas celulares de célula madre de glioma o *Glioma Neural Stem* (GNS) GNS166 y GNS179 fueron cedidas por el Dr. Steve Pollard (MRC Centre for Regenerative Medicine and Edinburgh Cancer Research Centre, University of Edinburgh). Estas líneas de carácter *stem* o célula madre fueron cultivadas en adhesión, previo tratamiento de la superficie de cultivo con 10 µg/mL de laminina (L2020, Sigma Aldrich) durante 3 h a 37 °C en medio DMEM/F12 (Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco, Ham F12, Sigma) en proporción 1:1 y suplementado con B27 10x (Gibco) N2 100x (Gibco), glucosa 45% y 20 ng/mL de factores de crecimiento

epidérmico (EGF, Sigma, St. Louis, MO, USA) y de fibroblastos (bFGF, R&D Systems), medio que denominamos medio selectivo para células madre.

Las células adherentes fueron subcultivadas cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA (Gibco by Lifetechnologies). Los cultivos de células madre de esferas en suspensión fueron cultivados en placas no tratadas para evitar la adherencia, en medio de cultivo selectivo para células madre y sometidos a disgregación enzimática con acutasa (Invitrogen A1110501) para su subcultivo.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar a 37°C de temperatura, 95% de humedad, 21% de O₂ y 5% de presión de CO₂. Todos los procedimientos se realizaron en campanas de flujo laminar de seguridad Clase II (nivel de seguridad biológica 2; Class II Biohazard Safety Cabinet, ESCO).

LÍNEA CELULAR	TIPO CELULAR	ORIGEN	MEDIO DE CULTIVO	PROCEDENCIA
A172	Glioma	Glioblastoma	DMEM +10% SBF	ATCC (CRL-1620)
T98G	Glioma	Glioblastoma	DMEM +10% SBF	ATCC (CRL-1690)
U87MG	Glioma	Astrocitoma	DMEM +10% SBF	ATCC (HTB-14)
U251MG	Glioma	Glioblastoma	DMEM +10% SBF	ATCC
U373MG	Glioma	Glioblastoma	DMEM +10% SBF	ATCC (HTB-17)
GNS166	Célula madre de glioma	Glioblastoma	DMEM/F12	Steve Pollard (MRC)
GNS179	Célula madre de glioma	Glioblastoma	DMEM/F12	Steve Pollard (MRC)
GB1012	Célula madre de glioma	Glioblastoma	DMEM/F12	Paciente Hospital Donostia
GB1014	Célula madre de glioma	Glioblastoma	DMEM/F12	Paciente Hospital Donostia
MDA-MB-231	Cáncer de mama	Cáncer de mama (Adenocarcinoma)	DMEM+10% SBF	ATCC (HTB-26)
PDX44	Derivada de paciente cáncer de mama	Cáncer de mama	DMEM+10% SBF	Vall d'Hebron
HEK 293T	Renal embrionaria	Riñón	DMEM+10% SBF	ATCC (CRL-1573)

Tabla 4. Características de las líneas celulares utilizadas. El medio DMEM fue suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. El DMEM/F12 con glucosa 45%, B27 10x, N2 100x y 20ng/µL de factores FGF y EGF. ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo.

MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE INFECCIÓN LENTIVIRAL

Los lentivirus con los distintos constructos fueron generados en el laboratorio mediante transfección de la línea celular embrionaria de riñón, HEK293T. Para la transfección de las células HEK293T con el plásmido de interés [Tabla 5] se sembraron $3 \cdot 10^6$ células en placas de 100 mm de diámetro (Thermo Scientific, 130182). Tras 24 horas se transfectaron con una mezcla que contenía 10 μg del ADN de interés (plásmido), los plásmidos empaquetadores MDL (2,55 μg) VSV-G (1,37 μg) y REV (0,98 μg), 19 μL del agente de transfección TurboFect (Thermo Scientific, R0531) y medio Optimem (Gibco) sin SFB hasta un volumen final de 1 mL. Esta mezcla de transfección se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y, tras retirar el medio de la placa de HEK293T y lavar las células con PBS 1x, se añadió gota a gota sobre éstas y se añadieron 9 mL de medio. Las células se incubaron a 37°C y 5% CO_2 durante 6 horas y, transcurrido ese tiempo, se retiró el medio y se agregaron 5 mL de medio de cultivo (DMEM suplementado con 10% de SBF). Tras 48 horas se emplearon los lentivirus contenidos en el medio de cultivo de las células HEK293T para infectar las células diana. Este medio de cultivo fue previamente filtrado con filtros de 0,2 μm de tamaño de poro para evitar la presencia de células HEK293T.

En el caso de las células GNS166, las infecciones lentivirales se realizaron usando los lentivirus portadores de los plásmidos de interés generados en la Plataforma de Vectores Virales de Inbiomed (Parque Científico y Tecnológico de Gipuzkoa).

El día anterior a la infección se sembraron $2 \cdot 10^5$ células diana en placas de 100mm \emptyset ó $1 \cdot 10^5$ células diana en placas de 6 pocillos en el caso de las GNS166. Transcurridas 24 horas se realizaron las infecciones a una M.O.I. 10 (10 unidades infectivas por célula), en medio DMEM en ausencia de suero y empleando polibreno (Sigma-Aldrich, Cat. N° H9268-5G) a una concentración final de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A las 6 horas de la infección se retiró el medio que contenía las partículas víricas y se añadió medio DMEM complementado con SBF.

Transcurridas 48 horas desde la infección, en los casos en los que los plásmidos introducidos contenían el gen pac de resistencia a la puromicina (codificante de la N-acetil puromicina transferasa o pac), se procedió a la selección de las células infectadas mediante adición de puromicina (Sigma-Aldrich, Cat.N° P8833) a una concentración de 2µg/mL en medio de cultivo durante 48-72 horas.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pLKO.1 puro/shC	Vector vacío, control	Addgene #8453
shSOX9-1	Silenciamiento de SOX9	Addgene #40644
shSOX9 -2	Silenciamiento de SOX9	Sigma-Aldrich TRCN0000342824
pWXL GFP	Control del plásmido de sobre-expresión de SOX9	Addgene #12257
pWXL SOX9	Sobre-expresión del gen de SOX9	Addgene #36979
shPML- 1	Silenciamiento de PML	Sigma-Aldrich TRCN0000003865
shPML- 4	Silenciamiento de PML	Sigma-Aldrich TRCN 0000003867
shPML- 5	Silenciamiento de PML	Sigma-Aldrich TRCN 0000003867
sh41 STAT3	Silenciamiento de STAT3	Sigma-Aldrich TRCN0000020841
sh43 STAT3	Silenciamiento de STAT3	Sigma-Aldrich TRCN0000020843
HA-PMLIV	Sobre-expresión de PML inducible	Subclonado en CiC Biogune

Tabla 5. Características de los plásmidos utilizados.

ENSAYOS FUNCIONALES

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Se sembraron por duplicado $2,5 \cdot 10^4$ células en 2 mL de medio de cultivo en placas de cultivo estándar de 6 pocillos. Las células fueron separadas con tripsina y contadas a día 1, 3 y 5 tras la siembra del ensayo y los datos fueron representados en gráficas indicando el número total de células a cada tiempo de contaje.

ENSAYO DE FORMACIÓN DE ESFERAS Y CAPACIDAD DE AUTO-RENOVACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE

Se sembraron $0,5 \cdot 10^3$ células por pocillo por triplicado en placas de 12 pocillos no tratadas y se mantuvieron en cultivo durante 10 días añadiendo 0,5 mL de medio selectivo para célula madre cada 3 días. Transcurridos 10 días, se contaron las esferas (primarias) formadas con ayuda de un microscopio óptico. A continuación, para analizar la capacidad de auto-renovación de las células madre, las esferas se disgregaron mediante digestión mecánica y enzimática con acutasa (Invitrogen A1110501) y se sembraron a la misma densidad en las condiciones anteriormente descritas. Las células se mantuvieron en cultivo durante 10 días y se procedió nuevamente al conteo de la nueva generación de esferas formadas (esferas secundarias).

ENSAYO DE CRECIMIENTO EN AGAR BLANDO (SOFT-AGAR)

En primer lugar se preparó una base de medio de cultivo para célula madre mezclado con agar 2,4% (26,31%) en una placa de 6 pocillos (1,5 mL/pocillo). Posteriormente se prepararon las células ($2 \cdot 10^3$ células/pocillo por triplicado) en una mezcla de agar 2,4% al 14,28% en 2mL medio de cultivo para célula madre. La placa se mantuvo en cultivo durante 15 días añadiendo medio cada 2 días. Una vez finalizado el tiempo del ensayo se cuantificaron el número de colonias formadas con ayuda del microscopio.

ENSAYO DE COLONIAS

En placas de 6 pocillos (Corning TM, 3506) se sembraron $0,5 \cdot 10^3$ células por triplicado en medio de cultivo DMEM con SBF. Las células se mantuvieron en cultivo durante 15 días, añadiendo medio fresco cada 3 días. Una vez finalizado el ensayo se fijaron las células con 0,5 mL de paraformaldehído 37% durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente y tras descartar el medio se tiñeron las células con

Giemsa en PBS al 5% durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada para realizar el conteo de las colonias formadas.

SENESCENCIA

Para medir la senescencia se utilizó un kit comercial de actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia (Cell Signaling, Cat. N° 9860S). Este kit detecta la actividad de β -galactosidasa a pH 6, característica propia de las células senescentes, que son capaces de hidrolizar X-gal produciendo un producto de color azul. Se sembraron $2 \cdot 10^4$ células por triplicado en placas de 24 pocillos (CorningTM, 3527) y tras 24 horas se retiró el medio de cultivo, se hizo un lavado con PBS 1x (Gibco, Cat. N° 10010-015) y se añadió a las células una mezcla de reacción con X-Gal preparada de acuerdo al protocolo del kit. Tras 16-18 horas de incubación a 37°C en un incubador sin CO₂, las células senescentes (azules), fueron contabilizadas y fotografiadas con un microscopio Eclipse TS100 (Nikon).

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MTT

Con el objetivo de evaluar los efectos de los inhibidores de SOX9, PML y STAT3 sobre las células se realizó el ensayo colorimétrico de viabilidad celular basado en el metabolismo del Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este ensayo se basa en la medición del color púrpura del formazán producido por la reducción del reactivo MTT por parte de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células viables.

Para ello, se sembraron $2 \cdot 10^3$ células por pocillo en placas de 96 pocillos (CorningTM, 3585) por sextuplicado y tras 24 horas fueron tratadas con los fármacos [Tabla 6] a las concentraciones indicadas en cada experimento. Como control para los tratamientos se utilizó el disolvente indicado para cada fármaco. Tras 72 horas se añadió 30 μ L /pocillo de reactivo MTT (Sigma-Aldrich, Cat. No. M2128) 1,9 mg/mL y se incubó durante 3 horas a 37°C y 5 % de CO₂. A continuación, se aspiró el contenido de los pocillos y se añadieron 150 μ L de DMSO (Sigma-Aldrich, Cat. N° D1650) para disolver los cristales

de formazán. Tras 15 minutos de incubación en agitación y a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Multiskan Ascent (Thermo Scientific). Se asignó el 100 % de viabilidad al valor medio de absorbancia de los pocillos tratados con vehículo y respecto a ello se calcularon los porcentajes de viabilidad de las células sometidas a las diferentes concentraciones de inhibidores.

FÁRMACO	ABREVIATURA	DISOLVENTE	FUNCIÓN	REFERENCIA
Temozolomida	TMZ	DMSO	Agente alquilante	Sigma-Aldrich T2577
Rapamicina	Rapa	DMSO	Inhibidor de mTOR	Sigma-Aldrich R8781
Trióxido de Arsénico	ATO	NaOH	Inhibidor de PML	Sigma-Aldrich A 1010
STX-0119	STX	PBS	Inhibidor de la dimerización de STAT3	Merck Millipore 573126
TG101348	TG101348	DMSO	Competidor de ATP inhibidor de JAK2	Santa Cruz, sc-364740

Tabla 6. Características de fármacos e inhibidores utilizados.

ENSAYOS *IN VIVO* DE CARCINOGENÉISIS

GENERACIÓN DE TUMORES SUBCUTÁNEOS

La formación de tumores subcutáneos fue llevada a cabo en ratones inmunodeprimidos *FOXn1^{nu}/FOXn1^{nu}* de 6-8 semanas de edad. Estos ratones presentan una mutación en el gen *FOXn1* esencial para el desarrollo tímico, así como del pelo, lo cual hace que carezcan de células T maduras (www.jax.org/strain/007850). Se procedió a la inyección de células con los distintos genotipos de manera subcutánea en los 4 flancos. Para ello las células se levantaron con tripsina, se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS a la concentración deseada. A los ratones se les inocularon 0,1 mL de suspensión celular en cada punto de inyección y fueron observados dos veces por semana, midiendo el tamaño de los tumores generados mediante un calibre hasta punto final, considerado cuando la longitud máxima del tumor alcanza los 15 mm. El volumen tumoral se calculó

mediante la fórmula $V = (L \cdot W^2 \cdot 0,5)$, donde L es la longitud mayor del tumor y W la longitud menor.

Se realizaron análisis de iniciación tumoral con distintas diluciones de células para calcular el número de células mínimo necesario para la formación de tumores. En estos ensayos de dilución limitante, para calcular el número de células iniciadoras se usó la plataforma web ELDA (*Extreme Limiting Dilution Analysis*) (Hu and Smyth, 2009).

GENERACIÓN DE TUMORES CEREBRALES MEDIANTE ESTEREOTAXIA

La inducción de formación de tumores cerebrales *in vivo* se realizó en ratones NOD-SCID (deficientes en linfocitos B y T) de 6-8 semanas de edad. Se empleó esta cepa de ratones porque permite el trasplante alogénico y xenogénico resultando un modelo idóneo para experimentos de transferencia celular y *xenografts* (www.jax.org/strain/001303). Las células a inyectar, de carácter de célula madre, fueron sometidas a disgregación enzimática mediante acutasa, lavadas con PBS y resuspendidas en PBS para su inyección.

Se inyectaron $0,1 \cdot 10^6$ células de las diferentes condiciones experimentales en un volumen final de 1 μ L de PBS 1x mediante una jeringa Hamilton de 75RN, 26s ga 2" (HA-87930, Teknokroma Analítica) en el estriado del hemisferio derecho de los ratones mediante el aparato estereotáxico (Kopf Instruments) [Imagen 1] en las siguientes coordenadas: Bregma: +1,0 mm posterior, -2 mm lateral izquierdo y -2,5 mm de profundidad, de acuerdo al protocolo del Dr. Pollard (Pollard et al., 2009), a un caudal constante de 0,05 μ L/min.

Se realizó un seguimiento de los animales en el que se valoraron signos de presencia tumoral como la pérdida de peso, la pérdida de capacidades funcionales y cualquier otro signo de deterioro. Los cerebros de los ratones fueron extraídos y fijados en paraformaldehído para posteriores estudios.

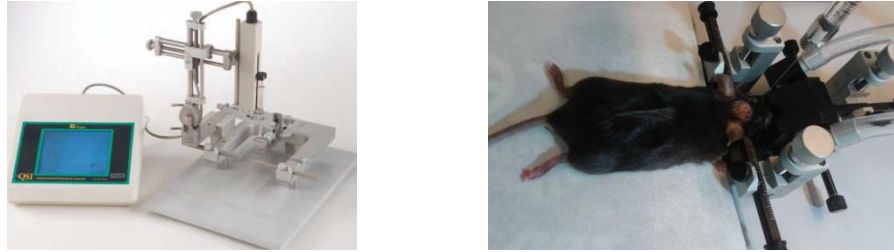


Imagen 1. Aparato de estereotaxia (Kopf Instruments) e imagen representativa de la inyección estereotáctica.

CEPA	CARACTERÍSTICAS	ENSAYO	PROCEDENCIA
Hsd: Athymic Nude-Foxn1 nu (Athymic Nude)	Cepa atímica, deficiente en linfocitos T	Subcutáneo	Harlan Laboratories https://www.jax.org/strain/007850
NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl (Nod-Scid)	Cepa deficiente en linfocitos B y T	Estererotaxia	https://www.jax.org/strain/001303

Tabla 7. Características de las cepas de ratones utilizadas en los ensayos in vivo de carcinogénesis.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células de interés se recogieron en tubos cónicos para precipitarlas por centrifugación, eliminar el sobrenadante y posteriormente lavarlas con PBS. Los *pellets* celulares se lisaron en 100 μ L de tampón de lisis (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 una mezcla de distintos inhibidores de proteasas (Cat. No. P8340, Sigma-Aldrich) y el inhibidor de serina proteasas fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF, Cat. N° P7626) en una relación de 1 μ L de mezcla por cada millón de células e inhibidores de fosfatasa (Cat. No. P7626, Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos para que se efectuara la

lisis. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 12.000 x g (RCF) en una (microcentrífuga 22R, Beckman Coulter) durante 10 minutos a 4°C para precipitar el material no solubilizado. Los sobrenadantes de la centrifugación constituyeron los extractos de proteínas, que fueron trasvasados a nuevos tubos para ser cuantificados.

La concentración de proteína de los extractos se determinó mediante el método del ácido bicinconónico (Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat. N° 23227, Thermo Scientific). Este compuesto es capaz de formar un complejo púrpura intenso (absorbe luz a 562 nm) con iones Cu^{1+} en un medio alcalino, en el que los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu^{++} . La absorbancia del compuesto será proporcional a la concentración de proteína presente. Según esto, se incubó 1 μL de muestra de extracto con BCA durante 25 minutos a 37°C y se cuantificó la intensidad colorimétrica de las muestras en un lector de placas MutiSkán Ascent (Thermo Scientific). Se emplearon muestras de albúmina de suero bovino a diferentes concentraciones conocidas (BSA 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para realizar una recta patrón (concentración de proteína *versus* absorbancia) en la que se interpoló la absorbancia de las muestras para obtener sus concentraciones.

WESTERN BLOT

Se tomó el volumen correspondiente a los microgramos de proteína deseados (generalmente 30 μg) y se le añadió una quinta parte 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). Las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos para la completa desnaturalización de las proteínas y posteriormente fueron separadas mediante SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis). Esta técnica está basada en la utilización de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes que contienen SDS para conferir carga negativa a las proteínas, por lo que éstas se separan en función de su peso molecular al aplicar una diferencia de voltaje. Se realizaron geles de poliacrilamida de 1,5 mm de grosor compuestos por una porción concentradora (4,5% poliacrilamida) y una porción separadora del gel en la que el porcentaje de poliacrilamida se escogió en función del peso molecular de las proteínas a detectar (10-15%). La electroforesis se desarrolló

empleando tampón de electroforesis (Tris 20 mM, glicina 0.2 M, SDS 0,1% p/v y pH 8.3) y una fuente de alimentación BioRad HC Power Pac.

Posteriormente, las proteínas ya separadas por tamaño fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran 0,2 μ m NC; Cat. N° 10600001, GE Healthcare Life Science), la cual tiene carga positiva, de forma que aplicando una diferencia de potencial, las proteínas migran y quedan inmovilizadas en ella. Se realizó mediante transferencia húmeda en tampón de transferencia 25 mM Trizma base, 192 mM Glicina, 20 % de metanol, pH 8.6) durante 90 minutos a un amperaje constante de 300 mA. La eficacia de la transferencia de proteínas se comprobó mediante la tinción de las proteínas de la membrana con Rojo Ponceau S (Cat. N° P7170, Sigma). A continuación, la membrana se incubó con una solución de tampón de Tris Buffer salino 0,01% Tween 20 (Cat. N° 8221840500, Merck Millipore) con 5% de leche en polvo (Cat. N° 70166, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación para bloquear la reactividad inespecífica de los anticuerpos primarios que posteriormente se utilizaron.

Tras el bloqueo, se procedió a la incubación de las membranas de nitrocelulosa en agitación a 4°C durante 15-18 horas con los diferentes anticuerpos primarios según las especificaciones de sus hojas técnicas.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios [Tabla 8], las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con Tris Buffer Salino 0,01% -Tween 20 (Cat. No. 8221840500, Merck Millipore) (TBST) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente [Tabla 8] durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa fueron preparados a una dilución 1:2000 en TBST y 5% de leche en polvo. Tras la incubación las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST.

La detección de las proteínas se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia NOVEX ECL Chemi Substrate (Cat N° WP20005, ThermoFisher), que está basado en la reacción quimioluminiscente de oxidación del luminol por parte de la peroxidasa de los anticuerpos secundarios. La señal lumínica emitida de la reacción fue

transmitida a películas fotográficas Amersham Hyperfilm ECL films (GE Healthcare), las cuales fueron reveladas mediante incubación en líquido revelador.

ANTICUERPO	ESPECIE DE ORIGEN	DILUCIÓN	REFERENCIA
Primarios			
β -actina	Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich AC-15
SOX9	Conejo	1:1000	Millipore AB5535
SOX2	Conejo	1:500	Millipore AB5603
PML	Conejo	1:1000	Bethyl laboratories A301-167A
STAT3	Ratón	1:1000	Cell Signaling 9139
pSTAT3 (Tyr705)	Conejo	1:1000	Cell Signaling 9145
P27	Ratón	1:500	BD Transduction Laboratories BD610241
GFP	Cabra	1:1000	Abcam ab-6673
Secundarios			
Goat anti-rabbit HRP	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Sc-2004
Goat anti-mouse HRP	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Sc-2005
Donkey anti-goat HRP	Asno	1:2000	Santa Cruz Biotechnology Sc-2020

Tabla 8. Características de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Western blot.

INMUNOFLUORESCENCIA

Para determinar la expresión y/o localización subcelular de determinadas proteínas en células, se sembraron $2 \cdot 10^4$ células en su medio de cultivo correspondiente en pocillos de cámaras de inmunocitoquímica (Lab-Tek II Chambers Thermo Scientific) y tras 24 horas fueron fijadas con 4% de paraformaldehído durante 10 minutos. Tras la fijación se procedió al bloqueo y permeabilización con PBS-0,3% Tritón X-100 (Cat. N° T8787, Sigma) suplementado con 5% SBF durante una hora a temperatura ambiente.

Tras el bloqueo, las muestras fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo primario [Tabla 9] durante 2 horas a temperatura ambiente y lavadas 3 veces con PBS 1x para posteriormente ser incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) [Tabla 9] durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Tras 3 lavados con PBS 1x se realizó el montaje usando Vectashield Mounting Medium con DAPI Hard set (Cat. N° H-1400, Vector

Laboratories). La inmunofluorescencia se observó en un microscopio Eclipse 80i y las imágenes se adquirieron con el software NIS Elements Advances Research (Nikon).

ANTICUERPO	ESPECIE DE ORIGEN	DILUCIÓN	REFERENCIA
Primarios			
SOX9	Conejo	1:1000	Millipore AB5535
SOX2	Conejo	1:500	Millipore AB5603
Fosfo-histona H3	Ratón	1:1000	Abcam Ab14955
PML (PG-M3)	Conejo	1:200	Santa Cruz Biotechnology SC-966
Secundarios			
Alexa Fluor 555 Rabbit Anti-Mouse IgG	Conejo	1:500	Invitrogen A21427
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Cabra	1:500	Invitrogen A32731

Tabla 9. Características de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las técnicas de inmunofluorescencia.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Con el objetivo de identificar y cuantificar la expresión de proteínas de interés en muestras de pacientes y en los tumores originados en los modelos animales se realizaron inmunohistoquímicas (IHQ).

MICROARRAY TISULAR (TMA) DE TUMORES DE PACIENTES

➤ **GLIOBLASTOMA**

Se analizó la expresión de SOX9 mediante IHQ en soporte TMA en muestras de dos cohortes de pacientes de GBM. Los bloques de TMA de pacientes del Hospital Universitario Donostia (HUD) (n=47) se prepararon en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital siguiendo el protocolo estándar. El TMA de la cohorte de 20 pacientes de GBM de University Hospital of Basel (USB) fue cedido por el Dr. Alexandar Tzankov, jefe del departamento de Histopatología y Autopsia de USB.

Todos los TMA fueron analizados con la ayuda de la Dra. Irune Ruiz, jefa del Servicio de Anatomía Patológica del HUD. La expresión variable de SOX9 fue cuantificada y categorizada según el porcentaje de positividad como “SOX9+”, donde menos del 60% de células eran positivas para SOX9, y “SOX9++” cuando más del 60% de las células presentaban positividad.

La cuantificación de PML se realizó basada en Carracedo *et al.*, 2012, en una escala del 0-3 en base a la cuantificación de la tinción de puntos nucleares, siendo: PML 0 = ausencia de tinción; PML 1= ~1% -10%; PML 2 =~10-30%; PML 3= ≥30%. La cuantificación de p-STAT3 se realizó en base a la siguiente escala: p-STAT3 0 = ausencia de tinción; p-STAT3 1= ~1-30 %; p-STAT3 2 = ~30-60 %; p-STAT3 3= ≥ 60 %.

➤ CÁNCER DE MAMA

Se analizó la expresión de SOX9, PML y p-STAT3 mediante IHQ en soporte TMA en un panel de muestras derivadas de pacientes (PDX) (n=23) correspondientes a (Carracedo *et al.*, 2012) y en muestras de pacientes de cáncer de mama de la cohorte de Marsella (n=737) (Martín-Martín *et al.*, 2016).

En las PDX la expresión de PML fue caracterizada de la misma forma que en la muestras de GBM y la expresión de SOX9 fue clasificada en 3 categorías según abundancia SOX9 +, SOX9 ++ y SOX9 +++ (Carracedo *et al.*, 2012).

En la cohorte de Marsella la cuantificación de PML, se dividió en PML-alto y PML-bajo y la señal de intensidad nuclear ($h = (1 \times \text{PML-bajo}) + (2 \times \text{PML-alto})$) y fue cuantificada atribuyendo el valor relativo 1 a PML-bajo y 2 a PML-alto. La cuantificación de expresión de SOX9 se realizó de forma automática como se describe en (Charpin *et al.*, 2012) y también la de p-STAT3 (Martín-Martín *et al.*, 2016). Estos análisis se realizaron en el Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM).

TUMORES DE ENSAYOS *IN VIVO*

Los tumores generados de forma subcutánea o en cerebros de los ratones en los que se realizó estereotaxia fueron extraídos y fijados en 10% de formalina durante 48 horas a temperatura ambiente para posteriormente ser embebidos en parafina y cortados en secciones de 4 μm de grosor con un microtomo. Los cortes fueron desparafinados, rehidratados mediante baños sucesivos en alcoholes decrecientes e incubados en tampón citrato en ebullición durante 10 minutos para la recuperación antigénica. A continuación se incubaron en solución de bloqueo (PBS-0,3% Tritón X-100-5% FBS) y fueron incubados con los correspondientes anticuerpos primarios [Tabla 10] a 37°C durante 2 horas. Tras la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron e incubaron con los anticuerpos secundarios [Tabla 10]. Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con el sustrato 3,3'Diaminobenzidina (DAB, Cat. No. SPR-DAB-060, Spring Bioscience), produciéndose como producto de la reacción DAB oxidada, un precipitado marrón detectable en el tejido. Las tinciones se observaron en un microscopio Eclipse 80i y fueron procesadas con el software NIS Elements Advances Research (Nikon).

ANTICUERPO	ESPECIE DE ORIGEN	DILUCIÓN	REFERENCIA
Primarios			
SOX9	Conejo	1:1000	Millipore AB5535
SOX2	Conejo	1:500	Millipore AB5603
Ki67	Conejo	1:1000	Abcam Ab15580
PML (PG-M3)	Conejo	1:200	Santa Cruz Biotechnology SC-966
pSTAT3 (Tyr705)	Conejo	1:100	Cell Signaling M9C6
Secundarios			
MACH 3 Rabbit HRP-Polymer	Conejo	Instrucciones del fabricante	BioCare Medical M3R531

Tabla 10. Características de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Con el objetivo de estudiar la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de los genes de interés tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes mediante PCR a tiempo real, se purificó el ARN y se obtuvo el ADN complementario (ADNc) mediante una reacción de retrotranscripción (RT).

MUESTRAS HUMANAS DE PACIENTES DE GLIOBLASTOMA

Para el análisis de los niveles de ARNm en muestras de pacientes se utilizó parte del tejido excedente de diagnóstico almacenado en el Biobanco Vasco de Investigación (<http://www.biobancovasco.org>). Se tuvo acceso a 88 muestras de GBM y 4 de tejido cerebral sano. Además se utilizó como control de tejido sano una muestra comercial compuesta por un pool de tejido cerebral sano (FirstChoice de Ambion, AM6050).

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Para el aislamiento del ARN celular se lisaron las células con una solución monofásica de tiocianato de guanidina y fenol (Trizol® Cat. No. AM-9738, Life Technologies). En el caso de las muestras de pacientes, el tejido previamente congelado en nitrógeno líquido se homogeneizó en un tissue- lyser (Quiagen Retsch MM300) antes de la adición del Trizol. La lisis en Trizol se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente mediante pipeteo vigoroso. Posteriormente se añadieron 200 µL de cloroformo (Cat. No. C2432, Sigma), se mezcló mediante inversión y se dejó actuar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12.000 x g a 4°C durante 10 minutos (microcentrífuga 22R, Beckman Coulter), separándose éstas en 3 fases bien definidas: una fase acuosa superior que contenía el ARN, una interfase que contenía el ADN y una fase orgánica que contenía las proteínas. La fase acuosa superior se trasvasó a nuevos tubos tratados con DEPC (Dietil pirocarbonato, Cat. No. 159220, Sigma) y se descartaron el resto de fases. Se añadieron 500 µL de alcohol isopropílico (Cat. No. I9516,

Sigma) y 1 μL de glicógeno (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Cat. No. AM9510, Ambion) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar el ARN. Tras otra centrifugación a 12.000 x g a 4°C durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7.000 x g a 4°C durante 5 minutos para lavar el precipitado. Por último, se descartó el sobrenadante minuciosamente, se secó el *pellet* en una cámara de vacío durante 10 minutos y se resuspendió con agua libre de ARNasas. La concentración y pureza del ARN aislado se determinó mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermo Scientific).

TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

Para la obtención del ADN complementario de cadena simple se realizó la retrotranscripción mediante el método de cebadores aleatorios y el Kit MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Cat. N° 4311235, Life Technologies), partiendo de 1 μg de ARN total. Las muestras se sometieron a los siguientes ciclos de temperatura en un termociclador BioRad C1000 Thermal Cycler: incubación de 10 minutos a 25°C, fase de calentamiento a 37°C durante 120 minutos y fase de calentamiento final a 85°C durante 5 minutos. El ADNc resultante se diluyó en agua libre de ARNasas a una concentración final de 4 ng/ μL .

PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)

Para determinar los niveles de expresión de los genes de interés se utilizó la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o a tiempo real (qRT-PCR), que se basa en la reacción de PCR para amplificar el producto específico, y permite la monitorización del proceso ciclo a ciclo. Se empleó ADN complementario como molde, dos cebadores específicos y una mezcla de reacción (Absolute SYBR Green mix (Cat. N° 4368706G, Applied Biosystem) que contiene desoxirribonucleótidos (dNTPs), enzima ADN polimerasa y el fluoróforo SYBR Green, el cual se intercala en los ácidos nucleicos de doble cadena y permite la cuantificación del producto en cada ciclo.

Las PCR se realizaron en placas de 96 pocillos (cada muestra por triplicado) y en cada pocillo se dispusieron 20 ng de ADNc en un volumen final de 12 µL constituidos por 6 µL de Absolute SYBR Green mix, 0,75 µL de agua libre de ARNasas y 0,25 µL de mezcla de cebadores (*forward* y *reverse*) específicos para cada gen de estudio [Tabla 11] a una concentración de 0,4 µM. La reacción se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 96 (Roche) con los siguientes ciclos de temperatura: 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.

Como gen de control interno para corregir las variaciones de los niveles de ADNc se usó la amplificación de GAPDH (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa). Para realizar la cuantificación relativa de los niveles de expresión génica se utilizó la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que consiste en calcular la expresión normalizada del gen de interés en la muestra con respecto a la muestras de referencia. Los datos se presentan como el “cambio de veces de expresión” del gen diana normalizado con el gen control y a su vez relativizada respecto a la correspondiente muestra control.

GEN	SECUENCIA <i>FORWARD</i>	SECUENCIA <i>REVERSE</i>
GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG	GACGGTGCCATGGAATTTGC
SOX9	AGCGAACGCACATCAAGAC	CTGTAGGCGATCTGTTGGGG
PML	CATCACCCAGGGGAAAGA	TCAATAGGGTCCCTGGGAGT
SOX2	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
STAT3	CAGCAGCTTGACACACGGTA	AAACACCAAAGTGGCATGTGA
LGR5	ACCAGACTATGCCTTTGGAAAC	TTCCAGGGAGTGGATTCTAT
CD133	GCTCAGACTGGTAAATCCCC	GACTCGTTGCTGGTGAATTG
OCT4	CGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG	CCACATCGGCCTGTGTATATCCCAG

Tabla 11: Secuencias de cebadores utilizados.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE *MICROARRAYS*

El análisis de *microarray* de expresión se llevó a cabo a partir de 0,5 µg de ARN de las células madre de glioma GNS166 control y con silenciamiento de SOX9 empleando un Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix). Los datos fueron normalizados por RMA o *Robust Multiarray Average* empleando el programa Affymetrix® Expression Console™. El análisis de expresión diferencial se realizó empleando el programa *Genespring*. El conjunto de datos fue analizado mediante el programa Interactive Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA), programa que integra en redes la lista de genes seleccionados en función de las relaciones biológicas más significativas de acuerdo con la bibliografía publicada.

INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Con el objetivo de determinar si la proteína PML se une a secuencias reguladoras del promotor de *SOX9*, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina. Para ello se utilizó SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling Technology Cat. No.9003).

Se cultivaron las células U251 y MDA-MB-231 infectadas con el plásmido inducible HA-PML en placas de 150 mm durante 3 días en presencia o no de 50 ng/mL de doxiciclina para inducir la expresión de PML. Se añadió formaldehído al 35 % durante 10 minutos a temperatura ambiente a $2,5 \cdot 10^7$ células. Posteriormente se añadió glicina a las placas y se incubaron las células durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS frío se recogieron mediante un raspador en PBS + PMSF. Los pellet fueron lisados y los núcleos recogidos siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los lisados nucleares fueron digeridos con nucleasa micrococcal durante 20 min a 37°C y posteriormente se sonicaron (Branson) en alícuotas de 500 µL en hielo durante 3 pulsos de 15 segundos. Los extractos se mantuvieron en hielo durante 1 minuto entre

cada sonicación. Los lisados se aclararon mediante centrifugación a 11.000 x g durante 10 minutos a 4°C y la cromatina fue almacenada a -80°C.

Los extractos se incubaron con el anticuerpo policlonal HA-Tag (cat: C29F4, Cell Signaling Technology), anticuerpo policlonal de conejo anti-PML (cat: A301-167A; Bethyl laboratorios) y el anticuerpo IgG de conejo (cat: 2729, Cell Signaling Technology, Inc) durante 16h a 4°C en rotación. A continuación se añadieron esferas magnéticas conjugadas a proteína G y se incubaron durante dos horas a 4°C y en rotación. Se procedió a los lavados y elución de la cromatina siguiendo las instrucciones. La cuantificación del ADN se realizó usando Vii7 RT-PCR system (Applied Biosystems) con SybrGreen y primers que amplifican la región de unión predicha para PML en el promotor de *SOX9* (chr17:70117013-70117409). Cebador *forward*: cgggaaacttttctttgcag y cebador *reverse*: cggcgagcacttaggaag.

BASE DE DATOS DE PACIENTES Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Se generó una base de datos anonimizada con los datos clínicos de los pacientes de glioblastoma para su análisis. La base incluye todos los pacientes con diagnóstico anatomopatológico de GBM sometidos a tratamiento quirúrgico o biopsia en el HUD en el periodo entre 2007 y 2016, cuyo consentimiento informado se obtuvo previamente.

Para el análisis de correlación de expresión génica en muestras de GBM de pacientes de la cohorte del TCGA (Cell 2013) se utilizó cBioportal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org/>).

La correlación de expresión génica en muestras de pacientes de cáncer de mama se realizó extrayendo el conjunto de genes de GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) utilizando el programa [http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/V\\$STAT3_01](http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/V$STAT3_01). Los valores de la media se extrajeron de la cohorte de MSK/EMC (Memorial Sloan Kettering Cancer Center-Erasmus Medical Center) (Morales et al., 2014; Pavlovic et al., 2015) y posteriormente se usaron para realizar análisis de correlación Pearson.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos mostrados en el presente trabajo representan la media \pm error estándar (SEM), con el número de experimentos (n) indicado en cada experimento, siendo al menos tres experimentos independientes. Las medias fueron comparadas mediante el test estadístico t de Student para distribuciones normales, indicando los asteriscos los diferentes grados de significación estadística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$. Para los análisis de correlación entre dos genes se realizó la correlación de Pearson y para los ensayos de comparación de genes de componentes múltiples el análisis de la varianza (ANOVA). Para el cálculo de la significación estadística de la relación de los diferentes marcadores con la supervivencia en las muestras de los pacientes y ensayos *in vivo* de estereotaxia se aplicó el test de Log-Rank. Para el cálculo de la frecuencia de células iniciadoras tumorales se realizó la prueba Chi-cuadrado (χ^2). Se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor de 0,05. El intervalo de confianza (IC) usado para todos los análisis estadísticos es de 0,95.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los pacientes de GBM cuyas muestras fueron utilizadas para la realización de este trabajo firmaron el correspondiente consentimiento informado. El uso de estas muestras fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del área sanitaria de Guipúzcoa según consta en Acta nº 11/12 dentro del proyecto “Estudio de la función de SOX9 en glioblastoma”. La aprobación del panel de muestras de cáncer de mama y de la cohorte de Marsella se detalla en las correspondientes referencias (Carracedo et al., 2012; Martín-Martín et al., 2016) y fueron coordinados por la Unidad de Proteómica de CIC bioGUNE.

Todos los animales de experimentación utilizados en este trabajo fueron mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Biodonostia siguiendo las directrices de la autoridad competente y de acuerdo a las normas establecidas por el Consejo de las Comunidades Europeas (directiva 86/609/EEC).

RESULTADOS

NIVELES DE EXPRESIÓN DE SOX9 ELEVADOS EN MUESTRAS DE PACIENTES Y CÉLULAS MADRE DE GLIOMA

Para determinar la relevancia clínica de SOX9 en GBM, se comenzó analizando su expresión a nivel de ARNm mediante qRT-PCR en una cohorte de 88 muestras de GBM obtenidas de biopsias de pacientes del Hospital Universitario Donostia (HUD), y se comparó con la expresión en muestras de tejido cerebral sano. Los resultados revelaron que más del 80% de las muestras tumorales (71 de 88) presentan sobre-expresión de SOX9 (expresión mayor del doble respecto al tejido sano), mientras que menos del 20% de las mismas (17 de 88) expresan niveles similares o inferiores a los del tejido sano [Figura 11A].

De manera análoga se analizó la expresión de proteína de SOX9 mediante un *microarray* de tejidos (TMA) en muestras de 47 de esos mismos pacientes del HUD. Todas las muestras mostraron positividad en la expresión proteica de SOX9. Sin embargo, presentaron expresión variable, la cual fue cuantificada y clasificada según el porcentaje de positividad en "SOX9 +", donde menos del 60% de células eran positivas para SOX9 y "SOX9 ++", con un porcentaje de células positivas superior al 60% [Figura 11B]. El 83 % de las muestras pertenecían al grupo SOX9 +, mientras que el 17% de las mismas correspondían al grupo SOX9 ++. Reforzando estos datos, el análisis mediante TMA de una cohorte de 20 pacientes de GBM del University Hospital of Basel (USB) resultó también positivo en el 100% de las muestras, las cuales fueron clasificadas con el mismo criterio, resultando en el 40% de las muestras en el grupo SOX9 + y el 60% en el grupo SOX9 ++. Estos datos confirman que la expresión de SOX9 está elevada en GBM.

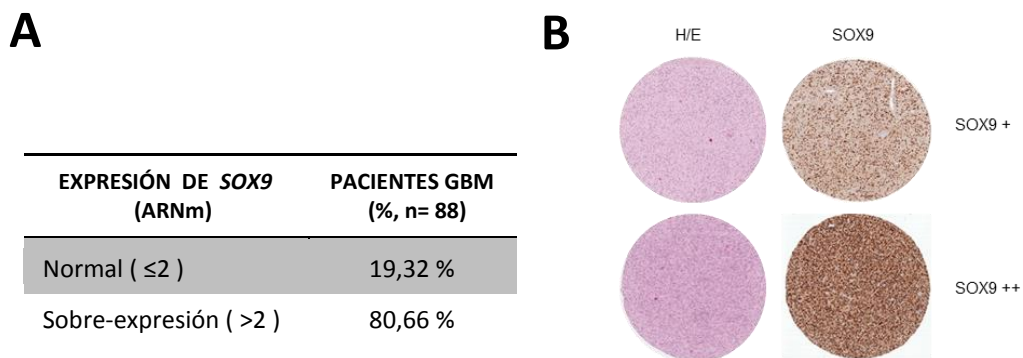


Figura 11. Expresión de *SOX9* en muestras de GBM de pacientes del HUD (A) Expresión de *SOX9* a nivel de ARNm (n=88). “Sobre-expresión” hace alusión a niveles superiores (>2 veces) respecto al tejido sano; “normal” hace alusión a niveles iguales o inferiores (≤2 veces) respecto a la media del tejido sano. **(B)** Imágenes representativas de *microarray* tisular (TMA) de la tinción hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de *SOX9* en las muestras de GBM (n= 47) de la cohorte de HUD. “*SOX9+*” hace alusión a la positividad en la expresión del ≤ 60% de las células; “*SOX9++*” corresponde a positividad en >60% de las células.

Se determinó la expresión de *SOX9* mediante qRT-PCR en diferentes líneas celulares de glioma establecidas: U251, T98G, A172, U87 y U373. Los resultados mostraron que la totalidad de las líneas celulares expresan *SOX9* a nivel de ARNm, presentado las líneas U251, T98G y A172 niveles de expresión superiores a los de las líneas U87 y U373 [Figura 12A]. Además, se confirmaron estos resultados en la expresión a nivel de proteína mediante Western blot [Figura 12B].

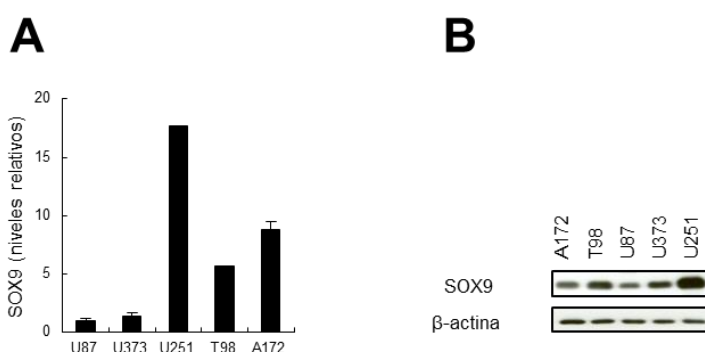


Figura 12. Nivel de expresión de *SOX9* en líneas celulares de glioma (A) Expresión relativa de ARNm (n=3). Expresión relativizada frente a la expresión de la línea U87. **(B)** Western blot representativo de *SOX9* (n=3).

Se analizó la asociación del nivel de expresión de SOX9 con la supervivencia de los pacientes y se observó que los pacientes de GBM del HUD cuyos tumores expresan niveles elevados de SOX9 a nivel de proteína (SOX9++) presentan un pronóstico significativamente más desfavorable, con una supervivencia media de 13 meses, mientras que los pacientes cuyos tumores expresan niveles inferiores de SOX9 (SOX9+) sobreviven una media de 24 meses ($p < 0,003$) [Figura 13A]. El mismo análisis en la cohorte de USB reveló también que la elevada expresión de SOX9 se asocia significativamente con una menor supervivencia de los pacientes (3,5 meses), respecto a los pacientes cuyos tumores expresan niveles inferiores de SOX9 (8 meses) ($p < 0,0179$) [Figura 13B], confirmando que SOX9 es un marcador pronóstico en dos cohortes independientes.

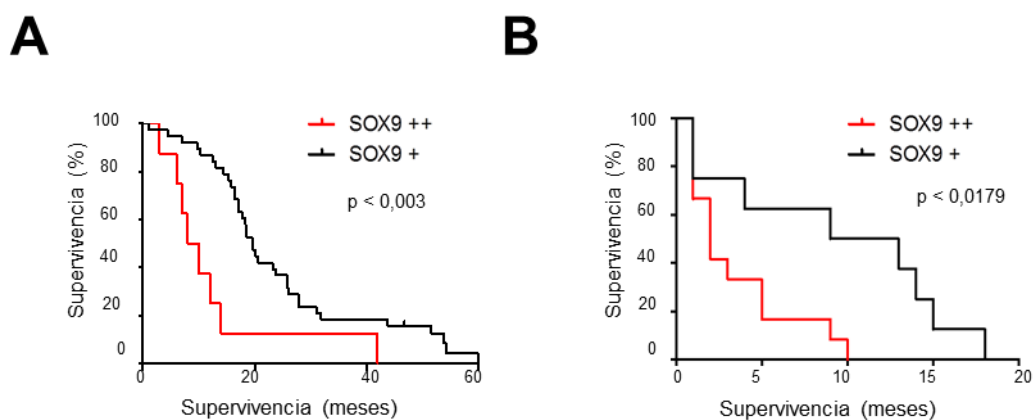


Figura 13. Asociación del nivel de expresión de SOX9 con la supervivencia de pacientes de GBM mediante análisis Kaplan-Meier. (A) En la cohorte del HUD ($n= 47$) ($p < 0,003$) y **(B)** en la cohorte de USB ($n=20$) ($p < 0,0179$). Nivel de expresión proteica de SOX9 analizada mediante TMA. SOX9+; positividad en $\leq 60\%$ de las células; SOX9++ positividad en $> 60\%$ de las células. Se realizó el test de Log-Rank y se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05.

Teniendo en cuenta la importancia clínica de la expresión de SOX9 en cuanto a la supervivencia de los pacientes, se prosiguió en el estudio de su rol en GBM y se estudió su expresión y papel en la regulación de las células madre de glioma (GSC).

Para conocer la expresión de SOX9 en la subpoblación de células madre tumorales (CMT) de las líneas, éstas fueron cultivadas en medio selectivo de célula madre. En estas

condiciones las células crecieron formando esferas en suspensión (tumorosferas) (GSC 2^{ria}) en las que los niveles de expresión de SOX9 resultaron significativamente superiores a los presentados por las líneas celulares en cultivo adherente o monocapa [Figura 14A]. La expresión de SOX9 aumentó significativamente en las tumorosferas de U373, U87 y U251 a nivel de ARNm [Figura 14B], como también los marcadores establecidos de célula madre SOX2, OCT4 y CD133 [Figura 14C]. A nivel de proteína también se observó un notable aumento de SOX9 en tumorosferas tal y como muestran las imágenes de Western blot [Figura 14D].

Además, las células U373 y U87 y las tumorosferas derivadas de las mismas fueron inyectadas de forma subcutánea en ratones inmunodeprimidos FOXn1^{nu} (nu/nu) para evaluar su capacidad tumorigénica. Se determinó que los tumores procedentes de las tumorosferas aparecieron antes (día 40 en las células U373) que los procedentes de las células parentales (día 140 en las células U373) [Figura 14E], y alcanzaron un mayor volumen. A día 34 los tumores procedentes de las tumorosferas de U87 alcanzaron los 340mm³ en comparación con los 40 mm³ de los originados por la línea parental [Figura 14E]. Los tumores originados fueron analizados mediante inmunohistoquímica (IHQ), y se observó que la expresión de SOX9 era superior en los tumores generados por las tumorosferas en comparación con los tumores generados por las células control [Figura 14F].

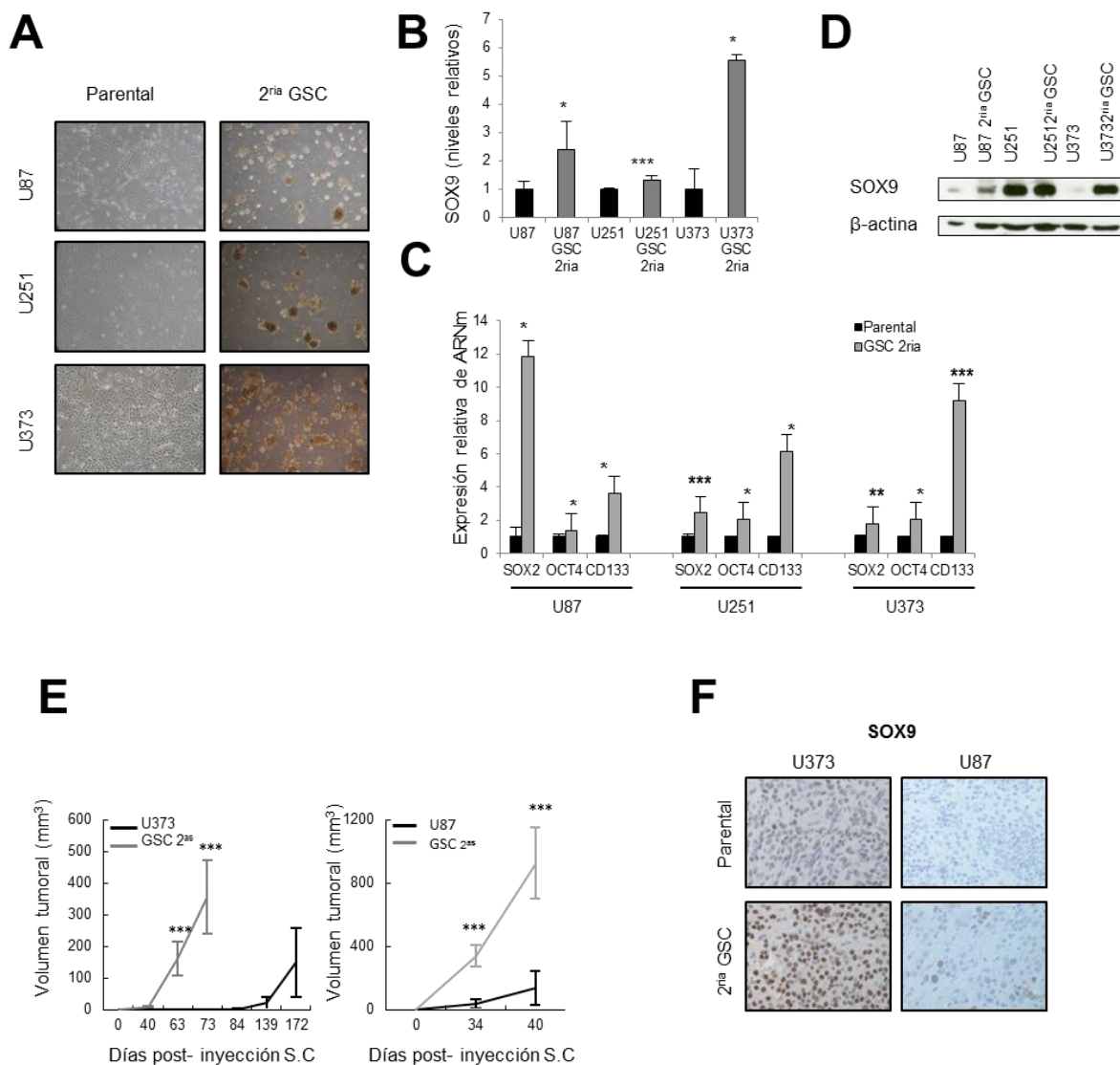


Figura 14. Expresión de SOX9 en líneas celulares de glioma en condiciones de cultivo adherente y en condiciones selectivas para célula madre. (A) Imágenes representativas de las líneas U87, U251 y U373 cultivadas en adhesión (parental) y en condiciones selectivas de célula madre (esferas, 2^{ria} GSC). **(B)** Expresión relativa de SOX9 a nivel de ARNm en esferas (2^{ria} GSC) respecto a las líneas en cultivo adherente (n=3) y **(C)** los marcadores establecidos de célula madre SOX2, OCT4 y CD133 (n=3). **(D)** Western blot representativo de SOX9 de las líneas de glioma U87, U251 y U373 cultivadas en condiciones selectivas de célula madre (2^{ria} GSC) y en adhesión. **(E)** Representación del volumen tumoral en los tiempos indicados de los tumores subcutáneos originados en ratones inmunodeprimidos FOXn1^{nu} (nu/nu) (n=8) por las células U373 y U87 cultivadas de forma adherente y en medio selectivo de célula madre (2^{ria} GSC). **(F)** Imágenes representativas de la expresión de SOX9 determinada mediante IHQ en los tumores subcutáneos generados. La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

En paralelo se caracterizó la expresión de SOX9 en cuatro líneas de célula madre de glioma derivadas de pacientes: GB1034, GB1012, GNS179 y GNS166, observándose una expresión endógena elevada a nivel de proteína en todas ellas [Figura 15A]. Cuando estas líneas de célula madre fueron diferenciadas mediante la adición de 1% de SFB al medio selectivo de célula madre, se observó que la expresión de SOX9 a nivel de ARNm disminuía significativamente en las células diferenciadas en comparación con las células madre de glioma del cultivo en esferas [Figura 15B], hecho que vincula a SOX9 con el estado no diferenciado de las células madre de glioma e indica que éste podría ser relevante en esta subpoblación celular.

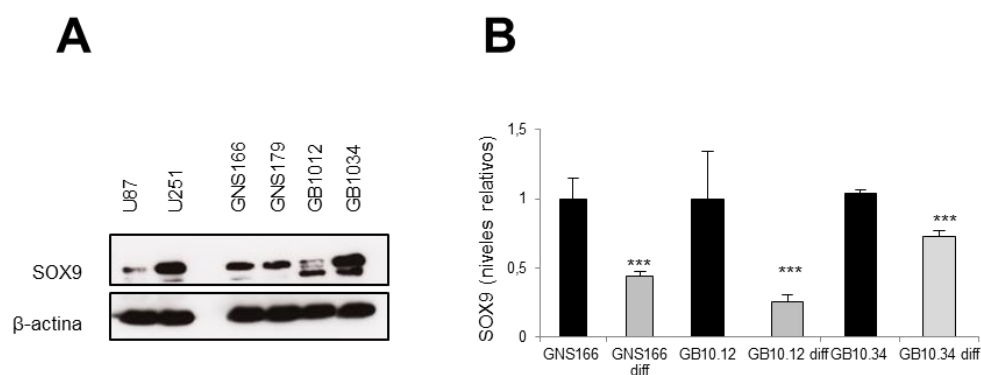


Figura 15. Nivel de expresión de SOX9 en líneas de célula madre de glioma. (A) Western blot representativo de SOX9 de las líneas de célula madre de glioma GNS166, GNS179, GB1012 y GB1034 respecto a las líneas convencionales U87 y U251 (n=3). **(B)** Expresión relativa de ARNm en condiciones selectivas de célula madre y condiciones de diferenciación (medio selectivo de célula madre con 1% SFB, “diff”). Expresión normalizada respecto a la expresión de GAPDH y relativizada frente a la expresión de la condición de célula madre (n=3). La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

Posteriormente se profundizó en el análisis del papel de SOX9 en GBM mediante ensayos de pérdida y ganancia de función.

LA SOBRE-EXPRESIÓN DE SOX9 AUMENTA LAS CARACTERÍSTICAS TUMOROGÉNICAS EN GLIOBLASTOMA

Con el objetivo de identificar la función de SOX9 en GBM, se sobre-expresó *SOX9* ectópicamente mediante infecciones con lentivirus portadores de un plásmido con la secuencia codificante de SOX9 en las líneas U87 y U373, las cuales presentan niveles bajos e intermedios de SOX9, respectivamente; y también en la línea de célula madre de glioma GNS166. La eficiencia de la sobre-expresión fue confirmada mediante Western blot [Figura 16A] y PCR cuantitativa [Figura 16B] y a continuación se estudió el fenotipo celular.

La sobre-expresión de *SOX9* resultó en un incremento significativo de la proliferación celular de un 14%, 36% y 43% en las células U87, U373 y GNS166, respectivamente [Figura 16C]. También se valoró la capacidad de las células para proliferar de una manera independiente de anclaje en medio *Soft agar* y la formación de colonias en condiciones de dilución limitantes, aspectos *in vitro* que guardan relación con su capacidad tumorigénica y de auto-renovación, características fundamentales de las CMT. Estos experimentos revelaron que la sobre-expresión de *SOX9* en las líneas U87 y U373 favorece el crecimiento independiente de anclaje, determinado a través del conteo de los focos celulares o *foci* generados en este medio [Figura 16D], y también la capacidad de formación de colonias en condiciones limitantes de dilución celular [Figura 16E].

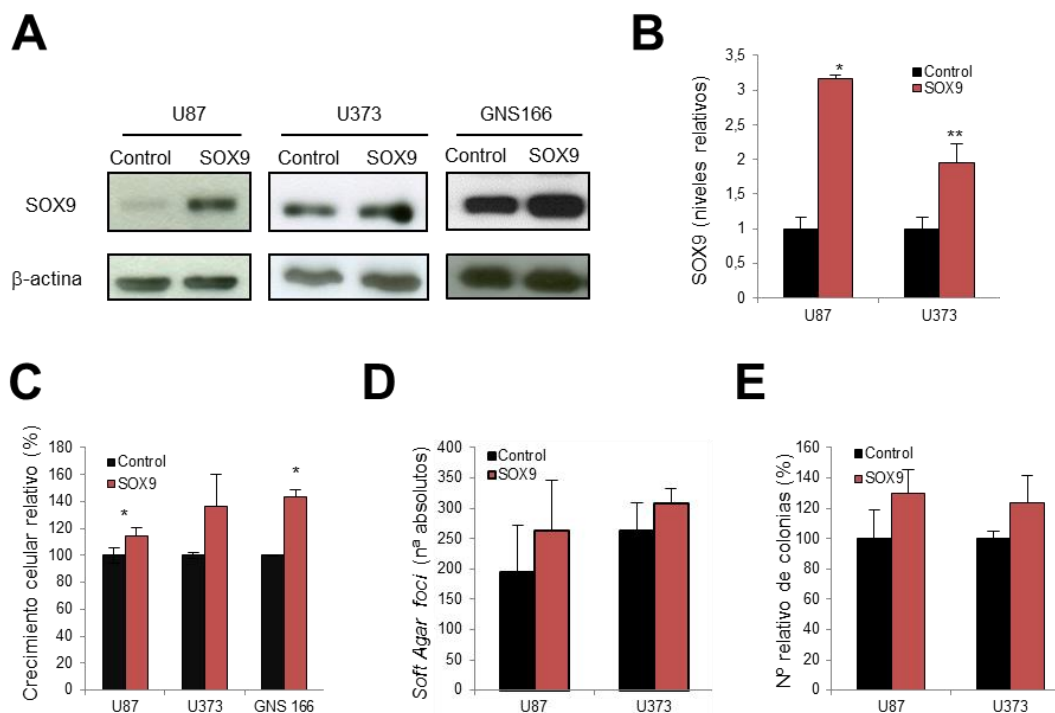


Figura 16. Efecto de la sobre-expresión ectópica de *SOX9* en líneas celulares de glioma y células madre de glioma. (A) Western blot representativo de *SOX9* en células U87, U373 y GNS166 infectadas mediante lentivirus con plásmido control y con sobre-expresión de *SOX9* (*SOX9*). **(B)** Expresión relativa de *SOX9* a nivel de ARNm de las células con sobre-expresión ectópica de *SOX9* respecto a células control en las líneas U87 y U373 (n=3). **(C)** Cuantificación relativa del crecimiento a día 5 (n=3). **(D)** Contaje de tumorosferas formadas en *soft-agar* de las células U87 y U373 con sobre-expresión de *SOX9* respecto al control (n=3) y **(E)** su capacidad de formación de colonias a partir de células aisladas (n=3). La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

Con el objetivo de valorar *in vivo* el efecto de la sobre-expresión de *SOX9* sobre la capacidad tumorigénica de las células de glioma, realizamos dos tipos de ensayos de carcinogénesis en animales inmunodeprimidos: ensayos subcutáneos con la línea celular U373 y ensayos ortotópicos mediante la inyección estereotáctica en el cerebro de las células madre de glioma GNS166.

En el primer caso, las células U373 con sobre-expresión de *SOX9* formaron tumores en el 87.5 % de los casos en comparación con el 12.5% de las células control, indicando una mayor capacidad de formación de tumores [Figura 17A]. También se

observaron diferencias relevantes en cuanto a la latencia en la aparición, pues los tumores con sobre-expresión de *SOX9* aparecieron a día 53, mientras que los originados a partir de las células control lo hicieron a día 84 [Figura 17B]. Además, el crecimiento tumoral fue superior en los tumores con sobre-expresión de *SOX9*, encontrándose diferencias muy significativas en los volúmenes alcanzados [Figura 17B y C].

Al analizar mediante IHQ los tumores generados por las células con sobre-expresión de *SOX9* se observó que expresaban niveles superiores de *SOX9* y también del regulador de célula madre *SOX2*, en comparación con los tumores originados por las células U373 control [Figura 17D], reforzando el papel de *SOX9* como regulador de las células madre de glioma. Además, en concordancia con los resultados de proliferación *in vitro* y de crecimiento tumoral *in vivo*, los tumores con sobre-expresión de *SOX9* presentaron mayor intensidad del marcador de proliferación Ki67 [Figura 17D].

Se realizó el mismo procedimiento con las células madre de glioma GNS166, que fueron inyectadas mediante estereotaxia en ratones inmunodeprimidos NOD-SCID. En estos experimentos se observó una disminución significativa ($p=0,0042$) en el tiempo de supervivencia de los ratones en los que se inyectaron las células GNS166 con sobre-expresión de *SOX9*, los cuales presentaron una supervivencia media de 35 días ($\pm 7,8$) en comparación con aquellos ratones en los que se inyectaron las células control, con una supervivencia media de 116 días ($\pm 11,5$) [Figura 17E].

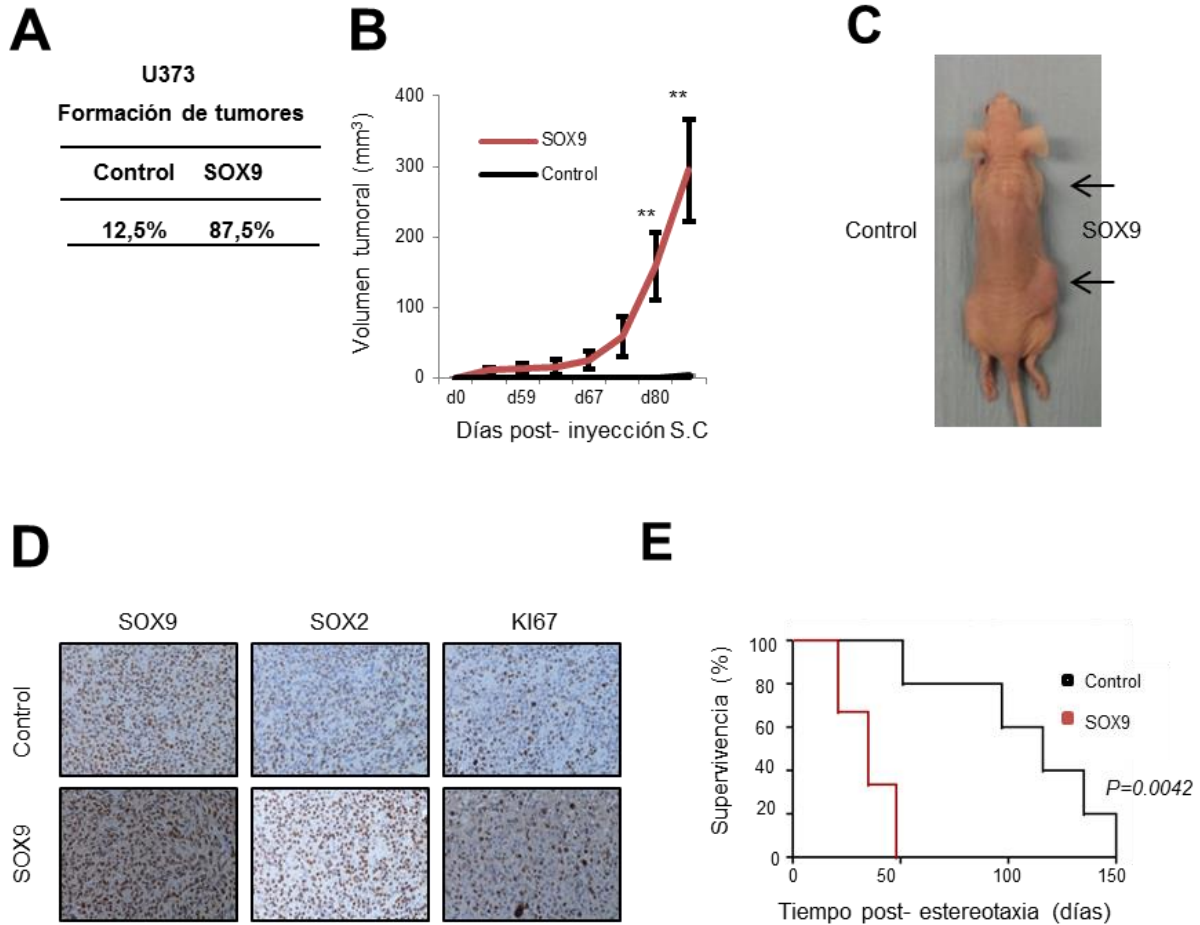


Figura 17. Efecto de la sobre-expresión ectópica de *SOX9* en líneas celulares de glioma y células madre de glioma. (A) Porcentaje de tumores formados tras la inyección subcutánea de $1 \cdot 10^5$ células U373 control y con expresión ectópica de *SOX9* en ratones inmunodeprimidos $FOXn1^{nu}$ (nu/nu) ($n=8$ inyecciones por condición experimental) y **(B)** representación del volumen tumoral en los tiempos indicados de los tumores subcutáneos originados. **(C)** Imagen representativa en la que se aprecian los tumores formados en los ratones. Los tumores formados en el flanco derecho corresponden a células con sobre-expresión ectópica de *SOX9* y el flanco izquierdo libre de tumores corresponde a la inyección de células control. **(D)** Imágenes representativas de la expresión de *SOX9*, *SOX2* y *Ki67* determinada mediante IHQ en los tumores generados en el ensayo subcutáneo. **(E)** Curva de Kaplan- Meier representando la supervivencia de ratones NOD-SCID tras la inyección estereotáctica de células GNS166 control ($n=4$) y con sobre-expresión ectópica de *SOX9* ($n=3$) ($P=0,0042$). Para el ensayo de estereotaxia se realizó el test de Log-Rank y se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor de 0,05. La significancia estadística del resto de ensayos se obtuvo con el test T de Student ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

El conjunto de estos datos muestra que los niveles elevados de SOX9 aumentan la proliferación celular, la capacidad de auto-renovación y la tumorigénesis en las líneas celulares de glioma y células madre de glioma, asociando por lo tanto la expresión de SOX9 con la iniciación y progresión tumoral.

Dada la correlación observada entre SOX9 y las GSC *in vitro* e *in vivo* y la asociación de la sobre-expresión de SOX9 con la supervivencia disminuida de los pacientes, se analizó el impacto de SOX9 en la respuesta a la quimioterapia. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de SOX9 en respuesta a Temozolomida (TMZ) en dos líneas de glioma con diferentes niveles de SOX9 basales; U251 con niveles basales altos y U87 con niveles bajos. Al tratar las células con dosis crecientes de TMZ (100 y 200 μ M) se observó que la expresión de SOX9 aumentaba de una manera dependiente de concentración [Figura 18A]. Posteriormente se realizó un ensayo de viabilidad celular en el que se observó que las células U87, las cuales presentan niveles basales más bajos de SOX9, eran significativamente más sensibles a TMZ que las células U251. En concreto, al tratar las células con 100 y 200 μ M de TMZ, el porcentaje de toxicidad de las células U87 variaba entre 24 y 27%, mientras que el de las células U251 se mantenía entre un 6 y 8% respectivamente [Figura 18B], sugiriendo que SOX9 está implicado en la resistencia a TMZ.

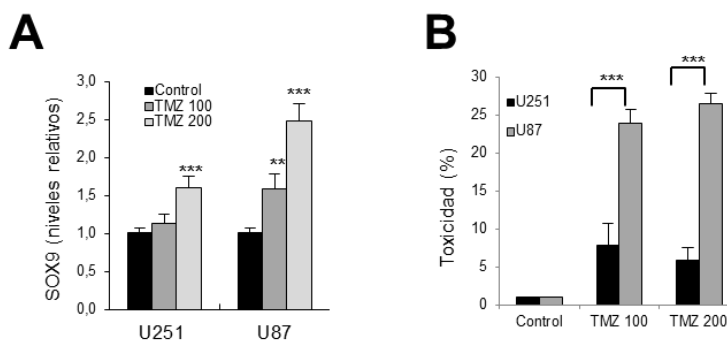


Figura 18. Efecto de la TMZ en células de glioma con diferentes niveles basales de SOX9. (A) Expresión de SOX9 a nivel de ARNm en U251 y U87 cultivadas con TMZ (100 y 200 μ M) durante 24h (n=3). Expresión relativizada frente al control tratado con DMSO. **(B)** Porcentaje de toxicidad celular analizado por ensayo MTT en U251 y U87 tras tratamiento de 72 horas con las dosis de TMZ indicadas (n=6). La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

Se cultivó la línea U251, con elevados niveles basales de SOX9, en presencia de dosis crecientes de Rapamicina, un inhibidor de la vía de señalización mTOR, durante 24 horas. En estos experimentos se observó que el nivel de expresión de SOX9 disminuía en respuesta a Rapamicina de una manera dosis-dependiente a nivel de ARNm [Figura 19A] y de proteína [Figura 19B].

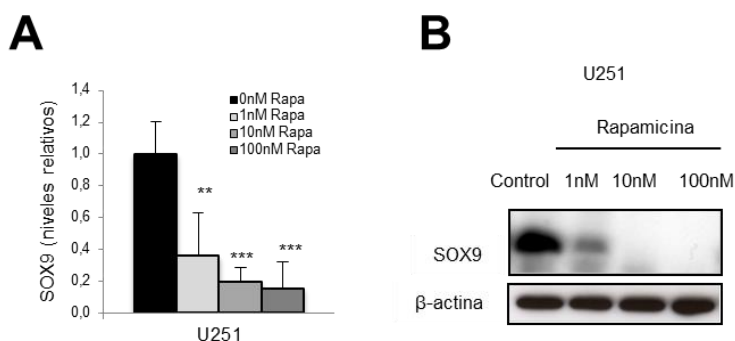


Figura 19. Efecto de la Rapamicina en células de glioma (A) Niveles de expresión de ARNm de *SOX9* en U251 cultivadas con dosis crecientes de Rapa (1, 10 y 100nM) a las 24h (n=3). Los valores están relativizados al control con DMSO y **(B)** expresión de *SOX9* a nivel de proteína (n=3). La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

EL SILENCIAMIENTO DE SOX9 REDUCE LAS CARACTERÍSTICAS TUMOROGÉNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

Se continuó con la caracterización de la función de *SOX9* en GBM silenciando su expresión mediante ARN interferente *short hairpin* (shSOX9-1) en las líneas celulares U373 y U251, las cuales presentan niveles basales intermedios y elevados de *SOX9* respectivamente, y en la línea de células madre de glioma GNS166. Tras verificar la eficiencia de la transducción mediante Western blot [Figura 20A], se procedió a analizar el fenotipo celular.

El silenciamiento de *SOX9* resultó en una disminución significativa de más del 50% en la proliferación celular en las líneas U251 y U373 [Figura 20B]. La proliferación, determinada mediante el conteo del número de células positivas para el marcador de mitosis Histona H3 fosforilada (ser10), también se redujo a la mitad en las células GNS166

[Figura 20C]. Esta reducción del crecimiento en las células *shSOX9* tanto en células diferenciadas como en GSC se acompañaba de un aumento significativo de la proporción de células senescentes, cuantificado a través del análisis de la actividad β -galactosidasa [Figura 20D].

Además, la capacidad de formación de tumorosferas de las líneas U251 y U373 en medio selectivo para células madre se redujo más del 60% en las células con silenciamiento de *SOX9* en comparación con las células control, hecho que implica una reducción de la capacidad de auto-renovación de las células madre [Figura 20E].

Para constatar esta reducción del potencial de la actividad tumoral de las células con el silenciamiento de *SOX9*, se realizaron ensayos de carcinogénesis subcutáneos en ratones inmunodeprimidos *FOXn1^{nu}* (*nu/nu*) y se observó una notable reducción en la capacidad de formación de tumores en las células U373 con silenciamiento de *SOX9*. Los ratones a los que se les inocularon las células con silenciamiento de *SOX9* desarrollaron tumores en el 33.3% de los casos, en comparación con las células control, que formaron en el 83.3%. Además, los tumores originados por las células con silenciamiento de *SOX9* aparecieron el día 116 tras la inoculación de las células y su crecimiento fue notablemente inferior al de los tumores originados por las células U373 control, los cuales aparecieron a día 102 [Figura 20F]. Al analizar mediante IHQ los tumores generados por las células con silenciamiento de *SOX9* se observó que, al contrario que los tumores originados por las células con sobre-expresión ectópica de *SOX9*, expresaban niveles inferiores de *SOX9*, *SOX2* y el marcador de proliferación *Ki67* en comparación con los tumores control [Figura 20F].

Por lo tanto, el silenciamiento de *SOX9* disminuye la proliferación celular, el crecimiento tumoral e incrementa la senescencia en líneas celulares de glioma y células madre de glioma. Además, el silenciamiento de *SOX9* disminuye la capacidad de auto-renovación y de iniciación tumoral. Estos resultados en su conjunto demuestran que *SOX9* es un gen responsable del mantenimiento de las características malignas que caracterizan a las células de GBM.

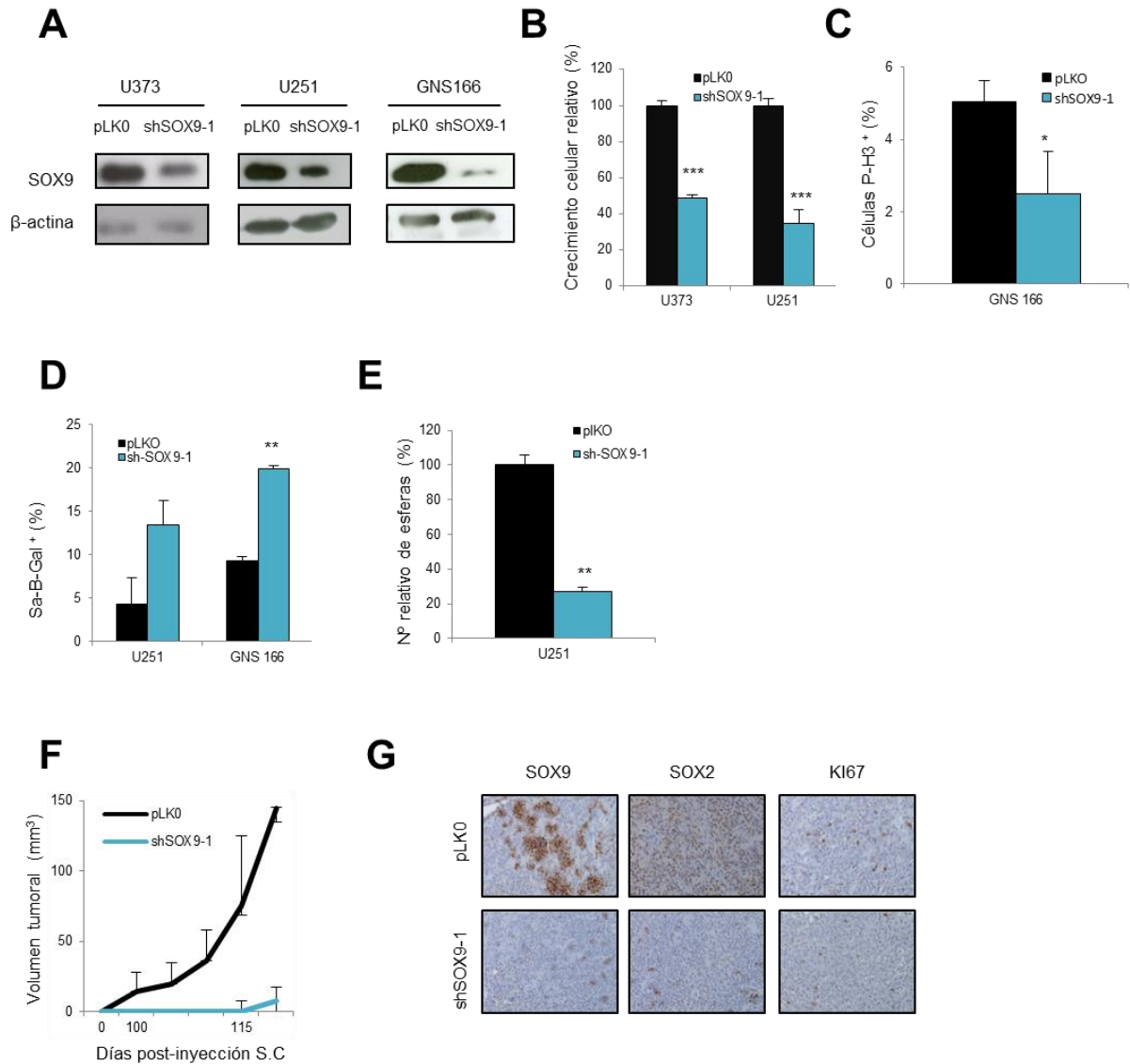


Figura 20. Efecto del silenciamiento genético de *SOX9* en líneas celulares de glioma y células madre de glioma. (A) Western blot representativo de *SOX9* de las células U373, U251 y GNS166 transducidas con un plásmido control (pLKO) y con el de silenciamiento de *SOX9* (shSOX9-1) (n=3). **(B)** Cuantificación relativa de la proliferación celular de las células U373 y U251 con silenciamiento de *SOX9* respecto a las células control a día 5 (n=3). **(C)** Cuantificación de células P-H3 positivas en la condición *shSOX9* respecto al control de las células GNS166 (n=3). **(D)** Cuantificación relativa de las células senescentes control y con silenciamiento de *SOX9* en la línea U251 y GNS166 (n=3). **(E)** Cuantificación relativa de formación de tumorosferas en U251 con silenciamiento de *SOX9* respecto a las células control en la línea U251 (n=3). **(F)** Representación del volumen tumoral en los tiempos indicados tras la inyección subcutánea de $1 \cdot 10^5$ células U373 control y con silenciamiento de *SOX9* en ratones inmunodeprimidos FOXn1^{nu} (nu/nu) (n=8 inyecciones por condición experimental). **(G)** Imágenes representativas de la expresión de *SOX9*, *SOX2* y Ki67 determinada mediante IHQ en los tumores subcutáneos generados. La significancia estadística del resto de ensayos se obtuvo con el test T de Student ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

Se quiso valorar la importancia de SOX9 en la población de CMT de otros cánceres en los que esta subpoblación celular es muy crítica, como el cáncer de mama. Para ello, se comenzó silenciando su expresión en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama mediante dos *shARN* (*shSOX9-1* y *shSOX9-2*) [Figura 21A]. El silenciamiento de *SOX9* resultó en una disminución significativa de más del 50% en la proliferación celular [Figura 21B]. También se valoró la capacidad tumorigénica de estas células en experimentos de tumorigénesis subcutánea en ratones inmunodeprimidos y se observó una disminución en la formación de tumores, ya que las células con silenciamiento de *SOX9* no generaron tumores (*sh-SOX9-1*) o sólo en el 12,5% de los casos (*sh-SOX9-2*), en comparación con las células control, que formaron en el 100% de los casos. El volumen de los tumores aparecidos fue significativamente inferior en las células con silenciamiento de *SOX9*, los cuales alcanzaron un volumen medio de $18 (\pm 17,68) \text{ mm}^3$ (*shSOX9-2*) en comparación con $659 (\pm 106,54) \text{ mm}^3$ de los originados por las células control a día 39 tras la inyección subcutánea [Figura 21D]. A continuación se analizaron distintas características asociadas a las CMT como la capacidad de formación de tumorosferas, observándose una reducción que alcanzó el 50% con las dos formas interferentes [Figura 21C] y la iniciación tumoral, mediante ensayos *in vivo* de tumorigénesis subcutánea en los que se inyectaron diferentes diluciones de células ($0,5 \cdot 10^6$ y $0,05 \cdot 10^6$). Con los resultados de incidencia tumoral para cada dilución celular y empleando la plataforma ELDA, se calculó la frecuencia de células iniciadoras de tumores en las células control y con silenciamiento de *SOX9*. Esta frecuencia resultó muy inferior en las células con silenciamiento de *SOX9* (1 en un número infinito de células para *shSOX9-1*; 1 en 4145 células para *shSOX9-2*) frente a las células control pLKO (1 en 71 células) [Figura 21E].

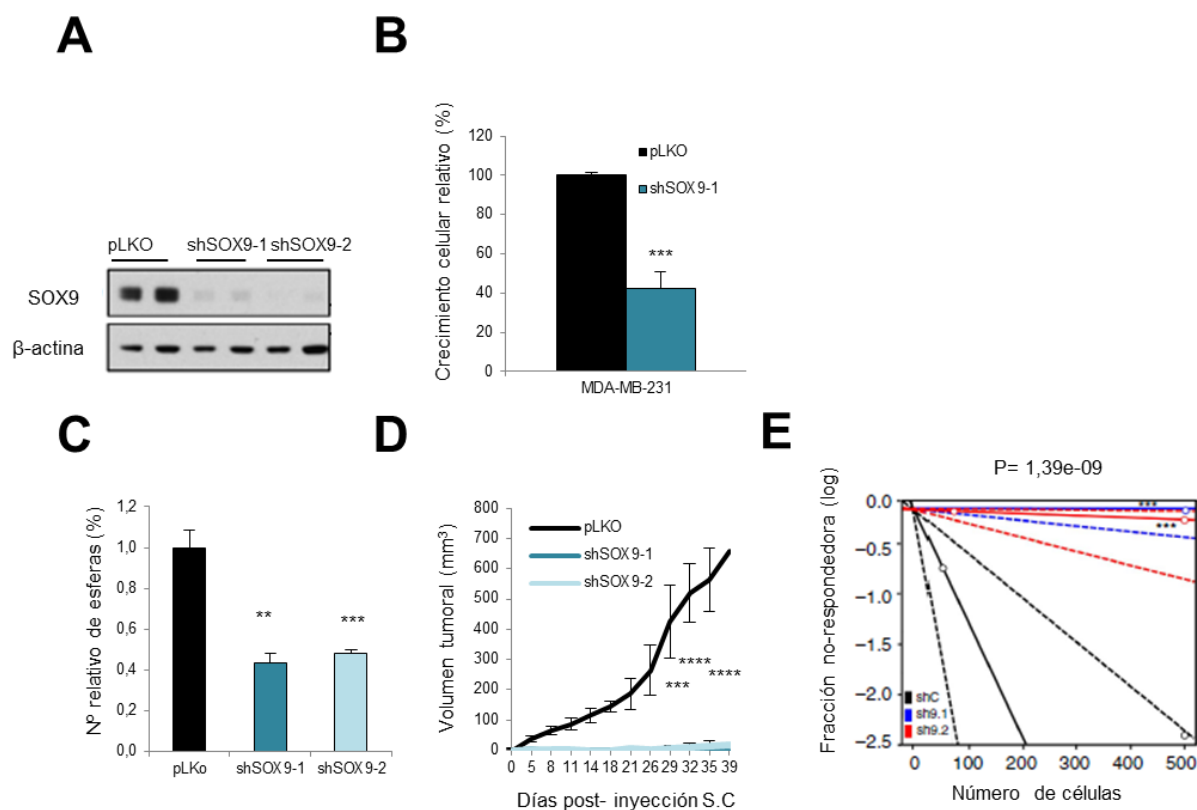


Figura 21. Efecto del silenciamiento de SOX9 en la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama. (A) Western blot representativo de SOX9 en células control (pLKO) y con silenciamiento de SOX9 mediante 2 *shARN* interferentes (*shSOX9-1* y *shSOX9-2*) (n=3). **(B)** Cuantificación relativa de la proliferación celular de las células con silenciamiento de SOX9 respecto a las células control a día 5 (n=3), **(C)** su capacidad de formación de tumorosferas (n=3) y **(D)** Representación del volumen tumoral en ensayo subcutáneo *in vivo* en ratones FOXn1^{nu} (nu/nu) (n=8 inyecciones por condición experimental). Se inocularon 0,5·10⁶ células MDA-MB-231 por inyección. **(E)** Representación logarítmica de ensayo de dilución seriada (líneas sólidas: valor medio; líneas discontinuas: 95% IC; círculos vacíos: valores obtenidos en cada dilución). Se inocularon 0,5·10⁶ y 0,05·10⁶ células de MDA-MB-231 (n=8 inyecciones por condición experimental). El número de células tumorales iniciadoras fue calculado mediante la plataforma ELDA, test Chi-cuadrado (χ^2) (P=1.39e-09). Las barras de error representan la SEM, valor P (p≤0,05*; p≤0,01**; p≤0,001***) comparado con el control. Test estadístico T de Student.

El silenciamiento de SOX9 en cáncer de mama, al igual que en el GBM, reduce la proliferación, la capacidad de auto-renovación y la iniciación y progresión tumoral *in vivo*. Estos resultados en dos tipos tumorales diferentes destacan el papel que desempeña SOX9 como regulador de las células madre tumorales modulando los programas de proliferación y quiescencia/auto-renovación.

IMPLICACIÓN DE LA VÍA JAK2/STAT3 EN LA REGULACIÓN DE SOX9 EN LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

Con el objetivo de identificar las vías moleculares reguladas por SOX9 en las CMT, se emplearon *microarrays* de expresión en los que se comparó el transcriptoma de las células madre de glioma GNS166 control con el de las células GNS166 con silenciamiento de SOX9. Se seleccionó esta línea derivada de pacientes ya que es más cercana a la clínica que las líneas convencionales. A partir del análisis de la expresión diferencial mediante Interactive Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems®) se identificaron distintas rutas significativamente alteradas en respuesta al silenciamiento de SOX9 [Figura 22A], como la vía de señalización de hormonas de crecimiento o la vía de señalización de interleuquina 17 (IL-17). Atendiendo a patobiologías y desórdenes, se vieron afectadas rutas relativas a enfermedades infecciosas y desórdenes de las funciones biológicas relacionadas con la respuesta antimicrobiana y respuesta inflamatoria [Figura 22B], en la que estaba implicado el interferón alfa (IFN- α) ($P= 6,71E-16$) como regulador *upstream*.

Además, destaca por su relevancia en cáncer y el nivel de significación estadística de su alteración, la vía mediada por JAK2, una tirosina quinasa de la familia Janus que participa en la señalización celular iniciada por determinados receptores de citoquinas y que activa a STAT3 (activador de la transcripción y traducción de señales) (Buchert et al., 2015). STAT3 es un regulador transcripcional muy importante que está activo y ha sido implicado en la progresión de la mayoría de cánceres conocidos (Bromberg, 2002). En el caso concreto del GBM, STAT3 presenta una elevada expresión respecto al tejido cerebral sano y su inhibición resulta en la inducción de apoptosis y cese de la proliferación tumoral (Rahaman et al., 2002). En cáncer de mama STAT3 también es muy relevante, encontrándose sobre-activado en el subtipo de tumores negativos para el receptor de estrógenos (ER) (Yeh et al., 2006).

A	Vías Canónicas Principales	P valor	Ratio
	JAK2 en la Señalización de citoquinas a través de Hormonas	5,20E-05	3/37 (0.081)
	Patogénesis de la Esclerosis Múltiple	1,59E-04	2/10 (0.2)
	Activación de IRF por receptores de reconocimiento de patrones citosólicos	3,30E-04	3/73 (0.041)
	Señalización de Hormonas de Crecimiento	4,32E-04	3/78 (0.038)
	Señalización de IL-17	4,89E-04	3/75 (0.04)

B	Enfermedades y Desórdenes de las Funciones Bio Principales	P valor	Moléculas
	Enfermedades Dermatológicas	7,40E-12- 2,15E-02	24
	Enfermedades Infecciosas	1,10E-10- 1,99E-02	19
	Respuesta Antimicrobiana	1,31E-07- 1,43E-02	9
	Respuesta Inflamatoria	1,31E-07- 1,99E-02	21
	Desórdenes del Sistema Endocrino	2,54E-07- 7,30E-03	16

Figura 22. Vías canónicas (A) y enfermedades y desórdenes de las funciones biológicas (B) principalmente alteradas en respuesta al silenciamiento de *SOX9* en células madre de glioma. Resultados en las células GNS166 control y con silenciamiento de *SOX9* (n=3) empleando el *microarray* de expresión Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0 Array de Affymetrix. La ratio indica el número de genes expresados diferencialmente que se corresponden con la vía canónica dividido por el número total de genes que participan en la vía. Análisis de la expresión diferencial mediante Interactive Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems®).

Validando los resultados del *microarray*, se observó que en las células GNS166 con silenciamiento de *SOX9* disminuía significativamente la expresión de *STAT3* a nivel de ARNm más del 40% [Figura 23A]. Además, a nivel de proteína disminuían tanto la expresión de *STAT3* como los niveles de *STAT3* fosforilado (Tyr 705) (activo; p-*STAT3*) en GNS166 y U251 [Figura 23B]. También se observó un aumento moderado de *STAT3* y p-*STAT3* al sobre-expresar ectópicamente *SOX9* en la línea U373 [Figura 23B]. En vista de estos resultados, estudiamos la correlación entre *SOX9* y *STAT3* en las tumorosferas derivadas de las células de glioma con sobre-expresión de *SOX9* y se observó que los niveles de expresión de p-*STAT3* estaban notablemente aumentados con la sobre-expresión de *SOX9* en la mayoría de los casos, tal y como muestran las imágenes de Western blot [Figura 23C]. Asimismo, en los tumores subcutáneos generados por las

tumorosferas derivadas de células U373, la elevada expresión de SOX9 iba acompañada de elevados niveles de p-STAT3 [Figura 23D]. Confirmamos esa asociación en la clínica mediante análisis de IHQ en la cohorte de GBM de USB (n=20), encontrando que la mayor expresión de SOX9 se asociaba significativamente con mayores niveles de p-STAT3 [Figura 23E]. Reforzando estos resultados, estudiamos la correlación entre *SOX9* y *STAT3* en la cohorte de 580 pacientes de GBM de libre acceso del TCGA (Cell, 2013) mediante la plataforma de análisis cBioportal for Cancer Genomics. Determinamos que existía una correlación positiva entre la expresión de ambos genes a nivel de ARNm (Pearson=0.60, Spearman 0.61) [Figura 23F]. Estos datos junto con los resultados anteriores sugieren que SOX9 podría regular a STAT3 en GBM. En cáncer de mama no hemos estudiado en detalle la regulación de STAT3 por parte de SOX9.

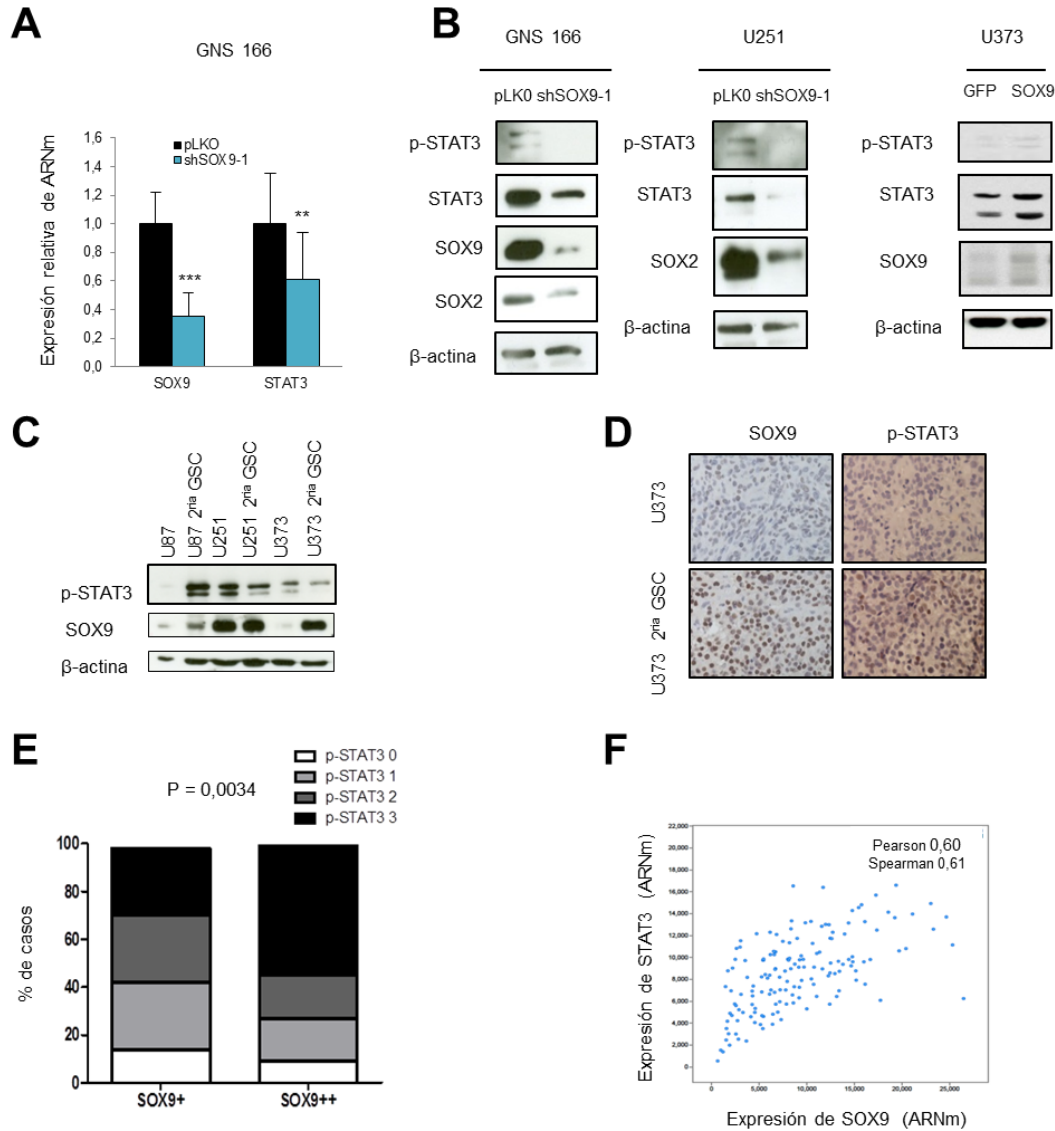


Figura 23. IMPLICACIÓN DE STAT3 EN LA VÍA DE SOX9 EN CÉLULAS MADRE DE GLIOMA. (A) Expresión relativa de *SOX9* y *STAT3* a nivel de ARNm de las células GNS166 con silenciamiento de *SOX9* (*shSOX9-1*) respecto a las células pLKO (n=3). **(B)** Western blot representativo de p-STAT3, STAT3, SOX9 y SOX2 de las células GNS166 y U251 pLKO y con silenciamiento de *SOX9* (*shSOX9-1*) y U373 control (GFP) y con sobre-expresión de *SOX9* (SOX9) (n=3). **(C)** Western blot representativo de p-STAT3 y SOX9 de las líneas de glioma U87, U373, U251 cultivadas en condiciones selectivas de célula madre (2^{ria} GSC) y adherentes. **(D)** Imágenes representativas de la expresión de SOX9 y p-STAT3 determinada mediante IHQ en los tumores generados en ratones inmunodeprimidos FOXn1^{nu} (nu/nu) al inyectar de forma subcutánea la línea U373 cultivada de forma adherente y en medio selectivo de célula madre (U373 2^{ria}GSC) **(E)** Inmunorreactividad analizada por IHQ en la cohorte de GBM del USB (n=20) de las proteínas p-STAT3 y SOX9. Test Chi-cuadrado (χ^2) (P=0,0034). **(F)** Correlación de la expresión de *STAT3* y *SOX9* a nivel de ARNm en n=580 muestras de GBM de (TCGA, Cell 2013) en cBioportal for Cancer Genomics (Pearson=0.60, Spearman 0.61).

STAT3 REGULA LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

En vista de que SOX9 participa en la regulación de las células madre en GBM y cáncer de mama y de que lo hemos relacionado con STAT3, se quiso valorar la implicación de STAT3 en la regulación de las CMT en estos tumores. Para ello, realizamos experimentos de silenciamiento de *STAT3* y valoramos el fenotipo producido. Comenzamos silenciando *STAT3* en las líneas de glioma U251 y GNS166 mediante el uso de dos ARN interferentes *short hairpin* (*sh41* y *sh43*) e infección con lentivirus. El Western blot confirmó el silenciamiento de STAT3, especialmente con *sh43* [Figura 24A]. A continuación determinamos que el silenciamiento de *STAT3* induce una disminución significativa de la proliferación celular de más del 50% en ambas líneas [Figura 24B], que va acompañada de un aumento significativo de la senescencia celular [Figura 24C]. Se observó que el silenciamiento también reduce la formación de tumorosferas derivadas de la línea U251 y la capacidad de auto-renovación de las mismas, reflejado por una menor capacidad de formación de tumorosferas secundarias tras disgregación de las primarias [Figura 24D]. Además, al valorar la capacidad tumorogénica mediante inyección subcutánea de las células, se observó una disminución en la formación de tumores, ya que las células con silenciamiento de *STAT3* no generaron tumores (*sh43*) o solamente en el 25% de los casos y de menor volumen (*sh41*), en comparación con las células control que formaron en el 70% de los casos [Figura 24E]. Se analizó además la capacidad de iniciación tumoral mediante ensayos de dilución seriada inyectando $0,5 \cdot 10^6$ y $0,05 \cdot 10^6$ células de manera subcutánea en ratones inmunodeprimidos. Mediante el cálculo del número de células iniciadoras empleando la plataforma ELDA se determinó que la frecuencia de las células iniciadoras tumorales se reducía en consecuencia del silenciamiento de STAT3, pasando de $1/415746$ en las pLKO a $1/1385010$ en *sh41* y a $1/\text{infinito}$ en *sh43* [Figura 24F].

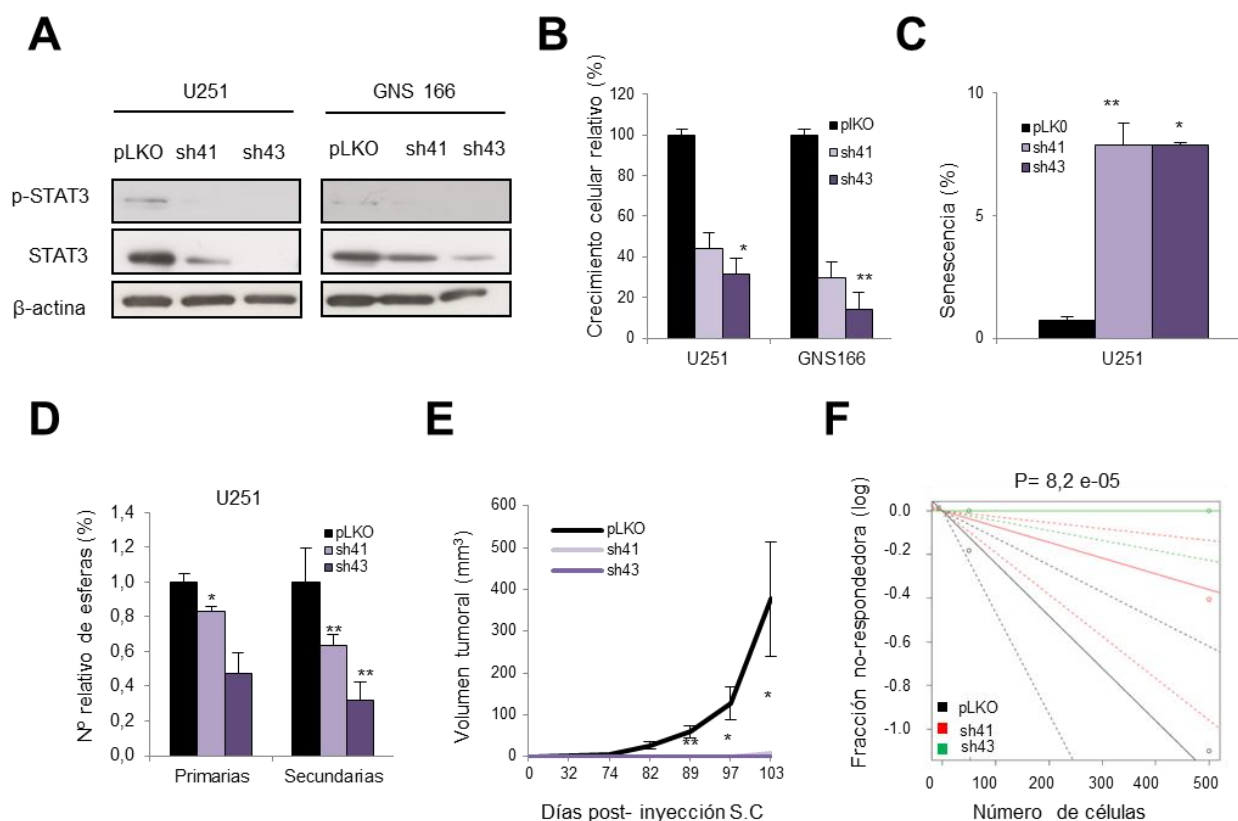


Figura 24. Efectos del silenciamiento genético de *STAT3* en células de glioma y células madre de glioma (A) Western blot representativo de p-STAT3 y STAT3 de las células U251 y GNS 166 control (pLKO) y con silenciamiento de *STAT3* (*sh41* y *sh43*) (n=3) y **(B)** cuantificación relativa del crecimiento (n=3). **(C)** Cuantificación relativa de células senescentes asociado a actividad β -galactosidasa en células U251 con silenciamiento de *STAT3* respecto a las células pLKO (n=3) **(D)** y su capacidad de formación de tumorosferas primarias y secundarias (n=3). **(E)** Representación del volumen tumoral en los tiempos indicados tras la inyección subcutánea de $0,5 \cdot 10^6$ células U251 control y con silenciamiento de *STAT3* en ratones inmunodeprimidos $FOXn1^{nu}$ (nu/nu) (n=12 inyecciones por condición). **(F)** Representación logarítmica de ensayo de dilución seriada (líneas sólidas: valor medio; líneas discontinuas: 95% IC; círculos vacíos: valores obtenidos en cada dilución). Se inocularon $0,5 \cdot 10^6$ y $0,05 \cdot 10^6$ células de U251 (n=12 inyecciones por condición experimental). El número de células tumorales iniciadoras fue calculado mediante la plataforma ELDA, test Chi-cuadrado (χ^2) ($P=8,2e-05$). Las barras de error representan la SEM, valor P ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$) comparado con el control. Test estadístico T de Student.

Estos resultados revelaron que el fenotipo celular derivado del silenciamiento de *STAT3* coincide con el producido por el silenciamiento de *SOX9*, así como su severidad en células de glioma.

En paralelo, se inhibió la actividad de STAT3 farmacológicamente. La vía JAK/STAT es activada por varios ligandos como interleuquinas, interferones, hormonas, factores de crecimiento, etc. Esa unión del ligando estimula la oligomerización del receptor y ello la activación de las proteínas JK, las cuales reclutan y fosforilan a STAT3. Esa fosforilación induce su dimerización y hace que se transloque al núcleo para regular la transcripción de genes (Levy and Lee, 2002). Para la inhibición farmacológica se utilizó STX-0119, el cual imposibilita la dimerización de STAT3, impidiendo su unión al ADN. Se observó mediante Western blot que los niveles de p-STAT3 y STAT3 a nivel de proteína se reducían con las dosis 50 y 100 μM [Figura 25A].

Se realizaron ensayos de viabilidad celular basados en el metabolismo de MTT en los cuales las líneas de glioma y células madre de glioma se trataron con concentraciones crecientes de STX-0119 (25, 50, 100 μM) durante 72 horas. En ellos se observó una reducción significativa dosis-dependiente en la viabilidad de las células con un porcentaje de toxicidad mayor del 20% en todas las concentraciones de inhibidor [Figura 25B]. También se analizó el efecto de STX-0119 en la formación de tumoresferas, observándose un efecto inhibitorio de más del 30% en todos los casos [Figura 25C].

Estos datos confirman que la actividad de STAT3 es importante para la proliferación, el mantenimiento y la supervivencia de las células de GBM y que su silenciamiento tanto genético como farmacológico tiene los mismos efectos que el silenciamiento de *SOX9*.

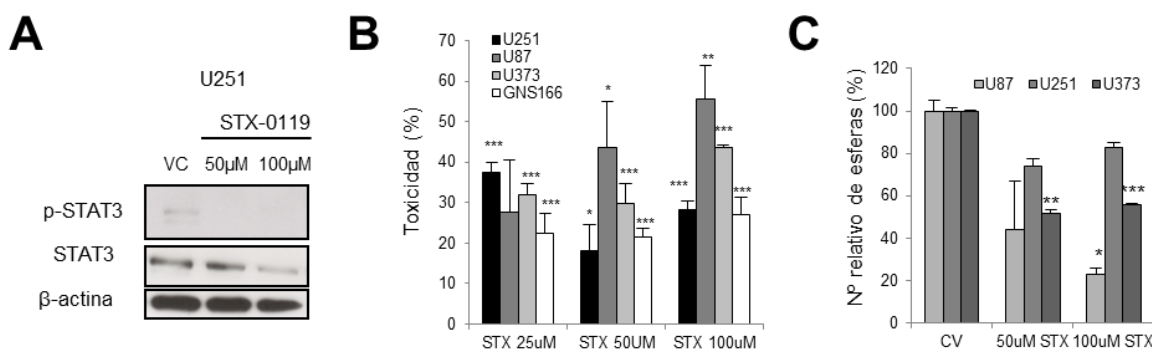


Figura 25. Efectos del silenciamiento farmacológico de STAT3 en células de glioma (A) Western blot representativo de p-STAT3 y STAT3 de las células U251 control y con inhibición farmacológica de STAT3 con las concentraciones 50 μ M y 100 μ M de STX-0119 (n=3). **(B)** Porcentaje de toxicidad celular analizado por ensayo MTT en células de glioma tras tratamiento de 72 horas con diferentes dosis de STX-0119 (25 μ M ,50 μ M y 100 μ M) (n=6) **(C)** Capacidad de formación de tumorosferas en respuesta a 50 μ M y 100 μ M de STX-0119 en U87, U251 y U373 (n=3). Las barras de error representan la SEM. La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

De forma análoga, se silenció *STAT3* en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 mediante los mismos 2 ARN interferentes y se comprobó que el silenciamiento fue eficiente, especialmente con la forma interferente *sh43* [Figura 26A]. Se observó que en las células con *STAT3* silenciado se reducía significativamente la capacidad de formación de tumorosferas, siendo el efecto más notable con el *sh43*, donde se reducía más del 50% [Figura 26B]. Resultados similares se obtuvieron con la inhibición farmacológica de la vía JAK2/STAT3 mediante el inhibidor TG101348, el cual inhibe la activación de *STAT3* de manera dosis dependiente a nivel de proteína y reduce significativamente la capacidad de formación de tumorosferas en un 50% [Figura 26C]. En cuanto a los ensayos *in vivo*, no se ha estudiado el impacto en tumorigénesis en este tumor. Estos datos demuestran que en este tipo de cáncer el silenciamiento de *STAT3* y *SOX9* provoca el mismo efecto en ensayos *in vitro*.

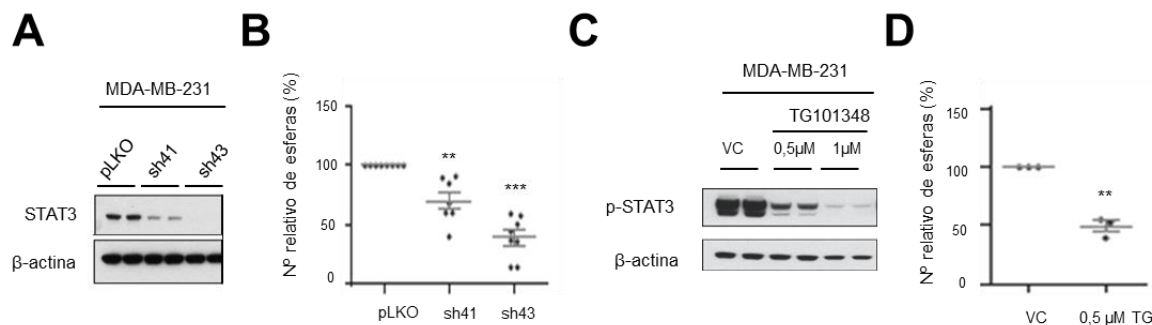


Figura 26. Silenciamiento genético y farmacológico de STAT3 en las células MDA-MB-231 de cáncer de mama. (A) Western blot representativo de STAT3 de las células control (pLKO) y tras el silenciamiento de STAT3 mediante 2 *shARN* interferentes (*sh41* y *sh43*) (n=3) y (B) cuantificación relativa de tumorosferas respecto a las células pLKO (n=7). (C) Western blot representativo de p-STAT3 de las células control (VC) y tras la inhibición de STAT3 mediante diferentes dosis (0,5 μM, 1 μM) de TG101314 (n=3) y (D) cuantificación relativa de tumorosferas tras la inhibición de STAT3 mediante TG101314 (0,5 μM) (n=3). Las barras de error representan la SEM, valor P ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$) comparado con el control como se indica. Test estadístico T de Student.

Los efectos de la inhibición de STAT3, tanto farmacológica como mediante el silenciamiento de su expresión en dos tipos tumorales diferentes destacan el papel que desempeña STAT3 en la regulación de las células madre tumorales, acción que puede estar promovida por SOX9.

NIVELES ELEVADOS DE EXPRESIÓN DE SOX9 CORRELACIONAN CON STAT3 Y PML EN CÉLULAS MADRE TUMORALES

En distintas líneas celulares tumorales y fibroblastos se ha descrito que los niveles de STAT3 activado correlacionan con la expresión de PML (gen de la leucemia promielocítica) (Hubackova et al., 2012), un regulador de la expresión génica que se localiza en los cuerpos nucleares y que ha sido vinculado con el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y las células iniciadoras de la leucemia mieloide crónica (Ito et al., 2008, 2012). Además, se ha determinado que PML promueve la supervivencia y

la proliferación de las células de cáncer de mama (Carracedo et al., 2012). En vista de ello, y dado que nuestros resultados indican que SOX9 y STAT3 son relevantes en la regulación de las CMT en cáncer de mama y GBM, y pueden estar correlacionados, nos planteamos que PML podría estar implicado también en esta regulación.

Con el fin de estudiar la asociación entre SOX9, STAT3 y PML en GBM, se comenzó caracterizando su expresión en líneas celulares de glioma mediante Western blot. Los resultados mostraron que a excepción de la línea U373, existe correlación entre los niveles de SOX9, PML y p-STAT3 en las líneas celulares de GBM [Figura 27A]. Resultados similares se obtuvieron en líneas de célula madre de glioma derivadas de pacientes [Figura 27B y C].

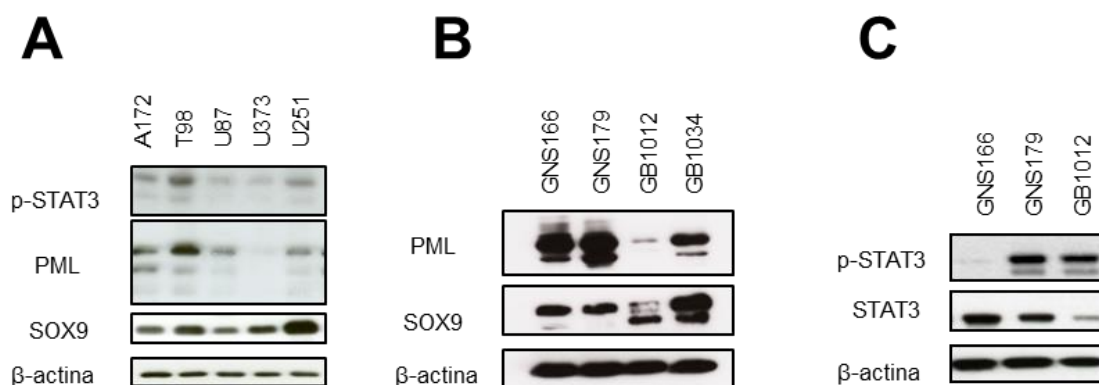


Figura 27. Niveles de expresión de SOX9, PML y P-STAT3 en líneas celulares de glioma y células madre de glioma. Western blot representativo de (A) las líneas de glioma A172, T98, U87, U373 y U251 (n=3). (B) Expresión de PML y SOX9 de las líneas de célula madre de glioma GNS166, GNS179, GB1012, GB1034 (n=3) y (C) su expresión de p-STAT3 y STAT3.

También en las tumorosferas derivadas de las células de glioma con elevada expresión de SOX9 y p-STAT3 se observó que la expresión de PML estaba notablemente aumentada, tal y como muestran las imágenes de Western blot [Figura 28A]. Asimismo, en los tumores subcutáneos generados por las tumorosferas de las células U373, la elevada expresión de SOX9 y p-STAT3 estaba acompañada de una elevada expresión de PML [Figura 28B].

Confirmamos esa asociación en la clínica mediante análisis de IHQ en la cohorte de GBM de USB (n=20), encontrando que la mayor expresión de PML se asociaba significativamente con mayores niveles de SOX9 y de p-STAT3 [Figura 28C y D]. Además, en apoyo a estos datos, a nivel celular se observó correlación positiva entre la expresión de ARNm de *STAT3* y *PML* en pacientes de GBM (n=580 TCGA, Cell 2013) [Figura 28E]. Estos resultados sugieren que SOX9-STAT3-PML podrían formar parte de un eje de señalización en las CMT de GBM.

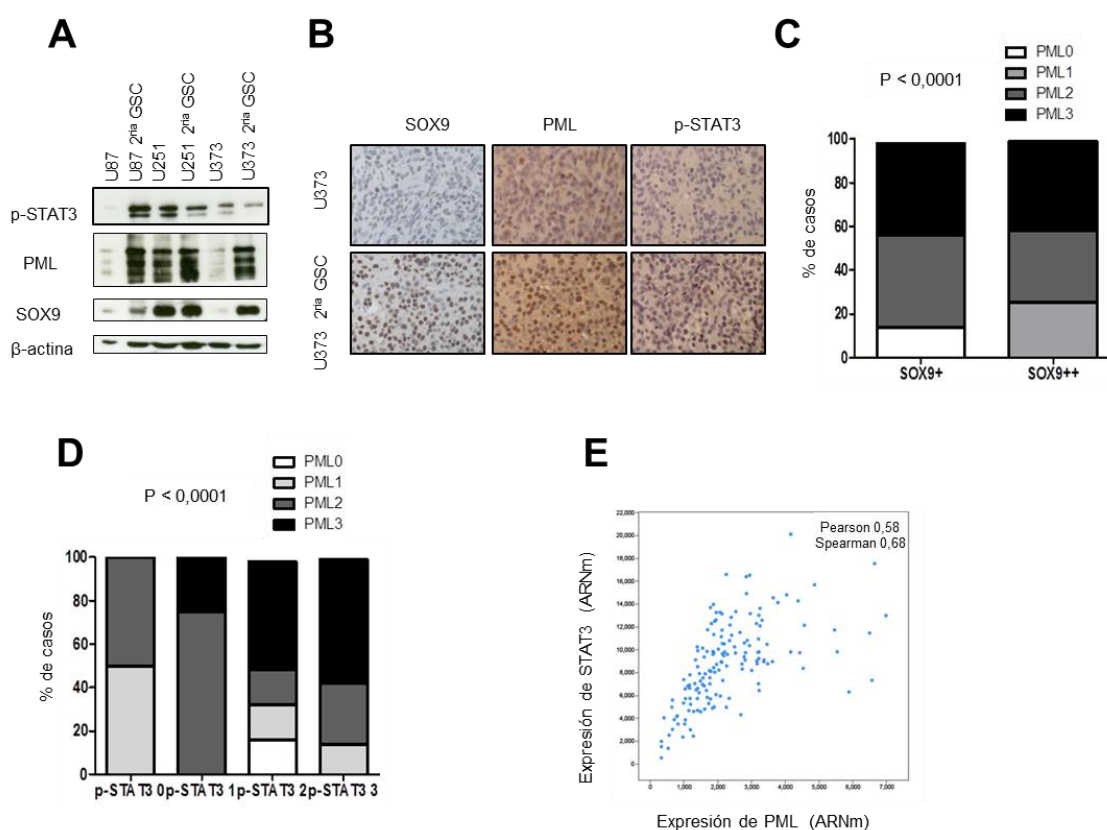


Figura 28. Expresión de SOX9, PML y STAT3 en CMT y pacientes de GBM. (A) Western blot representativo de p-STAT3, PML y SOX9 de las líneas de glioma U87, U373, U251 cultivadas en condiciones selectivas de célula madre (2^{ria} GSC) y adherentes. (B) Imágenes representativas de la expresión de SOX9, PML y p-STAT3 determinada mediante IHQ en los tumores generados en ratones inmunodeprimidos FOxn1^{nu} (nu/nu) al inyectar de forma subcutánea la línea U373 cultivada de forma adherente y en medio selectivo de célula madre (U373 2^{ria} GSC). (C) Inmunorreactividad analizada por IHQ en la cohorte de GBM del USB (n=20) de las proteínas PML y SOX9 Test Chi-cuadrado (χ^2) (P < 0,0001) y (D) PML y p-STAT3 (P < 0,0001). (E) Correlación de la expresión de *STAT3* y *PML* a nivel de ARNm en n=580 muestras de Glioblastoma de Cell 2013 (Pearson=0.58, Spearman 0.68).

Se realizó el mismo estudio en cáncer de mama y los resultados revelaron que la expresión de *PML* y *SOX9* estaba significativamente incrementada en la población de células madre, junto con la expresión de reguladores establecidos de célula madre como *LGR5* y *SOX2* [Figura 29A]. Además, al igual que en GBM, se observó correlación positiva entre la expresión de ARNm de *STAT3* y *PML* en pacientes de cáncer de mama (n=448) de la base de datos de MSK/EMC [Figura 29B]. Confirmamos esa asociación mediante análisis de IHQ en la cohorte de muestras de pacientes de cáncer de mama de Marsella (n=737), observando que la mayor expresión de p-STAT3 se asociaba significativamente con mayores niveles de PML [Figura 29C]. También observamos que la mayor expresión de *SOX9* se asociaba significativamente con mayores niveles de PML en un panel de muestras tumorales derivadas de pacientes o PDX (n=23) [Figura 29D], hecho que confirmamos en la cohorte de Marsella (n=737) [Figura 29E].

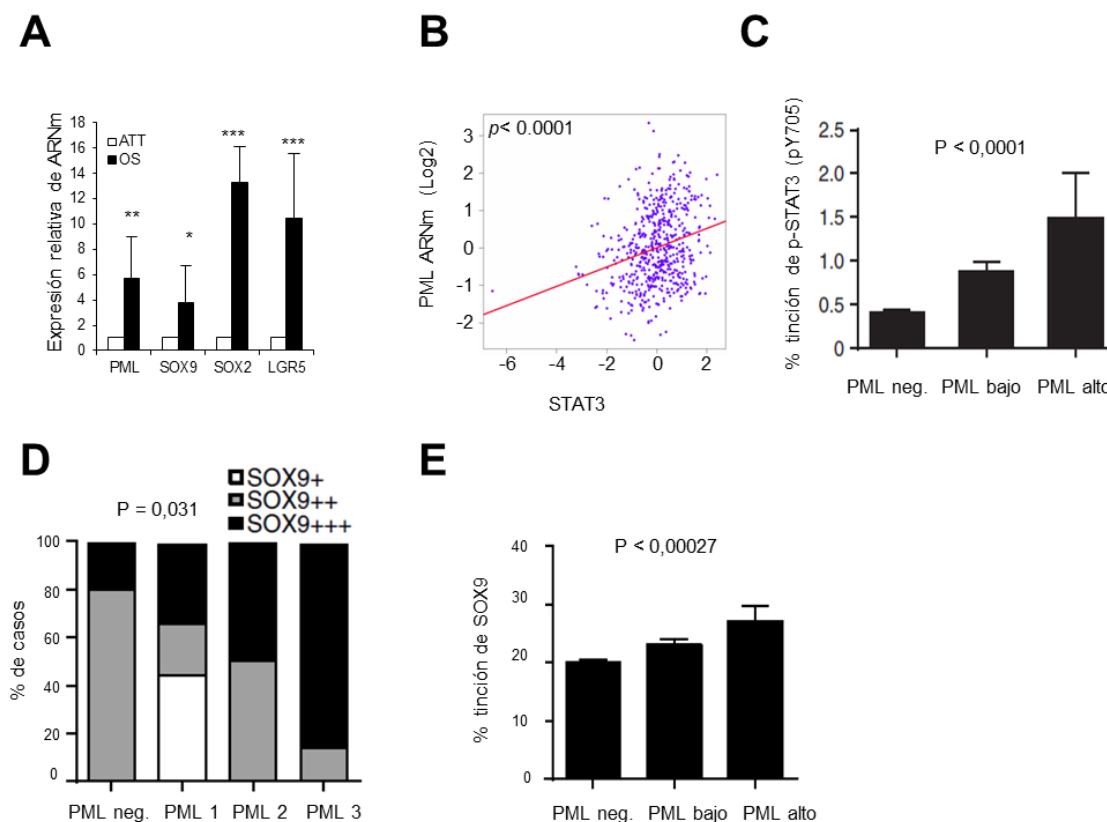


Figura 29. Expresión en células madre tumorales y en muestras de pacientes de cáncer de mama. (A) Expresión de *PML*, *SOX9*, *SOX2* y *LGR5* a nivel de ARNm en las células MDA-MB-231 cultivadas de forma adherente (ATT) y en medio selectivo para célula madre (OS) (n=6 PML, n=5 SOX9 LGR5, n=3 SOX2). Expresión relativizada frente a la condición adherente. (B) Correlación de Spearman de PML y STAT3 en tumores de cáncer de mama de MSK/EMC (n=448) Correlación de Pearson ($p < 0,0001$) (C) Inmunorreactividad de la proteína p-STAT3 con la expresión variable de PML en biopsias de pacientes de la cohorte de Marsella (n= 737) ($P < 0,0001$) Análisis de la varianza. (D) Inmunorreactividad de la proteína PML y SOX9 en un panel de muestras derivadas de pacientes de cáncer de mama (n=23) Test Chi-cuadrado (χ^2) ($P=0,031$) (E) Inmunorreactividad de la proteína SOX9 con la expresión variable de PML en biopsias de pacientes de la cohorte de Marsella (n=737) análisis de la varianza ($P < 0,00027$). Las barras de error representan la SEM, valor P ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

Para comprobar si PML también podría participar en el eje de señalización SOX9-STAT3 se analizó su expresión al modular la expresión de SOX9 Y STAT3.

En primer lugar, se observó que al silenciar STAT3 tanto genética como farmacológicamente disminuían los niveles de PML en GBM [Figura 30A y B] y en cáncer de mama [Figura 30C y D]. También estudiamos los niveles de SOX9, observando que estaban disminuidos en respuesta a la modulación de STAT3 tanto genética como farmacológica en ambos tumores [Figura 30A-D].

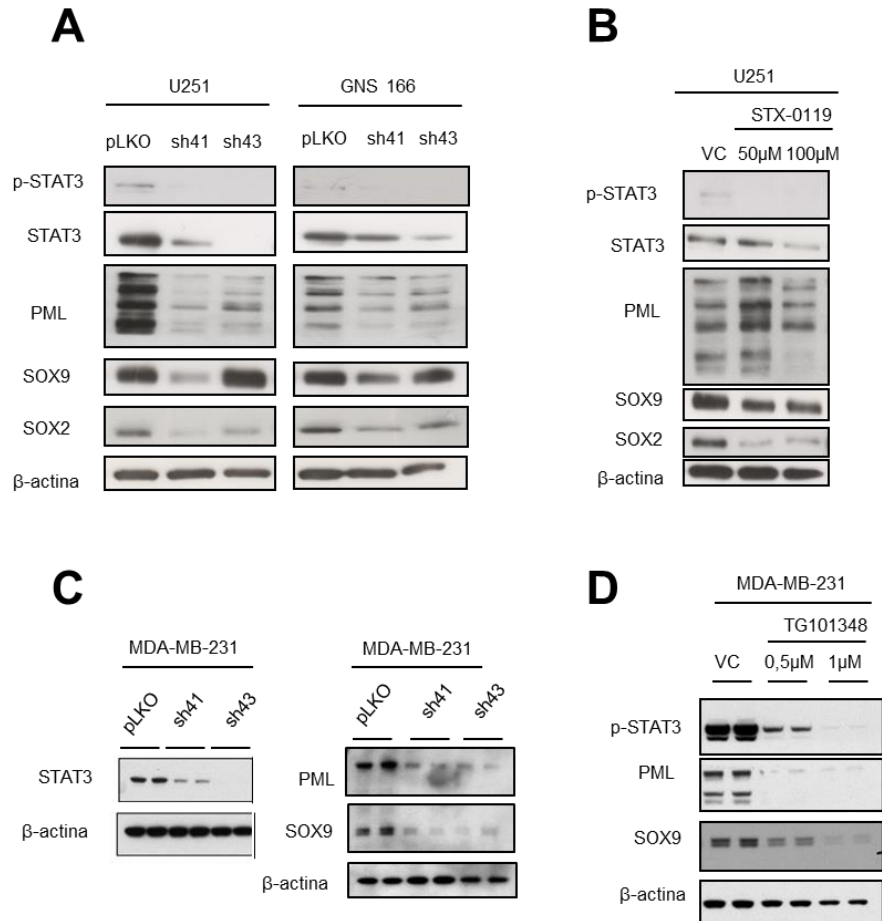


Figura 30. Efectos del silenciamiento de STAT3 en la expresión de PML y SOX9 en GBM y cáncer de mama. (A) Western blot representativo de p-STAT3, STAT3, PML, SOX9 y SOX2 de las células GNS166 Y U251 control (pLKO) y con silenciamiento de STAT3 (*sh41* y *sh43*) (n=3) y en (B) las células U251 control (VC) y con inhibición farmacológica de STAT3 con 50 μM y 100 μM de STX-0119 (n=3) (C) Western blot representativos de la expresión de STAT3, PML y SOX9 en las células MDA-MB-231 (n=3). (D) Expresión de p-STAT3, PML y SOX9 en células MDA-MB-231 control (VC) y tras la inhibición de STAT3 mediante TG101314 (0.5 μM y 1 μM) (n=3) (C y D datos no publicados).

En relación a las células con silenciamiento de *SOX9* en GBM, la expresión a nivel de proteína de STAT3 y PML disminuía y al sobre-expresar *SOX9*, la expresión de STAT3 y PML se elevaba [Figura 31A]. En cambio, en cáncer de mama el silenciamiento de *SOX9* en la línea MDA-MB-231 no tenía efecto en los niveles de PML [Figura 31B].

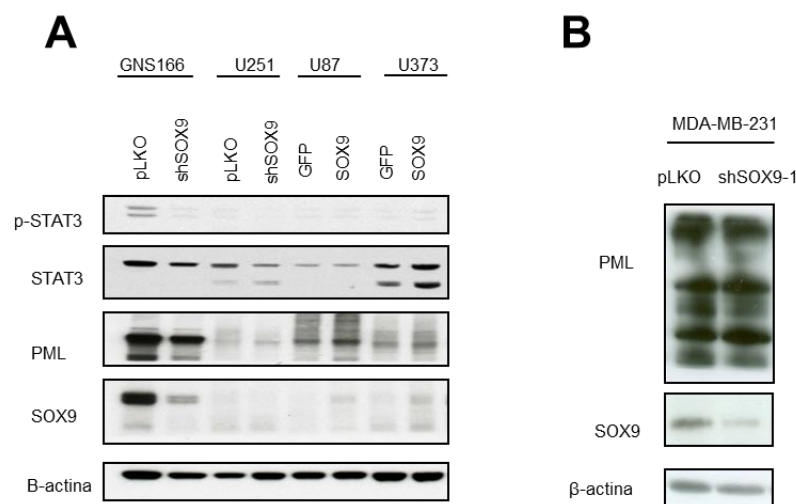


Figura 31. Efectos de la modulación de *SOX9* en la expresión de PML y STAT3. (A) Western blot representativo de p-STAT3, STAT3, PML y SOX9 de las células GNS166 Y U251 control (pLKO) y con silenciamiento de *SOX9* (*shSOX9-1*) y U87MG y U373 control (GFP) y con expresión ectópica de *SOX9* (SOX9) (n=3). (B) Western blot representativo de PML y SOX9 de las células MDA-MB-231 control (pLKO) y con silenciamiento de *SOX9* (*shSOX9-1*) (n=3).

Estos resultados en su conjunto demuestran que la expresión de *SOX9*-STAT3-PML está correlacionada tanto en CMT como en biopsias tumorales y que existe una interrelación entre ellos.

EL SILENCIAMIENTO DE PML REDUCE EL POTENCIAL TUMOROGÉNICO

Para completar la caracterización de la vía SOX9-STAT3-PML en CMT decidimos estudiar el impacto del silenciamiento de PML en células de glioma y mama. Para ello se silenció en primer lugar la expresión de *PML* mediante infecciones lentivirales con dos ARN interferentes (*shPML-1* y *shPML-4*) en las células de glioma U251 y GNS166, con niveles basales elevados de PML. Tras confirmar la eficiencia de la infección mediante PCR cuantitativa [Figura 32A] y Western blot [Figura 32B], se observó que el silenciamiento de *PML* reducía significativamente el crecimiento celular en ambas líneas, siendo la reducción de entre un 30 y un 80% según el *sh* y la línea celular [Figura 32C]. Esta reducción significativa en la proliferación celular también fue comprobada mediante el conteo del número de células fosfo-H3 positivas, cuya reducción por el silenciamiento de *PML* fue notable y significativa en ambas líneas [Figura 32D], e iba acompañada de un incremento de la senescencia celular, la cual aumentó significativamente en ambas líneas hasta alcanzar un 14% de células senescentes en el caso de U251 silenciado con *shPML-4* y más del 20% en el caso de las GNS166 silenciadas con ambos ARN interferentes [Figura 32E-F]. Además, las células *shPML* desarrollaron menor capacidad de formación de tumorosferas (reducción de más del 50 %) [Figura 32G].

Se realizaron estudios *in vivo* de tumorigénesis ortotópica mediante cirugía estereotáctica en ratones inmunodeprimidos NOD-SCID, observándose que el silenciamiento de *PML* en las células GNS166 reducía significativamente la actividad. Los ratones en los que se inyectaron las células con silenciamiento de *PML* mostraron una supervivencia media ($174.5 \pm 36,86$ días) significativamente superior ($p=0,0049$) en comparación con los ratones en los que se inyectaron las células control, los cuales presentaron una supervivencia media de 116 días ($\pm 11,51$) [Figura 32H]. Estos estudios muestran que el fenotipo de las células con silenciamiento de *PML* es similar al de las células con silenciamiento de SOX9 y STAT3.

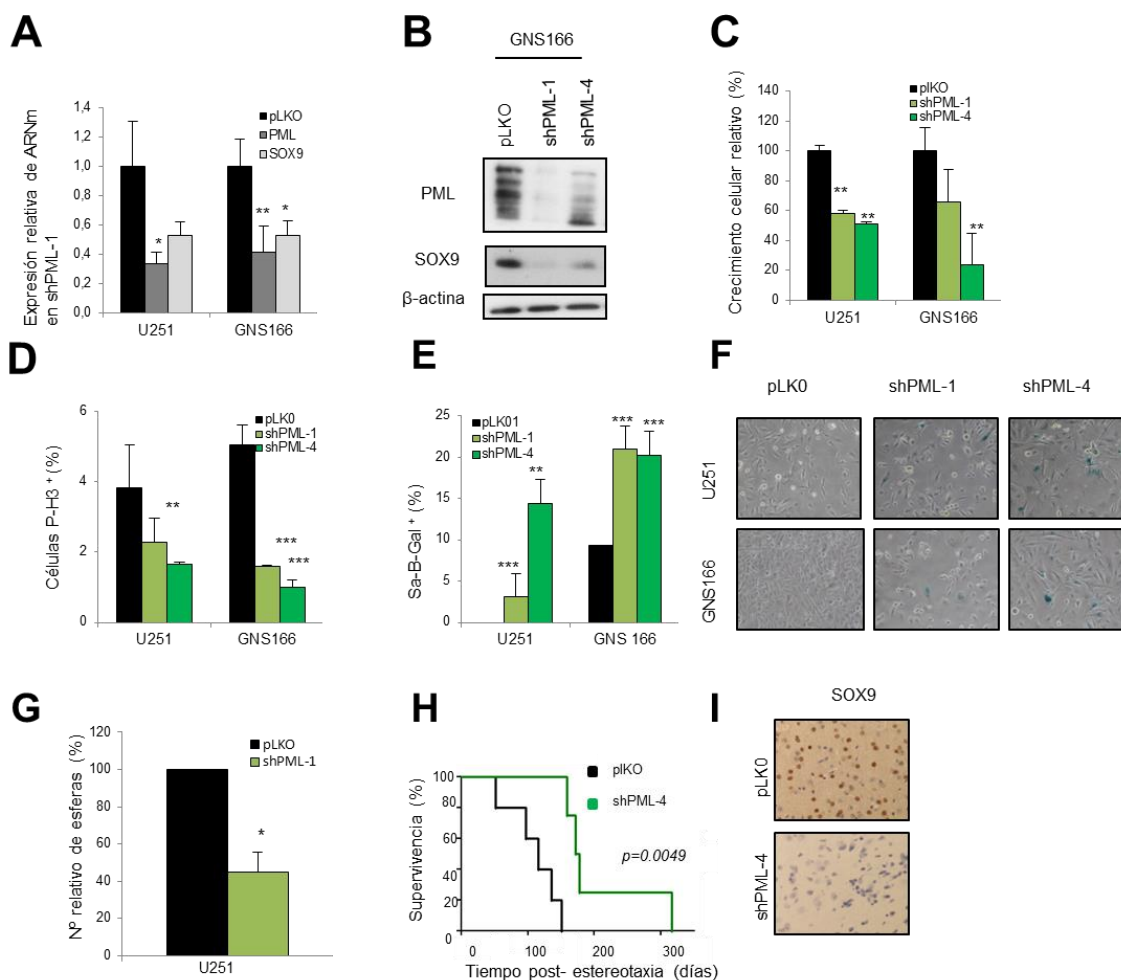


Figura 32. Efectos del silenciamiento genético de *PML* en líneas celulares de glioma y células madre de glioma (A) Expresión relativa de *PML* y *SOX9* a nivel de ARNm de las células U251 y GNS166 con silenciamiento de *PML* (*shPML-1*) respecto a las células control (pLKO) (n=3). **(B)** Western blot representativo de *PML* y *SOX9* de las células GNS166 pLKO y tras el silenciamiento de *PML* mediante 2 *shARN* interferentes (*shPML-1* y *shPML-4*) (n=3). **(C)** Cuantificación relativa del crecimiento celular en las células pLKO y con silenciamiento de *PML* en U251 y GNS166 (n=3) y **(D)** cuantificación de células P-H3 positivas (n=3) y **(E)** cuantificación relativa de células senescentes asociado a actividad β -galactosidasa (n=3). **(F)** Imágenes representativas de las células senescentes (coloración azulada). **(G)** Contaje de tumorosferas formadas por las células U251 pLKO y con silenciamiento de *PML* (*shPML-1*) en medio selectivo para célula madre (n=3). **(H)** Curva de Kaplan-Meier representando la supervivencia de ratones NOD-SCID tras la inyección estereotáctica de células GNS166 control (pLKO) (n=5) y con silenciamiento de *PML* (*shPML-4*) (n=4) ($P=0,0049$). Para el ensayo de estereotaxia se realizó el test de Log-Rank y se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor de 0,05. Las barras de error representan la SEM, valor P ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$) comparado con el control. Test estadístico T de Student.

A continuación se siguió el mismo abordaje en cáncer de mama. Se silenció *PML* mediante 3 *shARN* diferentes en la línea MDA-MB-231 y en PDX44, las cuales expresan niveles basales altos de *PML*, y se comprobó la eficiencia del silenciamiento mediante Western blot [Figura 33D y G]. Se observó una reducción en el crecimiento celular de más del 50 % en el caso de MDA-MB-231 con silenciamiento de *PML* (*shPML-1* y *shPML-4*) [Figura 33A] que iba acompañado de un aumento significativo de la senescencia celular en las células silenciadas con ambos ARN interferentes [Figura 33B y C]. Se observó que en las células con silenciamiento de *PML* (*sh5*, *sh2* y *sh4*), al igual que en GBM, además de reducirse los niveles de expresión de *PML* también disminuía la expresión de *SOX9*, siendo el efecto más notable con la secuencia de interferencia más eficaz frente a *PML*, la *sh4* en el caso de MDA-MB-231 [Figura 33D]. También se observó que en las células con silenciamiento de *PML* se reducía significativamente la formación de tumorosferas [Figura 33E y H]. En concordancia, se observó un efecto inhibitorio en la formación de tumores subcutáneos al inyectar células de la línea MDA-MB-231 y PDX44 control (*shC*) y con silenciamiento de *PML* (*sh2*, *sh4* y *sh5*) [Figura 33F y J]. Tras el cálculo del número de células iniciadoras de tumores mediante la plataforma ELDA, se determinó que en el caso de MDA-MB-231 la frecuencia se reducía en consecuencia del silenciamiento de *PML* de 1/218 en el caso de las células control a 1/825 en las *sh5* y anulándose en las *sh4* [Figura 33F]. En el caso de las PDX44 la frecuencia de células iniciadoras tumorales fue estimada en 1/39,6 en el control (*shC*), 1/100 en *sh5* y 1/185 en *sh4* [Figura 33J].

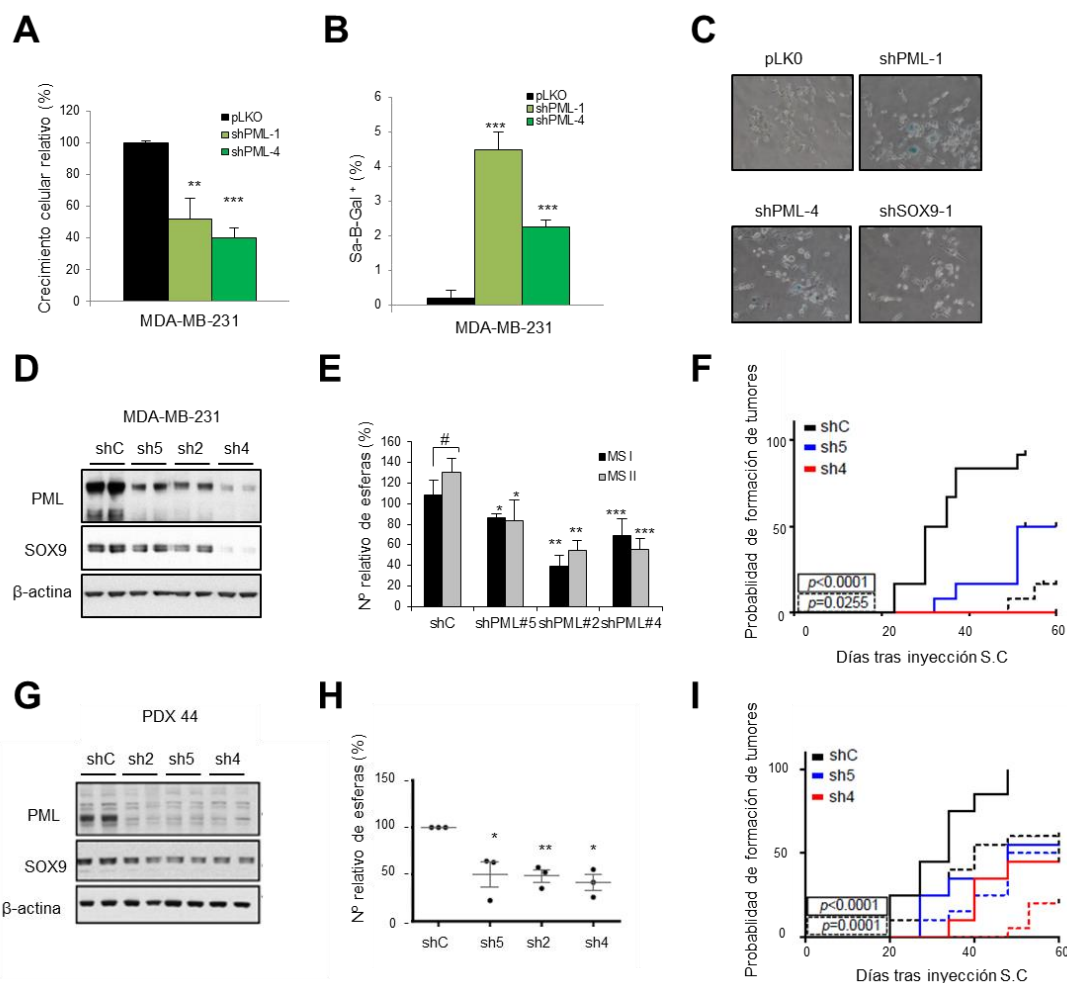


Figura 33. Efectos de la inhibición genética de *PML* en cáncer de mama. (A) Cuantificación relativa de la proliferación celular de las células MDA-MB-231 con silenciamiento de *PML* (*shPML-1* y *shPML-4*) respecto a las células control (pLKO) a día 5 (n=3) y (B) cuantificación relativa de células senescentes asociado a actividad β -galactosidasa (n=3) y (C) sus imágenes representativas de las células senescentes en azul. (D) Western blot representativo de *PML* y *SOX9* de MDA-MB-231 control (ShC) y con silenciamiento de *PML* mediante 3 *shARN* interferentes (*sh5*, *sh2* y *sh4*) (n=4) (E) su capacidad de formación de tumorosferas primarias (MSI) y secundarias (MSII) en medio selectivo para célula madre (n=4). (F) Experimento de dilución limitante tras *xenotrasplante* en ratones inmunodeprimidos FOXn1^{nu} (nu/nu) de $0,5 \cdot 10^6$ (línea continua) y $0,05 \cdot 10^6$ (línea discontinua) células MDA-MB-231 control (shC) y con silenciamiento de *PML* (*shPML-5*, y *shPML-4*) (n=12 inyecciones subcutáneas por condición experimental). (G) Expresión de *PML* y *SOX9* de las células PDX44 con silenciamiento de *PML* mediante 3 *shARN* interferentes (*sh2*, *sh5* y *sh4*) (n=4) (H) y su capacidad de formación de tumorosferas (n=3) (I) Experimento de dilución limitante tras *xenotrasplante* en ratones inmunodeprimidos FOXn1^{nu} (nu/nu) inoculados con $0,1 \cdot 10^6$ (línea continua) y $0,01 \cdot 10^6$ (línea discontinua) células PDX44 (n=20 inyecciones subcutáneas por condición experimental) (χ^2). Las barras de error representan la SEM, valor P ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$) comparado con el control como se indica. Test estadístico T de Student.

Estos resultados demuestran que PML es esencial en el mantenimiento de la auto-renovación y características de células madre en GBM y cáncer de mama, y que el silenciamiento de *PML* reproduce los efectos de la inhibición de SOX9 y STAT3 en estos tumores, sugiriendo que actúan en la misma vía.

Para determinar la interacción molecular existente, decidimos estudiar la expresión de SOX9 y STAT3 en las células con silenciamiento de *PML*. Se observó una destacable reducción en la expresión de SOX9 en las células con silenciamiento de PML, tanto a nivel de ARNm como de proteína en las células U251 y GNS166 de glioma [Figura 32A y B] y MDA de cáncer de mama [Figura 33D y G]. Del mismo modo, los tumores cerebrales generados en los animales al inyectar las células GNS166 con silenciamiento de PML expresaban menores niveles de SOX9 [Figura 32I]. También se observó una reducción en este caso algo más moderada en la expresión de STAT3 en respuesta al silenciamiento de PML en GBM como se mostrará posteriormente [Figura 37B], mientras que en cáncer de mama no se estudió la expresión de STAT3 en respuesta al silenciamiento de PML.

INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE PML

Se quiso determinar el efecto potencial de la inhibición farmacológica de la expresión de PML en células de glioma y cáncer de mama. Para ello se usó Trióxido de Arsénico (ATO), que induce la ubiquitinación SUMO dependiente y la degradación proteosomal de la proteína PML (Lallemand-Breitenbach et al., 2008). Este compuesto, conocido también como Trisenox, es usado para tratar la Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) (Antman, 2001; Au and Kwong, 2008).

Se trataron las líneas celulares U87 y U251 con 0.5, 1 y 2.5 μM de ATO y a las 48 horas se observó que la expresión de PML se reducía a nivel de proteína de forma dependiente de la dosis, alcanzándose unos niveles muy bajos en la línea U87 [Figura 34A]. Además, la expresión de SOX9 también se reducía [Figura 34A]. Se realizaron ensayos de MTT en las dos líneas y se detectó que el efecto citotóxico era mayor en la línea U87, cuyo porcentaje de viabilidad celular respecto a las células control (sin

tratamiento) se reducía significativamente y progresivamente de acuerdo a la dosis, alcanzándose un 67% de toxicidad en respuesta a la mayor concentración [Figura 34B]. La línea U251, cuyos niveles basales de SOX9 y PML son más elevados, mostró menor respuesta, ya que la toxicidad alcanzada fue de entre un 9-12% con las dosis más bajas y de un 47% con la dosis 5 μM de ATO [Figura 34B]. También se analizó el efecto de ATO en la formación de tumosferas y se observó que la inhibición de dicha capacidad era mayor en el caso de U87, con una reducción significativa del 80% mientras que en el caso de la línea U251 la reducción fue del 22% [Figura 34C].

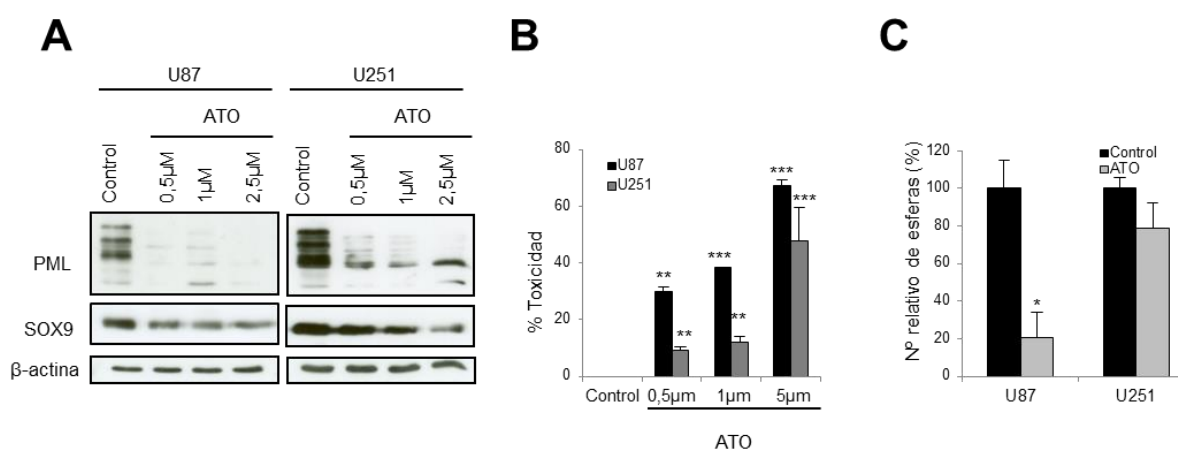


Figura 34. Silenciamiento farmacológico de PML en células de glioma. (A) Western blot representativo de PML y SOX9 de las células U87 y U251 control y con inhibición farmacológica de PML con 0.5 μM , 1 μM y 2.5 μM de ATO durante 48h (n=3). **(B)** Porcentaje de toxicidad celular analizado por ensayo MTT tras tratamiento de 72 horas con diferentes concentraciones de ATO: 0.5 μM , 1 μM y 5 μM (n=5) y **(C)** su capacidad de formación de tumosferas en células control y tratadas con ATO (1 μM ATO) (n=3). Las barras de error representan la SEM. La significancia estadística se obtuvo con el test T de Student ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$).

Estos datos muestran que la inhibición genética y farmacológica de PML produce en GBM el mismo efecto que el silenciamiento de STAT3 y SOX9, y también reduce la expresión de este último.

También valoramos el efecto de ATO en cáncer de mama y hallamos una inhibición muy significativa en la expresión de PML con 150 nM de ATO en MDA-MB-231 y en PDX44, además de que la expresión de SOX9 también se reducía [Figura 35A y D]. La inhibición con ATO supuso una reducción significativa en la formación de tumorosferas [Figura 35B y E]. Además, en experimentos *in vivo* de tumorigénesis en los que se inyectaron células MDA-MB-231 pre-tratadas con ATO (150 nM) en los animales y éstos fueron tratados diariamente con ATO 5 mg/kg intraperitonealmente, demostramos que la inhibición farmacológica de PML reduce significativamente ($p=0,07$) la capacidad de formación de tumores de las células de cáncer de mama [Figura 35C]. En este caso, la frecuencia iniciadora tumoral fue estimada en 1/279 en el caso del control y de 1/703 en las células con la inhibición con ATO.

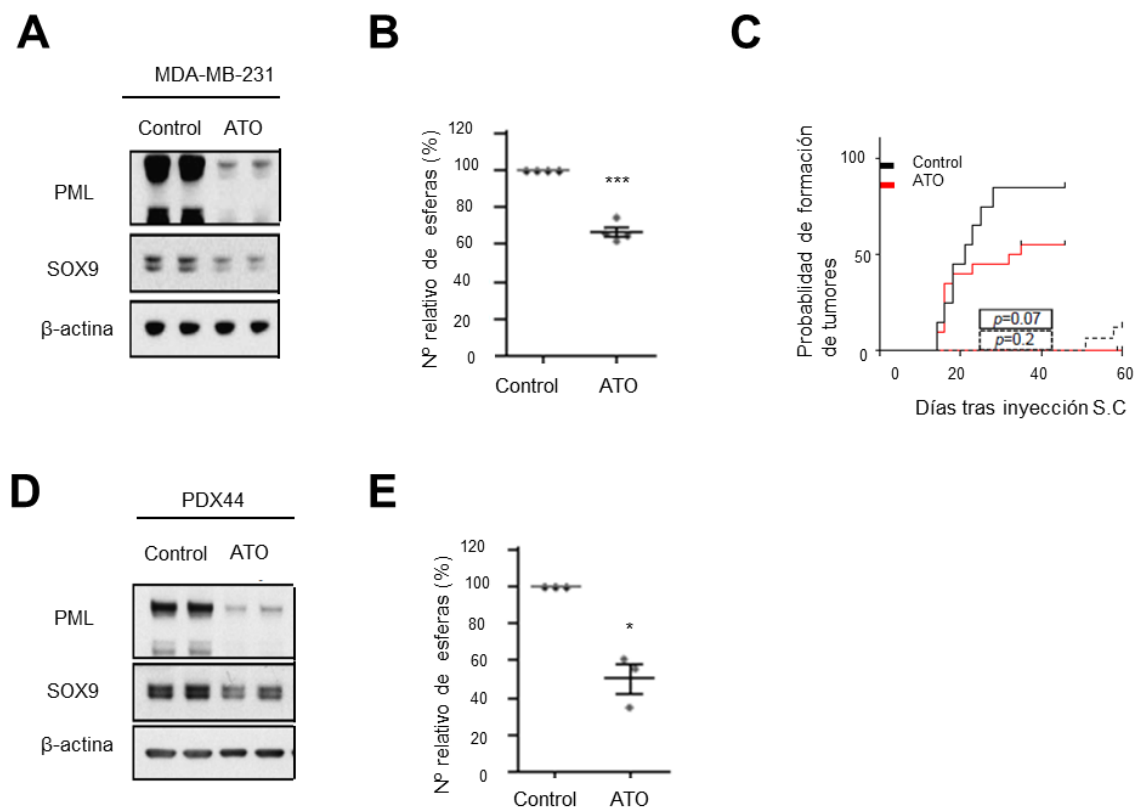


Figura 35. Efectos de la inhibición farmacológica de PML en cáncer de mama. (A) Western blot representativo de PML y SOX9 de MDA-MB-231 con inhibición de PML mediante tratamiento con 150 nM de ATO a las 72h (n=4). **(B)** Capacidad de formación de tumorosferas en medio selectivo para células madre (n=4). **(C)** Curva Kaplan-Meier de formación de tumores tras inyección subcutánea en ratones inmunodeprimidos FOXn1^{nu} (nu/nu) de $0.5 \cdot 10^6$ (línea) y $0.05 \cdot 10^6$ (puntos) células MDA-MB-231 control y pre-tratadas con 150 nM de ATO. Los ratones posteriormente fueron tratados intraperitonealmente con 5 mg/kg al día de ATO (n=20 inyecciones por condición experimental). Test Chi-cuadrado (χ^2) **(D)** Western blot representativo de PML y SOX9 de PDX44 con inhibición de PML mediante tratamiento con 150 nM de ATO (n=4) y, **(E)** su capacidad de formación de tumorosferas en medio selectivo para células madre (n=4). Las barras de error representan la SEM, valor P ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$) comparado con el control como se indica. Test estadístico T de Student.

Para demostrar con solidez que la vía SOX9-STAT3-PML es esencial en el mantenimiento de las CMT y que existe un bucle regulatorio entre ellos, se realizaron tres estudios diferentes.

SILENCIAMIENTO CONJUNTO DE PML Y SOX9

En primer lugar se silenció de manera conjunta *PML* y *SOX9* en las células GNS166 de glioma y MDA-MB-231 de cáncer de mama mediante infección lentiviral con *shARN* interferentes (*shPML-4* y *shSOX9-1*) [Figura 36]. Se observó que el silenciamiento conjunto de *PML* y *SOX9* producía un descenso en los niveles de ARNm de *SOX9* y *PML* de igual magnitud que el silenciamiento de *SOX9* y/o *PML* de manera individual, no hallándose adición de efectos ni potenciación alguna [Figura 36A y B].

A nivel de fenotipo, el silenciamiento conjunto de *SOX9* y *PML* en células de glioma redujo el número de células positivas para PH3, de manera similar que el silenciamiento individual de *SOX9* y/o *PML* [Figura 36C]. En cuanto a la inducción de senescencia, el silenciamiento conjunto de *PML* y *SOX9* inducía un porcentaje de senescencia muy similar al del silenciamiento independiente de los genes [Figura 36D]. En cáncer de mama se observaron los mismos efectos de la inhibición conjunta en términos de proliferación celular [Figura 36E], obteniéndose un efecto anti-proliferativo similar a los obtenidos con el silenciamiento independiente de cada uno de los genes. En el caso de la senescencia celular, el silenciamiento conjunto inducía un incremento en el porcentaje de células senescentes respecto a las células control similar al observado con el silenciamiento de *PML* [Figura 36F]. Este resultado es coherente con lo presentado previamente, ya que no habíamos observado inducción de senescencia por el silenciamiento de *SOX9* en la línea MDA-MB-231.

Estos resultados muestran que el silenciamiento simultáneo de ambos genes no produce un efecto antitumoral sinérgico ni aditivo en GBM y cáncer de mama, reforzando la idea de que *SOX9* y *PML* se encuentran en la misma vía de señalización.

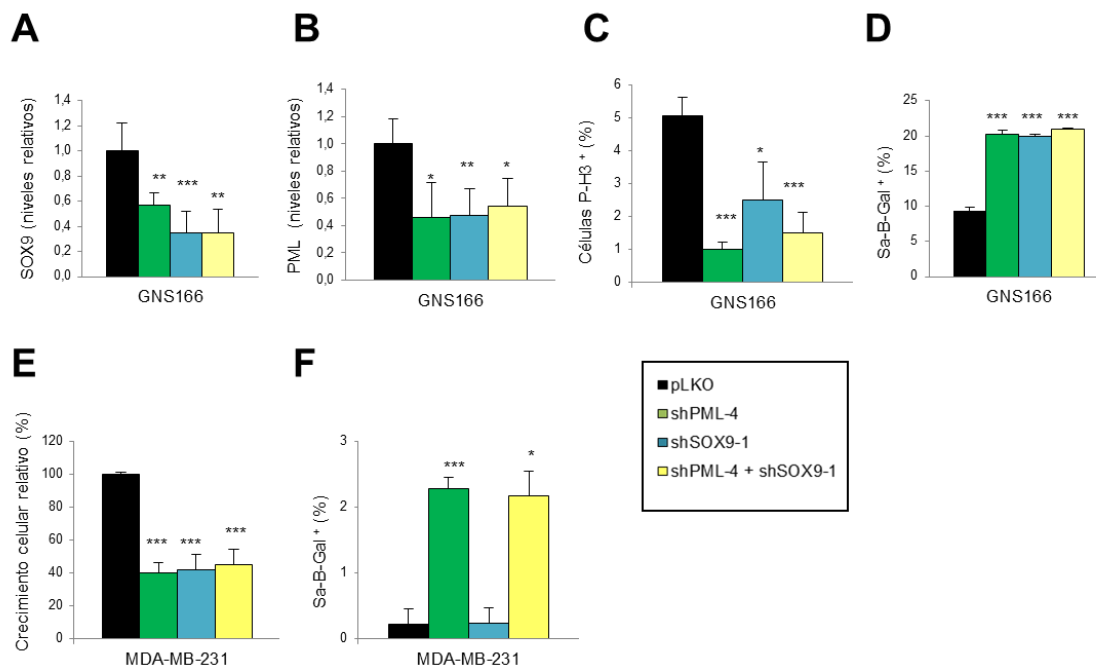


Figura 36. Efectos de la inhibición genética de *PML* y *SOX9* en conjunto en GBM y cáncer de mama. (A) Expresión relativa de *SOX9* a nivel de ARNm de las células control (pLKO) respecto a las células con silenciamiento de *PML* (*shPML-4*, verde), silenciamiento de *SOX9* (*sh-SOX9-1*, azul) y silenciamiento de *PML* y *SOX9* en conjunto (*shPML-4* + *sh-SOX9-1*, amarillo) en las células GNS166 (n=3), (B) expresión de *PML* a nivel de ARNm (C) cuantificación de células P-H3 (n= 3), (D) cuantificación relativa de células senescentes asociado a actividad β-galactosidasa (n=3). (E) Cuantificación relativa de la proliferación celular de las células MDA-MB-231 en las condiciones descritas a día 5 (n=3) y (F) cuantificación relativa de células senescentes asociado a actividad β-galactosidasa (n=3). Las barras de error representan la SEM, valor P (p≤0,05*; p≤0,01**; p≤0,001***) comparado con el control como se indica. Test estadístico T de Student.

LA RE-EXPRESIÓN DE *SOX9* RESTAURA EL FENOTIPO TUMORAL

En segundo lugar, para evaluar si *SOX9* participa en la actividad oncogénica de *PML*, se reactivó su expresión ectópicamente en células en las que previamente se había silenciado *PML* y se estudió su fenotipo.

Por un lado, en las células GNS166, el restablecimiento de *SOX9* incrementaba la proliferación celular significativamente respecto a las células con *PML* silenciado [Figura 37C]. La capacidad de formación de tumores también se incrementó en las células que se

restableció *SOX9*, ya que los ratones inoculados mediante estereotaxia con las células GNS166 con *SOX9* sobre-expresado tras el silenciamiento de *PML* mostraron una supervivencia media de 133 ($\pm 7,36$) días, mientras que los ratones inoculados con las células con silenciamiento de *PML* mostraban una supervivencia media de 174.5 ($\pm 36,86$) días [Figura 37D]. A nivel molecular, el Western blot mostró que el restablecimiento de *SOX9* en las células con silenciamiento de *PML* restablecía la expresión tanto de *SOX9* como de *PML* y pSTAT3 [Figura 37A y B].

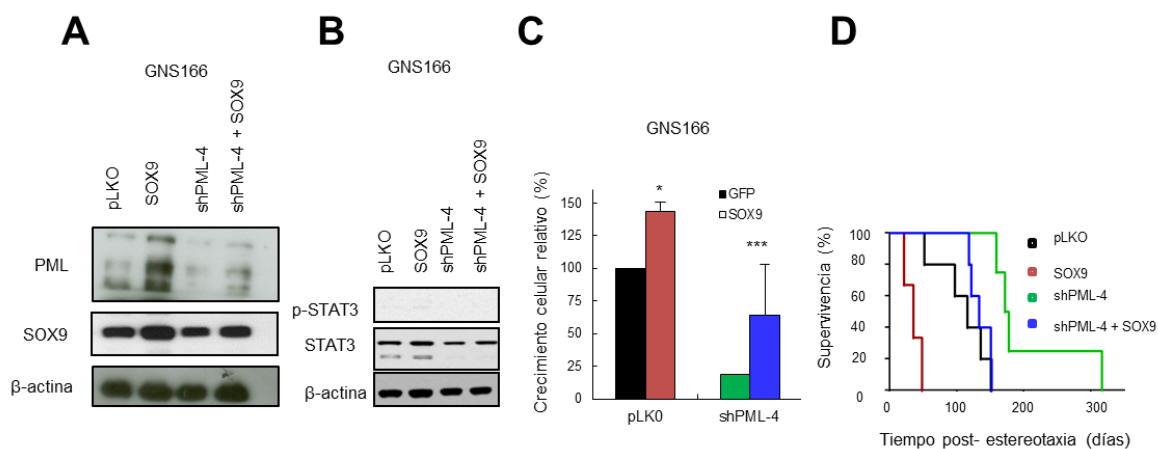


Figura 37. Efectos de la sobre-expresión ectópica de *SOX9* en células madre de glioma *PML* silenciadas. (A) Western blot representativo de *PML* y *SOX9* de las células GNS166 control (pLKO), con expresión ectópica de *SOX9* (SOX9), silenciamiento de *PML* (*shPML-4*) y en células con sobre-expresión ectópica de *SOX9* tras silenciamiento de *PML* (*shPML-4* + *SOX9*) (n=3). **(B)** Expresión de p-STAT3 y STAT3. **(C)** Cuantificación relativa de la proliferación celular (n=3). **(D)** Curva de Kaplan-Meier representando la supervivencia de ratones NOD-SCID tras la inyección estereotáctica de $0,1 \cdot 10^6$ células en ratones inmunodeprimidos NOD-SCID GNS166 control (pLKO; negro), con expresión ectópica de *SOX9* (SOX9; rojo), silenciamiento de *PML* (*shPML-4*; verde) y en células con sobre-expresión ectópica de *SOX9* tras silenciamiento de *PML* (*shPML-4* + *SOX9*; azul).

Se procedió del mismo modo en la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama, determinándose que al reactivar *SOX9* en células con silenciamiento de *PML* se restablecía completamente la capacidad de formación de tumoresferas de las células [Figura 38B] y se producía un restablecimiento significativo del crecimiento tumoral en animales inmunodeprimidos [Figura 38C] como también de la iniciación tumoral, ya que la frecuencia de las células iniciadoras se restablecía parcialmente. Estas frecuencias fueron

de 1/140 en pLKO, 1/58 en SOX9, 1/1506 en shPML-4 y 1/271 en shPML-4 + SOX9 [Figura 38D].

También se observó que la expresión ectópica de *SOX9* en las células con silenciamiento de *PML* producía un leve incremento en los niveles de este último [Figura 38A].

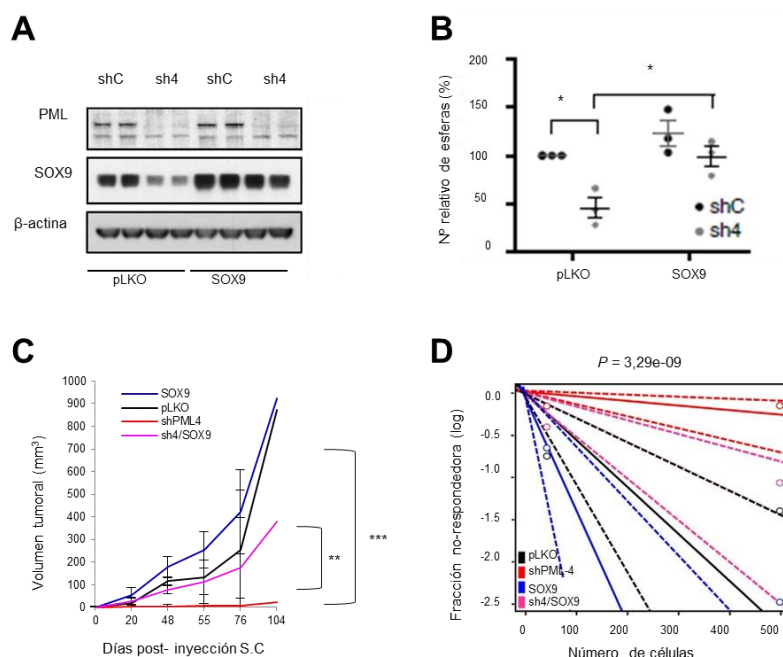


Figura 38. Efecto de la sobre-expresión ectópica de *SOX9* en células MDA-MB-231 de cáncer de mama con silenciamiento de *PML*. (A) Western blot representativo de *PML* y *SOX9* en células control (pLKO shC), con silenciamiento de *PML* (*sh4*), con expresión ectópica de *SOX9* (shC *SOX9*) y con el efecto de la expresión ectópica de *SOX9* en células con silenciamiento de *PML* (*sh4-SOX9*) (n=3). (B) Capacidad de formación de tumorosferas en medio selectivo para célula madre (n=3). (C) Capacidad de formación de tumores al inyectar $0,5 \cdot 10^6$ células en ratones inmunodeprimidos FOXn1^{nu} (nu/nu) control (pLKO; negro), con expresión ectópica de *SOX9* (*SOX9*; azul), silenciamiento de *PML* (*shPML-4*; rojo) y en células con sobre-expresión ectópica de *SOX9* tras ser silenciadas con *PML* (*shPML+ SOX9*; rosa)(*SOX9* y *shPML-4* n=12 pLKO y *sh4/SOX9* n=16). (D) Representación logarítmica de ensayo de dilución seriada (líneas sólidas: valor medio; líneas discontinuas: 95% IC; círculos vacíos: valores obtenidos en cada dilución). Se inocularon $0,5 \cdot 10^6$ y $0,05 \cdot 10^6$ células de MDA-MB-231. (n=12 inyecciones de las condiciones *shPML4* y *SOX9* y n=16 en las condiciones pLKO y *sh4/SOX9*). El número de células tumorales iniciadoras fue calculado mediante la plataforma ELDA, test Chi-cuadrado (χ^2). Las barras de error representan la SEM, valor P ($p \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$) comparado con el control como se indica. Test estadístico T de Student.

Siguiendo este abordaje experimental se observó la capacidad del restablecimiento ectópico de SOX9 para restablecer los efectos oncogénicos de PML en células tumorales de glioma y mama, demostrando que SOX9 es un efector de PML. Además, el hecho de que la reactivación de SOX9 module la expresión de PML y p-STAT3 refuerza la existencia de un bucle regulatorio entre los miembros de esta vía.

PML REGULA LA EXPRESIÓN DE SOX9 EN GLIOBLASTOMA Y EN CÁNCER DE MAMA

Por último, se propuso determinar el modo de regulación de PML sobre SOX9 y se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para analizar si se trataba o no de un mecanismo transcripcional. Para ello, se inmunoprecipitó PML en las células U251 de glioma [Figura 39A] y MDA-MB-231 de mama [Figura 39B] control y con sobre-expresión de PML (HA-PMLIV inducible con doxiciclina) y se analizaron las secuencias de ADN co-inmunoprecipitadas junto a PML en busca de secuencias reguladoras de la expresión de *SOX9*. De este modo se determinó que PML regula directamente la transcripción de *SOX9* en las células de ambos tipos de tumores.

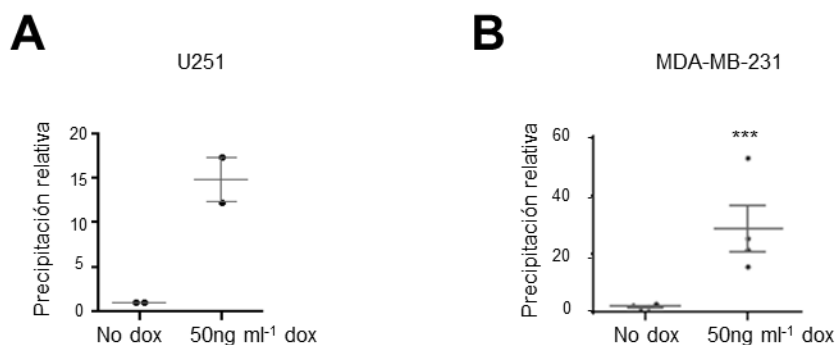


Figura 39. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de PML ectópico en células de glioma y cáncer de mama. Abundancia de la región del promotor de *SOX9* en inmunoprecipitación de cromatina de PML ectópico HA-PMLIV usando un anticuerpo HA-tag en las células **(A)** U251 (n=2) y **(B)** MDA-MB-231 (n=4) tras la inducción con doxiciclina 50 ng/mL durante 3 días. En (B) Los datos fueron normalizados respecto a IgG (control negativo de IP). Barras de error representan SEM, valor P (p≤0,05*; p≤0,01**; p≤0,001***)

DISCUSIÓN

Dentro de un mismo tipo de cáncer, la heterogeneidad hallada entre los tumores de diferentes pacientes (inter-tumoral), junto con los escasos beneficios que en muchas ocasiones reportan los tratamientos, ponen de manifiesto cada vez más la urgente necesidad de una medicina personalizada en el ámbito de la oncología. Además, la heterogeneidad molecular y celular dentro de un mismo tumor (intra-tumoral) es un fenómeno que dificulta un abordaje terapéutico efectivo, pues no todas las células presentan la misma susceptibilidad a los fármacos y se dan fenómenos de resistencia (y recurrencia). Ésta es la razón por la que las terapias combinadas y/o los fármacos multidiana proporcionan en general mayores beneficios clínicos. En la búsqueda de dianas moleculares para el tratamiento del cáncer, además de las alteraciones específicas que caracterizan a los diferentes subtipos moleculares de tumores identificados en muchos tipos de cáncer, es también muy relevante tener en cuenta la heterogeneidad intra-tumoral en lo que se refiere a la naturaleza celular, ya que en muchos tipos de tumores se ha identificado una subpoblación minoritaria de células madre tumorales (CMT). A estas células se les atribuye el origen de los tumores, pero además, sus características intrínsecas de auto-renovación, plasticidad y quiescencia las hacen resistentes a las terapias convencionales y también proclives a diseminarse generando metástasis. En consecuencia se las considera responsables de la recurrencia, de la progresión de la enfermedad y de la resistencia a las terapias.

Por todo lo expuesto, el abordaje futuro del cáncer demanda una estratificación molecular de los pacientes teniendo en cuenta la heterogeneidad genética y celular, y requiere el empleo de terapias efectivas contra las células que conforman el grueso del tumor y contra las CMT. Sin embargo, la realidad actual es que, a pesar de los avances, en muchos tipos de cáncer se continúan aplicando protocolos de tratamiento convencionales que no son totalmente efectivos. Un ejemplo de ello es el Glioblastoma (GBM), en el que se aplica radio y quimio-terapia en primera línea y cuyos pacientes no superan los 15 meses de media de vida (Stupp et al., 2009), o el cáncer de mama, que provoca más de medio millón de muertes al año a nivel mundial (WHO, 2012). En el caso del GBM, la recurrencia tumoral debida a la resistencia es un aspecto muy crítico, presentándose en

aproximadamente el 90% de los casos (CBTRUS, 2012) siendo los tumores recurrentes más resistentes a las terapias y generalmente inoperables (Weller et al., 2013). En este tipo de tumor la relevancia de las CMT, denominadas células madre de glioma (GSC), está muy demostrada y el fenómeno de la recurrencia parece deberse principalmente a esta población celular.

En el cáncer de mama es la alta tendencia metastásica el factor que contribuye de manera más sobresaliente a la elevada mortalidad de los pacientes, estimándose que más del 30% de los pacientes con enfermedad localizada en el momento del diagnóstico desarrolla metástasis a pesar de haberse sometido a cirugías de resección con resultado satisfactorio y terapia adyuvante (Cardoso et al., 2012; Henderson, 2013). Esta elevada metástasis se atribuye a las CMT de mama, cuya plasticidad les permite adquirir capacidad migratoria e invasiva a través del fenómeno de transición epitelio-mesénquima (EMT) (Asiedu et al., 2014; Brooks et al., 2015; Liu et al., 2014; May et al., 2011).

Este trabajo se ha orientado a la identificación de genes y mecanismos reguladores de la subpoblación de CMT, en GBM y cáncer de mama, hallando denominadores comunes y aspectos específicos de cada tumor; y encontrando marcadores de estratificación de pacientes con alto potencial como dianas moleculares; con el objetivo de identificar compuestos efectivos contra ellas y así mejorar el pronóstico de estas enfermedades y también de otros tipos de cáncer, dada la relevancia de las CMT en la mayoría de ellos.

SOX9 ES UN REGULADOR ESENCIAL DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

El factor de transcripción SOX9 juega un papel importante en la embriogénesis y también en la homeostasis de tejidos adultos, incluyendo la mama y el SNC, donde se ha asociado con la regulación de las células madre (Guo et al., 2012; Pritchett et al., 2011; Scott et al., 2010). Se conoce que las células madre son el origen de algunos tumores (Blanpain, 2013) como el GBM, el cual deriva, en algunos casos, de la transformación de las células madre neurales (NSC) (Chen et al., 2012). Por lo que se puede sugerir que SOX9, como regulador de células madre, puede estar relacionado con el origen de éste y otros tumores. Existen trabajos que apoyan esta hipótesis, ya que se ha observado que SOX9 coopera en la transformación neoplásica de las células madre del cerebro (Swartling et al., 2012), de la mama (Guo et al., 2012) y del páncreas (Kopp et al., 2012).

Asimismo, se ha documentado una elevada expresión de SOX9 en algunos tipos de cáncer como el de páncreas, mama, pulmón, próstata, meduloblastoma o colon (Matheu et al., 2012), siendo en este último tumor en el que se ha demostrado que la sobreexpresión de SOX9 promueve la transformación neoplásica, también en fibroblastos, mientras que su silenciamiento la retrasa (Matheu et al., 2012).

En este trabajo hemos observado que la expresión de SOX9 está enriquecida en líneas celulares de glioma cultivadas en condiciones selectivas para célula madre y que ello va acompañado de un enriquecimiento en otros marcadores establecidos de célula madre. El incremento de la expresión de SOX9 en las líneas U87 y U373 es mayor que en la U251, probablemente debido a que esta línea presenta un nivel basal de SOX9 que ya es elevado. Además, hemos comprobado que el nivel de SOX9 está significativamente elevado en los tumores que generan en ratones inmunodeprimidos las células de GBM cultivadas en condiciones de célula madre. Por el contrario, la expresión de SOX9 disminuye cuando las GSC entran en diferenciación. Estos hechos demuestran que SOX9 es relevante en el mantenimiento del estado no diferenciado de las CMT, definiéndolo como un **biomarcador** de esta subpoblación celular. Apoyando nuestros datos, en un trabajo reciente en el que han realizado análisis comparativos de cultivo *in vitro* se ha

descrito a SOX9 como un marcador de los cultivos de esferas de GBM que presentan capacidad tumorigénica (Behnan et al., 2016).

Se profundizó en el estudio de la función de SOX9 mediante ensayos de pérdida y ganancia de función. En esos ensayos determinamos que SOX9 favorece la iniciación y progresión tumoral, ya que la sobre-expresión ectópica de SOX9 en células de glioma y en GSC incrementa la proliferación y la capacidad de auto-renovación *in vitro*, así como la capacidad tumorigénica *in vivo*.

Por el contrario, hemos observado que al silenciar SOX9 en las líneas de glioma se reduce el crecimiento celular y tumoral, mientras que se induce senescencia celular. Este efecto del silenciamiento de SOX9 en la proliferación en líneas establecidas de glioma y el crecimiento tumoral lo habíamos mostrado en un estudio previo del grupo mediante ensayos *in vivo* (Garros-regulez et al., 2016), mientras que otro estudio había mostrado el efecto antiproliferativo *in vitro* mediante experimentos de contaje celular (Swartling et al., 2009). A diferencia de los estudios en líneas celulares establecidas, los estudios de silenciamiento en CMT específicamente no son tan abundantes. En este sentido, nosotros hemos mostrado los efectos del silenciamiento de SOX9 en las GSC y hemos determinado que ello reduce su capacidad de proliferación, auto-renovación e iniciación tumoral, además de inducir senescencia.

Además, hemos estudiado los niveles de expresión de SOX9 en muestras tumorales de pacientes de GBM, determinando que el 80% de los tumores de la cohorte del Hospital Universitario Donostia (HUD) presenta niveles de ARNm de SOX9 elevados respecto al tejido sano. Además, al caracterizar los niveles de expresión a nivel de proteína mediante TMA observamos que la totalidad de los tumores expresa SOX9, existiendo diferentes niveles de expresión en base a la proporción de células positivas. Estos datos adquieren una gran relevancia clínica cuando determinamos que los pacientes cuyos tumores presentan mayores niveles de SOX9 (biopsias con más del 60% de celularidad positiva) presentan un tiempo de supervivencia inferior, hecho que además confirmamos en otra cohorte independiente, del University Hospital of Basel (USB), indicando que SOX9 tiene un papel muy importante en la clínica de este tumor. En

concordancia con nuestros datos, otros grupos han observado en gliomas expresión aumentada de *SOX9* a nivel de ARNm (Gao et al., 2015; Wang et al., 2012) y la han asociado con una mala evolución clínica en los casos de mayor grado de malignidad (Wang et al., 2012).

Nuestros datos indican que *SOX9* es un gen importante en la patobiología del GBM, probablemente a través de su acción en las GSC.

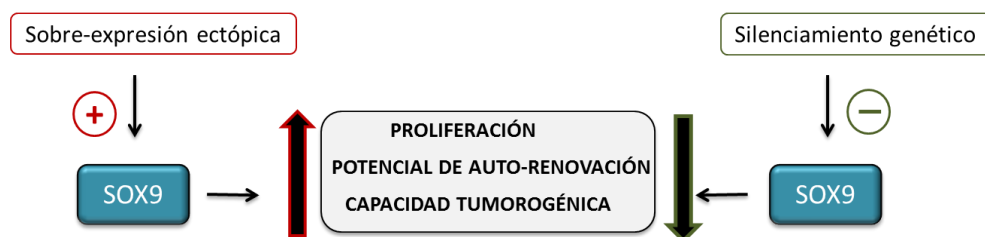


Figura 40. La sobre-expresión ectópica de *SOX9* aumenta las capacidades celulares indicadas, mientras que el silenciamiento genético de *SOX9* las reduce.

Estudiamos *SOX9* en la población de CMT también en cáncer de mama, observando que sus niveles están enriquecidos en esta subpoblación. Además, mediante el silenciamiento de su expresión observamos los mismos resultados que en GBM: reducción de la capacidad de auto-renovación e iniciación tumoral *in vivo*. En cuanto a la clínica, no hemos estudiado los niveles de expresión de *SOX9* a nivel de ARNm en nuestra cohorte de cáncer de mama, pero sí lo hemos estudiado en diferentes bases de datos como METABRIC, Miller, TCGA o Wang (datos no mostrados) en las que hemos observado una asociación significativa de la expresión elevada de *SOX9* con los tumores de tipo ER-, que son de los que presentan peor pronóstico. Sin embargo, no hemos visto asociación de la expresión de *SOX9* con la supervivencia, algo que otros grupos recientemente sí han asociado a nivel de proteína con peor pronóstico (Lei et al., 2016). Este hecho cobra mayor importancia ya que han relacionado el elevado nivel de expresión de *SOX9* con una mayor presencia de CMT de mama ($CD44^+/CD24^{-/bajo}$) y menor supervivencia de los pacientes (Lei et al., 2016).

Nuestros hallazgos, junto con las observaciones de otros grupos, revelan el impacto de SOX9 en dos poblaciones de CMT, definiéndolo como un **regulador** de las CMT.

Estudios complementarios del grupo en cáncer gástrico y cáncer de colon (Carrasco-Garcia et al., 2016; Santos et al., 2016), así como de otros grupos en carcinoma escamoso de esófago (Hong et al., 2015), pulmón (Jiang et al., 2010), cabeza y cuello (Sosa et al., 2015) y piel (Larsimont et al., 2015) han demostrado la relevancia de este factor de transcripción en la regulación de las CMT.

Las CMT resisten a las terapias por sus características intrínsecas y por su habilidad para mantenerse en quiescencia. De hecho, tienen la habilidad de mantenerse en estado latente durante largos periodos de tiempo en el organismo y mediante mecanismos epigenéticos de reprogramación volver a proliferar (Sosa et al., 2015). Esas células latentes que tienen capacidad de auto-renovación para dar células hijas idénticas a sí mismas y células diferenciadas, y que exhiben capacidad proliferativa, son las responsables de las recurrencias de los tumores (Clevers, 2011) y de la formación de los focos metastásicos (Valastyan and Weinberg, 2011). En este sentido, hemos determinado que las líneas de glioma con elevados niveles de SOX9 son más resistentes a TMZ, el fármaco de primera línea en GBM. Este hecho además de vincular a SOX9 con la quimiorresistencia y por extensión, a las CMT, podría explicar el peor pronóstico de los pacientes de GBM cuyos tumores presentan elevados niveles de SOX9. La elevada expresión de SOX9 se ha asociado también a la resistencia a las terapias en otros tumores como en el caso de la radioterapia en intestino (Roche et al., 2015) o el tratamiento con cisplatino en el cáncer gástrico (Santos et al., 2016).

Además, nuestros datos demuestran que SOX9 tiene una **actividad dual** en la regulación de las CMT. Por un lado, hemos demostrado que proporciona resistencia a las terapias, probablemente a través de su habilidad de inducir características asociadas a las células madre como la capacidad de auto-renovación, iniciación tumoral y latencia (Sosa et al., 2015) y por otro lado, regula la proliferación y senescencia, lo cual permite el crecimiento y la propagación del tumor.

Nuestros resultados muestran la importancia que tiene dirigirse a SOX9 no sólo como una estrategia de sensibilización al tratamiento, sino también para evitar la regresión tumoral destruyendo las subpoblaciones de CMT de lento ciclo celular y quiescentes para que no puedan proliferar y regenerar el tumor. El conjunto de estos resultados sugiere que SOX9 podría constituir una potencial diana terapéutica en distintos tumores.

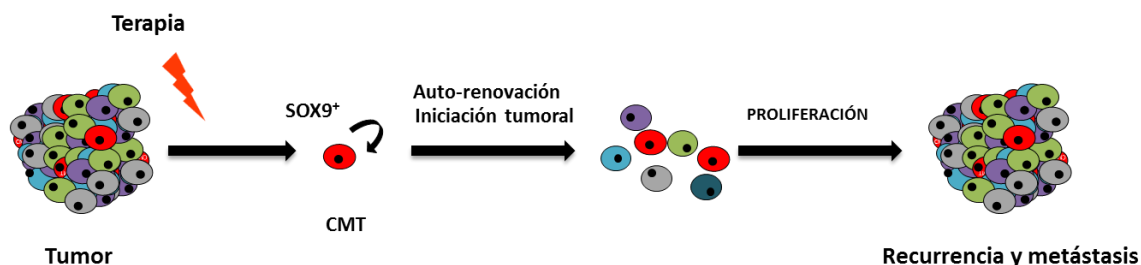


Figura 41. Las células madre tumorales (CMT), que expresan elevados niveles de SOX9, resisten a la terapia convencional y gracias a la capacidad de auto-renovación e iniciación tumoral y posterior proliferación son las responsables de la recurrencia y la diseminación metastásica del tumor.

STAT3 COMO MEDIADOR DE LA ACCIÓN DE SOX9

Estas evidencias acerca de SOX9 destacan la importancia de la búsqueda de las moléculas diana de este factor de transcripción. En nuestro caso, nos hemos centrado en el análisis del transcriptoma de las GSC con silenciamiento de *SOX9*, a diferencia de otros estudios que se centran en el transcriptoma de líneas celulares tumorales establecidas (Akan et al., 2012; Fang et al., 2011; Klijn et al., 2014) o de células de modelos de ratón (Larsimont et al., 2015). Mediante el análisis de *microarray* determinamos que vías relacionadas con la inflamación y la respuesta inmune estaban implicadas en la acción de SOX9. En concordancia con los resultados obtenidos, en unos estudios preliminares realizados (datos no mostrados) observamos que las células con silenciamiento de *SOX9* secretan más Factor I al medio extracelular, un inhibidor de la activación del sistema del complemento. Estos datos sugieren que SOX9 está implicado en la activación del sistema de complemento, componente fundamental de la respuesta inmunitaria que se ha

relacionado con la activación de vías de señalización implicadas en cáncer mediante la promoción de la inflamación crónica (Pio et al., 2013).

Otras evidencias recientes vinculan a SOX9 con la respuesta inmune. En este sentido, en el caso de melanoma, la actividad de SOX9 confiere a las células tumorales resistencia a la muerte celular mediada por células T (Ashkenazi et al., 2016). También en cáncer de pulmón y mama, el grupo de Massagué ha implicado a SOX9 en la evasión del sistema inmune innato (Malladi et al., 2016).

Este análisis del *microarray* también mostró la afectación en la señalización de JAK2, la cual forma parte de la vía de señalización JAK/STAT en la que participa STAT3. Esta vía de señalización es relevante en el desarrollo, donde participa en el mantenimiento de las ESC en la hematopoyesis y neurogénesis (Stine and Matunis, 2013). STAT3 además está implicado en la regulación del ciclo celular, la supervivencia celular, así como en la auto-renovación (Inghirami et al., 2005; Levy and Lee, 2002; Raz et al., 1999). STAT3 además tiene un papel fundamental en la inducción y mantenimiento del microambiente inflamatorio, el cual ha sido relacionado con la iniciación y progresión tumoral (Catlett-Falcone et al., 1999; Hajimoradi et al., 2016; Mantovani et al., 2008; Park et al., 2016). Asimismo, se ha descrito que STAT3 regula positivamente la expresión de genes pro-angiogénicos y de supervivencia celular, los cuales promueven el crecimiento tumoral, cuando es activado por IL-6, la cual a su vez es regulada por IL-17 (Wang et al., 2009), precisamente una interleuquina cuya señalización se ve afectada por el silenciamiento de SOX9 en nuestro análisis del transcriptoma.

Validando los resultados del *microarray* hemos mostrado que las GSC con silenciamiento de SOX9 expresan niveles significativamente menores de STAT3 tanto a nivel de ARNm como de la proteína en su forma activa fosforilada (p-STAT3), indicando que SOX9 regula a STAT3. Observamos también que la expresión de SOX9 correlaciona con la forma activa de STAT3 en líneas de glioma y en GSC. En cuanto a la clínica, comprobamos que existía una correlación positiva entre SOX9 y p-STAT3 a nivel de proteína en pacientes de GBM en la cohorte de USB y de ARNm en la cohorte de más de 500 biopsias de GBM estudiados por el TCGA. Reforzando estos datos clínicos, se ha

descrito que STAT3 está sobre-activado en GBM (Rahaman et al., 2002) y que además esa elevada expresión de STAT3 fosforilado correlaciona con peor pronóstico (Birner et al., 2010). Asimismo, existen más evidencias de la sobre-activación de STAT3 en cáncer de mama (Gritsko et al., 2006) además de en otros varios tipos de cáncer; cabeza y cuello (Leong et al., 2003), cáncer de próstata (Mora et al., 2002) y melanoma (Kortylewski et al., 2005).

Nosotros quisimos comprobar el papel de STAT3 en la regulación de las CMT mediante su silenciamiento genético. En GBM y cáncer de mama observamos que en las células con silenciamiento genético de *STAT3* se producía una disminución en la proliferación, capacidad de auto-renovación *in vitro* y tumorigénesis, hecho que confirma los datos de trabajos previos en GBM donde observaron inhibición del crecimiento celular mediante incorporación de BrdU y reducción en la formación de esferas en cultivo *in vitro* (Sherry et al., 2009), determinando que STAT3 es necesario para el mantenimiento de las características de las GSC.

Esta implicación de STAT3 en las CMT se ha determinado recientemente en otros tumores como en cáncer gástrico (Hajimoradi et al., 2016) y carcinoma hepatocelular (Ghoshal et al., 2016). Sin embargo, su función en cáncer no es exclusiva en la regulación de las CMT, ya que en muchos tumores como mieloma, intestino y neuroblastoma, entre otros, su sobre-activación ha sido asociada con la inducción de la proliferación celular e inflamación (Inghirami et al., 2005; Yu et al., 2009).

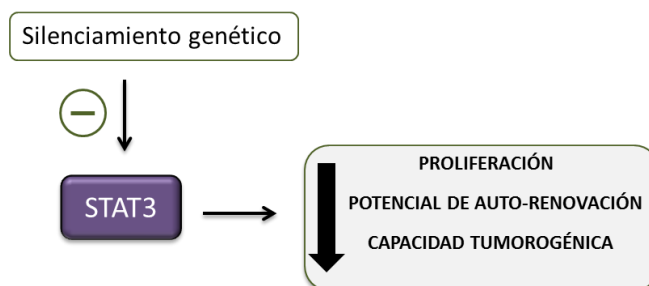


Figura 42. Nuestros resultados demuestran que el silenciamiento genético de *STAT3* reduce las mismas actividades celulares que el silenciamiento de *SOX9*.

VÍA SOX9-STAT3-PML COMO MECANISMO REGULADOR DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

Está descrito que la expresión de STAT3 correlaciona con la expresión de *PML* (gen de la leucemia promielocítica) en distintas líneas celulares tumorales (Hubackova et al. 2012). *PML* fue originalmente identificado como parte de la proteína fusionada *PML/RAR α* (receptor del ácido retinoico), que es producto de la translocación genómica de t (15;17) (Goddard et al., 1991; Kakizuka et al., 1991; de Thé et al., 1991) y que tiene un rol crítico en el desarrollo de la leucemia promielocítica aguda (LPA), donde está implicado en la auto-renovación de los progenitores mieloides (Du et al., 1999). *PML* forma junto a otras proteínas celulares los denominados cuerpos nucleares (*PML-NB*) que están presentes en la mayoría de líneas celulares y muchos tejidos. *PML* está implicado en varios aspectos de la actividad celular ya que está asociado con la transcripción de varios genes (Boisvert et al., 2000; Wang et al., 2004) y participa en la reparación del ADN, en apoptosis, senescencia y otros procesos celulares mediante el reclutamiento de diferentes moléculas señalizadoras. Se ha demostrado que *PML* contribuye a mantener la cromatina de la región del promotor *Oct4* en una conformación abierta para su expresión constante en células madre (Chuang et al., 2011). Estas observaciones postulan a *PML* como un regulador positivo de la expresión de factores de transcripción específicos de célula madre. Este hecho ha sido confirmado en varios estudios en los que lo vinculan con el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas a través de la vía de oxidación de ácidos grasos, sugiriendo un mecanismo metabólico en su rol regulador de las células madre (Ito et al. 2012).

En GBM y cáncer de mama nosotros observamos que la expresión de *PML* está enriquecida en las tumorosferas y en los tumores generados por éstas. Estos datos definen el papel de *PML* como biomarcador de las CMT en estos tipos de cáncer, y amplían lo descrito anteriormente en tumores líquidos como la leucemia mieloide crónica (LMC), donde habían visto implicación de *PML* en el mantenimiento de las células iniciadoras de leucemia (LIC) (Ito et al. 2008). De hecho, éstos son los primeros estudios de asociación positiva entre *PML* y las CMT.

En nuestro caso, hay que destacar que la elevada expresión de PML correlaciona con la de SOX9 y STAT3 en las CMT de GBM y cáncer de mama. Estos datos sugieren que elevados niveles de SOX9-STAT3-PML podrían formar parte de la señalización oncogénica distintiva de las CMT. Datos clínicos apoyan esta asociación, dado que hemos observado correlación a nivel de proteína entre SOX9, p-STAT3 y PML en ambos tumores en la cohorte de pacientes de GBM de USB y en las cohortes de cáncer de mama de Carracedo 2012 y Marsella; y correlación entre la expresión de ARNm de *STAT3* y *PML* en bases de datos disponibles de cáncer de mama (MSK/EMC) y GBM (TCGA).

Además de los elevados niveles de expresión de PML en CMT, en este trabajo hemos estudiado su función en la regulación de las CMT mediante su silenciamiento genético, mostrando que ello reduce la capacidad de auto-renovación y la capacidad de iniciación de tumores *in vivo* tanto en GBM como en cáncer de mama [Figura 43], hechos que determinan su papel oncogénico. Estos datos refuerzan un estudio en el que se detectó un subgrupo de biopsias de cáncer de mama que mostraba niveles de proteína y ARNm de PML significativamente elevados, asociados a peor prognosis y rápida recurrencia (Carracedo et al., 2012).

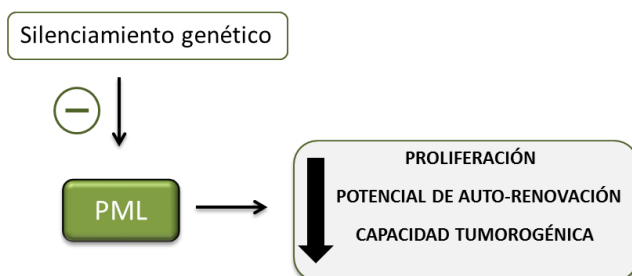


Figura 43. Nuestros resultados demuestran que el silenciamiento genético de *PML* reduce las mismas actividades celulares que el silenciamiento de *SOX9* y *STAT3*.

Lejos de ser el oncogén que nuestros resultados demuestran, hasta ahora PML se había descrito como un supresor tumoral. Su ausencia o pérdida de expresión en varios tipos de cáncer como los de próstata, colon, pulmón, linfomas, el cáncer de mama y tumores del SNC, había sido asociada a progresión tumoral y tumores de alto grado (Gurrieri et al., 2004). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que PML es esencial

en el mantenimiento de la auto-renovación y características de las CMT en cáncer de mama y GBM. A su vez, hemos observado que el silenciamiento de *SOX9* disminuye los niveles de *STAT3* y *PML*, mientras que su sobreexpresión los incrementa en GBM, y que el silenciamiento de *STAT3* disminuye los niveles de *SOX9* y *PML* en ambos tipos tumorales. Además, hemos demostrado que *PML* regula la expresión de *SOX9* y *STAT3*, ya que al silenciar la expresión de *PML* también se reduce el nivel de expresión de *SOX9* y *STAT3* tanto a nivel de ARNm como de proteína en ambos tumores, a excepción de *STAT3* en cáncer de mama, que no lo hemos estudiado. Estas evidencias demuestran que existe un bucle regulatorio entre los miembros de esta vía. Reforzando esta conclusión, hemos observado lo siguiente:

(i) El silenciamiento conjunto de *PML* y *SOX9* en ambos tipos tumorales no tiene mayor efecto que el silenciamiento de cada uno de ellos independientemente, es decir, no hay sinergia ni adición en las acciones de *PML* y *SOX9*, lo que indica que se encuentran en el mismo eje de acción.

(ii) Los estudios de re-expresión ectópica de *SOX9* tras el silenciamiento de *PML* determinaron que el restablecimiento de *SOX9* contrarrestaba los efectos del silenciamiento de *PML* en el fenotipo celular en ambos modelos tumorales, indicando que *SOX9* es un efector de *PML*.

(iii) Para comprobar el hecho de que *SOX9* es un efector directo de la acción de *PML* realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en los que demostramos que *PML* regula directamente la transcripción de *SOX9* tanto en las células de GBM como en cáncer de mama. Sin embargo, la actividad de *PML* está mediada exclusivamente a través de *SOX9*, ya que en otros estudios han descrito a *c-Myc* como un efector de *PML* en el mantenimiento de las GSC, el cual se expresa en niveles altos en esta población celular (Zhou et al., 2015).

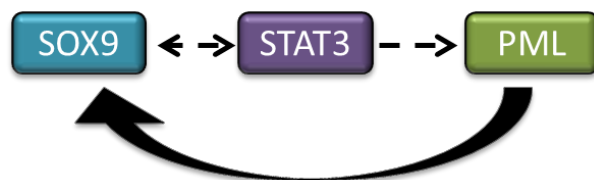


Figura 44. Hemos demostrado que *PML* regula de forma directa la transcripción de *SOX9*.

Conviene puntualizar que existen ciertas diferencias en la regulación de esta vía en ambos tipos de cáncer. En el caso concreto del GBM, el silenciamiento de *SOX9* conlleva una disminución en la expresión de PML y STAT3, y el aumento ectópico de la expresión de *SOX9* eleva los niveles basales de PML y STAT3. Estos resultados sugieren que *SOX9* regula a STAT3 Y PML, pero además los resultados discutidos en el párrafo anterior revelan que PML también regula a *SOX9* demostrando la existencia de un bucle regulatorio entre *SOX9*, STAT3 y PML. Sin embargo, en cáncer de mama no podemos confirmar este aspecto, ya que la modulación de los niveles de *SOX9* no afecta a la expresión de PML y no se han estudiado los niveles de STAT3 en respuesta al silenciamiento de *PML*.

En resumen, nuestros resultados indican que en GBM STAT3 es un efector de *SOX9*, por lo que en este tumor el eje regulador de CMT podría establecerse en el siguiente orden: *SOX9*-STAT3-PML con *loop* de vuelta. Sin embargo, en cáncer de mama, el hecho de que el silenciamiento de *SOX9* no afecte a los niveles de PML sugiere que la vía sigue el orden STAT3 – PML – *SOX9*. Otro aspecto a comentar es que en cáncer de mama observamos senescencia celular como consecuencia del silenciamiento de PML, pero no al silenciar *SOX9*. Este evento indica que *SOX9* actúa *downstream* de PML en la regulación de las CMT de mama, y muestra que la actividad de PML en la evasión de la senescencia no implica a *SOX9*, pudiendo ser una acción directa del propio PML o de otro efector del mismo, diferente de *SOX9*. En cambio, en GBM *SOX9* sí que media la evasión de la senescencia.

Sin embargo, el mecanismo de regulación de esta vía no es fijo, ya que por ejemplo recientemente se ha demostrado que STAT3 activa directamente la expresión de *SOX9* uniéndose a su promotor durante el desarrollo del esqueleto (Hall et al., 2017).

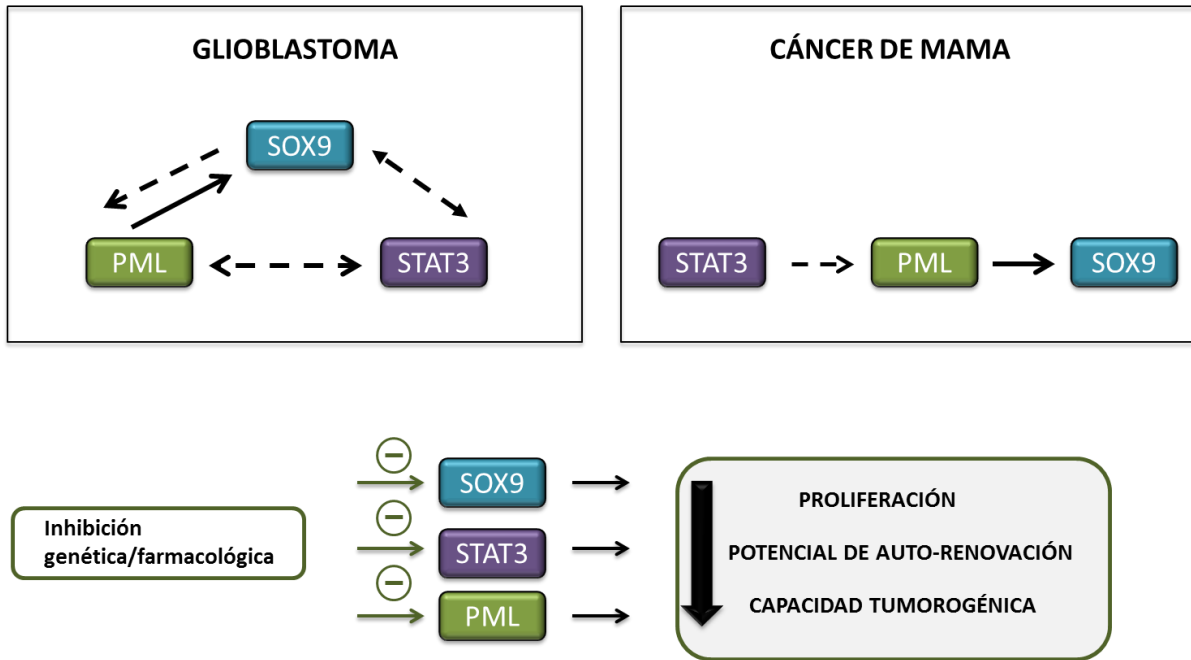


Figura 45. Nuestros datos sugieren que elevados niveles de SOX9-STAT3-PML forman parte de la señalización oncogénica distintiva de las CMT y demuestran que el silenciamiento genético y farmacológico de cada uno de ellos reduce la capacidad de proliferación, potencial de auto-renovación y capacidad tumorigénica en ambos tipos tumorales. Además, existe un bucle regulatorio (flecha discontinua) entre los miembros de esta vía, siendo la regulación de PML sobre SOX9 directa (flecha continua) en ambos tipos tumorales.

El mecanismo de SOX9 en la regulación de las CMT que describimos en este trabajo no excluye que SOX9 pueda activar o regular a otros efectores o vías. En este sentido, se ha demostrado que SOX9 regula los *super enhancers*, incluyendo el suyo propio, indicando auto-regulación (Adam et al., 2015). Además, hay evidencias de la existencia de otras dianas de SOX9 como LGR5 en la regulación de GSC (Hiraoka et al., 2015). También se ha descrito la sinergia de la co-expresión de SOX9 junto con SLUG en el mantenimiento de las CMT en el cáncer de mama (Guo et al., 2012) o a BMI1 como efector directo de SOX9 en otros tumores como el cáncer de colon (Matheu et al., 2012). En cáncer gástrico también hemos demostrado que SOX9 juega un papel oncogénico a través de la vía de WNT/ β -catenin con la que establece un bucle regulatorio y por la que regula a las CMT gástricas (Santos et al., 2016).

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS – TRASLACIÓN CLÍNICA

En este trabajo hemos determinado que en GBM y cáncer de mama la actividad de SOX9 se contextualiza en un eje de señalización en el que participan STAT3 y PML.

Los resultados citados anteriormente postulan que la inhibición del eje de señalización SOX9-STAT3-PML podría constituir una estrategia prometedora para combatir la resistencia a la quimioterapia y recurrencia en el caso de GBM y la diseminación metastásica en cáncer de mama.

La estratificación de los pacientes en base a los niveles de SOX9, PML y STAT3 podría ser una estrategia terapéutica aplicable para seleccionar terapias dirigidas a las CMT. Para ello, en primer lugar habría que identificar patrones de estratificación fiables y reproducibles de la expresión de cualquiera de ellos. En el caso de la cuantificación de SOX9, dentro de su positividad se han distinguido dos subgrupos: de expresión alta ($\geq 60\%$ células positivas) o baja ($< 60\%$). Este patrón podría ser relevante en clínica, ya que hemos determinado en dos cohortes independientes de GBM que conlleva diferencias significativas en términos de supervivencia. Sin embargo, en otros tumores, en los que se ha cuantificado la expresión proteica de SOX9 por inmunohistoquímica, se ha utilizado una estratificación de SOX9 considerando la positividad cuando el porcentaje de células positivas en la muestra era superior al 25%, aunque en este caso no se asociaron los grados de expresión de SOX9 de acuerdo a este modelo de estratificación con la supervivencia de los pacientes (Matheu et al., 2012). Estos datos sugieren que la expresión de SOX9 es diferencial y variable entre distintos tipos de cáncer. De hecho, datos sin publicar de nuestro grupo en cáncer de páncreas refuerzan el valor de la estratificación de los pacientes en base a la expresión de SOX9 y un trabajo en carcinoma renal también pone de manifiesto la relevancia de esta estratificación (Li et al., 2015b). En este trabajo, los pacientes cuyos tumores presentan niveles bajos de SOX9, considerándolos con positividad del 10%, tienen mejor respuesta al tratamiento con Sorafenib/Sunitinib (inhibidores de TK) que los pacientes con expresión superior.

En la búsqueda de inhibidores frente a SOX9, hemos observado que la Rapamicina, inhibidor de la vía de señalización de mTOR, la cual se encuentra anormalmente activa en un alto porcentaje de casos de GBM (TCGA, 2008), reduce los niveles de expresión de SOX9. Además, hemos mostrado que el hecho de combinar con la Rapamicina el tratamiento convencional con TMZ parece ser una forma de incrementar la eficacia de la quimioterapia y mejorar las expectativas clínicas actuales de aquellos pacientes cuyos tumores expresan niveles elevados de SOX9 (Garros-regulez et al., 2016). En el caso del cáncer de colon, también hemos demostrado mayor efecto del tratamiento con Rapamicina en la capacidad de auto-renovación y crecimiento tumoral en células con niveles altos de SOX9, aunque en este caso la Rapamicina no reduce su nivel de expresión (Carrasco-Garcia et al., 2016). Esta estrategia podría extenderse a otros tumores, ya que en cáncer de mama metastásico se ha demostrado que la combinación de Everolimus (un análogo de Rapamicina) y Exemestano (inhibidor de aromatasas) aumenta la supervivencia libre de progresión (Reardon et al., 2012). La Rapamicina y sus análogos como Temsirolimus (carcinoma renal) y Everolimus (astrocitoma células gigantes) han sido aprobados por la FDA para distintos tipos de cáncer y están en ensayos clínicos en los tipos de cáncer estudiados (Meng and Zheng, 2015), por lo que su implementación en la clínica podría ser factible a corto o medio plazo.

En cuanto a **PML**, hemos estudiado su nivel de ARNm en la cohorte de HUD, sin obtener resultados significativos en relación con la supervivencia. Estos resultados podrían deberse a que la estratificación en base a la expresión de *PML* a nivel de ARNm puede no ser la forma más óptima de clasificar a estos pacientes, ya que en un estudio previo se observó que todos los tumores analizados de colon, pulmón, próstata, mama y SNC, entre otros, presentaban elevada expresión de *PML* a nivel de ARNm (Gurrieri et al., 2004). En cuanto a nivel de proteína, en nuestro caso no hemos estudiado su expresión en la cohorte de HUD y en el análisis de USB no hemos observado diferencias en relación a la supervivencia, puede que debido a que el número de muestras es limitante (n=20). Sin embargo, sí hemos observado que el patrón de inmunorreactividad de PML muestra una asociación con el nivel de expresión de SOX9 tanto en GBM (cohorte USB) como en cáncer

de mama (cohorte Carracedo 2012 y cohorte de Marsella). En ambos casos el patrón de estratificación de PML ha sido basado en una escala del 0-3 en base a la cuantificación de la tinción de puntos nucleares (PML 0 = ausencia de tinción; PML 1= ~1 -10%; PML 2 =~10-30%; PML 3= \geq 30%) (Carracedo et al., 2012). Además de esta asociación en cuanto a la expresión proteica, hemos demostrado la utilidad de esta misma estratificación de la expresión de PML en pacientes de cáncer de mama demostrando que los pacientes cuyas muestras presentan niveles más elevados de PML se asocian con un peor pronóstico implicando diseminación metastásica (Martín-Martín et al., 2016).

Hemos aplicado la terapia dirigida a la inhibición de PML mediante ATO (trióxido de arsénico). Este compuesto está disponible de forma inyectable con el nombre de Trisenox, tiene un largo historial en la práctica clínica con efectos secundarios mínimos (Au and Kwong, 2008) y está aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con LPA (leucemia promielocítica aguda) que han recurrido o que no responden al tratamiento estándar (Antman, 2001). Es interesante destacar que ATO está actualmente en ensayos clínicos en fase II en pacientes con gliomas malignos en combinación con TMZ y radioterapia (NCT00275067).

En concreto nosotros hemos determinado los efectos del tratamiento con ATO en las CMT en GBM y cáncer de mama. Hemos demostrado que además de reducir la proliferación y el crecimiento de las células tumorales, reduce las características asociadas a las CMT: la capacidad de auto-renovación y la capacidad de iniciación tumoral *in vivo*, hechos que muestran la relevancia de este fármaco contra las CMT. Estos resultados están en concordancia con los de otros grupos donde han comprobado el efecto de ATO en la inhibición del crecimiento tumoral mediante la degradación de PML en GBM (Zhou et al., 2015). Nosotros además hemos confirmado que ATO además de la expresión de PML, también reduce los niveles de expresión de SOX9 (no hemos estudiado el efecto sobre STAT3). El efecto de ATO sobre las CMT también ha sido estudiado en otros tipos de cáncer como el cáncer de hígado, en el que se ha demostrado que ATO reduce la viabilidad de las CMT e incrementa la sensibilidad de las células al agente quimioterápico Pirarubicina, reduciendo la expresión de PML y la tumorigenicidad en modelos animales

(Tang 2016). ATO, además de su efecto en las CMT, independientemente de su efecto sobre PML, facilita la inducción de apoptosis, inhibición de proliferación, inhibición de angiogénesis y promueve la diferenciación celular mediante sus efectos en otras vías moleculares (Lengfelder et al., 2012; Miller et al., 2002), por lo que presenta potencial a múltiples niveles.

Por otro lado, en cuanto al uso de ATO en función de una estratificación de los pacientes, hemos demostrado que las líneas celulares con niveles de PML más elevados son las que mejor responden al tratamiento dirigido a esta proteína con ATO (Martín-Martín et al., 2016). Este fenómeno implica que las células con mayor expresión de PML son más dependientes de PML, y se conoce como *adicción oncogénica* (Weinstein and Joe, 2008). Estos hechos indican que esos pacientes cuyos tumores expresan alto nivel de PML son los que mejor podrían beneficiarse de la terapia dirigida a la inhibición de PML. En cambio, en GBM hemos observado que las células de glioma con niveles de expresión de SOX9 y PML más elevados son más resistentes al tratamiento con ATO, hecho que nos indica que en este tumor no se produce el fenómeno de *adicción oncogénica* a diferencia del cáncer de mama.

En cuanto a la estratificación en base a **STAT3**, nosotros no hemos estudiado su expresión a nivel de ARNm, pero sí hemos hecho una estratificación a nivel de proteína en base al número de células positivas (p-STAT3 0 = ausencia de tinción; p-STAT3 1= ~1 % -30 %; p-STAT3 2 = ~30-60 %; p-STAT3 3= ≥60 %) en nuestras cohortes de pacientes de GBM y mama. En este caso no hemos observado una asociación directa con la supervivencia, puede que por el número de muestras limitante en el caso de GBM (USB n=20) o tal vez por haber establecido un patrón de estratificación poco apropiado. Sin embargo, hemos observado una correlación entre la expresión de p-STAT3 y la de SOX9 y PML en ambos tumores, proteínas que sí hemos asociado con peor pronóstico en GBM y mama, respectivamente. Reforzando estos datos, otros trabajos han cuantificado la expresión de p-STAT3 a nivel de proteína en GBM en base al número de células positivas de acuerdo a la siguiente escala (ausencia; bajo: <5%; alto: <5-20%>; muy alto: ≥20%) y han observado que la elevada expresión se asocia a peor pronóstico (Birner et al., 2010). Resultados

similares se han obtenido también en otros tumores. En pacientes de cáncer de colon han asociado elevada expresión de p-STAT3 (por cuantificación histométrica) con mal pronóstico, asociándolo a una respuesta inflamatoria sistémica (Park et al., 2016). En cáncer de próstata también han asociado la elevada activación de STAT3 con tumores malignos, realizando la estratificación en tres niveles de tinción nuclear comparativos con la expresión en líneas celulares establecidas (Mora et al., 2002).

STAT3 es muy necesario en funciones de células no tumorales y su inhibición no específica en células no tumorales podría tener efectos secundarios en el paciente. Sin embargo, aunque la inactivación del gen resulte en letalidad embrionaria (Takeda et al., 1997) a muchos tejidos adultos normales no les afecta en su totalidad la pérdida de STAT3 (Sano et al., 1999; Schlessinger and Levy, 2005). Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que la reducción de la expresión de STAT3 o su inhibición con otros fármacos como el inhibidor LLL3 (análogo de STA-21) o el inhibidor AG490 de su regulador JAK2, en GBM, o Curcumina en cáncer de pulmón, reducen el crecimiento tumoral, presentándolo como una diana potencial para el tratamiento del cáncer (Fuh et al., 2009; Senft et al., 2011; Yang et al., 2012).

En este trabajo hemos demostrado los efectos mediante inhibición farmacológica de STAT3 con el inhibidor STX-0119 en GSC, observando que disminuye la proliferación y capacidad de auto-renovación en GBM. La eficacia de este inhibidor se había observado previamente en líneas derivadas de pacientes de GBM, en las que redujo el crecimiento tumoral (Ashizawa et al., 2013). Es importante comentar que actualmente también se están llevando a cabo ensayos clínicos de fase I con WP1066, una molécula diseñada para dirigirse a la vía de STAT3 en cáncer. Se está aplicando en pacientes con gliomas malignos recurrentes como GBM y gliomas anaplásicos o metástasis cerebrales a partir de melanoma (NCT01904123).

También lo hemos comprobado en cáncer de mama mediante la inhibición farmacológica de STAT3 con el inhibidor TG101348 el cual también reduce las características de las CMT en este tumor, reduciendo su proliferación y capacidad de auto-renovación. Nuestros datos de la eficacia de la inhibición de STAT3 se ven reforzados con

otros estudios realizados en CMT en los que han mostrado que el inhibidor de STAT3 Stattic sensibiliza a las GSC a la TMZ (Villalva et al., 2011) y que Shikonin, un componente de la dieta que inhibe a STAT3 y a miembros de otras vías, resulta en la reducción del potencial tumorigénico y metastásico en cáncer de mama (Thakur et al., 2015).

Los estudios y propuestas discutidas subrayan el potencial de las terapias dirigidas específicamente contra las CMT. Sin embargo, la erradicación total de los tumores exige la complementación con agentes dirigidos frente al resto de células del tumor. En este sentido, hemos mostrado estrategias combinatorias de Rapamicina y TMZ en el caso de GBM (Garros-regulez et al., 2016). Destacando la eficacia de la estrategia combinatoria, hay varios ensayos clínicos que muestran que ATO tiene un efecto sinérgico con la radioterapia (Lew et al., 2002). La terapia combinada dirigida a CMT y al grueso del tumor también se ha estudiado en cáncer de mama donde se ha observado que el agente antimicrobiano Salinomycin, que ha demostrado efectividad contra las CMT, en combinación con la quimioterapia convencional de Paclitaxel, supone una mejora en la reducción de los tumores (Wang et al., 2016).

Por lo tanto, las terapias combinadas junto con una mayor personalización del tratamiento en función de la caracterización molecular de los tumores podrían mejorar la efectividad de los tratamientos. En este sentido, en el presente trabajo proponemos la estratificación molecular de los pacientes de GBM y cáncer de mama en base a la expresión de SOX9, STAT3 y/o PML, los cuales presentamos como biomarcadores y reguladores de la actividad de las CMT, y también como dianas moleculares en esta población celular, responsable de la resistencia a las terapias, de la recurrencia y la diseminación metastásica. La estrategia planteada en esta propuesta podría tener impacto en otros tipos de cáncer como el cáncer colorrectal (Matheu et al., 2012), el cáncer gástrico (Hajimoradi et al., 2016; Santos et al., 2016), la leucemia mieloide crónica (Zhou and Bao, 2014) o el carcinoma hepatocelular (Ghoshal et al., 2016), en los cuales se ha descrito la relevancia de SOX9, STAT3 y/o PML en la regulación de las CMT.

El uso de estos marcadores como dianas moleculares en los subgrupos de pacientes con elevada expresión de los mismos, junto con terapias estándar dirigidas al grueso del tumor podría suponer una mejora en el control de la enfermedad y en el pronóstico de los pacientes con cáncer.

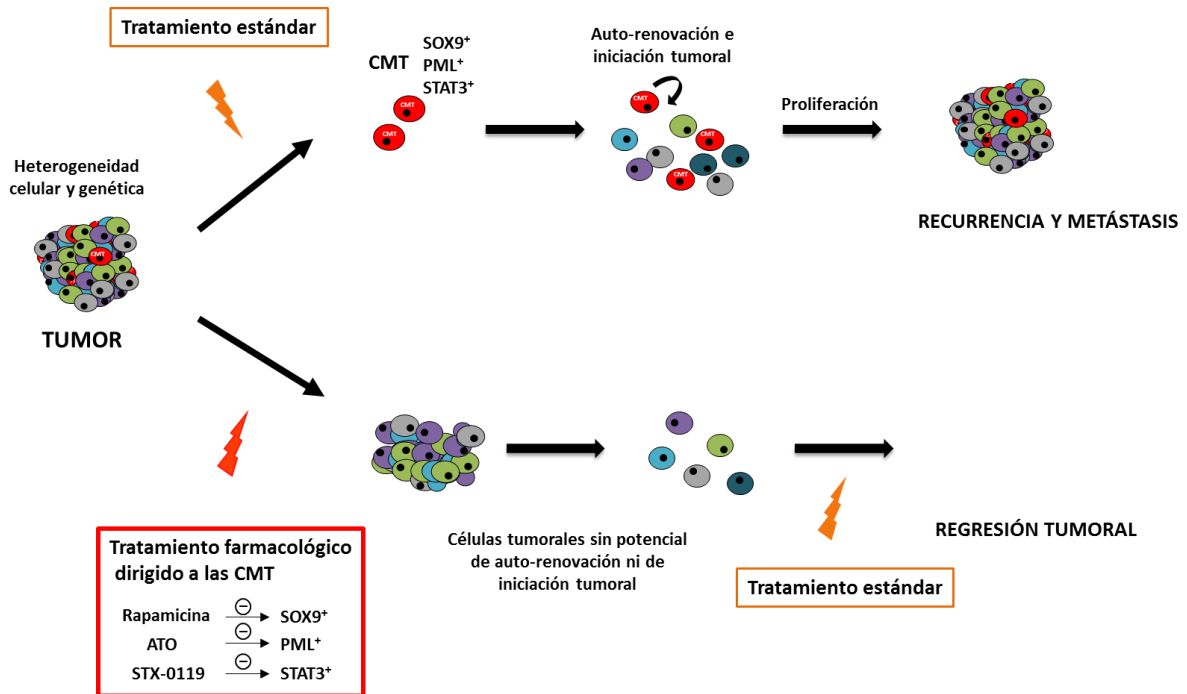


Figura 46. El eje SOX9-PML-STAT3 es crítico para el mantenimiento de las CMT. Las terapias dirigidas a esas CMT, que expresan niveles elevados de esos marcadores, junto con la terapia estándar dirigida al resto de células tumorales evitarían la recurrencia y la metástasis tumoral.

CONCLUSIONES

1. SOX9 es un factor de transcripción que se encuentra sobre-expresado en muestras tumorales de pacientes de glioblastoma y su alta expresión correlaciona con peor supervivencia de los pacientes.
2. La elevada expresión de SOX9 se asocia con el estado indiferenciado de las células madre tumorales en glioblastoma y confiere resistencia al tratamiento con Temozolomida.
3. La actividad de SOX9 regula la capacidad proliferativa y las características de células madre de las células tumorales de mama y glioblastoma.
4. STAT3 y PML son mediadores de la actividad de SOX9 en las células madre tumorales.
5. SOX9, STAT3 y PML conforman una vía de señalización reguladora de células madre tumorales en la que existen distintos bucles regulatorios entre los miembros de la vía.
6. Mecánicamente, PML regula de forma directa la transcripción de SOX9 en cáncer de mama y glioblastoma.
7. La correlación de la expresión de SOX9 con la de PML y STAT3 en muestras clínicas tumorales de pacientes con cáncer de mama y glioblastoma confirma la existencia y el impacto traslacional de la vía reguladora de células madre tumorales SOX9-STAT3-PML.
8. A nivel farmacológico, la regulación negativa de SOX9 con Rapamicina, la de PML con Trióxido de Arsénico y la inhibición de STAT3 con STX-0119, individualmente, reducen la capacidad de auto-renovación y la tumorigénesis en glioblastoma y cáncer de mama.
9. El tratamiento con Rapamicina, STX-0119 o Trióxido de Arsénico de acuerdo a una estratificación de los pacientes en base a la expresión de SOX9, STAT3 y PML, respectivamente, podría constituir una novedosa estrategia terapéutica efectiva frente a las células madre tumorales en cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, B.K., Fritz, P., McClellan, M., Hauptvogel, P., Athelougou, M., and Brauch, H. (2005). Prevalence of CD44⁺/CD24^{-/low} cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin. Cancer Res.* *11*, 1154–1159.

Acanda de la Rocha, A.M., Sampron, N., Alonso, M.M., and Matheu, A. (2014). Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res* *4*, 312–324.

Adam, R.C., Yang, H., Rockowitz, S., Larsen, S.B., Nikolova, M., Oristian, D.S., Polak, L., Kadaja, M., Asare, A., Zheng, D., et al. (2015). Pioneer factors govern super-enhancer dynamics in stem cell plasticity and lineage choice. *Nature* *521*, 366–370.

Ajani, J.A., Song, S., Hochster, H.S., and Steinberg, I.B. (2015). Cancer stem cells: The promise and the potential. *Semin. Oncol.* *42*, S3–S17.

Akan, P., Alexeyenko, A., Costea, P.I., Hedberg, L., Solnestam, B.W., Lundin, S., Hällman, J., Lundberg, E., Uhlén, M., and Lundeberg, J. (2012). Comprehensive analysis of the genome transcriptome and proteome landscapes of three tumor cell lines. *Genome Med.* *4*, 86.

Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S. (2009). Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* *11*, R46.

Al-Hajj, M., and Clarke, M.F. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* *23*, 7274–7282.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3983–3988.

Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L.F. (2009). Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell* *15*, 45–56.

An, Y., and Ongkeko, W.M. (2009). ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *5*, 1529–1542.

Antman, K.H. (2001). Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *Oncologist* *6 Suppl 2*, 1–2.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* *118*, 149–161.

Ashizawa, T., Miyata, H., Iizuka, A., Komiyama, M., Oshita, C., Kume, A., Nogami, M., Yagoto, M., Ito, I., Oishi, T., et al. (2013). Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. *Int. J. Oncol.* *43*, 219–227.

Ashkenazi, S., Ortenberg, R., Besser, M., Schachter, J., and Markel, G. (2016). SOX9 indirectly regulates CEACAM1 expression and immune resistance in melanoma cells. *Oncotarget* *5*.

Askanazy, M. Die Teratome nach ihrem Bau, ihrem Verlauf, ihrer Genese und im Vergleich zum experimentellen Teratoid. *Verhandl. Deutsch. Pathol.* *11*, 39–82 (1907).

Asiedu, M.K., Beauchamp-Perez, F.D., Ingle, J.N., Behrens, M.D., Radisky, D.C., and Knutson, K.L. (2014). AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene* *33*, 1316–1324.

Atena, M., Reza, A.M., and Mehran, G. (2014). A Review on the Biology of Cancer Stem Cells. *Stem Cell Discov.* *4*, 83–89.

Au, W.-Y., and Kwong, Y.-L. (2008). Arsenic trioxide: safety issues and their management. *Acta Pharmacol. Sin.* *29*, 296–304.

Auffinger, B., Tobias, A.L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Lesniak, M.S., and Ahmed, A.U. (2014). Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ.* *21*, 1119–1131.

Bachoo, R.M., Maher, E.A., Ligon, K.L., Sharpless, N.E., Chan, S.S., You, M.J., Tang, Y., DeFrances, J., Stover, E., Weissleder, R., et al. (2002). Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: Convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* *1*, 269–277.

Balko, J.M., Giltane, J.M., Wang, K., Schwarz, L.J., Young, C.D., Cook, R.S., Owens, P., Sanders, M.E., Kuba, M.G., Sánchez, V., et al. (2014). Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov.* *4*, 232–245.

- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* *444*, 756–760.
- Behnan, J., Stangeland, B., Hosainey, S.A.M., Joel, M., Olsen, T.K., Micci, F., Glover, J.C., Isakson, P., and Brinchmann, J.E. (2016). Differential propagation of stroma and cancer stem cells dictates tumorigenesis and multipotency. *Oncogene* 1–15.
- Bernard, P., and Harley, V.R. (2010). Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 400–410.
- Bhat, K.P.L., Balasubramanian, V., Vaillant, B., Ezhilarasan, R., Hummelink, K., Hollingsworth, F., Wani, K., Heathcock, L., James, J.D., Goodman, L.D., et al. (2013). Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- κ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. *Cancer Cell* *24*, 331–346.
- Bianchini, G., Balko, J.M., Mayer, I.A., Sanders, M.E., and Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *13*, 674–690.
- Birner, P., Toumangelova-Uzeir, K., Natchev, S., and Guentchev, M. (2010). STAT3 tyrosine phosphorylation influences survival in glioblastoma. *J. Neurooncol.* *100*, 339–343.
- Blanpain, C. (2013). Tracing the cellular origin of cancer. *Nat. Cell Biol.* *15*, 126–134.
- Blanpain, C., and Fuchs, E. (2014). HHS Public Access. *Science* (80-.). 344.
- Blanpain, C., Lowry, W.E., Geoghegan, A., Polak, L., and Fuchs, E. (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* *118*, 635–648.
- Bleau, A.M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W., and Holland, E.C. (2009). PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell* *4*, 226–235.
- Boisvert, F.M., Hendzel, M.J., and Bazett-Jones, D.P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J. Cell Biol.* *148*, 283–292.

Bonavia, R., Inda, M.D.M., Cavenee, W.K., and Furnari, F.B. (2011). Heterogeneity maintenance in glioblastoma: A social network. *Cancer Res.* *71*, 4055–4060.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* *3*, 730–737.

Borah, A., Raveendran, S., Rochani, A., Maekawa, T., and Kumar, D.S. (2015). Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis* *4*, e177.

Borovski, T., De Sousa E Melo, F., Vermeulen, L., and Medema, J.P. (2011). Cancer stem cell niche: The place to be. *Cancer Res.* *71*, 634–639.

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* *155*, 462–477.

Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *J. Clin. Invest.* *109*, 1139–1142.

Brooks, M.D., Burness, M.L., and Wicha, M.S. (2015). Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell* *17*, 260–271.

Buchert, M., Burns, C.J., and Ernst, M. (2015). Targeting JAK kinase in solid tumors: emerging opportunities and challenges. *Oncogene* *35*, 1–13.

Burrell, R. a, McGranahan, N., Bartek, J., and Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* *501*, 338–345.

Calgani, A., Vignaroli, G., Zamperini, C., Coniglio, F., Festuccia, C., Di Cesare, E., Gravina, G.L., Mattei, C., Vitale, F., Schenone, S., et al. (2016). Suppression of SRC signaling is effective in reducing synergy between glioblastoma and stromal cells. *Mol. Cancer Ther.*

Cancer Genome Atlas Network, Muzny, D.M., Bainbridge, M.N., Chang, K., Dinh, H.H., Drummond, J. a., Fowler, G., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Morgan, M.B., et al. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* *487*, 330–337.

Cantone, I., and Fisher, A.G. (2013). Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat. Structural Mol. Biol.* *20*, 282–289.

Capper, D., Gaiser, T., Hartmann, C., Habel, A., Mueller, W., Herold-Mende, C., von Deimling, A., and Siegelin, M.D. (2009). Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation. *Acta Neuropathol.* *117*, 445–456.

Cardoso, F., Harbeck, N., Fallowfield, L., Kyriakides, S., and Senkus, E. (2012). Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* *23*.

Carracedo, A., Weiss, D., Leliaert, A.K., Bhasin, M., De Boer, V.C.J., Laurent, G., Adams, A.C., Sundvall, M., Song, S.J., Ito, K., et al. (2012). A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *J. Clin. Invest.* *122*, 3088–3100.

Carrasco-Garcia, E., Sampron, N., Aldaz, P., Arrizabalaga, O., Villanua, J., Barrena, C., Ruiz, I., Arrazola, M., Lawrie, C., and Matheu, A. (2013). Therapeutic strategies targeting glioblastoma stem cells. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* *8*, 216–227.

Carrasco-Garcia, E., Lopez, L., Aldaz, P., Arevalo, S., Aldaregia, J., Egaña, L., Bujanda, L., Cheung, M., Sampron, N., Garcia, I., et al. (2016). SOX9-regulated cell plasticity in colorectal metastasis is attenuated by rapamycin. *Sci. Rep.* *6*, 32350.

Castillo, S.D., and Sanchez-Cespedes, M. (2012). The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin Ther Targets* *16*, 903–919.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J.L., Nuñez, G., et al. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* *10*, 105–115.

Chaffer, C.L., Brennan, J.P., Slavin, J.L., Blick, T., Thompson, E.W., and Williams, E.D. (2006). Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: Role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* *66*, 11271–11278.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., and Birnbaum, D. (2009). Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer* *9*, 202.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., Houvenaeghel, G., Extra, J.-M., Bertucci, F., Jacquemier, J., et al. (2010). Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *16*, 45–55.

Charpin, C., Tavassoli, F., Secq, V., Giusiano, S., Villeret, J., Garcia, S., Birnbaum, D., Bonnier, P., Lavaut, M.N., Boubli, L., et al. (2012). Validation of an immunohistochemical signature predictive of 8-year outcome for patients with breast carcinoma. *Int. J. Cancer* *131*.

Chen, J., McKay, R.M., and Parada, L.F. (2012). Malignant glioma: Lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* *149*, 36–47.

Cheng, L., Wu, Q., Huang, Z., Guryanova, O. a, Huang, Q., Shou, W., Rich, J.N., and Bao, S. (2011). L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *EMBO J.* *30*, 800–813.

Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., et al. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* *153*, 139–152.

Cheung, T.H., and Rando, T.A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 329–340.

Chuang, Y.-S., Huang, W.-H., Park, S.W., Persaud, S.D., Hung, C.-H., Ho, P.-C., and Wei, L.-N. (2011). Promyelocytic leukemia protein in retinoic acid-induced chromatin remodeling of Oct4 gene promoter. *Stem Cells* *29*, 660–669.

Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* *17*, 313–319.

Creighton, C.J., Li, X., Landis, M., Dixon, J.M., Neumeister, V.M., Sjolund, A., Rimm, D.L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J.I., et al. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 13820–13825.

Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., et al. (2012). Europe PMC Funders Group The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486, 346–352.

Dahan, P., Martinez Gala, J., Delmas, C., Monferran, S., Malric, L., Zentkowski, D., Lubrano, V., Toulas, C., Cohen-Jonathan Moyal, E., and Lemarie, A. (2014). Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis.* 5, e1543.

Dameshek, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6, 372–375 (1951).

Deng, S., Yang, X., Lassus, H., Liang, S., Kaur, S., Ye, Q., Li, C., Wang, L.P., Roby, K.F., Orsulic, S., et al. (2010). Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One* 5.

Di, C., and Zhao, Y. (2015). Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer (Review). *Exp. Ther. Med.* 9, 289–293.

Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793–4807.

Ding, L., Ellis, M.J., Li, S., Larson, D.E., Chen, K., Wallis, J.W., Harris, C.C., McLellan, M.D., Fulton, R.S., Fulton, L.L., et al. (2010). Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* 464, 999–1005.

Dollé, L., Boulter, L., Leclercq, I.A., and van Grunsven, L.A. (2015). Next generation of ALDH substrates and their potential to study maturational lineage biology in stem and progenitor cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 308, G573-8.

Du, C., Redner, R.L., Cooke, M.P., and Lavau, C. (1999). Overexpression of wild-type retinoic acid receptor alpha (RARalpha) recapitulates retinoic acid-sensitive transformation of primary myeloid progenitors by acute promyelocytic leukemia RARalpha-fusion genes. *Blood* 94, 793–802.

Eisenhardt, L., and Cushing, H. (1930). Diagnosis of Intracranial Tumors by Supravital Technique. *Am. J. Pathol.* 6, 541–552.7.

Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 38, 698–707.

Fang, X., Yoon, J.-G., Li, L., Yu, W., Shao, J., Hua, D., Zheng, S., Hood, L., Goodlett, D.R., Foltz, G., et al. (2011). The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis. *BMC Genomics* 12, 11.

Fillmore, C.M., Gupta, P.B., Rudnick, J.A., Caballero, S., Keller, P.J., Lander, E.S., and Kuperwasser, C. (2010). Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21737–21742.

Foster, J.W., Dominguez-Steglich, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D., Goodfellow, P.N., et al. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. 372, 525–530.

Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E.A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., Ellisman, M.H., Verma, I.M., Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., et al. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* 338, 1080–1084.

Fuh, B., Sobo, M., Cen, L., Josiah, D., Hutzen, B., Cisek, K., Bhasin, D., Regan, N., Lin, L., Chan, C., et al. (2009). LLL-3 inhibits STAT3 activity, suppresses glioblastoma cell growth and prolongs survival in a mouse glioblastoma model. *Br. J. Cancer* 100, 106–112.

Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., et al. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* 43, 34–41.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 64, 7011–7021.

Gao, J., Zhang, J.-Y., Li, Y.-H., 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, 10130–10138.

Garros-regulez, L., Aldaz, P., Arrizabalaga, O., Moncho-Amor, V., Carrasco-Garcia, E., Manterola, L., Moreno-Cugnon, L., Barrena, C., Villanua, J., Ruiz, I., et al. (2016). mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert Opin. Ther. Targets* 8222, 393–405.

- Ghoshal, S., Fuchs, B.C., and Tanabe, K.K. (2016). STAT3 is a key transcriptional regulator of cancer stem cell marker CD133 in HCC. *HepatoBiliary Surg Nutr* 5, 201–203.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567.
- Goddard, a D., Borrow, J., Freemont, P.S., and Solomon, E. (1991). Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* 254, 1371–1374.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 183, 1797–1806.
- Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313.
- Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., et al. (2006). Persistent activation of Stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 12, 11–19.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P.N., 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, 245–250.
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J.L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zürrer-Härdi, U., Bell, G., et al. (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* 148, 1015–1028.
- Gurrieri, C., Capodiecì, P., Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Nafa, K., Rush, L.J., Verbel, D.A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2004). Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 269–279.
- Hadjimichael, C., Chanoumidou, K., Papadopoulou, N., Arampatzi, P., Papamatheakis, J., and Kretsovali, A. (2015). Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J. Stem Cells* 7, 1150–1184.

Hajimoradi, M., Hassan, M., Ebrahimi, Z., et al. (2016). STAT3 is Overactivated in Gastric Cancer Stem-Like Cells Citation: STAT3 in GCSLCs. CELL JOURNAL(Yakhteh) Cell Journal(Yakhteh) CELL JOURNAL(Yakhteh) *17*, 617–628.

Hall, M.D., Murray, C.A., Valdez, M.J., and Perantoni, A.O. (2017). Mesoderm-specific Stat3 deletion affects expression of Sox9 yielding Sox9-dependent phenotypes. PLOS Genet. *13*, e1006610.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hata, T., Furukawa, T., Sunamura, M., Egawa, S., Motoi, F., Ohmura, N., Marumoto, T., Saya, H., and Horii, A. (2005). RNA interference targeting aurora kinase A suppresses tumor growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* *65*, 2899–2905.

Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H.I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15178–15183.

Henderson, I.C. (2013). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Breast Dis.* *24*, 76–78.

Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 715–725.

Higgins, M.J., and Baselga, J. (2011). Targeted therapies for breast cancer. *J. Clin. Invest.* *121*, 3797–3803.

Hiraoka, K., Hayashi, T., Kaneko, R., Nasu-Nishimura, Y., Koyama-Nasu, R., Kawasaki, Y., and Akiyama, T. (2015). SOX9-mediated upregulation of LGR5 is important for glioblastoma tumorigenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *460*, 216–221.

Holland, E.C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R.E., and Fuller, G.N. (2000). Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat. Genet.* 25, 55–57.

Hong, Y., Chen, W., Du, X., Ning, H., Chen, H., Shi, R., Lin, S., Xu, R., Zhu, J., Wu, S., et al. (2015). Upregulation of sex-determining region Y-box 9 (SOX9) promotes cell proliferation and tumorigenicity in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 9.

Hu, Y., and Smyth, G.K. (2009). ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J. Immunol. Methods* 347, 70–78.

Huang, E.H., Hynes, M.J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J.Z., Wicha, M.S., and Boman, B.M. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 3382–3389.

Hubackova, S., Krejčíková, K., Bartek, J., and Hodny, Z. (2012). Interleukin 6 signaling regulates promyelocytic leukemia protein gene expression in human normal and cancer cells. *J. Biol. Chem.* 287, 26702–26714.

Huse, J.T., and Holland, E.C. (2009). Genetically engineered mouse models of brain cancer and the promise of preclinical testing. In *Brain Pathology*, pp. 132–143.

Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193–206.

Inghirami, G., Chiarle, R., Simmons, W.J., Piva, R., Schlessinger, K., and Levy, D.E. (2005). New and old functions of STAT3: A pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle* 4, 1131–1133.

Ito, K., Bernardi, R., Morotti, A., Matsuoka, S., Ikeda, Y., Rosenblatt, J., Avigan, D.E., Teruya-feldstein, J., and Pandolfi, P.P. (2008). PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *453*, 1072–1078.

Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.H., et al. (2012). A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* *18*, 1350–1358.

Jackson, E.B., and Brues, A.M. (1941). Studies on a Transplantable Embryoma of the Mouse. *Cancer Res.* *1*, 494–498.

Jayson, G.C., Kerbel, R., Ellis, L.M., and Harris, A.L. (2016). Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet* *388*, 518–529.

Jiang, S.S., Fang, W.T., Hou, Y.H., Huang, S.F., Yen, B.L., Chang, J.L., Li, S.M., Liu, H.P., Liu, Y.L., Huang, C.T., et al. (2010). Upregulation of SOX9 in lung adenocarcinoma and its involvement in the regulation of cell growth and tumorigenicity. *Clin. Cancer Res.* *16*, 4363–4373.

Jin, F., Zhao, L., Zhao, H.Y., Guo, S.G., Feng, J., Jiang, X.B., Zhang, S.L., Wei, Y.J., Fu, R., and Zhao, J.S. (2008). Comparison between cells and cancer stem-like cells isolated from glioblastoma and astrocytoma on expression of anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes. *Neuroscience* *154*, 541–550.

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

Jones, R.J., Collector, M.I., Barber, J.P., Vala, M.S., Fackler, M.J., May, W.S., Griffin, C. a, Hawkins, a L., Zehnbauer, B. a, Hilton, J., et al. (1996). Characterization of mouse lymphohematopoietic stem cells lacking spleen colony-forming activity. *Blood* *88*, 487–491.

Kakizuka, A., Miller, W.H., Umesono, K., Warrell, R.P., Frankel, S.R., Murty, V.V.V.S., Dmitrovsky, E., and Evans, R.M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR?? with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* *66*, 663–674.

Kamachi, Y., and Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* *140*, 4129–4144.

Karamboulas, C., and Ailles, L. (2013). Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 2481–2495.

King, H.O., Brend, T., Payne, H.L., Wright, A., Ward, T.A., Patel, K., Egnuni, T., Stead, L.F., Patel, A., Wurdak, H., et al. (2017). RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells. *Stem Cell Reports* 8, 125–139.

Klijn, C., Durinck, S., Stawiski, E.W., Haverty, P.M., Jiang, Z., Liu, H., Degenhardt, J., Mayba, O., Gnad, F., Liu, J., et al. (2014). A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nat. Biotechnol.* 33, 306–312.

Kondoh, H., and Kamachi, Y. (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 391–399.

Kopp, J.L., von Figura, G., Mayes, E., Liu, F.F., Dubois, C.L., Morris, J.P., Pan, F.C., Akiyama, H., Wright, C.V.E., Jensen, K., et al. (2012). Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 22, 737–750.

Korkaya, H., and Wicha, M.S. (2013). HER2 and breast cancer stem cells: More than meets the eye. *Cancer Res.* 73, 3489–3493.

Korpala, M., Ell, B.J., Buffa, F.M., Ibrahim, T., Blanco, M.A., Celia-Terrassa, T., Mercatali, L., Khan, Z., Goodarzi, H., Hua, Y., et al. (2011). Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat. Med.* 17, 1101-U108.

Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mulé, J., Kerr, W.G., et al. (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat. Med.* 11, 1314–1321.

Kwon, C.H., Zhao, D., Chen, J., Alcantara, S., Li, Y., Burns, D.K., Mason, R.P., Lee, E.Y.H.P., Wu, H., and Parada, L.F. (2008). Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer Res.* 68, 3286–3294.

Lallemant-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., and de The, H. (2008). Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10, 547–555.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. a, and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648.

Larsimont, J.C., Youssef, K.K., Sánchez-Danés, A., Sukumaran, V., Defrance, M., Delatte, B., Liagre, M., Baatsen, P., Marine, J.C., Lippens, S., et al. (2015). Sox9 Controls Self-Renewal of Oncogene Targeted Cells and Links Tumor Initiation and Invasion. *Cell Stem Cell* 17, 60–73.

Lee, G., Auffinger, B., Guo, D., Hasan, T., Deheeger, M., Tobias, A.L., Kim, J.Y., Atashi, F., Zhang, L., Lesniak, M.S., et al. (2016). Dedifferentiation of Glioma Cells to Glioma Stem-like Cells By Therapeutic Stress-induced HIF Signaling in the Recurrent GBM Model. *Mol. Cancer Ther.* 15, 3064–3076.

Lee, J.S., Gil, J.E., Kim, J.H., Kim, T.K., Jin, X., Oh, S.Y., Sohn, Y.W., Jeon, H.M., Park, H.J., Park, J.W., et al. (2007). Brain cancer stem-like cell genesis from p53-deficient mouse astrocytes by oncogenic Ras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 496–502.

Leemhuis, T., Yoder, M.C., Grigsby, S., Agüero, B., Eder, P., and Srour, E.F. (1996). Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp Hematol* 24, 1215–1224.

Lei, B., Zhang, Y., Liu, T., Li, Y., and Pang, D. (2016). Sox9 upregulation in breast cancer is correlated with poor prognosis and the CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype. *Int J Clin Exp Pathol* 9, 7345–7351.

Lengfelder, E., Hofmann, W.-K., and Nowak, D. (2012). Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 26, 433–442.

Leong, P.L., Andrews, G. a, Johnson, D.E., Dyer, K.F., Xi, S., Mai, J.C., Robbins, P.D., Gadiparthi, S., Burke, N. a, Watkins, S.F., et al. (2003). Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4138–4143.

Levy, D.E., and Lee, C.K. (2002). What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* 109, 1143–1148.

Lew, Y.S., Kolozsvary, A., Brown, S.L., and Kim, J.H. (2002). Synergistic interaction with arsenic trioxide and fractionated radiation in locally advanced murine tumor. *Cancer Res.* 62, 4202–4205.

- Li, F., Tiede, B., Massagué, J., and Kang, Y. (2007). Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* *17*, 3–14.
- Li, Q., Rycaj, K., Chen, X., and Tang, D.G. (2015a). Cancer stem cells and cell size: A causal link? *Semin. Cancer Biol.* *35*, 191–199.
- Li, X.L., Chen, X.Q., Zhang, M.N., Chen, N., Nie, L., Xu, M., Gong, J., Shen, P.F., Su, Z.Z., Weng, X., et al. (2015b). SOX9 was involved in TKIs resistance in renal cell carcinoma via Raf/MEK/ERK signaling pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *8*, 3871–3881.
- Ling, S., Chang, X., Schultz, L., Lee, T.K., Cahux, A., Marchionni, L., Netto, G.J., Sidransky, D., and Berman, D.M. (2011). An EGFR-ERK-SOX9 signaling cascade Links Urothelial Development and Regeneration to Cancer. *71*, 3812–3821.
- Liu, A., Yu, X., and Liu, S. (2013). Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: Small genes make a big difference. *Chin. J. Cancer* *32*, 483–487.
- Liu, C., Liu, L., Chen, X., Cheng, J., Zhang, H., Shen, J., Shan, J., Xu, Y., Yang, Z., Lai, M., et al. (2016). Sox9 regulates self-renewal and tumorigenicity by promoting symmetrical cell division of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *64*, 117–129.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* *5*, 67.
- Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., Martin-Trevino, R., Shang, L., McDermott, S.P., Landis, M.D., et al. (2014). Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports* *2*, 78–91.
- Lobo, N. a, Shimono, Y., Qian, D., and Clarke, M.F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 675–699.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* *114*, 97–109.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131, 803–820.

Luo, J., Yin, X., Mat, T., and Lu, J. (2010). Stem cells in normal mammary gland and breast cancer. *Am J Med Sci.* 339, 336–70.

Lyons, J.G., Lobo, E., Martorana, A.M., and Myerscough, M.R. (2008). Clonal diversity in carcinomas: Its implications for tumour progression and the contribution made to it by epithelial-mesenchymal transitions. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 665–677.

Malki, S., Boizet-Bonhoure, B., and Poulat, F. (2010). Shuttling of SOX proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 411–416.

Malladi, S., MacAlinao, D.G., Jin, X., He, L., Basnet, H., Zou, Y., De Stanchina, E., and Massagué, J. (2016). Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* 165, 45–60.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133, 704–715.

Mantovani, A., Mantovani, A., Allavena, P., Allavena, P., Sica, A., Sica, A., Balkwill, F., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.

Mao, P., Joshi, K., Li, J., Kim, S.H., Li, P., Santana-Santos, L., Luthra, S., Chandran, U.R., Benos, P. V, Smith, L., et al. (2013). Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8644–8649.

Marcato, P., Dean, C.A., Da, P., Araslanova, R., Gillis, M., Joshi, M., Helyer, L., Pan, L., Leidal, A., Gujar, S., et al. (2011). Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells* 29, 32–45.

Martín-Martín, N., Piva, M., Urosevic, J., Aldaz, P., Sutherland, J.D., Fernández-Ruiz, S., Arreal, L., Torrano, V., Cortazar, A.R., Planet, E., et al. (2016). Stratification and therapeutic potential of PML in metastatic breast cancer. *Nat. Commun.* 7, 12595.

Marusyk, A., and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1805, 105–117.

Marusyk, A., Almendro, V., and Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* 12, 323–334.

Matheu, A., Collado, M., Wise, C., Manterola, L., Cekaite, L., Tye, A.J., Canamero, M., Bujanda, L., Schedl, A., Cheah, K.S.E., et al. (2012). Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Res.* 72, 1301–1315.

May, C.D., Sphyris, N., Evans, K.W., Werden, S.J., Guo, W., and Mani, S.A. (2011). Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 13, 202.

Medema, J.P. (2013). Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat. Cell Biol.* 15, 338–344.

Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.K., Wen, P.Y., and Olson, J.J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA. Cancer J. Clin.* 60, 166–193.

Meng, L.-H., and Zheng, X.S. (2015). Toward rapamycin analog (rapalog)-based precision cancer therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 1163–1169.

Miller, W.H., Schipper, H.M., Lee, J.S., Singer, J., and Waxman, S. (2002). Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res.* 62, 3893–3903.

Moon, J.H., Kwon, S., Jun, E.K., Kim, A., Whang, K.Y., Kim, H., Oh, S., Yoon, B.S., and You, S. (2011). Nanog-induced dedifferentiation of p53-deficient mouse astrocytes into brain cancer stem-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 175–181.

Mora, L.B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., et al. (2002). Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: Direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 62, 6659–6666.

Morales, M., Arenas, E.J., Urosevic, J., Guiu, M., Fernández, E., Planet, E., Fenwick, R.B., Fernández-Ruiz, S., Salvatella, X., Reverter, D., et al. (2014). RARRES3 suppresses breast cancer lung metastasis by regulating adhesion and differentiation. *EMBO Mol. Med.* 6, 1–17.

Morokoff, A., Ng, W., Gogos, A., and Kaye, A. (2015). Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J. Clin. Neurosci.* 22, 1219–1226.

Munz, M., Baeuerle, P.A., and Gires, O. (2009). The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 69, 5627–5629.

Nakano, I. (2015). Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target. *J. Neurosurg.* 122, 324–330.

Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P., and Eaves, C.J. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat. Rev. Cancer* 12, 133–143.

Nieto, M A., Huang, R.Y.J., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* (80). 194, 23–28.

O’Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 111–115.

Ocaña, O.H., Córcoles, R., Fabra, Á., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., and Nieto, M.A. (2012). Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell* 22, 709–724.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 19, 764–772.

Oosterveen, T., Kurdija, S., Alekseenko, Z., Uhde, C.W., Bergsland, M., Sandberg, M., Andersson, E., Dias, J.M., Muhr, J., and Ericson, J. (2012). Mechanistic Differences in the Transcriptional Interpretation of Local and Long-Range Shh Morphogen Signaling. *Dev. Cell* 23, 1006–1019.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J. (2012). CBTRUS Statistical Report Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol* 14 (suppl 5, 1–57).

- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., et al. (2014). The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. *Neuro. Oncol.* *16*, 896–913.
- Pal, B., Chen, Y., Bert, A., Hu, Y., Sheridan, J.M., Beck, T., Shi, W., Satterley, K., Jamieson, P., Goodall, G.J., et al. (2015). Integration of microRNA signatures of distinct mammary epithelial cell types with their gene expression and epigenetic portraits. *Breast Cancer Res.* *17*, 85.
- Park, J.H., Mcmillan, D.C., Clark, J., Horgan, P.G., Roxburgh, C.S.D., and Edwards, J. (2016). Signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3), host inflammatory responses and survival of patients with colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* *34*.
- Parker, N.R., Khong, P., Parkinson, J.F., Howell, V.M., and Wheeler, H.R. (2015). Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. *Front. Oncol.* *5*, 55.
- Passeron, T., Valencia, J.C., Namiki, T., Vieira, W.D., Passeron, H., Miyamura, Y., and Hearing, V.J. (2009). Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *J. Clin. Invest.* *119*, 954–963.
- Pavlovic, M., Arnal-Estapé, A., Rojo, F., Bellmunt, A., Tarragona, M., Guiu, M., Planet, E., Garcia-Albéniz, X., Morales, M., Urosevic, J., et al. (2015). Enhanced MAF Oncogene Expression and Breast Cancer Bone Metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* *107*, djv256.
- Peitzsch, C., Kurth, I., Kunz-Schughart, L., Baumann, M., and Dubrovskaja, A. (2013). Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother. Oncol.* *108*, 378–387.
- Perez-Losada, J., and Balmain, A. (2003). Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 434–443.
- Perou, C.M. (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* *16 Suppl 1*, 61–70.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C. a, Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L. a, et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.
- Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M.,

Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173.

Pierce, G.B., and Speers, W.C. (1988). Tumors as Caricatures of the Process of Tissue Renewal: Prospects for Therapy by Directing Differentiation. *Cancer Res.* 48, 1996–2004.

Pierce, G.B., DIXON, F.J., and VERNEY, E.L. (1960). Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies. *Lab. Invest.* 9, 583–602.

Pio, R., Ajona, D., and Lambris, J.D. (2013). Complement inhibition: a promising concept for cancer treatment. *Semin. Immunol.* 25, 54–64.

Pollard, S.M., Yoshikawa, K., Clarke, I.D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., et al. (2009). Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Cell Stem Cell* 4, 568–580.

Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., and Ailles, L.E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 973–978.

Pritchett, J., Athwal, V., Roberts, N., Hanley, N.A., and Hanley, K.P. (2011). Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: Lessons from development. *Trends Mol. Med.* 17, 166–174.

Qiu, Z.K., Shen, D., Chen, Y.S., Yang, Q.Y., Guo, C.C., Feng, B.H., and Chen, Z.P. (2014). Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. *Chin. J. Cancer* 33, 115–122.

Rahaman, S.O., Harbor, P.C., Chernova, O., Barnett, G.H., Vogelbaum, M. a, and Haque, S.J. (2002). Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 21, 8404–8413.

Raz, R., Lee, C.K., Cannizzaro, L.A., d'Eustachio, P., and Levy, D.E. (1999). Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2846–2851.

- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.
- Reynolds, B. a, and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* (80-). 255, 1707–1710.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111–115.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Larocca, L.M., Lombardi, D.G., Signore, M., Pierconti, F., Petrucci, G., Montano, N., Maira, G., and De Maria, R. (2008). Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* 15, 1491–1498.
- Roche, K.C., Gracz, A.D., Liu, X.F., Newton, V., Akiyama, H., and Magness, S.T. (2015). SOX9 Maintains Reserve Stem Cells and Preserves Radioresistance in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology* 149, 1553–1563.e3.
- Ropolo, M., Daga, A., Griffiero, F., Foresta, M., Casartelli, G., Zunino, A., Poggi, A., Cappelli, E., Zona, G., Spaziante, R., et al. (2009). Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Mol. Cancer Res.* 7, 383–392.
- Rossi, S., Baili, P., Capocaccia, R., Caldora, M., Carrani, E., Minicozzi, P., Pierannunzio, D., Santaquilani, M., Trama, A., Allemani, C., et al. (2015). The EURO CARE-5 study on cancer survival in Europe 1999-2007: Database, quality checks and statistical analysis methods. *Eur. J. Cancer* 51, 2104–2119.
- Russo, J., and Russo, I.H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas* 49, 2–15.
- Safa, A.R., Saadatzadeh, M.R., Cohen-Gadol, A.A., Pollok, K.E., and Bijangi-Vishehsaraei, K. (2015). Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis.* 2, 152–163.
- Sano, S., Itami, S., Takeda, K., Tarutani, M., Yamaguchi, Y., Miura, H., Yoshikawa, K., Akira, S., and Takeda, J. (1999). Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J.* 18, 4657–4668.

Santos, J.C., Carrasco-Garcia, E., Garcia-Puga, M., Aldaz, P., Montes, M., Fernandez-Reyes, M., De Oliveira, C.C., Lawrie, C.H., Arauzo-Bravo, M.J., Ribeiro, M.L. and Matheu, A. (2016). SOX9 elevation acts with canonical WNT signaling to drive gastric cancer progression. *Cancer Res.* *76*, 6735–6746.

Sarkar, A., and Hochedlinger, K. (2013). The Sox Family of Transcription Factors: Versatile Regulators of Stem and Progenitor Cell Fate. *12*, 15–30.

Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., et al. (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* *451*, 345–349.

Schlessinger, K., and Levy, D.E. (2005). Malignant transformation but not normal cell growth depends on signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res.* *65*, 5828–5834.

Schlierf, B., Friedrich, R.P., Roerig, P., Felsberg, J., Reifenberger, G., and Wegner, M. (2007). Expression of SoxE and SoxD genes in human gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *33*, 621–630.

Schoenhals, M., Kassambara, A., De Vos, J., Hose, D., Moreaux, J., and Klein, B. (2009). Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *383*, 157–162.

Scott, C.E., Wynn, S.L., Sesay, A., Cruz, C., Cheung, M., Gaviro, M.-V.G., Booth, S., Gao, B., Cheah, K.S.E., Lovell-Badge, R., et al. (2010). SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nat. Neurosci.* *13*, 1181–1189.

Senft, C., Priester, M., Polacin, M., Schröder, K., Seifert, V., Kögel, D., and Weissenberger, J. (2011). Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* *101*, 393–403.

Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* *439*, 84–88.

Sherry, M.M., Reeves, A., Wu, J.K., and Cochran, B.H. (2009). STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells* *27*, 2383–2392.

Short, S.C., Giampieri, S., Worku, M., Alcaide-German, M., Sioftanos, G., Bourne, S., Lio, K.I., Shaked-Rabi, M., and Martindale, C. (2011). Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells. *Neuro. Oncol.* *13*, 487–499.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, a M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* *346*, 240–244.

Singer, E., Judkins, J., Salomonis, N., Matlaf, L., Soteropoulos, P., McAllister, S., and Soroceanu, L. (2015). Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma. *Cell Death Dis.* *6*, e1601.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* *63*, 5821–5828.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* *432*, 396–401.

Sinn, H.P., and Kreipe, H. (2013). A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care* *8*, 149–154.

Somarelli, J. a, Schaeffer, D., Marengo, M.S., Bepler, T., Rouse, D., Ware, K.E., Hish, a J., Zhao, Y., Buckley, a F., Epstein, J.I., et al. (2016). Distinct routes to metastasis: plasticity-dependent and plasticity-independent pathways. *Oncogene* *35*, 1–10.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10869–10874.

Sosa, M.S., Parikh, F., Maia, A.G., Estrada, Y., Bosch, A., Bragado, P., Ekpin, E., George, A., Zheng, Y., Lam, H.-M., et al. (2015). NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes. *Nat. Commun.* *6*, 6170.

Sotiriou, C., Neo, S.-Y.-Y., McShane, L.M., Korn, E.L., Long, P.M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S.B., Harris, A.L., and Liu, E.T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10393–10398.

Stine, R.R., and Matunis, E.L. (2013). JAK-STAT signaling in stem cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* *786*, 247–267.

Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* *439*, 993–997.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 987–996.

Stupp, R., Hegi, M.E., Gilbert, M.R., and Chakravarti, A. (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J. Clin. Oncol.* *25*, 4127–4136.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). 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.* *10*, 459–466.

Suvà, M.L. (2013). Epigenetic Reprogramming in Cancer Mario L. Suvà. *Nat. Med.* *1567*, 179–192.

Swartling, F., Ferletta, M., Kastemar, M., Weiss, W., and B, W. (2009). Cyclic GMP-dependent protein kinase II inhibits cell proliferation, Sox9 expression and Akt phosphorylation in human glioma cell lines. *Computer (Long. Beach. Calif).* *28*, 3121–3131.

Swartling, F.J., Savov, V., Persson, A.I., Chen, J., Hackett, C.S., Northcott, P.A., Grimmer, M.R., Lau, J., Chesler, L., Perry, A., et al. (2012). Distinct Neural Stem Cell Populations Give Rise to Disparate Brain Tumors in Response to N-MYC. *Cancer Cell* *21*, 601–613.

Tagscherer, K.E., Fassl, A., Campos, B., Farhadi, M., Kraemer, A., Böck, B.C., Macher-Goeppinger, S., Radlwimmer, B., Wiestler, O.D., Herold-Mende, C., et al. (2008). Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* *27*, 6646–6656.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.

Takebe, N., Miele, L., Harris, P.J., Jeong, W., Bando, H., Kahn, M., Yang, S.X., and Ivy, S.P. (2015). Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12, 445–464.

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3801–3804.

T.C.G.A. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Genomics* 455, 1061–1068.

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–117.

Thakur, R., Trivedi, R., Rastogi, N., Singh, M., and Mishra, D.P. (2015). Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load, tumorigenic potential and metastasis in breast cancer. *Sci. Rep.* 5, 10194.

de Thé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR?? fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675–684.

Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. *Cancer Cell* 22, 725–736.

Ulasov, I. V, 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, 103–112.

Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275–292.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010a). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant

Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., and Wilkerson, M. (2010b). NIH Public Access. *Cancer* 17, 98–110.

Vignot, S., Frampton, G.M., Soria, J.-C., Yelensky, R., Commo, F., Brambilla, C., Palmer, G., Moro-Sibilot, D., Ross, J.S., Cronin, M.T., et al. (2013). Next-generation sequencing reveals high concordance of recurrent somatic alterations between primary tumor and metastases from patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 31, 2167–2172.

Villalva, C., Martin-Lannerée, S., Cortes, U., Dkhissi, F., Wager, M., Le Corf, A., Tourani, J.M., Dusanter-Fourt, I., Turhan, A.G., and Karayan-Tapon, L. (2011). STAT3 is essential for the maintenance of neurosphere-initiating tumor cells in patients with glioblastomas: A potential for targeted therapy? *Int. J. Cancer* 128, 826–838.

Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314–322.

Wang, Q.-E. (2015). DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies. *World J. Biol. Chem.* 6, 57–64.

Wang, J., Shiels, C., Sasieni, P., Wu, P.J., Islam, S.A., Freemont, P.S., and Sheer, D. (2004). Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J. Cell Biol.* 164, 515–526.

Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med.* 206, 1457–1464.

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. *Med. Oncol.* 29, 3484–3490.

Wang, T., Narayanaswamy, R., Ren, H., and Torchilin, V.P. (2016). Combination therapy targeting both cancer stem-like cells and bulk tumor cells for improved efficacy of breast cancer treatment. *Cancer Biol. Ther.* 17, 698–707.

Weinstein, I.B., and Joe, A. (2008). Oncogene Addiction Oncogene Addiction Multistage Carcinogenesis and Oncogene Addiction. *Cancer Res* 6868.

Weller, M., Cloughesy, T., Perry, J.R., and Wick, W. (2013). Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma-are we there yet? *Neuro. Oncol.* *15*, 4–27.

WHO (2012). Globocan 2012 - Home. Globocan 2012.

Wirapati, P., Sotiriou, C., Kunkel, S., Farmer, P., Pradervand, S., Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Ignatiadis, M., Sengstag, T., Schütz, F., et al. (2008). Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* *10*, R65.

Yang, C.L., Liu, Y.Y., Ma, Y.G., Xue, Y.X., Liu, D.G., Ren, Y., Liu, X.B., Li, Y., and Li, Z. (2012). Curcumin blocks small cell lung cancer cells migration, invasion, angiogenesis, cell cycle and neoplasia through janus kinase-STAT3 signalling pathway. *PLoS One* *7*.

Yeh, Y.T., Ou-Yang, F., Chen, I.F., Yang, S.F., Wang, Y.Y., Chuang, H.Y., Su, J.H., Hou, M.F., and Yuan, S.S.F. (2006). STAT3 ser727 phosphorylation and its association with negative estrogen receptor status in breast infiltrating ductal carcinoma. *Int. J. Cancer* *118*, 2943–2947.

Yin, H., and Glass, J. (2011). The phenotypic radiation resistance of CD44 +/CD24 -or low breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. *PLoS One* *6*.

Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 798–809.

Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., and Yu, J.S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* *23*, 9392–9400.

Zhou, W., and Bao, S. (2014). PML-mediated signaling and its role in cancer stem cells. *Oncogene* *33*, 1475–1484.

Zhou, W., Cheng, L., Shi, Y., Ke, S.Q., Huang, Z., Fang, X., Chu, C.W., Xie, Q., Bian, X.W., Rich, J.N., et al. (2015). Arsenic trioxide disrupts glioma stem cells via promoting PML degradation to inhibit tumor growth. *Oncotarget* *6*, 37300–37315.

Zhu, Y., Guignard, F., Zhao, D., Liu, L., Burns, D.K., Mason, R.P., Messing, A., and Parada, L.F. (2005). Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell* *8*, 119–130.

ANEXO I

Publicaciones relacionadas con la tesis



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>



© 2016 The Author(s). Published by Taylor & Francis.



[View supplementary material](#)



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



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 782



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)



Citing articles: 6 [View citing articles](#)

ORIGINAL RESEARCH

 OPEN ACCESS

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](#).

© 2016 The Author(s). Published by Taylor & Francis.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

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 *pWPKL-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 cyclophosphamide 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.

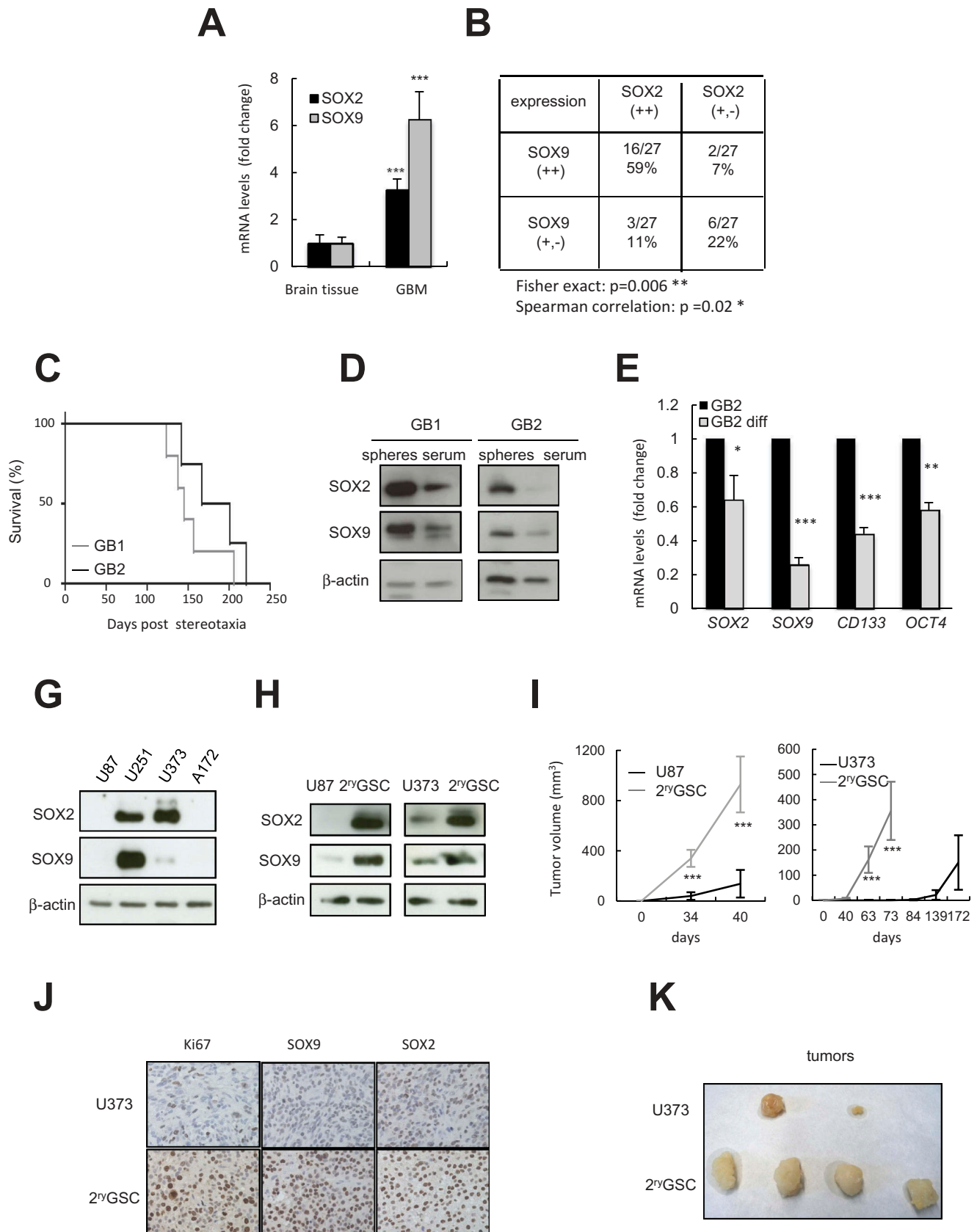


Figure 1. SOX2 and SOX9 are co-expressed in human glioblastoma samples, GSC and glioma cell lines.

(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 cell 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.

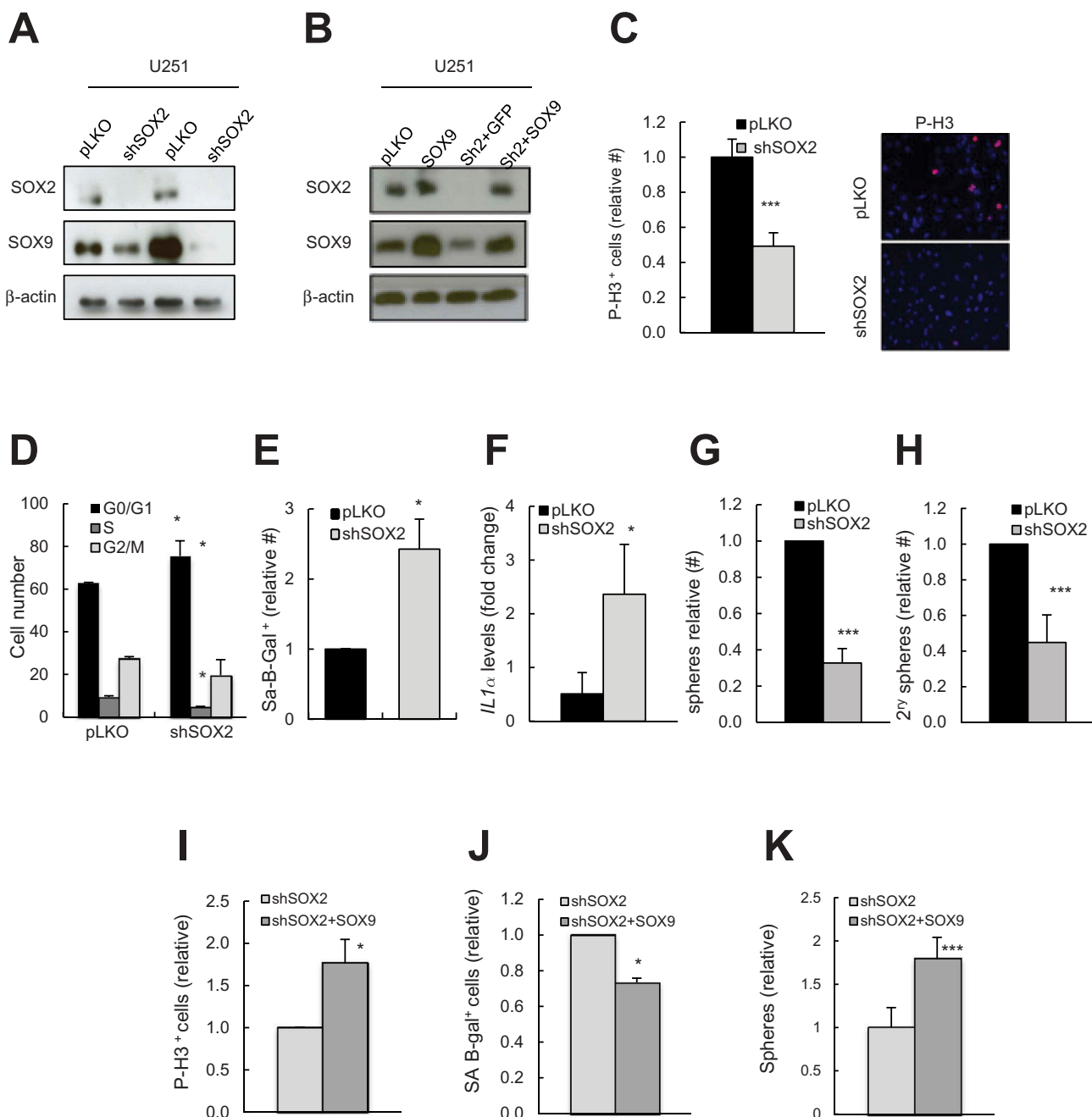


Figure 2. Downregulation of SOX2 leads to decreased proliferation and self-renewal in U251 cells via SOX9.

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 transduced 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 transduced 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* transduced 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.

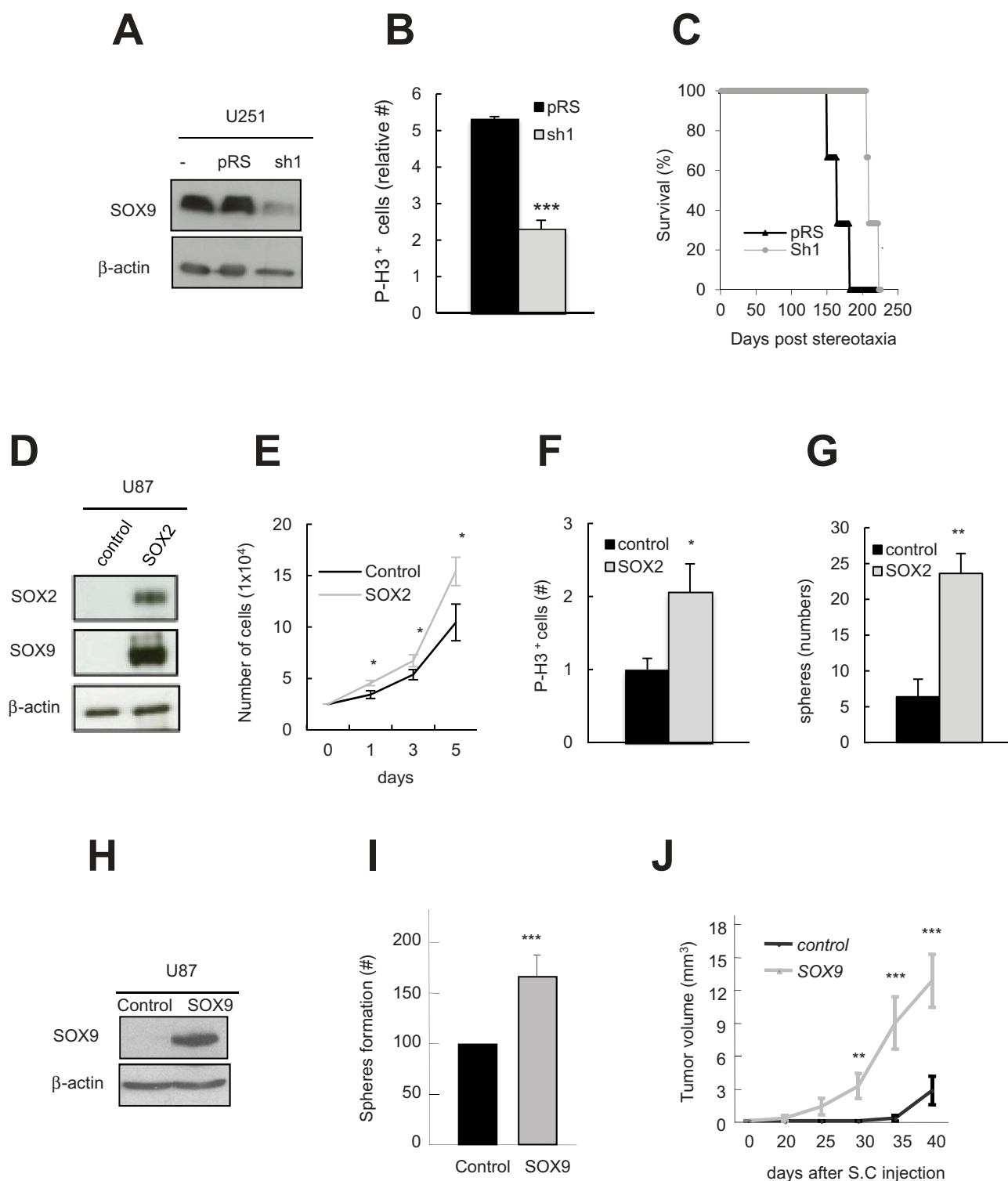


Figure 3. Effect of SOX2 and SOX9 gain of function in glioma cells.

(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

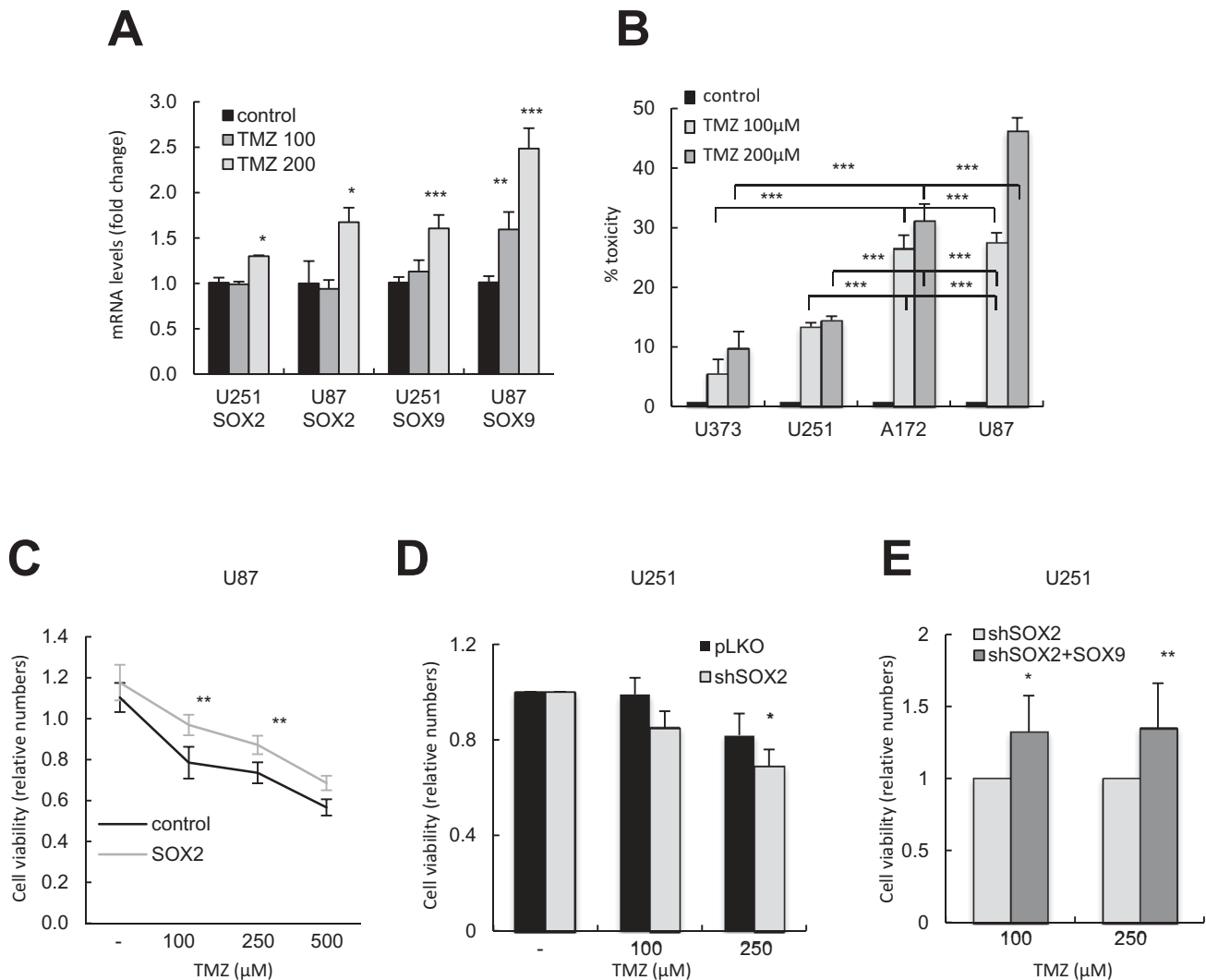


Figure 4. Effect of TMZ treatment in glioma cells with different activity of SOX2 and SOX9.

(A) SOX2 and SOX9 expression levels in U87 and U251 cells cultured with increasing doses (100 and 200 μ M) 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

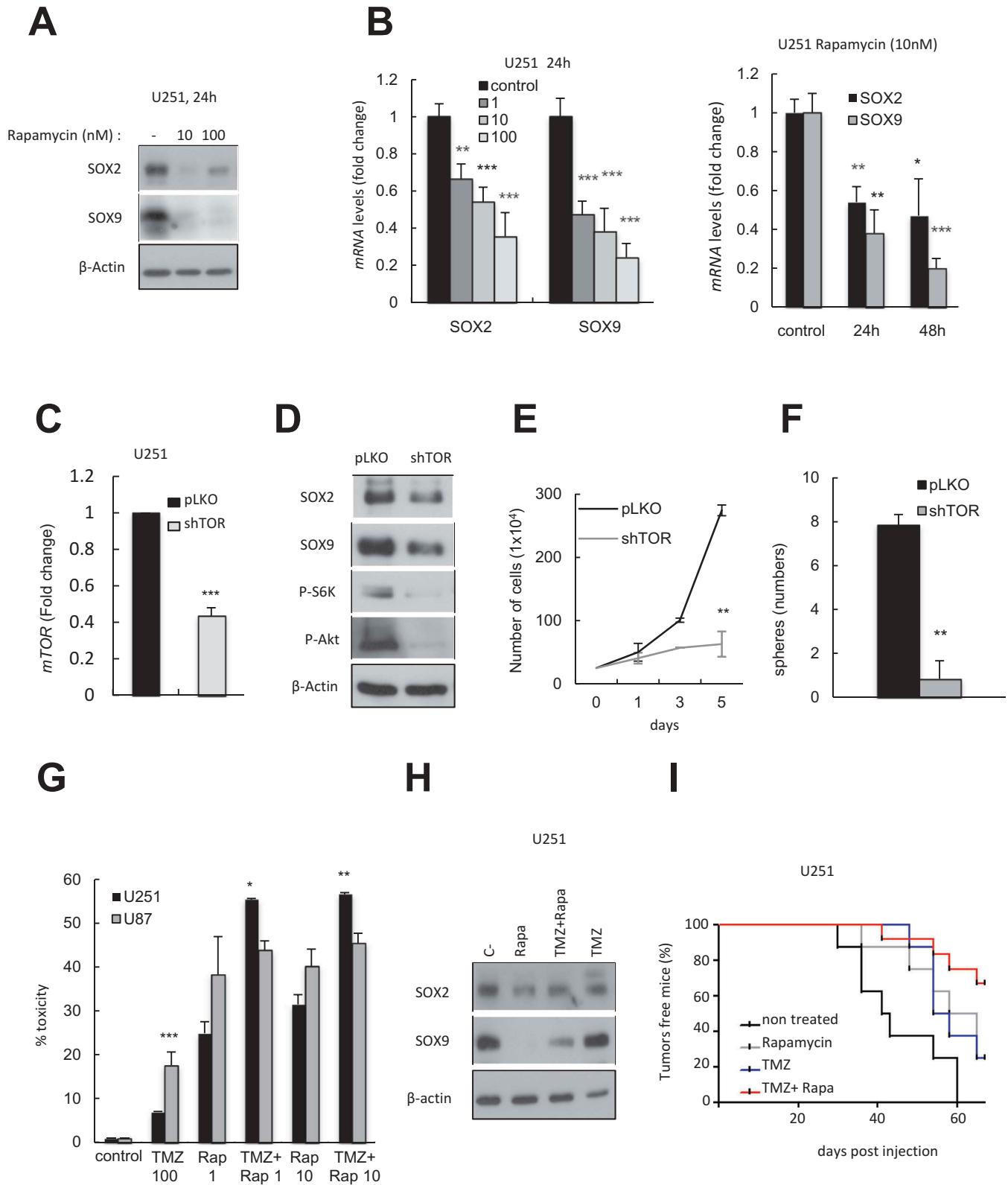


Figure 5. mTOR signaling inhibition reduces SOX2 and SOX9 and cooperates with TMZ. (A) Representative western blot of the effect of 10 and 100nM doses of rapamycin in SOX2 and SOX9 in U251 cells. (B) Dose (1, 10 and 100nM) and time (24,48 h) dependent effect of rapamycin in SOX2 and SOX9 mRNA levels 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 (100µM), 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, Griffiro 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.

ARTICLE

Received 27 Oct 2015 | Accepted 12 Jul 2016 | Published 24 Aug 2016

DOI: 10.1038/ncomms12595

OPEN

Stratification and therapeutic potential of PML in metastatic breast cancer

Natalia Martín-Martín^{1,*}, Marco Piva^{1,*}, Jelena Urosevic², Paula Aldaz³, James D. Sutherland¹, Sonia Fernández-Ruiz¹, Leire Arreal¹, Verónica Torrano¹, Ana R. Cortazar¹, Evarist Planet^{4,5}, Marc Guiu², Nina Radosevic-Robin^{6,7}, Stephane Garcia⁸, Iratxe Macías¹, Fernando Salvador², Giacomo Domenici¹, Oscar M. Rueda⁹, Amaia Zabala-Letona¹, Amaia Arruabarrena-Aristorena¹, Patricia Zúñiga-García¹, Alfredo Caro-Maldonado¹, Lorea Valcárcel-Jiménez¹, Pilar Sánchez-Mosquera¹, Marta Varela-Rey^{1,10}, Maria Luz Martínez-Chantar^{1,10}, Juan Anguita^{1,11}, Yasir H. Ibrahim^{12,13}, Maurizio Scaltriti¹⁴, Charles H. Lawrie^{3,11}, Ana M. Aransay^{1,10}, Juan L. Iovanna⁸, Jose Baselga¹⁵, Carlos Caldas⁹, Rosa Barrio¹, Violeta Serra¹², Maria dM Vivanco¹, Ander Matheu^{3,11,**}, Roger R. Gomis^{2,16,**} & Arkaitz Carracedo^{1,11,17}

Patient stratification has been instrumental for the success of targeted therapies in breast cancer. However, the molecular basis of metastatic breast cancer and its therapeutic vulnerabilities remain poorly understood. Here we show that PML is a novel target in aggressive breast cancer. The acquisition of aggressiveness and metastatic features in breast tumours is accompanied by the elevated PML expression and enhanced sensitivity to its inhibition. Interestingly, we find that STAT3 is responsible, at least in part, for the transcriptional upregulation of PML in breast cancer. Moreover, PML targeting hampers breast cancer initiation and metastatic seeding. Mechanistically, this biological activity relies on the regulation of the stem cell gene *SOX9* through interaction of PML with its promoter region. Altogether, we identify a novel pathway sustaining breast cancer aggressiveness that can be therapeutically exploited in combination with PML-based stratification.

¹CIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park, Bulding 801a, 48160 Derio, Spain. ²Oncology Programme, Institute for Research in Biomedicine (IRB-Barcelona), 08028 Barcelona, Spain. ³Oncology Area, Biodonostia Institute, 20014 San Sebastian, Spain. ⁴Biostatistics and Bioinformatics Unit, Institute for Research in Biomedicine (IRB-Barcelona), 08028 Barcelona, Spain. ⁵School of Life Sciences, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), 1015 Lausanne, Switzerland. ⁶ERTICa Research Group, University of Auvergne EA4677, Clermont-Ferrand, France. ⁷Biodiagnostics Laboratory OncoGenAuvergne, Pathology Unit, Jean Perrin Comprehensive Cancer Center, 63000 Clermont-Ferrand, France. ⁸Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM UMR 1068, CNRS UMR 7258, Aix-Marseille University and Institut Paoli-Calmettes, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, 13288 Marseille, France. ⁹Cancer Research UK Cambridge Institute, University of Cambridge, Li Ka Shing Centre, Robinson Way, Cambridge CB2 0RE, UK. ¹⁰Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). ¹¹IKERBASQUE, Basque foundation for science, 48013 Bilbao, Spain. ¹²Experimental Therapeutics Group, Vall d'Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain. ¹³Weill Cornell Medicine, New York 10021, USA. ¹⁴Human Oncology and Pathogenesis Program, Department of Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 10065 New York, USA. ¹⁵Human Oncology and Pathogenesis Program, Department of Medicine, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 10065 New York, USA. ¹⁶Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010 Barcelona, Spain. ¹⁷Biochemistry and Molecular Biology Department, University of the Basque Country (UPV/EHU), 48949 Leioa, Spain. * These authors contributed equally to this work. ** These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.C. (email: acarracedo@cicbiogune.es).

Patient stratification for cancer therapy is an excellent illustration of precision medicine, and biomarker-based treatment selection has tremendously aided in the success of current cancer therapies¹. In this sense, the current ability to molecularly define and differentiate breast cancer (BCa) into molecular subtypes^{2,3} has allowed the identification of patients at risk of relapse⁴ and has led to biomarker signatures used to spare low-risk patients from aggressive chemotherapy⁵.

Tumours are heterogeneous entities and most cancers retain a differential fraction of cells with increased self-renewal capability (cancer stem or initiating cells)⁶. Cancer-initiating cells (CICs) exhibit a unique spectrum of biological, biochemical and molecular features that have granted them an important role in disease recurrence and metastatic dissemination in BCa^{7,8}. Despite the accepted relevance of CICs in cancer progression, the molecular cues governing their activity and function remain largely unknown. The sex determining region Y Box 9 (SOX9) is a recently described regulator of cell differentiation and self-renewal^{9–11} and is found upregulated in BCa^{12–14}.

The promyelocytic leukaemia (PML) protein negatively regulates survival and proliferation pathways in cancer, functions that have established it as a classical pro-apoptotic and growth inhibitory tumour suppressor^{15,16}. PML is the essential component of multi-protein sub-nuclear structures commonly referred to as the PML nuclear bodies. PML multimerizes to function as a scaffold critical for the composition and assembly of the entire complex, a process that is regulated by Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)-mediated modifications and interactions^{15,16}. Despite the general perception of being PML a bona fide tumour suppressor in cancer, a series of recent studies have demonstrated that PML exhibits activities in cancer that go far and beyond tumour suppression¹⁷. The work in chronic myeloid leukaemia has evidenced that PML expression can be promoted in certain cancers, providing a selective advantage to tumour cells^{18,19}. Moreover, PML is found upregulated in a subset of BCa²⁰. However, to which extent PML targeting could be a valuable therapeutic approach in solid cancers remains obscure.

In this study, we reveal the therapeutic and stratification potential of PML in BCa and the molecular cues, underlying the therapeutic response unleashed by PML inhibition.

Results

PML silencing hampers BCa-initiating cell capacity. The elevated expression of PML in a subset of BCa^{17,20} strongly suggests that it could represent an attractive target for therapy. To ascertain the molecular and biological processes controlled by PML in BCa, we carried out short hairpin RNA (shRNA) lentiviral delivery-mediated PML silencing in different cellular systems. Four constitutively expressed shRNAs exhibited activity against PML (Fig. 1a; Supplementary Fig. 1a–d). PML knockdown elicited a potent reduction in the number of ALDH1-positive cells and in oncosphere formation (OS, readout of self-renewal potential^{7,21}), in up to three PML-high-expressing basal-like BCa (BT549 and MDA-MB-231) or immortalized (HBL100) cell lines tested (Fig. 1b–d; Supplementary Fig. 1e–g). This phenotype was recapitulated with a doxycycline-inducible lentiviral shRNA system targeting PML (sh4; Fig. 1e,f; Supplementary Fig. 1h).

Self-renewal capacity is a core feature of CICs⁷. On the basis of this notion, we hypothesized that PML could regulate tumour initiation in BCa. We performed tumour formation assays in immunocompromised mice, using MDA-MB-231 cells (PML-high-expressing triple-negative breast cancer (TNBC)) transduced with non-targeting (shRNA Scramble; shC) or PML-targeting shRNAs. PML silencing exhibited a profound

defect in tumour formation capacity, resulting in a decrease in the frequency of tumour-initiating cells from 1/218 (shC) to 1/825 (sh5) and completely abolished (1/infinite) in sh4 (Fig. 1g; Supplementary Fig. 1i).

To extrapolate these observations to the complexity of human BCa, we characterized a series of patient-derived xenografts (PDXs; Table 1; Supplementary Fig. 1j). The distribution of PML expression in the different subtypes of engrafted tumours was reminiscent of patient data, with a higher proportion of PML-high-expressing tumours in basal-like/triple-negative subtype²⁰. Taking advantage of the establishment of a PML-high-expressing PDX-derived cell line (PDX44), we sought to corroborate the results obtained in the PML-high-expressing cell lines. As with MDA-MB-231 cells, PML silencing was effective in the PDX44-derived cell line (Fig. 1h) and resulted in a significant decrease in OS formation (Fig. 1i). *In vivo*, PML silencing decreased tumour-forming capacity of PDX44 cells (tumour-initiating cell frequency was estimated of 1/39.6 in shC, 1/100 in sh5 and 1/185 in sh4; Fig. 1j; Supplementary Fig. 1k).

These data demonstrate that PML expression is required for BCa-initiating cell function in TNBC cells.

PML sustains metastatic potential in BCa. CIC activity is associated with tumour initiation and recurrence^{7,22}. We have previously shown that PML expression is associated to early recurrence²⁰, which we validated in an independent data set²³ (Supplementary Fig. 2a). The development of metastatic lesions is based on the acquisition of novel features by cancer cells²⁴. On the basis of our data, we surmised that the activity of PML on CICs could impact on the survival and growth in distant organs. To test this hypothesis, we measured metastasis-free survival (MFS) in two well-annotated large messenger RNA (mRNA) data sets^{3,25,26}. First, we evaluated the impact of high PML expression in MFS in the MSK/EMC (Memorial Sloan Kettering Cancer Center-Erasmus Medical Center) data set^{25,26}. As predicted, PML expression above the mean was associated with reduced MFS (Fig. 2a). Second, we validated this observation in the METABRIC data set, focusing on early metastasis (up to 5 years)³. On the one hand, we confirmed the MSK/EMC data (Fig. 2b; hazard ratio (HR) = 1.31, log-rank test $P = 0.006$). On the other hand, a Cox continuous model demonstrated an association of PML expression with the increased risk of metastasis (HR = 2.305, $P = 0.002$). Of note, we tested the expression of PML in patients with complete pathological response or residual disease after therapy²⁷, but could not find a significant association of these parameters in two data sets (Supplementary Fig. 2b).

The molecular alterations associated to metastatic capacity can be studied using BCa cell lines, in which metastatic cell sub-clones have been selected through the sequential enrichment in immunocompromised mice²⁸. If PML is a causal event in the acquisition of metastatic capacity, then changes in its expression should be observed in this cellular system. As predicted, PML mRNA and protein expression were elevated in three distinct metastatic sub-clones compared with their parental counterparts^{25,26} (Fig. 2c; Supplementary Fig. 2c).

Metastasis surrogate assays provide valuable information about the capacity of cancer cells to home and colonize secondary organs²⁹. TNBC cells exhibit metastatic tropism to the lung³⁰, and the molecular requirements of this process have begun to be clarified through the generation of highly metastatic sub-clones³¹. Our patient analysis suggests that PML expression is favoured in primary tumours, with higher capacity to disseminate. Moreover, cell sub-clone analysis further reveals that PML expression is selected for in the process of metastatic selection. With this data

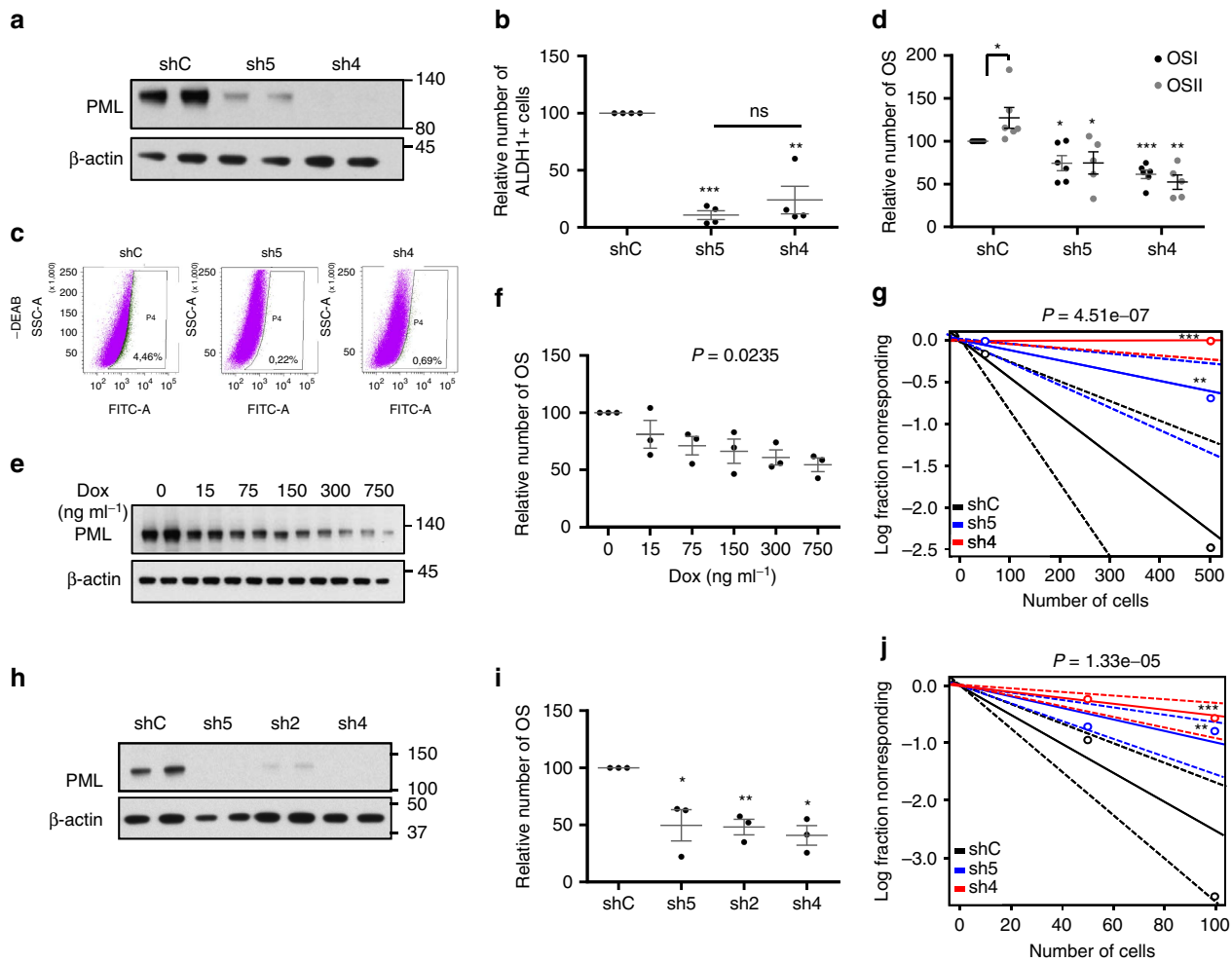


Figure 1 | Genetic targeting of *PML* hampers breast cancer initiation potential. (a) *PML* levels (representative western blot out of four independent experiments) upon *PML* silencing with two shRNAs (sh) in MDA-MB-231 cells. (b) Percentage of ALDH1+ cells upon *PML* silencing with two shRNAs in MDA-MB-231 cells ($n = 4$). (c) Representative flow cytometry analysis out of three independent experiments of the ALDH1+ population in shC or shPML-transduced MDA-MB-231 cells (FITC: fluorescein-isothiocyanate, SSC-A: side-scatter). (d) Effect of *PML* silencing on primary (OSI) and secondary (OSII) OS formation in MDA-MB-231 cells ($n = 5$ for OSI in shPML cells and $n = 6$ for shC and OSI in shPML cells). (e,f) *PML* levels (representative western blot out of three independent experiments) (e) and OS formation ($n = 3$) (f) upon *PML* inducible silencing (shPML#4) with the indicated doses of doxycycline in MDA-MB-231 cells. (g) Limiting dilution experiment after xenotransplantation. Nude mice were inoculated with 500,000 or 50,000 MDA-MB-231 cells ($n = 12$ injections per experimental condition). Tumour-initiating cell number was calculated using the ELDA platform. A log-fraction plot of the limiting dilution model fitted to the data is presented. The slope of the line is the log-active cell fraction (solid lines: mean; dotted lines: 95% confidence interval; circles: values obtained in each cell dilution). (h) *PML* levels (representative western blot out of four independent experiments) upon *PML* silencing in the PDX44-derived cell line. (i) OSI formation upon *PML* silencing in PDX44 cells ($n = 3$). (j) Limiting dilution experiment after xenotransplantation. Nude mice were inoculated either with 100,000 or 10,000 PDX44 cells ($n = 20$ injections per experimental condition). Tumour-initiating cell number was calculated using the ELDA platform as in (g). Error bars represent s.e.m., P value ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ compared with shC or as indicated). Statistics test: one-tail unpaired t -test (b,d,i), analysis of variance (f) and χ^2 -test (g,j). dox, doxycycline; OS, oncospheres; shC, Scramble shRNA; sh2, sh4 and sh5, shRNA against *PML*.

in mind, we asked to which extent *PML* would be responsible for the enhanced metastatic capacity. To address this question, we silenced *PML* in a highly metastatic sub-clone derived from MDA-MB-231 and injected these cells in the tail vein of nude mice. We chose tail vein injection due to the fact that other metastasis models based on the orthotopic implantation of cells in the mammary fat pad²⁵ are influenced by primary tumour formation, which we reported to be altered by *PML* (Fig. 1). The reduction of *PML* was confirmed in the injected cells (Fig. 2d). Strikingly, *PML* silencing led to a significant reduction in lung metastatic foci formation (Fig. 2e). When evaluating the immunoreactivity of *PML* in the metastatic lesions (Fig. 2e–g), we observed a direct association between *PML* silencing at the time of injection (Fig. 2d) and the immunoreactivity of *PML* in

metastatic foci (Fig. 2g). We evaluated whether the lack of *PML* could be limiting metastatic growth capacity by eliciting an apoptotic response, rather than CIC capacity. However, no differential apoptosis was detected by the means of cleaved caspase-3 staining (Supplementary Fig. 2d–e).

These data demonstrate that the genetic targeting of *PML* results in a tumour-suppressive response, characterized by decreased BCa-initiating cell function and consequently, reduced tumour initiation and metastasis.

STAT3 participates in the regulation of *PML* expression. Our data demonstrate that *PML* is transcriptionally regulated in BCa. *PML* gene expression is regulated upon various external stimuli,

Table 1 | PDX characterization based on BCa subtype (intrinsic subtype is presented in brackets).

PDX	Subtype	PML
31	TNBC (HER2 enriched)	–
102	ER + (basal like)	–
131	ER + (luminal B)	–
156	ER + (basal like)	–
197	TNBC (basal like)	–
4	ER + (luminal B)	+
6	ER + (luminal A)	+
10	HER2 + (HER2 enriched)	+
39	ER + (luminal B)	+
60	ER + (basal like)	+
98	ER + (basal like)	+
136	TNBC (basal like)	+
137	TNBC (basal like)	+
161	ER + (luminal B)	+
93	TNBC (NA)	++
179	TNBC (NA)	++
44	TNBC (basal like)	+++
88	TNBC (basal like)	+++
89	TNBC (NA)	+++
94	TNBC (basal like)	+++
124	TNBC (basal like)	+++
127	TNBC (basal like)	+++
167	TNBC (basal like)	+++

ER, oestrogen receptor; NA, not applicable; TNBC, triple-negative breast cancer.

including type I and II interferons and interleukin 6, which are mediated by interferon regulatory factors and signal transducers and activators of transcription (STATs), respectively^{32–35}. Specifically, it has been reported that activated STAT3 but not STAT1 correlates with *PML* mRNA and protein levels in fibroblasts, HeLa and U2OS cell lines³⁴. Since, STAT3 is activated in oestrogen receptor (ER)-negative BCa³⁶, we hypothesized that this transcription factor may be responsible for the transcriptional activation of *PML* in this tumour type. We silenced *STAT3* with two different short hairpins (sh41 and sh43), and showed that this approach led to the decrease in *PML* protein and gene expression in the different cell lines tested (Fig. 3a; Supplementary Fig. 3a–b). Moreover, pharmacological inhibition of the Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway at two different levels (SI3-201, an inhibitor of STAT3 phosphorylation and activation; TG1013148, a potent and highly selective ATP-competitive inhibitor of JAK2) decreased *PML* levels (Fig. 3b,c). In coherence with the activity of *PML*, genetic and pharmacological inhibition of STAT3 in MDA-MB-231 cells reduced the primary OS formation capacity (Fig. 3d–f). Importantly, *PML* gene expression levels in a cohort of 448 patients (MSK/EMC) correlated with the activity of STAT3, as confirmed with two different STAT3 signatures (Fig. 3g; ref. 37; [http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/V\\$STAT3_01](http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/V$STAT3_01)). In addition, immunohistochemical analysis confirmed an association between the *PML* immunoreactivity and phosphorylated STAT3 levels in the Marseille cohort (Fig. 3h). Our results provide strong support for the role of STAT3 as an upstream regulator of *PML* in BCa.

Elevated *PML* expression predicts response to arsenic trioxide.

PML can be pharmacologically inhibited with arsenic trioxide (Trisenox, ATO), which induces SUMO-dependent ubiquitylation and proteasome-mediated degradation of the protein^{38,39}. Similar to our results obtained by knocking down *PML* via

shRNA, low doses of ATO decreased *PML* levels and exerted a negative effect on the OS formation capacity both in MDA-MB-231 and PDX44 cells (Fig. 4a,b). Moreover, ATO reduced the tumour formation capacity in a xenograft model derived from MDA-MB-231 cells in full coherence with the genetic approach (tumour-initiating cell frequency was estimated of 1/279 in vehicle and 1/703 in ATO; Fig. 4c; Supplementary Fig. 4a).

We hypothesized that cells with elevated *PML* would be ‘addicted’⁴⁰ to the expression of the protein and hence be more sensitive to the action of *PML* inhibitors. To prove this notion, we studied additional cell lines with high (BT549, HBL100) or low (MCF7, T47D) *PML* expression. With this approach, we could demonstrate that the effect of *PML* silencing on the OS formation was exquisitely restricted to *PML*-high-expressing cells (Fig. 4d). This effect was recapitulated with ATO (Fig. 4e), where *PML*-low cells remained refractory to the drug in terms of the OS formation capacity.

Our results open a new avenue for the treatment of tumours that exhibit elevation in *PML* expression. *PML* elevation is predominant in ER-negative tumours (Supplementary Fig. 4b), which also present worse prognosis than ER-positive BCa^{2,41}. Whereas luminal subtypes present better overall prognosis, there is a subset of patients within this subtype that exhibits aggressive subtypes, the worse prognosis subgroup would exhibit increased *PML* levels. Indeed, MFS analysis within each intrinsic subtype confirmed that ER-positive BCa (luminal A and luminal B) contained a subset of patients with higher *PML* and worse prognosis (Supplementary Fig. 4c–g).

Our results in ER-positive tumours indicate that the *PML* expression is enriched in patients harbouring tumours of poor prognosis^{2,3}. These results are coherent with our data in metastatic clone selection (Fig. 2c), suggesting that the acquisition of aggressive features is accompanied by the elevation of *PML* expression and ‘addiction’ to the protein. We therefore sought to study whether metastatic ER-positive cell sub-clones, which present elevated *PML* expression, would exhibit sensitivity to *PML* inhibition, in contrast to the parental cells. Indeed, ATO reduced the OS formation selectively in *PML*-high-expressing metastatic cells derived from MCF7, whereas the parental cells remained refractory to the drug (Fig. 4f,g). Our results strongly suggest that *PML* elevation in BCa is associated to a dependence on its expression and hence enforces the need for patient stratification based on *PML* levels before the establishment of *PML*-directed therapies.

PML regulates BCa-initiating cell function through SOX9.

To ascertain the molecular mechanism by which *PML* regulates BCa-initiating cell function, we first evaluated the expression levels of this gene in a sorted population of ALDH1-positive versus -negative MDA-MB-231 cells (Fig. 5a,b), and in adherent cultures versus OS (CIC-enriched cultures) (Fig. 5c). Strikingly, *PML* expression increased in both experimental approaches (Fig. 5b,c), together with the levels of well-established stem cell regulators (Fig. 5c). On this basis, we hypothesized that *PML* might control the expression of stem cell factors, as a mean to regulate BCa-initiating cell function. SOX9 is a recently described regulator of cell differentiation and self-renewal^{9,10,11} and is upregulated in BCa^{12–14}. Constitutive (Fig. 5d; Supplementary Fig. 5a–b) and inducible (Fig. 5e) *PML* silencing exerted an inhibitory effect on SOX9 expression that correlated with the OS formation capacity (Fig. 5f). *PML* pharmacological inhibition also induced a decrease on SOX9 expression (Fig. 5g; Supplementary Fig. 5c–d). This regulatory activity was corroborated in the PDX44 cell line (Fig. 5h,i; Supplementary Fig. 5e), and in a

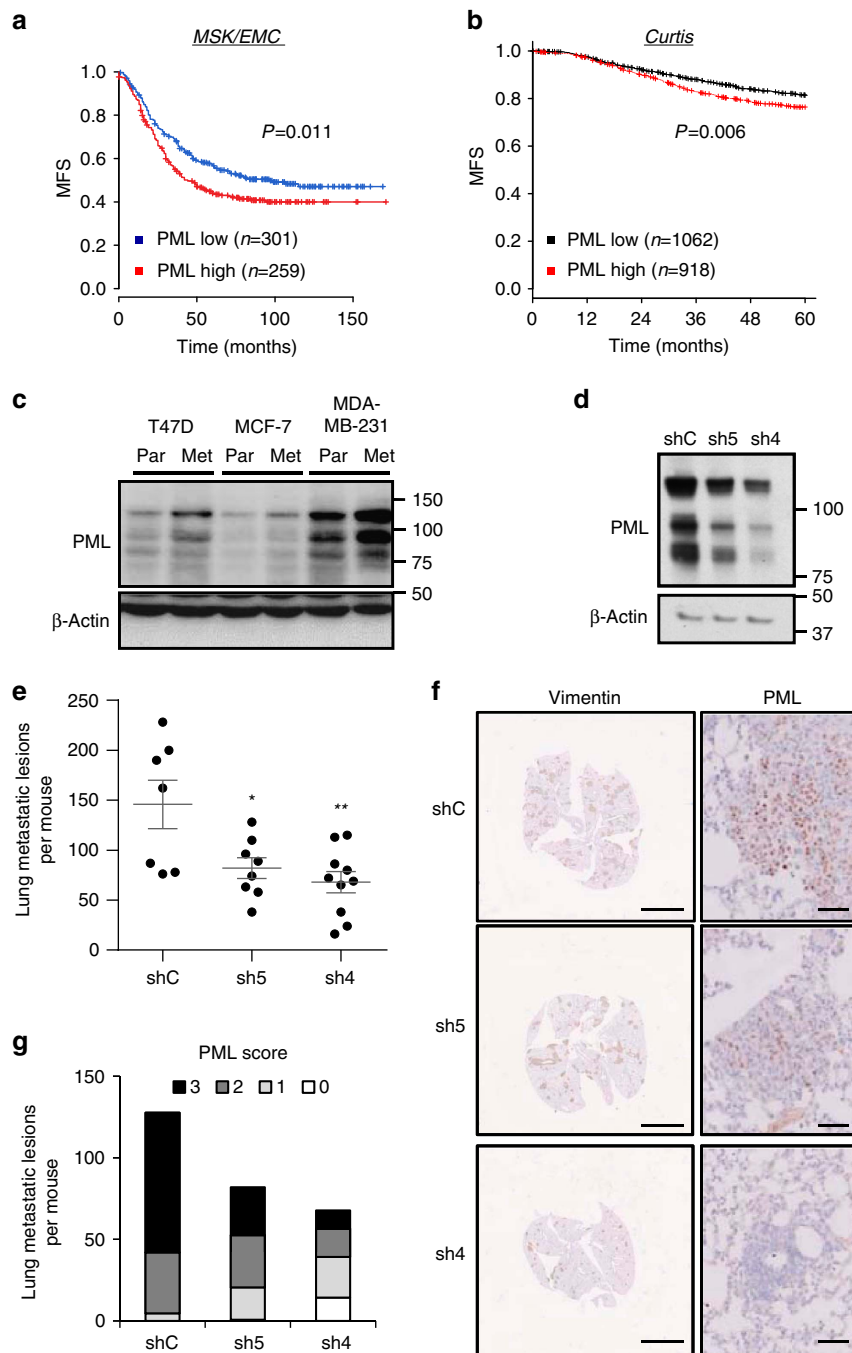


Figure 2 | PML is associated to breast cancer metastatic dissemination. (a,b) Kaplan-Meier representations of MFS based on *PML* RNA expression. (a) MSK/EMC data set, $n = 560$. (b) Curtis data set (MFS before 60 months), $n = 1980$. PML high: above the mean expression; PML low: below the mean expression. (c) Representative western blot out of three independent experiments, showing *PML* protein expression in cell line sub-clones selected for high metastatic potential (Par = parental and Met = metastatic). (d-g) Effect of *PML* silencing on metastatic capacity of intravenously injected metastatic MDA-MB-231 sub-clones ($n = 10$ mice per condition): Western blot showing *PML* silencing in cells at the time of injection (d), number of metastatic lesions (e), representative immunostaining of Vimentin (scale bar, 3 mm) and *PML* (scale bar, 50 μm) as indicator of metastatic lesions (f), and number of metastatic lesions for each *PML* immunoreactivity score (22 metastatic foci were scored and extrapolated to the number of total metastatic foci in each lung) (g). Error bars represent s.e.m., P value (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with shC). Statistical test: Gehan-Breslow-Wilcoxon test (a,b) and one-tail unpaired t-test (e). MFS, metastasis-free survival; shC: Scramble shRNA; sh4 and sh5, shRNA against *PML*.

correlative manner in the PDX data set (Fig. 5j), as well as in the aforementioned Marseille data set (Fig. 5k).

We next ascertained the molecular cues regulating *SOX9* expression downstream *PML*. Since the regulation was observed at the mRNA level, we interrogated *SOX9* promoter *in silico* and in public datasets. The ENCODE project has provided a vast

amount of information about regulators and binding sites⁴³. *SOX9* promoter exhibited a 2 kb region of acetylated H3K27 (H3K27Ac), which would indicate the proximal regulatory region. To our surprise, we found *PML* among the 10 proteins with highest confidence DNA-binding score in *SOX9* promoter region (Fig. 5l; cluster score = 527 (refs 44–46)). There is limited

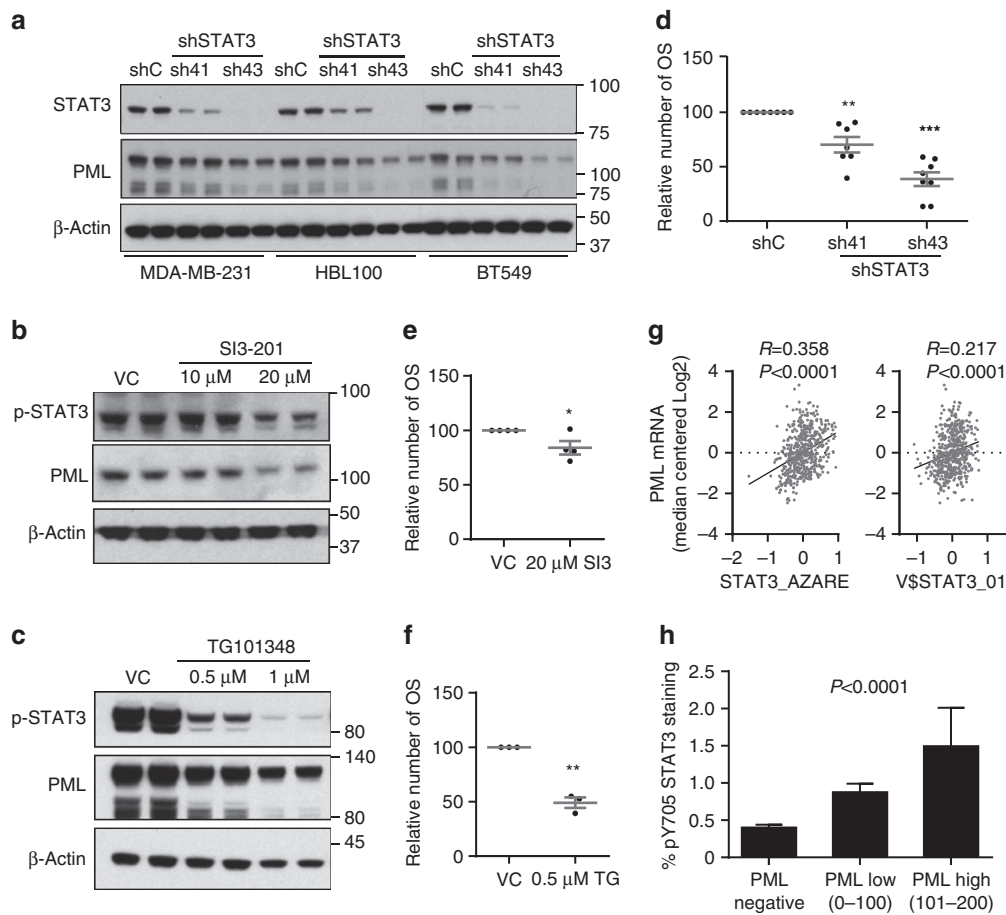


Figure 3 | STAT3 regulates PML expression in breast cancer. (a) Representative western blot out of three independent experiments showing STAT3 and PML protein expression upon *STAT3* silencing with two different shRNA (sh41 and sh43). (b,c) Representative western blot out of three independent experiments, showing STAT3 and PML protein expression upon *STAT3* inhibition using SI3-201 (b) and TG101314 (c) in MDA-MB-231 cells. (d-f) Effect of *STAT3* inhibition on primary OS formation using sh41 and sh43 against *STAT3* ($n = 7$) (d), SI3-201 (SI3; $n = 4$) (e) and TG101314 (TG; $n = 3$) (f) in MDA-MB-231 cells. (g) Correlation of two different *STAT3* gene signatures with *PML* gene expression in the MSK/EMC data set. (h) Immunoreactivity of pY705 *STAT3* protein in patient biopsies with varying expression of *PML* in the Marseille cohort ($n = 737$). Error bars represent s.e.m., P value ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ compared with shC or VC as indicated). Statistics test: one-tail unpaired t -test (d,e,f), Pearson correlation (g) and analysis of variance (h). OSI, primary oncospheres; shC, Scramble shRNA; sh41 and sh43, shRNA against *STAT3*; VC, vehicle control.

evidence of the capacity of PML to regulate gene expression in concordance with transcription factors through association with DNA^{47–49}. We performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis of ectopically expressed and endogenous PML, as well as SOX9 expression analysis in these conditions. We confirmed that PML is in close proximity to *SOX9* promoter region and that its ectopic expression upregulates *SOX9* transcript and protein levels (Fig. 5m; Supplementary Fig. 5f–j). It is worth noting that PML does not present a canonical DNA-binding domain, and it is therefore plausible that it lies in close proximity to *SOX9* promoter through the interaction with intermediary DNA-binding proteins.

The regulation of *SOX9* led us to hypothesize that this transcription factor mediated the effects of PML on the regulation of CIC function. On the one hand, we ascertained whether *SOX9* silencing would recapitulate the effects of PML inhibition. We set up two shRNAs targeting *SOX9* (Fig. 6a) that exhibited a potent effect on primary (Fig. 6b) and secondary (Supplementary Fig. 6a) OS formation. Moreover, *SOX9* silencing in MDA-MB-231 cells reduced the tumour formation capacity *in vivo* (tumour-initiating cell frequency was estimated of 1/71.7 in shC, completely abolished (1/infinite) in sh9.1 and 1/4145.5 in sh9.2; Fig. 6c; Supplementary Fig. 6b–c), in agreement with other reports¹².

On the other hand, we evaluated the capacity of ectopically expressed *SOX9* to bypass the effects of PML silencing on CIC function. Ectopic *SOX9*-expressing BCa cells were refractory to *PML* genetic inhibition in terms of the OS formation (Fig. 6d,e) and tumour formation (tumour-initiating cell frequency was estimated of 1/139.8 in shC/Mock, 1/57.5 in shC/*SOX9*, 1/1506 in sh4/Mock and 1/270.8 in sh4/*SOX9*; Fig. 6f; Supplementary Fig. 6d). Importantly, the *in vitro* observation was recapitulated in ATO-treated cells (Fig. 6g).

These data reveal a novel molecular mechanism by which PML controls the expression of the stem cell factor *SOX9* to regulate BCa-initiating cell function (Fig. 6h). It is worth noting that we found PML at the promoter region of other stem cell genes, such as *LGR5* (Supplementary Fig. 6e–g), indicating that the capacity of this protein to regulate CIC function could involve a larger and more complex transcriptional program.

Discussion

Finding successful targeted treatment strategies for women at risk of metastatic BCa is of outstanding clinical interest. Our data unveil the therapeutic potential of targeting PML in combination

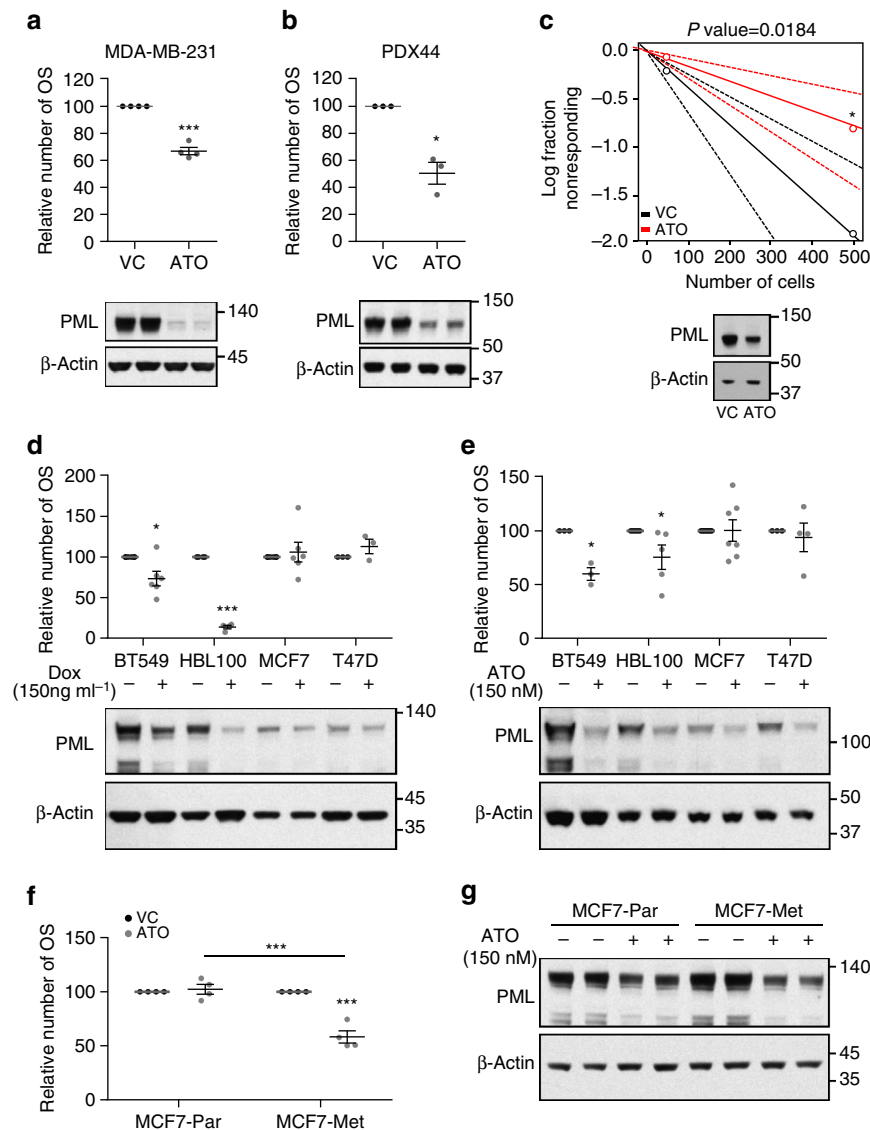


Figure 4 | PML inhibition selectively targets PML-high-expressing breast cancer cells. (a,b) Effect of 150 nM ATO treatment on OSI formation (top panels) in MDA-MB-231 ($n = 4$) (a) and PDX44 cells ($n = 3$) (b) and PML protein expression (3-day treatment, lower panels, representative western blot out of four—MDA-MB-231—or three—PDX44-independent experiments). (c) Limiting dilution experiment after xenotransplantation. Nude mice were inoculated with 500,000 or 50,000 MDA-MB-231 cells ($n = 20$ injections per experimental condition). ATO cells were pre-treated with 150 nM ATO 2 days before injection. Tumour-initiating cell number was calculated using the ELDA platform. A log-fraction plot of the limiting dilution model fitted to the data is presented. The slope of the line is the log-active cell fraction (solid lines: mean; dotted lines: 95% confidence interval; circles: values obtained in each cell dilution). A PML western blot from cells at the time of injection is presented in lower panel. (d,e) OSI formation in cell lines with high (BT549 and HBL100) and low (MCF7 and T47D) PML expression upon PML genetic silencing (MCF7 and T47D $n = 3$, and BT549 and HBL100 $n = 6$) (d) and 150 nM ATO (BT549 $n = 3$, HBL100 $n = 5$, MCF7 $n = 7$ and T47D $n = 4$) (e). A representative PML western blot out of three independent experiments is presented in lower panels. (f,g) Effect of 150 nM ATO on OSI formation ($n = 4$) (f) and on PML levels (a representative western blot is presented out of four independent experiments) (g) in MCF7 parental cells and MCF7 metastatic sub-clone. Error bars represent s.e.m., P value ($*P < 0.05$; $***P < 0.001$ compared with each control). Statistics test: one-tail unpaired t -test (a,b,d,e,f), χ^2 -test (c). ATO, arsenic trioxide; Met, metastatic; OSI, primary oncospheres; Par, parental; VC, vehicle control.

with a stratification companion that identifies patients harbouring PML-high-expressing BCa.

We demonstrate that PML targeting impacts on BCa-initiating cell function, and hence on cancer initiation and dissemination. In addition, we observed that PML expression is increased in BCa-initiating cells, highly metastatic sub-clones and in BCa patients at risk of metastasis. These data suggest that, in a subset of BCas, PML sustains the function of BCa-initiating cells and in turn supports the metastatic dissemination capacity⁶.

We show that PML-directed therapies are efficient in BCa cells with elevated expression of the protein. Such phenomenon has been defined as ‘addiction’^{40,50,51}, and it represents an exciting avenue in the establishment of novel therapeutic initiatives. Importantly, targeted therapies have been particularly successful when combined with a predictive biomarker. The availability of a clinically validated protocol to detect PML immunoreactivity⁵² offers a unique opportunity to define the patients that would benefit from therapies based on PML inhibition. In addition, our

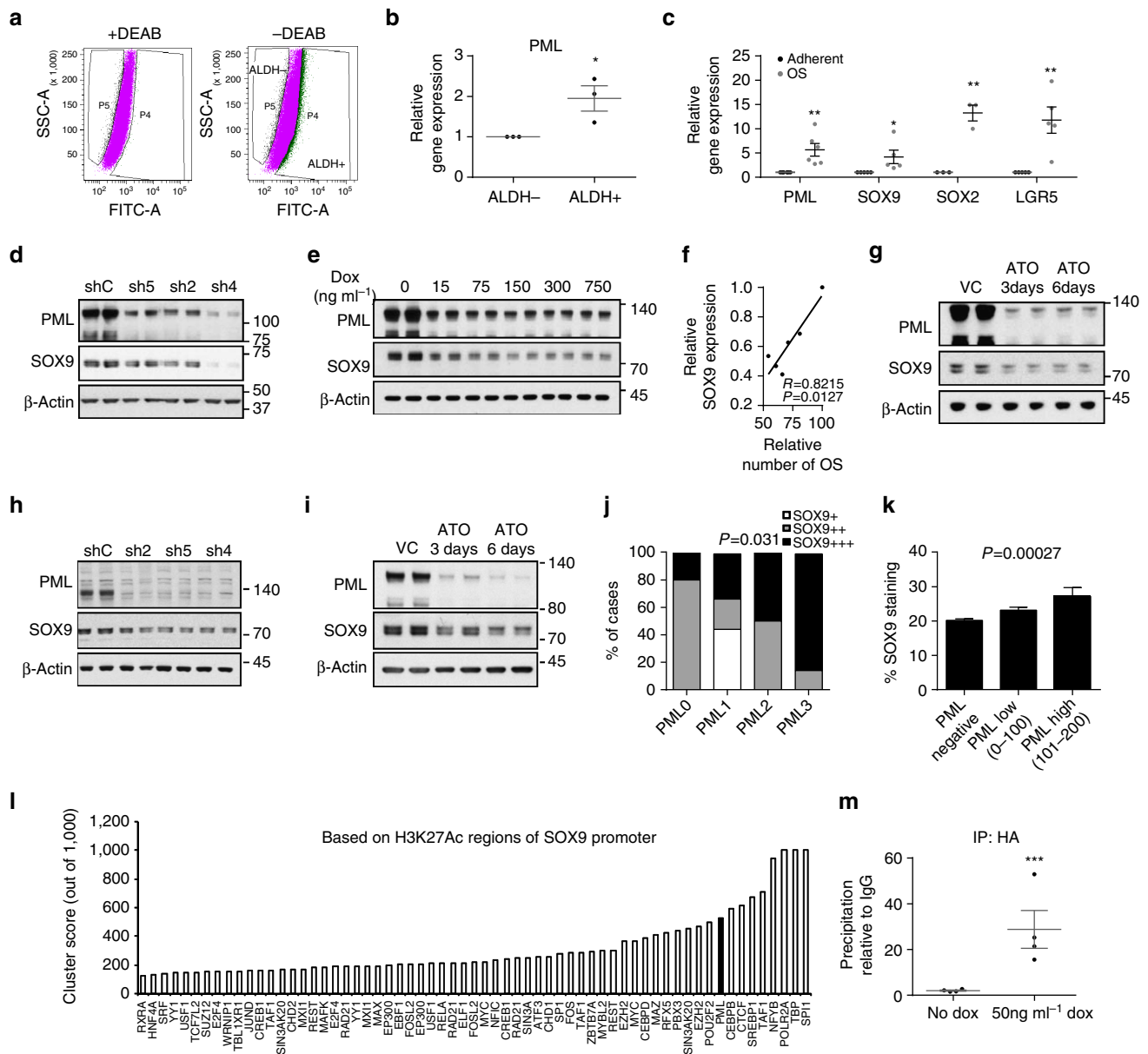


Figure 5 | PML regulates SOX9 expression in breast cancer. (a) Flow cytometry analysis of MDA-MB-231 cells based on ALDH1 activity. (b) PML gene expression in the two populations sorted in a ($n=3$). (c) Expression of self-renewal-associated genes in OSI compared with adherent MDA-MB-231 cells (PML $n=6$, SOX9 and LGR5 $n=5$ and SOX2 $n=3$). (d,e) Representative western blot out of four independent experiments depicting the downregulation of SOX9 protein upon constitutive (d) and inducible (e) PML silencing in MDA-MB-231 cells. (f) Correlation analysis of SOX9 protein densitometry from (e) and OSI formation in MDA-MB-231 cells ($n=3$). (g) Representative western blot out of four independent experiments depicting the downregulation of SOX9 protein upon 150 nM ATO treatment in MDA-MB-231 cells. (h,i) Representative western blot out of three independent experiments depicting the downregulation of SOX9 protein upon PML silencing (h) and 150 nM ATO treatment (i) in PDX44 cells. (j) PML and SOX9 immunoreactivity assayed by immunohistochemistry in a panel of PDX samples (Table 1). (k) SOX9 immunoreactivity in patient biopsies with varying expression of PML in the Marseille cohort ($n=737$). (l) Cluster score of DNA-binding proteins in SOX9 promoter region using ENCODE database. (m) SOX9 promoter region abundance in chromatin immunoprecipitation (ChIP) of exogenous HA-PMLIV using HA-tag antibody in MDA-MB-231 cells after induction with 50 ng ml⁻¹ doxycycline for 3 days ($n=4$). Data were normalized to IgG (negative-binding control). Error bars represent s.e.m., P value ($*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with control). Statistic test: one-tail unpaired t -test (b,c,m), Pearson correlation (f), χ^2 -test (j) and analysis of variance (k). ATO, arsenic trioxide; DEAB, diethylaminobenzaldehyde; dox, doxycycline; OSI, primary oncospere; shC, Scramble shRNA; sh2, sh4 and sh5, shRNA against PML; VC, vehicle control.

proof-of-concept demonstration of the therapeutic efficacy of PML pharmacological inhibition with ATO indicates that (1) repositioning of ATO (that is currently used in the treatment of acute PML) for BCa therapy is a viable approach, (2) there is strong support for the development of novel and more effective PML inhibitors and (3) the identification of combined

therapies with PML inhibitors in BCa is a novel and exciting area of investigation.

Mechanistically, our data demonstrate that PML is in close proximity to the promoter region of SOX9, and positively regulates the expression of the gene. SOX9 has been recently established as a central regulator of normal and cancer stem

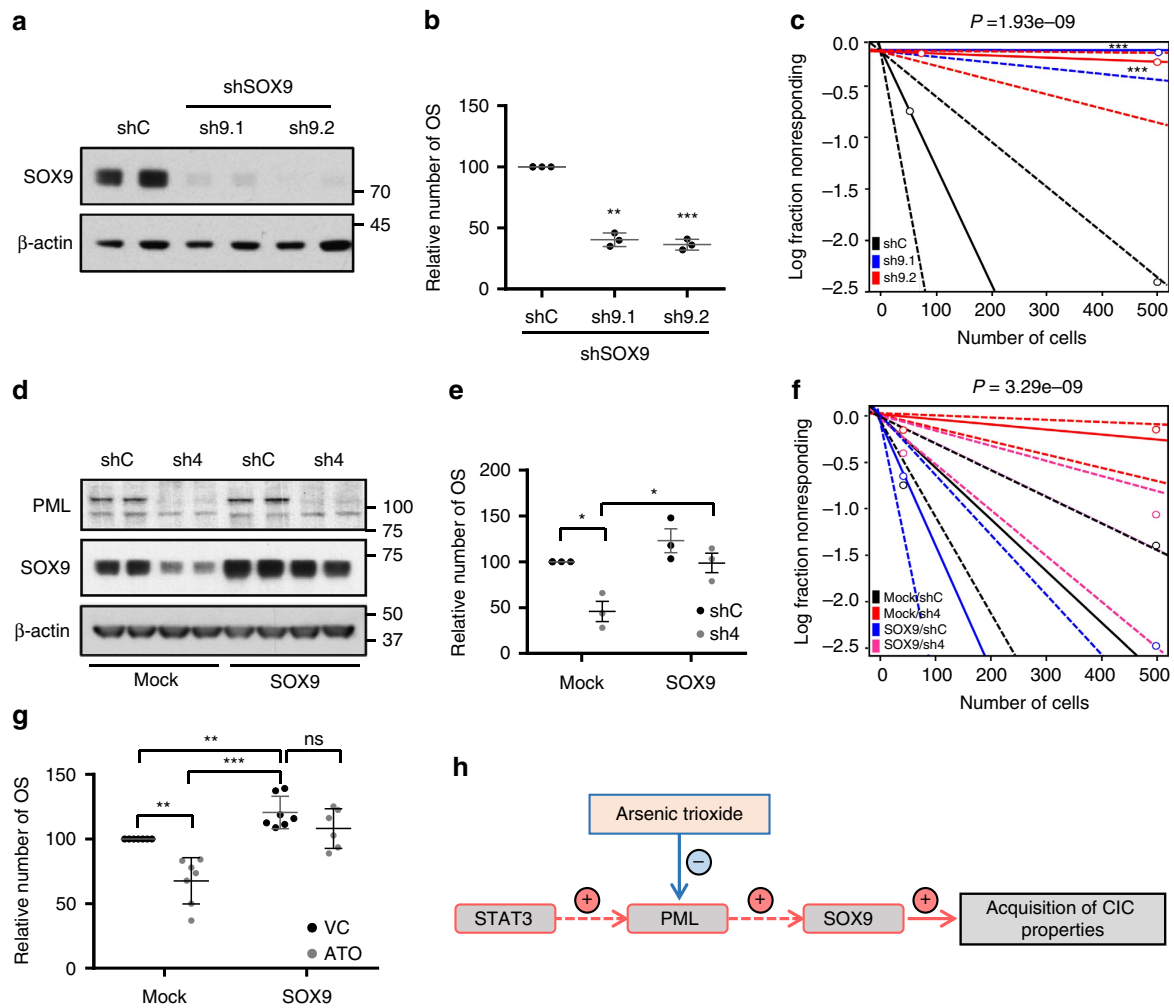


Figure 6 | SOX9 is critical for the regulation of breast cancer-initiating capacity downstream PML. (a,b) Effect of SOX9 silencing with two shRNA (sh9.1 and sh9.2) on SOX9 protein expression (representative western blot out of three independent experiments) (a) and on OSI formation ($n=3$) (b) in MDA-MB-231 cells. (c) Limiting dilution experiment after xenotransplantation. Nude mice were inoculated with 500,000 or 50,000 MDA-MB-231 cells ($n=8$ injections per experimental condition). Tumour-initiating cell number was calculated using the ELDA platform. A log-fraction plot of the limiting dilution model fitted to the data is presented. The slope of the line is the log-active cell fraction (solid lines: mean; dotted lines: 95% confidence interval; circles: values obtained in each cell dilution). (d,e) Effect of ectopic SOX9 expression on the consequences of PML silencing. Representative western blot (out of three independent experiments) depicting expression of PML and SOX9 (endogenous and ectopic protein are detected) (d) and OSI formation ($n=3$) (e) in the different experimental conditions in MDA-MB-231 cells. (f) Limiting dilution experiment to assess frequency of tumour-initiating cells after xenotransplantation. Nude mice were inoculated either with 500,000 or 50,000 MDA-MB-231 cells ($n=12$ per experimental condition, except in shC/Mock and sh4/SOX9, $n=16$). Tumour-initiating cell number was calculated using the ELDA platform as in c. (g) OSI formation in MDA-MB-231 cells transduced with the indicated constructs (mock, SOX9) and treated with vehicle or 150 nM ATO ($n=6$). (h) Diagram of the molecular mechanism by which PML controls the expression of the stem cell factor SOX9 to regulate BCa-initiating cell function. Error bars represent s.e.m., P value (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ compared with its control or as indicated). Statistic test: one-tail unpaired t -test (b,e,g) and χ^2 -test (c,f). ATO, arsenic trioxide; OSI, primary oncospheres; shC, Scramble shRNA; sh9.1 and sh9.2, shRNA against SOX9; sh4, shRNA against PML; VC, vehicle control.

cells^{9–13,53–61}. This activity is executed in part through the functional interplay with epithelial-to-mesenchymal transition regulators such as SLUG^{12,53,56}. In BCa, SOX9 is found overexpressed in the TNBC subtype, and regulates the WNT/beta-catenin pathway¹⁴. In addition, this transcription factor is a main driver of the transcriptional signature of this subtype of BCa⁶². All these features make SOX9 an ideal target for BCa therapy. However, development of small molecules targeting transcription factors has been an outstanding challenge with limited success⁶³. Our data demonstrating that PML sustains SOX9 expression in aggressive BCa opens the possibility to bypass this limitation and inhibit the function of the transcription factor through upstream PML targeting.

In summary, our data provide proof-of-concept demonstration of the fact that PML-inhibiting compounds could exhibit strong potential for BCa therapy upon PML-based stratification.

Methods

Cell culture. MDA-MB-231, BT594, HBL100, MCF7 and T47D cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) or from Leibniz-Institut—Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ, Germany), who provided an authentication certificate. None of the cell lines used in this study was found in the database of commonly misidentified cell lines maintained by ICLAC and NCBI biosample. PDX44-derived cell line was generated by Dr Ibrahim and Dr Serra starting from xenograft tumours. Cell lines were routinely monitored for mycoplasma contamination and quarantined, while treated if positive. All cell lines were

maintained in DMEM media supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum and 1% (v/v) penicillin–streptomycin. OS formation assays were carried out as previously described⁶⁴. In brief, single-cell suspensions were plated in six-well tissue culture plates covered with poly-2-hydroxyethyl-methacrylate (Sigma, St Louis, MO) to prevent cell attachment, at a density of 3,000 cells per ml in serum-free DMEM supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 1% B27 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 ng ml⁻¹ epidermal growth factor (EGF) (Sigma, St. Louis, MO) and 2 ng ml⁻¹ fibroblast Growth Factor, basic (FGFb) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After 6 days in culture, OS were counted using a light microscope. For secondary OS formation, following the same protocol, 100,000 cells were plated in 100 mm dishes and collected by gentle centrifugation (200g) and dissociated enzymatically (5 min in 1:1 TrypLE solution at 37 °C, Life Technologies, cat: 12604013) and single cells were re-plated at a density of 3,000 cells per ml in six-well tissue culture plates for 6 days.

Generation of stable cell lines. 293FT cells were used for lentiviral production. Lentiviral vectors expressing shRNAs against human *PML*, *STAT3* and *SOX9* from the Mission shRNA Library were purchased from Sigma-Aldrich or Addgene. Cells were transfected with lentiviral vectors following standard procedures, and viral supernatant was used to infect cells. Selection was done using puromycin (2 µg ml⁻¹) for 48 h. As a control, a lentivirus with scrambled shRNA (shC) was used. Short hairpins sequence: sh1PML (TRCN0000003865): CCGCAATACAA CGACAGCCGAGA AACTCGAGTCTGGGCTGTGCTGTTGATTGTTTTT, sh2PML (TRCN0000003865): CCGCAATACAACGACAGCCGAGA AACTGAGTCTGGGCTGTGCTGTTGATTGTTTTT; sh4PML (TRCN 0000003867): CCGGCCAGTGTACGCTCTCCATCTCGAGATGGAGAAGGCGTACACT GGGTTTTT; sh5PML (TRCN 0000003867): CCGGGTGACCGGCAGATTGT GGATCTCGAGATCCACAATCTGCCGGTACACTTTTT; shC: CCGGCAACAA GATGAAGAGCACCACCTCGAGTGGTGTCTTCTCATCTTGTGTTG. sh4STAT3 (TRCN0000020841): CCGGGCTGAAATCATCATGCGGCTATCTCGAGATAGC CCATGATGATTTTCACTTTTTT; sh43STAT3 (TRCN0000020843): CCGGGCAA AGAATCACATGCCACTTCTCGAGAAGTGGCATGTGATTCTTTGCTTTTT. sh1SOX9 (Addgene, GenBank ID: RHS3979-9587792; GCATCCTCAATTTCTG TATA); sh2SOX9 (TRCN0000342824): CCGGCTCCACCTTACCTACATGAAC TCGAGTTCATGTAGGTGAAGGTGGAGTTTTT. Sub-cloning of shC and sh4PML into pLKO-Tet-On vector was done introducing AgeI and EcoRI in the 5'-end of top and bottom shRNA oligos, respectively (following the strategy provided by Dr Dmitri Wiederschain⁶⁵, Addgene plasmid: 21915). HA-PMLIV was sub-cloned into a TRIPZ vector using Age1–Mlu1 sites.

Immunoassays. Western blot analysis was carried out as previously described²⁰. Uncropped scans are provided as part of the Supplementary Information (Supplementary Fig. 7). In brief, cells were seeded on six-well plates and 4 days (unless otherwise specified) after seeding cell lysates were prepared with RIPA buffer (50 mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM beta-glycerophosphate and protease inhibitor cocktail; Roche). The following antibodies were used for western blotting: rabbit polyclonal anti-PML, 1:1,000 dilution (cat: A301-167A; Bethyl laboratories), rabbit polyclonal anti-phospho-STAT3 (Tyr705) 1:1,000 dilution and total STAT3 1:1,000 dilution (cat: 9145, 9132 respectively; Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-SOX9 1:2,000 dilution (cat: AB5535; CHEMICON International), HA-Tag polyclonal antibody 1:2,000 dilution (cat: C29F4, Cell Signaling Technology, Inc) and mouse monoclonal anti-beta-ACTIN 1:2,000 dilution (clone: AC-74, catalogue: A5316, Sigma-Aldrich). After standard SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting techniques, proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL) system.

For immunofluorescence, cells were seeded on glass cover slips in 24-well plates and 4 days after seeding, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (15 min), PBS (three times wash), 1% Triton X-100 (5 min), PBS (three times wash), 10% goat serum (1 h) and anti-PML antibody 1:100 dilution (catalogue A301-167A; Bethyl laboratories) was added overnight (4 °C) in goat serum. Cover slips were washed with PBS three times and incubated with secondary antibody (anti-rabbit Alexa488; Invitrogen-Molecular Probes) for 1 h (room temperature). Cover slips were washed with PBS three times, and 4,6-diamidino-2-phenylindole added to stain nuclei (10 min), followed by mounting with Mowiol. Immunofluorescence images were obtained with an AxioImager D1 microscope.

For immunohistochemistry, tissues were fixed in 10% neutral-buffered formalin and embedded in paraffin according to standard procedures. Three to four µm-thick sections were stained for PML (clone PG-M3 Santa Cruz Biotechnology Inc, sc-966, 1:200 dilution), and vimentin (1:1,000, NCL-L-VIM-V9, Novocastra). Antigen retrieval was performed with citrate buffer (pH 6). Detection was performed with the ABC Kit from Vector Laboratories and 3,3'-diaminobenzidine (DAB)-based development. Sections were counterstained with haematoxylin. The PML general immunoreactivity scoring system (used in Fig. 1h) is described in ref. 20. For the Marseille data set, PML (1:200), SOX9 (1:400, Millipore) and phospho-STAT3 (Tyr705) (1:100, Cell Signalling; M9C6) immunostaining was performed as reported^{11,20}. The percentage of PML-high (Ph) and -low (Pl) immunoreactive tumour cells in the Marseille data set was quantified separately and the *h*-score was calculated, attributing a relative value of 1 × to Pl and 2 × to Ph intensity nuclear

signal ($h = (1 \times \text{Pl}) + (2 \times \text{Ph})$). For SOX9 automated quantification and construction of tissue microarrays (TMAs) in the Marseille data set was carried out as reported²³. In brief, cores were punched from the selected paraffin blocks, and distributed in new blocks including two cores of 0.6 mm diameter for each tumour. All the TMA blocks were stored at 4 °C. TMA serial tissue sections were prepared 24 h before immunohistochemistry processing and stored at 4 °C. The immunoperoxidase procedures were performed using an automated Ventana Benchmark XT auto-stainer. This device allowed identical well-controlled procedures for antigen retrieval and Ventana kits.

Quantitative real-time PCR. Cells were seeded as for western blot. Total RNA was extracted from cells using NucleoSpin RNA isolation kit from Macherey-Nagel (ref: 740955.240C). Complementary DNA was produced from 1 µg of RNA using qScript cDNA SuperMix (Quanta Bioscience, ref: 95048). Taqman probes were obtained from Applied Biosystems. Amplifications were run in a Viiia7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using the following probes: *PML* (Hs00971694_m1, cat: 4331182) and *SOX9* (Hs01001343_g1, cat: 4331182). For *STAT3*, *SOX2* and *LGR5* amplification, Universal Probe Library (Roche) primers and probes were employed (*STAT3*, For: cccttgaggatgagatcaaga, Rev: aagcgcctatc tgctggct; probe: 14; *SOX2*, For: gggggaatggacctgtatag, Rev: gcaaacctcaccgtacca; probe: 65; *LGR5*, For: accagactatgctcttggaaac, Rev: ttccacaggagtggtacct; probe: 78). *β-actin* (Hs99999903_m1, cat: 4331182) and *GAPDH* (Hs02758991_g1, cat: 4331182) housekeeping assays from Applied Biosystems showed similar results (all quantitative PCR with reverse transcription data presented were normalized using *GAPDH*).

ALDH1 activity by FACS. To measure the ALDH1 activity present in the cells, the ALDEFLUOR assay was carried out according to manufacturer's (Stemcell Technologies) guidelines. In brief, dissociated MDA-MB-231 cells were resuspended in ALDEFLUOR assay buffer at a final concentration of 1.10⁶ ml⁻¹. ALDH substrate, bodipyaminoacetaldehyde was added to the cells at a final concentration of 1.5 mM. Immediately, half of the cells were transferred to an Eppendorf tube containing a two fold molar excess of the ALDH inhibitor, diethylaminobenzaldehyde. Both tubes were incubated for 45 min at 37 °C, and after this incubation cells were centrifuged at 250g for 5 min at 4 °C and resuspended in ice-cold ALDEFLUOR assay buffer. Cells were analysed using a FACSAria1 (Becton Dickinson) flow cytometer. DRAQ7 (BiosituS) was added prior analysis to each tube for dead cell exclusion. FACSAria1 was also used for sorting cells. Data were analysed using the FACSDiva software.

Reagents. For *in vitro* experiments, SI3-201 (Sigma-Aldrich, SML0330) was prepared at 10 mg ml⁻¹ in dimethylsulfoxide and used at the indicated concentrations. TG101348 (Santa Cruz, sc-364740) was prepared 100 mg ml⁻¹ in dimethylsulfoxide and used at the indicated concentrations. ATO (Sigma-Aldrich) was prepared at a concentration of 100 mM in NaOH 1 N and subsequently diluted to 0.1 mM in PBS for a 1,000 × working solution. ATO was used at 150 nM either 3 or 6 days as indicated in figure legends. For *in vivo* experiments a dose of 5 mg kg⁻¹ per day was intraperitoneally administered.

Mice. Xenograft experiments were carried out following the ethical guidelines established by the Biosafety and Welfare Committee at CIC bioGUNE and Biodonostia Institute. The procedures employed were carried out following the recommendations from AAALAC. Xenograft experiments were performed as previously described⁶⁶, injecting either 5.10⁵ or 5.10⁴ cells per condition (unless otherwise specified), four injections per mouse. Metastasis experiment was approved by the institutional animal care and use committee of IRB-Barcelona. For tail vein injections, cells were resuspended in PBS and injected into tail vein of mice using a 26 G needle (1.2 × 10⁵ cells per mouse), as previously described²⁵. Cell lung colonization capacity was scored 21 days post inoculation by human vimentin. PML expression was scored as undetectable (PML 0) and detectable (PML 1 +, 2 + and 3 +). All mice (female Hsd:ATHymic Nude-Foxn1 nu/nu) were inoculated at 8–12 weeks of age.

ChIP. ChIP was performed using the SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (cat: 9003, Cell Signaling Technology, Inc). MDA-MB-231 cells were grown in 150 mm dishes either with or without 50 ng ml⁻¹ doxycycline during 3 days. Cells from three 150 mm dishes (2.5 × 10⁷ cells) were cross-linked with 35% formaldehyde for 10 min at room temperature. Glycine was added to dishes, and cells incubated for 5 min at room temperature. Cells were then washed twice with ice-cold PBS, and scraped into PBS + PMSF. Pelleted cells were lysed and nuclei were collected following manufacturer's instructions. Nuclear lysates were digested with micrococcal nuclease for 20 min at 37 °C and then sonicated in 500 µl aliquots on ice for three pulses of 15 s using a Branson sonicator. Cells were held on ice for at least 1 min between sonications. Lysates were clarified at 11,000g for 10 min at 4 °C, and chromatin was stored at –80 °C. HA-Tag polyclonal antibody (cat: C29F4, Cell Signaling Technology), rabbit polyclonal anti-PML (cat: A301-167A; Bethyl laboratories) and IgG antibody (cat: 2729, Cell Signaling Technology, Inc), were incubated overnight (4 °C) with rotation and protein G magnetic beads were

incubated 2 h (4 °C). Washes and elution of chromatin were performed following manufacturer's instructions. DNA quantification was carried out using a Via7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with SybrGreen reagents and primers that amplify the predicted PML binding region to SOX9 promoter (chr17:70117013-70117409) as follows: left primer: ccggaactttcttgcag and right primer: cggcgagcacttaggaag.

Patient data sets, bioinformatics and statistical analysis. All studies involving human subjects were approved by the corresponding committees with informed consent as stated in the original publications^{3,23,25}. The use of MSK/EMC and Marseille cohorts were previously described^{23,25}. For MSK/EMC, MFS curves were plotted using Kaplan–Meier estimates and compared using the Gehan–Breslow–Wilcoxon test. Two groups were compared using mean PML expression values as the cutoff between PML high and low. Kaplan–Meier survival and correlation analysis in patient samples: publicly available and clinically annotated BCa cohorts with gene expression profiles (GSE2603, GSE2034, GSE5327 and GSE12276) were pooled as described above. To remove systematic biases, before merging the expression measurements were converted to z scores for all genes. For intrinsic subtype classification, we carried out the following analysis: for luminal genes, *ESR1* and *PGR1* presented a bimodal distribution. We used package *mlcut* to fit a mixture of normal distributions with two components and obtain the posterior probability that each patient belongs to the luminal low and luminal high components. A patient was considered luminal low if the posterior probability of belonging to this group was > 80%. The same criterion was used for luminal high. When a patient was neither luminal high nor luminal low, it was considered luminal intermediate. Proliferation status (Prol) and *ERBB2* expression did not present a bimodal distribution. Therefore, half of the patients with lowest mean values were considered proliferation low. The rest were considered proliferation high. After defining high and low populations for each parameter, the subtypes were constructed as follows: luminal A: Prol low, *ESR1* intermediate or high, luminal intermediate or high; luminal B: Prol high, *ESR1* intermediate or high, luminal intermediate or high; *HER2* enriched: Prol high, *ESR1* intermediate or low, luminal intermediate or low; *ERBB2* high; basal like: Prol high, *ESR1* low, luminal low; *ERBB2* low, *PGR1* low. Sixty-four patients could not be assigned to any subtype according to PAM50's classification. A Cox proportional hazards model was fitted to compute HR. Likelihood ratio tests were performed to compute P values. The HR was checked for constancy over time, fulfilling Cox model assumptions.

For Curtis data set patients, RNA was extracted from 1,980 tumours as described³. RNA hybridizations were performed using Illumina HT-12 v3 platform and analysed using the bioconductor bead array package⁶⁷. The BASH algorithm⁶⁸ was applied to correct for spatial artefacts in the arrays. Bead-level data were summarized and re-annotated as described in ref. 3. Log-intensity values for PML expression were scaled to z scores. Probe selection was performed on the basis of probe quality, 3'-position, no other genomic matches and no single-nucleotide polymorphisms in the region. On the basis of these criteria, PML probe ILMN_1731299 was selected for analysis. Survival analysis was done using as endpoints MFS at 5 years (distant metastasis as event). Two groups were compared using mean PML expression values as the cutoff between PML high and low. We used the log-rank test as implemented in the survival R package⁶⁹.

For therapy response analysis, publicly available data sets (GSE22093 and GSE23988) were downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO), and subjected to background correction, log₂ transformation and quartile normalization.

For correlation analysis with *STAT3* signatures, gene sets were extracted (ref. 37, and [http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/V\\$STAT3_01](http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/V$STAT3_01)) and average signal value in the MSK/EMC data set was calculated. These values were used to perform the correlation analysis with PML signal values (Pearson correlation).

No statistics were applied to determine sample size. The experiments were not randomized. The investigators were not blinded to allocation during experiments and outcome assessment. Data analysed by parametric tests are represented by the mean ± s.e.m. of pooled experiments unless otherwise stated. *n* values represent the number of independent experiments performed or the number of individual mice or patient specimens. For each independent *in vitro* experiment, at least three technical replicates were used and a minimum number of three experiments were performed to ensure adequate statistical power. Analysis of variance test was used for multi-component comparisons and Student's *t*-test for two-component comparisons. In the *in vitro* experiments, normal distribution was confirmed or assumed (for *n* < 5) and Student's *t*-test was applied for two-component comparisons. Two-tailed statistical analysis was applied for experimental design without predicted result, and one tail for validation or hypothesis-driven experiments. The confidence level used for all the statistical analyses was of 0.95 (alpha value = 0.05). Tumour-initiating cell frequency was estimated using ELDA software as previously described⁷⁰.

Data availability. Data from public repositories analysed throughout this manuscript (see the 'Patient data sets, bioinformatics and statistical analysis' section) is available as indicated in the referenced publications.

References

- Haber, D. A., Gray, N. S. & Baselga, J. The evolving war on cancer. *Cell* **145**, 19–24 (2011).
- Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 10869–10874 (2001).
- Curtis, C. *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346–352 (2012).
- Normanno, N. *et al.* Prognostic applications of gene expression signatures in breast cancer. *Oncology (Williston Park)* **77**(Suppl 1): 2–8 (2009).
- van de Vijver, M. J. *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1999–2009 (2002).
- Stingl, J. & Caldas, C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 791–799 (2007).
- Valent, P. *et al.* Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 767–775 (2012).
- Li, F., Tiede, B., Massague, J. & Kang, Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* **17**, 3–14 (2007).
- Jo, A. *et al.* The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes Dis.* **1**, 149–161 (2014).
- Larsimont, J. C. *et al.* Sox9 controls self-renewal of oncogene targeted cells and links tumor initiation and invasion. *Cell Stem Cell* **17**, 60–73 (2015).
- Matheu, A. *et al.* Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Res.* **72**, 1301–1315 (2012).
- Guo, W. *et al.* Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* **148**, 1015–1028 (2012).
- Malhotra, G. K. *et al.* The role of Sox9 in mouse mammary gland development and maintenance of mammary stem and luminal progenitor cells. *BMC Dev. Biol.* **14**, 47 (2014).
- Wang, H. *et al.* SOX9 regulates low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) and T-cell factor 4 (TCF4) expression and Wnt/beta-catenin activation in breast cancer. *J. Biol. Chem.* **288**, 6478–6487 (2013).
- Bernardi, R. & Pandolfi, P. P. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 1006–1016 (2007).
- Carracedo, A., Ito, K. & Pandolfi, P. P. The nuclear bodies inside out: PML conquers the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **23**, 360–366 (2011).
- Martin-Martin, N., Sutherland, J. D. & Carracedo, A. PML: not all about tumor suppression. *Front. Oncol.* **3**, 200 (2013).
- Ito, K. *et al.* PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* **453**, 1072–1078 (2008).
- Ito, K. *et al.* A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Med.* **18**, 1350–1358 (2012).
- Carracedo, A. *et al.* A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *J. Clin. Invest.* **122**, 3088–3100 (2012).
- Li, H. *et al.* Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)-expressing cells are enriched in triple-negative breast cancer. *Int. J. Biol. Markers* **28**, e357–e364 (2013).
- Baccelli, I. & Trumpp, A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J. Cell Biol.* **198**, 281–293 (2012).
- Charpin, C. *et al.* Validation of an immunohistochemical signature predictive of 8-year outcome for patients with breast carcinoma. *Int. J. Cancer* **131**, E236–E243 (2012).
- Chiang, A. C. & Massague, J. Molecular basis of metastasis. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2814–2823 (2008).
- Morales, M. *et al.* RARRES3 suppresses breast cancer lung metastasis by regulating adhesion and differentiation. *EMBO Mol. Med.* **6**, 865–881 (2014).
- Pavlovic, M. *et al.* Enhanced MAF Oncogene Expression and Breast Cancer Bone Metastasis. *J. Natl Cancer Inst.* **107**, djv256 (2015).
- Iwamoto, T. *et al.* Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. *J. Natl Cancer Inst.* **103**, 264–272 (2011).
- Minn, A. J. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**, 518–524 (2005).
- Bos, P. D., Nguyen, D. X. & Massague, J. Modeling metastasis in the mouse. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 571–577 (2010).
- Gupta, G. P. *et al.* ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 19506–19511 (2007).
- Bos, P. D. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* **459**, 1005–1009 (2009).
- Dror, N. *et al.* Interferon regulatory factor-8 is indispensable for the expression of promyelocytic leukemia and the formation of nuclear bodies in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 5633–5640 (2007).

33. Stadler, M. *et al.* Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* **11**, 2565–2573 (1995).
34. Hubackova, S., Krejčíková, K., Bartek, J. & Hodny, Z. Interleukin 6 signaling regulates promyelocytic leukemia protein gene expression in human normal and cancer cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 26702–26714 (2012).
35. Lavau, C. *et al.* The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene* **11**, 871–876 (1995).
36. Yeh, Y. T. *et al.* STAT3 ser727 phosphorylation and its association with negative estrogen receptor status in breast infiltrating ductal carcinoma. *Int. J. Cancer* **118**, 2943–2947 (2006).
37. Azare, J. *et al.* Constitutively activated Stat3 induces tumorigenesis and enhances cell motility of prostate epithelial cells through integrin beta 6. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4444–4453 (2007).
38. Tatham, M. H. *et al.* RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat. Cell. Biol.* **10**, 538–546 (2008).
39. Lallemand-Breitenbach, V. *et al.* Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat. Cell. Biol.* **10**, 547–555 (2008).
40. Weinstein, I. B. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science* **297**, 63–64 (2002).
41. Perou, C. M., Parker, J. S., Prat, A., Ellis, M. J. & Bernard, P. S. Clinical implementation of the intrinsic subtypes of breast cancer. *Lancet Oncol.* **11**, 718–719 (2010).
42. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
43. Consortium EP. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* **306**, 636–640 (2004).
44. Gerstein, M. B. *et al.* Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature* **489**, 91–100 (2012).
45. Wang, J. *et al.* Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. *Genome Res.* **22**, 1798–1812 (2012).
46. Wang, J. *et al.* Factorbook.org: a Wiki-based database for transcription factor-binding data generated by the ENCODE consortium. *Nucleic Acids Res.* **41**, D171–D176 (2013).
47. Vernier, M. *et al.* Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev.* **25**, 41–50 (2011).
48. von Mikecz, A., Zhang, S., Montminy, M., Tan, E. M. & Hemmerich, P. CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. *J. Cell Biol.* **150**, 265–273 (2000).
49. Kuo, H. Y. *et al.* PML represses lung cancer metastasis by suppressing the nuclear EGFR-mediated transcriptional activation of MMP2. *Cell Cycle* **13**, 3132–3142 (2014).
50. Weinstein, B. Relevance of the concept of oncogene addiction to hormonal carcinogenesis and molecular targeting in cancer prevention and therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **617**, 3–13 (2008).
51. Weinstein, I. B. & Joe, A. Oncogene addiction. *Cancer Res.* **68**, 3077–3080 discussion 3080 (2008).
52. Lo-Coco, F. & Ammatuna, E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **156-161**, 514 (2006).
53. Fazilaty, H., Gardaneh, M., Akbari, P., Zekri, A. & SLUG, Behnam B. and SOX9 Cooperatively Regulate Tumor Initiating Niche Factors in Breast Cancer. *Cancer Microenviron.* **9**, 71–74 (2016).
54. Hiraoka, K. *et al.* SOX9-mediated upregulation of LGR5 is important for glioblastoma tumorigenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460**, 216–221 (2015).
55. Hong, Y. *et al.* Upregulation of sex-determining region Y-box 9 (SOX9) promotes cell proliferation and tumorigenicity in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **6**, 31241–31254 (2015).
56. Luanpitpong, S. *et al.* SLUG is required for SOX9 stabilization and functions to promote cancer stem cells and metastasis in human lung carcinoma. *Oncogene* **35**, 2824–2833 (2016).
57. Roche, K. C. *et al.* SOX9 maintains reserve stem cells and preserves radioresistance in mouse small intestine. *Gastroenterology* **149**, 1553–1563 e1510 (2015).
58. Scott, C. E. *et al.* SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nat. Neurosci.* **13**, 1181–1189 (2010).
59. Furuyama, K. *et al.* Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* **43**, 34–41 (2011).
60. Adam, R. C. *et al.* Pioneer factors govern super-enhancer dynamics in stem cell plasticity and lineage choice. *Nature* **521**, 366–370 (2015).
61. Garros-Regulez, L. *et al.* mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert. Opin. Ther. Targets* **20**, 393–405 (2016).
62. Willis, S. *et al.* Enriched transcription factor signatures in triple negative breast cancer indicates possible targeted therapies with existing drugs. *Meta Gene* **4**, 129–141 (2015).
63. Johnston, S. J. & Carroll, J. S. Transcription factors and chromatin proteins as therapeutic targets in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1855**, 183–192 (2015).
64. Piva, M. *et al.* Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol. Med.* **6**, 66–79 (2014).
65. Wiederschain, D. *et al.* Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle* **8**, 498–504 (2009).
66. Carracedo, A. *et al.* Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* **118**, 3065–3074 (2008).
67. Dunning, M. J., Smith, M. L., Ritchie, M. E. & Tavare, S. beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics* **23**, 2183–2184 (2007).
68. Cairns, J. M., Dunning, M. J., Ritchie, M. E., Russell, R. & Lynch, A. G. BASH: a tool for managing BeadArray spatial artefacts. *Bioinformatics* **24**, 2921–2922 (2008).
69. Therneau, T. M. & Grambsch, P. M. *Statistics for Biology and Health* (Springer, 2000).
70. Hu, Y. & Smyth, G. K. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J. Immunol. Methods* **347**, 70–78 (2009).

Acknowledgements

Apologies to those whose related publications were not cited due to space limitations. We thank Dr Miquel Angel Pujana for insightful discussions, Dr Monika González for technical help, Dr Miriam Rábano for technical help with flow cytometry cell sorting and Dr Aleix Prat for the evaluation of the intrinsic subtypes in PDX. The work of A.C. is supported by the Ramón y Cajal award, the Basque Department of Industry, Tourism and Trade (Etorrek), Health (2012111086) and Education (PI2012-03), Marie Curie (277043), Movember Foundation (GAP1), ISCIII (PI10/01484, PI13/00031), FERO (VIII Fellowship) and ERC (336343). N.M.-M. and P.A. are supported by the Spanish Association Against Cancer (AECC), AECC JP Vizcaya and Guipuzcoa, respectively. J.U. and F.S. are Juan de la Cierva Researchers (MINECO). L.A., A.A.-A. and L.V.-J. are supported by the Basque Government of education. M.L.-M.C. acknowledges SAF2014-54658-R and Asociación Española contra el Cancer. R.B. acknowledges Spanish MINECO (BFU2014-52282-P, Consolider BFU2014-57703-REDC), the Departments of Education and Industry of the Basque Government (PI2012/42) and the Bizkaia County. M.S., V.S. and J.B. acknowledge Banco Bilbao Vizcaya Argentaria (BBVA) Foundation (Tumour Biomarker Research Program). M.S. and J.B. are supported by NIH grant P30 CA008748. M.d.M.V. is supported by the Institute of Health Carlos III (PI11/02251, PI14/01328) and Basque Government, Health Department (2014111145). A.M. is supported by ISCIII (CP10/00539, PI13/02277) and Marie Curie CIG 2012/712404. V.S. is supported by the SCIII (PI13/01714, CP14/00228), the FERO Foundation and the Catalan Agency AGAUR (2014 SGR 1331). R.R.G. research support is provided by the Spanish Ministry of Science and Innovation grant SAF2013-46196, BBVA Foundation, the Generalitat de Catalunya (2014 SGR 535), Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and FEDER funds (SAF2013-46196).

Authors contributions

N.M.-M. and M.P. performed all the *in vitro* and *in vivo* experiments, unless specified otherwise. P.A., J.U., M.G., F.S., A.M. and R.R.G. performed or coordinated (A.M. and R.R.G.) *in vivo* tumour formation and metastasis assays. J.D.S. and R.B. generated PML inducible overexpressing and silencing lentiviral vectors. S.F.-R. performed the histochemical stainings and contributed to *in vitro* analyses. L.A. and I.M. contributed to *in vitro* analyses. V.T. contributed to the SOX9 promoter analysis. N.R.-R., S.G. and J.L.I. performed or coordinated (J.L.I.) the immunohistochemical scoring in patient specimens. A.R.C., E.P., O.M.R., A.M.A. and C.C. performed or coordinated (A.M.A. and C.C.) the bioinformatic and biostatistical analysis. G.D. performed ALDH1 analysis. Y.I., M.S., J.B. and V.S. generated the PDX. A.Z.-L., A.A.-A., P.Z., A.C.-M., L.V.-J., P.S.-M., M.V.-R., M.L.-M.C., J.A. and C.H.L. contributed to the experimental design and discussion. M.d.M.V., A.M. and R.R.G. contributed to the experimental design, data analysis and discussion. A.C. directed the project, contributed to data analysis and wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Martín-Martín, N. *et al.* Stratification and therapeutic potential of PML in metastatic breast cancer. *Nat. Commun.* 7:12595 doi: 10.1038/ncomms12595 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

SOX9-regulated cell plasticity in colorectal metastasis is attenuated by rapamycin

Estefania Carrasco-Garcia¹, Lidia Lopez¹, Paula Aldaz¹, Sara Arevalo¹, Juncal Aldaregia¹, Larraitz Egaña¹, Luis Bujanda², Martin Cheung³, Nicolas Sampron¹, Idoia Garcia^{1,4} & Ander Matheu^{1,4}

Received: 02 March 2016
Accepted: 08 August 2016
Published: 30 August 2016

The cancer stem cell (CSC) hypothesis proposes a hierarchical organization of tumors, in which stem-like cells sustain tumors and drive metastasis. The molecular mechanisms underlying the acquisition of CSCs and metastatic traits are not well understood. SOX9 is a transcription factor linked to stem cell maintenance and commonly overexpressed in solid cancers including colorectal cancer. In this study, we show that SOX9 levels are higher in metastatic (SW620) than in primary colorectal cancer cells (SW480) derived from the same patient. This elevated expression correlated with enhanced self-renewal activity. By gain and loss-of-function studies in SW480 and SW620 cells respectively, we reveal that SOX9 levels modulate tumorsphere formation and self-renewal ability *in vitro* and tumor initiation *in vivo*. Moreover, SOX9 regulates migration and invasion and triggers the transition between epithelial and mesenchymal states. These activities are partially dependent on SOX9 post-transcriptional modifications. Importantly, treatment with rapamycin inhibits self-renewal and tumor growth in a SOX9-dependent manner. These results identify a functional role for SOX9 in regulating colorectal cancer cell plasticity and metastasis, and provide a strong rationale for a rapamycin-based therapeutic strategy.

Cancers display a high degree of heterogeneity between individual patients but also between cancer cells within the same tumor. Both types of heterogeneity affect clinical practice. During the last decade, it has been demonstrated that there is a population of cancer cells with stem-like properties, so-called cancer stem cells (CSCs), in several types of malignancies. CSCs are defined by their abilities to self-renew and generate differentiated progeny. These characteristics enable them to be the root of malignancies and to play a major role in tumor initiation and recurrence, therapy resistance and metastasis¹.

Colorectal adenocarcinoma is the second most commonly diagnosed type of cancer and constitutes the second leading cause of cancer-related mortality worldwide, causing nearly 700,000 deaths per year². Colorectal cancer occurs sporadically in the majority of cases, being due to inherited mutations in less than 10% of patients. In most patients, death is not caused by the primary tumor, but rather by its metastasis in other organs and associated complications. Indeed, patients are generally diagnosed at an advanced stage, wherein the 5-year survival rate is only 11.7%².

Ten years ago, various research groups demonstrated the existence of colorectal cancer stem cells (CR-CSCs), and revealed these cells to be responsible for treatment resistance³. More recently, it has been identified that CR-CSCs have a role as drivers of the metastatic progression of colorectal cancer⁴. Moreover, the expression of the CD44v6 variant of CD44 or CD110 was shown to serve as a biomarker for this CR-CSC pool of colorectal metastasis drivers^{5,6}. These studies started to unravel the mechanisms involved in the regulation of CR-CSCs associated with metastasis and showed that plasticity between CR-CSCs and non-CR-CSCs occurs at advanced stages of tumor progression.

The transcription factor Sex-determining region Y (SRY)-box 9 (SOX9) plays a crucial role in stem cell maintenance and lineage commitment during embryonic development and also in adult tissue homeostasis. In the intestinal epithelium, lineage tracing and loss of function mouse models identified that Sox9 is a key regulator of

¹Cellular Oncology group, Biodonostia Institute, San Sebastian, Spain. ²Department of Gastroenterology, Hospital Donostia and Instituto Biodonostia, University of the Basque Country, Centro de Investigacion Biomedica en Red en Enfermedades Hepaticas y Digestivas (CIBERehd), San Sebastian, Spain. ³School of Biomedical Sciences, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong, China. ⁴IKERBASQUE, Basque Foundation, Bilbao, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.M. (email: ander.matheu@biodonostia.org)

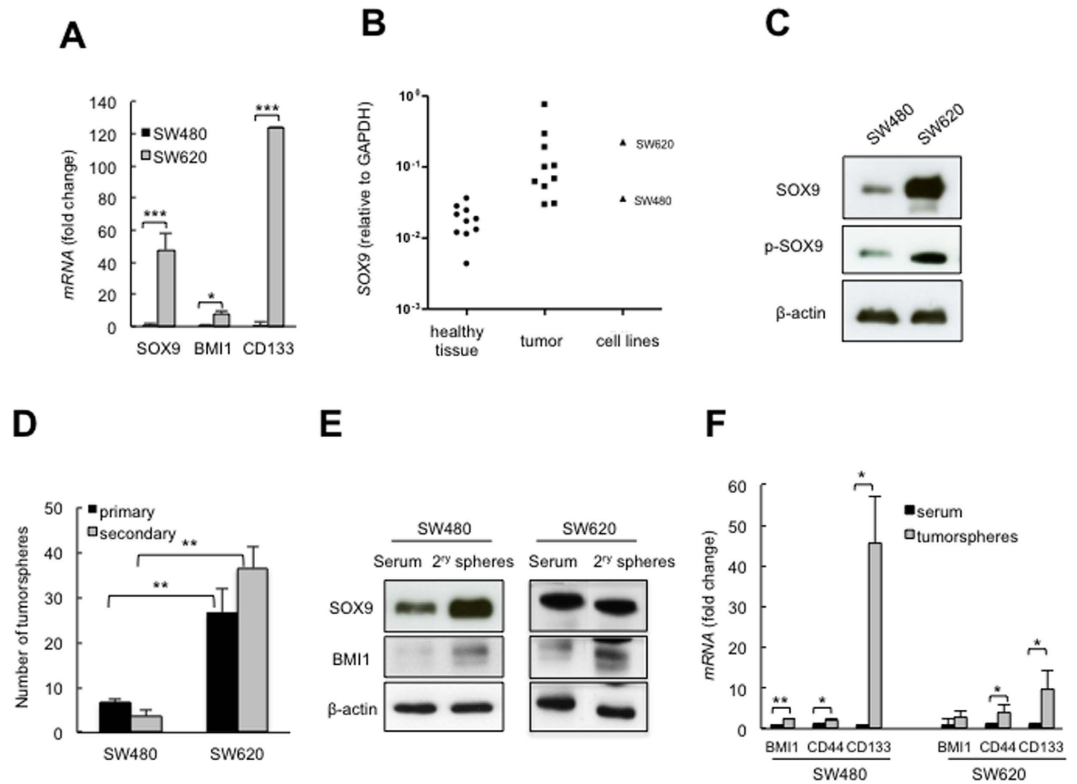


Figure 1. High levels of SOX9 correlate with CR-CSCs. (A) Higher expression of stem cell markers in SW620 than in SW480 cells ($n \geq 3$). (B) SOX9 mRNA expression relative to GAPDH in normal and tumoral colonic paired human samples and in SW480 and SW620 cell lines. (C) Higher SOX9 protein expression and phospho-SOX9 (S181) in SW620 cells than in SW480 cells. (D) Number of tumorspheres derived from SW480 and SW620 cells ($n = 6$). (E) SOX9 and BMI1 protein expression in tumorspheres and in parental SW480 and SW620 cells ($n = 3$). (F) Stem cell marker mRNA expression levels in tumorspheres relative to the corresponding parental cells ($n \geq 3$).

tissue homeostasis, regeneration and tumor initiation, through its functions in stem/progenitor cell maintenance and Paneth cell differentiation^{7–11}. These activities arise acting as an effector and at the same time regulator of Wnt signaling¹⁰, a pathway whose activation is sufficient to initiate colorectal tumors, that is relevant for the maintenance of CR-CSCs¹². Moreover, it is the most frequently aberrantly activated pathway in colorectal cancer¹³.

There is growing evidence of the impact of SOX9 in human malignancies^{14–17}. In particular, several studies have revealed that SOX9 is commonly overexpressed in colorectal cancers^{18–23}, even in cases where the gene is mutated, event which happens in around 5–10% of cases^{13,24}. Clinico-pathologically, high SOX9 expression correlates with tumor progression and advanced tumor stage¹⁸ and has been associated with lower overall patient survival^{20,21}. Functional studies have supported the view that SOX9 plays a pro-oncogenic role in primary colorectal cancer cells^{18,21}, but under some circumstances it behaves as a tumor suppressor^{25,26}. The role of SOX9 in the regulation of CR-CSCs has not been previously explored. In this work, we found that SOX9 is sufficient and necessary for the acquisition and maintenance of CR-CSC and metastatic traits, properties linked to transcriptional and post-transcriptional regulation. Finally, we reveal that SOX9-mediated self-renewal and growth is impaired by the mTOR inhibitor rapamycin.

Results and Discussion

High levels of SOX9 correlate in CR-CSCs and metastatic cells. SW480 and SW620 cell lines were derived from a primary colorectal adenocarcinoma and its lymph node metastasis, respectively²⁷. We started by characterizing the expression of CR-CSC markers³, finding that metastatic SW620 cells had higher levels of *BMI1*, *CD133* and *SOX9* than SW480 primary cells (Fig. 1A). These differences were markedly strong in the case of the last two genes. When *SOX9* levels were compared with CRC human samples and matched adjacent colon tissue, we found *SOX9* expression significantly increased in CRC tissues ($p < 0.05$), with levels in SW620 being between the most highly expressed cancer tissues, whereas in SW480 were near the lowest cases (Fig. 1B). Therefore, the level of expression of SOX9 in SW480 and SW620 cell lines is within the range of overexpression observed in human colorectal samples, suggesting that their levels are of biological relevance. SOX9 protein levels were also strikingly elevated in SW620 cells as well as phosphorylated SOX9 at serine 181 (Fig. 1C). This site is known to stimulate SOX9 transcriptional and DNA-binding activity²⁸, indicating that SOX9 upregulation in metastatic cells is associated with transcriptional and post-transcriptional modifications. In clinical samples, SOX9 expression is higher in liver metastasis than matched primary colorectal cancers, where it is part of an aggressive stem

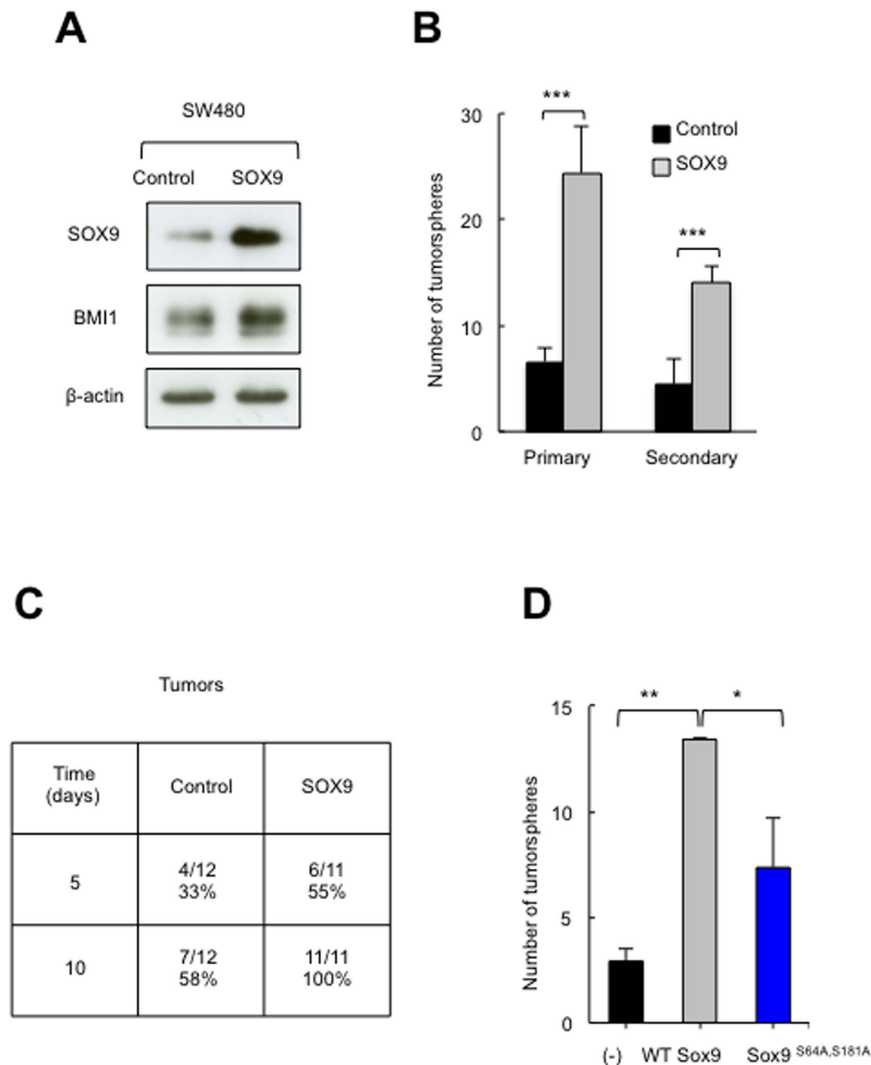


Figure 2. SOX9 overexpression provides self-renewal ability. (A) Representative immunoblots of SOX9 and BMI1 in SW480 cells transduced with SOX9 (SOX9) or empty vector (control) ($n = 3$). (B) Number of primary and secondary tumorspheres in control and SOX9 overexpressing SW480 cells ($n \geq 3$). (C) Tumor initiation ability of indicated genotypes. Frequency of tumors formed in immunocompromised mice after subcutaneous injection of $1 \cdot 10^6$ cells. (D) Number of tumorspheres formed in control (-), Sox9^{S64A,S181A} and WT Sox9 SW480 transduced cells ($n = 3$).

cell signature together with ASCL2, LGR5, EPHB3 and ETS2²⁹. Hence, our molecular identification of SOX9 is consistent with the clinical data, and together they show that SOX9 exhibits a dynamic expression in colorectal cancer, with high levels of SOX9 being associated with CR-CSCs and metastasis.

Next, we observed that the metastatic cells exhibited greater capacity to form tumorspheres (primary) than SW480 cells (26.6 in SW620 vs. 6.7 in SW480). Moreover, the ability for self-renewal, measured in terms of the number of secondary tumorspheres, was also much higher in SW620 cells (Fig. 1D). In agreement with the enrichment in the CR-CSC pool, we detected elevated expression of *CD133*, *CD44* and BMI1, as well as SOX9, in tumorspheres formed from both cell lines (Fig. 1E,F). The above information, together with the evidence that both cell lines belong to the stem-like subtype showing high Wnt activity³⁰, postulates SW480 and SW620 as suitable models to study the role of SOX9 in cellular plasticity and metastasis.

SOX9 overexpression provides stemness properties to colorectal cancer cells. To determine whether SOX9 activity is involved in the plasticity between non-CR-CSCs and CR-CSCs, we used a lentiviral vector harboring a plasmid with the SOX9 coding sequence to produce SOX9-overexpressing SW480 cells, and compared their functional properties to control empty-vector transduced cells. Western blotting revealed the overexpression of SOX9 in SW480 cells (Fig. 2A). Importantly, the ability to form tumorspheres was markedly different between control and SOX9 overexpressing cells. Indeed, cells with SOX9 overexpression generated 4-fold greater number of primary tumorspheres and 2.5-fold higher secondary tumorsphere formation (Fig. 2B). Next, we determined the effect of SOX9 overexpression on tumor initiation, a distinctive feature of CSCs¹. Notably, by

10 days, all immunodeficient Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu} mice inoculated with SOX9 overexpressing cells had developed tumors, compared to just over half (58%) of tumors derived from control cells (Fig. 2C). These results indicate that SOX9 promotes the acquisition of CR-CSC characteristics, both *in vitro* and also *in vivo*.

Given the differences observed in phosphorylated SOX9 between primary and metastatic cells, we wondered whether this activity might play a role in the gain of stemness. For this, we transduced SW480 cells with a construct containing point mutations at S64 and S181 phosphorylation sites (Sox9^{S64A,S181A}) or WT-Sox9³¹ and compared them to non-infected cells. We found that Sox9^{S64A,S181A} cells formed fewer tumorspheres (0.65 fold) than WT-Sox9 and slightly more than controls (Fig. 2D). Another study has recently found that SLUG prevents SOX9 ubiquitin-mediated proteasomal degradation, thereby controlling its stability and maintaining lung CSC activity³². To our knowledge, these studies have provided the first proofs of a role for SOX9 post-translational modifications associated with cancer phenotypes.

Since cancer cell motility and consequent invasion of the basement membrane have been associated with the gain of CSC properties and an epithelial mesenchymal transition (EMT) program³³, we investigated the effect of ectopic SOX9 overexpression on these phenotypes. Stable overexpression of SOX9 resulted in a significant increase in the migratory potential of SW480 cells (Fig. 3A). Collagen invasion assays showed that high levels of SOX9 also enhanced their invasive potential (Fig. 3B). Moreover, migration ability (Fig. 3C) and invasive potential (Fig. 3D) were impaired in Sox9^{S64A,S181A} cells, indicating that SOX9 phosphorylation is necessary, at least in part, for these processes. Next, we measured the expression of several EMT markers and detected a reduction in the expression of the epithelial adhesion protein E-Cadherin (Fig. 3E). In addition, SOX9 overexpression provoked a robust induction of the mesenchymal marker Vimentin (Fig. 3E,F), which was reduced in cells lacking the phosphorylation sites (Fig. 3G). A previous study found that ectopic SOX9 induced an epithelial mesenchymal transition (EMT) and led to the formation of more metastasis *in vivo* in an additional primary colorectal cell line²¹. Hence, high levels of SOX9 confer motility, invasive properties and a mesenchymal phenotype to primary colorectal carcinoma cells, all of them important features for the translocation of a cancer cell from the primary tumor to a distant tissue in metastasis.

At a molecular level, we have previously described that Sox9 modulates proliferation directly regulating Bmi1¹⁸, a stem cell marker which genetic or pharmacologic inhibition irreversibly impairs CR-CSC activity³⁴. Since we observed higher levels of both of them associated to CR-CSCs population (Fig. 1E), and in clinical samples¹⁸, we reasoned that BMI1 may be involved in SOX9-mediated colorectal cancer cell plasticity. In agreement with our hypothesis, the expression of BMI1 was higher in SOX9 overexpressing SW480 cells (Fig. 2A). In contrast, SW620 SOX9 silencing cells displayed BMI1 downregulation (Fig. 4A). ChIP-seq experiments revealed that SOX9 binds to the promoter of BMI1 in colorectal cells³⁵, supporting that this regulation is direct. Overall, these data indicate that SOX9 modulates colorectal cancer cell plasticity regulating the dynamics of BMI1 and postulate SOX9-BMI1 as a critical axis for maintaining CR-CSCs activity and colorectal cancer pathobiology.

SOX9 is necessary for CR-CSCs maintenance. Having demonstrated that SOX9 promotes the acquisition of self-renewal and metastatic traits in primary colorectal carcinoma cells, we next determined its function in metastatic cells. For this, we knocked down SOX9 in SW620 cells using a specific short hairpin RNA (*shSOX9*). Quantitative real-time PCR and Western blotting demonstrated the silencing of the endogenous expression of SOX9 by *shSOX9* (Fig. 4A,B). Strikingly, SOX9 downregulation resulted in a significant decline in the formation of both primary and secondary tumorspheres relative to that in SW620 control cells (Fig. 4C). Therefore, SOX9 silencing abrogates the self-renewal ability of colon metastatic cells *in vitro*.

To corroborate the functional need of SOX9 for CR-CSC maintenance, we moved onto *in vivo* experiments. The ability to initiate tumors was severely impaired in SOX9-silenced cells relative to control cells. Specifically, 41% of injections with *shSOX9* cells developed tumors, while tumors were generated in all mice injected with control cells (Fig. 4D). Similarly, only 11% of inoculations developed tumors when injected with an additional short hairpin targeting a different SOX9 sequence (*shSOX9-2*) (Fig. 4D). Furthermore, tumors originating from *shSOX9* and *shSOX9-2* cells grew more slowly than those from control cells (Fig. 4E,F). Strikingly, the impaired tumorigenic activity of SOX9 knockdown cells (Fig. 4G) was further corroborated *in vivo* by reduced cell proliferation in the tumors. *shSOX9* derived xenografts displayed lower number of Ki67 positive cells than tumors derived from control cells ($p = 0.00049$) (Fig. 4G,H). Together, these results show that the expression of SOX9 acts as a pleiotropic regulator maintaining self-renewal but also governing the proliferative capacity of colorectal cancer cells.

Next, we studied whether SOX9-mediated loss of stemness properties could affect phenotypes necessary for metastatic colonization in distant organs³⁶. Thus, the invasive potential of metastatic cells *in vitro* was impaired as a consequence of SOX9 silencing (Fig. 5A). Moreover, immunofluorescence and Western blot analysis revealed that the levels of the mesenchymal markers Vimentin and N-Cadherin were lower in SW620 cells in the absence of SOX9 *in vitro* (Fig. 5B,C). These results were further validated in tumors originated from *shSOX9* cells (Fig. 5D). In line with these findings, genome-wide chromatin immunoprecipitation with DNA sequencing ChIP-seq analysis identified genes involved in EMT and quiescence as targets of SOX9 in colorectal cancer cells³⁵. In summary, our results demonstrate that SOX9 activity is required for retaining metastatic CR-CSC functional properties.

SOX9 mediates rapamycin anti-tumorigenic effect. In CRC SOX9 overexpression is a strong predictor of shorter survival in 5-FU-treated patients and enhanced vascular invasion in biopsies²², whereas intestine stem cells expressing high levels of Sox9 are more resistant to irradiation in mice³⁷. Since activation of CR-CSC signaling is central to acquired resistance to therapy in colorectal cancer, our results suggest that pharmacological inhibition of SOX9 might be a novel therapeutic approach for this type of cancer.

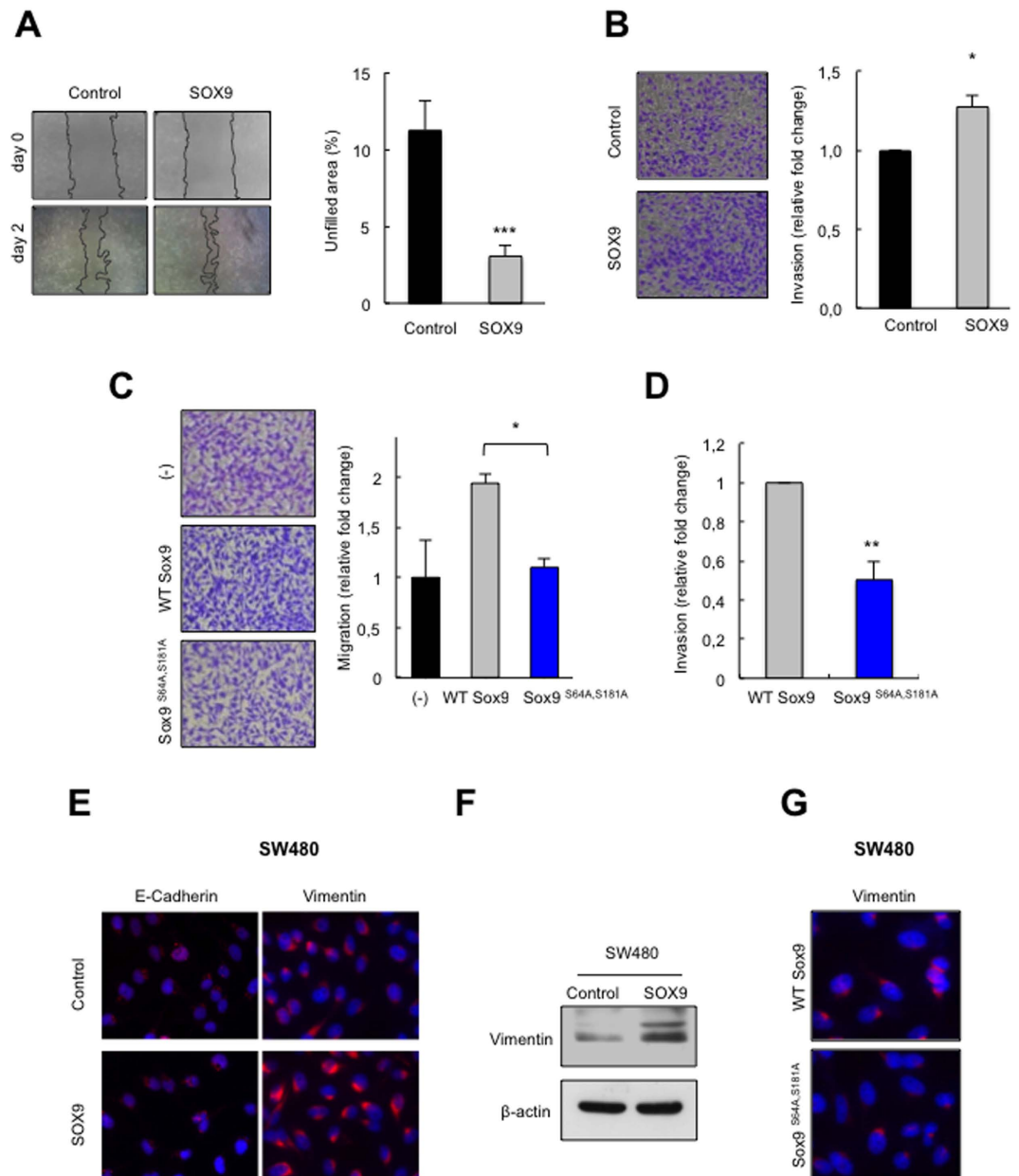


Figure 3. SOX9 contributes to gain of metastatic traits in CRC cells. (A) Representative image and quantification of non-filled area in wound healing assays of SW480 control and SOX9 overexpressing cells (n = 4). (B) Representative images and quantification of transwell invasion for the indicated genotypes (n ≥ 3). (C) Representative images and quantification of transwell migration of SW480 control (-) compared to cells transduced with Sox9^{S64A,S181A} or a WT form of SOX9 (WT-Sox9) (n = 2). (D) Quantification of transwell *in vitro* invasion for the indicated conditions (n = 2). (E) Representative images of immunofluorescence studies of E-Cadherin and Vimentin in control and SOX9 overexpressing SW480 cells (n ≥ 2). (F) Representative Western blot of Vimentin in the indicated genotypes (n = 2). (G) Vimentin expression detected by immunofluorescence in SW480 cells transduced with the wt (WT Sox9) or the Sox9^{S64A,S181A} mutant form of SOX9 (n = 2).

It has been shown that rapamycin inhibits the early stages of colorectal tumorigenesis, concomitantly with decreasing Sox9 in the *Apc^{fl/fl}* mouse model³⁸. Similarly, we have recently identified that rapamycin impairs glioma stem cell activity through silencing of SOX2 and SOX9 expression³⁹. Given that the mammalian target of rapamycin (mTOR) is frequently activated in human colorectal cancers, and its natural inhibitor rapamycin and rapalogs are promising antitumor agents, whose efficacy is currently being tested in clinical trials with promising results⁴⁰, we explored a potential relationship between the mTOR pathway and SOX9 in human colorectal cells. We observed that, in parallel to SOX9, the endogenous levels of phosphorylated S6 Ribosomal protein, downstream target and likely physiological effector of the mTOR pathway, were higher in SW620 than in SW480 cells (Fig. 6A). Next, we sought to establish whether rapamycin would be able to regulate metastatic cell activity

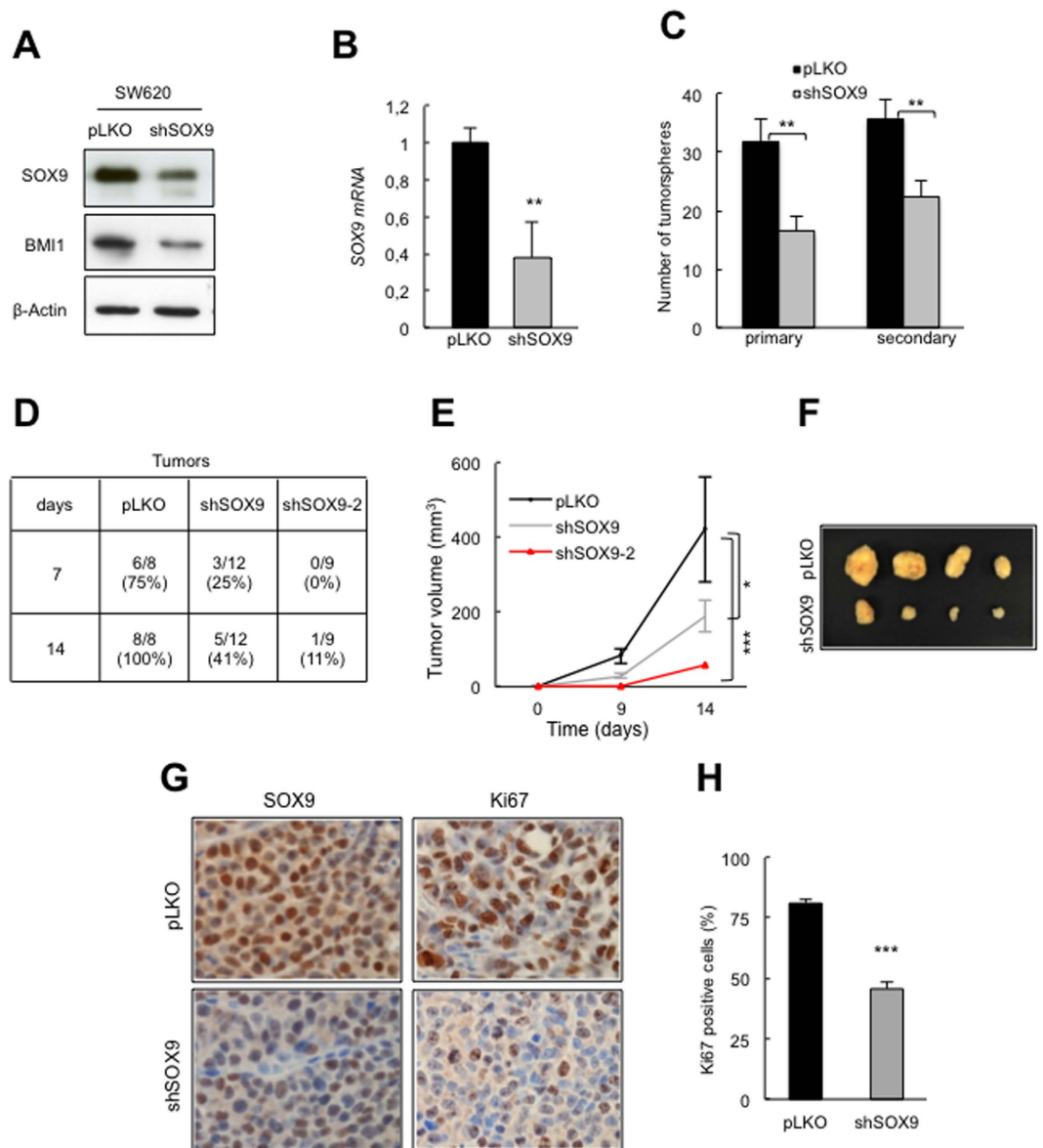


Figure 4. SOX9 silencing impairs self-renewal of SW620 cells. (A) Representative immunoblots of SOX9 and BMI1 protein expression in empty vector (*pLKO*) and *shSOX9* SW620 cells ($n \geq 3$). (B) SOX9 mRNA levels in *shSOX9* SW620 relative to *pLKO* cells ($n = 3$). (C) Plot of the number of primary and secondary tumorspheres in the indicated conditions ($n \geq 5$). (D) Tumor initiation ability of the indicated cellular genotypes. Frequency of tumors formed in immunocompromised mice after subcutaneous injection of $1 \cdot 10^6$ cells per injection. (E) Tumor volume calculated at the indicated time points in nude mice injected with *pLKO* or two independent *shSOX9* constructs (*shSOX9* and *shSOX9-2*) ($1 \cdot 10^6$ cells per injection). (F) Representative image showing the generated tumors per genotype. (G) Immunohistochemistry of SOX9 and Ki67 staining in SW620 derived tumors from *pLKO* or *shSOX9* conditions ($n = 4$). (H) Quantification of percentage of Ki67 positive cells in SW620 derived tumors from *pLKO* or *shSOX9* conditions ($n = 4$).

through SOX9 activity. To answer this question, we first treated SW480 and SW620 cells with increasing concentrations of rapamycin (0.1, 10 and 100 nM) or vehicle (DMSO). SOX9 levels were not affected after cells cultured with the indicated concentrations of rapamycin (Fig. 6A). Given that the highest concentrations decreased the expression of SOX9 in glioma cells³⁹, the effect of this agent on SOX9 expression seems to be context dependent. On the contrary, 10 and 100 nM concentrations of rapamycin decreased phosphorylated S6 more strongly in SW620 than in SW480 cells (Fig. 6A). This evidence supports the idea of enhanced impairment of mTOR signalling pathway in the metastatic cells. Moreover, we found that 10 nM of rapamycin was sufficient to cause a severe reduction in the formation of primary (66% decrease in rapamycin vs. vehicle treated) and secondary (90% reduction) tumorspheres in SW620 cells, without affecting that capacity in SW480 cells (Fig. 6B,C).

Next, we checked the response of CR-CSCs with modulated levels of SOX9 to rapamycin treatment. For this, we treated gain and loss of SOX9 expression SW480 and SW620 cells with rapamycin (10 nM) or vehicle and

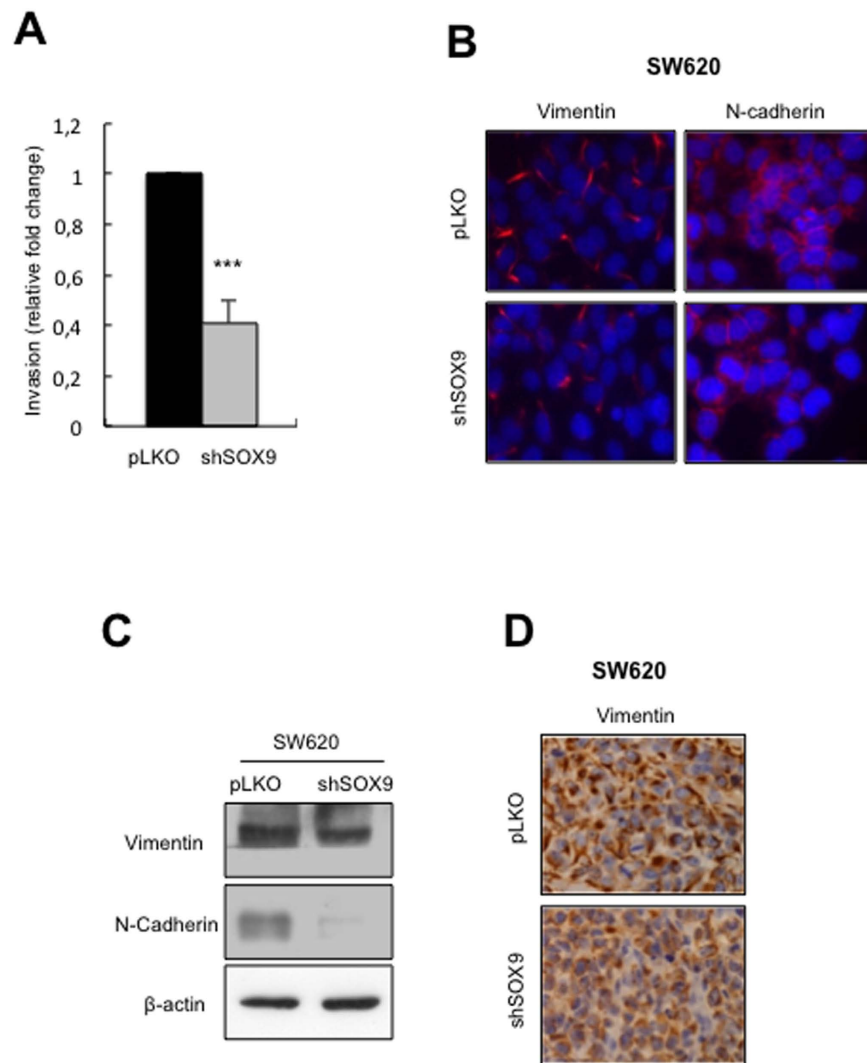


Figure 5. SOX9 silencing impairs metastatic phenotypes of SW620 cells. (A) Transwell invasion in SW620 *shSOX9* cells relative to SW620 control cells analyzed 24 hours after seeding ($n = 3$). (B) Vimentin and N-Cadherin mesenchymal markers expression analyzed by immunofluorescence in SW620 *pLKO* and *shSOX9* cells ($n \geq 2$). (C) Representative western blot of Vimentin and N-Cadherin in SW620 *pLKO* and *shSOX9* cells ($n \geq 2$). (D) Vimentin expression detected by immunohistochemistry in subcutaneous tumors generated by *pLKO* and *shSOX9* cells ($n = 4$).

cultured them under CSC conditions. Strikingly, SOX9-induced tumorsphere formation and self-renewal in SW480 cells was markedly attenuated by the presence of a 10 nM dose of the mTOR inhibitor (Fig. 6D). In contrast, that low dose of rapamycin promoted a decrease of 66 and 90% in primary and secondary tumorspheres in SW620 control cells, whereas the decline was only of 32 and 18% respectively in *shSOX9* cells (Fig. 6E). These observations confirm that SOX9 levels sensitize CR-CSCs to rapamycin treatment, an effect likely mediated by the impairment of the mTOR signaling pathway, rather than the decline in SOX9 levels themselves.

In order to validate the antitumor activity of rapamycin in cells with different SOX9 expression *in vivo*, we injected SW620 and SW480 cells subcutaneously in nude mice and treated animals with 5 mg/Kg of rapamycin twice a week. This treatment resulted in delayed tumor initiation and a significant decrease in tumor growth in SW620 cells ($p < 0.01$) compared to that observed with the vehicle control treatments (Fig. 7A–C). In contrast, the mTOR inhibitor did not affect tumor growth of SW480 cells (Fig. 7C). As shown in *in vitro* studies, phosphorylated S6 Ribosomal protein was markedly decreased whilst SOX9 showed similar expression in rapamycin compared to vehicle treated SW620 tumors (Fig. 7D). Finally, we also evaluated molecular markers for cell proliferation and apoptosis by immunohistochemistry. The expression of Ki67 was exclusively reduced ($p < 0.05$) in tumors obtained from SW620 cells treated with rapamycin (Fig. 7E and data not shown), whereas immunohistochemical staining for the apoptosis marker, fragmented PARP-1, was increased by rapamycin treatment ($p = 0.004$) (Fig. 7E). Together, these results show that rapamycin treatment attenuates CSC characteristics in colorectal cancer cells in a SOX9 expression dependent manner.

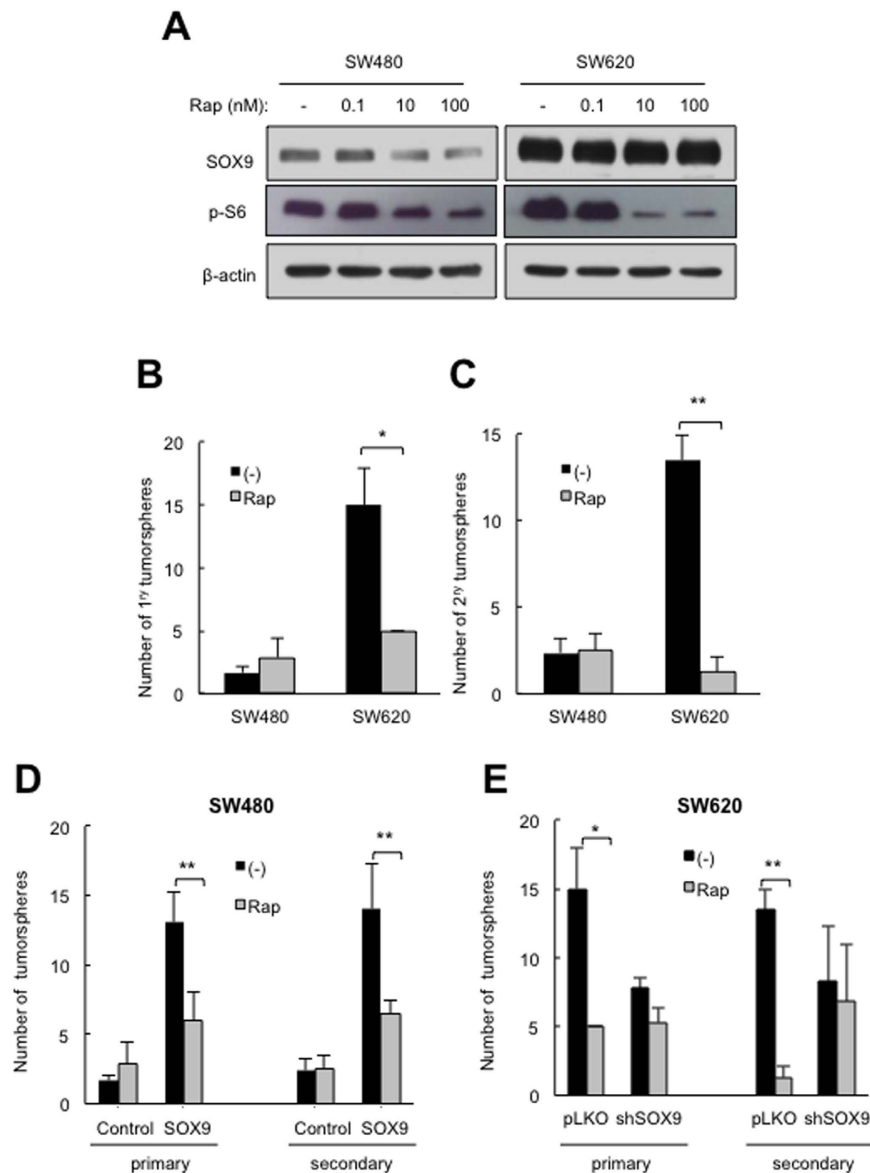


Figure 6. High SOX9 levels sensitize colorectal cancer cells to rapamycin. (A) Representative immunoblot of phospho-S6 Ribosomal protein (Ser235/Ser236) (p-S6), SOX9 and β -actin protein expression in SW480 and SW620 cells treated with the indicated concentrations of rapamycin for 24 hours (n = 2). (B) Number of primary tumorspheres in SW480 and SW620 cells treated with vehicle (-) or rapamycin 10 nM (Rap) (n = 4). (C) Number of secondary tumorspheres derived from SW480 and SW620 primary tumorspheres treated with vehicle (-) or rapamycin 10 nM (Rap) (n = 4). (D) Number of tumorspheres formed by control and SOX9 overexpressing SW480 cells in the presence or absence of rapamycin 10 nM (Rap) (n = 3). (E) Number of tumorspheres formed by *pLKO* and *shSOX9* SW620 cells in the presence or absence of rapamycin 10 nM (Rap) (n = 3).

There is considerable focus nowadays studying the impact of cancer cell plasticity and metastasis. It is hint towards a complex network concerning heterogeneous pools of cells, which might interact within them or dynamically switch their characteristics⁴¹. These activities may be regulated in response to intracellular stress or microenvironmental stimuli via not well established molecular mechanisms yet. Our data indicate that the dynamics of SOX9 expression regulate colorectal cancer cell plasticity in a cell-autonomous manner. SOX9 directs cancer cell self-renewal and proliferation programs, governing the transition between CR-CSCs and non-CSCs. These functions are important for metastatic spread (Fig. 7F). Importantly, SOX9 inhibition impairs self-renewal and invasive potential, indicating that it might be considered as a novel therapeutic target for advanced colorectal cancers. In relation to this, we reveal that SOX9 levels define the antitumor action of the mTOR inhibitor rapamycin in colorectal cells, providing preclinical evidence to justify further research into therapeutic strategies based on this agent, using SOX9 levels as a biomarker for patient stratification.

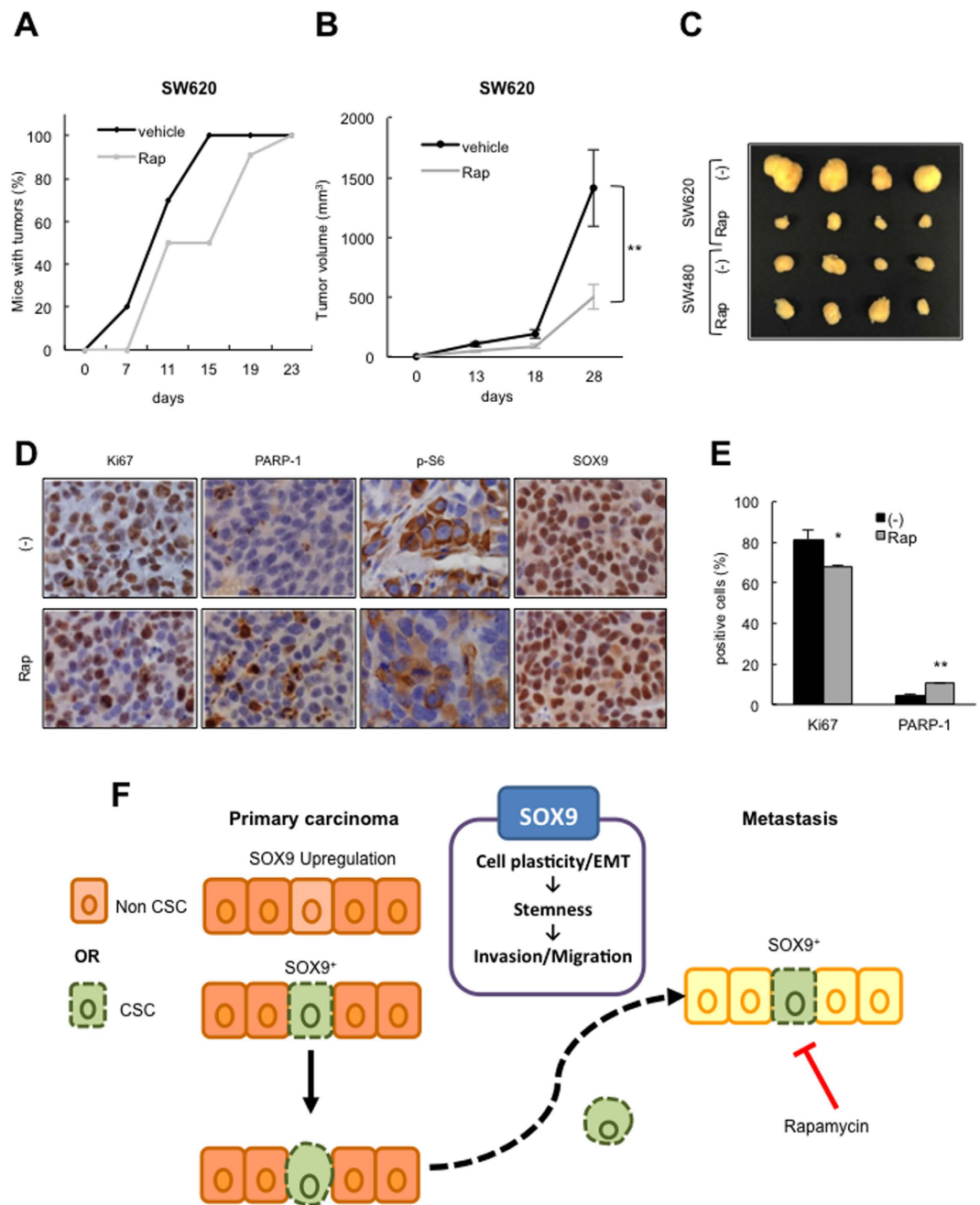


Figure 7. Rapamycin impairs tumor growth in SW620 metastatic cells. (A) Percentage of nude mice harbouring SW620 derived tumors at the indicated time points after intraperitoneal treatment with vehicle (-) or rapamycin 5 mg/Kg (Rap) twice a week (n = 8). Log-rank test (* $p \leq 0.05$) (B) Representation of tumor volume formed by SW620 cells in immunocompromised mice treated with vehicle (-) or rapamycin 5 mg/Kg (Rap) (n = 8). (C) Representative image of tumors formed from SW620 and SW480 cells treated with vehicle (-) or rapamycin 5 mg/Kg (Rap). (D) Representative images of Ki67, fragmented PARP-1, p-S6, and SOX9 immunostaining in SW620 derived tumors in the indicated conditions (n = 4). (E) Quantification of percentage of Ki67 and fragmented PARP positive cells (n = 3). (F) Illustrative image of the role of SOX9 in CRC cell plasticity. The expression of SOX9 regulates stemness activity and EMT plasticity in CRC cells mediating the pro-metastatic abilities of migration and invasion. High SOX9 expressing cells exhibit enhanced CR-CSC properties subjacent to enhanced pro-metastatic abilities. The mTOR inhibitor rapamycin exerts an enhanced antitumoral and anti-metastatic effect on CRC cells expressing high SOX9 levels.

Materials and Methods

Patients and tumor samples. Human colorectal carcinoma samples were provided by the Basque Biobank for Research-OEHUN (<http://www.biobancovasco.org>). The methods and experimental protocols in human

samples were carried out in accordance with relevant guidelines, and all study participants signed informed consent form. The study was approved by the ethic committee of Biodonostia Institute and Hospital Donostia.

Cell lines culture conditions. SW480 and SW620 cell lines were obtained from the ATCC (American Type Culture Collection) and cultured as adherent monolayers in DMEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum. Tumorspheres were cultured in DMEM/F12 medium (Sigma) supplemented with 20 ng/mL of EGF and bFGF (Sigma) growth factors, in the presence of N2 and B27. For tumorspheres studies, $0.5 \cdot 10^3$ cells/well were seeded in non-treated 12-well flat bottom plates and fresh medium was added every 3 days. After 10 days, primary (1st) tumorspheres were counted. Then, spheres were disaggregated with Accutase, seeded for secondary (2nd) tumorspheres and maintained for another 10 days in culture.

Viral infections. Lentiviral infections were performed as previously described⁴². For *gene* knockdown, cells were transduced with two independent constructs; shSOX9 (a gift from Dr. Bob Weinberg, Addgene plasmid #40644)⁴³ and shSOX9-2 (Sigma TRCN0000342824). For SOX9 overexpression, we used the plasmid #36979 from Addgene, a gift from Bob Weinberg⁴³. Plasmids with point mutations in S64 and S181 (*Sox9*^{S64A,S181A}) or WT forms of Sox9 were gifts from Dr. Cheung. Cells were infected for 6 hours with a multiplicity of infection of 10.

mRNA expression analysis. Total RNA was extracted with TRIzol (Life Technologies). Reverse transcription was performed using a High-Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies). Quantitative real-time PCR was performed using Power SYBR[®] Green Master Mix (Thermo Scientific), in an ABI PRISM 7300 thermocycler (Applied Biosystems). Variations in RNA input were corrected using the expression of the GAPDH housekeeping gene. The $\Delta\Delta$ CT method was used for relative quantification.

Western blot and immunofluorescence analysis. Immunoblot and immunofluorescence analysis were performed as previously described¹⁸. Primary antibodies used were: SOX9 (AB5535, Millipore), phospho-SOX9 (ab59252, abcam), BMI1 (05-637, Millipore), E-cadherin (BD610181, BD Transduction Laboratories), Vimentin (M7020, DAKO), N-Cadherin (BD610920, BD Transduction Laboratories), phospho-S6 Ribosomal protein (Cell Signaling Technology[®], #4858) and β -actin (AC-15, Sigma). For Western blot detection of primary antibodies, we used HRP-linked antibodies (Santa Cruz Biotechnology) and detection was performed by chemiluminescence using NOVEX ECL Chemi Substrate (ThermoFisher). For immunofluorescence, secondary antibodies conjugated with fluorochromes were used and nuclear DNA was stained with Hoechst 33342 (Sigma). Images were obtained at a 40x magnification.

Migration and invasion assays. For wound healing (*scratch*) assays, cells were seeded at a confluence of 90% in 24-well flat-bottom plates and 12 hours later a linear artificial gap (*scratch*) was made in serum-deprived conditions for 48 hours. The non-filled area (i.e., not covered by cell migration) was quantified using Scion image software (Scion Corporation). Transwell cell migration was evaluated using 6.5-mm Transwell[®] chambers with 8.0- μ m pore polycarbonate membrane inserts (Corning #3422). Invasion assays were performed using the QCM[™] Collagen Cell Invasion Assay (ECM551, Millipore). Invading cells were quantified 24 hours after the seeding.

In vivo carcinogenesis assays. For subcutaneous injection, SW480 and SW620 cells were harvested with trypsin/EDTA and resuspended in PBS. Cells ($1 \cdot 10^6$) were injected subcutaneously into both flanks of Foxn1^{tmu}/Foxn1^{tmu} nude mice (8 weeks old). Mice were examined twice a week and external calipers were used to measure tumor size at the indicated time points from which tumor volume was calculated according to the formula $\frac{1}{2}(\text{length} \times \text{width}^2)$.

For rapamycin experiments, SW620 and SW480 cells were treated for 48 h with rapamycin 10 nM before subcutaneous implantation ($1 \cdot 10^6$ cells in PBS). Five days later, mice were injected intraperitoneally with rapamycin (5 mg/kg) or vehicle twice a week during the experiment. Tumor volume was estimated as described above.

Immunohistochemistry. Tumors generated in mice were dissected, fixed in 10% formalin for 48h and embedded in paraffin. 4 micrometer-thick sections were incubated with primary antibodies (SOX9, AB5535 (Millipore); Ki67, ab15580 (Abcam); Vimentin, M7020 (DAKO); phospho-S6 Ribosomal protein (Cell Signaling Technology[®], #4858), and fragmented PARP-1, 32064 (Abcam) at 37 °C for 2 hours. The sections then were washed and incubated with MACH 3 Rabbit/Mouse Probe and MACH 3 HRP-Polymer (M3R531, Biocare Medical). Immunostaining was developed with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, SPR-DAB-060, Spring Bioscience).

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

References

- Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov* **13**, 497–512, doi: 10.1038/nrd4253 (2014).
- Brenner, H., Kloor, M. & Pox, C. P. Colorectal cancer. *Lancet* **383**, 1490–1502, doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9 (2014).
- Zeuner, A., Todaro, M., Stassi, G. & De Maria, R. Colorectal cancer stem cells: from the crypt to the clinic. *Cell Stem Cell* **15**, 692–705, doi: 10.1016/j.stem.2014.11.012 (2014).
- Pang, R. *et al.* A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* **6**, 603–615, doi: 10.1016/j.stem.2010.04.001 (2010).
- Todaro, M. *et al.* CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell* **14**, 342–356, doi: 10.1016/j.stem.2014.01.009 (2014).

6. Wu, Z. *et al.* TPO-Induced Metabolic Reprogramming Drives Liver Metastasis of Colorectal Cancer CD110+ Tumor-Initiating Cells. *Cell Stem Cell* **17**, 47–59, doi: 10.1016/j.stem.2015.05.016 (2015).
7. Van Landeghem, L. *et al.* Activation of two distinct Sox9-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**, G1111–1132, doi: 10.1152/ajpgi.00519.2011 (2012).
8. Ladang, A. *et al.* Eip3 drives Wnt-dependent tumor initiation and regeneration in the intestine. *J Exp Med* **212**, 2057–2075, doi: 10.1084/jem.20142288 (2015).
9. Blache, P. *et al.* SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *The Journal of cell biology* **166**, 37–47 (2004).
10. Bastide, P. *et al.* Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *The Journal of cell biology* **178**, 635–648 (2007).
11. Ramalingam, S., Daughtridge, G. W., Johnston, M. J., Gracz, A. D. & Magness, S. T. Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**, G10–20, doi: 10.1152/ajpgi.00277.2011 (2012).
12. Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192–1205, doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012 (2012).
13. Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330–337, doi: 10.1038/nature11252 (2012).
14. Wang, G. *et al.* Zbtb7a suppresses prostate cancer through repression of a Sox9-dependent pathway for cellular senescence bypass and tumor invasion. *Nat Genet* **45**, 739–746, doi: 10.1038/ng.2654 (2013).
15. de la Rocha, A. M., Sampron, N., Alonso, M. M. & Matheu, A. Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *Am J Cancer Res* **4**, 312–324 (2014).
16. Larsimont, J. C. *et al.* Sox9 Controls Self-Renewal of Oncogene Targeted Cells and Links Tumor Initiation and Invasion. *Cell Stem Cell* **17**, 60–73, doi: 10.1016/j.stem.2015.05.008 (2015).
17. Malladi, S. *et al.* Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* **165**, 45–60, doi: 10.1016/j.cell.2016.02.025 (2016).
18. Matheu, A. *et al.* Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Res* **72**, 1301–1315, doi: 0008-5472.CAN-11-3660 (2012).
19. Bruun, J. *et al.* Prognostic Significance of beta-Catenin, E-Cadherin, and SOX9 in Colorectal Cancer: Results from a Large Population-Representative Series. *Front Oncol* **4**, 118, doi: 10.3389/fonc.2014.00118 (2014).
20. Lu, B. *et al.* Analysis of SOX9 expression in colorectal cancer. *American journal of clinical pathology* **130**, 897–904 (2008).
21. Shen, Z. *et al.* Identification of the interplay between SOX9 and S100P in the metastasis and invasion of colon carcinoma. *Oncotarget* **6**, 20672–20684, doi: 3967 (2015).
22. Candy, P. A. *et al.* Notch-induced transcription factors are predictive of survival and 5-fluorouracil response in colorectal cancer patients. *Br J Cancer* **109**, 1023–1030, doi: 10.1038/bjc.2013.431 (2013).
23. Panza, A. *et al.* Interplay between SOX9, beta-catenin and PPARgamma activation in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 1853–1865, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.004 (2013).
24. Javier, B. M. *et al.* Recurrent, truncating Sox9 mutations are associated with sox9 overexpression, KRAS mutation, and TP53 wild type status in colorectal carcinoma. *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.9682 (2016).
25. Jay, P., Berta, P. & Blache, P. Expression of the carcinoembryonic antigen gene is inhibited by SOX9 in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* **65**, 2193–2198, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1484 (2005).
26. Abdel-Samad, R. *et al.* MiniSOX9, a dominant-negative variant in colon cancer cells. *Oncogene* **30**, 2493–2503, doi: 10.1038/onc.2010.621 (2011).
27. McNutt, N. S., Mak, L. L. & Kim, Y. S. Comparison of cell peripheries in the human colonic adenocarcinoma cell lines SW480 and SW620 grown in floating chamber culture, cover slip culture, athymic (nude) mice, and BALB/c mice. *Lab Invest* **44**, 309–323 (1981).
28. Huang, W., Zhou, X., Lefebvre, V. & de Crombrughe, B. Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol* **20**, 4149–4158 (2000).
29. Stange, D. E. *et al.* Expression of an ASCL2 related stem cell signature and IGF2 in colorectal cancer liver metastases with 11p15.5 gain. *Gut* **59**, 1236–1244, doi: 10.1136/gut.2009.195701 (2010).
30. Sadanandam, A. *et al.* A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* **19**, 619–625, doi: 10.1038/nm.3175 (2013).
31. Liu, J. A. *et al.* Phosphorylation of Sox9 is required for neural crest delamination and is regulated downstream of BMP and canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 2882–2887, doi: 10.1073/pnas.1211747110 (2013).
32. Luanpitpong, S. *et al.* SLUG is required for SOX9 stabilization and functions to promote cancer stem cells and metastasis in human lung carcinoma. *Oncogene* **35**, 2824–2833, doi: 10.1038/onc.2015.351 (2016).
33. Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027 (2008).
34. Kreso, A. *et al.* Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nat Med* **20**, 29–36, doi: 10.1038/nm.3418 (2014).
35. Shi, Z. *et al.* Context-specific role of SOX9 in NF-Y mediated gene regulation in colorectal cancer cells. *Nucleic acids research* **43**, 6257–6269, doi: 10.1093/nar/gkv568 (2015).
36. Nieto, M. A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* **342**, 1234850, doi: 10.1126/science.1234850 (2013).
37. Roche, K. C. *et al.* SOX9 Maintains Reserve Stem Cells and Preserves Radioresistance in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology* **149**, 1553–1563 e1510, doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.004 (2015).
38. Hardiman, K. M., Liu, J., Feng, Y., Greenon, J. K. & Fearon, E. R. Rapamycin inhibition of polyposis and progression to dysplasia in a mouse model. *PLoS One* **9**, e96023, doi: 10.1371/journal.pone.0096023 (2014).
39. Garros-Regulez, L. *et al.* mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert Opin Ther Targets* **20**, 393–405, doi: 10.1517/14728222.2016.1151002 (2016).
40. Altomare, I. & Hurwitz, H. Everolimus in colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother* **14**, 505–513, doi: 10.1517/14656566.2013.770473 (2013).
41. Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **331**, 1559–1564, doi: 10.1126/science.1203543 (2011).
42. Etxaniz, U. *et al.* Neural-competent cells of adult human dermis belong to the Schwann lineage. *Stem Cell Reports* **3**, 774–788, doi: 10.1016/j.stemcr.2014.09.009 (2014).
43. Guo, W. *et al.* Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* **148**, 1015–1028, doi: S0092-8674(12)00165-1 (2012).

Acknowledgements

PA was recipient of a predoctoral fellowship from the Spanish Association Against Cancer (AECC Gipuzkoa), and JA from SuperH foundation. We thank the Histology Platform staff of the Biodonostia Health Research Institute for their help. This work was supported by grants from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness

and the European Regional Development Fund (CP10/00539, PI13/02277), European Union (Marie Curie CIG 2012/712404) to AM, the Department of Health of the Basque Government to SA, and the Department of Industry of the Basque Government (SAIO13-PC11BN002 to AM, SAIO13-PC13BN010 to ECG and SAIO13-PC13BN011 to IG).

Author Contributions

E.C.-G., L.L., P.A., L.E., J.A. and I.G. performed the experimental research; S.A., N.S. and L.B. collected patient samples, M.C. contributed with design and production of reagents and all of them revised the manuscript; S.A., N.S., E.C.-G. and I.G. helped to support the project; A.M. designed the research, directed the work and wrote the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Carrasco-Garcia, E. *et al.* SOX9-regulated cell plasticity in colorectal metastasis is attenuated by rapamycin. *Sci. Rep.* **6**, 32350; doi: 10.1038/srep32350 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016