



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“TFIIH COMO BLANCO PARA EL TRATAMIENTO
CONTRA EL CÁNCER”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M en C. MARITERE URIÓSTEGUI ARCOS

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Instituto de Biotecnología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
Instituto de Biotecnología UNAM

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
Facultad de Medicina, UEAM.

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COMITÉ TUTOR

¹ Mario Enrique Zurita Ortega

¹ Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

² Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

JURADO DE EXAMEN

¹ Dra. Leonor Pérez Martínez

¹ Dr. José Luis Reyes Taboada

¹ Dra. Celina García Meléndrez

³ Dra. Lorena Aguilar Arnal

³ Dr. Alfonso León del Río

¹ Instituto de Biotecnología (IBt), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

² Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Mario Enrique Zurita Ortega. La Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay y el Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz participaron como tutores invitados. Este trabajo se financió parcialmente con los donativos de CONACyT No. 1977- Del Programa de Problemas Nacionales, PAPIIT/UNAM No. IN200315 y CONACyT No. 25088 concedidos al laboratorio del Dr. Mario Zurita. Durante la realización de este trabajo la M en C. Maritere Urióstegui Arcos contó con una beca de doctorado de CONACyT (CVU 549669, número de becario 414127) y con el apoyo para la asistencia de un congreso del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado.

Se la dedico a quienes me inspiraron, a quienes me ayudaron a llegar a donde he llegado, a mis héroes: mis papas.

AGRADECMIENTOS

Al Dr. Mario Zurita, por recibirme en su laboratorio, por siempre contar con su confianza y apoyo. Indudablemente aprendí muchísimo de él, además de ser el mejor jefe del mundo.

A los “Zuritas”: con las que compartí y coincidí tiempo y espacio. A Gris y Joss por enseñarme y apoyarme cuando mi caos personal me ganaba muchas gracias por su grandiosa amistad. A Alyeri, Sam, Xime y Adri por su amistad y enseñarme que no todo es laboratorio. A Pili y Andreita por todo su apoyo y amistad. A Edu y Paco por tenerme paciencia cuando les enseñaba. A las Dras. Martha y Viviana, por todas sus enseñanzas y sabiduría. Son amistades para toda la vida

A los “Reynauds”: Ángel e Iván (Tepoz) por sus consejos, ayuda y consultas que siempre me brindaron, gracias por su gran amistad.

A mi comité tutorial por contribuir en mi formación como Doctora en Ciencias. Especialmente a la Dra. Yvonne Rosenstein, por siempre estar ahí cuando la necesite y adoptarme en su laboratorio cuando fue necesario, gracias por todo el cariño y apoyo incondicional, por ser un ejemplo a seguir.

A los integrantes del jurado del examen: Dra. Leonor Pérez, Dr. José Luis Reyes, Dra. Celina García, Dra. Lorena Aguilar y Dr. Alfonso León por su paciencia, amabilidad y consejos para mejorar mi tesis.

A Toño y Gloria, por su excelente trabajo en la Unidad de Docencia del IBt.

A mi familia, mis papas (Margarita y Victorino) por haberme forjado en la persona que soy hoy en día; muchos de las cosas que he logrado se las debo a ellos, me formaron con reglas, pero al mismo tiempo con ciertas libertades y siempre me motivaron para que pudiera alcanzar mis sueños, muchas gracias por todo el apoyo incondicional que siempre me brindan. A mis hermanas (Miriam y Rocio) que son las personas que siempre están para mí en todo momento, brindándome su amor incondicional y son las mejores amigas que tengo en la vida. A mis sobrinos (Manu, Arturito y Mateito) que son mis nuevos maestros pokémon y pequeños gigantes, que con su sonrisa me recuerdan que el mundo todavía puede ser un lugar feliz. A mis cuñados (Fidel y Arturo) por todo el apoyo que me brindan y por aguantar a mis hermanas.

Y por último, pero no menos importante un agradecimiento con mención honorífica a Leo, por aceptarme, apoyarme y ayudarme en todo momento, porque somos un gran equipo juntos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCION	1
1.1. Cáncer.....	1
1.2 Transcripción.....	4
1.2.1 Factor de Transcripción IIH.....	6
1.2.1.1 Papel de TFIIH durante la transcripción	9
1.3 Fármacos cuyos blancos terapéuticos son factores transcripcionales	10
1.3.1 Triptolide.....	12
1.3.2 THZ1.....	13
II. ANTECEDENTES	15
2.1 Descripción del modelo de oncogenesis MCF10A-ErSrc	15
2.2 Los niveles de TFIIH se incrementan en las células MCF10A-ErSrc después de la transformación.	17
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVOS.....	21
5.1 OBJETIVO GENERAL	21
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	22
6.1 Cultivo celular.....	22
6.2 Reactivos	23
6.3 <i>Western blotting</i>	23
6.4 RT-PCR y/o qRT-PCR	25
6.5 Ensayos con siRNAs.....	27
6.6 Citometría de flujo	28
6.7 Método de Chou-Talalay	30
6.8 RNA-seq y análisis bioinformático	30
6.9 ChIP-seq y análisis bioinformático	31
6.10 Correlación entre el RNA-seq y el ChIP-seq.....	33
6.11 Ensayos de <i>Split-GFP</i>	33
6.12 Dinámica molecular	36

VII. RESULTADOS	39
7.1 TPL y THZ1 ejercen un efecto negativo sinérgico sobre la viabilidad de células tratadas con tamoxifeno	39
7.2 El TPL reduce los niveles del submódulo XPB-p52-p8 de TFIIH.....	45
7.3 El análisis del transcriptoma de las células tratadas con TPL mostró una respuesta inesperada en la expresión genética global	50
7.4 La RNAPII se mantiene en el promotor y en el cuerpo de los genes cuya expresión se incrementa	57
7.5 El THZ1 conduce a una respuesta génica similar al TPL en células cancerosas	66
7.6 El silenciamiento de transcritos codificados por genes que fueron sobre-expresados en respuesta a estrés transcripcional, aumenta la sensibilidad de las células al TPL.....	68
7.7 El silenciamiento de <i>CDK7</i> y <i>XPD</i> induce preferencialmente muerte de células TAM.....	71
7.8 Identificación de posibles nuevos inhibidores de TFIIH	72
VIII. DISCUSIÓN.....	76
IX. CONCLUSIÓN.....	83
X. PERSPECTIVAS	84
XI. BIBLIOGRAFIA.....	85
XII. ANEXOS.....	97
12.1 ANÁLISIS DE CALIDAD Y LECTURAS MAPEADAS DE LOS EXPERIMENTOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA	97
12.1.1 RNA-seq.....	97
12.1.2 ChIP-seq	98
12.2 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE TFIIH .	99
12.2.1 Preparación de modelos	99
12.2.2 Simulaciones de dinámica molecular.	101
12.2.3 Acoplamiento molecular	102
12.2.3.1 Configuración de sistemas	102
12.2.3.2 <i>Blind docking</i>	103
12.2.3.3 Unión al sitio dirigido.....	104
12.2.3.4 Recuperación	105
12.2.4 Resultados	106
12.2.5 Referencias	107
12.3 PUBLICACIONES	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de las células cancerosas..	2
Figura 2. Esquema de la formación del PIC.....	4
Figura 3. Establecimiento, mantenimiento y liberación de la RNAPII pausada.....	5
Figura 4. Estructura e interacciones de TFIIH.....	6
Figura 5. TFIIH es multifuncional.....	7
Figura 6. TFIIH es un factor clave en la transcripción de RNAPII	10
Figura 7. Triptolide (TPL).....	12
Figura 8 Minelide	13
Figura 9. THZ1.....	14
Figura 10. Principales componentes involucrados en la transformación celular de la línea MCF10A-ERSrc.....	16
Figura 11. Los niveles de TFIIH aumentan en las células MCF10A-ErSrc	18
Figura 12. Inmuntinciones de las subunidades de TFIIH en células TAM y NT ...	19
Figura 13. Esquema general de las clonaciones de TFIIH en el sistema tripartita <i>Split-GFP</i>	34
Figura 14. TPL, THZ1 y la combinación de ambas moléculas inducen muerte celular preferentemente en células tratadas con tamoxifeno (TAM).....	39
Figura 15. Determinación del efecto de la combinacion TPL y THZ1 usando el metodo de Chou-Talalay.....	41
Figura 16. .Los tratamientos con Triptolide (TPL), THZ1 y TPL/THZ1 inducen apoptosis en células MCF10A-ErSrc-TAM	43
Figura 17. Efecto del TPL, THZ1 y TPL+THZ1 sobre la proliferación y ciclo celular	44
Figura 18. TPL reduce los niveles de acumulación del submódulo XPB-P52-P8 de TFIIH	46
Figura 19. Efecto del THZ1 sobre TFIIH.....	46

Figura 20. Modelo de dinámica molecular computacional en donde se propone el mecanismo de la disociación del submódulo XPB-p52-p8 del complejo TFIIH y su posible degradación debido a la unión covalente de TPL a XPB	47
Figura 21. Interacción del submódulo XPB-p52-p8 de TFIIH y TPL.....	48
Figura 22. Ensayos de complementación del sistema <i>Split</i> -GFP	50
Figura 23. Efecto del TPL sobre p ^{Ser5} CTD RNAPII y la viabilidad en células MCF10A.ErSrc.....	50
Figura 24. Correlación global entre los genes diferencialmente expresados	52
Figura 25. Análisis del transcriptoma de células tratadas con TPL.....	53
Figura 26. Cambio en la expresión de los factores esenciales para la transformación de la línea MCF10A-ErSrc después de ser tratada con TPL ..	54
Figura 27. Verificación del transcriptoma mediante RT-PCR y el efecto del TPL en otras líneas celulares.	56
Figura 28. Correlación de Pearson entre réplicas de ChIP-seq	57
Figura 29. Análisis del posicionamiento de la RNAPII en células tratadas con TPL.	59
Figura 30. Diferentes respuestas observadas al tratamiento con TPL.....	61
Figura 31. Evaluación de síntesis <i>de novo</i> en las secuencias intrónicas.....	61
Figura 32. Ontología de genes relacionados al cáncer	62
Figura 33. Análisis de genes sobre-expresados y sus productos proteicos en respuesta al tratamiento con TPL	63
Figura 34. Análisis de genes sobre-expresados en respuesta a TPL en otras líneas celulares de cáncer de mama	65
Figura 35. THZ1 genera una respuesta similar a la observada por el efecto de TPL en la línea MCF10A-ErSrc	67
Figura 36. Incremento de la sensibilidad al TPL.....	70
Figura 37. La reducción de los niveles de CDK7 y XPD mata preferentemente a las células TAM	72

Figura 38. Ensayos de complementación de GFP	74
Figura 39. Ejemplos de fármacos que se unen a las interfases de interacción entre subunidades de TFIIH.....	75
Figura 40. Modelo propuesto de cómo afecta la integridad del complejo de TFIIH el uso del TPL y THZ1	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subunidades del complejo TFIIH.....	9
Tabla 2. Fármacos cuyo blanco es un componente de la maquinaria de transcripción.....	11
Tabla 3. Componentes del medio de crecimiento para la línea celular MCF10A-ErSrc	22
Tabla 4. Características de los anticuerpos primarios usados en este trabajo	25
Tabla 5. Características de los anticuerpos secundarios usados en este trabajo..	25
Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos usados para estos ensayos	26
Tabla 7 Características de los anticuerpos usados para citometría de flujo	29
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la clonación en el vector pcDNA-GFP10	34
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la clonación en el vector pcDNA-GFP11	35

ABREVIATURAS

µg	microgramos
µL	microlitros
6-4 PP	6-4 fotoproducto
BSA	Albumina de suero o sérica de bovino
CAK	Cinasa Activadora de CDKs
CDK7	Cinasa 7 dependiente de Ciclina
cDNA	DNA complementario
CS	Síndrome de Cockayne
CPD	Dímeros de ciclobutano de pirimidinas
CTD	Dominio C-terminal
Cyc H	Ciclina H
dH ₂ O	Agua destilada
DM	Dinámica molecular
DMEM	Del inglés " <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> "
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSHB	Del inglés " <i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i> "
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ER	Receptor de Estrógeno
ERCC2	Proteínas que complementa la reparación por escisión 2
ERCC3	Proteínas que complementa la reparación por escisión 3
FITC	Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato
FPKM	Del inglés " <i>Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads</i> "
g	gramo
GG	General del genoma
GEO	Del inglés " <i>Gene Expression Omnibus</i> "

H ₂ O	Agua
h	Horas
HSF1	Factor del choque térmico 1
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
IL-6	Interleucina 6
KCl	Cloruro de potasio
M	Mitosis
mAmp	mili Amperes
Mat1	ménage à trois 1
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NaCl	Cloruro de sodio
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NFKB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLB	Buffer de lisis nuclear
nM	nanomolar
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PC	fosfatidilserina
Pen/Strep	Penicilina/ Estreptomina
PI	Yoduro de propidio
PIC	Complejo de pre-inicio de la transcripción
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Per sulfato de amonio
P-TEFb	Del inglés " <i>Positive Transcription Elongation Factor-b</i> "
REN	Reparación por Escisión de Nucleótidos
RNA	Ácido ribonucleico
RNAPI	RNA polimerasa tipo I

RNAPII	RNA polimerasa tipo II
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
S	Serina
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
siRNA	Del inglés “ <i>small interfering RNA</i> ”
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAM	Tamoxifeno
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TCR	Reparación acoplada a la transcripción
TEMED	Tetrametil hylethylenediamine
TFIIH	Factor de transcripción IIH
TPL	Triptolide
TTD	Tricotiodistrofia
TTDA	Proteína tricotiodistrofia grupo de complementación A.
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WB	Western Blot
XP	Xeroderma pigmentosum
XPB	Proteínas xenoderma pigmentosum grupos de complementación B
XPD	Proteínas xenoderma pigmentosum grupos de complementación D

RESUMEN

La célula cancerosa requiere niveles altos de transcripción para sobrevivir y mantener el fenotipo canceroso, de hecho se ha propuesto que son “adictas a la transcripción”, lo que ubica a la maquinaria transcripcional como un excelente blanco terapéutico dirigido específicamente al tejido tumoral. Uno de los factores esenciales para que se lleve a cabo la transcripción, es el factor TFIIH, el cual está constituido por 10 subunidades agrupadas en dos subcomplejos el “core” (p8, p34, p44, p52, p62, XPB y XPD) y el CAK (CDK7, CYCH y MAT1). Estos subcomplejos participan en la Reparación por Escisión de Nucleótidos (REN) y en el control del ciclo celular, respectivamente. El papel de TFIIH en transcripción es esencial porque la subunidad XPB gira y empuja una de las cadenas del DNA en el promotor lo que ocasiona que se forme la burbuja de inicio de la transcripción (formación del complejo abierto). Lo anterior es importante para el reconocimiento del sitio de inicio de la transcripción por parte de la RNA Polimerasa II (RNAPII). Por otro lado, de manera prácticamente simultánea CDK7 fosforila la serina 5 de la RNAPII, que es necesaria para iniciar la transcripción. Por lo tanto, TFIIH participa en tres procesos cruciales para la célula y lo convierte en un candidato importante para el uso de inhibidores que afecten dicho factor y de esta manera, inhibir el crecimiento de células cancerosas de manera preferencial. En este sentido, THZ1 es una molécula que tiene la capacidad de unirse covalentemente a CDK7, provocando un cambio conformacional que inactiva su actividad de cinasa y por lo tanto, lo convierte en un efectivo fármaco contra células cancerosas.

Desde tiempos ancestrales, la medicina tradicional china ha utilizado infusiones de la raíz de la planta *Tripterygium wilfordii*, para tratar problemas inflamatorios y cáncer. La molécula que le otorga estas propiedades es conocida como triptolide (TPL). De manera interesante se encontró, que el blanco del TPL es la subunidad XPB de TFIIH. La cual se une de manera covalente a XPB y por lo tanto, afecta el inicio de la transcripción mediada por la RNAPII.

En este trabajo hemos usado el modelo de oncogénesis MCF10A-ErSrc para comparar el efecto de inhibidores de TFIIH entre células cancerosas y no

cancerosas, hemos descubierto nuevos posibles blancos que tienen el potencial de aumentar el efecto del TPL para inducir la muerte de la célula cancerosa. Encontramos que las células tumorales exhiben una mayor sensibilidad al TPL y a THZ1 que las células no cancerosas y que la combinación de ambas moléculas tiene un efecto sinérgico. De manera interesante, el TPL causa una reducción en los niveles de las subunidades XPB, p52 y p8 de TFIIH, pero no de otros componentes de este complejo, sugiriendo que estas tres proteínas forman un submódulo dentro TFIIH. Por ensayos de RNA-seq y de ChIP-seq mostramos que el TPL regula positiva y negativamente los niveles de transcritos de genes específicos. De manera interesante en los genes en los que hay un incremento de sus transcritos, hay una correlación con el mantenimiento o un aumento de la presencia de la RNAPII en sus promotores, indicando que son sobre-expresados a nivel de la transcripción. Varios de estos genes también son sobre-expresados en respuesta a THZ1. Por lo tanto, el estrés transcripcional en respuesta a estas moléculas inducen la sobre-expresión de genes específicos. De acuerdo con esto, al afectar la expresión de algunos de estos genes observamos un incremento en la sensibilidad de las células cancerosas al TPL. Asimismo, también encontramos que el silenciamiento de otras subunidades del complejo de TFIIH resulta en una mayor susceptibilidad de las células cancerosas a morir en comparación con las no cancerosas. Finalmente, logramos generar un sistema que permite analizar la interacción de las diferentes subunidades de TFIIH (*Split GFP*) para posteriormente probar diferentes moléculas que puedan interferir con esta interacción.

En conclusión, éste trabajo aporta conocimiento que es relevante en el entendimiento de cómo la célula cancerosa responde a la inhibición de la transcripción, de cómo el complejo TFIIH está organizado, propone nuevos blancos contra el cáncer y abre una nueva directriz para el estudio de nuevos mecanismos de transcripción.

ABSTRACT

The cancer cell requires high levels of transcription to survive and maintain the cancerous phenotype. They have been proposed to be "transcription addicted cells", which places the transcriptional machinery as an excellent therapeutic target-directed specifically at tumour tissue. One of the essential factors for transcription to take place is the TFIIH factor, which is made up of 10 subunits grouped into two subcomplexes, the "core" (p8, p34, p44, p52, p62, XPB, and XPD) and the CAK (CDK7, CYCH, and MAT1). These subcomplexes participate in Nucleotide Excision Repair and cell cycle control, respectively. The role of TFIIH in transcription is essential because the XPB subunit spins and pushes one of the DNA strands in the promoter causing the transcription initiation bubble to form (formation of the open complex). This is important for the recognition of the transcription start site by RNA Polymerase II (RNAPII). On the other hand, CDK7 phosphorylates serine 5 of RNAPII, which is necessary to initiate transcription, practically simultaneously. Therefore, TFIIH participates in three crucial processes for the cell and makes it an important candidate for the use of inhibitors that affect this factor and in this way the growth of cancer cells can be preferentially inhibited.

THZ1, a molecule that can covalently bind CDK7, causing a conformational change that inactivates its kinase activity has been shown to preferentially kill cancer cells. Furthermore, since ancient times, traditional Chinese medicine has used infusions from the root of the plant *Tripterygium wilfordii*, to treat inflammatory problems and cancer. The molecule that gives it these properties is known as triptolide (TPL). Interestingly, the target of TPL was found to be the XPB subunit of TFIIH, to which covalently binds it and therefore affects the initiation of RNAPII-mediated transcription.

In this work we have used the MCF10A-ErSrc oncogenesis model to compare the effect of TFIIH inhibitors between cancer or transformed cells and no cancer cell, we discovered new possible targets that have the potential to increase the effect of TPL to kill. We found that tumour cells exhibit a greater sensitivity to TPL and THZ1 than non-cancer cells and that the combination of both substances has a

synergistic effect. Interestingly, TPL causes a reduction in the levels of the XPB, p52 and p8 subunits of TFIIH, but not of other components of this complex, suggesting that these three proteins form a sub-module within TFIIH. Through RNA-seq and ChIP-seq experiments we show that although the transcript levels of many genes are reduced, a significant number increases after treatment with TPL. Interestingly, in genes where there is an increase in their transcripts, there is a correlation with the maintenance or an increase in the presence of RNAPII in its promoters, indicating that they are over-expressed at the level of transcription. Several of these genes are also over-expressed in response to THZ1. Therefore, transcriptional stress induces the over-expression of specific genes. Interestingly, when we affect the expression of some of these genes, we observe an increase in the sensitivity of cancer cells to TPL.

Likewise, we also found that knockdown of other subunits of the TFIIH complex renders, the cancer cells more susceptible to death compared to non-cancer cells.

And finally, we used a system to analyse the interaction of the different TFIIH subunits (Split GFP) to later test different molecules that may interfere with this interaction.

In conclusion, this work provides knowledge that is relevant in understanding how the cancer cell responds to transcription inhibition, how the TFIIH complex is organized, sets new targets against cancer and opens a new avenue for the study of new transcription regulation mechanisms.

I. INTRODUCCION

1.1. Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades más devastadoras para la humanidad, siendo considerada la segunda causa de muerte a nivel mundial. En la actualidad mueren al año aproximadamente 9.6 millones de personas por esta enfermedad, incluso más que las muertes ocasionadas por el VIH/SIDA, malaria y tuberculosis juntas. Se calcula que para el 2030 las muertes por cáncer aumenten a 13 millones al año (OMS, 2020).

En nuestro país, el cáncer es la tercera causa de muerte, solo precedida por las enfermedades cardiovasculares y Diabetes Mellitus; en el 2017 se registraron aproximadamente 83,813 decesos. En mujeres, el cáncer de mama es la primera causa de muerte con una ocurrencia de 20,444 casos al año e incidencia de 35.4 casos por 100 mil mujeres (INEGI, 2019).

Bajo el término de cáncer se agrupan un conjunto de enfermedades que alteran la homeóstasis celular en donde existe un crecimiento y diseminación incontrolados de células¹. Cuando una célula se convierte en cancerosa, adquiere características que las diferencian de las demás células llamadas: “*hallmarks*” del cáncer (Figura 1) ², algunas de estas características son:

- ✓ Una proliferación constitutiva, provocada por diferentes mutaciones en oncoproteínas, como c-Myc, c-Kit, Abl, Src, entre otros y de genes supresores de tumores, como p53, PTEN, entre otros².
- ✓ Evasión del sistema inmune, provocada por deficiencias en el desarrollo o función de células CD8⁺, CD4⁺ y natural killer (NK) que pueden favorecer un microambiente para el crecimiento tumoral².
- ✓ Un potencial replicativo sostenido, ya que durante la transformación neoplásica la enzima telomerasa mejora su funcionamiento y es capaz de rescatar a las células tumorales de la diferenciación terminal y senescencia y así favorecer la estabilidad de su potencial replicativo^{2,3}.

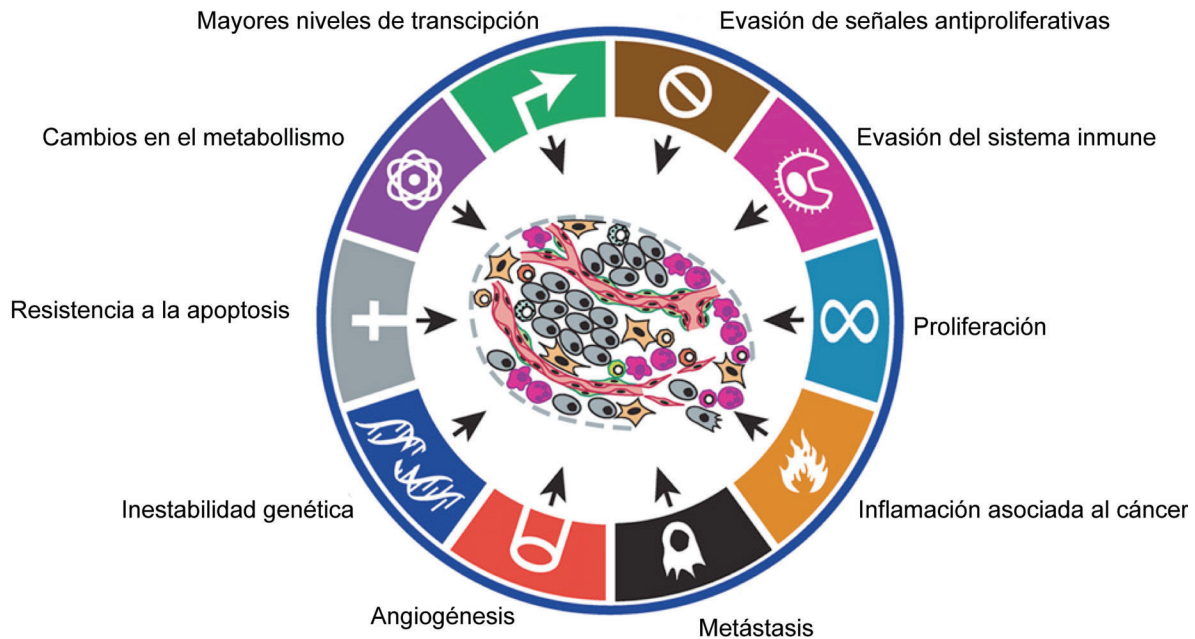


Figura 1. Características de las células cancerosas. Diferentes características que presentan las células cancerosas, en el centro de la imagen se representa el microambiente tumoral. Modificada de Hanahan & Weinberg, 2011².

- ✓ Inflamación asociada al cáncer, provocada por la presencia de mediadores pro-inflamatorios moleculares y celulares en el microambiente tumoral².
- ✓ Metástasis, la capacidad que tienen de invadir diferentes tejidos, es un proceso que ocurre en múltiples etapas: 1) degradación de la matriz extracelular; 2) transición epitelio-mesénquima; 3) reducción de moléculas de adhesión; 4) resistencia por la vasculatura sanguínea y linfática; 5) transición mesénquima-epitelio y 6) re-implantación^{2,4}.
- ✓ Inducción de neo-angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos es una necesidad de los tumores para asegurar el acceso de nutrientes y el intercambio de gases².
- ✓ Inestabilidad genética, se manifiesta a nivel genético, e incluye mutaciones, translocaciones, amplificaciones y/o inestabilidad cromosomal².
- ✓ Resistencia a apoptosis, existe un incremento en la expresión de moléculas como Bcl-2 y Bcl-x, a la par que se reducen los mediadores pro-apoptóticos como Bim, Bid y PUMA, además de la pérdida de la actividad de p53 en muchos tumores^{2,5}.

- ✓ Cambios en el metabolismo, por lo general las células cancerosas se vuelven anaerobias por la rápida división, soportan condiciones de hipoxia y aumentan el consumo de glucosa (efecto Warburg)^{2,6}.
- ✓ Mayores niveles de transcripción, asociados a la desregulación de reguladores maestros transcripcionales, cambios de marcas en la cromatina, pérdida de diferentes regiones que se encuentran silenciadas, amplificaciones, fusiones, entre otras^{2,7,8}.

Sobre esta última característica, se sabe que la célula cancerosa requiere niveles altos de transcripción para sobrevivir y mantener el fenotipo canceroso, de hecho se ha propuesto que son “adictas a la transcripción”, en particular la expresión se asocia con ciertos oncogenes y factores transcripcionales⁷. Por ejemplo, se ha visto que la célula cancerosa tiene un crecimiento y proliferación descontrolada, asociada a un aumento de transcritos de RNA ribosomales (rRNA). En algunas células un mayor nivel en la transcripción de los rRNAs inducen un crecimiento del nucléolo (marcador de células cancerosas cuando son altamente agresivas)⁹. También se ha descubierto que el oncogén *c-myc* necesita incrementar de manera global la transcripción de todos los genes de la célula para inducir un fenotipo canceroso, incluidos los genes que codifican al rRNA y esto lo hace a través de potenciar la actividad del complejo P-TEFb que estimula la elongación de la transcripción mediada por la RNA Polimerasa II (RNAPII)¹⁰. Otro aspecto importante a considerar es que la célula cancerosa se encuentra en una situación de estrés constante. También se sabe, que el factor de choque de calor 1 (HSF1) activa un programa transcripcional diferente al que activa cuando se induce un estrés por calor, que es esencial para mantener cánceres altamente malignos¹¹. Asimismo, se sabe que las células cancerosas son más sensibles a sufrir apoptosis en respuesta a la inactivación transcripcional¹². Entonces se podría decir que la inhibición de la transcripción basal puede interferir con este programa, afectando más a la célula cancerosa que a una célula no cancerosa.

Por todo lo anterior muchos de los estudios realizados en Biología Celular están convergiendo en el estudio directo del cáncer. Uno de ellos es evaluar cómo

trabaja la maquinaria que regula la expresión de los genes y cuáles son los principales factores que participan en ésta, además de establecer un vínculo entre la transcripción y la transformación de una célula no cancerosa a cancerosa, lo cual sugiere que la maquinaria basal de transcripción es un blanco prometedor para el diseño de fármacos que bloqueen la proliferación de la célula cancerosa.

1.2 Transcripción

La transcripción mediada por la RNAPII es un proceso por el cual la información genética del DNA pasa a RNA mensajero (mRNA) y algunos RNAs no codificantes. Es el primer paso de la síntesis de proteínas y para que se lleve a cabo, es necesaria la participación de diversas proteínas que se denominan factores transcripcionales y que cumplen funciones específicas durante la transcripción.¹³ La RNAPII no es capaz por si sola de reconocer al promotor de los genes e iniciar la transcripción por lo cual ésta requiere del Complejo de Pre-inicio de la Transcripción (PIC, por sus siglas en Inglés) en el promotor¹⁴. En general el PIC está constituido por factores transcripciones (TF), como TFIID que incluye a la *TATA-Binding-Protein* (TBP), TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIE y TFIIH, que de manera secuencial se unen en el promotor junto con la RNAPII para poder dar inicio a la transcripción¹³ (Figura 2).

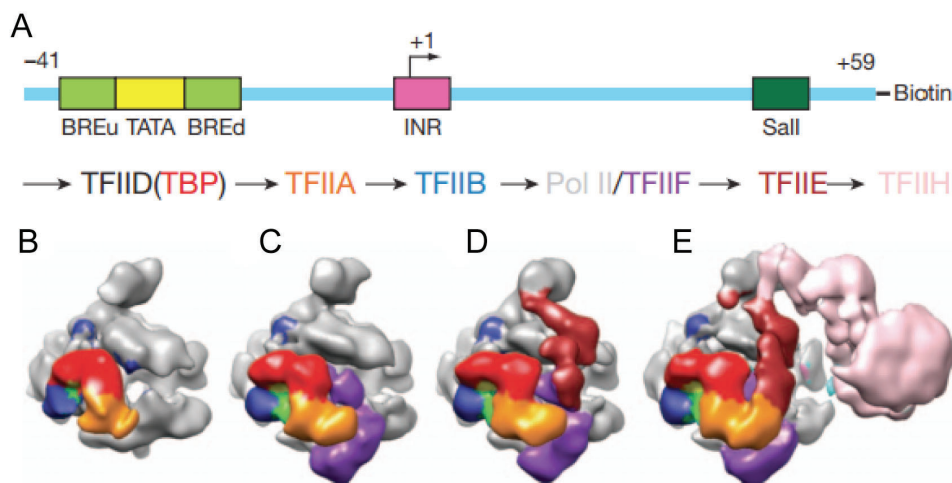


Figura 2. Esquema de la formación del PIC. (A) Esquema del DNA, donde se ilustran las posiciones de los elementos básicos para que se pueda llevar a cabo la transcripción. **(B-E)** Esquema de cómo se ensambla el

PIC, mostrando los diferentes factores transcripcionales en distintos colores. Modificado a partir de Yuan He y Eva Nogales^{15,16}.

En metazoarios, durante el inicio de la transcripción, la RNAPII sintetiza entre 20 a 120 nucleótidos y después hace una pausa^{17,18}. Dicha pausa es efectuada por los factores: NELF (factor negativo de elongación) que se encarga de estabilizar la RNAPII pausada al evitar la terminación prematura del promotor proximal; DSIF (factor inductor de sensibilidad DRB) promueve el reclutamiento de NELF y los factores del capping; PAF1C (complejo del factor 1 asociado a RNAPII) se encarga de modular la actividad de los *enhancers* y mantiene a la RNAPII en pausa al impedir su liberación para el alargamiento y Gdown1 que se encarga de bloquear el reclutamiento de TFIIF y previene la terminación temprana de la RNAPII^{19,20}. La liberación de la RNAPII es conducida por el “factor positivo de elongación b” (P-TEFb) que es parte del Súper Complejo de Elongación (SEC), P-TEFb se encarga de fosforilar a NELF provocando que se disocie de la cromatina, DSIF que se convierte en el factor de elongación positivo y también fosforila a la Serina 2 del dominio carboxilo terminal (“*carboxi terminal domain*” CTD) de la RNAPII y así poder iniciar la elongación^{21–23} (Figura 3).

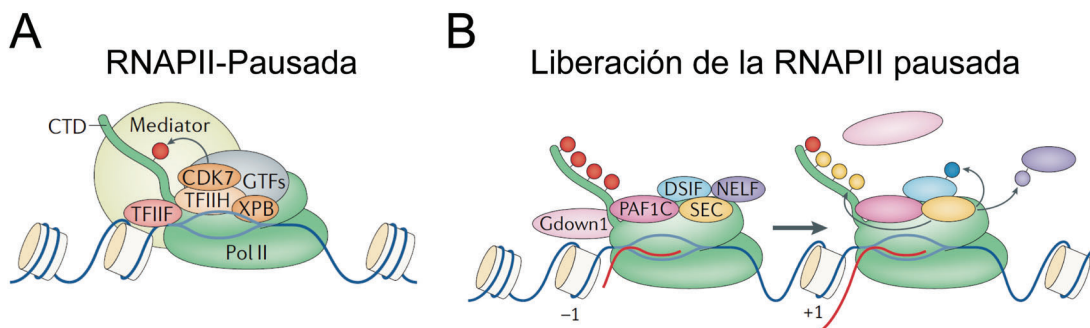


Figura 3. Establecimiento, mantenimiento y liberación de la RNAPII pausada. **A.** La pausa de la RNAPII se estabiliza al interactuar con varios factores, como el factor negativo de elongación (NELF), el factor inductor de sensibilidad DRB (DSIF), el complejo del factor 1 asociado a RNAPII (PAF1C) y Gdown1. **B.** La liberación de la RNAPII pausada es impulsada por el reclutamiento y la activación del factor positivo de elongación b (P-TEFb), que se encuentra dentro del complejo SEC, que se encarga de fosforilar los residuos de NELF, DSIF y Ser2 del la RNAPII CTD. Modificada a partir de Fei Xavier⁸.

1.2.1 Factor de Transcripción IIH

El factor de transcripción IIH (TFIIH) es un complejo formado por diez proteínas que están divididas en dos subcomplejos: el “core” compuesto por: XPB (p89), XPD (p80), p44, p62, p52, p34 y p8 y el subcomplejo “CAK” (cinasa activadora de CDKs) formado por CDK7, Ciclina H (CYCH) y MAT1²⁴. La organización estructural de TFIIH se ha modelado a partir de información generada mediante cristalografía, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y criomicroscopía electrónica^{25–28}. El modelo más reciente de la estructura de TFIIH muestra que las subunidades p34 y p44 forman un heterodímero a través de la interacción de sus dominios vWA (denominados así por la proteína fundadora de la familia de proteínas que poseen: von Willebrand factor A), a los cuales también se une la subunidad p62. Asimismo, las subunidades p8 y p52 forman un heterodímero y ambas interactúan con XPB. Simultáneamente, p52 contacta al heterodímero p34-p44, lo que permite el anclaje de p52, p8 y XPB al “core”. Además, la subunidad XPD une al CAK y al “core” a través de sus interacción con un componente de cada subcomplejo: MAT1 y p62 respectivamente²⁶ (Figura 4).

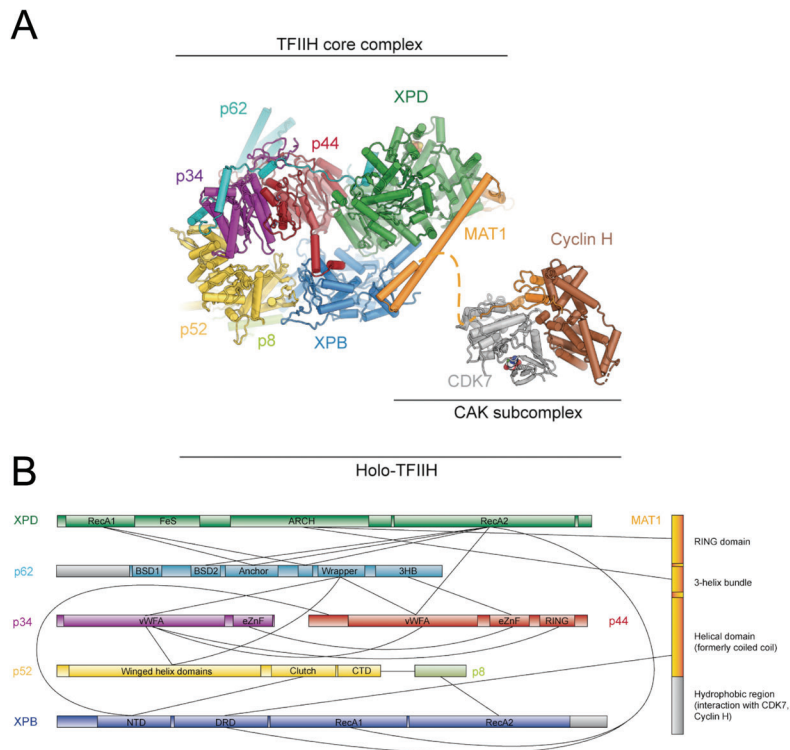


Figura 4. Estructura e interacciones de TFIIH. (A) Estructura de TFIIH resuelta mediante criomicroscopía. TFIIH está formada por diez subunidades organizadas en dos subcomplejos funcionales: el “core”, compuesto

por XPB, p52, p34, p44, XPD, p8 y p62; y el “CAK”, formado por CDK7, Ciclina H y MAT1, juntos forman el Holo complejo de TFIIH. **(B)** Red de interacción proteína-proteína a nivel de dominio entre los componentes del “core” y MAT1 de TFIIH. Abreviaturas: CTD: dominio C-terminal; DRD: dominio de reconocimiento de daños al DNA; FeS: dominio de sulfuro de hierro; NTD: dominio N-terminal; vWFA: von Willebrand Factor. Modificado de Basil J. Greber, 2019 y 2020 ^{26,27}.

TFIIH participa en tres procesos fundamentales para la célula (Figura 5):

1. El subcomplejo “core” o central, participa en Reparación por Escisión de Nucleótidos (REN).
2. El subcomplejo CAK participa en el control del ciclo celular.
3. Cuando los dos complejos están juntos (“core” y CAK) es cuando operan en la transcripción mediada por la RNAPII²⁴.

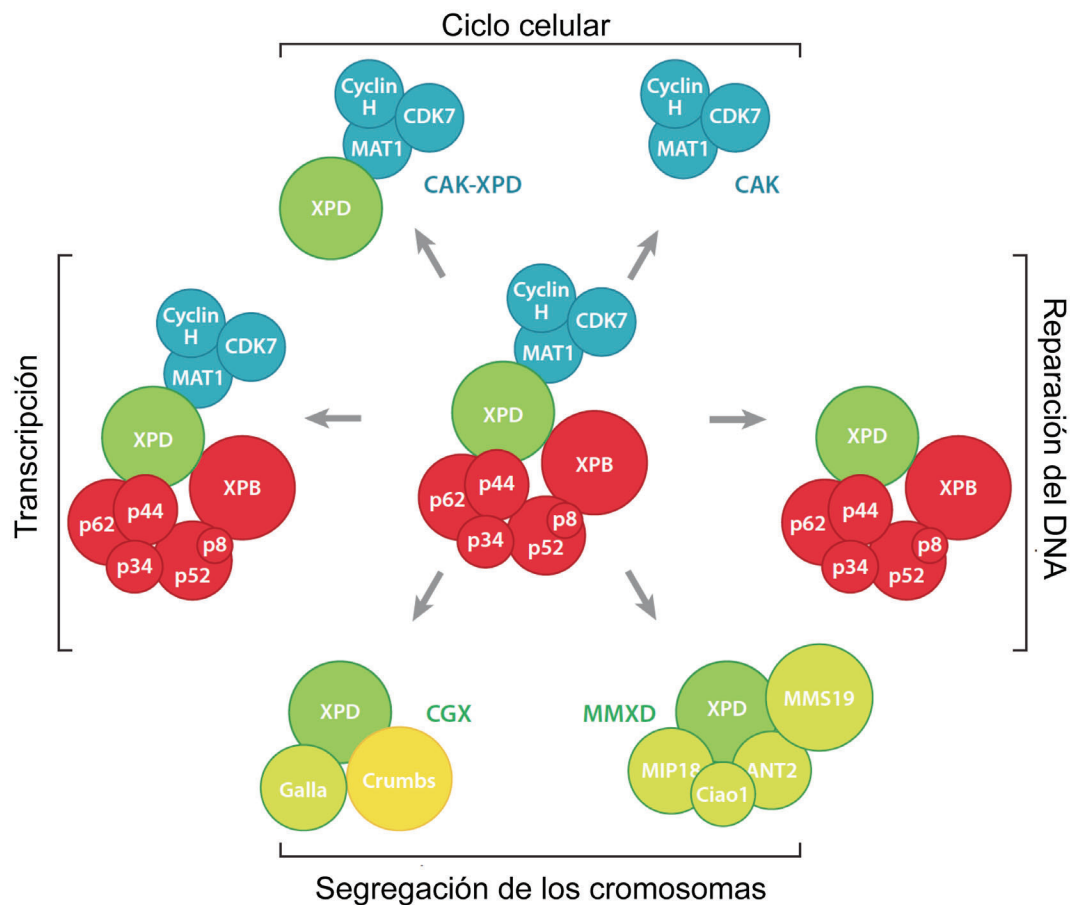


Figura 5. TFIIH es multifuncional. Las subunidades de TFIIH pueden formar el holocomplejo, complejos intermediarios o subcomplejos. El holocomplejo TFIIH participa en el inicio de la transcripción mediada por la RNAPII. El subcomplejo CAK y el complejo intermediario XPD-CAK está involucrado en el control del ciclo celular, mientras que el “core” participa en la reparación del DNA mediante el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos. Además, XPD es parte de los complejos CGX y MMXD, ambos involucrados en la segregación de los cromosomas. Modificado de Emmanuel Compe²⁹.

Las subunidades XPB, XPD y CDK7 poseen actividades enzimáticas que confieren multifuncionalidad a TFIIH. A su vez, la combinación de estas proteínas con el resto de las subunidades del complejo modulan su actividad (Tabla 1)²⁹.

Dos de las subunidades con actividad enzimática forman parte del “core” de TFIIH, estas son XPB y XPD, son helicasas/ATPasas de DNA de polaridad opuesta requeridas para la apertura del DNA en el promotor durante el inicio de la transcripción³⁰. Adicionalmente, XPB posee actividad de translocasa de DNA, con la cual permite el posicionamiento de esta molécula en la región catalítica de la RNAPII para el inicio de la síntesis del mRNA³¹. Asimismo, las actividades de XPB y XPD participan en la apertura de la doble cadena de DNA para formar la burbuja de reparación en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos, involucrado en la respuesta a daño del DNA causada por la luz UV y algunos agentes químicos³⁰.

Las actividades enzimáticas del “core” de TFIIH se modulan por componentes del mismo complejo. Las subunidades p8 y p52 estimulan la actividad ATPasa de XPB, mientras que p44 regula la actividad helicasa de XPD²⁴.

La subunidad catalítica del CAK es CDK7, una cinasa que como parte del holocomplejo fosforila las serinas 5 y 7 del CTD de la RNAPII y permite con ello el inicio de la elongación y el reclutamiento de factores que procesan el mRNA^{32,33}. Adicionalmente, el subcomplejo CAK fosforila a CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6, otras cinasas dependientes de ciclinas que participan en la progresión del ciclo celular³⁴. Asimismo, la actividad cinasa y la especificidad de CKD7 están reguladas por las otras dos subunidades del CAK: CYCH y MAT1²⁴

Adicionalmente, la subunidad p44 posee una secuencia consenso de ligasa de ubiquitina tipo E3, cuya actividad *in vitro* se estimula por p34³⁵ (Tabla 1). Por otra parte, XPD en conjunto con las proteínas MMS19 y MIP18 forma el complejo MMXD, involucrado en la segregación de los cromosomas durante la mitosis. Sin embargo, se desconoce cuál es el papel de XPD dentro de este complejo³⁶.

Tabla 1. Subunidades del complejo TFIIH

Subcomplejo	Subunidad	Función
Core	XPB/ERCC3	Helicasa 3'-5' dependiente de ATP. Translocasa de DNA.
	XPD/ERCC2	Helicasa 5'-3' dependiente de ATP.
	p62	Función estructural, interacciona con factores de transcripción y de NER.
	p52	Regula la actividad ATPasa de XPB.
	p44	Regula la actividad helicasa de XPD. Ligasa de ubiquitina E3.
	p34	Función estructural, interacciona fuertemente con p44.
	p8/TTDA	Regula la actividad ATPasa de XPB y estabiliza al complejo.
CAK	MAT1	Estabiliza el CAK.
	CDK7	Cinasa del CTD de la RNAPII
	CYCH	Modula la actividad cinasa de CDK7

XPB y XPD, proteínas *xenoderma pigmentosum* grupos de complementación B y D, respectivamente; ERCC, proteínas que complementa la reparación por escisión (“*excision repair cross-complementing*”); MAT1 (“*ménage à trois*”) trío 1; CDK7, cinasa 7 dependiente de ciclina; CYCH, Ciclina H; TTDA, proteína tricotodistrofia grupo de complementación A. Modificado de Compe³⁰.

1.2.1.1 Papel de TFIIH durante la transcripción

El último factor transcripcional que se recluta para formar el PIC, es TFIIH el cual es considerado el factor limitante de la transcripción, ya que existen menos moléculas de TFIIH en comparación con los demás factores transcripcionales³⁷. Otro paso clave en el inicio de la transcripción es la separación de la doble hebra del DNA (formación del complejo abierto) y escape del promotor, para que esto se lleve a cabo se requiere de la presencia de enzimas con actividad helicasa para el DNA, las subunidades de TFIIH: XPB y XPD son las que se encargan de abrir la burbuja y también se necesita la fosforilación del CTD, esta fosforilación se requiere para que la polimerasa se libere de los factores transcripcionales, una de las cinasas responsables de la fosforilación del CTD es CDK7, la cinasa de TFIIH.

Finalmente, TFIIF también participa en el inicio de la elongación ya la subunidad CDK7 es la que se encarga de fosforilar a CDK9 (subunidad catalítica de P-TEFb), y así P-TEFb pueda fosforilar a NELF, DSIF, y la serina 2 del CTD y liberar a la RNAPII pausada (Figura 6)^{29,30}.

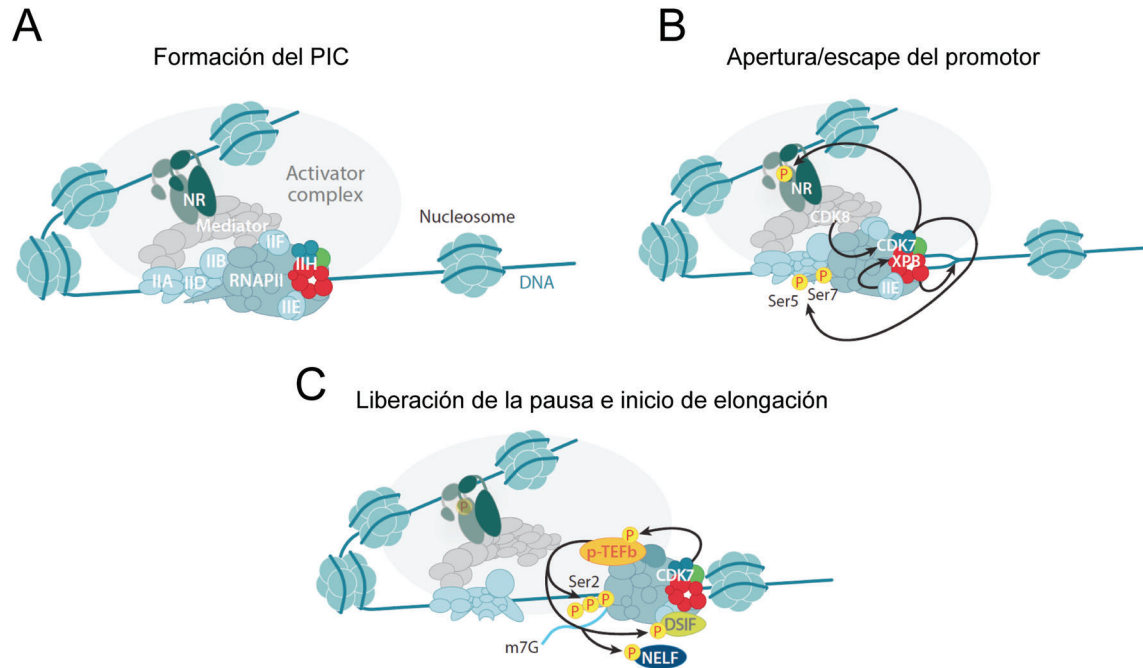


Figura 6. TFIIF es un factor clave en la transcripción de RNAPII. (A) TFIIF es el último componente que se une para formar el complejo de pre-inicio de la transcripción (PIC). (B) Una vez que se reclutan los factores de transcripción generales, las subunidades XPB y XPD de TFIIF promueven la apertura del DNA y CDK7 fosforila la serina 5 (Ser5) y la serina 7 (Ser7) de la CTD RNAPII y diferentes factores de transcripción como los NR (Receptores nucleares). La cinasa CDK8 (subunidad catalítica) del mediador pueden modular las actividades de CDK7. (C) La fosforilación por CDK7 estimula la actividad de P-TEFb, que a su vez fosforila Ser2 de RNAPII CTD, DSIF y NELF. Después de la fosforilación, NELF se disocia del complejo y DSIF se convierte en un factor de elongación positivo que viaja con RNAPII. Abreviaturas: CDK, cinasa dependiente de ciclina; CTD, Dominio C-terminal; P-TEFb, factor de elongación de transcripción positivo b; RNAPII, RNA Polimerasa II; TFIIF, factor de transcripción IIF; XPB, proteína del grupo B de xeroderma pigmentoso. Modificada de Compe³⁰.

1.3 Fármacos cuyos blancos terapéuticos son factores transcripcionales

Los fármacos cuyos blancos terapéuticos sean los componentes de la maquinaria basal de transcripción (cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), RNAP o alguno de los componentes de la transcripción asociada a algún complejo) podrían afectar

preferencialmente las células cancerosas (Tabla 2), dado que como se menciono anteriormente estas células llevan a cabo altas tasas de transcripción.

Tabla 2. Fármacos cuyo blanco es un componente de la maquinaria de transcripción

Fármaco	Blanco	Otros blancos	Tratamiento	Mecanismo de acción
H-7	CDK7, CDK8, CDK8	PKC	Solo en investigación	Reduce los niveles de fosforilación de la RNAPII, inhibiendo la elongación ³⁸⁻⁴⁰ .
AT8319	CDK9	-	MM y en linfoma de no-Hodgkin's	Inhibe la p ^{Ser2} RNAPII, inhibiendo la elongación ⁴¹ .
P276-00	CDK9	CDK1, CDK4	MM, cáncer de mama, melanoma, MCL y HNSCC	Inhibe la elongación de la transcripción ⁴¹ .
Flavopiridol	CDK8, CDK9	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7, PKC, Src, EGFR, ERK1	CLL, MM, MCL, melanoma, ALM y en linfoma de no-Hodgkin's	Inhibe la p ^{Ser2} RNAPII, inhibiendo la elongación e inhibe el procesamiento del rRNA ^{38,41} .
CX-5461	Complejo SL1	-	Modelos de linfoma y leucemia	Impide la formación del complejo SL1 ^{42,43} .
α-amininina	RNAPII y RNAPIII	-	Ninguna debido a hepatotoxicidad	Se une a la subunidad más grande de RNAPII y RNAPIII ⁴⁴ .
BMH-21	RNAPI	Induce p53	Melanoma	Degradación de la subunidad RPA194 de la RNAPI ⁴⁵ .
JQ1	BRD3 y BRD4	-	MM, leucemia y adenocarcinomas en modelos animales	Desplazar a BRD3 y BRD4 de la cromatina ⁴⁶⁻⁴⁸ .

Abreviaturas: CLL, leucemia linfocítica crónica; AML, leucemia mieloide aguda, crónica; HNSCC, células escamosas de cabeza y cuello carcinoma; MCL, linfoma de células del manto; MM, mieloma múltiple.

En este trabajo se han estudiado dos fármacos cuyos blancos son dos subunidades del complejo de TFIIF.

1.3.1 Triptolide

Triptolide (TPL), es un diterpeno tripóxido, no soluble en agua, que se obtiene de la raíz de la planta *Tripterygium wilfordii*, endémico de la región del este y sur de China, Korea y Taiwan⁴⁹. No hay estudios reportados sobre la actividad biológica del TPL, sin embargo, algunas investigaciones con otros terpenos, sugieren que probablemente podría funcionar como una primera línea de defensa contra las bacterias y hongos patógenos que intentan penetrar por las raíces (Figura 7)⁵⁰.

Desde tiempos ancestrales, el TPL se ha usado en la medicina tradicional china, como un potente antiinflamatorio, antiproliferativo y proapoptótico⁵¹. Se ha demostrado que el TPL inhibe la proliferación celular e induce apoptosis a concentraciones nanomolares (nM), por lo menos en 60 líneas celulares cancerosas o derivadas de tumores⁴⁹.

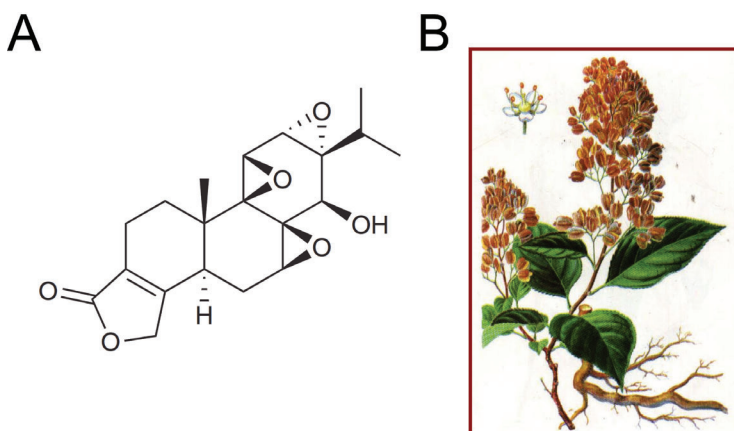


Figura 7. Triptolide (TPL). (A) Estructura química del triptolide. (B) Representación de la planta *Tripterygium wilfordii* de donde se obtiene el TPL. Tomado de Wang⁵².

Interesantemente en el 2011, se demostró que el blanco del TPL es la subunidad XPB de TFIIH, uniéndose covalentemente el carbono 12 del TPL con la cisteína 342 (TPL_{C12}-XPB_{Cys342}), inhibiendo así el dominio ATPasa de XPB y por lo tanto afectando el inicio de la transcripción mediada por la RNAPII^{53,54}. Se ha reportado también que el TPL interacciona con otras proteínas tales como: ADAM10, una metaloproteasa transmembranal que se expresa en varios tipos celulares de cáncer; DCTPP1, una pirofosfatasa que se ha visto aumentada en cáncer de

mama; ER α , el receptor de estrógenos alfa; PC2, policistin 2, un canal de calcio y con TAB1, una proteína de unión a cinasas activadoras. Sin embargo los detalles bioquímicos de las interacciones no están bien caracterizadas, por lo tanto, hasta el momento, el único blanco del TPL es la subunidad XPB del complejo de TFIIH⁵⁵.

Como se mencionó en párrafos anteriores, el TPL es insoluble en agua, por lo tanto, se han realizado modificaciones en diferentes grupos funcionales del TPL, encontrando que si se modifica y/o sustituye el C14, se puede cambiar la solubilidad del compuesto, hasta el momento hay al menos ocho análogos con buenos resultados antitumorales^{55,56}. El Minelide (Figura 8), un derivado del TPL, que es soluble en agua, se encuentra en estos momentos en la segunda fase de pruebas clínicas en pacientes con cáncer de páncreas que no responden a los tratamiento convencionales. El Minelide se administra en el torrente sanguíneo e induce muerte de las células cancerosas y ha mostrado datos prometedores.^{49,53-58}



Figura 8 Minelide. Estructura química del minelide. Tomado de Noel⁵⁵.

1.3.2 THZ1

Como se ha escrito en párrafos anteriores TFIIH es el factor limitante de la transcripción. Una de las subunidades con actividad enzimática es CDK7 que se encarga de fosforilar la serina (Ser) 5 y 7 del CTD de la RNAPII²⁴.

En tumores malignos algunas de las CDKs están desreguladas y son blancos potenciales de fármacos antitumorales, sin embargo, la mayor parte de los inhibidores de CDKs tienen su blanco en el dominio cinasa, el cual está altamente conservado en todas las CDKs y podría inhibir a múltiples miembros de la familia de CDKs. Por lo tanto, la identificación de un inhibidor selectivo para CDK es imprescindible para el desarrollo de terapias efectivas contra el cáncer^{32,59}.

En un estudio en 2014, lograron identificar un inhibidor de CDK7 llamado THZ1, una fenilaminopirimidina. El compuesto se une de manera covalente en la cisteína 312 (Cys 312), posición que se encuentra fuera del dominio cinasa, por lo cual, lo hace un fármaco específico para CDK7. THZ1 causa un cambio conformacional que inhibe la actividad cinasa de CDK7, es decir, no puede fosforilar la Ser 5 y 7 del CTD de la RNAPII (Figura 9)^{59,60}. Se ha demostrado que THZ1 es muy eficaz en concentraciones nanomolares (nM), ya que reduce la proliferación celular de diferentes tipos de líneas celulares derivadas de cáncer (o cancerosas) y también disminuye la expresión de MYC^{34,61}.

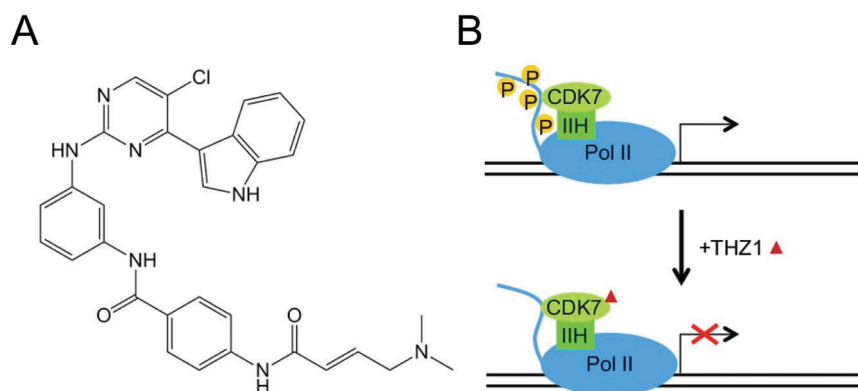


Figura 9. THZ1. (A) Estructura química del compuesto THZ1. **(B)** Mecanismo de acción de THZ1, inhibe la actividad cinasa de CDK7. Tomado de Kwiatkowski⁶⁰.

Estos aspectos son relevantes para este proyecto ya que como se mencionó anteriormente, la célula cancerosa necesita una actividad transcripcional mayor para proliferar y sobrevivir. Es así como TFIIF se convierte en un blanco interesante para el tratamiento contra el cáncer, en especial porque de todos los componentes del PIC, TFIIF es considerado el factor limitante²⁹.

II. ANTECEDENTES

2.1 Descripción del modelo de oncogenesis MCF10A-ErSrc

Las células MCF10A son células normales inmortalizadas, que se originan del tejido mamario fibroquístico obtenido de una mastectomía de una mujer de 36 años sin antecedentes familiares de cáncer de mama y sin evidencia de enfermedad. Aunque su cariotipo es estable, citogenéticamente estas células son aberrantes, ya que cuentan con una delección en los genes p16 y p14ARF, así como la amplificación del gen *myc* (no son completamente diploides), expresan p53 de manera silvestre, y son negativas para el receptor de estrógeno (ER)⁶².

Las células MCF10A-ErSrc son derivadas de la línea parental MCF10A y contienen una construcción que tiene al gen *src*, un derivado de la oncoproteína cinasa (v-Src) que esta fusionado al dominio de unión a ligando del receptor de estrógeno (ER). Se ha comprobado que el uso del fármaco denominado tamoxifeno (TAM, un análogo del estradiol) en esta línea produce un cambio conformacional en el sitio de unión de la hormona en el receptor de estrógenos activando a Src, este tratamiento induce la transformación de las células generando un fenotipo canceroso a las 72 horas post-tratamiento, con una transformación mayor del 90%⁶³.

El mecanismo por el cual se induce la transformación celular, inicia cuando el tamoxifeno se une directamente al dominio de unión a ligando del ER produciendo un cambio conformacional seguido de la autofosforilación en la tirosina 416 (Tyr 416)⁶⁴ y provocando así la activación y liberación de Src, la cual con su actividad de cinasa fosforila a IKK, y este a su vez fosforila al inhibidor de NFκB (IκB). Una vez que el inhibidor esta fosforilado, se libera el factor NFκB, y el inhibidor IκB es degradado por la vía del proteosoma. El factor NFκB se transloca al núcleo y activa la expresión de la interleucina 6 (IL-6). Después la IL-6 se libera y se une a su receptor (IL6-R) mediante una regulación autocrina⁶⁵. Cuando esta citocina se une a su receptor de membrana, induce la dimerización y activa las cinasas Jacks, las cuales se autofosforilan y fosforilan también al receptor. Los sitios fosforilados

funcionan como sitio de anclaje para las moléculas STATs que contienen dominios SH2, en este caso STAT3. Cuando se recluta hacia el receptor, los STAT3 se fosforilan, dimerizan y se translocan al núcleo para regular la transcripción de genes asociados con proliferación celular y anti-apoptosis, como ETS2, BCL2, FOS, ATF3 y ARNTL2, entre otros^{63,65}. La activación de STAT3 es importante para el mantenimiento de la transformación celular, por lo cual, se usará a lo largo de este trabajo como marcador de transformación.

De manera paralela, la activación del receptor de la IL-6 promueve el reclutamiento de la fosfatasa de tirosina SHP-2 a través de su dominio SH2, para fosforilar residuos de tirosina de proteínas adaptadoras como la GRB2, que puede activar la vía de Ras y de ahí las cinasas correspondientes río abajo RAF→MEK→ERK, repitiéndose la fosforilación por un lado del inhibidor de NFκB y la transcripción constitutiva del factor transicional STAT3 (Figura 10)⁶³.

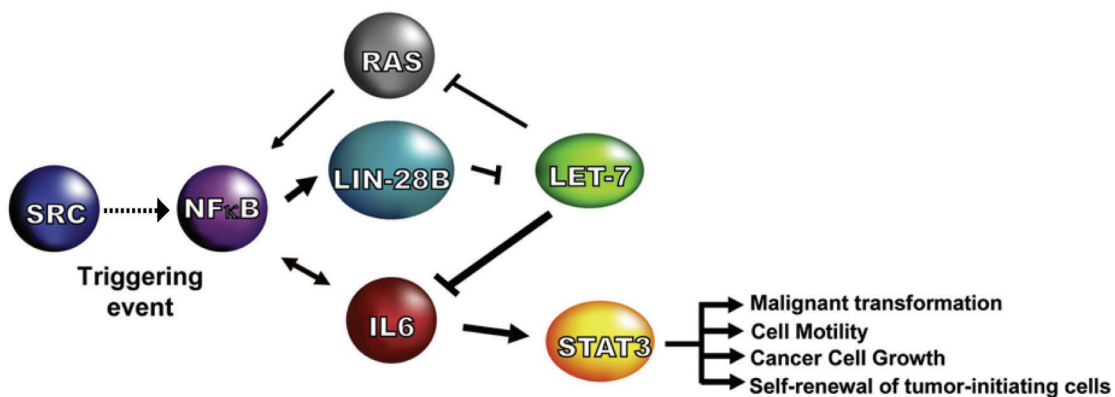


Figura 10. Principales componentes involucrados en la transformación celular de la línea MCF10A-ERSrc. Descripción esquemática del circuito epigenético para iniciar y mantener la transformación celular. Modificado de Iliopoulos⁶³.

En esta vía de señalización descrita anteriormente, también participan varios microRNAs, donde se ve que al activarse NFκB regula de manera positiva a Lin-28B el cual a su vez inhibe a let-7, ya que de manera normal let-7 inhibe a IL-6 y la vía de RAS. La activación de STAT3 es también regulada de manera positiva por activación directa de miR-21 y miR-181b, que activan a NFκB a través de la

inhibición de los supresores de tumores, PTEN y CYLD. Este circuito también se mantiene activo al nivel elevado de STAT3, el cual es capaz de inhibir a TSC22D3 (también conocido como GILZ, un regulador transcripcional), ya que de manera activa TSC22D3 es capaz de inhibir a RAS y NFκB. Por lo tanto con una simple dosis de tamoxifeno (2.5 μM) se activa un circuito que mantiene epigenéticamente el fenotipo canceroso hasta por 12 generaciones.⁶⁶

Recientemente a esta vía de transformación se le agregaron más componentes, formando una red de regulación transcripcional con más de 27 genes que son clave para angiogénesis, apoptosis, migración celular y transición epitelio-mesénquima a través de las vías de señalización de IL-1/ NFκB, IL6/STAT3 y TNF/JNK/AP-1⁶⁷.

Por lo tanto, la elección de este modelo oncogénico es adecuada para investigar la respuesta ante diferentes fármacos entre las células con un fenotipo transformado o tratadas con tamoxifeno (TAM) en comparación con las células no transformadas o no tratadas con tamoxifeno (NT).

2.2 Los niveles de TFIIH se incrementan en las células MCF10A-ErSrc después de la transformación.

Como primera aproximación, durante mis estudios de maestría, se compararon los niveles de diferentes subunidades de TFIIH en células NT y TAM, mediante experimentos tipo western blot e inmunotinciones. De manera relevante, encontramos que hay un incremento en los tres componentes del subcomplejo CAK (CDK7, MAT1 y CYCH) y en algunos de los componentes del complejo “core” de TFIIH (XPB, XPD, p62 y p8) que fueron analizados (Figura 11 y 12) en células TAM versus NT.

Sin embargo, los niveles de la TBP no fueron alterados (Figura 11A). Como control interno para las inmunotinciones se utilizó un anticuerpo que reconoce a la RNAPII

total, cuyos niveles no cambian durante la transformación (Figura 11B y Figura 12). Estos resultados mostraron que hay un incremento en los niveles de diferentes subunidades de TFIIH en las células TAM, apoyando la hipótesis de que las células cancerosas son adictas a la transcripción.

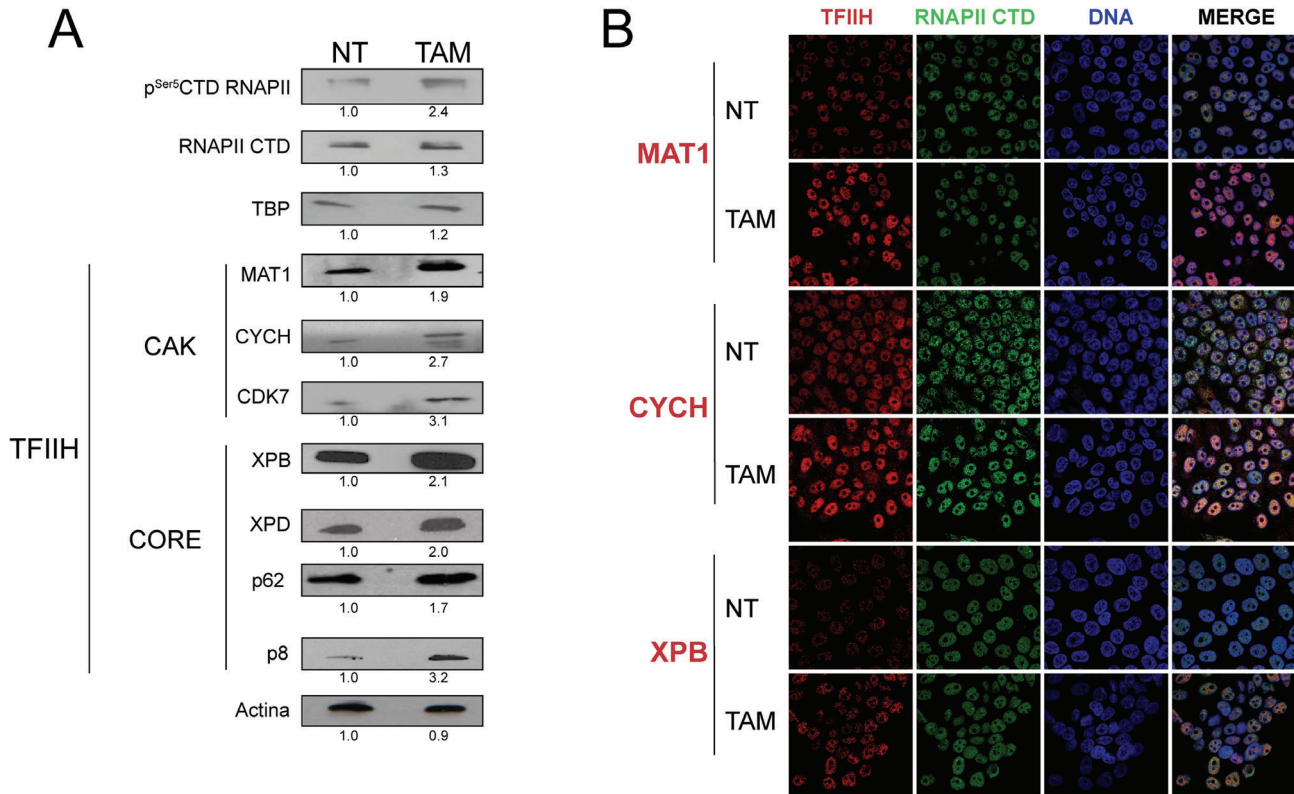


Figura 11. Los niveles de TFIIH aumentan en las células MCF10A-ErSrc. (A) Western blot de las subunidades de TFIIH: CAK (MAT1, CYCH y CDK7), CORE (XPB, XPD, p62 y p8) y p^{Ser5}CTD RNAPII aumentan en células TAM en comparación con las células NT. TBP y RNAPII (CTD) son utilizados para demostrar que no todos los componentes del PIC aumentan. Se usa como control de carga actina; las densitometrías realizadas se indica debajo de cada WB y los datos se muestran como un ejemplo de tres réplicas biológicas independientes. **(B)** Inmunotinciones de MAT1, CYCH y XPB (rojo), DNA (azul) y RNAPII CTD (verde) usado como control interno. Se muestra una imagen representativa de al menos tres réplicas biológicas independientes.

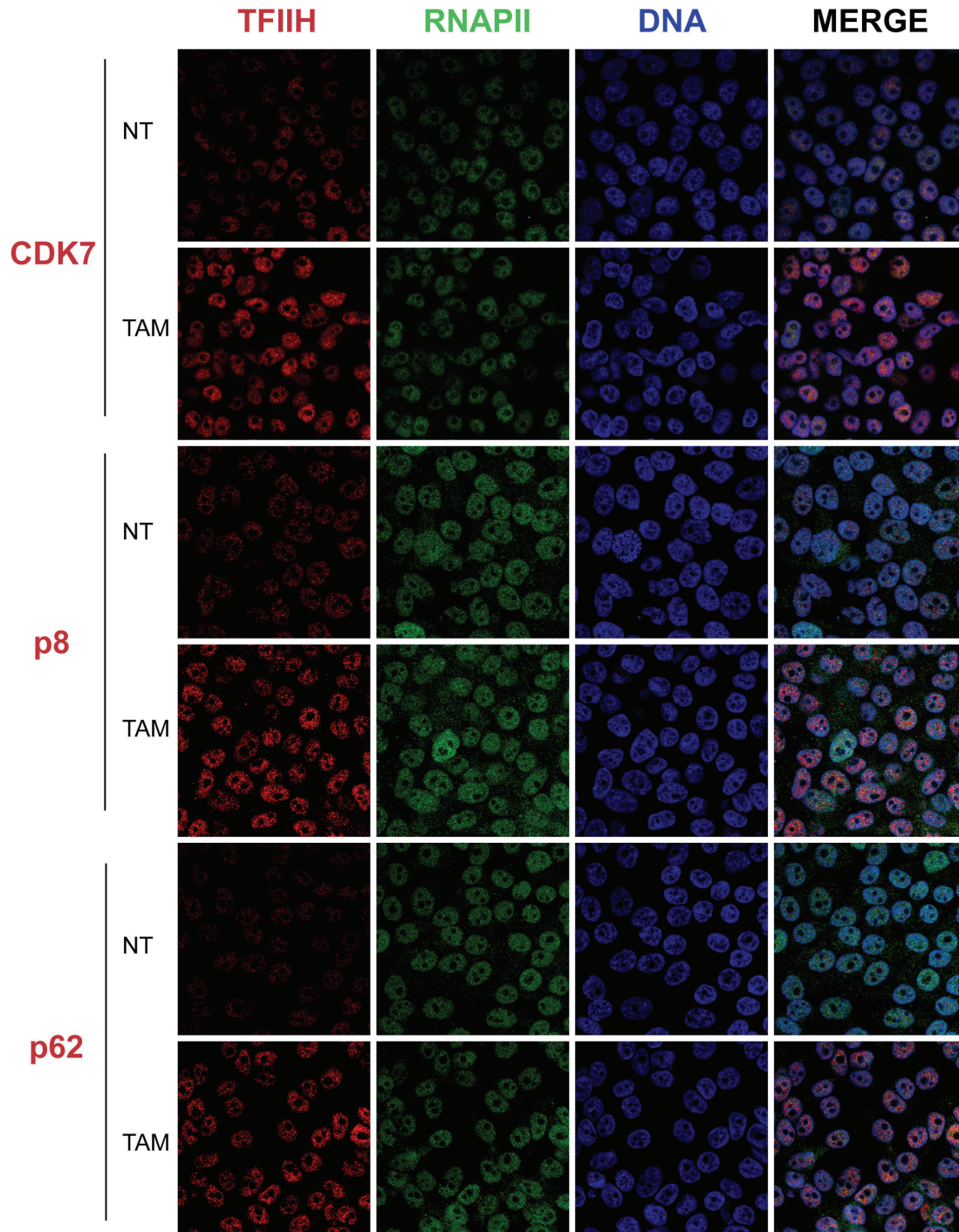


Figura 12. Inmunotinciones de las subunidades de TFIIH en células TAM y NT. Inmunotinciones de las subunidades de TFIIH: CDK7, p8 y p62 (en rojo) comparando células no tratadas (NT) y células tratadas con tamoxifeno (TAM), se usa como control interno a la RNAPII (en verde) y el DNA (en azul). Se muestra una imagen representativa de al menos tres replicas biológicas independientes.

III. JUSTIFICACIÓN

TFIIH es parte del complejo de pre-inicio de la transcripción y se ha propuesto como blanco contra el cáncer, por lo tanto, el uso de inhibidores que tengan como blanco a TFIIH, permitirá conocer la respuesta que se genera en las células cancerosas y compararlo con la respuesta de las células no cancerosas; lo cual permitirá tener un mejor entendimiento del uso de quimioterapia contra el cáncer basada en la inhibición global de la transcripción

IV. HIPÓTESIS

La inhibición de TFIIH en un contexto de cáncer conlleva a estrés transcripcional que resulta en muerte celular

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Entender la respuesta que se activa en las células cancerosas por el uso de moléculas que inhiban la transcripción global empleando como blanco a TFIIH.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el efecto del TPL, THZ1 y la combinatoria sobre la viabilidad, ciclo celular y proliferación en células cancerosas y no cancerosas.
2. Determinar el impacto de TPL y THZ1 sobre la integridad del complejo TFIIH.
3. Caracterizar la respuesta genómica que resulta de un estrés transcripcional en células cancerosas y no cancerosas. .
4. Determinar si los cambios en la expresión de genes en respuesta al TPL, también se producen como respuesta a THZ1.
5. Determinar el efecto de la reducción en la expresión de genes que responden al estrés transcripcional causado por el TPL.
6. Analizar el efecto de silenciar algunas subunidades de TFIIH en células cancerosas y no cancerosas.
7. Implementar una estrategia que permita analizar el efecto de moléculas que interfieran con la interacción de las subunidades de TFIIH.

VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA

6.1 Cultivo celular

La línea celular MC10A-ErSrc fue una donación del laboratorio del Dr. Kevin Struhl en Harvard Medical School, esta línea celular se cultivó en las condiciones que a continuación se describen:

Tabla 3. Componentes del medio de crecimiento para la línea celular MCF10A-ErSrc

Componente	Medio de crecimiento 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina ^a	Medio de selección 2 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina ^a
DMEM/F12 (1:1) (Invitrogen No. 11039-021)	500 mL	500 mL
Suero de Caballo (Invitrogen No.16050-122)	25 mL	25 mL
EGF (100 $\mu\text{g/mL}$ stock) ^b	100 μL	100 μL
Hidrocortisona (1 mg/mL stock) ^c	250 μL	250 μL
Toxina del cólera (1mg/mL stock) ^d	50 μL	50 μL
Insulina (10 mg/mL stock) ^e	500 μL	500 μL
Pen/Strep (100X solution. Invitrogen No. 15070-063)	5 mL	5 mL
Puromicina (1mg/mL stock) ^f	250 μL	1 mL

^a Para cada tipo de medio, pre mezclar los diferentes componentes apropiados y filtrarlos a través de un filtro estéril de 0.22 μm

^b EGF (Peprotech, 1mg). Resuspender a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ en dH_2O estéril. Preparar alícuotas y guardarlas a -20°C .

^c Hidrocortisona (Sigma No. H-0888, frasco con 1 g). Resuspender a una concentración final de 1 mg/ml en etanol. Preparar alícuotas y guardarlas a -20°C .

^d Toxina del cólera (Sigma No. C-8052, frasco con 2 g). Resuspender a una concentración final de 1 mg/ml en dH_2O estéril y dejar en agitación aproximadamente durante 10 min. Preparar alícuotas y guardar a 4°C .

^e Insulina (Sigma No. I-1882, vial con 100 mg). Resuspender a una concentración final de 10 mg/ml en dH_2O estéril con 1% de ácido acético glacial, dejar en agitación de 10 a 15 min. Preparar alícuotas y guardar a -20°C

^f Puromicina (Calbiochem No Cat. 540411) Resuspender en dH_2O estéril para obtener 1 mg/ml. Preparar alícuotas y guardar a -20°C . Modificado de Debnath⁶⁸.

Al momento de descongelar la línea celular, se realizaron dos pases con el medio de selección (Tabla 3), posterior a ello, la línea celular se cultivó con el medio de crecimiento (Tabla 3) hasta el pase 30.

NOTA: La puromicina se uso como antibiótico de selección de la construcción de la línea MCF10A-ErSrc.

Para la transformación las células MCF10A-ErSrc se trataron con tamoxifeno al 2.5 μ M cuando las células presentaban una confluencia del 80%. Las células fueron transformadas 72 h después de agregar tamoxifeno⁶³, como control de transformación se utilizo la p-STAT3 .

NOTA: Es importante mencionar que para el cultivo de la línea MCF10A-ErSrc, ni el medio de cultivo ni la tripsina tiene rojo de fenol, ya que su composición química puede mimetizar la estructura química del estradiol y activar la construcción mediante su unión al ligando del receptor de estrógenos.

El cultivo de las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y HEK-293 se realizó usando medio DMEM (Gibco, No. Cat.11965092), suplementado con FBS (Suero Fetal Bovino) al 10% (Gibco, No. Cat. 26140079)^{69,70}.

Todas las líneas se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

6.2 Reactivos

Tamoxifeno, 4-Hidroxytamoxifen (Sigma, No. Cat. H790); Triptolide (Tocris No. Cat. 3253); Insulina (Sigma No. Cat. I-1882); EGF (Peprotech, No. Cat. AF-100-15-1MG); Puromicina (Calbiochem No Cat. 540411) y THZ1 (APExBIO, No. Cat. A8882).

6.3 Western blotting

Se obtuvieron extractos de células NT y TAM crecidas en cajas de 100 mm x 20 mm (Corning, REF: 430167). Para extractos nucleares, las células se

resuspendieron en 1 mL de PBS 1X frío y se lavaron dos veces (2000 rpm durante 5 min), posteriormente se resuspendieron en 200 μ L de Buffer A frío (10 mM Hepes pH 7.6, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.75 mM espermidina, 0.15 mM Espermina, 1 mM DTT), más inhibidores (Aprotinina (10 μ g/mL) y leupeptina (10 μ g/mL) o complete 2X, DTT 1 M, PMSF 250 mM y Triton-X100 10%) se mezcló con la ayuda de una micropipeta y se incubó en hielo durante 15 min. Posteriormente se centrifugó durante dos minutos a 13000 rpm a 4°C y se removió el sobrenadante (fracción citosólica), a la pastilla nuclear se le agregaron 150 μ L de buffer NLB (Nuclear lysis buffer) (20 mM Hepes pH 7.6, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) más inhibidores y se agitó vigorosamente en vortex por 25 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Finalmente cada muestra fue alicuotada y almacenada a -80°C hasta su uso⁷¹. Para extractos totales, las células se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X frío y se lavaron dos veces (2000 rpm durante 5 min). Posteriormente se resuspendieron en 100 μ L de Buffer de homogenizado (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M Sacarosa), más inhibidores (Aprotinina (10 μ g/mL) y leupeptina (10 μ g/mL) o complete 2X, PMSF 250 mM y SDS 1%)⁷². A continuación, se centrifugó durante 30 min a 13000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante para su almacenamiento a -80°C. En cualquiera de los casos, la proteína se cuantificó usando la técnica de Bradford, para posteriormente cargar la misma cantidad de proteína en un gel desnaturalizante de acrilamida-brisacrilamida (Biorad) (gel concentrador al 3% y el gel separador al 7.5-15 %) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μ m de diámetro de poro (Biorad). La membrana se bloqueó durante 12 h a 4°C con leche semidescremada (a una concentración de 10-20 %) en PBST (PBS con 0.1 % Tween 20). Posteriormente se incubó durante 2 h con el anticuerpo primario (Tabla 4) diluido en PBST con leche semidescremada al 5 %. Se eliminó con PBST el exceso de anticuerpo primario (seis lavados de 10 min cada uno) y se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario HRP (Tabla 5). La membrana se lavó con PBST (seis lavados de 10 min cada uno) y las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (Thermo Scientific Pierce ECL). Las imágenes fueron tomadas

en el equipo: Gel Doc TM XR+ system (Biorad). Se realizaron ensayos con tres réplicas biológicas independientes.

Tabla 4. Características de los anticuerpos primarios usados en este trabajo

Anticuerpo	Dilución	No. Cat.	Compañía
8WG16 (RNAPII)	1:500	MMS-126R-500	Covance
H14 (p ^{Ser5} CTD RNAPII)	1:500	MMS-134-500	Covance
STAT3-P	1:1000	4113	Cell Signaling
TBP	1:500	sc-273	Santa Cruz Biotechnology
CDK7	1:1000	sc-7344	Santa Cruz Biotechnology
MAT1	1:1000	sc-6234	Santa Cruz Biotechnology
Ciclina H	1:1000	sc-855	Santa Cruz Biotechnology
XPB	1:1000	sc-293	Santa Cruz Biotechnology
p52	1:1000	sc-6852	Santa Cruz Biotechnology
p62	1:1000	sc-292	Santa Cruz Biotechnology
XPD	1:500	ab54676	Abcam
p8	1:500	T9577	Sigma-Aldrich
EPAS	1:100	sc-46691	Santa Cruz Biotechnology
ID2	1:500	ab53545	Abcam
CRY2	1:2000	ab93802	Abcam
HEXIM1	1:2000	ab25388	Abcam
Actina	1:2000	JLA-20-c	DSHB
Tubulina	1:2000	E7-c	DSHB

Tabla 5. Características de los anticuerpos secundarios usados en este trabajo

Anticuerpo	Dilución	No. Cat.	Compañía
Goat- anti Mouse	1:3000	A-10668	Invitrogen
Rabbit- anti Goat	1:2000	31402	Invitrogen
Goat- anti Rabbit	1:2500	656120	Invitrogen

6.4 RT-PCR y/o qRT-PCR

Se obtuvo RNA total de las células NT y TAM. Se utilizó TRizol (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones de la compañía fabricante durante la extracción de RNA. Se utilizó la misma cantidad de RNA de cada condición analizada (1 µg total

de RNA para todos los RT-PCR y qRT-PCR de los genes analizados y para las secuencias intrónicas se usaron 3 µg total de RNA) y las mismas condiciones de reacción para sintetizar el cDNA mediante transcripción reversa, utilizando la transcriptasa MVL-V (invitrogen). Se realizaron análisis de expresión mediante PCR semicuantitativos usando la Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific No. EP0405) y PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el sistema LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I y el equipo LightCycler 1.5 (Roche). El nivel de expresión relativa de cada gen analizado se calculó usando la siguiente fórmula: $2^{\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = (Ct \text{ gen blanco} - Ct \text{ gen control})$. En el caso de los PCR semicuantitativos la expresión relativa se calculó mediante densitometría usando el programa Fiji. La expresión de *GAPDH* se usó como control interno. Se realizaron triplicados técnicos de al menos dos réplicas biológicas independientes.

Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos usados para estos ensayos

Gen		Secuencia
<i>GAPDH</i>	Forward	GTT CCA ATA TGA TTC CAC CC
	Reverse	AAGATGGTGATGGGATTTCC
<i>ANKRD2</i>	Forward	AAG GTG AAG GGC CAA GAG
	Reverse	CTT CTG CTT GCG TTT CTT CC
<i>AXIN1</i>	Forward	TCG ATC CTG CCA TGT TTG
	Reverse	AGC CTG TCC TCG TAT ATT CC
<i>BCAS3</i>	Forward	CGA GTA GTG AAT CGC ATG AG
	Reverse	AGA AGG GCT GCT TGA TAG AC
<i>CCNL2</i>	Forward	GTG CCT CTA CTA CTG GAT CAA G
	Reverse	CTT CAC ATG GAC GCA GAA AC
<i>CDK3</i>	Forward	TGG GCA GCA AGT TCT ATA CC
	Reverse	TCA GAG TCA CCA GGA AAC AG
<i>CYP4B1</i>	Forward	CCT GGA CTT CCT GGA CAT TC
	Reverse	TGG TGT CAT GGC CTT CAA AC
<i>GJA9_AS</i>	Forward	AGA GGT CAC CGT TCT ATT CC
	Reverse	GGT TTC CAA TCG CAG TTA GC
<i>H19_AS</i>	Forward	TCA AAG CCT CCA CGA CTC TG
	Reverse	ACG CAC ACT CGT ACT GAG AC
<i>MFGE8</i>	Forward	AAC GCG GTG CAT GTC AAC
	Reverse	TTC AGC TCA CAG CCC AGT AG
<i>MYB</i>	Forward	AGA GGT GGC ATA ACC ACT TG

	Reverse	ATT TCT GCC CAT CTG TTC CC
NAV_AS	Forward	GAT TCT TCT TGC CCG ACG TG
	Reverse	AAT CAG ACG GAG GCT CAG AC
SOX9	Forward	CAG GTG CTC AAA GGC TAC
	Reverse	CAT GAA GGC GTT CAT GGG
PFKFB4	Forward	TGA GGC TAC GGA GGA CTT C
	Reverse	GGC CCA CAT CCA TGA TCT TG
PLK1	Forward	AAG TCT CTG CTG CTC AAG
	Reverse	AAA GCC GTG GAA TCC TAC
CRY2	Forward	GGG TTG CCA ACT ATG AGA G
	Reverse	ACA GGC GGT AGT AGA AGA G
EPAS1	Forward	CAC CAA GGG TCA GGT AGT AAG
	Reverse	GTT GCG AGG GTT GTA GAT G
HEXIM1	Forward	ACT CCG AGG CCA GTA AGT TG
	Reverse	TGC CGC TTC TTC TTG GAC
ID2	Forward	CTG CTA CTC CAA GCT CAA G
	Reverse	GCA GGT CCA AGA TGT AGT C
LOC730101	Forward	CAC CTC CTT TCT TGC CTT TG
	Reverse	AAT GGC CTC CAT CTG GAA AC
CLU_intron	Forward	GGACGGATGCATGACCTAAG
	Reverse	ACAATCAGCGAGGCACAC
POLR2A_intron	Forward	GGTAGCTTCCTCCTCTTCTG
	Reverse	TCCTGGTCTGTCGTGTTT
ID2_intron	Forward	ACTAGGAGATCCGTAGCCCAGAC
	Reverse	CACGCACAGCTCAATCTACAG

6.5 Ensayos con siRNAs

La transfección de los siRNA se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Dharmacon (<https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Protocols/basic-dharmafect-protocol.pdf>). Se usaron siempre los siguientes controles en cada experimento: células solo con medio, células solo con agente transfectante, células tratadas con un RNA Scrambled (No. Cat, D-001810-10-20) y células transfectadas con los siRNA de interés: *CRY2* (No. Cat. L-014151-01-0010), *EPAS1* (No. Cat. L-004814-00-0010), *HEXIM1* (No. Cat. L-012225-01-0010), *ID2* (No. Cat. L-009864-00-0010), *LOC730101* (No. Cat. R-189565-00-0010), *CDK7* (No. Cat. L-003241-00-0010) y *XPD* (No. Cat. L-011027-00-0010). Los siRNAs se diluyeron a una concentración final de 5 μ M en 1X siRNA buffer (libre de RNAsas).

Se sembraron las células en cajas de 6 pozos con una densidad de 2.5×10^5 /ml, se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂ en medio de cultivo libre de suero y antibiótico durante toda la noche. En tubos separados se diluyó el siRNA (tubo 1) y el reactivo de transfección DharmaFECT 1 (No. Cat T-2001-03) (tubo 2) con medio libre de suero. Se mezcló suavemente el contenido de cada tubo pipeteando cuidadosamente hacia arriba y hacia abajo. Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió el contenido del tubo 1 al tubo 2, y se mezcló suavemente por pipeteo. Se incubó la reacción durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó medio para alcanzar el volumen de 1 mL (medio libre de suero), cuidadosamente se añadió por goteo en los pozos correspondientes. Por último, se incubó a 37°C con 5 % de CO₂ por 24, 48 o 72 h. Finalmente, se obtuvo RNA o extractos proteicos para evaluar mediante RT-PCR, qRT-PCR, ensayos tipo western blot o ensayos de citometría de flujo. Se realizaron ensayos con al menos tres réplicas biológicas independientes.

6.6 Citometría de flujo

Para los ensayos de proliferación, se utilizó el indicador Cell Proliferation Dye eFluor 670 (No. Cat 65-0840, Invitrogen), como se indica en la ficha técnica. Se diluyó el colorante 1:10 con DMSO, de la dilución se usaron 5 µL y se agregaron 995 µL de medio sin suplementar para teñir las células durante 20 min en oscuridad, se lavaron 2 veces con medio suplementado con suero para quitar el exceso de colorante. Cada división celular se evaluó midiendo la dilución del colorante fluorescente. Los ensayos de viabilidad y apoptosis se realizaron en función de la capacidad de la anexina V para reconocer la fosfatidilserina cuando se expone en la membrana externa de las células que se encuentran en apoptosis temprana de acuerdo con el protocolo descrito en Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (No. Cat. 65- 0865) y Biolegend Pacific Blue™ Annexin V o FITC Annexin V (No. Cat. 640918). Para la tinción de viabilidad las células se incubaron con el colorante Viability Dye eFluor (500 µL de una dilución 1:10,000 en PBS 1X) a 4°C durante 30 min en la oscuridad y para los ensayos de apoptosis las células fueron incubadas con Pacific Blue™ Annexin V o FITC Annexin V en cualquiera de los

casos se usó 5 μ L del colorante y 495 μ L del buffer de unión de Anexina 1X, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min en la oscuridad. La tinción de las proteína intracelular se realizó de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente en Holmes KJ.⁷³ Las células se fijaron con 200 μ L de PFA 2% a 37°C durante 10 min, posteriormente se permeabilizaron con 1 mL de metanol a 4°C durante 30 min, se lavaron las células y después se incubó 20 μ L de anticuerpo primario (Tabla 5) durante 30 min y sin lavar se agregaron 20 μ L del anticuerpo secundario (Tabla 5) durante 30 min más, y finalmente se lavaron las células. Para los ensayos de ciclo celular, las células se tiñeron con DAPI (5 μ g / mL en PBS), se incubaron en 1 mL de la dilución durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lavaron con FACS (PBS 1X, 0,03% NaN₃, 2% de Suero fetal bovino) y se almacenaron a 4°C hasta el análisis. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences) o BD FAC Aria Fusion con el software BD FACSDiva (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el software FlowJo v. 10.5.3.

Tabla 7 Características de los anticuerpos usados para citometría de flujo

	Anticuerpo	Dilución	No. Cat	Compañía
Anticuerpo primarios	H14 (pSer5RNAPII)	1:300	MMS-134-500	Covance
	P-STAT3-PE	1:500	12-9033-42	eBioscience
	EPAS	1:100	sc-46691	Santa Cruz
	ID2	1:100	ab53545	Abcam
	CRY2	1:500	ab93802	Abcam
	HEXIM1	1:1000	ab25388	Abcam
	CDK7	1:300	sc-7344	Santa Cruz
Anticuerpo secundario	XPD	1:500	ab54676	Abcam
	Alexa Fluor 488	1:1000	A11001	Invitrogen
	Alexa Fluor 647	1:1000	A21244	Invitrogen
	Alexa Fluor 568	1:500	A1104	Invitrogen

6.7 Método de Chou-Talalay

Los datos de viabilidad celular se analizaron para determinar el tipo de efecto del tratamiento entre TPL y THZ1 (sinérgico o aditivo) utilizando el método implementado por Chou y Talalay^{74,75}. El Dr. Ting-Chao Chou junto con el Dr. Paul Talalay, propusieron la ecuación del efecto medio (MEE) de la ley de acción de masas, mediante la derivación de ecuaciones de velocidad de dinámica enzimática, seguida de inducción y deducción matemática (Ecuación de Henderson-Hasselbalch, Michaelis-Menten, Hill y Scatchard⁷⁶). En la ecuación de MEE, se reporta un índice de correlación (CI), de la relación de la fracción afectada (Fa) frente a la fracción no afectada (Fu) en relación a la dosis (D). Los valores de CI y Fa se calcularon utilizando el software CompuSyn (disponible para descarga gratuita desde www.combosyn.com). Los valores de CI = 1 indican un efecto aditivo, mientras que $C < 1$ y $C > 1$ indican sinergia y antagonismo, respectivamente⁷⁴.

6.8 RNA-seq y análisis bioinformático

Se obtuvo RNA total de 8×10^6 células tratadas con TPL 125 nM o DMSO durante 4 h utilizando TRIzol (Invitrogen). Los experimentos se realizaron por duplicado a partir de muestras biológicas independientes. El RNA enriquecido con poli-A fue secuenciado usando la plataforma de Illumina HiSeq™ 2000 por el Beijing Genomics Institute (BGI). Brevemente, el enriquecimiento de mRNA se realizó con oligo (dT), el mRNA se fragmentó y se utilizó como templado para la síntesis de cDNA mediante transcripción inversa. El sistema de PCR en tiempo real Agilent 2100 Bioanalyzer y ABI StepOnePlus se utilizaron en la cuantificación y calificación de las bibliotecas. Las bibliotecas se secuenciaron en Illumina HiSeq™ 2000. Se utilizaron los programas Bowtie2 v. 0.9.6⁷⁷ y BWA v 0.7.13⁷⁸ para mapear las lecturas contra el genoma de referencia *hg19*. La calidad de las lecturas de secuenciación se analizó con FastQC v 0.11.7. Para determinar los niveles de expresión se usaron FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) se usó el programa RSEM v 1.3.0⁷⁹. Los datos de expresión

diferencial se filtraron usando el método de “False Discovery Rate” (FDR) con un valor ≤ 0.001 ⁸⁰ y \log_2 FC (Fold change) ≥ 1.2 . El \log_2 FC en el nivel de la expresión > 1.2 indica aumento (al menos 2.4 veces más), mientras que el \log_2 FC < 1.2 indica disminución (al menos 2.5 veces menos) en la expresión de un gen con respecto a la muestra no tratada con TPL o no transformada con tamoxifeno, dependiendo de la comparación que se observe. Los análisis de expresión diferencial se realizaron usando las paqueterías de edgeR⁸¹ y DEseq2⁸² quedándonos con los genes que se expresaron diferencialmente en ambas paqueterías, los mapas de calor y diagramas de Venn se realizaron en R studio v 3.5.1 mientras que los gráficos de pastel se realizaron en GraphPad Prism v 7.

6.9 ChIP-seq y análisis bioinformático

Las células fueron tratadas con TPL 125 nM o DMSO durante 4 h. Los experimentos se realizaron por duplicado a partir de muestras biológicas diferentes. El ChIP (inmunoprecipitación de la cromatina) se realizó de acuerdo al protocolo previamente publicado⁸³. Inicialmente, se fijaron las células durante 10 min a temperatura ambiente en agitación constante con buffer de fijado (PFA 11%, 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 50 mM Hepes pH 8). Para detener el proceso de fijado, se agregó glicina (125 mM) por 5 min a temperatura ambiente en agitación constante, luego se realizó un lavado con PBS 1X y posteriormente las células fueron colectadas y se resuspendieron en 1 mL de PBS para ser centrifugadas a 400 g durante 4 min a 4°C. El botón celular obtenido se resuspendió en 300 μ L de buffer de lisis (1% SDS, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris pH 8, 1X complete) e incubado 10 min a temperatura ambiente. La sonicación de las células fue realizada en 11 ciclos (30 s ENCENDIDO/APAGADO, en un sonicador de baño Bioruptor Pico Diagenode) en tubos de 1.5 mL (No cat. C30010016, Diagenode). El extracto sonicado se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C y se incubó con IgG de conejo acoplada a Dynabeads Protein G (Life Technologies). El lisado celular se diluyó 1:10 con el buffer de dilución (0.01 % SDS, 1.1 % Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.0, 167 mM NaCl + Inhibidores). El 5% del

lisado celular se reservó como Input y el resto se incubó con 5 µg del anticuerpo (8WG16) o IgG de conejo (Invitrogen) durante 12 h a 4°C. Los complejos anticuerpo-cromatina se recuperaron con 25 µL de Dynabeads Protein G. El sobrenadante se descartó y la resina se lavó cinco veces durante 10 min con 1 mL del buffer, como a continuación se indica: una vez con buffer de baja sal (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 150 mM NaCl), seguido de una vez con el buffer de alta sal (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 500 mM NaCl), luego una vez con el buffer de lavado de LiCl (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA, y 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) y por último dos veces con buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM EDTA), incubando a 65°C y 1500 rpm durante 20 min. La elución de la cromatina inmunoprecipitada se combinó con 0.5 volúmenes de buffer TE y el entrecruzamiento se revirtió a 65°C durante 12 h. Se incubó con 0.2 µg/µL de RNasa A (Roche) durante 2 h a 37°C y posteriormente se incubó con Proteinasa K (Roche) a una concentración final de 0.2 µg/µL durante 2 h a 55°C. El DNA se recuperó con un protocolo estándar de extracción con fenol y cloroformo y se precipitó con etanol y glucógeno (Roche). El DNA recuperado se envió a la compañía de BGI para la construcción de las bibliotecas y su posterior secuenciación utilizando la plataforma Illumina HiSeq SE50.

Posteriormente, el filtrado de datos incluyó la eliminación de secuencias de los adaptadores, contaminación y lecturas de baja calidad sin procesar, usando programas de BGI como SOAPnuke y SOAPaligner/SOAP2⁸⁴ seguido de la alineación con el genoma de referencia *hg19*. El programa MACS2 v 1.4.2⁸⁵ se usó para generar los picos y archivos Bedgraph los cuales ya están normalizados contra el Input. Los archivos Bedgraph se convirtieron en archivos BigWig y se cargaron en el navegador UCSC Genome para su visualización. Posteriormente se usó el programa HOMER (Next-Generation Sequencing Analysis - *annotatePeaks.pl*)⁸⁶ para realizar la anotación de los picos con el genoma de referencia. La diferencia en el enriquecimiento de la RNAPII entre las células tratadas con TPL y las células control, se realizó con una la herramienta de HOMER (*getDiffExpression.pl*). Los datos de expresión diferencial se filtraron

usando $\log_2 FC \geq 1$. La representación gráfica de los datos se realizó usando R studio v 3.5.1 y GraphPad Prism v 7.

6.10 Correlación entre el RNA-seq y el ChIP-seq

Para realizar la correlación entre los datos de RNA-seq y ChIP-seq, se consideraron solo los picos de RNAPII ubicados en una región de ± 1 kb con relación al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Los datos de expresión diferencial se filtraron usando $\log_2 FC \geq 1$ para ChIP-seq y $\log_2 FC \geq 1.2$ para RNA-seq. El gráfico presentado en la Figura 27C se realizó en GraphPad Prism v 7. El valor de correlación (CV) representa el grado de similitud entre los datos ChIP-seq y RNA-seq.

El número de acceso para los datos de ChIP-seq y RNA-seq sin procesar y procesados, se encuentran en el GEO: GSE135256, ver sección anexa 12.1.

6.11 Ensayos de *Split-GFP*

Los plásmidos pCNV_GFP1-9-OPT, pcDNA_GFP10-GCN4 y pcDNA_GCN4-GFP11, fueron donados por Dra. Cabantous del Instituto de Investigación en Cáncer de Toulouse, Francia⁷⁰. Se realizaron las construcciones de las diferentes subunidades de TFIIH. Para esto, se obtuvo cDNA a partir de RNA total de células MCF10A-ERScr, se amplificaron los transcritos de CDK7 (NM_001324069), CYCH (NM_001239), MAT1 (NM_00117796), XPD (NM_000400), XPB (NM_000122), p52 (NM_001517), p8 (NM_207118), p34 (NM_001516), p44 (NM_001515) y p62 (NM_001142307) (Tabla 6 y Tabla 7) y éstos fueron insertados en el vector de clonación pJET1.2/blunt. Posteriormente, todos los fragmentos fueron clonados en los vectores de expresión que contienen los péptidos 10 y 11 de la GFP (pcDNA3.1-GFP10 y pcDNA3.1-GFP11) en los sitios de clonación *Mrel*: *XbaI* y *NotI*: *ClaI* de los vectores pcDNA_GFP10 y pcDNA_GFP11 respectivamente para un total de 20 construcciones, esto nos permite evaluar cada interacción en ambas direcciones (Figura 13).

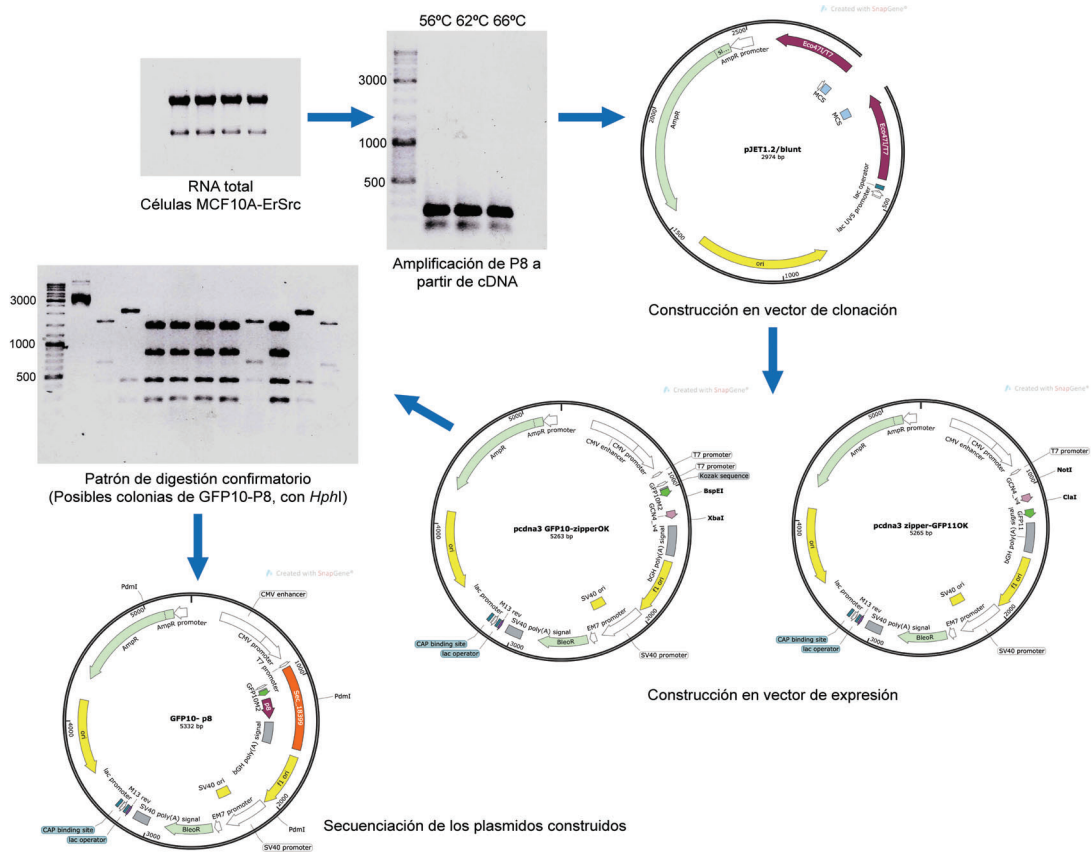


Figura 13. Esquema general de las clonaciones de TFIID en el sistema tripartita *Split-GFP*. Se muestran los diferentes pasos llevados a cabo para la clonación de los fragmentos de interés, empezando por visualización de la integridad del RNA total, seguido de la amplificación de los fragmentos de interés, en este caso se muestra a la subunidad de p8 (216 pb), así como los mapas de los vectores de clonación y de expresión. También, se muestra un ejemplo de algunos patrones de restricción para las 20 construcciones y por último se observa la confirmación mediante la secuenciación de los vectores que se construyeron.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la clonación en el vector pcDNA-GFP10

GEN	NOMBRE	SECUENCIA
CDK7	GFP10_BspEI_CDK7-F	CCTCCGGAATGGCTCTGGACGTGAAGTC
	GFP10_BspEI_CDK7-R	GGACTAGTTTAAAAAATTAGTTTCTTGGGCAATC C
CCNH	GFP10_BspEI_CCNH-F	CCTCCGGAATGTACCACAACAGTAGTC
	GFP10_XbaI_CCNH-R	CGTCTAGATTAGAGAGATTCTACCAGGTGCG
MAT1	GFP10_BspEI_MAT1-F	CCTCCGGAATGGACGATCAGGGTTGCCCTC
	GFP10_XbaI_MAT1-R	CGTCTAGATTAAGTGGGCTGCCAGAAAAGC

XPD	GFP10_Mrel_XPD-F	CCCGCCGGCGGAATGAAGCTCAACGTGGACGG GCTC
	GFP10_Xbal_XPD-R	CGTCTAGATCAGAGCTGCTGAGCAATCTGC
XPB	GFP10_Mrel_XPB-F	CCCGCCGGCGGAATGGGCAAAAGAGACCGAGC GGACCG
	GFP10_Xbal_XPB-R	CGTCTAGATCATTTCCTAAAGCGCTTGAAGAGC GGGTG
p52	GFP10_Mrel_p52-F	CCCGCCGGCGGAATGGAGAGCACCCCTTCAAG G
	GFP10_Xbal_p52-R	CGTCTAGATCAGGAGCTATGTTTCTGCCGCTTC C
p8	GFP10_BspEI_p8-F	CCTCCGGAATGGTCAACGTCTTGAAAGGAGTGC
	GFP10_Xbal_p8-R	CGTCTAGATCATTCTGGGTAAGGGAAAAAGC
p34	GFP10_BspEI_p34-F	CCTCCGGAATGGTTTCAGACGAAGATGAATTG
	GFP10_Xbal_p34-R	CGTCTAGATCAGGCAGACACTTTTCAG
p44	GFP10_BspEI_p44-F	CCTCCGGAATGGATGAAGAACCTGAAAGAAC
	GFP10_Xbal_p44-R	CGTCTAGATCAATTATACATAATGTATAATACTA ACTTTAG
p62	GFP10_Mrel_p62-F	CCCGCCGGCGGAATGGCAACCTCATCTGAA
	GFP10_Xbal_p62-R	CGTCTAGATCACGTTTTCTTCATCAGACGCCG

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la clonación en el vector pcDNA-GFP11

GEN	NOMBRE	SECUENCIA
CDK7	CDK7_NotI_GFP11-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGGCTCTGGACGTGAAG
	CDK7_ClaI_GFP11-R	CCATCGATAAAAATTAGTTTCTTGGGCAATCC
CCNH	CCNH_NotI_GFP11-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGTACCACAACAGTAGT C
	CCNH_ClaI_GFP11-R	CCATCGATGAGAGATTCTACCAGGTCGTC
MAT1	MAT1_NotI_GFP11-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGGACGATCAGGGTTGC C
	MAT1_ClaI_GFP11-R	CCATCGATACTGGGCTGCCAGAAAAGCC
XPD	XPD_NotI_GFP11-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGAAGCTCAACGTGGAC GGG
	XPD_ClaI_GFP11-R	CCATCGATGAGCTGCTGAGCAATCTGCTCTATCC
XPB	XPB_NotI_GFP11-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGGGCAAAAGAGACCG
	XPB_ClaI_GFP11-R	CCATCGATTTTCCTAAAGCGCTTGAAGAGCGGGT G
p52	p52_NotI_GFP11-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGGAGAGCACCCCTTCA AG
	p52_ClaI_GFP11-R	CCATCGATGGAGCTATGTTTCTGCCGCTTCC
p8	p8_NotI_GFP11-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGGTCAACGTCTTGAAA GGAG
	p8_ClaI_GFP11-R	CCATCGATTTTCTGGGTAAGGGAAAAAGC

p34	p34_NotI_GFP11-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGGTTTTCAGACGAAGAT GAATTG
	p34_ClaI_GFP11-R	CCATCGATGGCAGACACTTTTCAGTTTC
p44	p44_NotI_GFP11-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGGATGAAGAACCTGAA AGAACTAAG
	p44_ClaI_GFP11-R	CCATCGATATTATACATAATGTATAACTAACTTT AGAGTCTGCATAG
p62	GFP11_NotI_p62-F	ATAAGAATGCGGCCGCATGGCAACCTCATCTG
	GFP11_ClaI_p62-R	CCATCGATTCACGTTTTCTTCATCAGACGCCG

La transfección estable del plásmido pCNV_GFP1-9-OPT se realizó en las células HEK-293 utilizando lipofectamina 3000. Las células HEK-293_GFP1-9 se co-transfectaron con 1.5 µg de cada plásmido: GCN4-GFP10 y GCN4-GFP11; p52-GFP10 y GFP11-XPB; CDK7-GFP10 y CYCH-GFP11; p8-GFP10 y p52-GFP11. Luego de 36 h después de transfección, las células se visualizaron en el microscopio confocal multifotónico Olympus FV1000 a 60X.

Por otro lado, en experimentos alternos, después de 8 h de co-transfección se añadió TPL a diferentes concentraciones y 36 horas después, las células se tiñeron para determinar su viabilidad. Como control negativo se usaron los plásmidos GCN4-GFP10 y GFP11-GCN4 con las mismas condiciones. Los experimentos se realizaron al menos tres veces con muestras biológicas independientes.

6.12 Dinámica molecular

La estructura de crio-electromicroscopía de TFIIH²⁶ (Homo sapiens, PDB ID: 6NMI31) se recuperó del Protein Data Bank (PDB) (Figura 19). El submódulo XPB-p52-p8 se aisló para realizar el acoplamiento covalente con la estructura del TPL optimizada en el residuo Cys342 de XPB (subunidad de TFIIH), empleando AutoDock v4²⁶. Las formas Apo y dos Holo (unidas a TPL) del submódulo XPB-p52-p8 se sometieron a 100 ns de simulaciones de dinámica molecular (MD) de todos los átomos utilizando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN⁸⁷⁻⁹⁰ implementado en el paquete GROMACS 5.1.4⁸⁹.

Para las simulaciones de dinámica molecular de 500 ns de las subunidades aisladas de TFIIH se empleó el campo de fuerza CHARMM36⁹⁰ implementado en el programa GROMACS 5.1⁹¹. Los sistemas se construyeron empleando el modelo de agua TIP3P y se neutralizaron con una solución de cloruro de sodio a una concentración de 0.15 M. Se minimizó la energía del sistema con el algoritmo *steepest descent*, para posteriormente ser equilibrado con ensambles isocórico-isotérmico (NVT) e isobárico-isotérmico (NPT). Estas simulaciones nos permitieron muestrear el panorama conformacional de las macromoléculas empleando metodologías de agrupamiento (*clustering*) basado en los valores de desviación cuadrática media entre los confórmeros. Con base en esta información, se extrajeron de las simulaciones los confórmeros que representen más del 90 % de las estructuras de la simulación para cada una de las subunidades. Para la predicción del sitio de unión, se analizaron los sitios de interacción proteína-proteína de las subunidades y se realizaron predicciones de posibles sitios en donde la unión de un ligando podría alterar o inhibir dicha interacción (sitios “*druggable*”) empleando diferentes servidores en línea. Posteriormente se recopiló la base de datos de fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los servidores BindingDB y ZINC.⁹² Se prepararon y optimizaron las estructuras de los compuestos con las herramientas del programa OpenBabel⁹⁰. Además, se realizó un acoplamiento molecular ciego (*blind docking*) de los fármacos en los diferentes confórmeros de las subunidades de TFIIH con los programas AutoDock4.2⁹³, AutoDock vina⁹⁴ y rDOCK⁸⁷. Este método consiste en evaluar a los compuestos sobre toda la estructura de las subunidades, esto con la finalidad de identificar los sitios en los que los fármacos presentan mayor probabilidad de unión. Se emplearon los resultados de los tres programas para generar un resultado consenso (*consensus docking*), el cual nos permitió seleccionar a aquellos compuestos con mayor probabilidad de unión en las regiones que comprenden la interfaz proteína-proteína o en los potenciales sitios “*druggable*”. La selección se sustentó en un análisis en el modo de unión y por el valor de puntuación de los programas (*score*). Finalmente se evaluó con dinámica molecular la estabilidad y energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) de los complejos

proteína-ligando con mejores resultados en el estudio de acoplamiento molecular (Ver sección anexa 12.2). Las moléculas con los resultados más prometedores fueron seleccionadas para su posterior confirmación experimental.

VII. RESULTADOS

7.1 TPL y THZ1 ejercen un efecto negativo sinérgico sobre la viabilidad de células tratadas con tamoxifeno

Para determinar si las células TAM son más sensibles al TPL, THZ1 o a la combinación de ambos, en comparación con las células NT, se evaluó por medio de citometría de flujo, la viabilidad de células NT y TAM incubadas a diferentes concentraciones de TPL, THZ1 o ambas en diferentes tiempos. La viabilidad de las células NT y TAM fue altamente afectada por el TPL, siendo las células TAM más sensibles (Figura 14A) a una concentración de 100 nM de TPL por 72 h, aproximadamente el 90% de las células TAM murieron (Figura 14A). Sin embargo, a la misma concentración y tiempo de incubación más del 50% de las células NT eran viables.

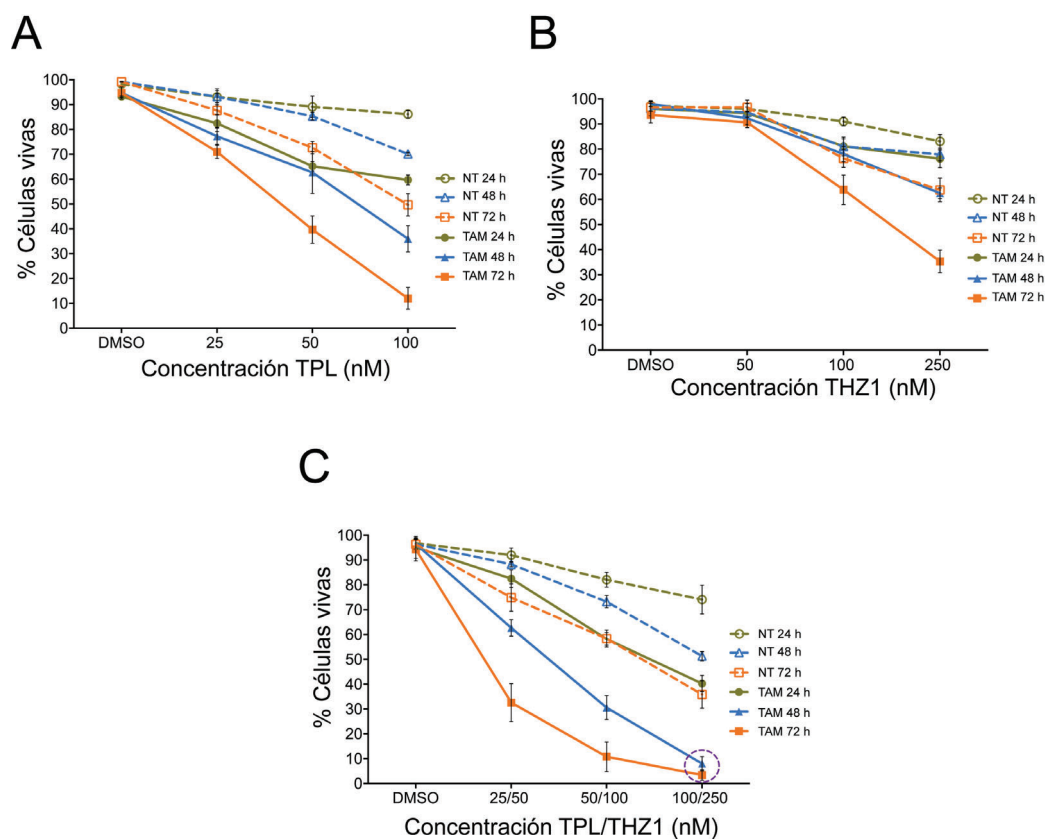


Figura 14. TPL, THZ1 y la combinación de ambas moléculas inducen muerte celular preferentemente en células tratadas con tamoxifeno (TAM). Ensayos de citometría de flujo para determinar la viabilidad celular de células tratadas con tamoxifeno (TAM) y no tratadas (NT) incubadas con (A) TPL (B) THZ1 y (C)

THZ1+TPL. Las líneas punteadas representan las células NT y las líneas continuas las células TAM, los diferentes colores indican el tiempo de incubación de cada molécula: verde-24 h, azul-48 h y naranja-72 h. Los datos que se grafican son el promedio \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Por su parte, a una concentración de 250 nM de THZ1 por 72 h, aproximadamente el 64% de las células TAM mueren comparado con el 36% de las células NT (Figura 13B). De manera interesante, se observó que la incubación simultánea con TPL y THZ1 tiene un efecto sinérgico en la viabilidad celular (Figura 14C) ya que prácticamente todas las células TAM mueren después de 48 h de incubación con TPL (100 nM) combinado con THZ1 (250 nM) (Figura 14C). Sin embargo, bajo estas condiciones aún después de 72 h de incubación, aproximadamente el 40% de las células NT se mantuvieron vivas (Figura 14C). Por lo tanto, el tratamiento con la combinación de TPL y THZ1 es mejor que con cada molécula por separado y afecta preferencialmente a las células TAM.

Para determinar si el efecto de ambas moléculas es aditivo o sinérgico; se utilizó el método implementado por Chou y Talalay⁹⁵ (descrito en la sección de materiales y métodos). En la ecuación de MEE, se reporta un índice de correlación (CI), que corresponde a la relación de la fracción afectada (Fa) frente a la fracción no afectada (Fu) con respecto a la dosis (D). En nuestro caso obtuvimos valores de $CI < 1$ (Figura 15), lo que nos indica que el efecto de las moléculas fue sinérgico en el caso de las células TAM. Los valores de $CI = 1$ indican un efecto aditivo mientras que $CI < 1$ y $CI > 1$ indican sinergismo y antagonismo, respectivamente^{74,75}.

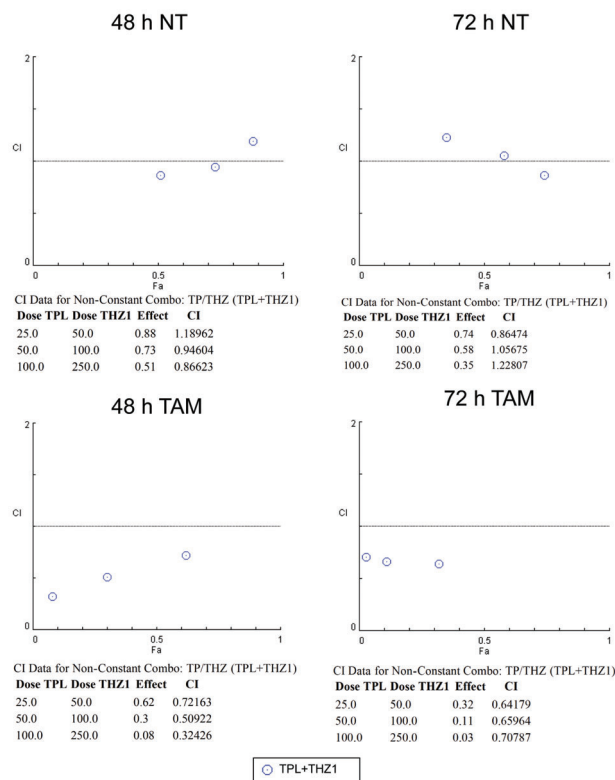
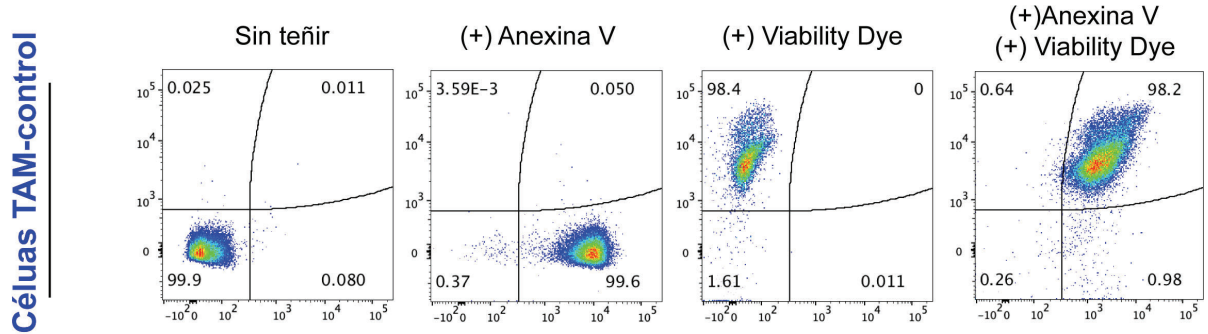


Figura 15. Determinación del efecto de la combinación TPL y THZ1 usando el metodo de Chou-Talalay. Gráficas del Índice de correlación de farmacos (IC) con respecto a la fracción afectada (Fa) para analizar el efecto de viabilidad de TPL + THZ1. Los valores fueron calculados utilizando el software CompuSyn.

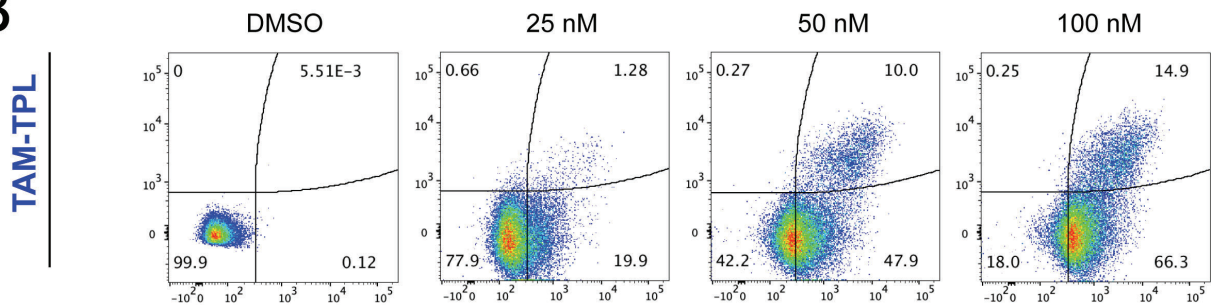
Tanto las células TAM como NT tratadas con TPL, THZ1 y TPL+THZ1 sufren apoptosis (Figura 16), evidenciada por la translocación de la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido de membrana que se transloca desde el interior hacia el exterior de la membrana, cuando las células sufren apoptosis. La anexina V es una glicoproteína dependiente de unión de Ca^{++} que tiene una alta afinidad por la PS y se une a las células con PS expuesta. La Anexina V se puede conjugar con diversos fluorocromos incluyendo FITC y por lo tanto sirve como una sonda sensible para el análisis de citometría de flujo de células que están experimentando apoptosis, además de combinar la tinción con un colorante vital (Viability Dye 780 - VD), para poder determinar el tipo de muerte. La externalización de PS se produce en las primeras etapas de la apoptosis, por lo cual la tinción con FITC anexina V puede identificar la apoptosis en etapas tempranas (VD negativo, FITC Anexina V positivo), las células que se consideran

viables son FITC anexina V y VD negativa; y las células que se encuentran en la apoptosis tardía son tanto FITC anexina V como VD positivas.

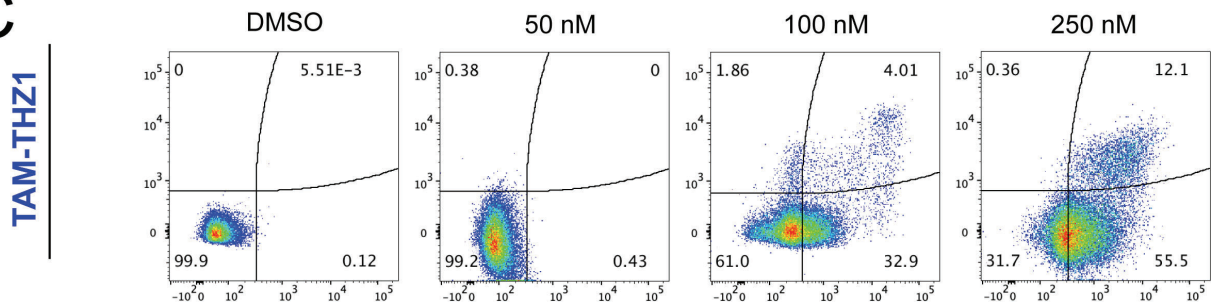
A



B



C



D

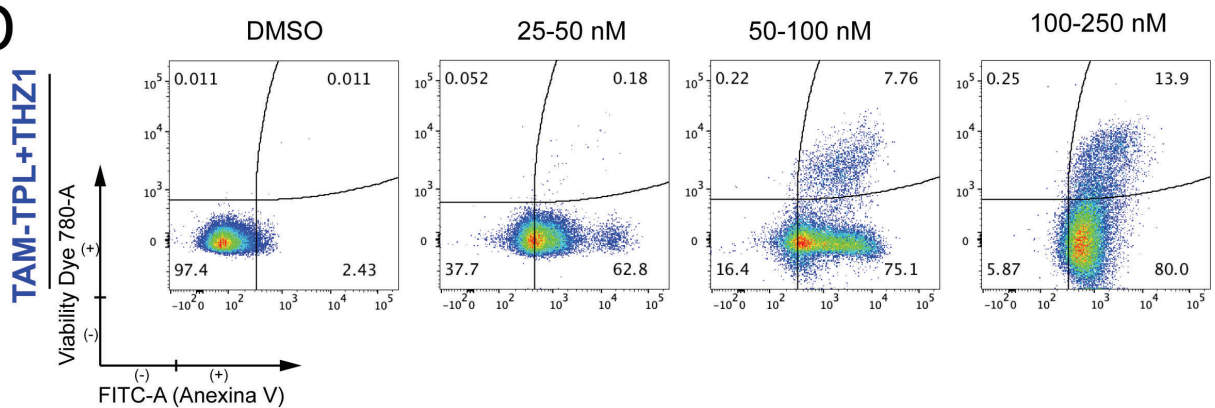


Figura 16. Los tratamientos con Triptolide (TPL), THZ1 y TPL/THZ1 inducen apoptosis en células MCF10A-ErSrc-TAM. La apoptosis se determinó mediante la tinción de Anexina-FITC (eje X) y viabilidad celular mediante la tinción con Viability Dye 780 (eje Y). **(A)** Células TAM utilizadas como control para definir los cuadrantes **(B)** Células TAM tratadas con TPL durante 72 h con 25, 50 y 100 nM, **(C)** Células TAM tratadas con THZ1 durante 72 h con 50, 100 y 250 nM **(D)** Células tratadas con TPL/THZ1, 25/50, 50/100 y 100/250 nM. Los gráficos se muestran como un ejemplo representativo de al menos tres réplicas biológicas. Para las muestras controles, se utilizó DMSO al 40% durante 30 min a 37°C para inducir muerte.

Lo siguiente a evaluar fue el efecto de los diferentes tratamientos sobre la proliferación y la progresión del ciclo celular en las células NT y TAM. La Figura 16A muestra que después de 72 h de incubación con 25 nM de TPL, las células TAM se detuvieron después de dos rondas de división, mientras que las células NT requirieron de 100 nM para mostrar el mismo efecto (Figura 17A). De igual manera, las células NT y TAM detuvieron su proliferación cuando fueron incubadas con 100 nM o 250 nM de THZ1 por 72 h respectivamente (Figura 17A). Interesantemente, cuando las células fueron incubadas con ambas moléculas simultáneamente, las células NT y TAM detuvieron su proliferación a una concentración de 25 nM de TPL y 50 nM de THZ1, lo que confirmó el efecto sinérgico entre estas dos moléculas (Figura 17A). Además, también se encontró que en presencia de TPL o THZ1, las células detuvieron su progresión en la fase G₁ y se necesitó una menor concentración de TPL o THZ1 para observar este efecto en las células TAM (Figura 17B). Así mismo, las células apoptóticas (población Sub-G₀) fueron enriquecidas considerablemente en células TAM y se correlacionó con los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad, esto fue más severo en las células co-incubadas con TPL y THZ1 (Figura 17B). Estos resultados, indicaron que las células TAM son más sensibles al TPL y THZ1 que las células NT. En las células TAM hubo una disminución en la proliferación y fueron detenidas en G₁ en concentraciones y tiempos de incubación más cortos cuando fueron incubadas con cualquiera de las dos moléculas, en comparación con las células no tratadas. De manera importante, el tratamiento simultáneo con TPL y THZ1 tuvo un efecto más severo sobre las células TAM que por separado, remarcando el uso potencial de inhibir diferentes actividades de TFIID con TPL y THZ1 para el desarrollo de terapias alternativas contra el cáncer.

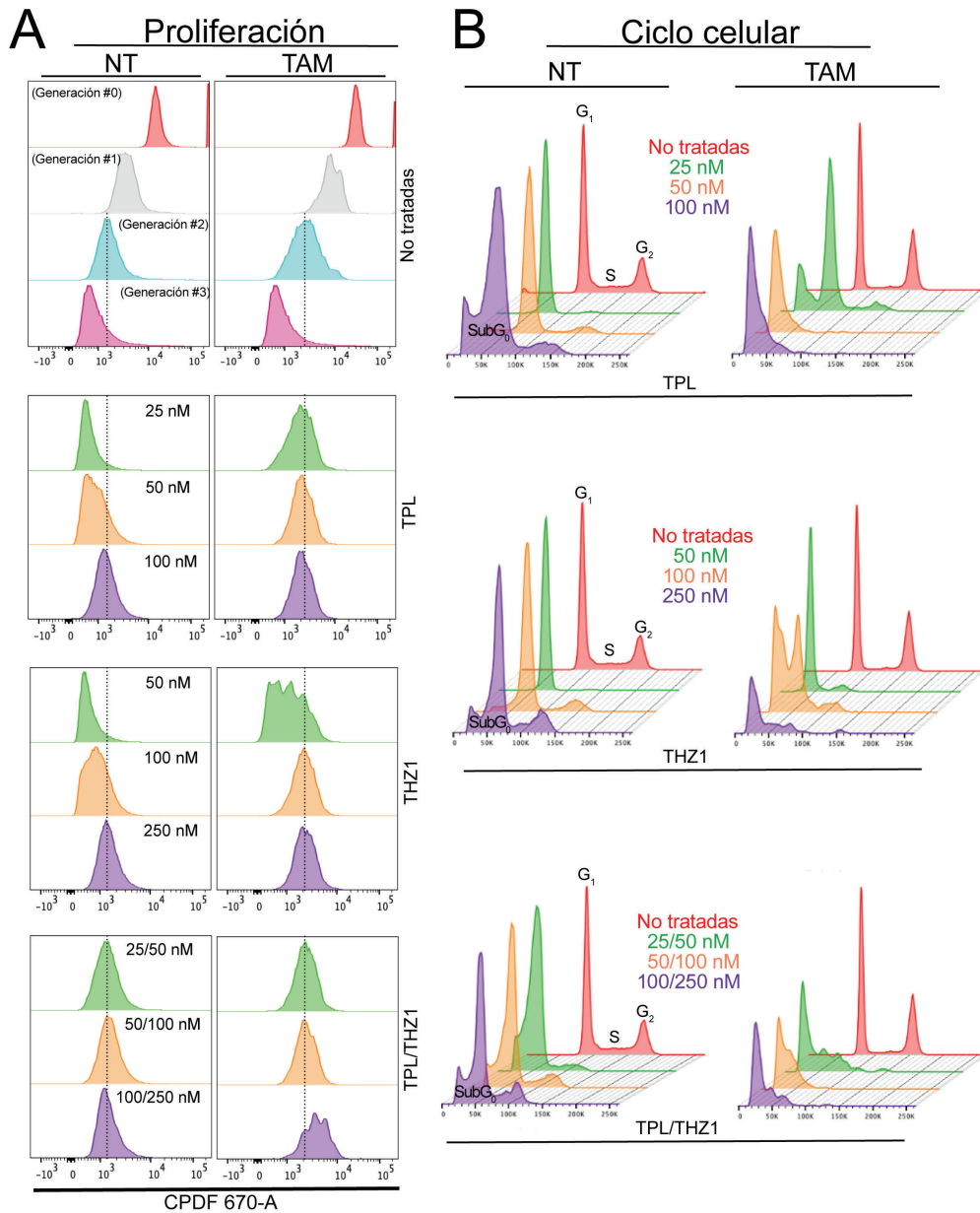


Figura 17. Efecto del TPL, THZ1 y TPL+THZ1 sobre la proliferación y ciclo celular. Ensayos de citometría de flujo para determinar la proliferación y ciclo celular en células tratadas con tamoxifeno (TAM) y no tratadas (NT). **(A)** Ensayo de proliferación en células TAM y NT incubadas con TPL (panel superior), THZ1 (panel central) y la combinación de THZ1 y TPL (panel inferior). El primer panel muestra células NT y TAM sin tratamiento, donde se observa la proliferación normal (duplicaciones generacionales). Las concentraciones utilizadas se indican en la figura. **(B)** Ensayo de ciclo celular en células TAM y NT incubadas con TPL (panel superior), THZ1 (panel central) y la combinación de THZ1 y TPL (panel inferior). Los gráficos **(A)** y **(B)** muestran las concentraciones utilizadas durante 72 h de tratamiento y corresponden a un ejemplo representativo de al menos tres réplicas biológicas.

7.2 El TPL reduce los niveles del submódulo XPB-p52-p8 de TFIIH

Estudios previos indican que durante la inhibición de la transcripción mediada por la RNAPII, esta se ubiquitina y se degrada⁷⁴. Por lo que en este estudio exploramos el efecto del TPL tanto sobre los niveles de las subunidades de TFIIH así como de la RNAPII. Para esto, las células NT y TAM se incubaron con TPL 125 nM a diferentes tiempos. Como se esperaba, los niveles de la RNAPII y por lo tanto, los niveles de fosforilación de la serina 5 del CTD de la RNAPII (p^{Ser5}CTD RNAPII), disminuyeron como resultado de la incubación de las células con TPL (Figura 18). También se observó una clara reducción en los niveles de las proteínas XPB, p52 y p8 en respuesta a la exposición al TPL (Figura 18). Sin embargo, los niveles de otras subunidades de TFIIH como XPD, p62, CDK7, CYCH y MAT1 no fueron afectados (Figura 17).

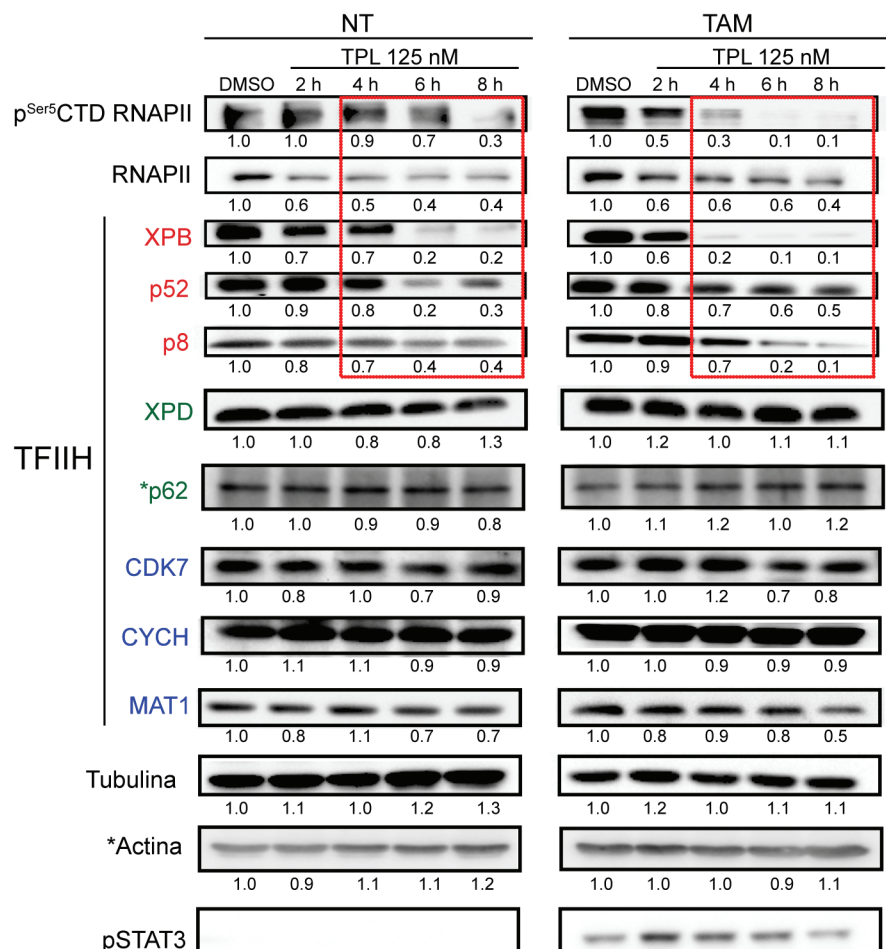


Figura 18. TPL reduce los niveles de acumulación del submódulo XPB-P52-P8 de TFIIH. Western blots (WB) que muestran a la RNAPII CTD, p^{Ser5}CTD RNAPII, y algunas subunidades de TFIIH (XPB, p52, p8, XPD, *p62, CDK7, CYCH MAT1) en células TAM y NT incubadas con TPL 125 nM durante 2, 4, 6 y 8 h en comparación con el control (DMSO, 8 h). Los niveles de proteína XPB, P52 y P8 (TFIIH) disminuyen a medida que avanza el tiempo de incubación con TPL (recuadro rojo). Se realizó densitometría utilizando a Tubulina y *Actina como control de carga; la cuantificación relativa se encuentra debajo de cada WB. (*) Son ensayos independientes que se realizaron con los mismos extractos proteicos. Los datos mostrados son un ejemplo representativo de tres réplicas biológicas. Se muestra a p-STAT3 como control de transformación.

Por otro lado, y como era de esperar, la incubación con THZ1 a diferentes tiempos, solo redujo los niveles de la p^{Ser5}CTD RNAPII, pero no afectó los niveles de RNAPII ni de CDK7 u otros componentes de TFIIH (Figura 19). Estos resultados indicaron que contrario a los efectos de TPL sobre la integridad de TFIIH, la inhibición de CDK7 por THZ1 no desestabiliza ningún submódulo de este complejo.

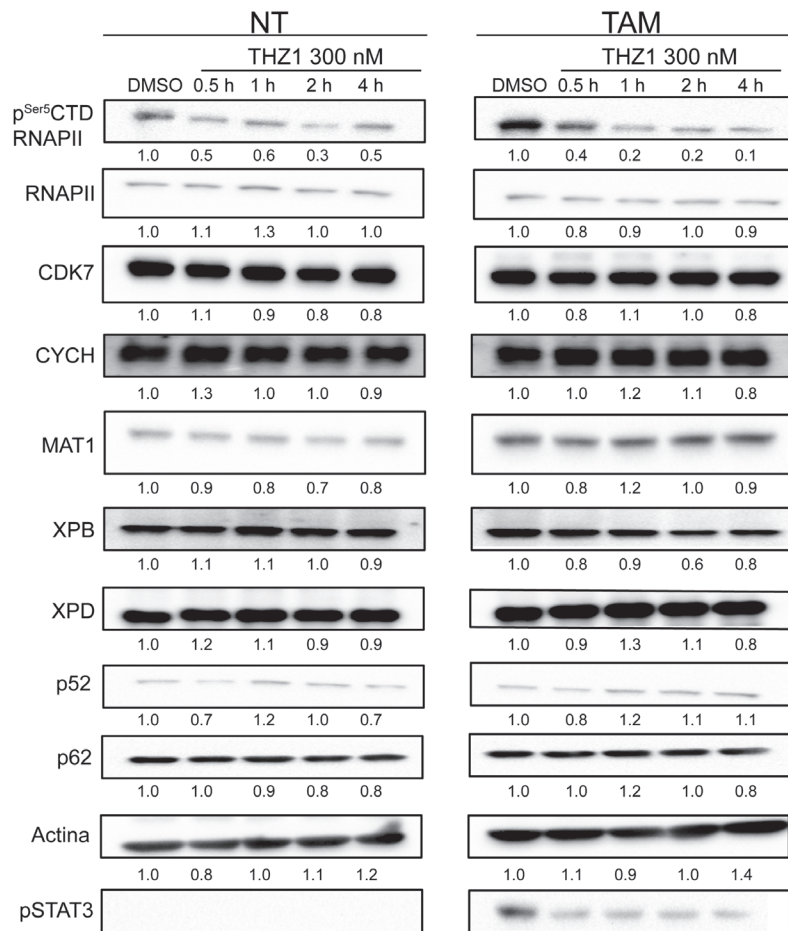


Figura 19. Efecto del THZ1 sobre TFIIH. Efecto del THZ1 en células NT y TAM tratadas con THZ1 a 300 nM durante 0,5, 1, 2 y 4 h en comparación con el control (DMSO 4 h). Se evaluaron los niveles de RNAPII CTD y

p^{Ser5}CDT RNPII, así como algunas subunidades TFIIH (CDK7, CYCH, MAT1, XPB, XPD, p52 y p62). p-STAT3 se usa como control de transformación de la línea celular y actina se usó como control de carga, la cuantificación relativa se indica debajo de cada WB y los datos se muestran como un ejemplo representativo de tres réplicas biológicas.

Dado que se conoce que XPB interacciona con las subunidades p52 y p8 para modular su actividad^{96,97,59,98} y los resultados anteriores sugieren que la unión covalente del TPL a XPB reduce los niveles del submódulo XPB-p52-p8 y provoca su posible degradación, se decidió investigar si el TPL causa una distorsión en XPB que pueda limitar su interacción con p52 y p8. Para lograr esto se estableció una colaboración con el grupo de la Dra. Laura Dueñas en la Facultad de Química de la UNAM. Ellos utilizaron la información pública que se reportó recientemente para la estructura del “core” de TFIIH por crio-microscopía electrónica⁹⁹. El TPL inhibe la función ATPasa de XPB por medio de la formación de un enlace covalente entre el C12 del inhibidor y el átomo de azufre de la Cys342 de XPB (TPLC12-Cys342)¹⁰⁰. El submódulo putativo XPB-p52-p8 se utilizó para hacer simulaciones de dinámica molecular (DM) de la unión covalente de TPL en la estructura de XPB (Figura 20).

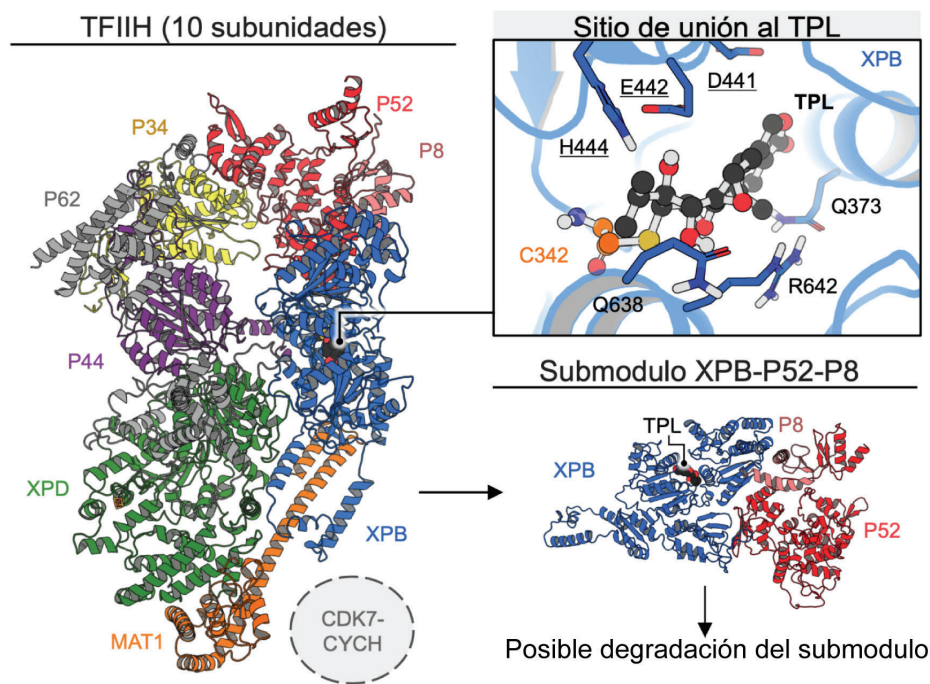


Figura 20. Modelo de dinámica molecular computacional en donde se propone el mecanismo de la disociación del submódulo XPB-p52-p8 del complejo TFIIH y su posible degradación debido a la unión

covalente de TPL a XPB. La figura de la izquierda muestra la estructura tridimensional de TFIIH: XPB (azul), XPD (verde), p8 (rosa), p34 (amarillo), p44 (púrpura), p52 (rojo), p62 (gris) y MAT1 (naranja). La figura superior derecha muestra los sitios de unión del TPL (negro) con XPB. Los residuos del sitio de unión del TPL se muestran en azul, subrayando los aminoácidos de la caja DEVH y el C342 que forma el enlace covalente con TPL se resalta en naranja.

Este análisis mostró que el sitio de unión del TPL está localizado en la interfase de los dominios de helicasa HD1 y HD2 (Figura 21). Durante las simulaciones de DM, la presencia de TPL afectó la interfase HD1-HD2 y alteró el número de contactos entre ambos dominios, lo que puede provocar la separación de estos y ocasionar un cambio alostérico en el dominio amino terminal de XPB que contacta a p52 y p8 sugiriendo que esto disocia el submódulo y lo lleva a su posible degradación.

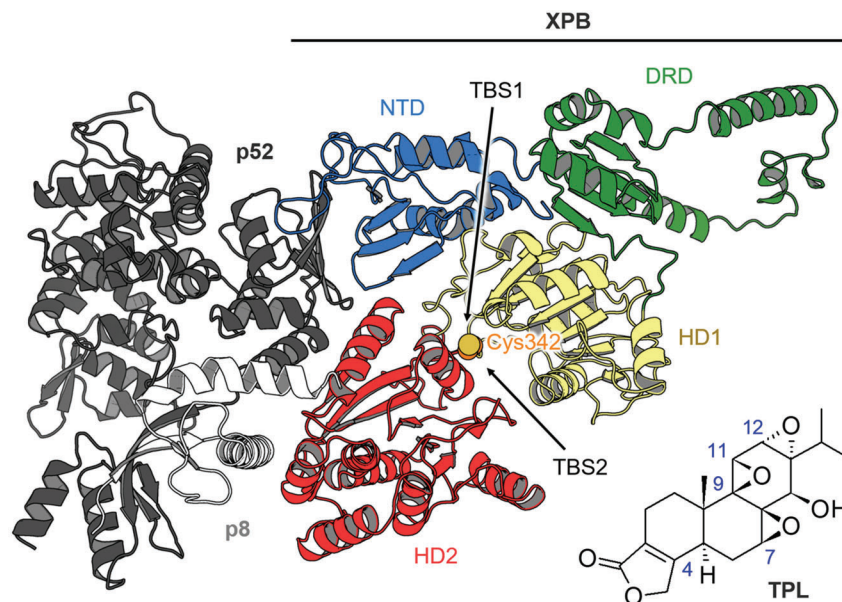


Figura 21. Interacción del submódulo XPB-p52-p8 de TFIIH y TPL. Representación de la estructura de XPB coloreada por sus dominios NTD (azul), DRD (verde), HD1 (amarillo) y HD2 (rojo). El residuo Cys342 se muestra en color naranja. Los sitios de unión TBS1 y TBS2 se encuentran señalizados por las flechas en color negro.

Para confirmar los resultados de la DM, se realizaron ensayos de complementación de *Split-GFP* entre XPB y p52 mediante el uso de un sistema de complementación tripartita de la GFP²⁶. Este sistema se basa en la fragmentación de la proteína GFP en tres segmentos, el primero (también llamado fragmento detector), esta conformado por las láminas beta de la 1 a la 9 (GFP 1-9), los dos restantes corresponden a las láminas 10 y 11 fusionadas cada una a las proteínas

de interés (GFP-10-X y X-GFP-11). Para llevar a cabo lo anterior, primero se generó una línea celular estable que expresara la GFP1-9 (HEK293-GFP1-9). Posteriormente se co-transfectaron con los plásmidos pcDNA3.1-GFP10-P52 y pcDNA3.1-XPB-GFP11 y se incubó con TPL a diferentes concentraciones durante 28 h (Figura 21). Como control, se utilizó una interacción homodimérica del factor transcripcional GCN4 (GFP10-GCN4 y GCN4-GFP11), previamente reportada²⁶. La señal de fluorescencia de GFP se cuantificó solo en células vivas mediante citometría de flujo. Después del tratamiento con TPL, se observó una clara reducción en la fluorescencia en las células positivas para p52-GFP-XPB, pero no en las células de control (Figura 22). Estos resultados en células vivas apoyan los datos obtenidos por DM que sugieren que XPB, p52 y p8 forman un submódulo en el “core” de TFIIH y que el TPL podría causar su degradación sin afectar el resto de las subunidades de TFIIH.

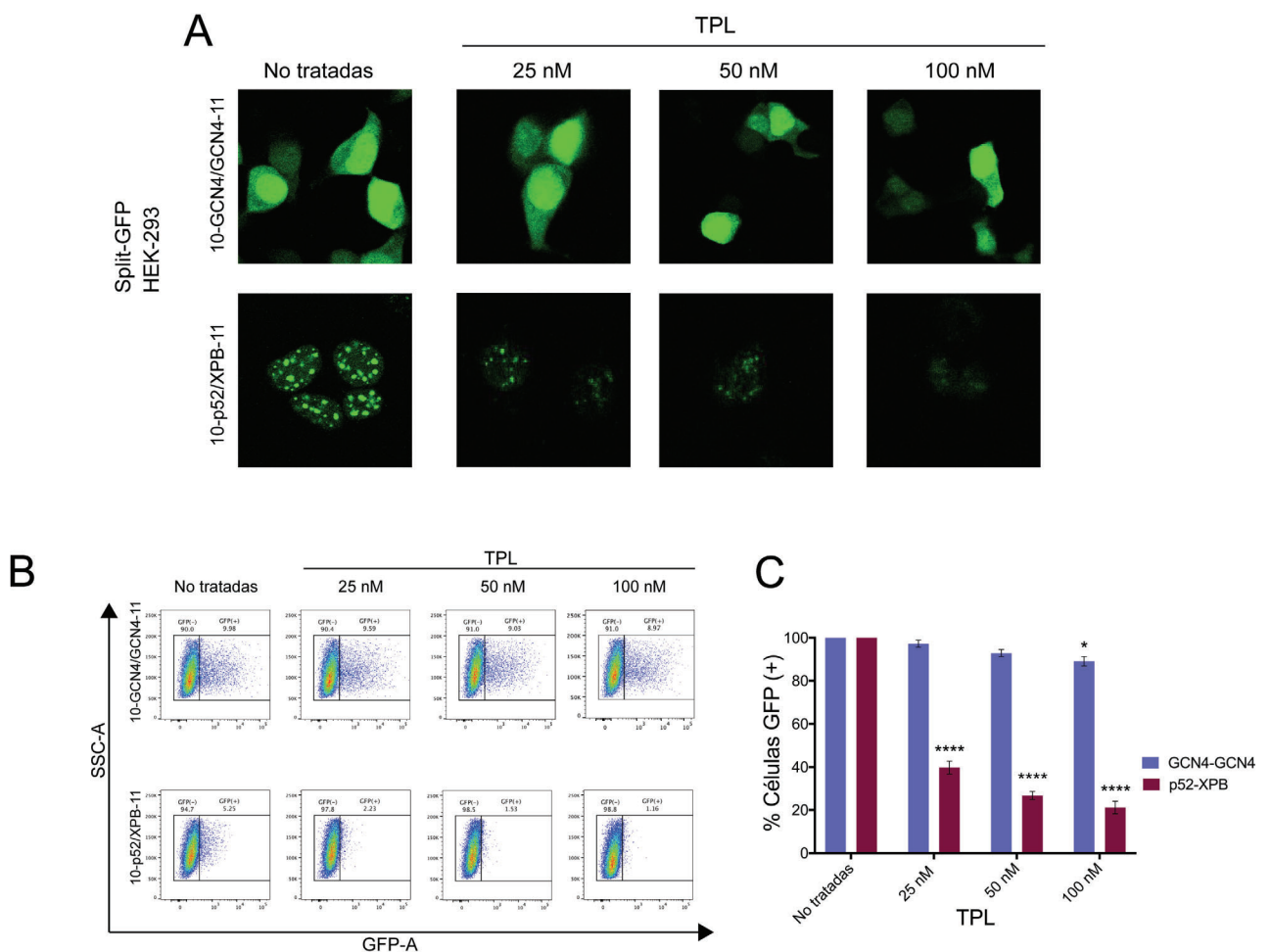


Figura 22. Ensayos de complementación del sistema *Split-GFP*. (A) Imagen representativa de al menos tres ensayos independientes del *Split-GFP* entre las subunidades p52 y XPB así como la interacción usada como control positivo (GCN4) expresadas en células HEK-293 tratadas con DMSO y TPL (25, 50 y 100 nM). (B) Ejemplo de la cuantificación realizada por citometría de flujo de las células vivas que expresan GFP. En los paneles superior se muestran la interacción 10-GCN4-GCN4-11 y en el panel inferior la interacción 10-p52-XPB-11. (C) Representación gráfica de al menos tres experimentos independientes donde se gráfica el porcentaje de células vivas positivas para GFP, se muestra el promedio \pm DE (desviación estándar). *P <0.05, **** P <0.0001 ANOVA de dos vías.

7.3 El análisis del transcriptoma de las células tratadas con TPL mostró una respuesta inesperada en la expresión genética global

Para explorar si el TPL genera un efecto diferencial en la expresión de genes en células NT y TAM, se analizaron mediante RNA-seq los transcriptomas de estas células después de ser incubadas con 125 nM de TPL por 4 h, concentración en donde los niveles de la p^{Ser5} RNAPII disminuyeron a la mitad en ambos tipos celulares sin comprometer fuertemente la viabilidad celular (Figura 23).

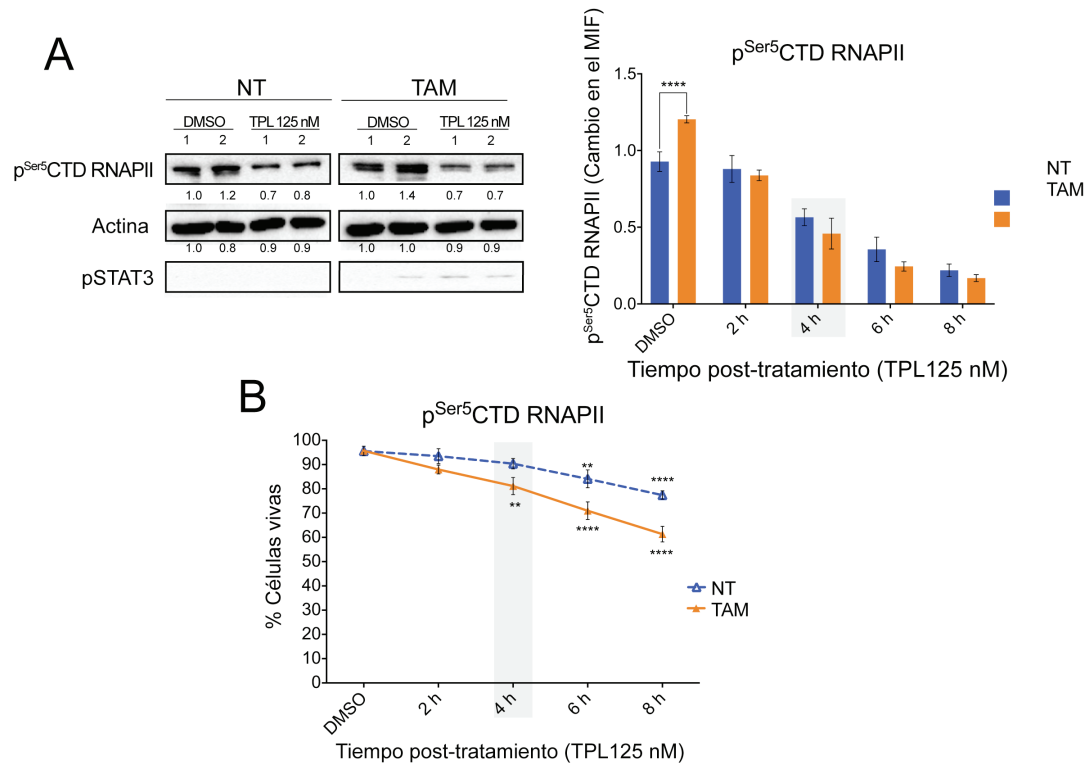
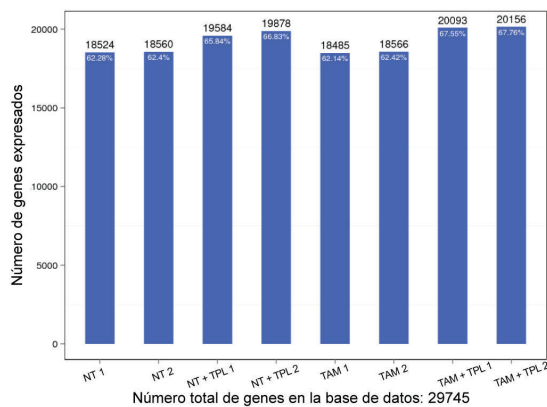


Figura 23. Efecto del TPL sobre p^{Ser5}CTD RNAPII y la viabilidad en células MCF10A.ErSrc. (A) En el panel izquierdo se muestran Westerns blots (WBs) de la p^{Ser5} CTD RNAPII en células NT y TAM tratadas con triptolide (TPL) durante 4 h a 125 nM o con el control (DMSO 4 h). Estas muestras son las que se usaron para el análisis del RNA-seq. La cuantificación relativa con respecto a actina se indica debajo de cada WB que

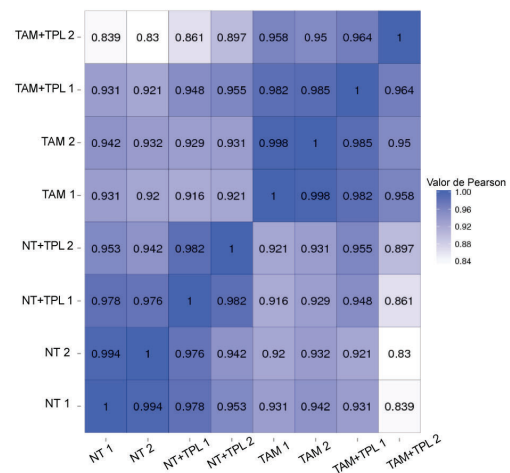
corresponde a dos réplicas biológicas (1,2). La pSTAT3 se usó como control de transformación. El panel derecho indica la cuantificación de la p^{Ser5}CTD RNAPII por citometría de flujo de células NT (azul) y TAM (naranja); el recuadro gris, indica el tiempo en donde la p^{Ser5}CTD RNAPII ha disminuido aproximadamente en un 50%. **(B)** Ensayo de viabilidad celular de las células NT (azul) y TAM (naranja) tratadas con 125 nM de TPL durante 2, 4, 6 y 8 h y con el control (DMSO 8h). Se puede apreciar que a las 4 h (recuadro gris) la viabilidad celular no está comprometida. El panel derecho **(A)** y el gráfico **(B)** se grafica el promedio \pm DE (desviación estándar) de al menos tres replicas biológicas independientes. **P<0.01, **** P <0.0001 ANOVA de dos vías, comparando siempre con DMSO.

De las 8 librerías que se hicieron para los experimentos de RNA-seq, se conto con un promedio de 22,872,532 lecturas, de los cuales se realizaron se mapearon con el genoma del humano hg19 (Ver sección anexa 12.1.1) en donde en promedio se mapeo mas del 85% de la lecturas generadas. Con los datos del transcriptoma se identificaron aproximadamente 18,500 transcritos expresados tanto en células NT y TAM, observando un mayor numero de transcritos en las muestras tratadas con TPL, considerando que se cuenta con un número similar de lecturas limpias, por lo que podría ser un efecto de la respuesta a la droga (Figura 24A). El análisis de correlación de Pearson entre las células NT y TAM con y sin TPL mostró que los duplicados eran muy parecidos entre si (Figura 24B), y como era de esperar, que el tratamiento con TPL causó una reducción en los niveles de un número significativo de genes, pero interesantemente, los niveles de otros transcritos aumentaron (Figura 24C).

A



B



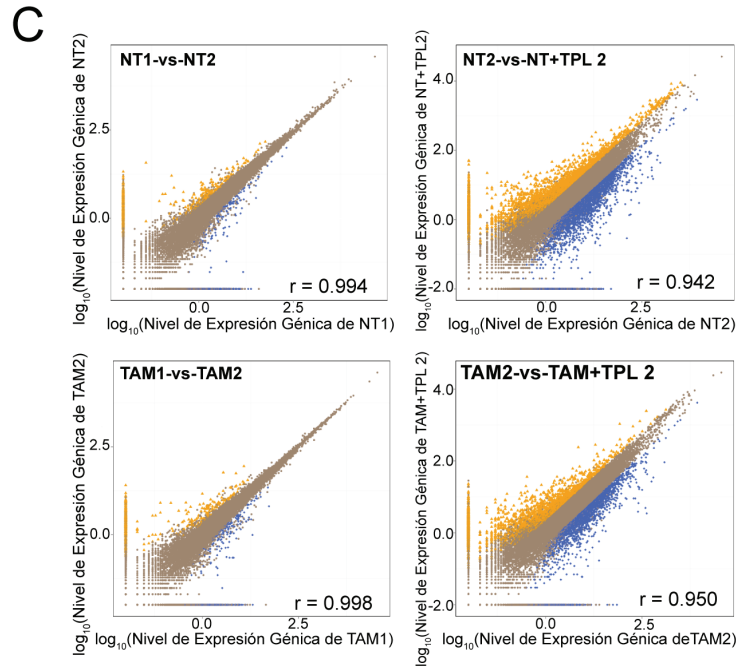


Figura 24. Correlación global entre los genes diferencialmente expresados. (A) Número de genes expresados (eje Y) por cada muestra (eje X). El porcentaje indicado en la parte superior de cada barra representa el número de genes expresados dividido entre el número total de genes reportados en la base de datos. **(B)** Valores de correlación de cada muestra; el gradiente de color del código de barras indica el valor mínimo como blanco y el máximo como azul. Si una muestra es muy similar a otra, el valor de correlación entre ellas es muy cercano a 1. **(C)** Correlación de Pearson entre dos réplicas de los datos de RNA-seq (arriba y abajo a la izquierda) y entre dos muestras, una sin tratamiento (control DMSO) y otra incubada con TPL (4 h-125 nM); el eje X y el eje Y representan el valor \log_{10} del nivel de la expresión génica. Los puntos azules representan los transcritos regulados negativamente, los transcritos regulados positivamente son los puntos naranjas y los puntos cafés son transcritos que no cambian.

La inducción del fenotipo transformado en las células MCF10A-ErSrc redujo la expresión del 6.84% de los genes y causó un incremento del 6.59% (Figura 25A). Al comparar el efecto del TPL en las células NT y TAM, los niveles de aproximadamente un 68% de los genes no tuvo un cambio significativo en su expresión, usando un FDR de ≤ 0.001 y $\log_2 FC \geq 1.2$. (Figura 25A). Sin embargo, en ambos tipos celulares alrededor de un 11% de los transcritos tuvieron un incremento y un 19% un decremento. (Figura 25A). Aquellos genes cuyos niveles de transcritos disminuyeron, 2135 fueron compartidos entre células NT y TAM. En cuanto a los genes que aumentaron los niveles de sus transcritos, 1681 fueron comunes entre células NT y TAM, 62 fueron exclusivos de las NT y 36 de las TAM

(Figura 25B). Se encontraron 213 genes expresados diferencialmente exclusivos de células NT o TAM (Figura 25C), pero en total fueron 3620 regulados diferencialmente en células NT y TAM en respuesta a TPL (Figura 25D).

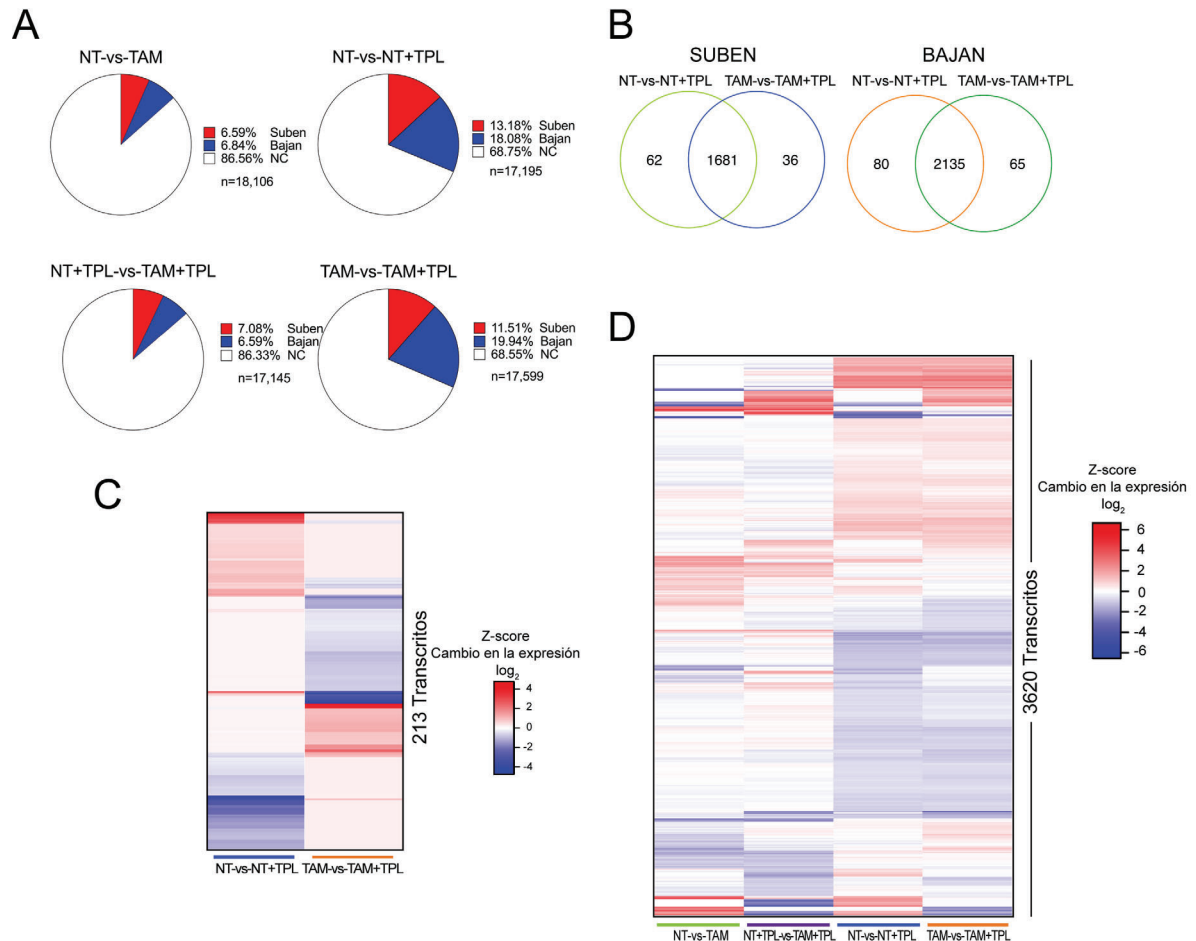


Figura 25. Análisis del transcriptoma de células tratadas con TPL. (A) Porcentajes de genes que se incrementan o disminuyen en células NT, NT tratadas con triptolide durante 4 h a 125 nM (NT+TPL), TAM y TAM tratadas con triptolide durante 4 h a 125 nM (TAM+TPL). Usando un *Fold change* de \log_2 se muestran en rojo los porcentajes de transcritos que aumentan, en azul los que disminuyen y en blanco los que no cambian (NC) significativamente. (B) Diagrama de Venn que muestra el porcentaje de transcritos que suben o bajan, únicos y compartidos entre las células NT y TAM tratadas con TPL. (C) Mapa de calor que compara 213 transcritos que se expresan diferencialmente entre las células NT y TAM después del tratamiento con TPL. (D) Mapa de calor de los genes que son diferencialmente expresados (3620 transcritos) en las diferentes comparaciones analizadas.

De manera interesantemente, la mayoría de los factores recientemente identificados como necesarios para mantener el estado oncogénico de las células TAM⁷⁰, recuperaron su expresión de manera similar a la condición de NT, lo que sugiere una reversión parcial del fenotipo TAM a NT (Figura 26).

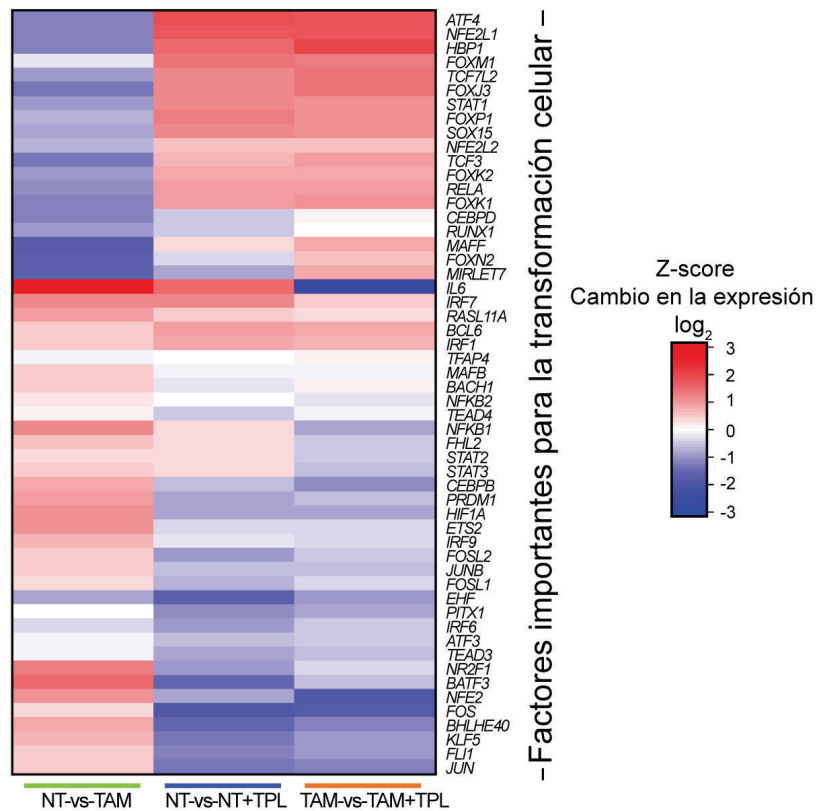
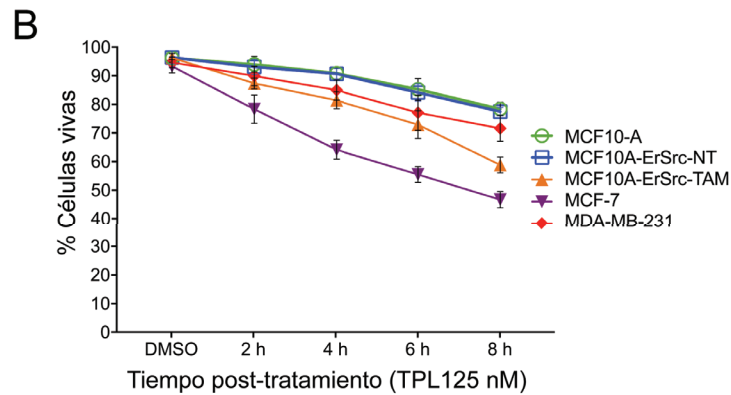
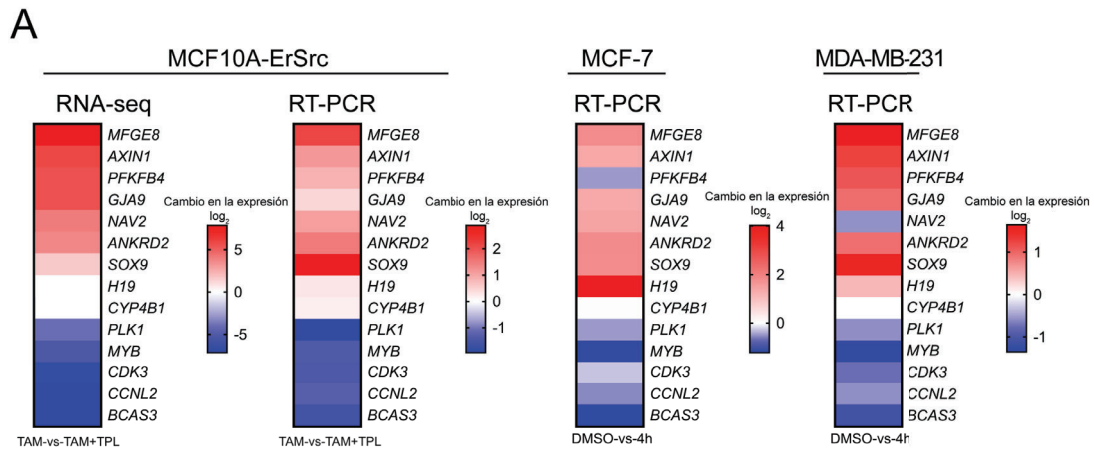


Figura 26. Cambio en la expresión de los factores esenciales para la transformación de la línea MCF10A-ErSrc después de ser tratada con TPL. Mapa de calor que muestra la respuesta de los factores esenciales para la transformación celular después de que las células son tratadas con TPL.

Con la finalidad de confirmar los datos del RNA-seq, se analizó un conjunto de 14 genes seleccionados al azar por ensayos de RT-PCR. Estos genes presentaron el mismo comportamiento observado en los datos de RNA-seq (Figura 27A). Adicionalmente se exploró si la respuesta que obtuvimos por el tratamiento con TPL en estos genes, también ocurre en otras líneas celulares de cáncer de mama. Para eso, se analizó la expresión de estos genes en la línea MCF-7 positiva para

el receptor de estrógenos, así como en la línea triple negativa MDA-MB-231 y se encontró que 12 de los 14 genes tienen un comportamiento similar al MCF10A-ErSrc cuando son tratadas con TPL (125 nM durante 4h) (Figura 27A). Curiosamente, la línea MCF-7 es la más sensible a TPL y la MDA-MB-231 la menos sensible al TPL (Figura 27B). Además, también observamos que existe una disminución de la p^{Ser5}CDT RNAPII en estas líneas celulares cuando son incubadas con TPL (Figura 27C). Estos resultados indican que, en general, varias líneas celulares de cáncer de mama responden de manera similar al TPL, al menos cuando se evalúa la expresión génica.



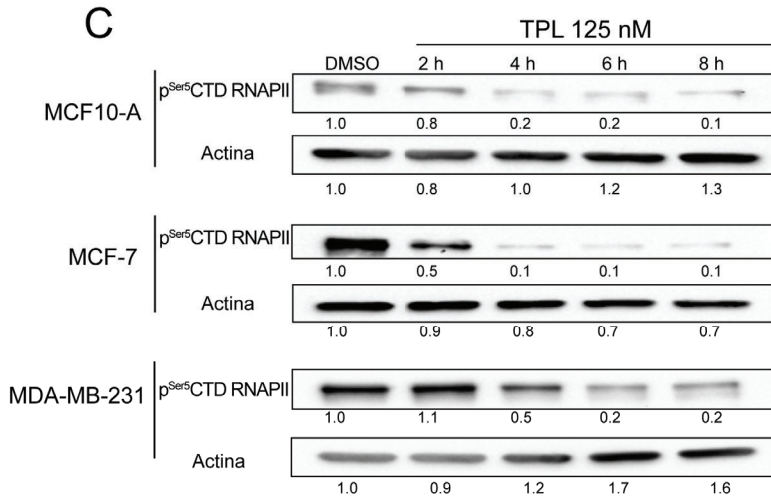


Figura 27. Verificación del transcriptoma mediante RT-PCR y el efecto del TPL en otras líneas celulares. (A) El panel izquierdo muestra los niveles de expresión de los datos obtenidos por el RNA-seq. El panel central muestra los niveles de expresión de los mismos genes verificados por RT-PCR y el panel derecho muestra los niveles de expresión de los mismos genes analizados en otras líneas celulares (DMSO vs - 4 h TPL a 125 nM). **(B)** Viabilidad celular de las líneas celulares MCF10-A (verde), MCF10A-ERSrc-NT (azul), MCF10A-ERSrc-TAM (naranja), MCF-7 (púrpura) y MDA-MB-231 (rojo) tratadas con TPL a 125 nM durante 2, 4, 6 y 8 h. Las células de control se trataron con DMSO durante 8 h. Los gráficos muestran el promedio \pm DE (desviación estándar) de al menos tres replicas biológicas independientes **(C)** Niveles de la p^{Ser5}CTD RNAPII en las líneas celulares MCF10-A, MCF-7 y MDA-MB-231, después de incubarse con TPL o con el control (DMSO, 8 h). Los análisis de densitometría se realizaron utilizando actina como control de carga; la cuantificación relativa se indica debajo de cada WB y los datos se muestran como un ejemplo representativo de tres réplicas biológicas.

En resumen, todos los datos presentados en esta sección indican que la inhibición de la actividad ATPasa de XPB por TPL modula diferencialmente un número importante de genes en las células NT y TAM. Inesperadamente, los resultados del RNA-seq indicaron que a pesar de que el TPL afecta la transcripción por RNAPII, algunos genes son sobre-expresados en respuesta a este insulto. Este resultado es imprevisto y sugiere que hay genes cuya transcripción puede continuar o incluso incrementarse bajo condiciones donde los niveles de la RNAPII y del submódulo XPB-p52-p8 de TFIIH han disminuido.

7.4 La RNAPII se mantiene en el promotor y en el cuerpo de los genes cuya expresión se incrementa

El incremento en los niveles de transcrito de un número importante de genes en respuesta al TPL puede ser el resultado de diferentes factores, incluyendo un aumento directo en la transcripción y/o un incremento en la cantidad de algunos RNAs por reducción de su degradación. Existen varios reportes donde usan el TPL para analizar la pausa de la RNAPII⁷⁰ sin embargo, el efecto sobre los niveles de RNA en condiciones en las que el reclutamiento de la RNAPII en el gen es reducido, no han sido determinados en ningún estudio previo. Por lo tanto, se analizó la distribución de la RNAPII en todo el genoma en experimentos por duplicado de inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a secuenciación masiva (ChIP-seq) (Ver sección anexa 12.2) a partir de células NT y TAM incubadas con y sin TPL en las mismas condiciones en las que se hizo el RNA-seq. La correlación de Pearson muestra que los duplicados son similares entre sí (Figura 28). Para estos experimentos se usó un anticuerpo que reconoce al CTD de la RNAPII.

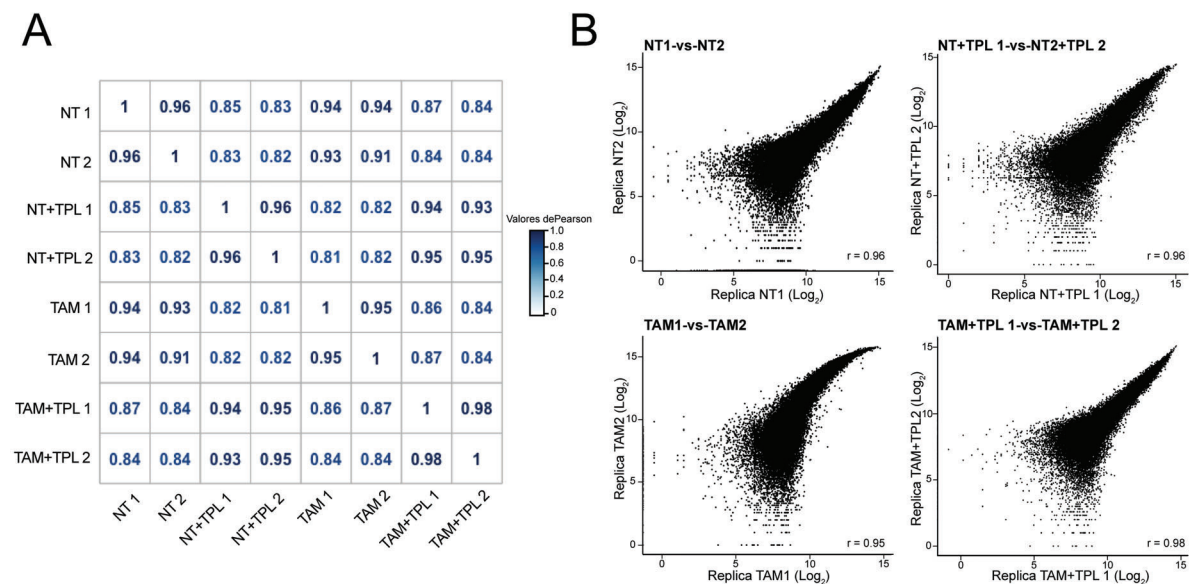


Figura 28. Correlación de Pearson entre réplicas de ChIP-seq. (A) Valores de las correlaciones de Pearson en cada muestra, el valor de correlación entre ellos es cercano a 1. (B) Graficas de correlación entre las muestras de ChIP-Seq de dos réplicas biológicas, se grafica la señal de todos los promotores y los cuerpos de los genes en donde se encontró señal de la RNAPII total.

El meta-análisis mostró que el posicionamiento de la RNAPII en los promotores es mayor en las células TAM comparándolo con las NT y se observó una reducción en el posicionamiento de la RNAPII en células NT y TAM por el tratamiento con TPL, con un pico principal que corresponde a la RNAPII pausada desplazada hacia el 5' del sitio de inicio de la transcripción (TSS) (Figura 29A). Este dato mostró que gran parte de la RNAPII se acumuló en el estado de pre-pausa y concuerda con resultados publicados sobre el efecto de TPL en la RNAPII sobre los promotores^{101-103,104}. También es consistente con la existencia de promotores pausados altamente estables¹⁰³. Sin embargo, también se identificaron promotores establemente pausados en células que tuvieron una reducción importante en los niveles de la RNAPII y del submódulo XPB-p52-p8 de TFIIH. Además, en algunos promotores se observó un incremento en el posicionamiento de la RNAPII, en células NT (5.42%) y TAM (3.93%) que fueron tratadas con TPL (Figura 29B), lo que sugirió que la activación de la transcripción se generó como respuesta a esta molécula. Dado que los datos del RNA-seq mostraron que un número importante de los transcritos son sobre-expresados por el TPL, se decidió analizar si hay una correlación con la acumulación de la RNAPII en los promotores de estos genes. Como se muestra en la Figura 27C, con el tratamiento del TPL, 261 y 301 genes tuvieron un incremento en la asociación de la RNAPII a los promotores y esto se correlacionó con un aumento importante en los niveles de los RNAs correspondientes en células NT y TAM, respectivamente. De estos genes 157 fueron compartidos entre los dos grupos de células (Figura 29C).

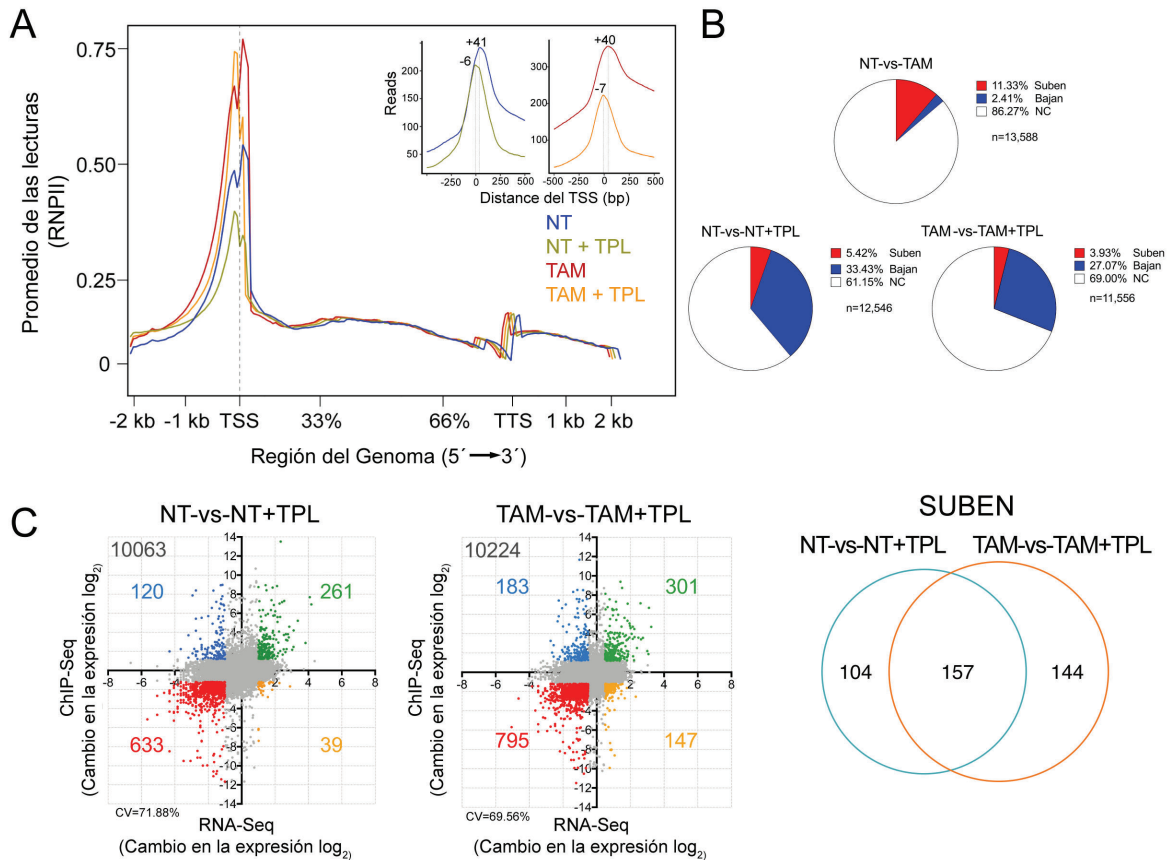


Figura 29. Análisis del posicionamiento de la RNAPII en células tratadas con TPL. (A) Meta-análisis del posicionamiento de la RNAPII en las células no tratadas (NT, azul), no tratadas + triptolide (NT+TPL, verde), tratadas con tamoxifeno (TAM, roja) y tratadas con tamoxifeno + triptolide (TAM+TPL, naranja) incubadas por 4 h a 125 nM. El panel superior derecho se muestra el desplazamiento de la RNAPII por las células tratadas con TPL hacia el TSS-5'. (B) Relación de la ocupación de RNAPII en promotores de genes después del tratamiento con TPL en células NT, NT+TPL, TAM y TAM+TPL. En rojo se indica el porcentaje de los promotores en los que aumenta el posicionamiento de la RNAPII, en azul los que bajan y en blanco los promotores que no tienen un cambio significativo. (C) Correlación entre los datos de RNA-seq (eje X) y los datos de ChIP-seq (eje Y), de las células NT-vs-NT+TPL y TAM-vs-TAM+TPL. En verde están los genes que aumentan tanto en el nivel de transcrito como en el posicionamiento de RNAPII en el promotor; en azul los genes que aumentan en el nivel de transcrito, pero tienen una disminución en el posicionamiento de la RNAPII; en rojo están los genes dobles negativos, es decir, baja el transcrito y baja el posicionamiento de la RNAPII y en amarillo son genes donde el transcrito disminuyó pero aumentan el posicionamiento de la RNAPII. Valor de correlación (CV). En el panel derecho se muestra el número de genes que aumentan en el RNA-seq y en el ChIP-seq, únicos y comunes entre las células NT-vs-NT+TPL en comparación con TAM-vs-TAM + TPL.

Además, se observó un aumento de la RNAPII en el cuerpo de estos genes (Figura 30). El análisis de correlación indicó que hay diferentes comportamientos en la expresión de diferentes genes en respuesta al TPL. Por ejemplo, existen genes como *FOS*, sobre el cual la RNAPII pausada disminuyó completamente, pero aumento la pre-pausada y los niveles de su transcrito disminuyeron

dramáticamente por el tratamiento con TPL (Figura 30A). Para otros genes como *SOX9*, los niveles de su transcrito disminuyeron por el TPL en las células NT y al igual que *FOS* la RNAPII pre-pausada fue enriquecida en estas células. Sin embargo, en células TAM el TPL indujo un incremento en el transcrito de *SOX9* así como un aumento de la presencia de la RNAPII en su promotor (Figura 30B). Para el caso del gen *VEGFA* que fue sobre-expresado en las células TAM, con altos niveles de la RNAPII en el cuerpo del gen, el TPL reprimió su expresión y redujo la presencia de la RNAPII (Figura 30C). Sin embargo, los genes más interesantes, fueron aquellos que en respuesta al TPL aumentaron los niveles de sus transcritos como *LOC730101* y *HEXIM1*, en los cuales también hubo un aumento en el posicionamiento de la RNAPII en sus promotores y en los cuerpos de los genes (Figura 30D-E). De manera remarcable, el efecto del TPL sobre la transcripción indujo una potente sobre-expresión del gen que codifica para la subunidad grande de la RNAPII (*POLR2A*) (Figura 30F).

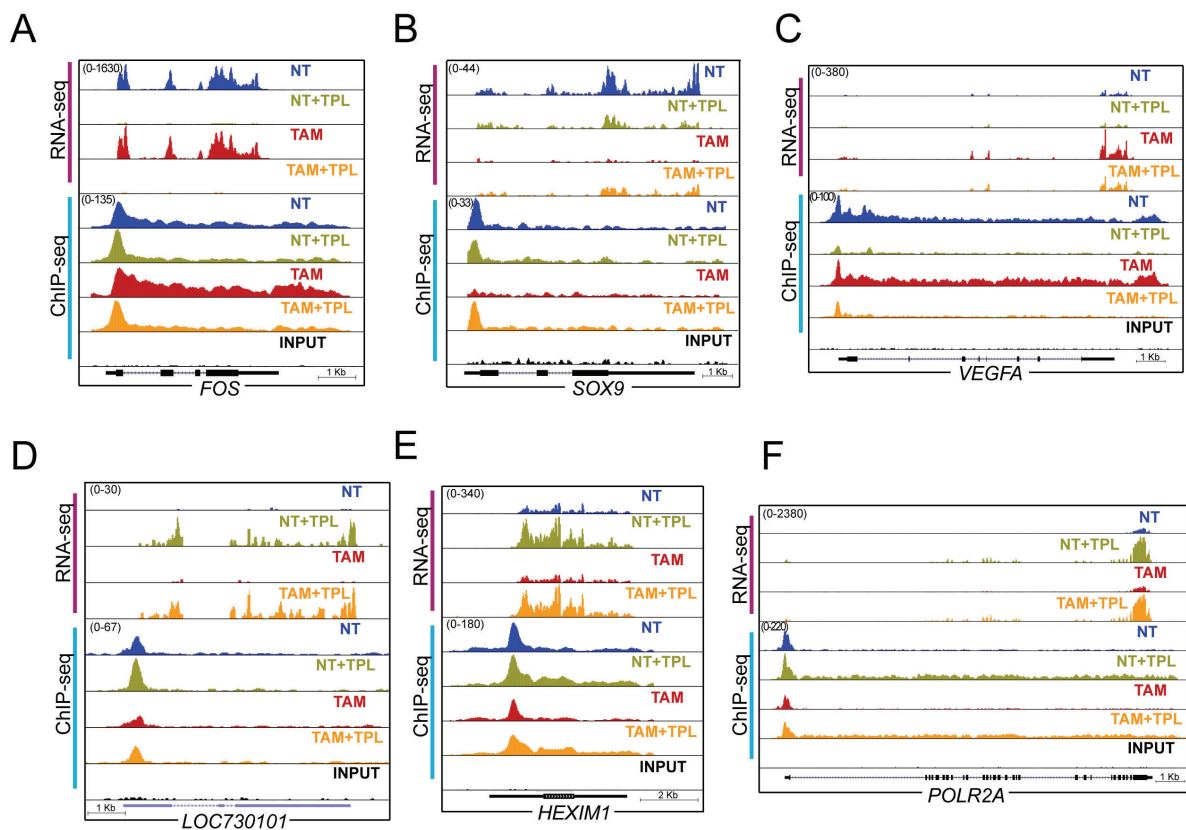


Figura 30. Diferentes respuestas observadas al tratamiento con TPL. Ejemplos de los diferentes comportamientos observados en RNA-Seq (barra rosa) y ChIP-Seq (barra azul), en (A) *FOS*, (B) *SOX9*, (C) *VEGFA*, (D) *LOC730101*, (E) *HEXIM1*, (F) *POLR2A*. Las imágenes obtenidas son a partir de nuestros datos visualizados en el navegador *Genome Browser*.

Confirmamos que el aumento en los niveles de los transcritos resulta de un aumento de la transcripción en respuesta al TPL mediante la evaluación de la transcripción *de novo* del primer intrón pre-mRNA de los genes *POLR2A*, *CLU* e *ID2* por qRT-PCR (Figura 31).

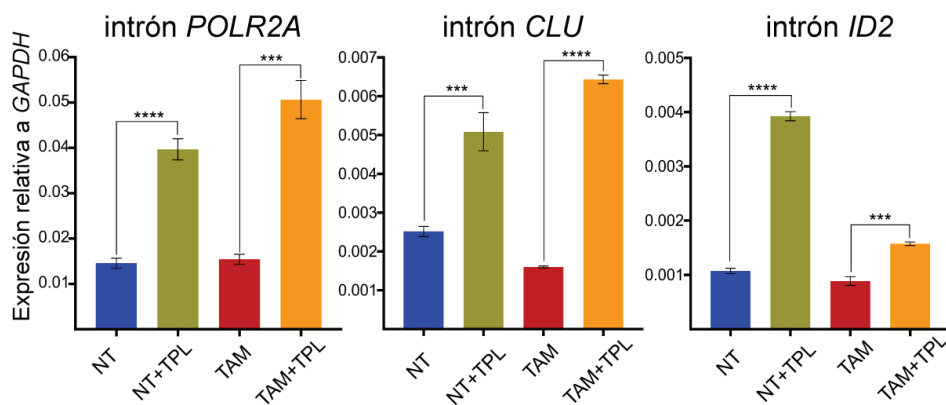


Figura 31. Evaluación de síntesis *de novo* en las secuencias intrónicas. Ensayos de qRT-PCR para evaluar la secuencia interna del primer intrón de los genes: *POLR2A* corresponde al gen de subunidad grande RNAPII, *CLU* es el gen que está involucrado en muerte celular y progresión e *ID2* corresponde a un factor transcripcional que participa en la transición epitelio-mesénquima. Los datos representan tres réplicas biológicas y técnicas en donde se muestra el promedio \pm DE (desviación estándar). Se realizó una *t de student* no pareada para determinar la estadística del experimento. **** P < 0.0001, *** P < 0.001.

A continuación, se realizó un análisis de ontología enfocado a genes que están relacionados con cáncer en los cuales hubo un incremento de la RNAPII en el promotor y los niveles del transcrito correspondiente aumentaron por el tratamiento con TPL (Figura 32). Un número importante de genes que actúan como supresores tumorales y de crecimiento celular, tales como *PHACTR4* y *ARID4A* estuvieron presentes en este análisis^{104,103}. Genes que se activan en respuesta a quimioterapia y/o radioterapia como *SNAI1* y *SNX1*^{105,106} también fueron sobre-expresados. De manera muy importante un grupo grande de genes que son considerados como oncogenes o promotores del crecimiento tumoral y/o

relacionados a metástasis, como *SKI*, *EGR4*, *SNAI1* y *CEMIP2*¹⁰⁷, también fueron sobre-expresados en respuesta a TPL (Figura 32). Así mismo, es importante resaltar que algunos genes que codifican para proteínas con dedos de Zn y RNAs largos no codificantes (lncRNAs) con función desconocida también fueron sobre-expresados.

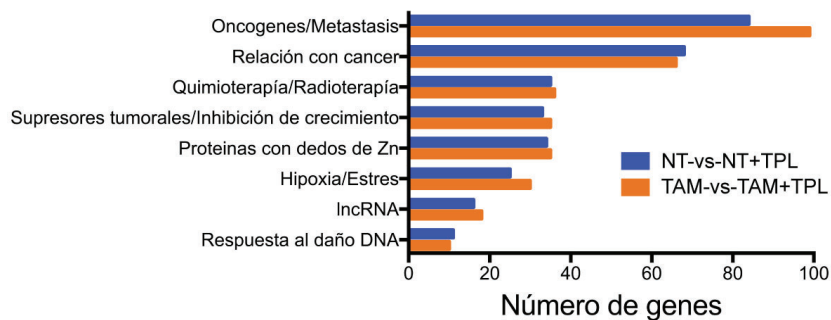


Figura 32. Ontología de genes relacionados al cáncer. Se muestran genes cuyos niveles de transcrito están aumentados (RNA-seq) y la RNAPII esta posicionada en su promotor (ChIP-seq).

Para confirmar los datos del RNA-seq y ChIP-seq, los genes que tienen un incremento de la RNAPII en el promotor también son sobre-expresados en respuesta al TPL, se eligieron 5 genes con diferentes funciones. Los genes seleccionados fueron: *ID2*, que codifica para un factor transcripcional que participa en la transición epitelio-mesénquima¹⁰⁸; *CRY2*, que codifica para un represor del ciclo circadiano y que está involucrado en el reciclaje de MYC¹⁰⁸⁻¹¹¹; el RNA largo no codificante *LOC730101*, el cual es inducido por hipoxia y ha sido relacionado con metástasis¹¹² y *HEXIM1*, que es un inhibidor de P-TEFb y se le ha asociado a resistencia en quimioterapia¹¹³ y que además se ha demostrado que también se sobre-expresa en respuesta a JQ1¹¹⁴. Además, se analizó a *EPAS1*, también conocido como HIF2A, un factor transcripcional que responde a hipoxia y es característico del cáncer¹¹⁵. En todos los casos el aumento en los niveles del RNA correspondiente fue confirmado (Figura 33A-E), además una cinética de los productos codificados de estos genes mediante Western blot (WB), confirmó que no solo aumenta el mensajero, sino también la proteína correspondiente en

respuesta al TPL observando un mayor incremento a las 4 h y a las 8 h observamos una disminución, incluso por debajo de los niveles iniciales, esta puede ser debido a que a este tiempo ya la viabilidad células se encuentra comprometida. (Figura 33F).

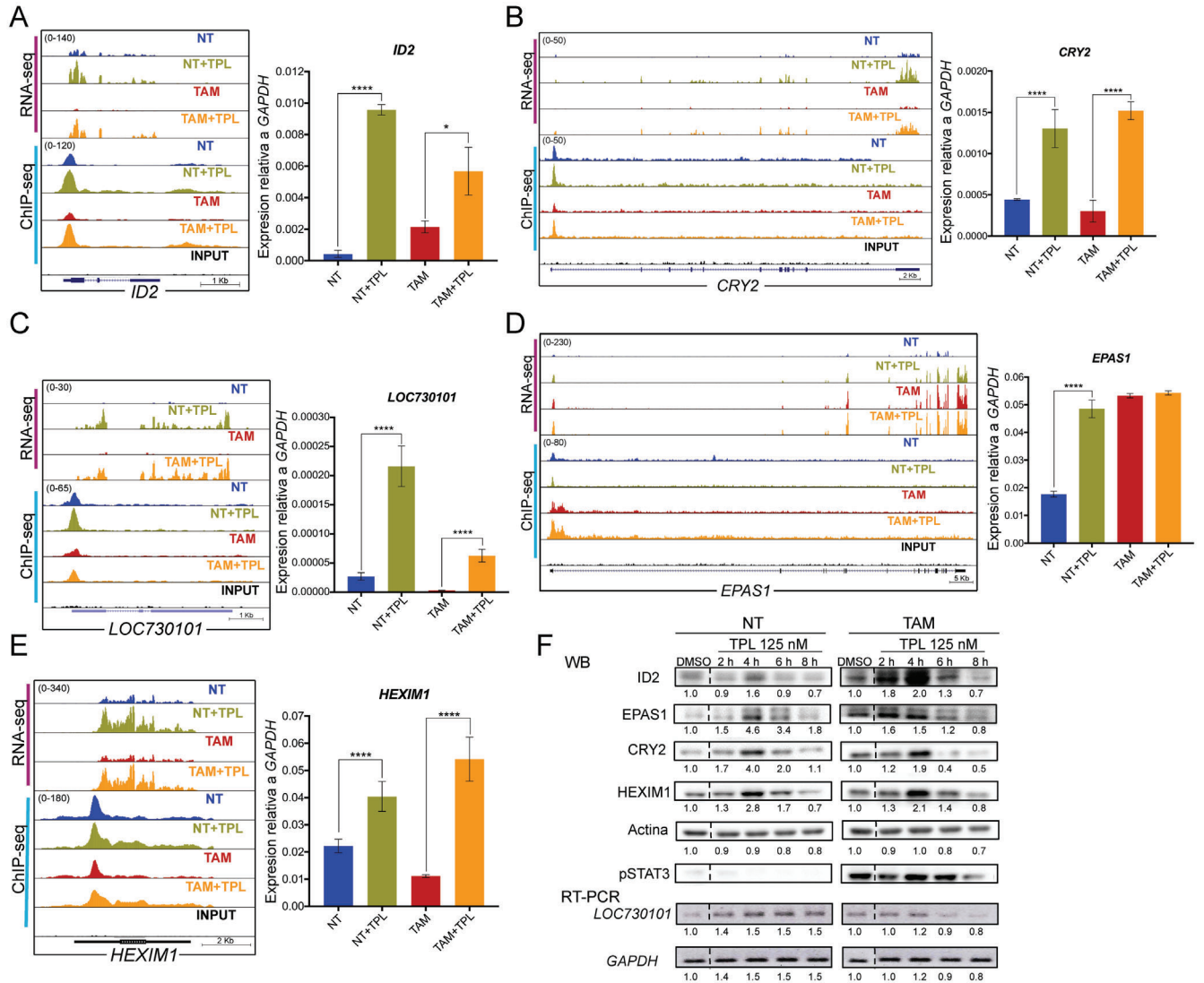
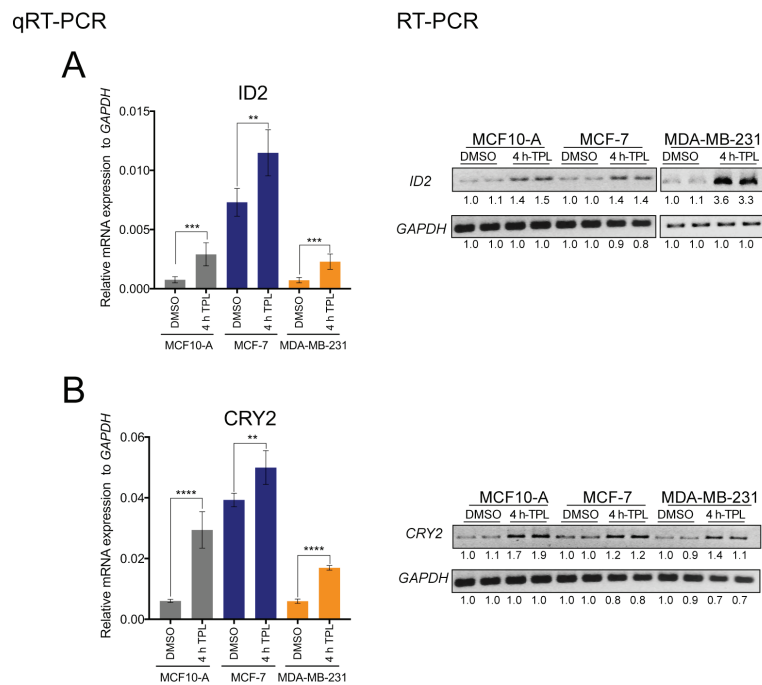


Figura 33. Análisis de genes sobre-expresados y sus productos proteicos en respuesta al tratamiento con TPL. (A) Gen *ID2*, imagen tomada del visualizador *Genome Browser* a partir de los datos obtenidos del RNA-seq (barra rosa) y ChIP-seq (barra azul). Se hace una comparación de las células NT (azul), NT + TPL (verde), TAM (rojo), TAM + TPL (naranja) y el INPUT (negro). Se muestra también la comprobación por qRT-PCR. **(B)** El gen *CRY2* aumenta con el tratamiento de TPL como se muestra en la imagen obtenida del *Genome Browser*, además de la confirmación por qRT-PCR. **(C)** Representación del lncRNA *LOC730101* en el *Genome Browser*, los experimentos de qRT-PCR también se muestran confirmando el aumento de este transcrito después del tratamiento con TPL. **(D)** Representación del transcrito *EPAS1* y la corroboración por qRT-PCR. **(E)** Imagen del navegador *Genome Browser* de *HEXIM1*. Experimentos de qRT-PCR que

confirman la sobre-expresión de HEXIM1 por TPL. **(F)** Western blot de la cinética donde se observan las diferentes proteínas analizadas ID2, HEXIM1, CRY2 y EPAS1 en respuesta al TPL. La pSTAT3 se uso como indicador del fenotipo transformado en las células TAM. También se muestra la cinética del la sobre-expresión del lncRNA *LOC730101* por RT-PCR. La línea discontinua indica dónde se cortaron las imágenes para suprimir otro tiempo de tratamiento (30 minutos) incluido en el experimento. Los análisis de densitometría se realizaron utilizando a actina o a *GAPDH* como control de carga en Western blot y RT-PCR respectivamente; la cuantificación relativa se indica debajo de cada gen y los datos se muestran como un ejemplo representativo de tres réplicas biológicas. Los graficas mostradas de A-E representan tres réplicas biológicas. Los gráficos muestran los promedios \pm DE (desviación estándar). **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$ prueba *t* de student.

También se analizó si los transcritos de estos genes que aumentan en respuesta al TPL en otras líneas celulares de cáncer de mama por RT-PCR y qRT-PCR. Interesantemente, estos genes también se sobre-expresaron en respuesta al TPL en las líneas MCF7 y MDA-MB-231, indicando que esta respuesta no es exclusiva de la MCF10A-ERSrc (Figura 34).



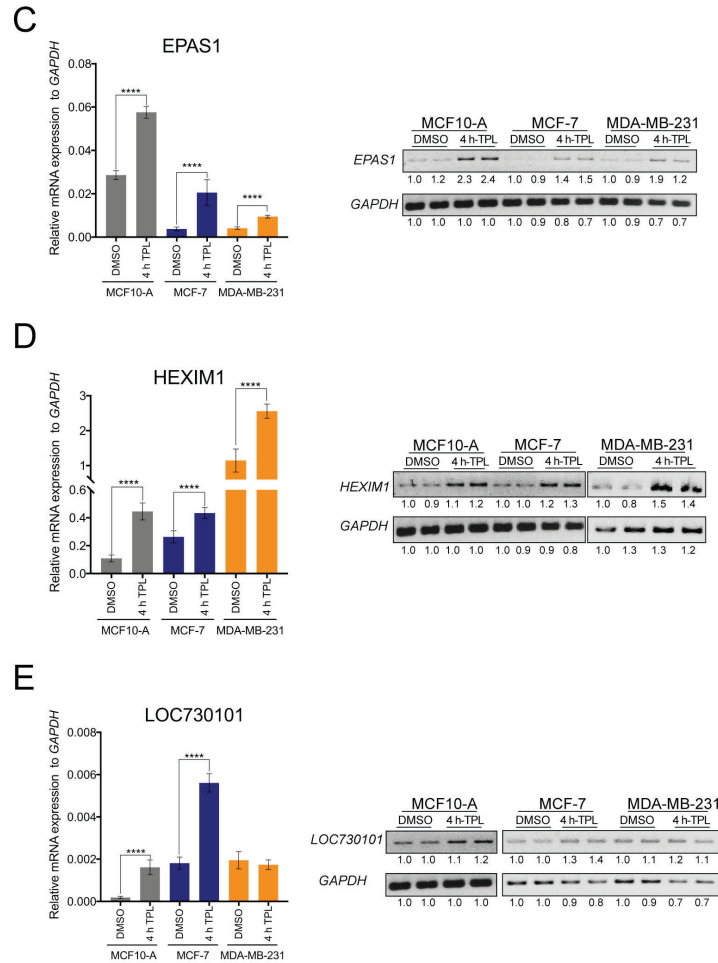


Figura 34. Análisis de genes sobre-expresados en respuesta a TPL en otras líneas celulares de cáncer de mama. Análisis cuantitativo de qRT-PCR y RT-PCR (izquierda y derecha respectivamente) de los genes **(A) ID2**, **(B) CRY2**, **(C) EPAS1**, **(D) HEXIM1** y **(E) LOC730101** en las líneas MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231. Los análisis de densitometría se realizaron utilizando a *GAPDH* como control de carga y la cuantificación relativa se indica debajo de cada gen. Los gráficos muestran el promedio \pm DE (desviación estándar). Prueba t de student para determinar la estadística. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$. Los paneles derecho e izquierdo representan al menos dos y tres muestras biológicas independientes, respectivamente

Colectivamente, los resultados indican que tanto las células NT como TAM, responden al insulto causado por el TPL sobre-expresando genes específicos. Algunos de ellos codifican para factores que participan en la supresión de tumores, pero más importante aún, para genes que promueven la carcinogénesis, resistencia a quimioterapia y metástasis, también son sobre-expresados.

7.5 El THZ1 conduce a una respuesta génica similar al TPL en células cancerosas

Se decidió explorar si la incubación con THZ1 induce una respuesta a nivel de la expresión génica similar a la del TPL. Nuestra primera aproximación fue determinar por RT-PCR la respuesta de algunos genes que fueron sobre-activados por el TPL en células NT y células TAM, pero ahora incubadas con THZ1. Para este experimento usamos una concentración de 300 nM de THZ1 durante 2 h (Figura 35A). La Figura 33B muestra que para *ID2*, el lncRNA *LOC730101*, *HEXIM1* y *EPAS1*, hubo un aumento claro en los niveles de sus transcritos en las células NT incubadas con THZ1 (Figura 35B). En las células TAM los niveles de *ID2* y del lncRNA se incrementaron y una conducta similar a la observada con TPL ocurre con *EPAS1* (Figura 35B). En contraste, para el caso de *HEXIM1*, no se observó un incremento claro por la incubación con THZ1 en los dos tipos celulares. Por su parte *CRY2* no se vio afectado por el tratamiento con el THZ1 (Figura 35B). Estos resultados sugieren que hay una respuesta similar pero no idéntica a nivel de la expresión génica entre el TPL y THZ1.

Para explorar que tan similar fue la respuesta global a nivel de expresión génica a TPL y THZ1, utilizamos datos públicos de RNA-Seq obtenidos de una línea celular de cáncer de esófago (KYSE510) tratada con THZ1¹¹⁶. A partir de este análisis se encontró que 94 de 231 genes que fueron sobre-activados con TPL y que correlacionan con un incremento en la RNAPII en el promotor, también fueron sobre-expresados por el tratamiento con THZ1 (Figura 35C). Estos resultados sugieren que en respuesta al estrés transcripcional ya sea por TPL o THZ1, hay un grupo similar de genes sobre-expresados, a pesar de que fueron células diferentes las que se trataron con THZ1.

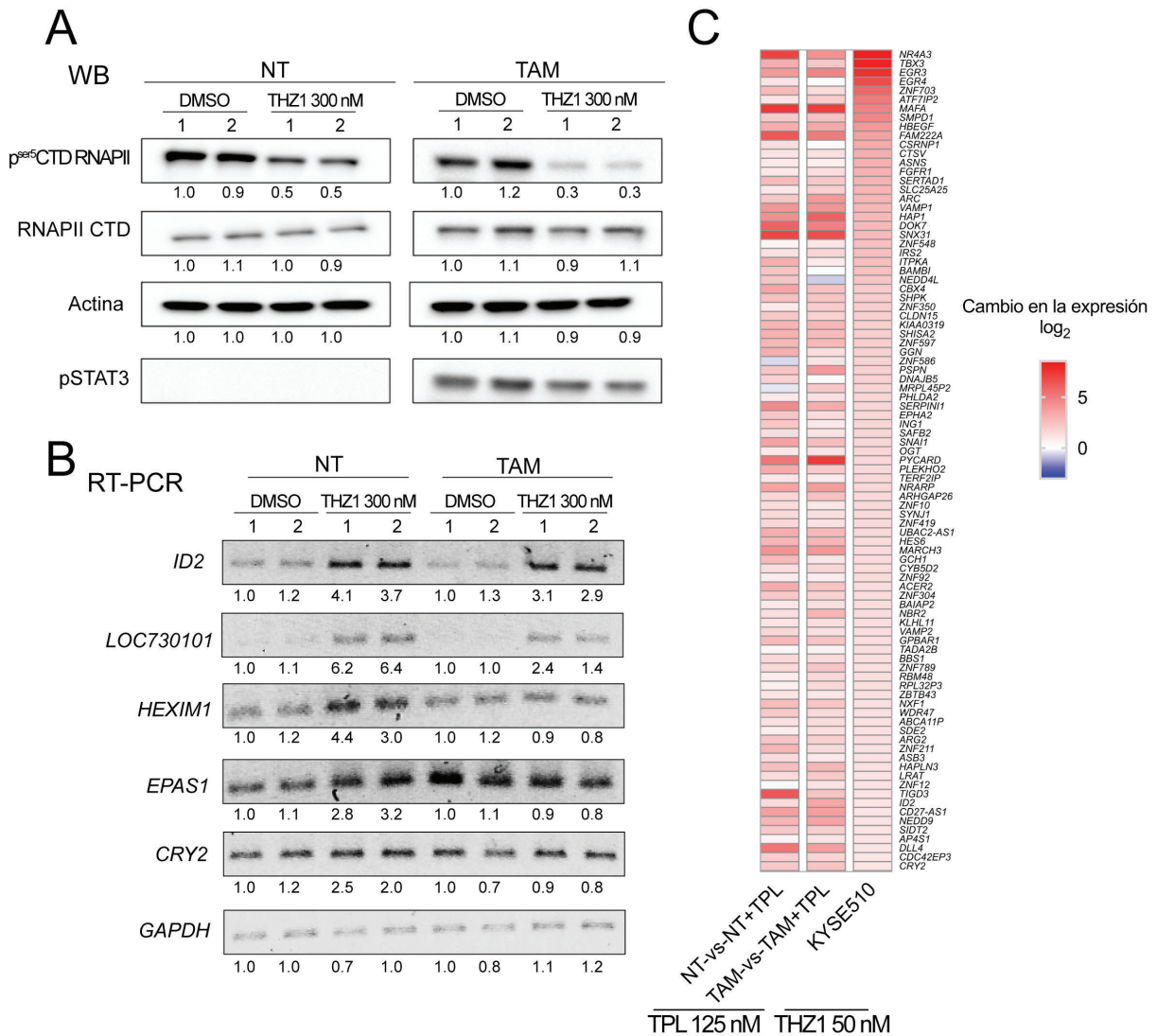
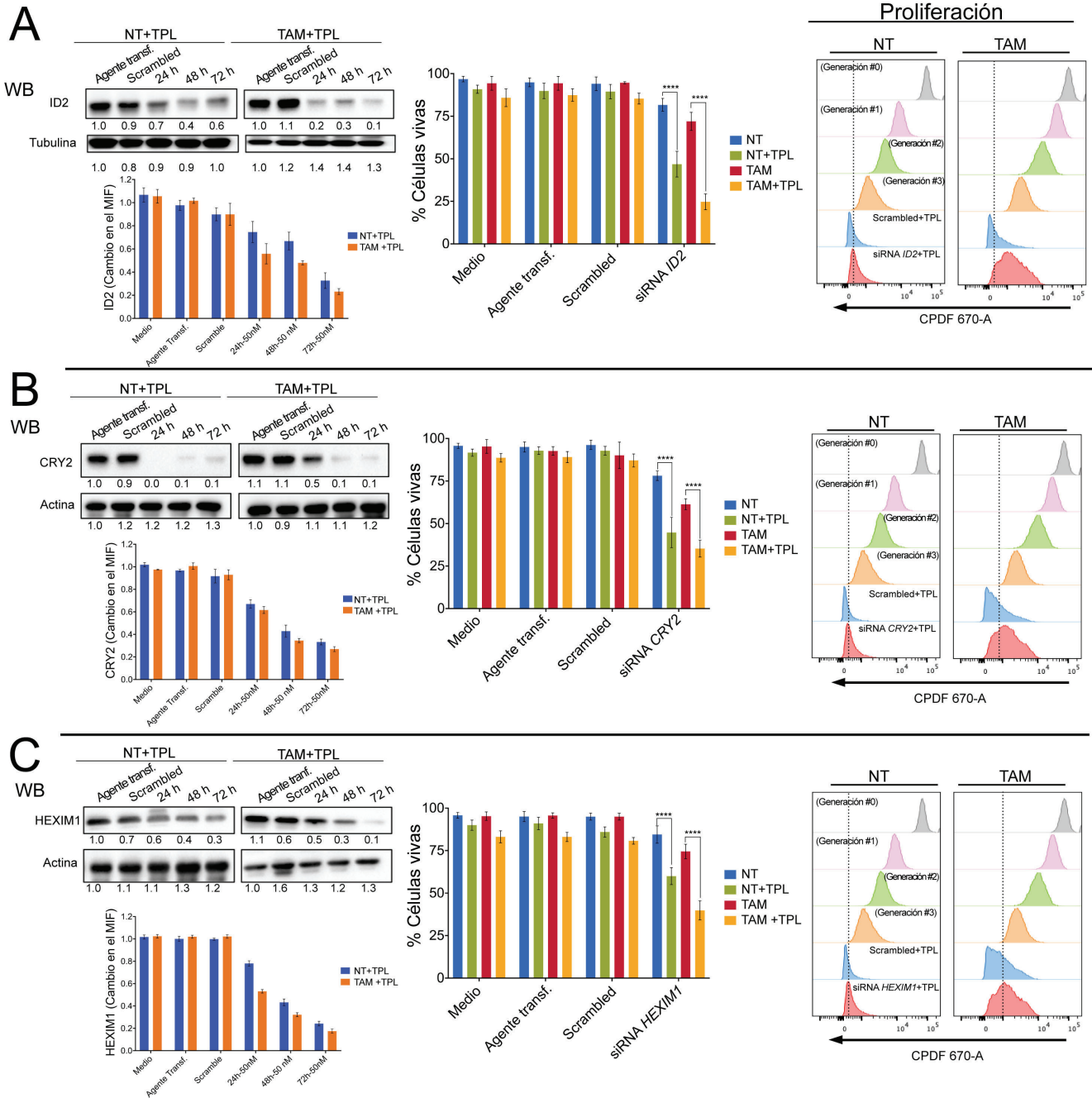


Figura 35. THZ1 genera una respuesta similar a la observada por el efecto de TPL en la línea MCF10A-ErSrc. (A) Niveles de la p^{Ser5}CTD RNAPII y la RNAPII en células NT y TAM tratadas con 300 nM de THZ1 durante 2 h o con DMSO como control. pSTAT3 se usa como control del fenotipo transformado en las células TAM. **(B)** Ensayos de RT-PCR semicuantitativos de células NT y TAM tratadas con 300 nM de THZ1 durante 2 h de *ID2*, *LOC730101*, *CRY2*, *EPAS1* y *HEXIM1*. Para los análisis de densitometría se utilizó actina o *GAPDH* como control de carga en los Western-blot **(A)** y RT-PCR **(B)** respectivamente; la cuantificación relativa se indica debajo de cada gen y los datos mostrados representan al menos dos replicas biológicas independientes. **(C)** Comparación de la respuesta de las células tratadas y sin tratar con TPL en la línea celular MCF10A-ErSrc y células tratadas y sin tratar con THZ1 en la línea KYSE510¹¹⁷

7.6 El silenciamiento de transcritos codificados por genes que fueron sobre-expresados en respuesta a estrés transcripcional, aumenta la sensibilidad de las células al TPL

El hecho de que algunos genes fueran sobre-expresados en respuesta al TPL, abrió la posibilidad de que algunos de ellos puedan ser blanco para matar células tumorales. Para explorar esta posibilidad, se decidió analizar si el interferir algunos de los transcritos sobre-expresados por el TPL puede potenciar el efecto tóxico del TPL. Para esto se eligió reducir los niveles de los transcritos de *ID2*, *CRY2*, *HEXIM1*, *LOC730101* y *EPAS1* en células NT y TAM y posteriormente incubar las células con TPL, para después determinar la viabilidad y proliferación celular. Para esto las células NT y TAM fueron transfectadas con una mezcla de siRNAs específicos para cada uno de estos transcritos a diferentes tiempos, seguido de la incubación con TPL a una concentración de 125 nM durante 4 h, condición en la cual el TPL no afecta drásticamente a las células. En estas condiciones se encontró que la incubación con TPL en células transfectadas con mezclas de siRNAs inespecíficas (Scrambled), no afecta la viabilidad celular (Figura 36). Los análisis realizados a través de citometría de flujo y western blots, mostraron que todos los RNAs blancos fueron silenciados eficientemente por los siRNAs correspondientes, obteniendo una máxima reducción a las 72 h después de la transfección (Figura 36A-E). La disminución de los RNAs que codifican para *ID2*, *CRY2* y *HEXIM1*, redujeron significativamente la viabilidad de células NT y TAM tratadas con TPL, comparándolas con las mezclas inespecíficas de siRNAs (scrambled) o con TPL solamente (Figura 36A-C). Interesantemente, la reducción del *LOC730101* resultó en la disminución de la viabilidad celular, aún en ausencia de TPL, aunque el silenciamiento eficiente de este lncRNA también intensificó el efecto del TPL en ambos tipos de células (Figura 36E). Sorprendentemente, la reducción en los niveles de *EPAS1*, no resultaron en el aumento importante en la capacidad tóxica de TPL (Figura 36D). A diferencia de las células NT, la mayoría de las células TAM que sobreviven se vieron afectadas en la proliferación por el tratamiento de los siRNAs y el TPL, incluido *EPAS1* (Figura 36A-E).

En resumen, estos resultados muestran que la reducción de algunos de los genes que fueron sobre-expresados en respuesta a TPL, sensibilizan a las células al tratamiento de este fármaco; por lo tanto, estos genes son posibles blancos para aumentar el efecto letal del TPL sobre células cancerosas.



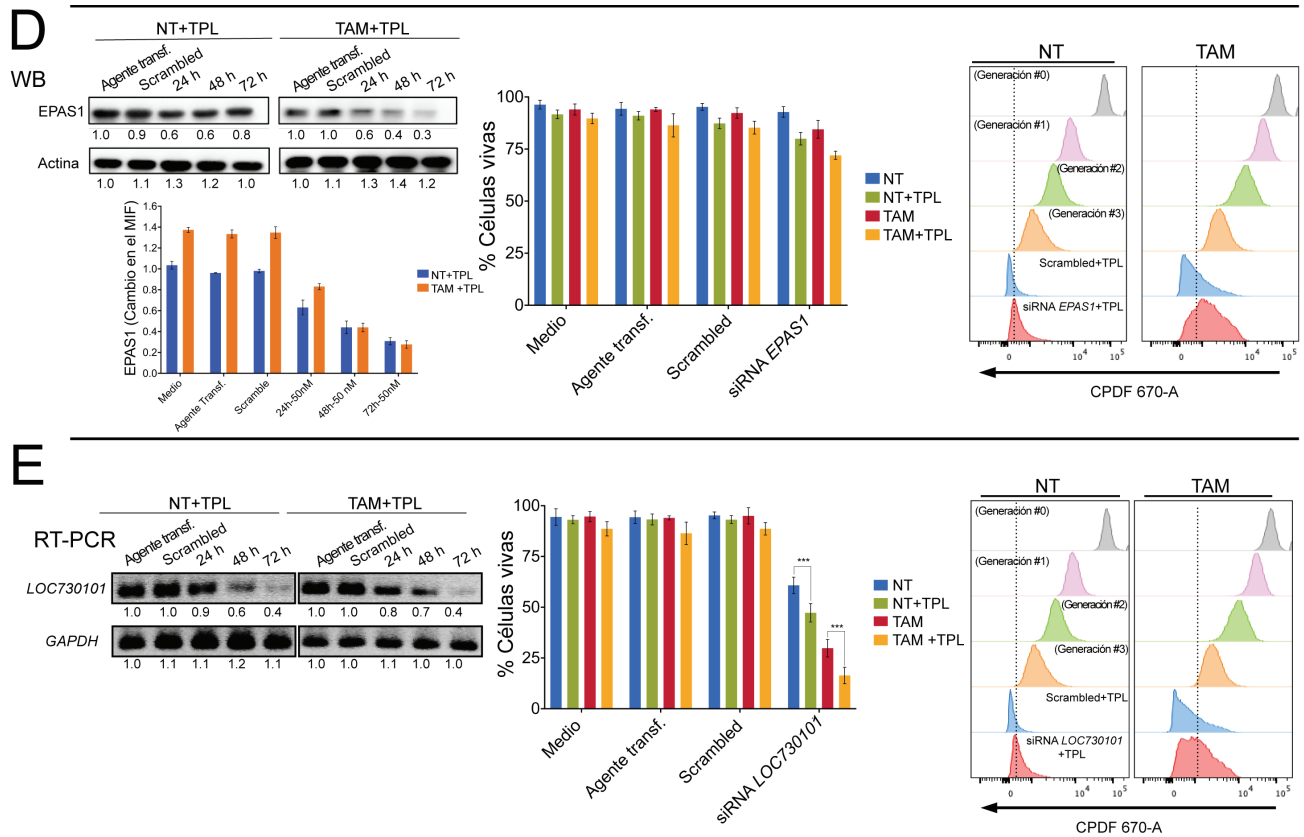


Figura 36. Incremento de la sensibilidad al TPL. Al reducir de niveles de los transcritos codificados por los genes sobre-expresados en respuesta al estrés transcripcional se mejora la sensibilidad al TPL. Las células fueron tratadas con los siRNAs de *ID2*, *CRY2*, *HEXIM1*, *LOC730101* y *EPAS1* a diferentes tiempos y posteriormente con TPL, 125 nM durante 4 h. La disminución de cada proteína se determinó mediante análisis de Western blot y citometría de flujo. En el caso del lncRNA, *LOC730101*, se analizó la disminución por RT-PCR. El efecto sobre la viabilidad y proliferación celular se analizó por citometría de flujo. **(A)** Análisis del efecto del siRNA de *ID2*. **(B)** Análisis del efecto del siRNA de *CRY2*. **(C)** Análisis del efecto del siRNA de *HEXIM1*. **(D)** Análisis del efecto del siRNA de *EPAS1*. **(E)** Análisis del efecto del siRNA de *LOC730101*. La supervivencia y proliferación celular solo muestra el efecto de TPL después de la incubación del siRNA correspondiente a 72 h. Los análisis densitométricos se realizaron utilizando actina o *GAPDH* como control de carga en Western blot y RT-PCR respectivamente; la cuantificación relativa se indica debajo de cada gen y los datos se muestran como un ejemplo representativo de tres réplicas biológicas. Los gráficos muestran el promedio \pm DE (desviación estándar). **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$ prueba *t de student*.

7.7 El silenciamiento de *CDK7* y *XPD* induce preferencialmente muerte de células TAM

Ya que las células TAM son más sensibles que las NT al TPL y al THZ1, se analizó si afectar otra subunidad de TFIIH, diferente a XPB y CDK7, tiene un efecto similar en las células TAM. Para lograr esto, se utilizaron siRNAs contra el mRNA que codifica a la subunidad XPD, que es la otra helicasa de TFIIH. Como control positivo, se usaron siRNAs contra la subunidad de CDK7, que sabemos que al afectarla con THZ1 las células TAM fueron más sensibles. Se observó una reducción eficiente en los niveles de XPD por medio de los siRNAs en células TAM y NT (Figura 37A). Interesantemente, con la misma concentración de siRNAs, XPD fue reducido en tiempos más cortos en las células TAM que en las células NT. Este efecto no es debido a una introducción más eficiente de los siRNAs en las células TAM, ya que la cuantificación de la introducción de siRNAs fluorescentes mostró que en ambos tipos de células se internan con la misma eficiencia. Notablemente el efecto sobre la viabilidad celular fue más dramático en células TAM que en las NT (Figura 37B). De igual forma que en el caso de XPD, observamos que el knock-down de CDK7 también fue más severo en las células TAM (Figura 37C) las cuales fueron más sensibles a la reducción en los niveles de CDK7 (Figura 37D). Estos resultados indican que en este modelo de oncogénesis la reducción en los niveles de XPD y CDK7 mata preferentemente a las células TAM. La disminución más rápida en los niveles de XPD y CDK7 en las células TAM puede estar relacionada a su alto grado de proliferación que requiere un reciclaje de proteínas más acelerado.

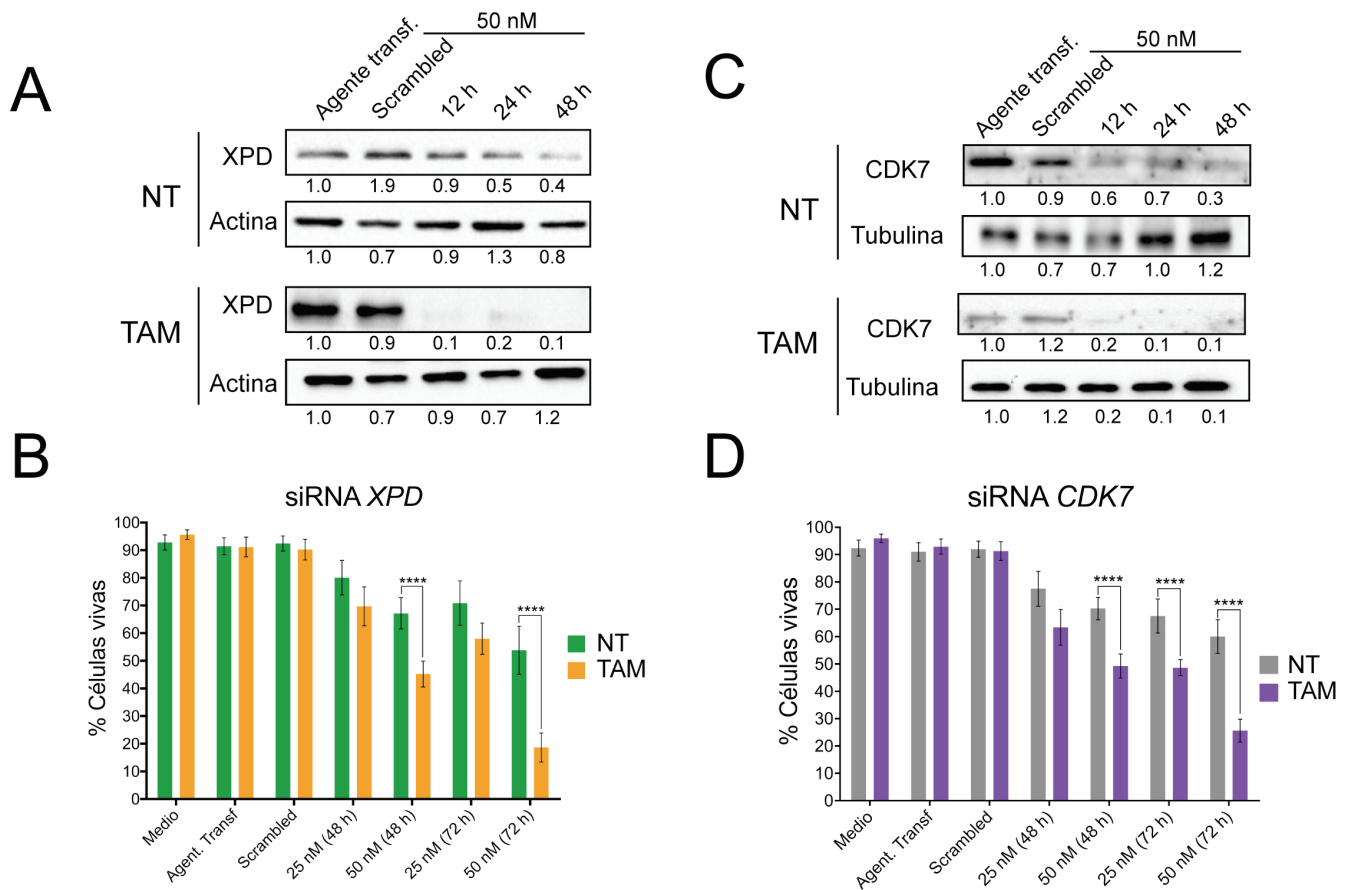


Figura 37. La reducción de los niveles de CDK7 y XPD mata preferentemente a las células TAM. Las células NT y TAM fueron incubadas con el siRNA correspondiente a diferentes tiempos, 12, 24 y 48 h. **(A)** Western blot de las células NT y TAM incubadas con el siRNA de *XPD*. Se pudo observar la disminución en los niveles de proteína en comparación con el Scrambled o con solo el Agente Transfectante (Agent. Transf.). **(B)** Ensayo de viabilidad de las células tratadas con el siRNA de *XPD*, las células NT en verde y las células TAM en naranja. **(C)** Western blot de células NT y células TAM incubadas con el siRNA de *CDK7*. **(D)** Ensayo de viabilidad de células NT (gris) y TAM (morado) tratadas con el siRNA de *CDK7*. En **(A)** y **(C)** se realizó densitometría usando como control de carga actina y tubulina respectivamente; la cuantificación relativa se indica debajo de cada WB y los datos se muestran como un ejemplo representativo de tres réplicas biológicas independientes. Los gráficos muestran el promedio \pm DE (desviación estándar) de al menos tres réplicas biológicas independientes. Análisis estadístico: Anova de dos vías, **** $P < 0.0001$.

7.8 Identificación de posibles nuevos inhibidores de TFIIH

Con base en los datos obtenidos nos interesó buscar moléculas pequeñas que interfirieran con las interacciones entre las diferentes subunidades de TFIIH. Para ello, se estableció una colaboración con la Dra. Laura Dueñas y su estudiante el Dr. Rodrigo Aguayo en la Facultad de Química de la UNAM, para realizar ensayos

de modelado computacional y encontrar *in silico* cuales pueden ser posibles moléculas que interfieran con las interacciones de las subunidades de TFIIH. La comprobación experimental de estos datos se está llevando a cabo en colaboración con la Dra. María del Pilar Valencia quien actualmente realiza una estancia posdoctoral en el laboratorio del Dr. Mario Zurita.

Es importante mencionar que para este estudio los análisis de modelado molecular usaron como base la estructura tridimensional del complejo TFIIH recientemente resuelta a una mayor resolución¹¹⁸. Para la construcción del modelo del heterodímero CDK7-CCNH se emplearon las estructuras cristalizadas. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de 500 ns de las subunidades. Estas simulaciones nos permitieron muestrear el panorama conformacional de las macromoléculas y se extrajeron de las simulaciones los conformeros que representan más del 90 % de las estructuras de la simulación para cada una de las subunidades. Se analizaron los sitios de interacción proteína-proteína y se realizó la predicción de sitios en donde la unión de un ligando pueda alterar o inhibir su interacción. Se recopiló la base de datos de fármacos aprobados por la FDA y se realizó un acoplamiento molecular ciego de los fármacos en los diferentes conformeros de las subunidades de TFIIH utilizando diversos programas. Se empleó el resultado de los tres programas para generar un resultado consenso, el cual permitió seleccionar a aquellos compuestos con mayor probabilidad de unión en las regiones que comprenden la interfaz proteína-proteína o en los potenciales sitios "*druggable*". Se evaluó, con dinámica molecular, la estabilidad y la energía libre de unión de los complejos proteína-ligando y se seleccionaron las moléculas con los resultados más prometedores para su posterior confirmación experimental (Ver sección anexa 12.2).

La aproximación experimental se está realizando mediante el sistema de *Split-GFP* tripartita que nos permite evaluar *in vivo*, moléculas que interfieran con interacciones de miembros de TFIIH. El ensayo se basa en la asociación de tres fragmentos de la proteína verde fluorescente (GFP): dos péptidos cortos, GFP10 (residuos 194-212) y GFP11 (residuos 213-233), cada uno unido a las proteínas

blanco y un fragmento detector grande, GFP1-9 (residuos 1-193). De esta forma, la interacción de las proteínas blanco reconstituye la fluorescencia de la GFP, de tal manera que cualquier molécula que impida dicha interacción, será evidenciada a través de la ausencia de fluorescencia.

Después de generar la línea estable que expresa el fragmento GFP1-9, se probaron las diferentes interacciones, hasta el momento contamos con las interacciones de: 10-p52/XPB-11, 10-p8/p52-11 y 10-CDK7/CYNH-11 (Figura 38).

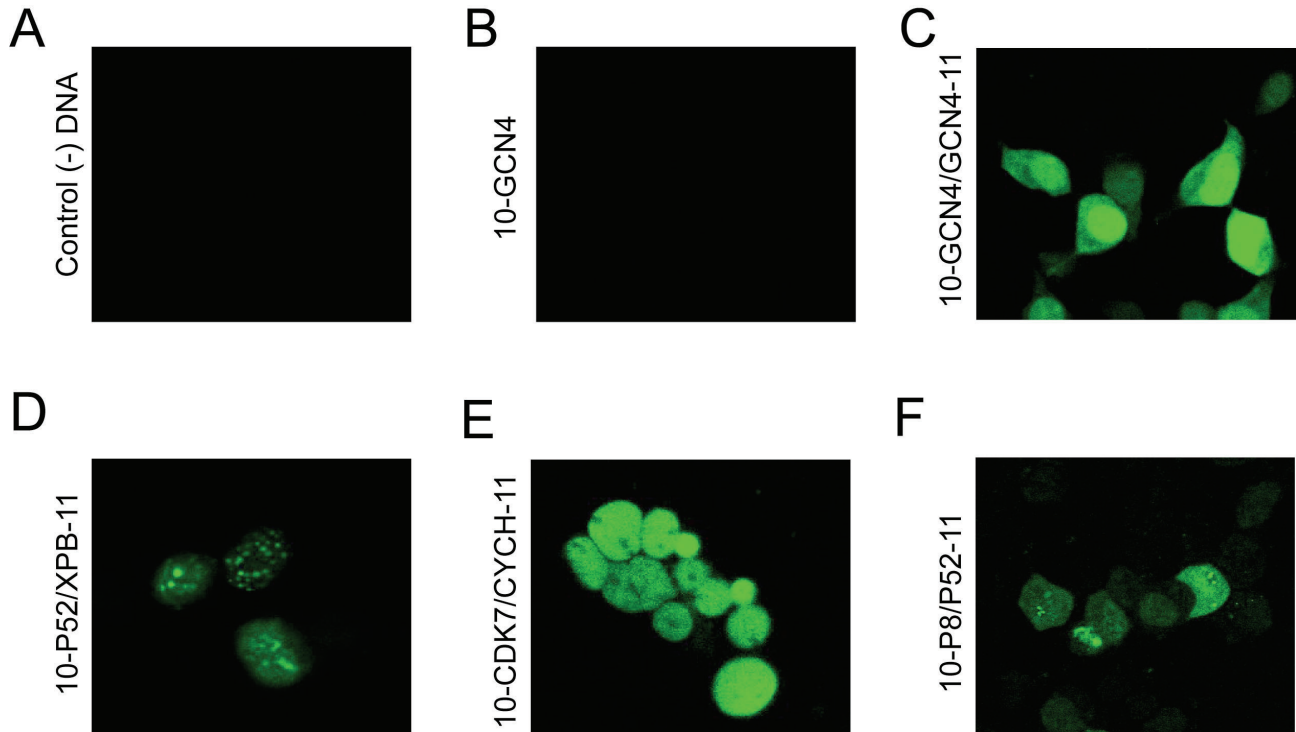


Figura 38. Ensayos de complementación de GFP. Se muestran imágenes representativas de al menos tres ensayos independientes de Split-GFP entre las diferentes interacciones de TFIIH. **(A)** Control negativo, sin DNA, **(B)** Células transfectadas con un solo plásmido: GFP10-GCN4, **(C)** Interacción usada como control positivo (GCN4), previamente reportado²⁶. **(D)** GFP10-p52/XPB-GFP11, **(E)** GFP10-CDK7/CYCH-GFP11 y **(F)** GFP10-p8/p52-GFP11 expresadas en células HEK-293 (GFP1-9).

De esta forma, el sistema Split-GFP permitirá evaluar los compuestos que ya han sido detectados a través del modelado *in silico* (Figura 38, Ver sección anexa 12.2).

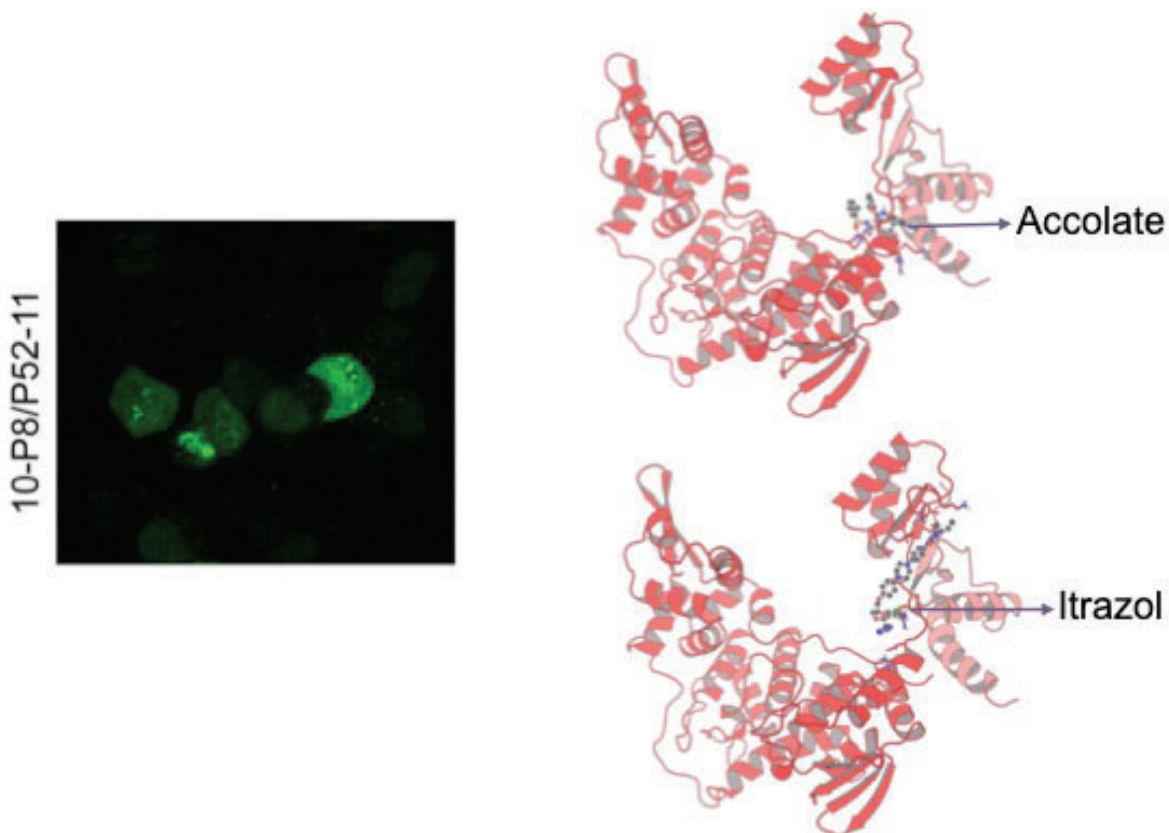


Figura 39. Ejemplos de fármacos que se unen a las interfases de interacción entre subunidades de TFIIH. Imagen donde se observa la estructura del accolate, un antagonista de los receptores de los leucotrienos el cual es usado en el tratamiento del asma bronquial. Y la estructura del itrazol, un derivado del imidazólico de última generación utilizado en medicina por sus propiedades antifúngicas. Ambas moléculas pueden interferir con las subunidades p8-p52 de TFIIH.

VIII. DISCUSIÓN

El uso de diferentes agentes físicos y químicos es aún el procedimiento más común para combatir a las células cancerosas. El mecanismo de acción de la quimioterapia mata a las células cancerosas y/o detiene su proliferación por medio de la inducción de una respuesta celular ligada al mecanismo de acción del fármaco. Moléculas como el THZ1 y TPL que afectan directamente las actividades de TFIIH tiene un alto potencial para el tratamiento del cáncer. En el presente trabajo, se realizó un análisis sistemático de estas dos moléculas, principalmente del TPL en la línea celular MCF10A-ErSrc. Los resultados sugieren que las células tumorales (TAM) son más sensibles al TPL y THZ1 que sus precursoras o parentales (NT) y que la combinación de ambas sustancias tiene un efecto sinérgico sobre la muerte celular. El hecho de que los niveles de las subunidades de TFIIH aumenten en las células TAM apoya la hipótesis ya descrita⁷⁰ de que las células cancerosas son adictas a altos niveles de transcripción. Así mismo, este antecedente indicó que este modelo de oncogénesis es adecuado para hacer los estudios comparativos entre las células NT y TAM tratadas con TPL y THZ1. De hecho, las células TAM son claramente más sensibles a TPL y THZ1 que las NT y que el TPL es más eficiente para matarlas en comparación con el THZ1.

Desde el punto de vista del mecanismo, se encontró que a pesar de que el TPL y THZ1 afectan directamente el inicio de la transcripción por la RNAPII de la mayoría de los genes, algunos de ellos son sobre-expresados como resultado del estrés transcripcional al que las células son sometidas con estas moléculas, abriendo la posibilidad de que estos genes sean blancos terapéuticos en conjunto con inhibidores de TFIIH para matar preferencialmente a células cancerosas.

En este modelo de oncogénesis ambas drogas: TPL y THZ1 mostraron que matan a las células vía apoptosis, paran la proliferación un ciclo de división antes en las células TAM y detiene a las células en la fase G₁. Como era de esperar, el co-tratamiento con TPL y THZ1 tiene un efecto sinérgico sobre la viabilidad celular. Interesantemente, la combinación de TPL (100 nM) y THZ1 (250 nM) mató

aproximadamente el 90% de las células TAM después de 48 h, sin embargo, más del 40% de las células NT fueron viables en las mismas condiciones. Esto indica que la inhibición simultánea de dos de las funciones de TFIIH, resulta en una reducción en la capacidad de las células cancerosas para sobrevivir. Estos resultados también sugieren que la aplicación simultánea de sustancias que afectan diferentes funciones de TFIIH, es una alternativa interesante para tratar al cáncer y abre la posibilidad de la búsqueda de nuevas drogas que afecten a otras subunidades de TFIIH, en particular porque el TPL es altamente hepatotóxico⁷.

La inhibición de la transcripción por TPL induce la degradación de la RNAPII por la vía del proteosoma^{56,56}. Se ha propuesto que TPL induce la degradación de la RNAPII después de la fosforilación de la subunidad grande de la RNAPII por CDK7⁵². Sin embargo, nosotros encontramos que TPL no solo induce la degradación de la RNAPII sino también posiblemente la degradación de XPB, p52, p8, pero no de otras subunidades de TFIIH. Esto contrasta con THZ1, que inhibe la actividad de CDK7, pero no tiene un efecto sobre la RNAPII o alguna de las subunidades de TFIIH.

Es conocido que la interacción de XPB con p52 y p8 modula su actividad ATPasa^{119,26}. La estructura recientemente resuelta del “core” de TFIIH muestra que la región N-terminal de XPB y el dominio llamado “clutch” de p52, tienen un doblamiento similar a partir del cual interaccionan. Esta interacción no es cercana al dominio ATPasa, sugiriendo que la regulación de la actividad ATPasa ocurre por medio de la interacción combinada de XPB, p52 y p8⁹⁸. De acuerdo a esto, los resultados sugieren que la unión covalente de TPL al dominio ATPasa de XPB desestabiliza su interacción con p52 y p8, afectando el ensamble de estas subunidades y provocando la posible degradación del submódulo XPB-p52-p8. Así mismo, el estudio computacional permitió proponer que la disociación del submódulo XPB-p52-p8 es principalmente causada por la separación de los dominios HD1-HD2 de XPB, inducida por la presencia de TPL en su interfase. Además, estos resultados sugieren que en el contexto de TFIIH, XPB, p52 y p8 forman un submódulo que es estable solo cuando las tres proteínas están juntas y

que su ausencia no afecta a otras proteínas. Esta idea es consistente con la conformación y organización del modelo descrito para la estructura del “core” de TFIID¹⁰⁰. Además estos datos también correlacionan con trabajos previos del grupo en *Drosophila* en el que mutantes en p52, presentan niveles reducidos de XPB y p8²⁶.

Interesantemente, como observamos en la reducción en los niveles de CDK7 y XPD por medio de siRNAs, la degradación de la RNAPII, así como del submódulo XPB-p52-p8 es mas rápida en las células TAM que en las NT incubadas con TPL. Por lo tanto, es posible que el mecanismo que incrementa la sensibilidad en células TAM es parcialmente debido al alto grado de proliferación de estas células, ya que en esta situación el recambio de estas proteínas no ocurre lo suficientemente rápido para compensar su reducción y por lo tanto el efecto negativo sobre la transcripción es aumentado.

Diferentes reportes que utilizan técnicas como GRO-seq y ChIP-seq han demostrado que el TPL tiene un efecto inmediato en el posicionamiento de la RNAPII sobre los promotores en el inicio de la transcripción en al menos el 90% de los genes^{26,72}. Sin embargo, estos estudios se han realizado en tiempos de incubación muy cortos y a concentraciones muy altas (10-500 μ M) de TPL, pero cuando los niveles de la RNAPII no han sido afectados. El análisis del transcriptoma fue realizado en células NT y TAM bajo condiciones en las que hay una disminución de la RNAPII, sin tener un efecto grave de la viabilidad celular. Bajo estas condiciones, los niveles de la mayoría de los transcritos no fueron afectados, aunque también los niveles de muchos transcritos fueron reducidos y de manera importante un número significativo de genes fueron regulados positivamente. Interesantemente, el incremento específico de los transcritos como respuesta al tratamiento con TPL, también ocurre en otras líneas celulares de cáncer de mama. En similitud con nuestros resultados, se ha documentado que la radiación UV causa la degradación de la RNAPII, pero con la RNAPII restante, la célula sobre expresa genes específicos como respuesta a este insulto¹²⁰. Una situación similar puede estar operando como respuesta a TPL.

En apoyo a que hay una inducción específica de genes como respuesta al estrés transcripcional, los resultados del ChIP-seq muestran que hay una correlación entre el aumento en varios transcritos y la presencia de la RNAPII en los promotores de estos genes, así como en los cuerpos de estos y qRT-PCR de secuencias intrónicas confirmó que es debido a un aumento de la transcripción. Esto está respaldado por el hecho de que los productos proteicos correspondientes de los genes analizados también aumentan después del tratamiento con TPL. Como ha sido reportado para otras drogas utilizadas en quimioterapia, los resultados sugieren que a pesar de que el TPL inhibe el inicio de la transcripción por la RNAPII, el estrés transcripcional causado por el TPL genera una respuesta a nivel genético, suprimiendo la expresión de algunos genes, pero aumentando la transcripción de otros. Una explicación a este fenómeno puede ser como ha sido reportado recientemente¹²¹ que el TPL inhibe la transcripción por la interacción con XPB, pero que cuando XPB no está presente, entonces la transcripción no es inhibida. En apoyo de esta hipótesis, encontramos que el TPL induce la degradación del submódulo XPB-p52-p8. Sin embargo, esta hipótesis no se sostiene ya que los resultados muestran un aumento en la transcripción de genes específicos. Además, también se encontró que muchos de los genes que son sobre-activados por el TPL, también lo son como respuesta al THZ1, que inhibe a CDK7, pero no afecta los niveles de la RNAPII, ni de las subunidades de TFIIH. Aun más interesante es que uno de los genes que son sobre-expresados corresponde al que codifica para la subunidad grande de la RNAPII, la cual es parcialmente degradada por la acción del TPL, sugiriendo un mecanismo de retroalimentación para mantener los niveles de esta enzima. Por lo tanto, los datos muestran que existe un mecanismo de activación de la transcripción como respuesta al estrés transcripcional causado por TPL y THZ1.

El TPL es una sustancia altamente efectiva para matar células cancerosas y algunos compuestos relacionados se encuentran actualmente en fases clínicas. Sin embargo, un problema con el uso de TPL en pacientes es que es altamente tóxico y los efectos inespecíficos no pueden ser ignorados^{122,123}. Por lo tanto, el encontrar nuevos blancos que aumenten el efecto del TPL a concentraciones

bajas es muy atractivo. En este trabajo, se analizaron solo 5 genes de muchos otros posibles blancos que son sobre-expresados como respuesta al TPL. La reducción de *ID2*, *HEXIM1* y *CRY2*, aumentó la sensibilidad de células NT y TAM a dosis bajas de TPL, siendo las células TAM las más sensibles. Aún más, solo en las células TAM, la progresión del ciclo celular fue afectada. De manera interesante el lncRNA *LOC730101* parece ser esencial para la línea MCF10A-ErSrc, además de que la reducción en sus niveles amplifica el efecto del TPL. De manera sorprendente, la reducción de *EPAS1 (HIF-2A)*, gen que es sobre-expresado en muchos tumores, no mejoró significativamente el efecto de TPL en células NT y TAM, en términos de la viabilidad en las condiciones analizadas, aunque si afecta la proliferación celular. Estos resultados sugieren que otros productos génicos que son sobre-expresados en respuesta a TPL, pueden aumentar el efecto anti-tumoral de esta sustancia.

Aunque el tratamiento con TPL a dosis altas eventualmente mata a todas las células TAM, las circunstancias pueden ser diferentes en condiciones *in vivo* y es posible que muchas de las células cancerosas en un tumor estén expuestas a concentraciones más bajas de TPL, permitiendo que estas respondan al estrés transcripcional, sobre-expresando los genes que reportamos. Esta respuesta génica es relevante para el tratamiento de tumores por TPL, THZ1 y sus derivados y mucho más considerando que algunos de los genes que son sobre activados promueven la tumorigénesis y/o la metástasis.

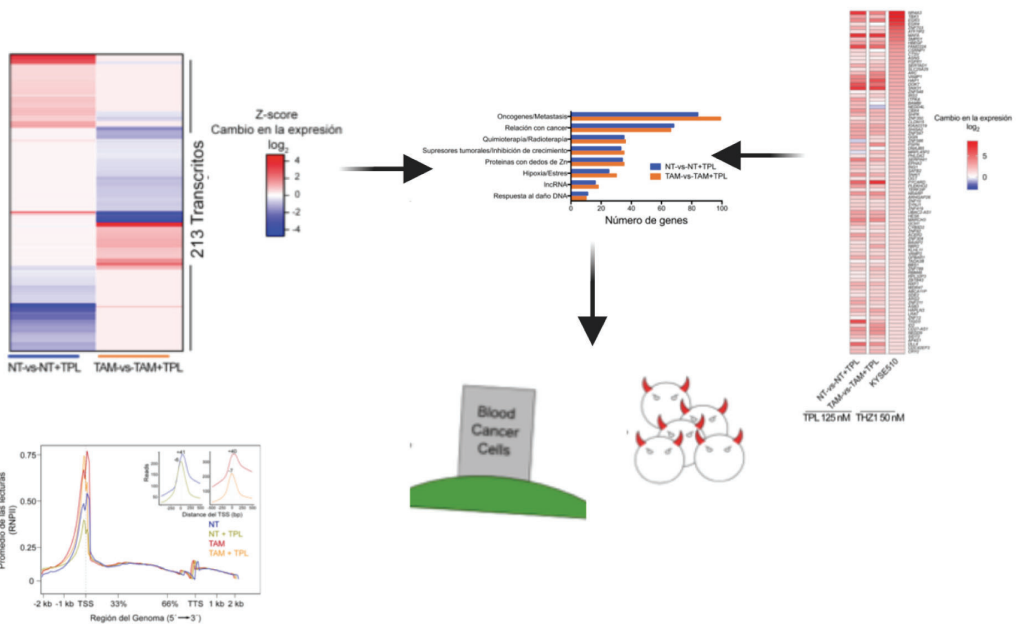
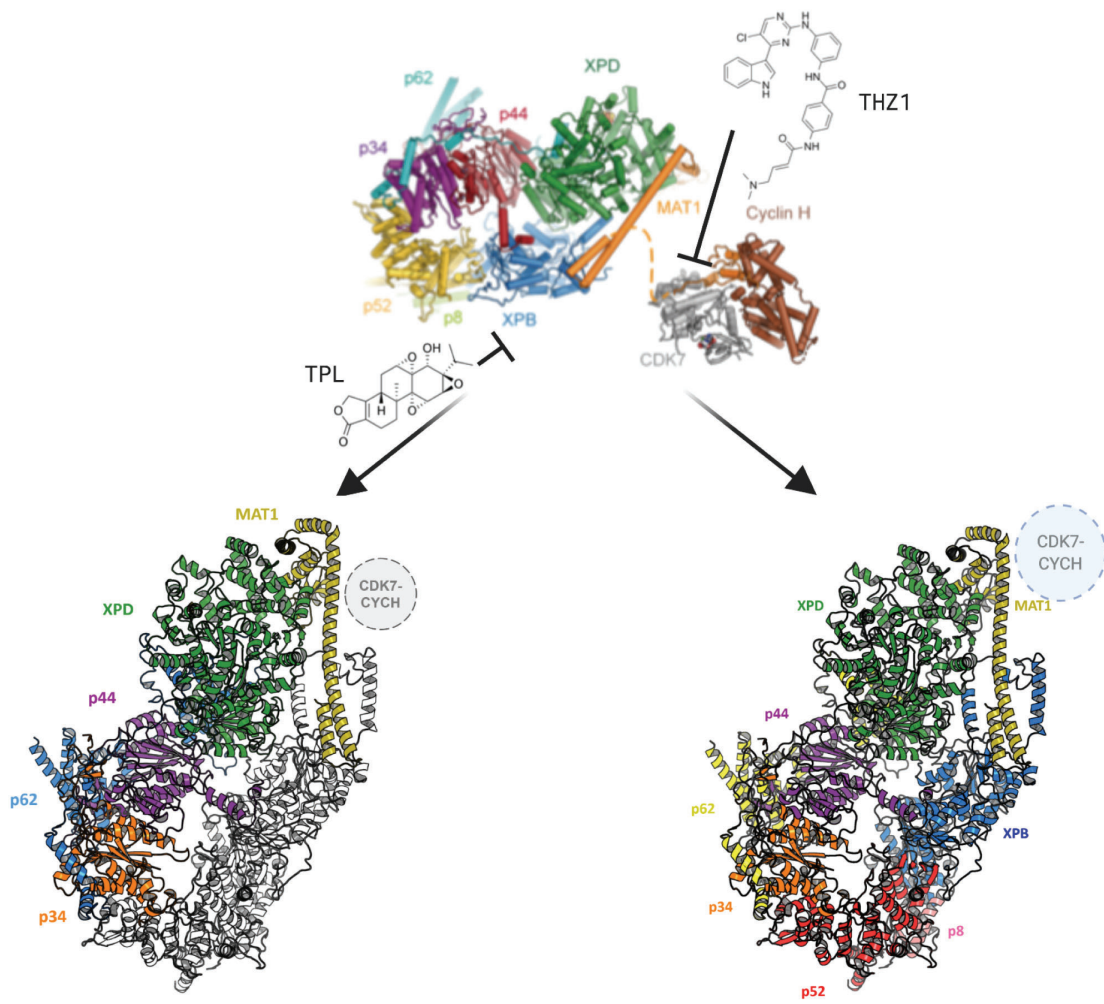


Figura 40. Modelo propuesto de cómo afecta la integridad del complejo de TFIIH el uso del TPL y THZ1. Cuando las células son tratadas con TPL, este afecta la integridad de TFIIH, ya que provoca la disminución del submódulo XPB-p52-p8, probablemente provocando su degradación. Sin embargo cuando las células son tratadas con THZ1 la integridad del complejo no se ve afectada. Pero al tratar a las células con cualquiera de estas dos moléculas se activan e inactivan diferentes tipos de genes, que pueden ayudar a sobrevivir o provocar la muerte en la célula.

Con todo lo anterior mencionado, TFIIH se convierte en un blanco muy atractivo contra el cáncer, por eso se plantea que con la estrategia del sistema de complementación de Split-GFP podamos encontrar al menos una molécula nueva que sea capaz de interferir con alguna de las interacciones de las subunidades de TFIIH y poder utilizarla en combinación con el TPL o THZ1.

IX. CONCLUSIÓN

- ✓ Las células tratadas con tamoxifeno son más sensibles a THZ1 y TPL. THZ1 y el TPL pueden actuar sinérgicamente, matando preferencialmente a las células TAM.
- ✓ El modulo XPB-p52-p8 de TFIIH es afectado fuertemente por el tratamiento con TPL y de manera más severa en las células TAM.
- ✓ El efecto del TPL sobre el transcriptoma de células NT y TAM afecta los niveles de alrededor del 13-14% de los transcritos. Se encontraron transcritos que bajan sus niveles, sin embargo, hay un número importante de transcritos que aumentan sus niveles.
- ✓ Al igual que trabajos previos, se puede observar una disminución en los niveles de la RNAPII pausada en los promotores y un incremento en la acumulación de la RNAPII pre-pausada o puesta sobre el promotor por el tratamiento con TPL. Sin embargo en las condiciones analizadas en este trabajo, también se observa la persistencia de la RNAPII pausada en promotores de transcritos que aumentan como respuesta al TPL. Esto indica que a pesar de que hay una reducción significativa de los niveles de la RNAPII, hay una respuesta al TPL por las células incrementando la transcripción de un poco más de 200 genes en células NT y TAM. Algunos de estos genes también se sobre-expresan en respuesta a THZ1.
- ✓ La reducción de los mRNA de algunos genes que se sobre activan como respuesta al TPL, potencia el efecto del TPL.
- ✓ La reducción de *XPD* y *CDK7* usando siRNAs también afecta preferencialmente a las células TAM.
- ✓ Se logró establecer el protocolo para evaluar posibles interacciones entre dos proteínas (*Split-GFP*), para posteriormente poder evaluar compuestos que interfieran con la interfase de la interacción de dos de las subunidades de TFIIH.

X. PERSPECTIVAS

- Evaluar si los fármacos seleccionados mediante el modelado molecular interfieren con alguna de las interacciones entre dos de las subunidades de TFIID.
- Determinar si la activación de los genes que sobre-expresan por el tratamiento con TPL/THZ1 también se observa en líneas celulares diferentes a cáncer de mama, modelos 3D y/o en modelos *in vitro* de metástasis.
- Analizar si el efecto de la sobre expresión de estos genes es una respuesta más general o específicos de TPL o TFIID, es decir, probar si estos genes se sobreactivan por otros tipos de estrés como: *heat shock*, exposición a otras moléculas o a luz UV.
- Para algunos de los genes sobre-expresados ya se cuentan con los inhibidores específicos, por lo tanto, se plantea analizar el efecto del inhibidor más el TPL para ver si las células TAM son más susceptibles.
- Analizar genes y/o regiones del genoma que se sobre activen, ya que pueden estar involucrados en la respuesta del estrés transcripcional.

XI. BIBLIOGRAFIA

- 1 Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 235–71.
- 2 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–674.
- 3 Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med* 2016; **8**: 69-90.
- 4 Luo M, Brooks M, Wicha M. Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Breast Cancer Stem Cells: Implications for Metastasis and Therapeutic Resistance. *Curr Pharm Des* 2015; **21**: 1301–1310.
- 5 Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 2014; **25**: 304–317.
- 6 Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; **324**: 1029–1033.
- 7 Bradner JE, Hnisz D, Young RA. Review Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell* 2017; **168**: 629–643.
- 8 Chen FX, Smith ER, Shilatifard A. Born to run: Control of transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; **19**: 464–478.
- 9 Drygin D, Rice WG, Grummt I. The RNA Polymerase I Transcription Machinery: An Emerging Target for the Treatment of Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; **50**: 131–156.
- 10 Zheng Y, Levens D. Tuning the MYC response. *Elife* 2016; **5**: 188-191.
- 11 Mendillo ML, Santagata S, Koeva M, Bell GW, Hu R, Tamimi RM *et al*. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell* 2012; **150**: 549–562.
- 12 Koumenis C, Giaccia A. Transformed cells require continuous activity of RNA polymerase II to resist oncogene-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 7306–7316.
- 13 Han Y, He Y. Eukaryotic transcription initiation machinery visualized at

- molecular level. *Transcription* 2016; **7**: 203–208.
- 14 Schilbach S, Hantsche M, Tegunov D, Dienemann C, Wigge C, Urlaub H *et al.* Structures of transcription pre-initiation complex with TFIID and Mediator. *Nature* 2017; **551**: 204-208
 - 15 He Y, Fang J, Taatjes DJ, Nogales E. Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature* 2013; **495**: 481–486.
 - 16 Han Y, Yan C, Fishbain S, Ivanov I, He Y. Structural visualization of RNA polymerase III transcription machineries. *Cell Discov* 2018; **4**: 4:40
 - 17 Adelman K, Lis JT. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet* 2012; **13**: 720–731.
 - 18 Liu X, Kraus WL, Bai X. Ready, pause, go: Regulation of RNA polymerase II pausing and release by cellular signaling pathways. *Trends Biochem Sci* 2015; **40**: 516–525.
 - 19 Kwak H, Lis JT. Control of Transcriptional Elongation. *Annu Rev Genet* 2013; **47**: 483–508.
 - 20 Vos SM, Farnung L, Boehning M, Wigge C, Linden A, Urlaub H *et al.* Structure of activated transcription complex Pol II–DSIF–PAF–SPT6. *Nature* 2018; **560**: 607–612.
 - 21 Zaborowska J, Egloff S, Murphy S. The pol II CTD: New twists in the tail. *Nat Struct Mol Biol* 2016; **23**: 771–777.
 - 22 Jonkers I, Lis JT. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; **16**: 167–177.
 - 23 Bowman EA, Kelly WG. RNA Polymerase II transcription elongation and Pol II CTD Ser2 phosphorylation: A tail of two kinases. *Nucl (United States)* 2014; **5**: 29-47.
 - 24 Rimel JK, Taatjes DJ. The essential and multifunctional TFIID complex. 2018; **27**: 1018–1037.
 - 25 Greber BJ, Nguyen THD, Fang J, Afonine P V., Adams PD, Nogales E. The cryo-electron microscopy structure of human transcription factor IID. *Nature* 2017; **9**: 98-106.
 - 26 Greber BJ, Toso DB, Fang J, Nogales E. The complete structure of the

- human TFIIH core complex. *Elife* 2019; **8**: 1–29.
- 27 Greber BJ, Perez-bertoldi JM, Lim K, Iavarone AT, Toso DB. The cryo-electron microscopy structure of the human CDK-activating kinase. 2020; **9**: 1–30.
- 28 Luo J, Cimermancic P, Viswanath S, Ebmeier CC, Kim B, Dehecq M *et al.* Architecture of the Human and Yeast General Transcription and DNA Repair Factor TFIIH. *Mol Cell* 2015; **59**: 794–806.
- 29 Compe E, Egly J-M. Nucleotide Excision Repair and Transcriptional Regulation: TFIIH and Beyond. *Annu Rev Biochem* 2016; **85**: 265–290.
- 30 Compe E, Egly JM. TFIIH: When transcription met DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 343–354.
- 31 Dienemann C, Schwalb B, Schilbach S, Cramer P. Promoter Distortion and Opening in the RNA Polymerase II Cleft. *Mol Cell* 2019; **73**: 97-106.e4.
- 32 Larochelle S, Amat R, Glover-Cutter K, Sansó M, Zhang C, Allen JJ *et al.* Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* 2012; **19**: 1108–1115.
- 33 Fisher RP. Cdk7: a kinase at the core of transcription and in the crosshairs of cancer drug discovery. *Transcription* 2019; **10**: 47–56.
- 34 Nilson KA, Guo J, Turek ME, Brogie JE, Delaney E, Luse DS *et al.* THZ1 Reveals Roles for Cdk7 in Co-transcriptional Capping and Pausing. *Mol Cell* 2015; **59**: 576–587.
- 35 Takagi Y, Masuda CA, Chang WH, Komori H, Wang D, Hunter T *et al.* Ubiquitin ligase activity of TFIIH and the transcriptional response to DNA damage. *Mol Cell* 2005; **18**: 237–243.
- 36 Ito S, Tan LJ, Andoh D, Narita T, Seki M, Hirano Y *et al.* MMXD, a TFIIH-Independent XPD-MMS19 Protein Complex Involved in Chromosome Segregation. *Mol Cell* 2010; **39**: 632–640.
- 37 Long JJ, Leresche A, Kriwacki RW, Gottesfeld JM. Repression of TFIIH Transcriptional Activity and TFIIH-Associated cdk7 Kinase Activity at Mitosis. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 1467–1476.
- 38 Rickert P, Corden JL, Lees E. Cyclin C/CDK8 and cyclin H/CDK7/p36 are

- biochemically distinct CTD kinases. *Oncogene* 1999; **18**: 1093–1102.
- 39 Dubois MF, Nguyen VT, Bellier S, Bensaude O. Inhibitors of transcription such as 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole and isoquinoline sulfonamide derivatives (H-8 and H-7*) promote dephosphorylation of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II largest subunit. *J Biol Chem* 1994; **269**: 13331–13336.
- 40 DePinto W, Chu XJ, Smith M, Packman K, Goelzer P, Lovey A *et al.* In vitro and in vivo activity of R547: A potent selective cyclin-dependent kinase inhibitor currently in phase I clinical trials. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 2644–2658.
- 41 Stellrecht CM, Chen LS. Transcription inhibition as a therapeutic target for cancer. *Cancers (Basel)* 2011; **3**: 4170–4190.
- 42 Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, Hein N, Peck A, Cullinane C *et al.* Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53. *Cancer Cell* 2012; **22**: 51–65.
- 43 Villicaña C, Cruz G, Zurita M. The basal transcription machinery as a target for cancer therapy. *Cancer Cell Int* 2014; **14**:17-28.
- 44 Bensaude O. Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription* 2011; **2**: 103–108.
- 45 Peltonen K, Colis L, Liu H, Trivedi R, Moubarek MS, Moore HM *et al.* A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell* 2014; **25**: 77–90.
- 46 Fong CY, Gilan O, Lam EYN, Rubin AF, Ftouni S, Tyler D *et al.* BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells. *Nature* 2015; **525**: 538–542.
- 47 Qi J. Bromodomain and extraterminal domain inhibitors (BETi) for cancer therapy: Chemical modulation of chromatin structure. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; **6**:62-83.
- 48 Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; **468**: 1067–1073.
- 49 Yan P, Sun X. Triptolide: A new star for treating human malignancies. *J Cancer Res Ther* 2018; **14**: 271.

- 50 Lange BM, Fishedick JT, Lange MF, Srividya N, Šamec D, Poirier BC. Integrative approaches for the identification and localization of specialized metabolites in Tripterygium roots. *Plant Physiol* 2017; **173**: 456–469.
- 51 Vispe S, DeVries L, Creancier L, Besse J, Breand S, Hobson DJ *et al.* Triptolide is an inhibitor of RNA polymerase I and II-dependent transcription leading predominantly to down-regulation of short-lived mRNA. *Mol Cancer Ther* 2009; **8**: 2780–2790.
- 52 Wang Y, Lu J jian, He L, Yu Q. Triptolide (TPL) inhibits global transcription by inducing proteasome-dependent degradation of RNA polymerase II (Pol II). *PLoS One* 2011; **6**: 13-23.
- 53 Titov D V., Gilman B, He QL, Bhat S, Low WK, Dang Y *et al.* XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nat Chem Biol* 2011; **7**: 182–188.
- 54 He QL, Titov D V., Li J, Tan M, Ye Z, Zhao Y *et al.* Covalent modification of a cysteine residue in the XPB subunit of the general transcription factor TFIIH through single epoxide cleavage of the transcription inhibitor triptolide. *Angew Chemie - Int Ed* 2015; **10**: 14-17.
- 55 Noel P, Von Hoff DD, Saluja AK, Velagapudi M, Borazanci E, Han H. Triptolide and Its Derivatives as Cancer Therapies. *Trends Pharmacol Sci* 2019; **40**: 327–341.
- 56 Song W, Liu M, Wu J, Zhai H, Chen Y, Peng Z. Preclinical Pharmacokinetics of Triptolide: A Potential Antitumor Drug. *Curr Drug Metab* 2018; **21**: 66-81.
- 57 Giri B, Gupta VK, Yaffe B, Modi S, Roy P, Sethi V *et al.* Pre-clinical evaluation of Minnelide as a therapy for acute myeloid leukemia. *J Transl Med* 2019; **17**: 1–9.
- 58 A Phase II, International Open Label Trial of Minnelide™ in Patients With Refractory Pancreatic Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03117920> (accessed 29 Jan2020).
- 59 Christensen CL, Kwiatkowski N, Abraham BJ, Carretero J, Al-Shahrour F, Zhang T *et al.* Targeting Transcriptional Addictions in Small Cell Lung Cancer with a Covalent CDK7 Inhibitor. *Cancer Cell* 2014; **26**: 909–922.

- 60 Kwiatkowski N, Zhang T, Rahl PB, Abraham BJ, Reddy J, Ficarro SB *et al.* Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* 2014; **511**: 616–620.
- 61 Zeng M, Kwiatkowski NP, Zhang T, Nabet B, Xu M, Liang Y *et al.* Targeting MYC dependency in ovarian cancer through inhibition of CDK7 and CDK12/13. *Elife* 2018; **7**: 1–20.
- 62 Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Brenz R, Russo J, Pauley RJ *et al.* Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Res* 1990; **50**: 6075–6086.
- 63 Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An Epigenetic Switch Involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell* 2009; **139**: 693–706.
- 64 Endo A, Ly T, Pippa R, Bensaddek D, Nicolas A, Lamond AI. The Chromatin Assembly Factor Complex 1 (CAF1) and 5-Azacytidine (5-AzaC) Affect Cell Motility in Src-transformed Human Epithelial Cells * Edited by Joel Gottesfeld. 2017; **292**: 172–184.
- 65 Drost J, Agami R. Transformation Locked in a Loop. *Cell* 2009; **139**: 654–656.
- 66 Fleming JD, Giresi PG, Lindahl-Allen M, Krall EB, Lieb JD, Struhl K. STAT3 acts through pre-existing nucleosome-depleted regions bound by FOS during an epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Epigenetics and Chromatin* 2015; **8**: 1–14.
- 67 Ji Z, He L, Regev A, Struhl K. Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- κ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; **116**: 9453–9462.
- 68 Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 2003; **30**: 256–268.
- 69 Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006; **10**: 515–527.

- 70 Cabantous S, Nguyen HB, Pedelacq JD, Koraïchi F, Chaudhary A, Ganguly K *et al.* A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci Rep* 2013; **3**: 1–9.
- 71 Gurrion C, Uriostegui M, Zurita M. Heterochromatin reduction correlates with the increase of the KDM4B and KDM6A demethylases and the expression of pericentromeric DNA during the acquisition of a transformed phenotype. *J Cancer* 2017; **8**: 2866–2875.
- 72 Cruz-Becerra G, Juárez M, Valadez-Graham V, Zurita M. Analysis of *Drosophila* p8 and p52 mutants reveals distinct roles for the maintenance of TFIIH stability and male germ cell differentiation. *Open Biol* 2016; **6**: 16-22.
- 73 Holmes KL, Otten G, Yokoyama WM. Flow Cytometry Analysis Using the Becton Dickinson FACS Calibur. 2001; **30**: 1–22.
- 74 Chou TC TP. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzym Regul* 1984; **22**: 27–55.
- 75 Chou T. Theoretical Basis , Experimental Design , and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. 2007; **124**: 3-10.
- 76 Chou T. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. 2010; **70**: 440–447.
- 77 Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. 2009; **10**: 10-25.
- 78 Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows – Wheeler transform. 2009; **25**: 1754–1760.
- 79 Li B, Dewey CN. RSEM : accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. 2011.
- 80 Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Stat* 2001; **29**: 1165–1188.
- 81 McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic*

- Acids Res* 2012; **40**: 4288–4297.
- 82 Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014; **15**: 1–21.
- 83 Cruz-Becerra G, Valerio-Cabrera S, Juárez M, Bucio-Mendez A, Zurita M. TFIIH is highly dynamic during zygotic genome activation in *Drosophila* and its depletion causes catastrophic mitosis. *J Cell Sci* 2018; **21**: 16–31.
- 84 Li R, Yu C, Li Y, Lam T, Yiu S, Kristiansen K *et al.* SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. 2009; **25**: 1966–1967.
- 85 Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE *et al.* Open Access Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). 2008; **86**: 9–13.
- 86 Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P *et al.* Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol Cell* 2010; **38**: 576–589.
- 87 Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comput Chem* 2009; **30**: 2785–2791.
- 88 Bianco G, Forli S, Goodsell DS, Olson AJ. Covalent docking using autodock: Two-point attractor and flexible side chain methods. *Protein Sci* 2016; **25**: 295–301.
- 89 Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO *et al.* Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 2010; **78**: 1950–1958.
- 90 Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 2015; **1–2**: 19–25.
- 91 Webb B, Sali A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Bioinforma* 2014; **47**: 5.6.1–5.6.32.
- 92 Best RB, Zhu X, Shim J, Lopes PEM, Mittal J, Feig M *et al.* Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone phi, psi and Side-Chain chi(1) and chi(2) Dihedral

- Angles. *J Chem Theory Comput* 2012; **8**: 3257–3273.
- 93 Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad, Erin S, Coleman RG. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J Chem Inf Model* 2012; **52**: 1757–1768.
- 94 National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. 2017.
- 95 Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem* 2009; **31**: 455–461.
- 96 Kuehner JN, Kaufman JW, Moore C. Stimulation of RNA Polymerase II ubiquitination and degradation by yeast mRNA 3'-end processing factors is a conserved DNA damage response in eukaryotes. *DNA Repair (Amst)* 2017; **57**: 151–160.
- 97 Wilson MD, Harreman M, Svejstrup JQ. Ubiquitylation and degradation of elongating RNA polymerase II: The last resort. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 2013; **1829**: 151–157.
- 98 Fregoso M, Laine J-P, Aguilar-Fuentes J, Mocquet V, Reynaud E, Coin F *et al.* DNA Repair and Transcriptional Deficiencies Caused by Mutations in the Drosophila p52 Subunit of TFIIH Generate Developmental Defects and Chromosome Fragility. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 3640–3650.
- 99 Coin F, Oksenysh V, Egly JM. Distinct Roles for the XPB/p52 and XPD/p44 Subcomplexes of TFIIH in Damaged DNA Opening during Nucleotide Excision Repair. *Mol Cell* 2007; **26**: 245–256.
- 100 Kainov DE, Vitorino M, Cavarelli J, Poterszman A, Egly JM. Structural basis for group A trichothiodystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 2008; **15**: 980–984.
- 101 Ji Z, He L, Rotem A, Janzer A, Cheng CS, Regev A *et al.* Genome-scale identification of transcription factors that mediate an inflammatory network during breast cellular transformation. *Nat Commun* 2018; **9**: 18-44.
- 102 Krebs AR, Imanci D, Hoerner L, Gaidatzis D, Burger L, Schübeler D. Genome-wide Single-Molecule Footprinting Reveals High RNA Polymerase II Turnover at Paused Promoters. *Mol Cell* 2017; **67**: 411-422.e4.

- 103 Chen F, Gao X, Shilatifard A, Shilatifard A. Stably paused genes revealed through inhibition of transcription initiation by the TFIIH inhibitor triptolide. *Genes Dev* 2015; **29**: 39–47.
- 104 Erickson B, Sheridan RM, Cortazar M, Bentley DL. Dynamic turnover of paused pol II complexes at human promoters. *Genes Dev* 2018; **32**: 1215–1225.
- 105 Hurst DR, Xie Y, Vaidya KS, Mehta A, Moore BP, Accavitti-Loper MA *et al.* Alterations of BRMS1-ARID4A interaction modify gene expression but still suppress metastasis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008; **283**: 7438–7444.
- 106 Solimini NL, Liang AC, Xu C, Pavlova NN, Xu Q, Davoli T *et al.* STOP gene Phacr4 is a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci* 2013; **110**: E407–E414.
- 107 Jiang B, Chen W, Qin H, Diao W, Li B, Cao W *et al.* TOX3 inhibits cancer cell migration and invasion via transcriptional regulation of SNAI1 and SNAI2 in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 2019; **449**: 76–86.
- 108 Ju W, Yoo BC, Kim I-J, Kim JW, Kim SC, Lee HP. Identification of Genes With Differential Expression in Chemoresistant Epithelial Ovarian Cancer Using High-Density Oligonucleotide Microarrays. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* 2009; **37**: 78-99.
- 109 Jung HY, Fattet L, Tsai JH, Kajimoto T, Chang Q, Newton AC *et al.* Apical–basal polarity inhibits epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis by PAR-complex-mediated SNAI1 degradation. *Nat Cell Biol* 2019; **21**: 359–371.
- 110 Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, Yoshimaru T, Daizumoto K, Sone S *et al.* Early growth response 4 is involved in cell proliferation of Small cell lung cancer through transcriptional activation of its downstream genes. *PLoS One* 2014; **9**: 36-69.
- 111 Lee H, Goodarzi H, Tavazoie SF, Alarcón CR. TMEM2 Is a SOX4-regulated gene that mediates metastatic migration and invasion in breast cancer. *Cancer Res* 2016; **76**: 4994–5005.
- 112 Zeng S, Zhang Y, Ma J, Deng G, Qu Y, Guo C *et al.* BMP4 promotes

- metastasis of hepatocellular carcinoma by an induction of epithelial–mesenchymal transition via upregulating ID2. *Cancer Lett* 2017; **390**: 67–76.
- 113 Huber AL, Papp SJ, Chan AB, Henriksson E, Jordan SD, Kriebs A *et al*. CRY2 and FBXL3 Cooperatively Degrade c-MYC. *Mol Cell* 2016; **64**: 774–789.
- 114 Li S, Hu K, Chen S, Liu S, Wang Y. High expression of long non-coding RNA LOC730101 correlates with distant metastasis and exhibits a poor prognosis in patients with osteosarcoma. 2018; **67**: 4115–4120.
- 115 Ketchart W, Ogba N, Kresak A, Albert JM, Pink JJ, Montano MM. HEXIM1 is a critical determinant of the response to tamoxifen. *Oncogene* 2011; **30**: 3563–3569.
- 116 Bowry A, Piberger AL, Rojas P, Saponaro M, Petermann E. BET Inhibition Induces HEXIM1- and RAD51- Dependent Conflicts between Transcription and Replication. *CellReports* 2018; **25**: 2061-2069.e4.
- 117 Zhang Q, Lou Y, Zhang J, Fu Q, Wei T, Sun X *et al*. Hypoxia-inducible factor-2 α promotes tumor progression and has crosstalk with Wnt/ β -catenin signaling in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2017; **16**: 1–14.
- 118 Jiang YY, Lin DC, Mayakonda A, Hazawa M, Ding LW, Chien WW *et al*. Targeting super-enhancer-Associated oncogenes in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut* 2017; **66**: 1358–1368.
- 119 Manzo SG, Zhou ZL, Wang YQ, Marinello J, He JX, Li YC *et al*. Natural product triptolide mediates cancer cell death by triggering CDK7-dependent degradation of RNA polymerase II. *Cancer Res* 2012; **72**: 5363–5373.
- 120 Henriques T, Gilchrist DA, Nechaev S, Bern M, Muse GW, Burkholder A *et al*. Stable pausing by RNA polymerase II provides an opportunity to target and integrate regulatory signals. *Mol Cell* 2013; **52**: 517–28.
- 121 Jonkers I, Kwak H, Lis JT. Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *Elife* 2014; **3**: 1–25.
- 122 Williamson L, Saponaro M, Boeing S, East P, Mitter R, Kantidakis T *et al*. UV Irradiation Induces a Non-coding RNA that Functionally Opposes the Protein

Encoded by the Same Gene. *Cell* 2017; **168**: 843-855.e13.

- 123 Alekseev S, Nagy Z, Sandoz J, Weiss A, Egly JM, Le May N *et al.* Transcription without XPB Establishes a Unified Helicase-Independent Mechanism of Promoter Opening in Eukaryotic Gene Expression. *Mol Cell* 2017; **65**: 504-514.e4.

XII. ANEXOS

12.1 ANÁLISIS DE CALIDAD Y LECTURAS MAPEADAS DE LOS EXPERIMENTOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

A continuación se muestran los resultados de los análisis de calidad y las lecturas mapeadas para los experimentos de secuenciación masiva

12.1.1 RNA-seq

En el proyecto denominado HUMpljN en la compañía BGI se secuenciaron 8 muestras. Se generaron un promedio de 22,918,284 lecturas de secuenciación sin procesar y luego de realizar las limpieza (lecturas de baja calidad) se obtuvieron 22,872,535. La Tabla 1 se resume brevemente la información de secuenciación de los datos, también se presenta el porcentaje mapeado contra el genoma de referencia (hg19) y el análisis de calidad para cada muestra.

Tabla 1. Resumen de los datos de secuenciación, alineación y calidad de cada muestra para el RNA-seq

Muestra	Raw Data Size (bp)	Raw Reads Number	Clean Data Size (bp)	Clean Reads Number	Total Mapped Reads (%)	Clean Read1 Q20(%) >= 95	Clean Read1 Q30(%) >= 90
NT-1	1,123,030,118	22,918,982	1,121,802,031	22,893,919	90.62	99.0	97.2
NT-2	1,123,047,856	22,919,344	1,122,070,894	22,899,406	89.93	99.1	97.3
NT+TPL-1	1,123,044,720	22,919,280	1,120,306,894	22,863,406	90.20	99.1	97.2
NT+TPL-2	1,122,940,105	22,917,145	1,118,689,796	22,830,404	91.21	99.0	97.0
TAM-1	1,122,963,674	22,917,626	1,121,779,050	22,893,450	90.82	99.1	97.3
TAM-2	1,123,007,235	22,918,515	1,121,712,459	22,892,091	92.03	99.0	97.2
TAM+TPL-1	1,122,972,739	22,917,811	1,120,326,494	22,863,806	92.09	99.0	97.2
TAM+TPL-2	1,122,961,077	22,917,573	1,119,346,151	22,843,799	90.59	99.0	97.0

12.1.2 ChIP-seq

En el proyecto denominado F17FTSEUHT1188 por la compañía BGI, se secuenciaron 10 muestras. Se generaron en promedio de 44,044,352 lecturas de secuenciación sin procesar y después de realizar la limpieza (quitar adaptadores y lecturas de baja calidad) se obtuvieron 43,675,052 lecturas. En la Tabla 2 se resume brevemente la información de secuenciación de los datos, también se presenta el porcentaje mapeado contra el genoma de referencia (hg19) y el análisis de calidad para cada muestra.

Tabla 2. Resumen de los datos de secuenciación, alineación y calidad de cada muestra para el ChIP-seq

Muestra	Clean Data Size (bp)	Clean Reads Number	Total Mapped Reads (%)	Clean Reads Q20 Rate (%)
INPUT-NT	2,626,882,150	52,537,643	95.89	98.45
NT-1	1,419,285,650	28,385,713	93.20	98.49
NT-2	2,664,595,500	53,291,910	96.38	99.06
NT+TPL-1	1,635,002,250	32,700,045	93.74	98.36
NT+TPL-2	1,504,084,950	30,081,699	95.25	98.76
INPUT-TAM	1,883,127,050	37,662,541	96.67	99.33
TAM-1	2,297,024,350	45,940,487	95.70	98.41
TAM-2	2,714,280,200	54,285,604	95.51	99.20
TAM+TPL-1	1,748,236,650	34,964,733	91.03	98.21
TAM+TPL-2	3,345,007,550	66,900,151	95.90	99.12

12.2 RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE TFIIH

En esta sección se presentan los datos obtenidos de las dinámicas moleculares, realizadas en el grupo de la Dra. Laura Dueñas en la Facultad de Química de la UNAM, con la ayuda del Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz.

A continuación se describen los modelos y métodos empleados para la identificación de inhibidores de la interacción proteína-proteína de TFIIH a través de la estrategia de detección virtual basada en acoplamiento de conjunto¹.

12.2.1 Preparación de modelos

Se utilizaron las estructuras de microscopía crioelectrónica (cryo-EM) del “core” TFIIH en *Homo sapiens* (PDB ID: 6NMI²) y estructuras de rayos X de CDK7 (estado 1 (S1), PDB ID: 1UA2³) y CYCH (PDB ID: 1JKW⁴) del PDB (Banco de datos de proteínas) (Figura 1). Las cadenas laterales no resueltas se completaron con el servidor WHAT-IF⁵. Los loops faltantes y los segmentos de aminoácidos (aa) de XPB (aa 204 a 247), p44 (aa 174 a 181), p34 (aa 73 a 94), CDK7 (aa 44 a 55) y CCNH (aa 1 a 10) se modelaron utilizando Swiss-Model⁶ y GalaxyLoop-PS2⁷. Se generó y validó un modelo de homología del estado 2 (S2) de CDK7 (Figura 2) con el servidor SwissModel usando PDB ID: 5LMK⁸ (CDK2 | 2.40 Å resolución | 44.7 % identidad de secuencia) como plantilla. Los complejos CDK7-CYCH se construyeron en base a la superposición estructural con CDK8-CYCC (PDB ID: 5HNB⁹).

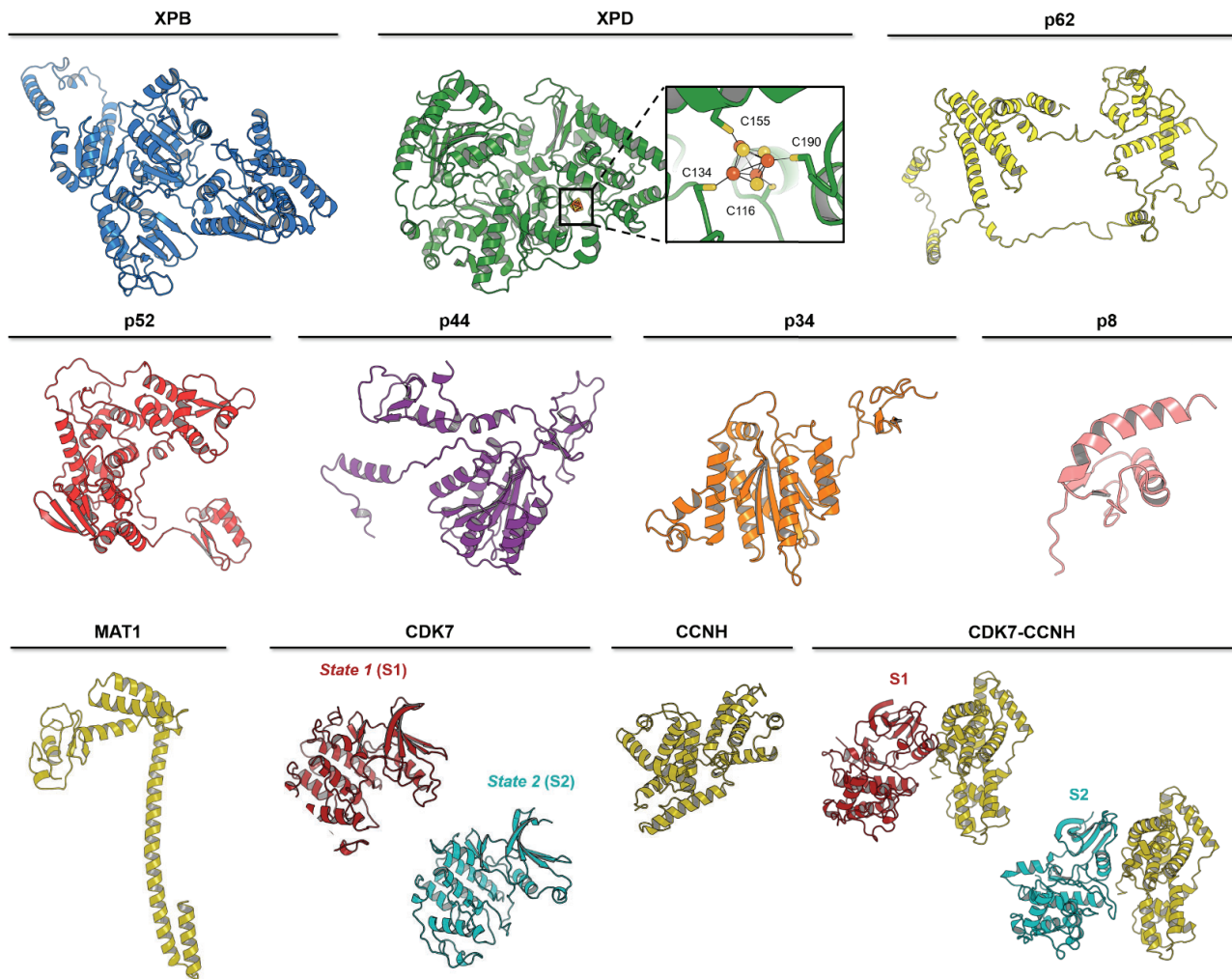


Figura 1. Estructura tridimensional de los componentes del “core” de TFIID y CDK7-CYCH empleados en este estudio.

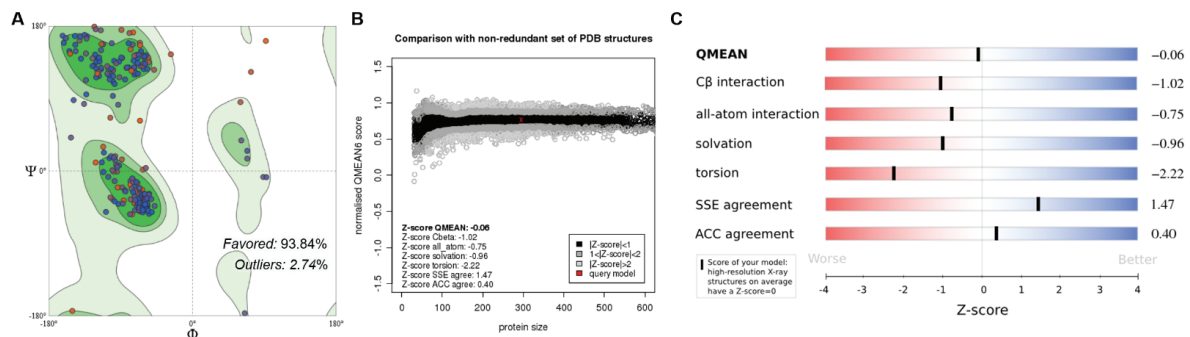


Figura 2. Validación del modelo de homología del estado 2 de CDK7. **(A)** Gráfico de Ramachandran, **(B)** Distribución del puntaje QMEAN6 normalizada y **(C)** Puntaje Z de los componentes QMEAN individuales

12.2.2 Simulaciones de dinámica molecular.

El “core” del complejo de TFIIH, CDK7, CYCH y CDK7-CYCH se evaluaron a través de simulaciones de dinámica molecular (MD) de 500 ns utilizando el campo de fuerza CHARMM36¹⁰ implementado en el paquete GROMACS v. 5.1.4¹¹. Los modelos se solvataron usando agua TIP3P y se neutralizaron con una solución de NaCl 0.15 M. Los sistemas se sometieron a una minimización leve utilizando los algoritmos de “*steepest descent*” y “*conjugate gradient*”. Después de las minimizaciones, cada sistema se calentó a 300 K y se equilibró durante 5,000 ps en un conjunto canónico (NVT) usando el termostato Nosé-Hoover¹². Los sistemas se equilibraron para 5,000 ps a 1 bar en un conjunto isotérmico-isobárico (NPT) con el barostato Parrinello-Rhman¹³. Finalmente, cada sistema se sometió a ejecuciones de producción de NPT no restringidas con un paso de tiempo de 0.002 ps y se registró cada 5 ps. La lista de vecinos se actualizó cada 20 pasos y los enlaces de hidrógeno no polares se restringieron utilizando el algoritmo LINCS¹⁴. El potencial de Lennard-Jones se estableció usando una función de cambio entre 1.0 y 1.2 nm, y las interacciones electrostáticas se calcularon dentro de un radio de corte de 1.2. Las interacciones electrostáticas de largo alcance se calcularon con el método PME utilizando un espaciado de cuadrícula de Fourier de 1.2 nm¹⁵. Los parámetros del grupo [4Fe4S] Cys₄ para la simulación XPD se recuperaron de los cálculos de teoría funcional de densidad realizados por Chang y Kim¹⁶.

Para el análisis MD, calculamos las desviaciones de la raíz cuadrática media (RMSD) y las fluctuaciones de la raíz cuadrática media por residuo (RMSF) utilizando las herramientas incorporadas en GROMACS. El agrupamiento basado en RMSD de los últimos 200 ns de cada simulación MD se realizó utilizando el algoritmo gromos con valores de corte entre 0,15 y 0,20 nm. Los límites se fijaron para cada sistema con el fin de seleccionar los primeros 20 grupos que representan más del 90% de las conformaciones de los últimos 200 ns (Figura 3). Finalmente, extrajimos la estructura más representativa de cada grupo de sistemas simulados para los estudios de acoplamiento molecular.

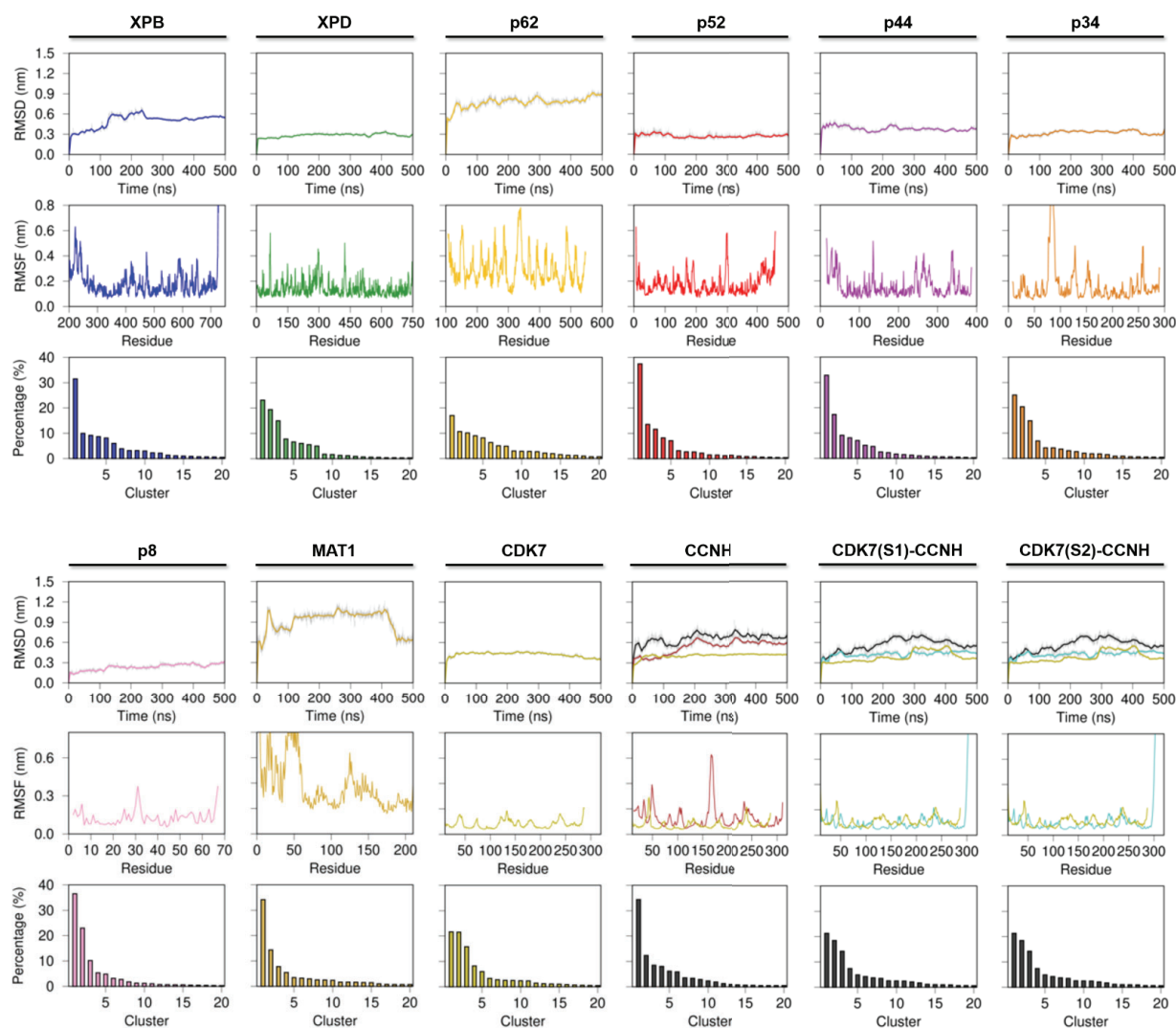


Figura 3. Raíz cuadrática media (RMSD), raíz cuadrática media por residuo (RMSF) y gráficos de agrupamiento basados en RMSD de las simulaciones MD para las diferentes subunidades de TFIIH.

12.2.3 Acoplamiento molecular

12.2.3.1 Configuración de sistemas

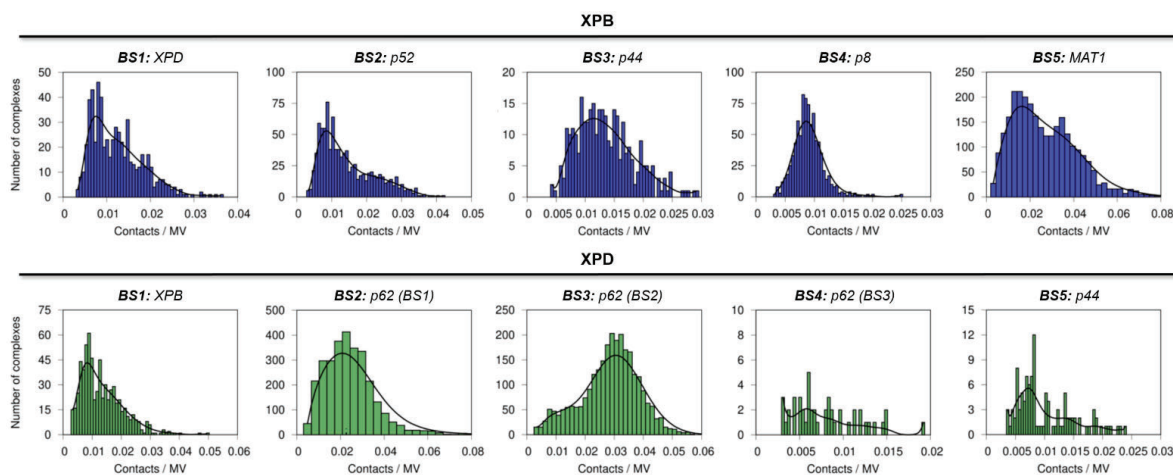
- a. *Preparación del ligando.* Se recuperaron un total de 3600 medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de la base de datos ZINC¹⁷. Los compuestos de la FDA fueron limpiados y optimizados utilizando la caja de herramientas OpenBabel¹⁸. Las cargas

parciales atómicas Gasteiger-Marsili y los tipos de átomos de AutoDock se asignaron con el paquete MGLTools v 1.5.6¹⁹ para la generación PDBQT.

- b. *Preparación de proteínas.* Los hidrógenos polares, las cargas parciales atómicas de Gasteiger-Marsili y los tipos de átomos de AutoDock se calcularon para las 20 estructuras representativas de cada componente que emplea el paquete MGLTools v 1.5.6¹⁹ Las cargas parciales de [4Fe4S] Cys₄ se introdujeron manualmente.

12.2.3.2 *Blind docking*

Se tomaron las estructuras de todos los medicamentos de la FDA utilizando el software QuickVina-W^{20,21}. Utilizamos un valor de exhaustividad de 50 y extrajimos los 20 modos de enlace con los puntajes de enlace más bajos de cada acoplamiento. Se seleccionaron los ligandos acoplados con más del 60% de posibilidades de unión a los sitios de interacción proteína-proteína. Estos ligandos se filtraron adicionalmente en función del número de contactos con el sitio de unión por volumen molecular (MV) del ligando, eligiendo solo aquellos con contactos / valores de MV por encima de la media de distribución (Figura 4).



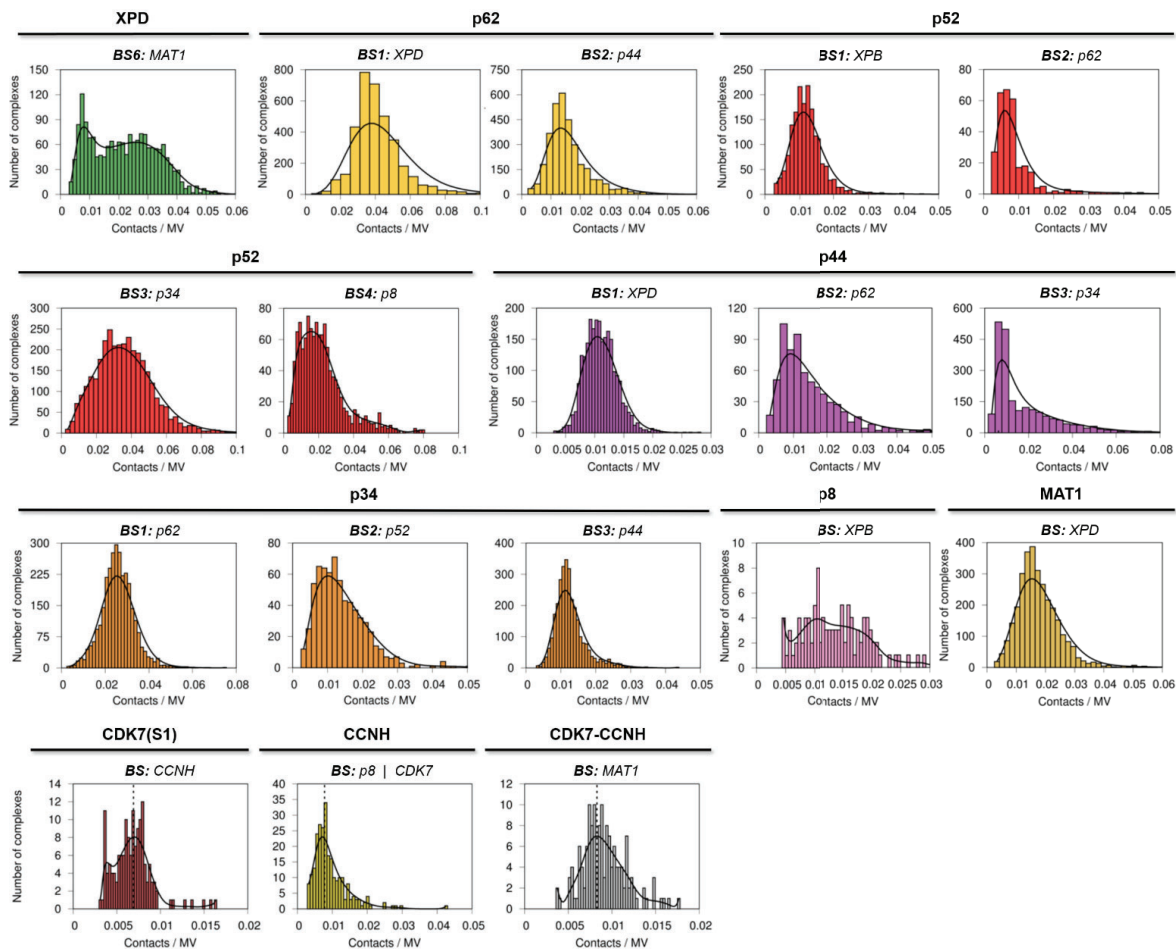


Figura 4. Distribución del número de contactos por volumen molecular de ligando (MV) de los complejos obtenidos del estudio de blind docking .

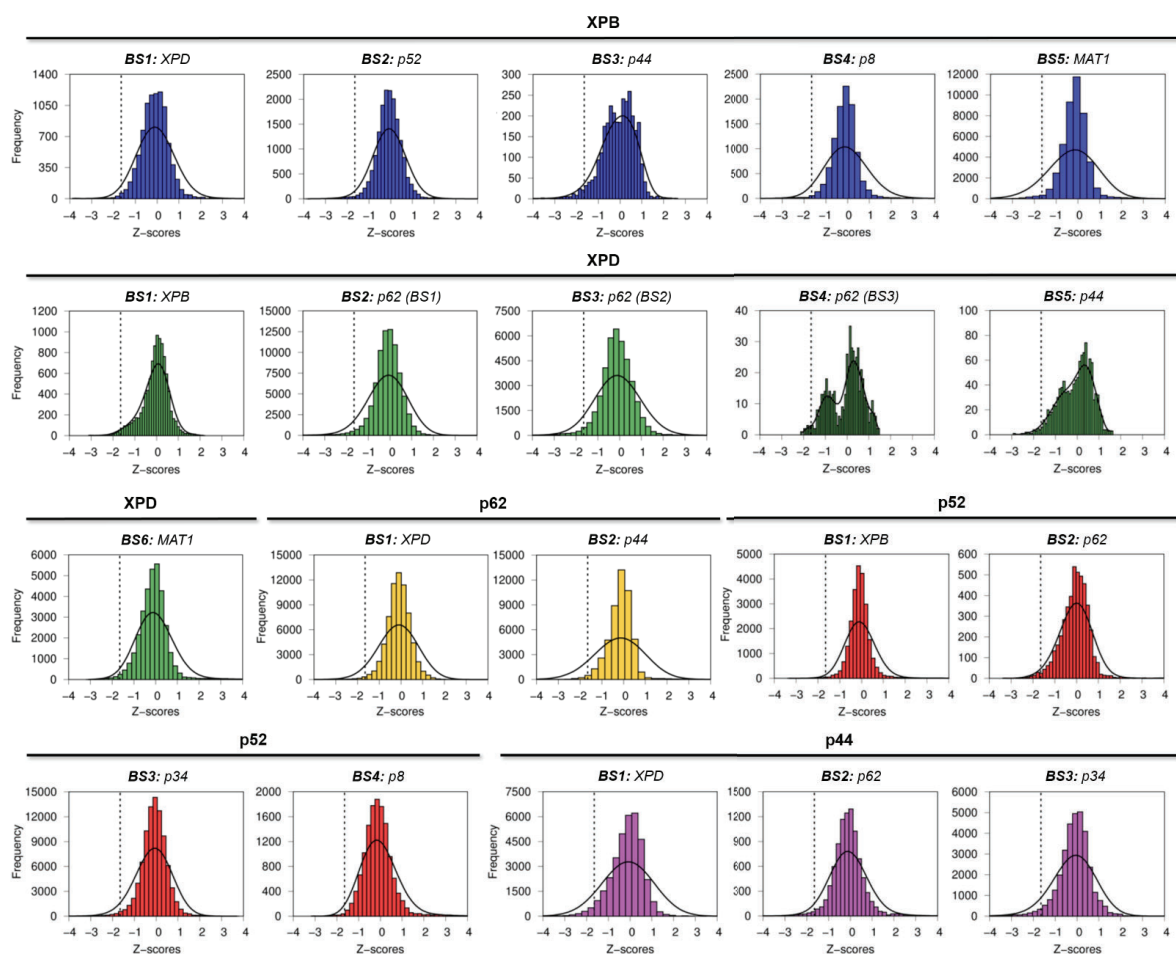
12.2.3.3 Unión al sitio dirigido

Los ligandos filtrados se acoplaron a su sitio de interacción proteína-proteína correspondiente utilizando el software QuickVina v 2.0²². Empleando los parámetros de acoplamiento mencionados anteriormente, se cubrieron los sitios de unión con cuadros de cuadrícula de $25 \times 25 \times 25 \text{ \AA}^3$ para cada sistema. Todos los posibles sitios de unión se extrajeron para su posterior análisis.

12.2.3.4 Recuperación

Las interacciones de unión resultantes se restauraron usando Vina, DrugScore (DSX)²³ y RF-Score-VS²⁴. Se calculó el promedio de las funciones individuales de puntuación con escala Z (Z-score) para obtener una puntuación de consenso de "rango por número"^{25,26}. Los compuestos con valores de puntuación Z inferiores a -1,65 (valor p = 0.05) fueron seleccionados como posibles inhibidores de la interacción proteína-proteína para ser considerados para una evaluación adicional en ensayos experimentales (Figura 5).

Las figuras y gráficos en 3D se generaron con el software PyMOL v 0.9²⁷ y Gnuplot 5.1²⁸, respectivamente.



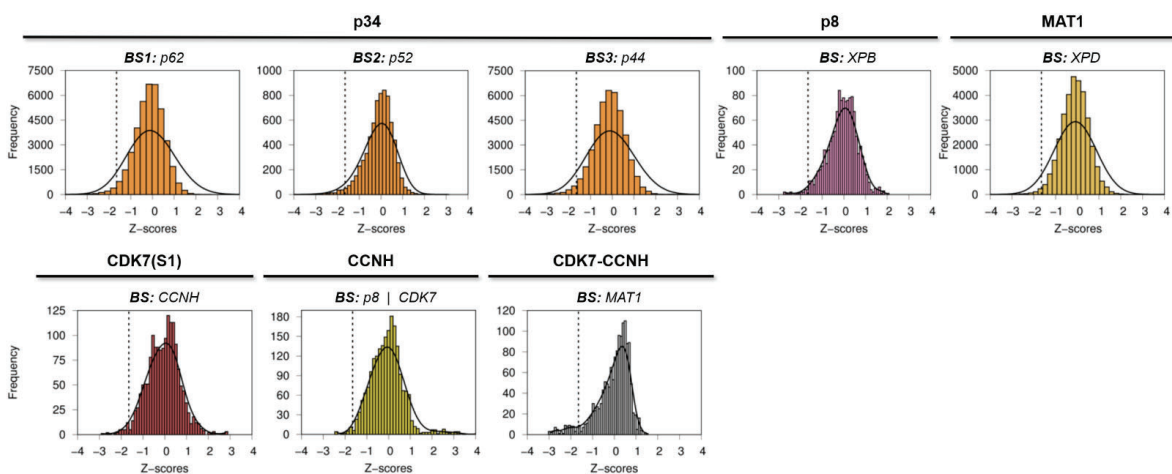


Figura 5. Distribución de la frecuencia relativa, obtenida a partir del Z-score

12.2.4 Resultados

En la Tabla 1 se muestra los números de compuestos identificados por interacción proteína-proteína de acuerdo con el análisis estadístico del Z-score.

Tabla 1. Número de compuestos identificados con un potencial para inhibir las interacción proteína-proteína

Proteína	Proteína	No. Comp	Proteína	Proteína	No. Comp	Proteína	Proteína	No. Comp
CDK7	CCNH	8	XPB	XPB	21	p52	p8	10
CCNH	CDK7	4		p62	124	p44	XPD	203
CDK7/CYCH	MAT1	9		p44	6		p62	27
CDK7/CYCH	MAT1	30		MAT1	50		p34	137
XPB	XPD	10	p62	XPD	53	p34	p62	130
	p52	11		p44	46		p52	31
	p44	11	p52	XPB	4		p44	192
	p8	12		p62	13	p8	XPB	8
	MAT1	46		p34	82	MAT1	XPD	63

12.2.5 Referencias

1. De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G. & Cavalli, A. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **59**, 4035–4061 (2016).
2. Greber, B. J., Toso, D. B., Fang, J. & Nogales, E. The complete structure of the human TFIIH core complex. *Elife.* **8**, 1–29 (2019).
3. Lolli, G., Lowe, E. D., Brown, N. R. & Johnson, L. N. The crystal structure of human CDK7 and its protein recognition properties. *Structure* **12**, 2067–2079 (2004).
4. Andersen, G., Poterszman, A., Egly, J. M., Moras, D. & Thierry, J.-C. The Crystal Structure of Human Cyclin H. *FEBS Lett.* **397**, 65–69 (1996).
5. Vriend, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph. Model.* **8**, 52–56 (1990).
6. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303 (2018).
7. Park, H., Lee, G. R., Heo, L. & Seok, C. Protein loop modeling using a new hybrid energy function and its application to modeling in inaccurate structural environments. *PLoS One.* **9**, 1–18 (2014).
8. Hylsová, M. *et al.* Explicit treatment of active-site waters enhances quantum mechanical/implicit solvent scoring: Inhibition of CDK2 by new pyrazolo[1,5-a]pyrimidines. *Eur. J. Med. Chem.* **126**, 1118–1128 (2017).
9. Schiemann, K. CDK8-CYCC in complex with [6-hydroxy-3-(3-methyl-benzyl)-1H-indazol-5-yl]-((S)-3-hydroxy-pyrrolidin-1-yl)-methanone. (*To be Publ.* (2016).
10. Best, R. B. *et al.* Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone phi, psi and Side-Chain chi(1) and chi(2) Dihedral Angles. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3257–

3273 (2012).

11. Abraham, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25 (2015).
12. Braga, C. & Travis, K. P. A configurational temperature Nosé-Hoover thermostat. *J. Chem. Phys.* **123**, 0–15 (2005).
13. Parrinello, M. & Rahman, Strain fluctuations and elastic constants. *J. Chem. Phys.* **76**, 2662 (1982).
14. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **18**, 1463–1472 (1997).
15. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089 (1993).
16. Chang, C. H. & Kim, K. Density functional theory calculation of bonding and charge parameters for molecular dynamics studies on [FeFe] hydrogenases. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 1137–1145 (2009).
17. Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, Erin, S. & Coleman, R. G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 1757–1768 (2012).
18. O’Boyle, N. M. *et al.* Open Babel: An Open chemical toolbox. *J. Cheminform.* **3**, 1–14 (2011).
19. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
20. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 (2009).

21. Hassan, N. M., Alhossary, A. A., Mu, Y. & Kwoh, C. K. Protein-Ligand Blind Docking Using QuickVina-W with Inter-Process Spatio-Temporal Integration. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
22. Alhossary, A., Handoko, S. D., Mu, Y. & Kwoh, C. K. Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2. *Bioinformatics* **31**, 2214–2216 (2015).
23. Neudert, G. & Klebe, G. DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of receptor-ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 2731–45 (2011).
24. Wójcikowski, M., Ballester, P. J. & Siedlecki, P. Performance of machine-learning scoring functions in structure-based virtual screening. *Sci. Rep.* **7**, 46710 (2017).
25. Wang, R. & Wang, S. How Does Consensus Scoring Work for Virtual Library Screening? An Idealized Computer Experiment. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **41**, 1422–1426 (2001).
26. Shamsara, J. Evaluation of 11 scoring functions performance on matrix metalloproteinases. *Int. J. Med. Chem.* **2014**, 162150 (2014).
27. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA. <http://www.pymol.org> (2007).
28. Williams, T. & Kelley, C. Gnuplot: an interactive plotting program. (2016).

12.3 PUBLICACIONES

OPEN BIOLOGY

royalsocietypublishing.org/journal/rsob

Research



Cite this article: Uriostegui-Arcos M, Aguayo-Ortiz R, Valencia-Morales M del P, Melchy-Pérez E, Rosenstein Y, Dominguez L, Zurita M. 2020 Disruption of TFIID activities generates a stress gene expression response and reveals possible new targets against cancer. *Open Biol.* **10:** 200050.
<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.200050>

Received: 4 March 2020
Accepted: 10 May 2020

Subject Area:
cellular biology/molecular biology

Keywords:
TFIID, cancer, transcription, gene expression, RNA polymerase II

Author for correspondence:
Mario Zurita
e-mail: marioz@ibt.unam.mx

Electronic supplementary material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.5002097>.

THE ROYAL SOCIETY
PUBLISHING

Disruption of TFIID activities generates a stress gene expression response and reveals possible new targets against cancer

Maritere Uriostegui-Arcos¹, Rodrigo Aguayo-Ortiz^{3,4},
María del Pilar Valencia-Morales¹, Erika Melchy-Pérez², Yvonne Rosenstein²,
Laura Dominguez³ and Mario Zurita¹

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, and
²Departamento de Biomedicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos 62250, Mexico
³Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico
⁴Center for Arrhythmia Research, Department of Internal Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

MZ, 0000-0002-8404-2173

Disruption of the enzymatic activities of the transcription factor TFIID by the small molecules Triptolide (TPL) or THZ1 could be used against cancer. Here, we used the MCF10A-ErSrc oncogenesis model to compare the effect of TFIID inhibitors between transformed cells and their progenitors. We report that tumour cells exhibited highly increased sensitivity to TPL or THZ1 and that the combination of both had a synergic effect. TPL affects the interaction between XPB and p52, causing a reduction in the levels of XPB, p52 and p8, but not other TFIID subunits. RNA-Seq and RNAPII-ChIP-Seq experiments showed that although the levels of many transcripts were reduced, the levels of a significant number were increased after TPL treatment, with maintained or increased RNAPII promoter occupancy. A significant number of these genes encode for factors that have been related to tumour growth and metastasis, suggesting that transformed cells might rapidly develop resistance to TPL/THZ inhibitors. Some of these genes were also overexpressed in response to THZ1, of which depletion enhances the toxicity of TPL, and are possible new targets against cancer.

1. Introduction

Cancer cells are known to be addicted to high levels of transcription as the enhanced expression of a plethora of molecules is required for the generation and the maintenance of a transformed phenotype [1,2]. This information suggests that the different factors that participate in general transcriptional activation by RNA polymerase II (RNAPII) could be targets for treating cancer. Since RNAPII is not able to recognize the promoter and initiate transcription in a regulated way by itself, it requires the assembly of what is known as the pre-initiation complex (PIC) at promoters. Generally, the PIC includes the TFIID complex, RNAPII, TFIIB, TFIIA, TFIIF, TFIIH and TFIID [3]. In metazoans, during transcriptional activation, RNAPII synthesizes a transcript with a length of 20–120 nucleotides and then it pauses [4,5]. The release of paused RNAPII is conducted by the positive-elongation factor p-TEFb [6,7].

A component of the PIC and an interesting target to affect transcription—and therefore cancer—is TFIID [8,9]. TFIID is a complex of 10 subunits composed of the CAK subcomplex containing CDK7, CYH and MAT1, which also

© 2020 The Authors. Published by the Royal Society under the terms of the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>, which permits unrestricted use, provided the original author and source are credited.

Research Paper

Heterochromatin Reduction Correlates with the Increase of the KDM4B and KDM6A Demethylases and the Expression of Pericentromeric DNA during the Acquisition of a Transformed Phenotype

Cinthya Gurrion, Maritere Uriostegui and Mario Zurita[✉]

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 62250 Cuernavaca Morelos, México

✉ Corresponding author: email: marioz@ibt.unam.mx

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2017.02.03; Accepted: 2017.06.04; Published: 2017.08.24

Abstract

Cancer cells have alterations in chromatin organization, mostly a reduction in heterochromatin. How this process occurs during transformation and if it participates in the maintenance of a cancerous phenotype is not well understood. Here, using a transformation-inducible cell line, we analyzed the changes that occur in heterochromatin during transformation to a cancerous phenotype. After transformation, there is a reduction in heterochromatin bodies and a nuclear reorganization of HP1 α . These occurrences correlate with reductions in H3K9me3 and H3K27me3 levels and with some of the enzymes that introduce these modifications. At the same time, there are increases in the KDM4B and KDM6A/UTX demethylases and an enhancement in the transcription of pericentromeric DNA that correlate with the reduction of H3K9me3 and the recruitment of KDM4B to these elements. The depletion of KDM4B and KDM6A/UTX has a more deleterious effect in transformed cells than in their progenitors, suggesting an important role for these enzymes in the survival of cancerous cells. These results provide new insights into heterochromatin dynamics during transformation to a cancerous phenotype as well as some of the participating mechanisms.

Key words: Heterochromatin; Histone demethylases; Satellite DNA; Transformation.

Introduction

Constitutive heterochromatin, the most condensed form of chromatin, is present in human cells, particularly in the pericentromeric and subtelomeric regions as well as in repetitive elements along the genome. This kind of heterochromatin is enriched in nucleosomes that contain Histone 3 trimethylated at lysine 9 (H3K9me3), which is recognized by Heterochromatic Protein 1 proteins (HP1 α , β and γ) [1]. Tri-methylation of H3K9 is conducted by Suppressors of Variegation 3-9 Homologs 1 and 2 (SUV3-9H-1 and SUV3-9H-2) enzymes [2]. Conversely, facultative heterochromatin is present in genes that are not expressed in particular

moments of development or in specific cell types [3]. Tri-methylation of Lysine 27 of H3 (H3K27me3) is a histone mark in genes that is characteristic of this type of heterochromatin. This modification is introduced by the action of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), whose methyl transferase activity is present in its Ezh1 or Ezh2 enzymes [4, 5]. These modifications are reversible since histone demethylases that remove these specific marks have been identified. H3K9me3 can be demethylated by the KDM4A, KDM4B and KDM4C enzymes, and these enzymes also demethylate H3K36 and H1K26 [6]. H3K27me3 can be demethylated by the action of the

<http://www.jcancer.org>

Research



Cite this article: Uriostegui-Arcos M, Aguayo-Ortiz R, Valencia-Morales M del P, Melchy-Pérez E, Rosenstein Y, Dominguez L, Zurita M. 2020 Disruption of TFIH activities generates a stress gene expression response and reveals possible new targets against cancer. *Open Biol.* **10**: 200050.
<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.200050>

Received: 4 March 2020

Accepted: 10 May 2020

Subject Area:

cellular biology/molecular biology

Keywords:

TFIIH, cancer, transcription, gene expression, RNA polymerase II

Author for correspondence:

Mario Zurita

e-mail: marioz@ibt.unam.mx

Electronic supplementary material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.5002097>.

Disruption of TFIH activities generates a stress gene expression response and reveals possible new targets against cancer

Maritere Uriostegui-Arcos¹, Rodrigo Aguayo-Ortiz^{3,4},
María del Pilar Valencia-Morales¹, Erika Melchy-Pérez², Yvonne Rosenstein²,
Laura Dominguez³ and Mario Zurita¹

¹Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, and

²Departamento de Biomedicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos 62250, Mexico

³Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

⁴Center for Arrhythmia Research, Department of Internal Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

MZ, 0000-0002-8404-2173

Disruption of the enzymatic activities of the transcription factor TFIH by the small molecules Triptolide (TPL) or THZ1 could be used against cancer. Here, we used the MCF10A-ErSrc oncogenesis model to compare the effect of TFIH inhibitors between transformed cells and their progenitors. We report that tumour cells exhibited highly increased sensitivity to TPL or THZ1 and that the combination of both had a synergic effect. TPL affects the interaction between XPB and p52, causing a reduction in the levels of XPB, p52 and p8, but not other TFIH subunits. RNA-Seq and RNAPII-ChIP-Seq experiments showed that although the levels of many transcripts were reduced, the levels of a significant number were increased after TPL treatment, with maintained or increased RNAPII promoter occupancy. A significant number of these genes encode for factors that have been related to tumour growth and metastasis, suggesting that transformed cells might rapidly develop resistance to TPL/THZ inhibitors. Some of these genes were also overexpressed in response to THZ1, of which depletion enhances the toxicity of TPL, and are possible new targets against cancer.

1. Introduction

Cancer cells are known to be addicted to high levels of transcription as the enhanced expression of a plethora of molecules is required for the generation and the maintenance of a transformed phenotype [1,2]. This information suggests that the different factors that participate in general transcriptional activation by RNA polymerase II (RNAPII) could be targets for treating cancer. Since RNAPII is not able to recognize the promoter and initiate transcription in a regulated way by itself, it requires the assembly of what is known as the pre-initiation complex (PIC) at promoters. Generally, the PIC includes the TFIID complex, RNAPII, TFIIB, TFIIA, TFIIF, TFIIE and TFIH [3]. In metazoans, during transcriptional activation, RNAPII synthesizes a transcript with a length of 20–120 nucleotides and then it pauses [4,5]. The release of paused RNAPII is conducted by the positive-elongation factor p-TEFb [6,7].

A component of the PIC and an interesting target to affect transcription—and therefore cancer—is TFIH [8,9]. TFIH is a complex of 10 subunits composed of the CAK subcomplex containing CDK7, CYCH and MAT1, which also

participates in cell cycle control, and the core subcomplex that is part of the mechanism of nucleotide excision repair (NER) [10]. The core subcomplex is composed of p8, p34, p44, p52, p62, XPB and XPD subunits (the last two are DNA helicases/ATPases) [11]. Together, the CAK and the core form the 10-subunit TFIIH complex, which participates in transcription [11,12]. The role of TFIIH in RNAPII transcription involves phosphorylation of Ser 5 in the RNAPII CTD (p^{Ser5}CTD RNAPII) by CDK7, which is important for transcription initiation, recruitment of the CAP enzyme, other modifications and mRNA processing [12–14]. By contrast, XPB functions as an ATP-dependent translocase that rotates DNA to open it around the transcription initiation site, facilitating the synthesis of RNA by RNAPII [15,16]. Thus, compounds that affect the TFIIH functions have been found or developed as strong candidates to combat cancer. For instance, the chemical compound THZ1 (phenylaminopyrimidine) and related substances inhibit the kinase activity of CDK7 by binding a protein region outside of its catalytic domain (Cys312) [17]. Although THZ1 is very effective in killing different types of cancer cells, it has not yet been clinically tested in cancer patients [18]. On the other hand, the diterpenoid epoxide, triptolide (TPL), inhibits the ATPase activity of XPB by covalently binding its catalytic domain [19]. TPL and its derivatives have been shown to kill different types of cancer cells and minelide, a triptolide derivative is currently in clinical trials for the treatment of pancreatic cancer [20,21]. In addition, TPL has been used as a tool to study transcription initiation and promoter-proximal pausing [22–24]. Although many studies demonstrate the potential use of TPL against cancer [25–27] and indicate how this drug affects transcription initiation, studies of how TPL affects global gene expression between cancer cells and their progenitors are still needed. Additionally, it is not known whether TPL and THZ1 cause a similar effect in cells or whether TPL affects TFIIH integrity. In addition, transcriptional response studies are still limited or analysed with brief incubation times and not when the effect of TPL on cell homeostasis is initiating. In this work, we addressed these points using an inducible oncogenesis model.

2. Results

2.1. Triptolide and THZ1 preferentially kill transformed cells, and the combination has a synergistic effect

To study the effects of TPL and THZ1 on cancer cells and their progenitors, we used the MCF10A-ErSrc cell line as an oncogenesis model [28]. After 36–72 h of incubation with tamoxifen, which activates v-Src oncoprotein, the MCF10A-ErSrc line achieves multiple features associated with cellular transformation like: high proliferation, lost adherence, mammospheres formation and generates tumours metastasis in immunocompromised mice. In this study, cells with these characteristics are referred to as tamoxifen-treated (TAM) and their progenitors as non-treated (NT). Since phosphorylated STAT3 (pSTAT3) is required for cellular transformation through IL6 and NF- κ B, thereby it was used as a transformation control in this cell line [28,29].

To analyse whether NT cells are more sensitive than TAM cells when TFIIH is affected, we evaluate by flow cytometry viability of NT and TAM cells which were incubated with TPL, THZ1 or both chemicals at different concentrations

and for different times (figure 1a). The viability of both NT and TAM cells was highly affected by the presence of TPL, with TAM cells being more sensitive (figure 1a). Following incubation with 100 nM TPL for 72 h, approximately 90% of TAM cells died (figure 1a). However, at the same concentration and incubation time, more than 50% of NT cells were still viable. By contrast, at a concentration of 250 nM THZ1 for 72 h, approximately 64% of TAM cells died and only 36% of NT cells died (figure 1a). Interestingly, simultaneous incubation of NT and TAM cells with both chemicals had an additive effect on cell viability (figure 1a), as practically all TAM cells died after 48 h when incubated with TPL (100 nM) and THZ1 (250 nM) (figure 1a). However, under those conditions and even after 72 h, approximately 40% of NT cells remained viable (figure 1a). Thus, the combination of TPL and THZ1 is better than the single treatment with each of those drugs and preferentially target TAM cells for cell death via apoptosis (electronic supplementary material, figure S1a–d). Also, drug combination analysis by the Chou–Talalay method [30] showed combination index (CI) values < 1.0 in TAM cells, which denotes a synergistic pharmacological effect (electronic supplementary material, figure S1e). Interestingly, TPL/THZ1 treatment in NT cells has a synergistic effect only in the highest concentrations (electronic supplementary material, figure S1e).

Next, we evaluated by flow cytometry assays the effect of TPL, THZ1 and the combination of both at different concentrations and times on proliferation and cell cycle progression in NT and TAM cells (figure 1b,c). Figure 1b shows that after 72 h of incubation with 25 nM TPL, TAM cells stopped after two cycles of proliferation; and that NT cells required 100 nM TPL to stop proliferating (figure 1b). Similarly, TAM and NT cells stopped proliferating, when incubated with 100 nM or 250 nM THZ1 for 72 h, respectively (figure 1b). Interestingly, when incubated with both TFIIH inhibitors NT and TAM cells stopped proliferating with only 25 nM TPL and 50 nM THZ1, confirming the synergistic effect of these drugs (figure 1b). Furthermore, we found that in the presence of TPL and THZ1, cells were arrested at the G₁ phase and that lower concentrations of TPL and THZ1 were needed for TAM cells (figure 1c). Taken together, these results indicate that TAM cells are more sensitive to TPL and THZ1 than their NT cells counterparts. TAM cells stopped proliferating and were arrested at G₁ at lower concentrations and shorter incubation times when incubated with either drug. Importantly, simultaneous treatment with TPL and THZ1 had a significantly more severe effect on TAM cells than on NT cells as well as either drug used independently, underscoring the potential of simultaneously inhibiting different TFIIH activities with TPL and THZ to develop alternative therapies for cancer treatment.

2.2. TPL interferes with the XPB–p52 interaction, inducing the degradation of the XPB–p52–p8 submodule of TFIIH

Based on our previous analysis of TFIIH mutants in *Drosophila* [31], we sought to explore the effect of TPL on the XPB levels in NT and TAM cells. Cells were incubated with 125 nM TPL for different times. Since the disruption of transcription by RNAPII causes degradation of this enzyme, we also evaluated levels of RNAPII as well as of other TFIIH subunits. As expected, levels of RNAPII—and therefore p^{Ser5}CTD

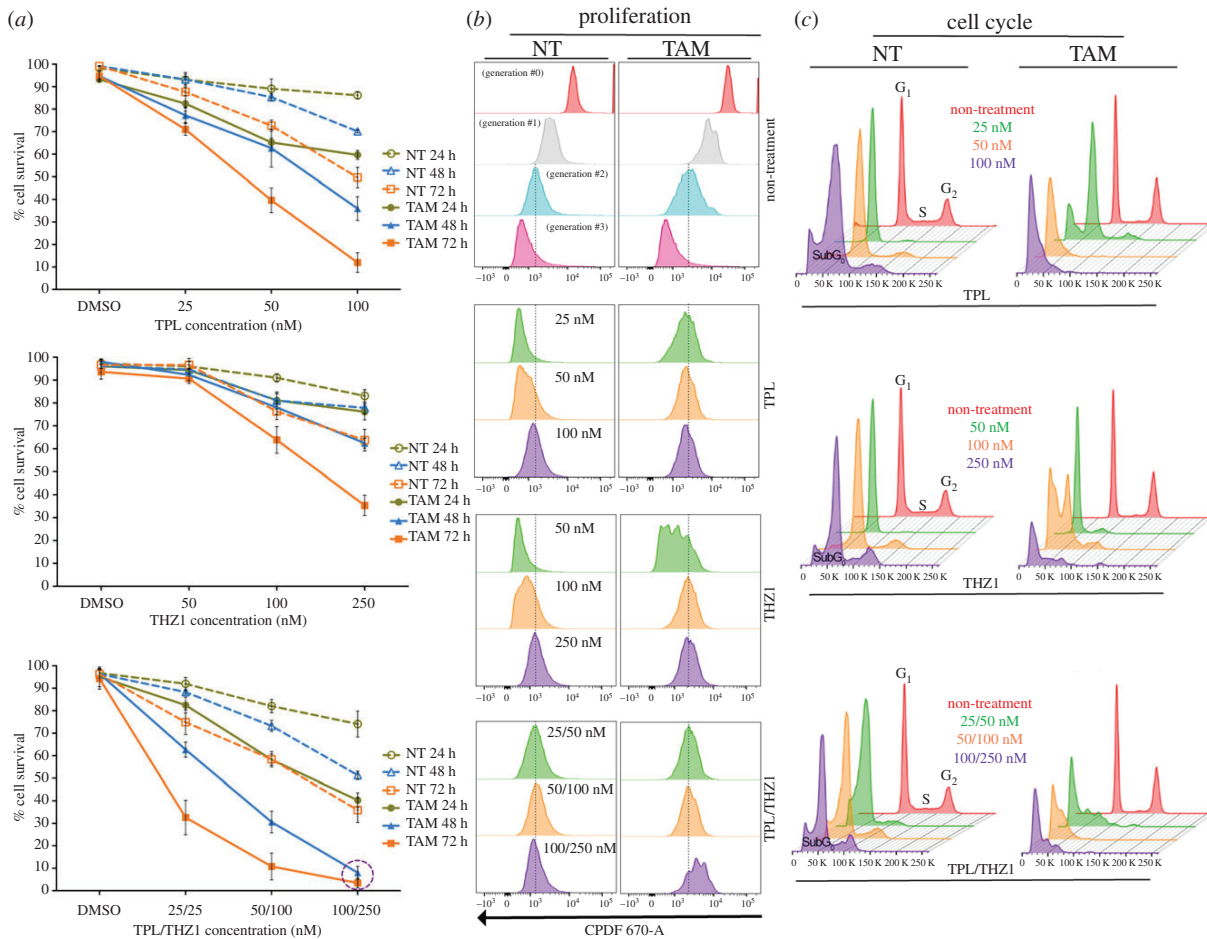


Figure 1. Triptolide (TPL) and THZ1 preferentially kill transformed cells and the combinatory of both substances potentiate their effect. Flow cytometry assays to determine cellular viability, proliferation and cell cycle arrest in tamoxifen-treated (TAM) and non-treated (NT) cells. (a) Cellular viability observed in cells incubated with TPL (upper panel), THZ1 (middle panel) and the combination of THZ1 and TPL (lower panel). The concentrations and incubation time used are indicated in the figure. Data are presented as mean values \pm s.d. (standard deviation) from three independent experiments. (b) Proliferation assay in TAM and NT cells incubated with TPL (upper panel), THZ1 (middle panel) and the combination of THZ1 and TPL (lower panel). The first panel shows non-treatment cells throughout its generational duplications. (c) Cell cycle arrest assay in TAM and NT cells incubated with TPL (upper panel), THZ1 (middle panel) and the combination of THZ1 and TPL (lower panel). Graphs in (b) and (c) show concentrations used for 72 h of treatment and correspond a representative example from three biological replicates.

RNAPII—decreased as a result of incubating the cells with TPL (figure 2a). A clear reduction in XPB protein was also observed, which was greater in TAM cells (figure 2a). Furthermore, levels of the p52 and p8 subunits were also diminished in response to TPL exposure (figure 2a). However, levels of other subunits of TFIIH, such as XPD, p62, CDK7, CYCH and MAT1, were not affected (figure 2a; electronic supplementary material, figure S2a). As expected, incubation with THZ1 for different times reduced the levels of p^{ser5}CTD RNAPII, but it did not affect the levels of this enzyme or the levels of any TFIIH subunit, including the CAK subcomplex, consistent with previous reports [32] (electronic supplementary material, figure S2a).

p52 and p8 subunits have direct contact with XPB and modulate its ATPase activity [31,33]. Since our results suggested that the binding of TPL to the ATPase domain of XPB destabilizes XPB as well as p52 and p8, we investigated whether TPL causes a distortion of XPB that limits the interaction of XPB with p52 and p8. To achieve this aim, we used the public information recently reported for the structure of the human TFIIH core by cryo-electron microscopy [34]. TPL inhibits XPB-ATPase function through the formation of a covalent bond between the C12 carbon (12,13-epoxide group) on the inhibitor and the sulfur atom of the Cys342

residue of XPB (TPL_{C12}-Cys342) [35]. The isolated XPB-p52-p8 putative submodule was employed to perform molecular dynamics (MD) simulations of the covalent docking of the optimized TPL structure to the Cys342 residue of XPB (figure 2b). Our covalent docking study showed that the TPL binding site (TBS) in XPB is located at the interface of the helicase domains (HD1 and HD2), which are mainly constituted by DEVH box residues (electronic supplementary material, figure S3). During the MD simulations, a per-residue contact analysis shows that the presence of TPL at the HD1-HD2 interface altered the number of contacts between both domains (electronic supplementary material, figures S3d and S3g), which may lead the separation of the domains and that the dissociation could be due to allosteric modulation guided by the loss of interactions between the XPB N-terminal domain (NTD) and p52 and between XPB HD2 and p52/p8.

To confirm the MD results we performed split-GFP-complementation assays between XPB and p52 by using the tripartite split-GFP association system [36], which is based on a tripartite association between two GFP tags (20 amino acids long each) fused to interacting protein partners, and the complementary GFP1-9 detect. Stable HEK-293 cells expressing GFP1-9 were co-transfected with GFP10-P52 and XPB-GFP11 constructs an

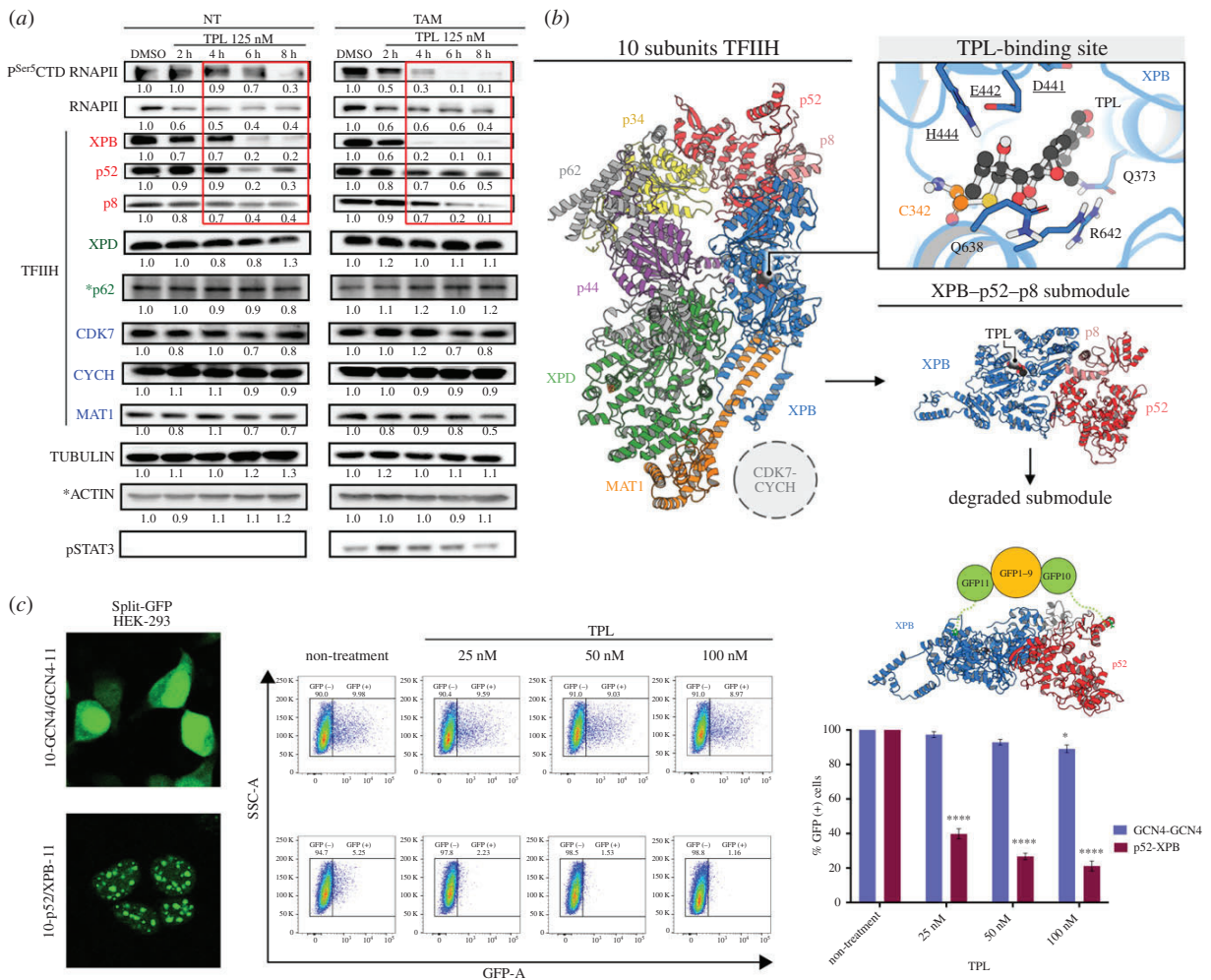


Figure 2. TPL induces the degradation of the XPB–p52–p8 submodule of TFIIH. (a) Western blots showing RNAPII CTD and the p^{Ser5}CTD RNAPII, and some TFIIH subunits (XPB, p52, p8, XPD, p62, CDK7, CYCH and MAT1) from cells incubated with TPL 125 nM for 2, 4, 6, 8 h in comparison to the control with DMSO for 8 h. (*) Independent western blots using the same extracts. Note that the TFIIH subunits, XPB, p52 and p8 protein levels decrease as the incubation time with TPL advances (box in red). Densitometric analyses were performed using tubulin and actin (only for p62) as loading control; the relative quantification is indicated under each blot and the data showed as a representative example from three biological replicates. The p-STAT3 is used as a transformation control. (b) Computational molecular dynamics model that proposes the mechanism of the XPB–p52–p8 submodule dissociation from the TFIIH complex and degradation due to the covalent binding of TPL to XPB. The figure on the left shows the three-dimensional structure of TFIIH coloured by its components: XPB (blue), XPD (green), p8 (pink), p34 (yellow), p44 (purple), p52 (red), p62 (grey) MAT1 (orange). The upper right figure depicts TPL (black) binding mode in XPB. TPL binding site (TBS) residues are shown in blue, underlining the DEVH box amino acids, and C342 forming the covalent bond with TPL is highlighted in orange. (c) TPL interferes with the p52–XPB interaction. A representative image from at least three independent Split-GFP complementation assays between the p52 and XPB subunits expressed in HEK-293 cells is shown in the left panel. The middle panel shows an example of the cytometry measure of the GFP fluorescent activity by the cell in the GCN4-GCN4 split-GFP homodimer complementation used as control and the p52–GFP–XPB split complementation. Note that at 25 nM of TPL incubation by 28 h practically no fluorescent cells in the p52–XPB construct are detected. The right panel shows a kinetic assay of three independent experiments where the percentage of live and positive cells for GFP is shown. Significant differences were analysed by Two-way ANOVA with corrections for multiple comparisons, always comparing with the non-treated column. Statistical significance is indicative * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. The structure at the top of the histogram depicts the p52–GFP–XPB complementation, showing that the localization of the GFPs is compatible with the formation of a functional TFIIH complex with a reasonable distance between fused GFP10 and GFP11 fragments.

incubated with TPL at different low concentrations for 28 h (figure 2c). As a control, we used a GCN4 homodimeric interaction (GFP10-GCN4 and GCN4-GFP11) previously reported [36]. A three-dimensional representation of the XPB–GFP–p52 complex shows that the localization of GFP is compatible with the interaction between XPB and p52 (figure 2c). The GFP fluorescence signal was quantified only in living cells by flow cytometry. After the TPL treatment a clear reduction in the fluorescence is observed in the p52–GFP–XPB-complementation cells, but not in the control cells (figure 2c). These *in vivo* results are in agree with structural modelling results that suggest that TPL interferes with the binding between XPB

and p52. Altogether, the results of this section suggest that XPB, p52 and p8 form a submodule in the core of TFIIH and that TPL besides inhibiting the XPB-ATPase activity, also cause the XPB–p52–p8 destabilization without affecting the rest of the TFIIH subunits.

2.3. Analysis of the transcriptome of TPL-treated cells shows an unexpected gene expression response

While analysing the transcriptome of TFIIH mutants in *Drosophila*, we previously reported that not all genes responded

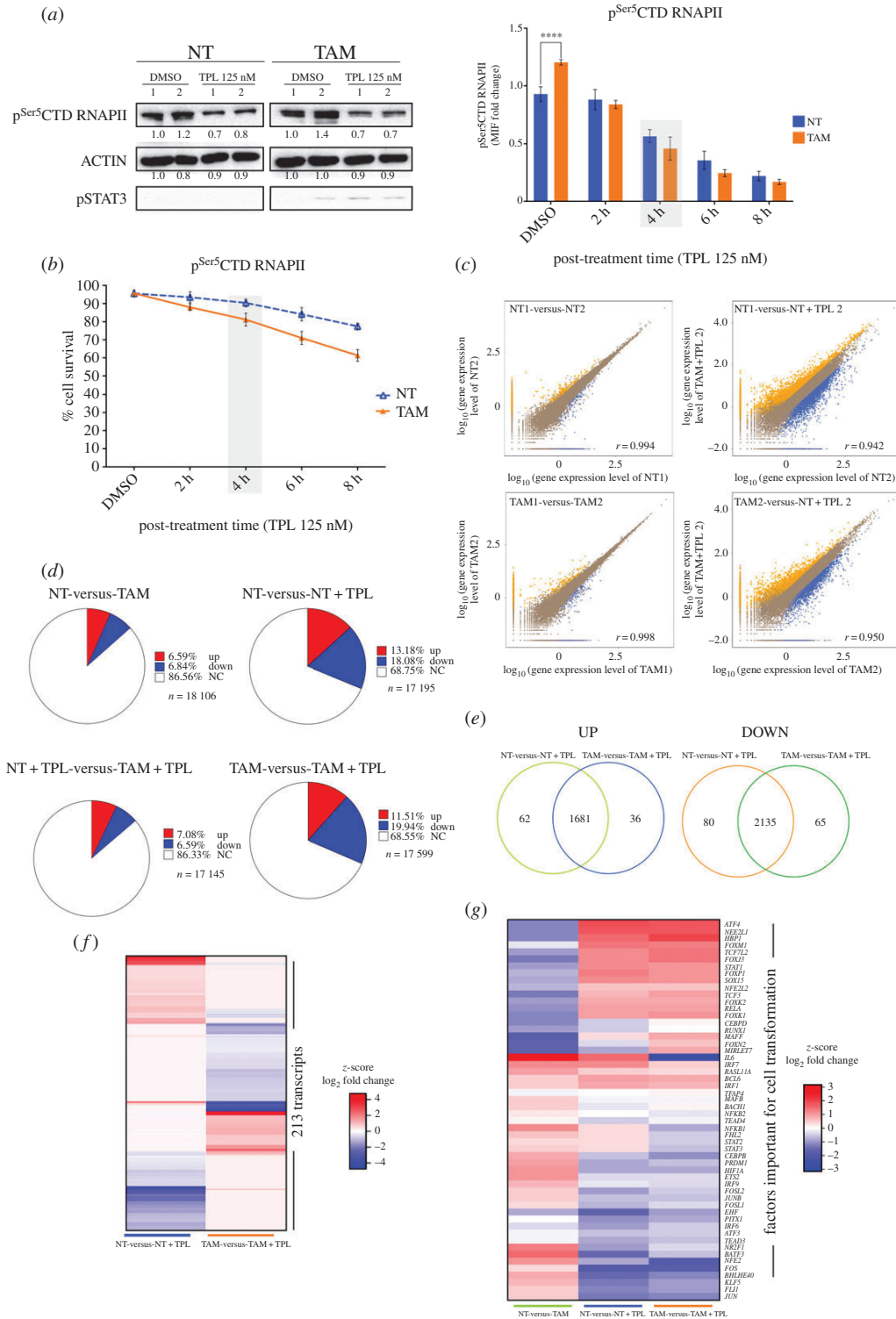


Figure 3. (Caption overleaf.)

equally and that the transcript levels of numerous genes increase in TFIH mutant tissues [37,38]. Therefore, to explore whether TPL also generates a differential effect on gene expression in TAM and NT cells, we analysed the transcriptomes of these cells after incubation with 125 nM TPL for 4 h, a concentration found to reduce equally RNAPII levels by half in NT and TAM cells, to affect mildly cell viability (figure 3*a,b*).

Approximately 18 500 different transcripts were identified in both TAM and NT cells (electronic supplementary material,

figure S4*a*). A Pearson's correlation analysis between NT and TAM cells with and without TPL showed, as expected, that the treatment with TPL caused a reduction in the transcript levels of some genes, but intriguingly, the levels of other transcripts increased (figure 3*c*; electronic supplementary material, figure S4*b*). Induction of the transformed phenotype of MCF10A-ErSrc cells reduced the expression of 6.84% and increased the expression of 6.59% of the genes (figure 3*d*). When we compared the effect of TPL in NT and TAM cells, the RNA levels of approximately 68% of the genes did not

Figure 3. (*Overleaf*.) Transcriptome analysis of TPL-treated cells. (a) Left panel show western blots (WB) to evaluate the p^{Ser5}CTD RNAPII in tamoxifen non-treated (NT) and tamoxifen-treated (TAM) cells incubated with triptolide (TPL) for 4 h at 125 nM or DMSO for 4 h as a control. Densitometric analyses were performed using actin as a loading control. The relative quantification is indicated under each blot from two biological replicates. pSTAT3 is used as a transformation control. The cells were collected and divided into two fractions, one for WB and the other for RNA-Seq analysis. The right panel indicates the quantification of p^{Ser5}CTD RNAPII by flow cytometry, NT (blue) and TAM cells (orange), the grey box, indicates the time that p^{Ser5}CTD RNAPII has decreased approximately 50%. (b) Cell viability of the NT (blue) and TAM cells (orange) incubated with 125 nM of TPL for 2, 4, 6 and 8 h. DMSO (incubated for 8 h) was used as control. It can be appreciated that at 4 h (grey box) the cell viability is not very compromised. (c) Pearson's correlation between two of the replicates of the RNA-Seq data (left) and between two samples (right); the x- and y-axes represent the log₁₀ value of gene expression. The blue dots represent the downregulation transcripts; orange dots upregulation transcripts and brown dots non-affected. (d) Percentages of up and downregulated genes in NT, NT cells incubated with triptolide for 4 h at 125 nM (NT + TPL), TAM cells and TAM cells incubated with triptolide for 4 h at 125 nM (TAM + TPL). In red are represented the transcript percentages that increased, in blue the transcript percentages that are down and in white the transcripts with no significant log₂ fold change. (e) Venn diagram showing the percentage of up and down, unique and common transcripts between NT and TAM cells treated TPL. (f) Heat map comparing 213 transcripts that are differentially expressed between NT and TAM cells after TPL treatment. (g) Heat map showing the response to TPL in the expression of genes that are either up or downregulated in the establishment of the transformed phenotype. Note that TPL induces the increase in expression of most of the genes downregulated for the transformed phenotype and reduces the expression of most of the genes upregulated to maintain the transformed phenotype. Right panel (a) and graph (b) represent three biological replicates while left panel (a) and graphs (c) to (g) summarizing the results of two biological replicates. In graph (a-right) and (b) data are mean ± s.d. (standard deviation). Significant differences were analysed by Two-way ANOVA with corrections for multiple comparisons. Statistical significance is indicated (*****p* < 0.0001).

significantly change, probably because, in the conditions used in this experiment, the reduction in transcription initiation of many genes is not detected by RNA-Seq (figure 3d). However, in both, NT and TAM cells, approximately 11% of the gene transcript levels were increased, and approximately 19% were decreased (figure 3d). Among the downregulated genes, 2135 transcripts were shared between NT and TAM cells. Among the upregulated genes, 1681 transcripts were common to NT and TAM cells, 62 were exclusive to NT cells and 36 were exclusive to TAM cells (figure 3e; electronic supplementary material, table S1). The expressions of 213 genes were exclusive to either NT or TAM cells (figure 3f). Some genes as *SOX9*, *RETL1* and *IGFBP3*, were downregulated in NT cells and upregulated in TAM cells in response to TPL. However, we also detected genes whose transcripts were upregulated in NT cells and downregulated in TAM cells, such as *FAM111B* and *F2R* (electronic supplementary material, table S1). Intriguingly, most of the recently identified factors required to maintain the oncogenic state in TAM cells [39], change its expression back to NT condition, suggesting a partial reversion of TAM to NT phenotype (figure 3g).

To confirm the RNA-Seq results, a set of randomly selected genes was analysed by RT-PCR and exhibited the same behaviour as shown by the RNA-Seq data (electronic supplementary material, figure S5a). In addition, we explored whether a similar response to TPL occurs in other breast cancer cell lines. For that, we analysed the expression of these genes in the estrogen receptor-positive MCF-7 line as well as in the triple-negative MDA-MB-231 line and found that 12 of 14 genes had similar behaviour as the MCF10A-ErSrc (electronic supplementary material, figures S5 and S7). These results indicate that in general, several breast cancer cell lines have a similar gene expression response to TPL. Intriguingly, the MCF-7 line is the most sensible to TPL and the MDA-MB-231 the less sensitive (electronic supplementary material, figure S5b).

Altogether our data indicate that XPB inhibition by TPL differentially modulates many genes in NT and TAM cells. Unexpectedly, the RNA-Seq results indicate that even when TPL affects RNAPII transcription, some genes are upregulated in response to this insult. This result suggests that there are genes for which, transcription may continue or even increase under conditions in which the levels of RNAPII are reduced as well as the XPB-p52-p8 submodule.

2.4. Promoter occupancy and elongating RNAPII are maintained in genes upregulated in response to TPL

The increase in the RNA levels of numerous genes in response to TPL can be a result of different factors, including enhancement of transcription and/or an increase in the accumulation of some RNAs by reducing their degradation. Reports using TPL to analyse pausing at promoters have been described [40,41]. However, the effect of TPL on RNA levels under conditions when the level of RNAPII is reduced was not determined in any of these studies. Therefore, we sought to analyse the genomic occupancy of RNAPII by chromatin immunoprecipitation followed by next-generation sequencing (ChIP-Seq) in NT and TAM cells incubated with or without TPL under similar conditions as those used in the RNA-Seq experiments.

Overall, the metagenome analysis showed that the occupancy of RNAPII on the promoters was higher in TAM cells than in NT cells. As expected, we observed a reduction in the occupancy of RNAPII in NT and TAM cells when treated with TPL, with the main peak that corresponds to paused RNAPII in TPL-treated cells displaced to the 5' end of the transcription start site (TSS) (figure 4a). This data shows that most RNAPII accumulates in the initiation state (PIC) and is in agreement with previous results on the effect of TPL on RNAPII occupancy on gene promoters [40,41]. Also consistent with the existence of highly stable paused RNAPII at some promoters, maintaining the RNAPII in a paused position even after transcription inhibition by TPL [40], since promoters corresponding to paused RNAPII were still detected (figure 4a). However, in our experiments, we identified stably paused RNAPII in some promoters in cells with a substantial reduction in the levels of RNAPII and the XPB-p52-p8 submodule of TFIIH. Additionally, some promoters exhibited an increase in RNAPII occupancy in NT (5.42%) and TAM (3.93%) cells incubated with TPL (figure 4b; electronic supplementary material, table S2).

Since the RNA-Seq results indicated that some transcripts were upregulated by TPL, we assessed whether there was a correlation between the occupancy level of RNAPII on the promoters with transcripts that were up- or downregulated in response to TPL. As shown in figure 4c, in TPL-treated

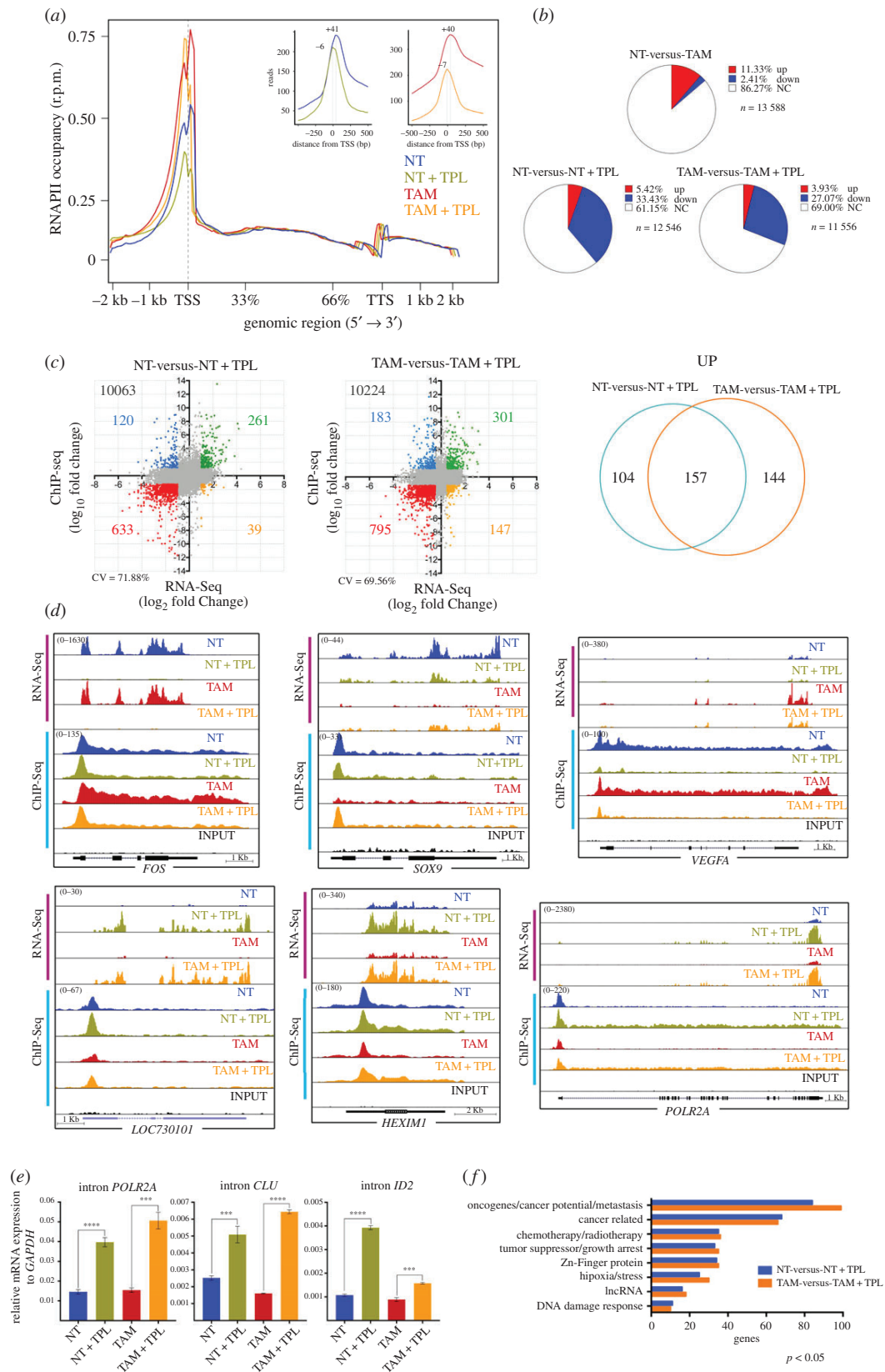


Figure 4. (Caption overleaf.)

NT and TAM cells, 261 and 301 genes respectively, were found to have an increased association of RNAPII to their promoters, and that correlated with a significant increase in their corresponding RNA levels (electronic supplementary material, table S2). Of these genes, 157 were shared between

NT and TAM cells (figure 4c). Also, an increase of RNAPII in the body of these genes is observed (figure 4d).

The correlation analyses indicated that there were different gene expression patterns in response to TPL (figure 4c). There were genes such as *FOS*, on which paused RNAPII was cleared,

Figure 4. (*Overleaf.*) Analysis of the positioning of the RNAPII in cells treated with TPL. ChIP-Seq experiments were performed from two independent biological replicates for each condition. (a) Meta-analysis of the positioning of the RNAPII comparing the non-treated (NT, blue), non-treated + triptolide (NT + TPL, green), Treated with tamoxifen (TAM, red) and Treated with tamoxifen + triptolide (TAM + TPL, orange) treated with TPL for 4 h at 125 nM. The upper right panel shows the displacement suffered by the cells when are treated with TPL towards the TSS-5'. Note the presence of two RNAPII picks, without TPL the major pick corresponds to paused RNAPII and with TPL the major pick corresponds to initiating RNAPII. Also, note that after TPL treatment in some promoters RNAPII is maintained paused. (b) Relation of the occupancy of the RNAPII in gene promoters after the TPL treatment in NT, NT + TPL, TAM and TAM + TPL cells. In red is indicated the promoter occupancy percentage that increases, in blue percentage that goes down and in white promoters that do not have a significant change. (c) Correlation between the RNA-Seq data (x-axis) and ChIP-Seq data (y-axis), from the NT-versus-NT + TPL and TAM-versus-TAM + TPL cells. In green are genes that increase both in transcriptional level and RNAPII positioning in the promoter; in blue genes that increase in transcriptional level but have low positioning in the promoter; in red are the double negative genes, genes with lower transcriptional level and lower positioning in the promoter, while in yellow are genes with low transcript level but increase in the positioning of the polymerase. Correlation value (CV). The right panel shows the number of genes that increase in RNA-Seq and ChIP-Seq, unique and common between NT-versus-NT + TPL cells compared to TAM-versus-TAM + TPL. (d) Examples of the different behaviours observed in the RNA-Seq (pink bar) and ChIP-Seq (blue bar) *FOS*, *SOX9*, *VEGFA*, *LOC730101*, *HEXIM1* and *POLR2A*. Images are from the Genome Browser. (e) qRT-PCR of intronic sequences to quantify the levels de-novo synthesized mRNAs for genes overexpressed in response to TPL. *POLR2A* corresponds to the RNAPII large subunit gene, *CLU* is the clustering gene and *ID2* corresponds to the inhibitor of DNA binding gene. In the three genes, an internal sequence of the first intron was evaluated. Data represent three biological and technical replicates. The graph shows mean values \pm s.d. (standard deviation). Significant differences were analysed by *t*-test. Statistical significance is indicated (**** $p < 0.0001$ or *** $p < 0.001$). (f) Gene ontology of cancer-related genes that were upregulated in the RNA-Seq and the RNAPII occupancy in ChIP-Seq data. Representative plots and graphs in panels (a) to (d) and (f) summarizing the results of two biological replicates from ChIP-Seq analysis.

but initiating RNAPII was enriched and whose transcript levels were reduced by TPL in NT and TAM cells (figure 4d; electronic supplementary material, table S2). For other genes, such as *SOX9*, the mRNA levels decreased in the presence of TPL in NT cells, but in TAM cells, TPL induced a significant increase in the RNA levels as well as an increase in RNAPII promoter occupancy of these same genes (figure 4d; electronic supplementary material, table S2). The *VEGFA* gene was overexpressed in TAM cells, with high levels of RNAPII in the body of the gene, but TPL repressed its expression, reducing the occupancy of RNAPII (figure 4d). The most intriguing response to TPL occurred in genes that were upregulated, such as *LOC730101* and *HEXIM1*, in which RNAPII occupancy on the promoter and along the body of the gene were increased (figure 4d). Interestingly, the effect of TPL on transcription induced potent overexpression of the gene that encodes for the large subunit of RNAPII (*POLR2A*) (figure 4d). We confirmed that the increase in levels of the mRNAs is due to an enhancement of transcription in response to TPL by evaluating the *novu* transcription of the first intron pre-mRNA of *POLR2A*, *CLU* and *ID2* genes by qRT-PCR (figure 4e).

Next, we performed a gene ontology analysis focusing on cancer-related genes in which RNAPII occupancy on the TSS, as well as its RNA levels, was increased (figure 4f; electronic supplementary material, table S3). A large number of genes that function as tumour and growth suppressors, such as *PHACTR4* and *ARID4A* [42,43], as well as genes that correspond to chemotherapy/radiotherapy response genes, such as *SNAI1* and *SNX1* [44,45], were overexpressed. However, a large number of genes considered as oncogenes or that promote tumour growth and/or metastasis, such as *SKI*, *EGR4*, *SNAI1* and *CEMIP2* [45–48], were also overexpressed in response to TPL (figure 4f; electronic supplementary material, table S2).

To confirm whether genes exhibiting an increase in RNAPII promoter occupancy were also overexpressed in response to TPL and for further analysis, we selected five genes with different cellular functions for qRT-PCR. The selected genes were *ID2*, a transcription factor known to participate in epithelial–mesenchymal transition [49]; *CRY2*, a circadian repressor involved in *MYC* turnover [50]; long non-coding RNA (lncRNA) *LOC730101*, which is induced

by hypoxia and has been related to metastasis [51]; and *HEXIM1*, an inhibitor of p-TEFb, linked to chemotherapy resistance and that it has been shown that also is overexpressed in response to JQ1 [52,53]. In addition, we analysed *EPAS1*, also known as *HIF-2A*, a transcription factor that responds to hypoxia, a hallmark of cancer. *EPAS1* is overexpressed in TAM cells and its transcript levels were high and maintained in cells incubated with TPL [49]. For all genes, the increase in RNA levels was confirmed (figure 5a–e). Kinetic analysis of the encoded products of these genes by Western blot confirmed that not only the accumulation of the RNA increases, but also the corresponding protein in response to TPL (figure 5f). Intriguingly, at 8 h after TPL treatment, the protein levels decline, due that most of the cells start to die. Furthermore, we verified the increase in the expression of these genes in response to TPL in other breast cancer cell lines by RT-PCR and qRT-PCR. Interestingly, these genes were also overexpressed in the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines in response to TPL, indicating that this response is not exclusive to the MCF10A-ErSrc line (electronic supplementary material, figure S7). Collectively, our results indicate that both NT and TAM cells respond to a TPL insult by inhibiting RNA transcription. Yet, despite TPL directly affects transcription initiation, and significantly reduces the levels of RNAPII as well as of the XPB–p52–p8 submodule components of TFIIH, the transcriptional stress imposed to the cells results in activation of selected genes. Among those, genes that suppress cancer growth are overexpressed, but importantly, genes that promote carcinogenesis, chemotherapy resistance and metastasis are also upregulated.

2.5. THZ1 drives a similar gene response as TPL in cancer cells

Next, we decided to explore whether incubation with THZ1 induces a similar gene response as TPL. The first approach to answer this question was to determine, by RT-PCR, the response of some of the upregulated genes in response to TPL in NT and TAM cells when incubated with THZ1. For this experiment, we used a concentration of 300 nM THZ1

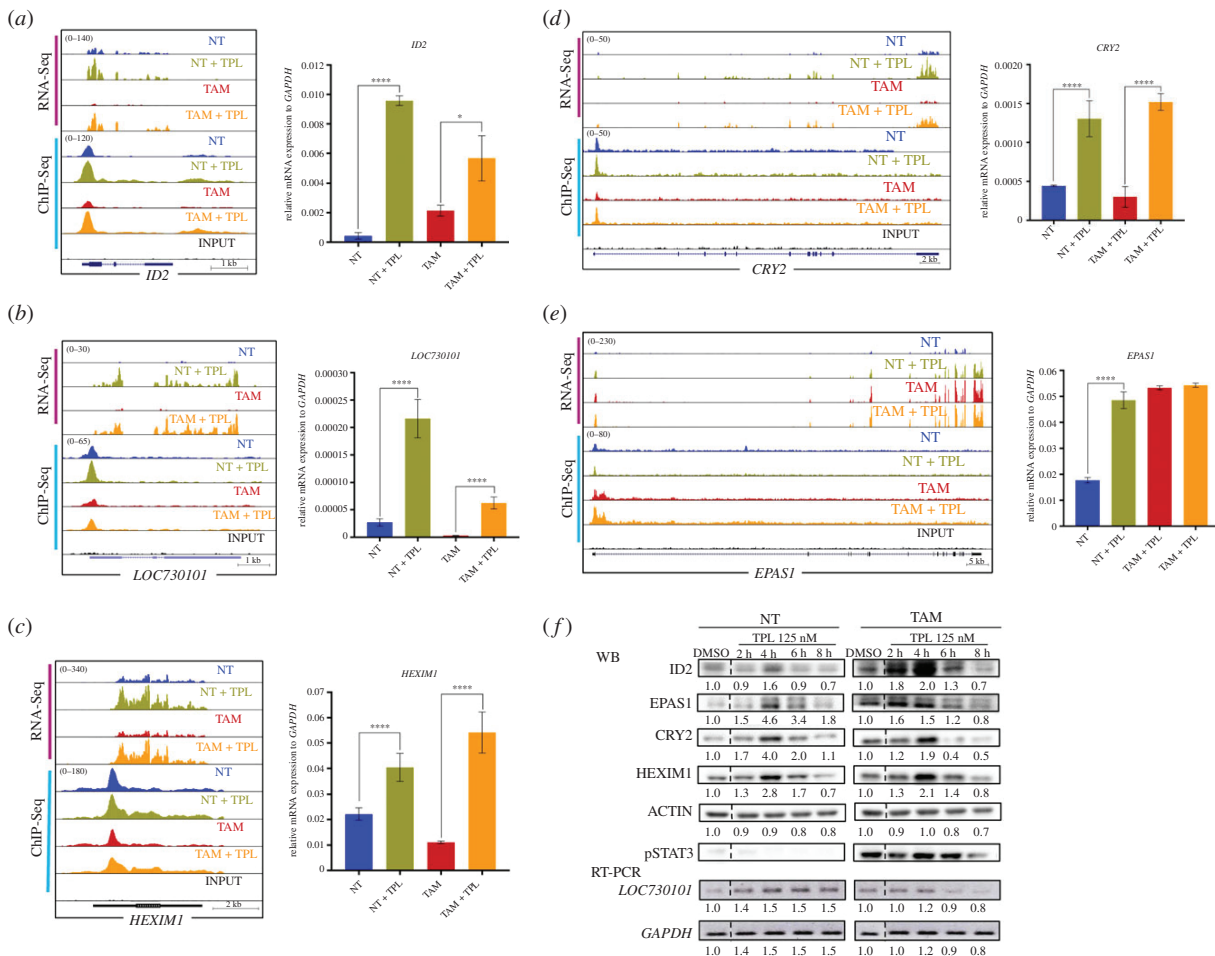


Figure 5. Analysis of overexpressed genes and its protein products in response to TPL treatment. (a) *ID2* gene, representation of the Genome Browser, RNA-Seq (pink bar) and ChIP-Seq (blue bar), comparing the NT (blue), NT + TPL (green), TAM (red), TAM + TPL (orange) and the INPUT (black). qRT-PCR corroboration is also shown. (b) lncRNA *LOC730101* representation in the Genome Browser. qRT-PCR experiments are also shown confirming the increase of this transcript after TPL treatment. (c) *HEXIM1* Genome Browser image. qRT-PCR experiments confirming *HEXIM1* overexpression by TPL. (d) *CRY2* gene increase with the TPL treatment shown in the Genome Browser image, confirmation by qRT-PCR is also shown. (e) *EPAS1* Genome Browser image and qRT-PCR corroboration. (f) Example of a time-course experiment of the overexpression of the *ID2*, *HEXIM1*, *CRY2* and *EPAS1* proteins in response to TPL by Western blot analysis. *STAT3* phosphorylated is an indicator of the transformed phenotype in TAM cells. A time-course analysis of the overexpression of the *LOC730101* lncRNA by RT-PCR is also shown. The dashed line indicates where the images were cut in order to avoid another treatment time (30 min) included in the experiment. Densitometric analyses were performed using actin or *GAPDH* as a loading control in Western blot and RT-PCR, respectively; the relative quantification is indicated under each blot and the data showed as a representative example from three biological replicates. Data from (a) to (e) represent three biological replicates. Graphs show mean values \pm s.d. (standard deviation). Significant differences were analysed by *t*-test. Statistical significance is indicated (* $p < 0.05$ or **** $p < 0.0001$).

for 2 h (figure 6a). Figure 6b shows that for *ID2*, lncRNA *LOC730101*, *HEXIM1* and *EPAS1*, there was a clear increase in the mRNA levels in NT cells incubated with THZ1 (figure 6b). In TAM and NT cells, the mRNA levels of *ID2* and the lncRNA increased and similar behaviour of *EPAS1* as that seen with TPL incubation was observed (figure 6b). By contrast, no clear increase in the *HEXIM1* transcript level was observed in TAM cells, and in all cell types, *CRY2* level remained the same in THZ1-treated cells. These results suggest that there are some similarities in the gene expression responses to TPL and THZ1 in NT and TAM cells, but that the responses are not identical.

To explore how similar the gene expression responses to TPL and THZ1 are, we used public RNA-Seq data from an oesophageal cancer cell line treated with THZ1 [54]. We found that 94 genes upregulated by TPL that correlated with an increase in the occupancy of RNAPII in the oncogenesis model used here were also upregulated by THZ1 in the

oesophageal cancer cell line (figure 6c). These results suggest that in response to transcriptional stress by either TPL or THZ1, a similar set of genes is overexpressed.

2.6. Depletion of transcripts encoded by genes overexpressed in response to transcriptional stress augments the cells sensitivity to triptolide

The fact that some genes are overexpressed in response to TPL underscored the possibility that some of them were targets for tumour cell killing. To explore the likelihood that depleting the transcripts of genes overexpressed in response to TPL potentiates the killing effect of TPL, we chose to evaluate the effect of silencing *ID2*, *CRY2*, *HEXIM1*, *LOC730101* and *EPAS1* on cell viability and proliferation. NT and TAM cells were transfected with pooled siRNAs against each of these transcripts for 24, 48 or 72 h, followed by incubation

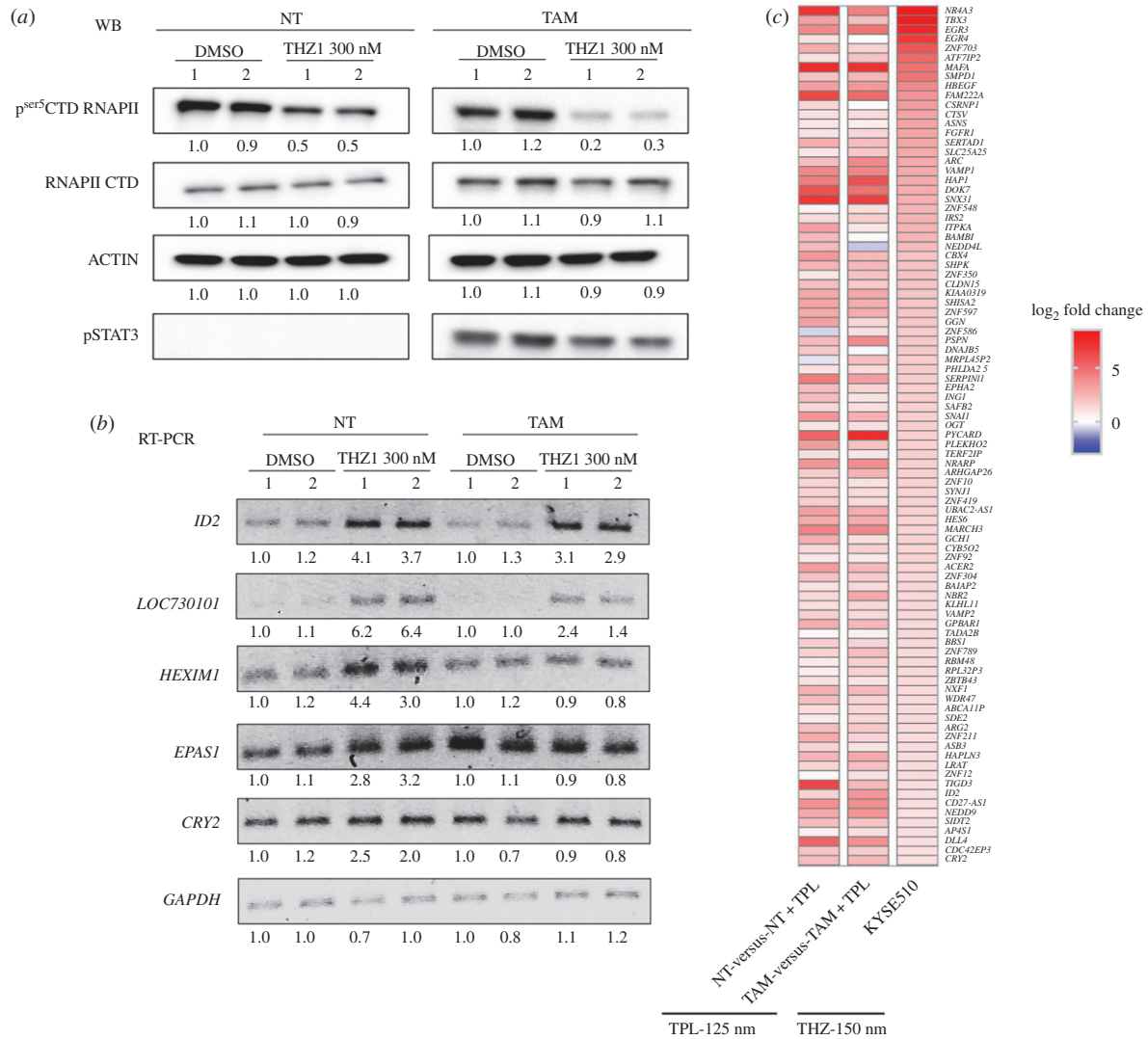


Figure 6. THZ1 generates a similar response as observed by the effect of TPL on transformed cells. (a) p^{Ser5}CTD RNAPII and RNAPII CTD levels in tamoxifen-treated (TAM) and non-treated (NT) cells treated with 300 nM of TPL for 2 h or with DMSO as control. STAT3 phosphorylated is an indicator of the transformed phenotype in TAM cells. (b) Semiquantitative RT-PCR of NT and TAM cells treated with 300 nM of THZ1 for 2 h of *ID2*, *LOC730101*, *CRY2*, *EPAS1* and *HEXIM1*. Densitometric analyses (a) and (b) were performed using actin or *GAPDH* as a loading control in western blot and RT-PCR respectively; the relative quantification is indicated under each blot and the data showed represent at less two biological replicates. (c) Comparison with published data of the THZ1 response in KYSE510 cells [54] indicating a similar response to some of the overexpressed genes after TPL treatment.

with 125 nM TPL for 4 h. Consistent with data shown above, 125 nM TPL alone or in combination with the scrambled siRNAs did not affect NT and TAM cells' survival (figure 7, middle panels). All targeted RNAs were effectively silenced by the corresponding siRNAs, with the maximum reduction at 72 h post-transfection, after that, the cells were incubated with 125 nM of TPL for 4 h and evaluated by immunoblot and flow cytometry (figure 7*a–e*, left panels). Depletion of the mRNAs encoding for *ID2*, *CRY2* and *HEXIM1* significantly reduced the viability of TPL-treated NT and TAM cells as compared to cells incubated with scrambled siRNAs or TPL alone (figure 7*a–c*, middle panels). Different from *ID2*, *CRY2*, *HEXIM1* depletion, silencing lncRNA *LOC730101* resulted in diminished cell viability, even in the absence of TPL, but the effect of silencing this lncRNA, intensified the killing capacity of TPL in both NT and TAM cells (figure 7*e*, middle panel). Surprisingly, reducing the levels of *EPAS1* (*HIF-2A*) RNA did not result in the enhanced killing capacity of TPL (figure 7*d*, middle panel). Unlike NT

cells, the majority of surviving TAM cells underwent at least one round of proliferation less than NT transformed cells following RNA silencing of all genes (including *EPAS1*) and TPL treatment, or even two (figure 7*a–e*, right panels). In summary, these results show that depletion of some genes overexpressed in response to TPL sensitizes cells to TPL treatment; therefore, these genes are possible targets to enhance the killing effect of TPL on cancer cells.

3. Discussion

The use of different chemical and physical agents is still the most common approach for killing cancer cells. The mechanism of action of chemotherapy drugs will directly kill cancer cells or stop their proliferation by inducing a cellular response linked to the mechanism of action of the drug. Substances such as TPL and THZ1 that directly impact the activities of TFIIH have a high potential for use in cancer treatment.

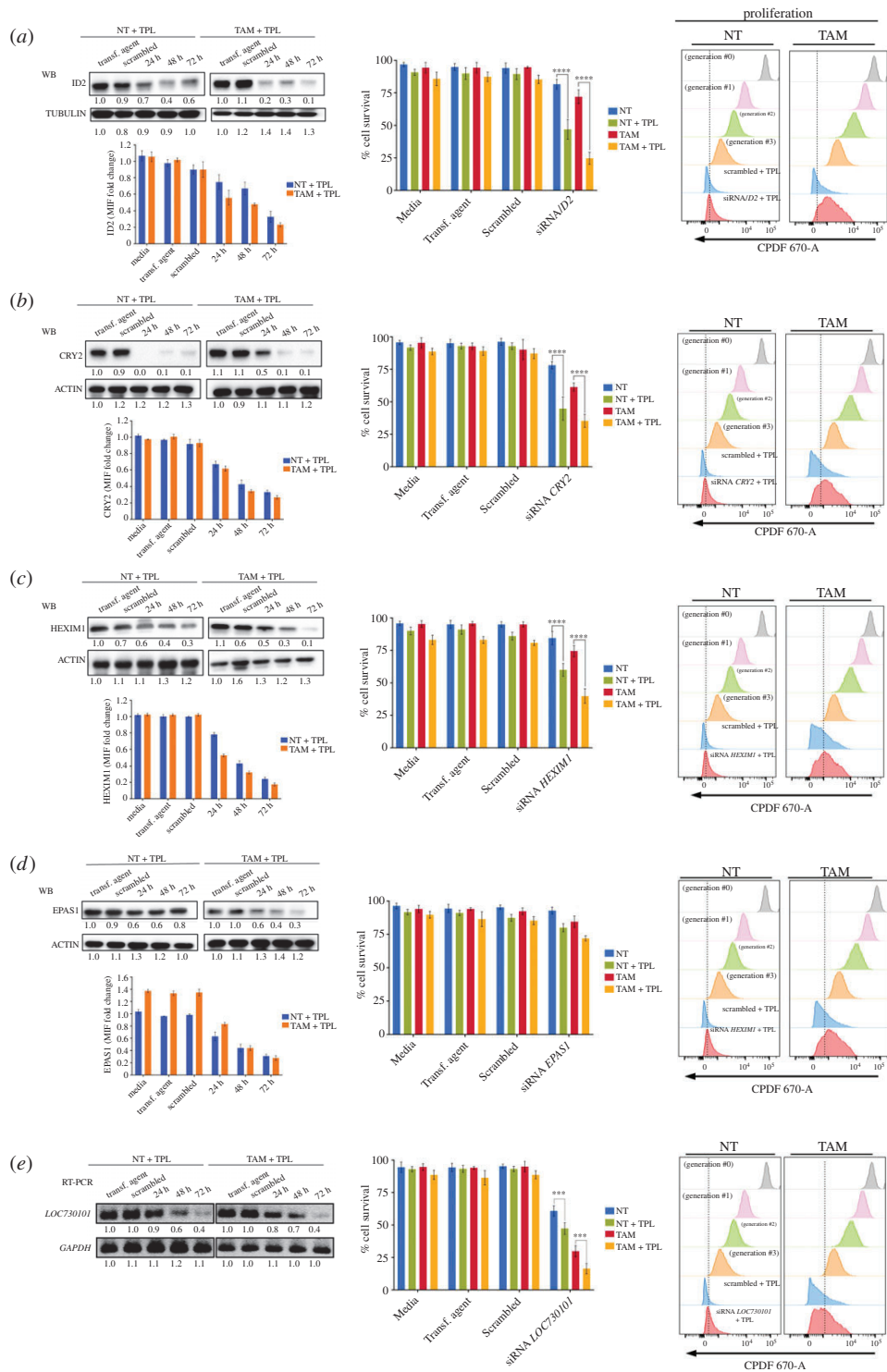


Figure 7. Depletion of transcripts of overexpressed genes by transcriptional stress enhances the sensitivity to TPL. *ID2*, *CRY2*, *HEXIM1*, *EPAS1* and *LOC730101* were depleted by incubating the corresponding siRNAs at different times. After that, the cells were incubated with 125 nM of TPL for 4 h. The depletion of each protein product was determined by Western blot analysis and by cytometry. In the case of the *LOC730101* transcript, its depletion was analysed by RT-PCR. The effect on cell survival and proliferation were also analysed by flow cytometry and the results indicated in the figure. (a) ID2 analysis. (b) CRY2 analysis. (c) HEXIM1 analysis. (d) EPAS analysis. (e) LOC730101 analysis. Cell survival and proliferation only show the effect of TPL after incubation of the corresponding siRNA by 72 h. The name of each gene is indicated in the corresponding panel. Densitometric analyses were performed using actin or *GAPDH* as a loading control in western blot and RT-PCR, respectively; the relative quantification is indicated under each blot and the data showed as a representative example from three biological replicates. Graphs show mean values \pm s.d. (standard deviation). Significant differences were analysed by *t*-test. Statistical significance is indicated (**** $p < 0.0001$ or *** $p < 0.001$).

In this study, we performed a systematic analysis of the effects and response to these drugs, primarily TPL, in the MCF10A-ErSrc oncogenesis model. Our results strongly suggest that TAM tumour cells exhibited increased sensitivity

to TPL or THZ1 as compared to their NT counterparts and that the combination of both drugs had a synergic effect on cell death. From a mechanistic point of view, we found that even though TPL and THZ1 directly affect transcription

initiation by RNAPII of the majority of genes, specific genes are overexpressed as a result of the transcriptional stress to which the cells are submitted upon treatment with these drugs, underscoring the possibility to target these genes in conjunction with TFIIF inhibitors to kill cancer cells.

In this oncogenic model, both TPL and THZ1 were found to kill cells via apoptosis, stop proliferation one replication cycle earlier in TAM cells than in NT cells and arrest cells in G₁. Co-treatment with TPL and THZ1 had a synergic effect on cell viability. Interestingly, the combination of TPL and THZ1 killed preferentially the transformed (cancerous) cells with high efficacy. These results also suggest that the simultaneous use of substances that affect different TFIIF functions is an interesting alternative to treat cancer and opens the possibility of searching for new drugs that may affect other TFIIF subunits, particularly if we consider the hepatotoxic effect of TPL and its derivatives [55].

Inhibition of transcription by TPL induces the proteasome-dependent degradation of RNAPII [56,57]. It has been proposed that TPL induces the degradation of the polymerase following phosphorylation of POLR2A, the largest subunit of RNAPII by CDK7 [56]. We report here that incubation with TPL induced the degradation not only of RNAPII but also of XPB as well as of p52 and p8, but it did not affect other TFIIF subunits. THZ1, which inhibits the kinase activity of CDK7, did not have any effect on the RNAPII and TFIIF protein levels.

It is known that the interaction of XPB with p52 and p8 modulates its ATPase activity [31,33,58], and the recently solved structure of the TFIIF core shows that the N-terminal domain of XPB and the clutch domain of p52 have a similar fold and form a symmetric dimer. This interaction is not close to the ATPase domain, suggesting that regulation of ATPase activity occurs through the combined interaction of p52 and p8 with XPB [34]. Accordingly, our findings show that the covalent binding of TPL to the ATPase domain of XPB destabilizes its interaction with p52, hindering the assembly of the subunits. Furthermore, our computational study allowed us to propose that the dissociation/degradation of the XPB-p52-p8 submodule is mainly caused by the separation of XPB HD1-HD2 induced by the presence of TPL at the domain interface. Additionally, these results suggest that in the context of TFIIF, XPB, p52 and p8 form a submodule that is stable only when the three subunits are interacting and that the other TFIIF modules are not affected in its absence. This idea is consistent with the conformation and organization model described in the recently solved structure of the TFIIF core [34].

Intriguingly, degradation of RNAPII, as well as the XPB-p52-p8 submodule was accelerated in TAM cells incubated with TPL. Thus, it is feasible the mechanism that increases the sensitivity of TAM cells to TPL is partially due to the high proliferation rate of these cells, the turnover of these proteins is not fast enough to compensate for RNAPII depletion and, as a consequence, the effect on global transcription is enhanced.

Several reports on the effect of TPL using PRO-Seq and GRO-Seq have shown that the immediate effect is the reduction in transcription initiation of at least 90% of genes [22,23]. These studies were performed after short incubation times, with extremely high concentrations (10–500 μ M) of TPL, but when the levels of RNAPII were not affected. We analysed the transcriptome of NT and TAM cells under conditions in which the levels of RNAPII were reduced by half,

with a minor effect in cell viability. However, we detected that many transcripts were downregulated and many others were upregulated. These results correlate with our data in *Drosophila*, in which both up- and downregulated transcripts were observed in p8 and p52 mutant organisms [37,38]. Interestingly, the increase in the levels of several specific genes in response to TPL also occurred in other breast cancer cell lines. In similarity with our results, it has been documented that UV irradiation causes the degradation of the RNAPII, but with the remaining RNAPII, the cell overexpresses specific genes a response to this insult. A similar situation may be operating as a response to TPL [59]. Furthermore, our ChIP-Seq results showed that the increase in the RNA levels of many genes was correlated with an increase in the occupancy of RNAPII on the corresponding promoters as well as in the gene bodies and qRT-PCR of intronic sequences confirmed that it is due to an enhancement of transcription. This is supported by the fact that the corresponding protein products of the genes analysed here also increase after the TPL treatment. An explanation for this phenomenon could be that, as recently reported [60], TPL inhibits transcription by its interaction with XPB, but if XPB is not present, then transcription is not inhibited. In support of this hypothesis, we found that TPL induced degradation of the XPB-p52-p8 submodule. Although it is feasible that under our experimental conditions, some genes were not affected by TPL, probably because some genes do not require XPB as it has been shown in yeast [15], this hypothesis is not supported by the observation that the response is the overexpression of specific genes, with a significant increase in the corresponding RNA levels and protein products. In addition, we observed that numerous genes upregulated by TPL were also upregulated in cells treated with THZ1, which inhibits CDK7 but does not affect the levels of the TFIIF subunits or RNAPII. Therefore, our data evidence that TPL and THZ1 activate a mechanism of gene response to transcriptional stress in treated cells.

TPL is a very effective substance for killing cancer cells, and related compounds are now in clinical phases of development. However, one of the problems with the use of TPL in patients is that it is highly toxic, and off-target effects cannot be ignored [20,55]. Therefore, finding new targets to enhance the effect of reduced concentrations of TPL is very attractive. Here, we analysed only five of many other possible targets found to be overexpressed in response to TPL and in four, its depletion enhances the toxic effect of TPL at low concentrations. These results suggest that many of the other gene products overexpressed in response to TPL may improve the anti-tumoural capacity of TPL, opening a new avenue to complement the attack on the transcriptional addiction of cancer cells.

Although treatment with TPL at high doses eventually killed most TAM cells, the circumstances may be different under *in vivo* conditions, and it is possible that many of the cancerous cells in the tumour are exposed to lower concentrations of TPL, allowing them to respond to transcriptional stress, by upregulating the transcription level of some of the genes we report. This gene response is relevant for the treatment of tumours by TPL or THZ1, more so considering that some genes that we found to be over-activated encode factors that promote tumourigenesis and/or metastasis and suggest that transformed cells might rapidly develop resistance to TPL/THZ inhibitors.

In conclusion, the results presented here show that cells have the capacity to respond to the transcriptional insult

caused by TPL by overexpressing some genes. Some of these genes are also overexpressed in response to THZ1, and these genes are possible targets in combination with TPL to preferentially kill cancer cells. However, this study also invokes several questions. For instance, does the depletion of genes overexpressed in response to transcriptional stress also enhance the effect of THZ1 on cancer cells? What is the mechanism that potentiates the effect of TPL by depleting genes that have different functions, such as *ID2*, *HEXIM1* and *CRY2*? Is the overexpression of some genes by TPL achieved via only one specific response pathway, or are many pathways involved? The answers to these questions will be relevant in understanding the response to chemotherapy based on transcription inhibitors used in cancer.

4. Material and methods

4.1. Cell lines

MCF10A-ERSrc cell line was donated by Dr Struhl. Cells were treated with 2 μM tamoxifen [28] and morphological transformation is observed within 36–72 h. MCF10A and MCF10A-ER-Src cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with: 5% donor horse serum (charcoal stripping fetal bovine serum was prepared following Struhl's group protocol for the MCF10AER-Src cell line (https://www.encodeproject.org/documents/ae279a0c-4d69-4d46-afa1-33d9657c0ea2/@@download/attachment/MCF-10A_Struhl_protocol.pdf), while the heat inactivated serum was employed for the MCF10A line), 20 ng ml⁻¹ epidermal growth factor, 10 μg ml⁻¹ insulin, 100 μg ml⁻¹ hydrocortisone, 1 ng ml⁻¹ cholera toxin, 1% pen/step, with the addition of puromycin (only in the line MCF10AER-Src) [28,61]. MDA-MB-231, MCF7 and HEK-293 cells lines were grown in DMEM, 10% FBS and 1% pen/step [36,62].

4.2. Chemicals

Tamoxifen, 4-Hydroxytamoxifen (Sigma, Cat. H790); Triptolide (Tocris Cat. 3253) and THZ1 (APExBIO, Cat. A8882).

4.3. Western blotting

Cell extracts were prepared as described in Gurrion *et al.* [63]. Antibodies used were: 8WG16, H14, Phospho-STAT3, TBP, CDK7, MAT1, CYCLIN H, XPB, p52, p62, XPD, p8, EPAS, ID2, CRY2, HEXIM1, ACTIN and TUBULIN (electronic supplementary material, table S4). Horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Invitrogen, 1 : 3000) were used for chemiluminescence detection through Thermo Scientific Pierce ECL. The images were taken with the Gel Doc XR+ system (Bio-Rad). Experiments were performed by at less three independent biological replicates.

4.4. RT-PCR or qRT-PCR

Total RNA was extracted with TRizol (Invitrogen) and equal quantity from each sample was used. cDNA synthesis was performed in a reaction mix containing 1 μg of total RNA, oligo-dT, random primer and M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). For the intron cDNA same condition were used, except for 3 μg of total RNA and specific oligo. qPCR analyses were performed with LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR

Green I and the LightCycler 1.5 Instrument (Roche). Relative expression level of each analysed gene was calculated by $2^{-\Delta\text{Ct}}$, where $\Delta\text{Ct} = (\text{Ct target gene} - \text{Ct control gene})$, using *GAPDH* as an internal control [64]. Transcript abundance quantification and DNA number copies were measured by triplicate and three independent biological replicates were analysed. Primers are described in electronic supplementary material, table S4.

4.5. siRNA assays

siRNA-silencing was performed according to Dharmacon instructions. The siRNAs used were: *CRY2* (Cat. L-014151-01-0010), *EPAS1* (Cat. L-004814-00-0010), *HEXIM1* (Cat. L-012225-01-0010), *ID2* (Cat. L-009864-00-0010), *LOC730101* (Cat. R-189565-00-0010) and Scrambled (Cat. D-001810-10-20). siRNAs were used in a 25 and 50 nM final concentration for 24–72 h and then mRNA or protein analysis were performed by western blot and flow cytometry. Experiments were performed by at less three independent biological replicates.

4.6. Flow cytometry

For proliferation assays, cells were loaded with the Cell Proliferation Dye eFluor 670 (Invitrogen, Cat. 65-0840). Viability and Apoptosis assays were according to manufacture: Fixable Viability Dye eFluor 780 (Invitrogen, Cat. 65-0865) and Biolegend Pacific Blue Annexin V or FITC Annexin V (Bio-Legend, Cat. 640918 or Cat. 640906, respectively). Intracellular protein staining was performed as previously described [65]. Cell cycle assays were performed staining the cells with DAPI 5 μg ml⁻¹ in PBS for 30 min at 37°C. Samples were acquired on a BD FACSCanto II or BD FACs Aria Fusion flow cytometer with the BD FACSDiva software and analysed using the FlowJo v10.5.3. Experiments were performed by three independent biological replicates.

Cell viability data was analysed for cooperative effects between TPL and THZ1 using the method implemented by Chou & Talalay [30,66]. CI and Fa values were calculated using CompuSyn software (available for free download from www.combosyn.com). CI values = 1 indicate an additive effect, and C < 1 and C1 > 1 indicate synergism and antagonism, respectively.

4.7. Split-GFP assays

Plasmids pCNV_GFP1-9-OPT, pcDNA_GFP10-GCN4 and pcDNA_GCN4-GFP11, were donated by Dra. Cabantous [36]. Stable transfection was performed in the HEK-293 cells of pCNV_GFP1-9-OPT plasmid using lipofectamine 3000. GCN4 sequences were removed with the restriction enzymes *BspEI*:*XbaI* for pcDNA_GFP10-GCN4 and *NotI*:*ClaI* for pcDNA_GFP11-GCN4. *p52* (NM_001517) and *XPB* (NM_000122) were amplified from cDNA and inserted into *MreI*:*XbaI* and *NotI*:*ClaI* cloning sites of pcDNA_GFP10 and pcDNA_GFP11 vectors, respectively.

HEK-293_GFP1-9 cells were co-transfected with 1.5 mg of each plasmid: p52-GFP10 and GFP11-XPB. Thirty-six hours after transfection, cells were visualized in the Olympus FV1000 Multi-photon confocal microscope 60X. On the other hand, TPL at different concentration was added to co-transfected cells 8 h later and 36 h afterwards cells were stained for viability. As negative control the plasmids GCN4-GFP10

and GFP11-GCN4 with the same conditions were used. Experiments were performed by at least three independent biological replicates.

4.8. RNA-Seq and bioinformatic analysis

Here 8×10^6 cells were treated with TPL 125 nM or DMSO 4 h. Experiments were performed by two independent biological replicates. Total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. Poly-A enriched RNA was sequenced using Illumina HiSeq™ 2000 by the Beijing Genomics Institute (BGI). Briefly, mRNA enrichment was performed using oligo(dT), mRNA was fragmented and were used as template for the synthesis of cDNA by reverse transcription. The Agilent 2100 Bioanalyzer and ABI StepOne-Plus Real-Time PCR System were used in quantification and qualification of the sample libraries. Libraries were sequenced in Illumina HiSeq2000. Bowtie2 v. 0.9.6 [67], was used to map clean reads to reference gene and BWA v. 0.7.13 [68] to reference genome *hg19*. Sequencing reads were checked with FastQC v. 0.11.7. Expression levels were quantified using FPKM by RSEM v. 1.3.0 [69]. Differential expression data were filtered using $FDR \leq 0.001$ [70], and $\log_2 FC \geq 1.2$. Gene expression analyses were performed using scripts in R v. 3.5.1. Analysis details are available upon request.

4.9. ChIP-Seq and bioinformatic analysis

Cells were treated with TPL 125 nM or DMSO for 4 h. ChIP-Seq was performed according to a previously published protocol [71] and experiments were performed by two independent biological replicate (electronic supplementary material, figure S6). Briefly, cells were cross-linked with 1% PFA at room temperature for 10 min and sonicated for 11 cycles (30 s ON/OFF, Diagenode Bioruptor Pico bath sonicator). 5% of the lysate was reserved as Input. Lysate was incubated with 5 mg of the antibody (8WG16) or irrelevant rabbit IgG (Invitrogen). Library construction and Illumina sequencing were performed using Illumina HiSeq SE50 platform at BGI.

Briefly, data filtering included removing adaptor sequences, contamination and low-quality reads from raw reads by BGI programs, like SOAPnuke filter. Clean data were mapped to the reference genome (*hg19*) by SOAPaligner/SOAP2 [72]. MACS2 v. 1.4.2 [73] was used to call peaks and generate Bedgraph files that show fold change enrichment over input. Bedgraph files were then converted into BigWig files and uploaded to UCSC Genome Browser for visualization.

HOMER (Next-Generation Sequencing Analysis; *annotatePeaks.pl*) [74] was used to annotate the peaks to the genome.

Difference in RNAPII enrichment between TPL-treated and control cells we performed a differential binding analysis using HOMER (*getDiffExpression.pl*). Differential expression data were filtered using $\log_2 FC \geq 1$. Graphic representation of the data was performed using R v. 3.5.1 and GraphPad Prism v. 7. Analysis details are available upon request.

4.10. Correlation of ChIP-Seq and RNA-Seq analysis

To perform a correlation between RNA-Seq and ChIP-Seq analyses, we considerate only the RNAPII peaks located a ± 1 kb window spanning the Transcription Start Site (TSS). Differential expression data were filtered using $\log_2 FC \geq 1$ for ChIP-Seq and $\log_2 FC \geq 1.2$ for RNA-Seq. Graph was made GraphPad Prism (figure 4c). Correlation value (CV) represents the similarity degree between ChIP-Seq and RNA-Seq data.

Accession number for raw and processed ChIP-Seq and RNA-Seq data reported in this paper is GEO: GSE135256.

4.11. Molecular dynamics

The cryo-electron microscopy structure of *Homo sapiens* TFIIF (PDB ID: 6NMI [34]) was retrieved from the Protein Data Bank (figure 2b). The isolated XPB-p52-p8 submodule was employed to perform the covalent docking of the optimized TPL structure into Cys342 residue of the XPB component employing the AutoDock v4.2 [75]. The Apo and two holo (TPL-bound) forms of XPB-p52-p8 submodule were submitted to 100 ns all-atom molecular dynamics (MD) simulations using the CHARMM36 force field [76] implemented in the GROMACS 5.1.4 package [77]. (For more details, see electronic supplementary material, *methods* and electronic supplementary material table S5.)

Data accessibility. Accession number for raw and processed ChIP-seq and RNA-seq data reported in this paper is GEO: GSE135256.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. This work was supported by the CONACyT grant no. 1977-Problemáticas Nacionales program, PAPPIT/UNAM grant no. IN200315 and CONACyT no. 25088 to MZ. M.U.-A. received a scholarship from CONACyT (414127), as a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas at the Universidad Nacional Autónoma de México.

Acknowledgements. We thank Arturo Pimentel, Andres Saralegui, Chris Wood and the National Laboratory of Advance Microscopy at the Instituto de Biotecnología/UNAM for advice in the use of the confocal microscopes. L.D. thanks the Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación for the support received in the use of the HP Cluster Platform 3000SL supercomputer (LANCAD-UNAM-DGTIC-306).

References

- Bradner JE, Hnisz D, Young RA. 2017 Review transcriptional addiction in cancer. *Cell* **168**, 629–643. (doi:10.1016/j.cell.2016.12.013)
- Villicaña C, Cruz G, Zurita M. 2014 The basal transcription machinery as a target for cancer therapy. *Cancer Cell Int.* **14**, 18. (doi:10.1186/1475-2867-14-18)
- Schilbach S, Hantsche M, Tegunov D, Dienemann C, Wigge C, Urlaub H, Cramer P. 2017 Structures of transcription pre-initiation complex with TFIIF and Mediator. *Nature* **551**, 204–209. (doi:10.1038/nature24282)
- Adelman K, Lis JT. 2012 Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 720–731. (doi:10.1038/nrg3293)
- Liu X, Kraus WL, Bai X. 2015 Ready, pause, go: Regulation of RNA polymerase II pausing and release by cellular signaling pathways. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 516–525. (doi:10.1016/j.tibs.2015.07.003)
- Bowman EA, Kelly WG. 2014 RNA Polymerase II transcription elongation and Pol II CTD Ser2 phosphorylation: a tail of two kinases. *Nucl. (United States)* **5**, 224–236. (doi:10.4161/nucd.29347)
- Jonkers I, Lis JT. 2015 Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat.*

- Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 167–177. (doi:10.1038/nrm3953)
8. Berico P, Coin F. 2018 Is TFIIH the new Achilles heel of cancer cells? *Transcription* **9**, 47–51. (doi:10.1080/21541264.2017.1331723)
 9. Zurita M, Cruz-Becerra G. 2016 TFIIH: new discoveries regarding its mechanisms and impact on cancer treatment. *J. Cancer* **7**, 2258–2265. (doi:10.7150/jca.16966)
 10. Compe E, Egly J-M. 2016 Nucleotide excision repair and transcriptional regulation: TFIIH and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 265–290. (doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014857)
 11. Compe E, Egly JM. 2012 TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 343–354. (doi:10.1038/nrm3350)
 12. Fisher RP. 2019 Cdk7: a kinase at the core of transcription and in the crosshairs of cancer drug discovery. *Transcription* **10**, 47–56. (doi:10.1080/21541264.2018.1553483)
 13. Coin F, Egly JM. 2015 Revisiting the function of CDK7 in transcription by virtue of a recently described TFIIH kinase inhibitor. *Mol. Cell.* **59**, 513–524. (doi:10.1016/j.molcel.2015.08.006)
 14. Nilson KA, Guo J, Turek ME, Brogie JE, Delaney E, Luse DS, Price DH. 2015 THZ1 reveals roles for Cdk7 in co-transcriptional capping and pausing. *Mol. Cell* **59**, 576–587. (doi:10.1016/j.molcel.2015.06.032)
 15. Dienemann C, Schwab B, Schilbach S, Cramer P. 2019 Promoter distortion and opening in the RNA polymerase II cleft. *Mol. Cell* **73**, 97–106. (doi:10.1016/j.molcel.2018.10.014)
 16. Greber BJ, Nguyen THD, Fang J, Afonine PV, Adams PD, Nogales E. 2017 The cryo-electron microscopy structure of human transcription factor IIH. *Nature* **549**, 414–417. (doi:10.1038/nature23903)
 17. Christensen CL *et al.* 2014 Targeting transcriptional addictions in small cell lung cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Cancer Cell* **26**, 909–922. (doi:10.1016/j.ccell.2014.10.019)
 18. Zeng M *et al.* 2018 Targeting MYC dependency in ovarian cancer through inhibition of CDK7 and CDK12/13. *Elife* **7**, 1–20. (doi:10.7554/elife.39030)
 19. Titov DV *et al.* 2011 XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 182–188. (doi:10.1038/nchembio.522)
 20. Noel P, Von Hoff DD, Saluja AK, Velagapudi M, Borazanci E, Han H. 2019 Triptolide and its derivatives as cancer therapies. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 327–341. (doi:10.1016/j.tips.2019.03.002)
 21. Minneamrita Therapeutics 2017 A phase II, international open label trial of Minnelide™ in patients with refractory pancreatic cancer (MinPAC). See <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03117920> (accessed on 29 January 2020).
 22. Henriques T, Gilchrist DA, Nechaev S, Bern M, Muse GW, Burkholder A, Fargo DC, Adelman K. 2013 Stable pausing by RNA polymerase II provides an opportunity to target and integrate regulatory signals. *Mol. Cell* **52**, 517–528. (doi:10.1016/j.molcel.2013.10.001)
 23. Jonkers I, Kwak H, Lis JT. 2014 Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *Elife* **3**, 1–25. (doi:10.7554/elife.02407)
 24. Rimel JK, Taatjes DJ. 2018 The essential and multifunctional TFIIH complex. *Protein Sci.* **27**, 1018–1037. (doi:10.1002/pro.3424)
 25. He J, Peng T, Peng Y, Ai L, Deng Z, Wang X, Tan W. 2020 Molecularly engineering triptolide with aptamers for high specificity and cytotoxicity for triple-negative breast cancer. *Chem. New Front.* **5**, 7–11. (doi:10.1021/jacs.9b10510)
 26. Giri B *et al.* 2019 Pre-clinical evaluation of Minnelide as a therapy for acute myeloid leukemia. *J. Transl. Med.* **17**, 1–9. (doi:10.1186/s12967-019-1901-8)
 27. Acikgoz E, Tatar C, Oktm G. 2020 Triptolide inhibits CD133⁺/CD44⁺ colon cancer stem cell growth and migration through triggering apoptosis and represses epithelial-mesenchymal transition via downregulating expressions of snail, slug, and twist. *J. Cell. Biochem.* **121**, 3313–3324. (doi:10.1002/jcb.29602)
 28. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. 2009 An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* **139**, 693–706. (doi:10.1016/j.cell.2009.10.014)
 29. Iliopoulos D, Rotem A, Struhl K. 2011 Inhibition of miR-193a expression by max and RXR α activates K-ras and PLAU to mediate distinct aspects of cellular transformation. *Cancer Res.* **71**, 5144–5153. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0425)
 30. Chou TC, Talalay P. 1984 Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzym. Regul.* **22**, 27–55. (doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4)
 31. Fregoso M, Laine J-P, Aguilar-Fuentes J, Mocquet V, Reynaud E, Coin F, Egly J-M, Zurita M. 2007 DNA repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the *Drosophila* p52 subunit of TFIIH generate developmental defects and chromosome fragility. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3640–3650. (doi:10.1128/mcb.00030-07)
 32. Kwiatkowski N *et al.* 2014 Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* **511**, 616–620. (doi:10.1038/nature13393)
 33. Coin F, Oksenysh V, Egly JM. 2007 Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol. Cell* **26**, 245–256. (doi:10.1016/j.molcel.2007.03.009)
 34. Greber BJ, Toso DB, Fang J, Nogales E. 2019 The complete structure of the human TFIIH core complex. *Elife* **8**, 1–29. (doi:10.7554/elife.44771)
 35. He QL, Titov DV, Li J, Tan M, Ye Z, Zhao Y, Romo D, Liu JO. 2015 Covalent modification of a cysteine residue in the XPB subunit of the general transcription factor TFIIH through single epoxide cleavage of the transcription inhibitor triptolide. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 1859–1863. (doi:10.1002/anie.201408817)
 36. Cabantous S *et al.* 2013 A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Sci. Rep.* **3**, 1–9. (doi:10.1038/srep02854)
 37. Cruz-Becerra G, Juárez M, Valadez-Graham V, Zurita M. 2016 Analysis of *Drosophila* p8 and p52 mutants reveals distinct roles for the maintenance of TFIIH stability and male germ cell differentiation. *Open Biol.* **6**, e160222. (doi:10.1098/rsob.160222)
 38. Cruz-Becerra G, Valerio-Cabrera S, Juárez M, Bucio-Mendez A, Zurita M. 2018 TFIIH is highly dynamic during zygotic genome activation in *Drosophila* and its depletion causes catastrophic mitosis. *J. Cell Sci.* **131**, jcs.211631. (doi:10.1242/jcs.211631)
 39. Ji Z, He L, Rotem A, Janzer A, Cheng CS, Regev A, Struhl K. 2018 Genome-scale identification of transcription factors that mediate an inflammatory network during breast cellular transformation. *Nat. Commun.* **9**, 2068. (doi:10.1038/s41467-018-04406-2)
 40. Chen F, Gao X, Shilatfard A, Shilatfard A. 2015 Stably paused genes revealed through inhibition of transcription initiation by the TFIIH inhibitor triptolide. *Genes Dev.* **29**, 39–47. (doi:10.1101/gad.246173.114)
 41. Erickson B, Sheridan RM, Cortazar M, Bentley DL. 2018 Dynamic turnover of paused pol II complexes at human promoters. *Genes Dev.* **32**, 1215–1225. (doi:10.1101/gad.316810.118)
 42. Hurst DR *et al.* 2008 Alterations of BRMS1-ARID4A interaction modify gene expression but still suppress metastasis in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 7438–7444. (doi:10.1074/jbc.M709446200)
 43. Solimini NL, Liang AC, Xu C, Pavlova NN, Xu Q, Davoli T, Li MZ, Wong K-K, Elledge SJ. 2013 STOP gene Phactr4 is a tumor suppressor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, E407–E414. (doi:10.1073/pnas.1221385110)
 44. Jiang B *et al.* 2019 TOX3 inhibits cancer cell migration and invasion via transcriptional regulation of SNAI1 and SNAI2 in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* **449**, 76–86. (doi:10.1016/j.canlet.2019.02.020)
 45. Ju W, Yoo BC, Kim I-J, Kim JW, Kim SC, Lee HP. 2009 Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high-density oligonucleotide microarrays. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* **18**, 47–56. (doi:10.3727/096504009789954672)
 46. Jung HY, Fattet L, Tsai JH, Kajimoto T, Chang Q, Newton AC, Yang J. 2019 Apical-basal polarity inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis by PAR-complex-mediated SNAI1 degradation. *Nat. Cell Biol.* **21**, 359–371. (doi:10.1038/s41556-019-0291-8)
 47. Lee H, Goodarzi H, Tavazoie SF, Alarcón CR. 2016 TMEM2 is a SOX4-regulated gene that mediates metastatic migration and invasion in breast cancer. *Cancer Res.* **76**, 4994–5005. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2322)
 48. Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, Yoshimaru T, Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, Katagiri T. 2014 Early growth response 4 is involved in cell

- proliferation of Small cell lung cancer through transcriptional activation of its downstream genes. *PLoS ONE* **9**, e113606. (doi:10.1371/journal.pone.0113606)
49. Zeng S *et al.* 2017 BMP4 promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by an induction of epithelial–mesenchymal transition via upregulating ID2. *Cancer Lett.* **390**, 67–76. (doi:10.1016/j.canlet.2016.12.042)
 50. Huber AL *et al.* 2016 CRY2 and FBXL3 cooperatively degrade c-MYC. *Mol. Cell* **64**, 774–789. (doi:10.1016/j.molcel.2016.10.012)
 51. Li S, Hu K, Chen S, Liu S, Wang Y. 2018 High expression of long non-coding RNA LOC730101 correlates with distant metastasis and exhibits a poor prognosis in patients with osteosarcoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**, 4115–4120.
 52. Bowry A, Piberger AL, Rojas P, Saponaro M, Bowry A, Piberger AL, Rojas P, Saponaro M, Petermann E. 2018 Report BET inhibition induces HEXIM1- and RAD51-dependent conflicts between transcription and replication. *CellReports* **25**, 2061–2069. (doi:10.1016/j.celrep.2018.10.079)
 53. Ketchart W, Ogba N, Kresak A, Albert JM, Pink JJ, Montano MM. 2011 HEXIM1 is a critical determinant of the response to tamoxifen. *Oncogene* **30**, 3563–3569. (doi:10.1038/onc.2011.76)
 54. Jiang YY *et al.* 2017 Targeting super-enhancer-associated oncogenes in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut* **66**, 1358–1368. (doi:10.1136/gutjnl-2016-311818)
 55. Song W, Liu M, Wu J, Zhai H, Chen Y, Peng Z. 2018 Preclinical pharmacokinetics of triptolide: a potential antitumor drug. *Curr. Drug Metab.* **20**, 147–154. (doi:10.2174/1389200219666180816141506)
 56. Manzo SG, Zhou ZL, Wang YQ, Marinello J, He JX, Li YC, Ding J, Capranico G, Miao ZH. 2012 Natural product triptolide mediates cancer cell death by triggering CDK7-dependent degradation of RNA polymerase II. *Cancer Res.* **72**, 5363–5373. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1006)
 57. Wang Y, Lu JJ, He L, Yu Q. 2011 Triptolide (TPL) inhibits global transcription by inducing proteasome-dependent degradation of RNA polymerase II (Pol II). *PLoS ONE* **6**, e23993. (doi:10.1371/journal.pone.0023993)
 58. Kainov DE, Vitorino M, Cavarelli J, Poterszman A, Egly JM. 2008 Structural basis for group A trichothiodystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 980–984. (doi:10.1038/nsmb.1478)
 59. Williamson L *et al.* 2017 UV irradiation induces a non-coding RNA that functionally opposes the protein encoded by the same gene. *Cell* **168**, 843–855. (doi:10.1016/j.cell.2017.01.019)
 60. Alekseev S, Nagy Z, Sandoz J, Weiss A, Egly JM, Le May N, Coin F. 2017 Transcription without XPB establishes a unified helicase-independent mechanism of promoter opening in eukaryotic gene expression. *Mol. Cell* **65**, 504–514. (doi:10.1016/j.molcel.2017.01.012)
 61. Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. 2003 Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* **30**, 256–268. (doi:10.1016/S1046-2023(03)00032-X)
 62. Neve RM *et al.* 2006 A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* **10**, 515–527. (doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008)
 63. Gurrión C, Oriostegui M, Zurita M. 2017 Heterochromatin reduction correlates with the increase of the KDM4B and KDM6A demethylases and the expression of pericentromeric DNA during the acquisition of a transformed phenotype. *J. Cancer* **8**, 2866–2875. (doi:10.7150/jca.19477)
 64. Schmittgen TD, Livak KJ. 2008 Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3**, 1101–1108. (doi:10.1038/nprot.2008.73)
 65. Holmes KL, Otten G, Yokoyama WM. 2001 Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACS Calibur. In *Current protocols in immunology*, vol. 49, pp. 5.4.1–5.4.22. Chichester, UK: John Wiley.
 66. Chou T. 2007 Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* **58**, 621–681. (doi:10.1124/pr.58.3.10)
 67. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009 Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25. (doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25)
 68. Li H, Durbin R. 2009 Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760. (doi:10.1093/bioinformatics/btp324)
 69. Li B, Dewey CN. 2011 RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323.
 70. Benjamini Y, Yekutieli D. 2001 The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Stat.* **29**, 1165–1188. (doi:10.1214/aos/1013699998)
 71. Liang K *et al.* 2017 Therapeutic targeting of MLL degradation pathways in MLL-rearranged leukemia. *Cell* **168**, 59–72. (doi:10.1016/j.cell.2016.12.011)
 72. Li R, Yu C, Li Y, Lam T, Yiu S, Kristiansen K, Wang J. 2009 SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* **25**, 1966–1967. (doi:10.1093/bioinformatics/btp336)
 73. Zhang Y *et al.* 2008 Open access model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* **9**, R137. (doi:10.1186/gb-2008-9-9-r137)
 74. Heinz S *et al.* 2010 Article simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *MOLCELL* **38**, 576–589. (doi:10.1016/j.molcel.2010.05.004)
 75. Bianco G, Forli S, Goodsell DS, Olson AJ. 2016 Covalent docking using autodock: two-point attractor and flexible side chain methods. *Protein Sci.* **25**, 295–301. (doi:10.1002/pro.2733)
 76. Huang J, MacKerell Jr AD. 2013 CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **34**, 2135–2145. (doi:10.1002/jcc.23354)
 77. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. 2015 GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25. (doi:10.1016/j.softx.2015.06.001)

Research Paper

Heterochromatin Reduction Correlates with the Increase of the KDM4B and KDM6A Demethylases and the Expression of Pericentromeric DNA during the Acquisition of a Transformed Phenotype

Cinthya Gurrion, Maritere Uriostegui and Mario Zurita[✉]

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 62250 Cuernavaca Morelos, México

✉ Corresponding author: email: marioz@ibt.unam.mx

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2017.02.03; Accepted: 2017.06.04; Published: 2017.08.24

Abstract

Cancer cells have alterations in chromatin organization, mostly a reduction in heterochromatin. How this process occurs during transformation and if it participates in the maintenance of a cancerous phenotype is not well understood. Here, using a transformation-inducible cell line, we analyzed the changes that occur in heterochromatin during transformation to a cancerous phenotype. After transformation, there is a reduction in heterochromatin bodies and a nuclear reorganization of HP1 α . These occurrences correlate with reductions in H3K9me3 and H3K27me3 levels and with some of the enzymes that introduce these modifications. At the same time, there are increases in the KDM4B and KDM6A/UTX demethylases and an enhancement in the transcription of pericentromeric DNA that correlate with the reduction of H3K9me3 and the recruitment of KDM4B to these elements. The depletion of KDM4B and KDM6A/UTX has a more deleterious effect in transformed cells than in their progenitors, suggesting an important role for these enzymes in the survival of cancerous cells. These results provide new insights into heterochromatin dynamics during transformation to a cancerous phenotype as well as some of the participating mechanisms.

Key words: Heterochromatin; Histone demethylases; Satellite DNA; Transformation.

Introduction

Constitutive heterochromatin, the most condensed form of chromatin, is present in human cells, particularly in the pericentromeric and subtelomeric regions as well as in repetitive elements along the genome. This kind of heterochromatin is enriched in nucleosomes that contain Histone 3 trimethylated at lysine 9 (H3K9me3), which is recognized by Heterochromatic Protein 1 proteins (HP1 α , β and γ) [1]. Tri-methylation of H3K9 is conducted by Suppressors of Variegation 3-9 Homologs 1 and 2 (SUV3-9H-1 and SUV3-9H-2) enzymes [2]. Conversely, facultative heterochromatin is present in genes that are not expressed in particular

moments of development or in specific cell types [3]. Tri-methylation of Lysine 27 of H3 (H3K27me3) is a histone mark in genes that is characteristic of this type of heterochromatin. This modification is introduced by the action of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), whose methyl transferase activity is present in its Ezh1 or Ezh2 enzymes [4, 5]. These modifications are reversible since histone demethylases that remove these specific marks have been identified. H3K9me3 can be demethylated by the KDM4A, KDM4B and KDM4C enzymes, and these enzymes also demethylate H3K36 and H1K26 [6]. H3K27me3 can be demethylated by the action of the

UTX/KDM6A and KDM6B demethylases [7]. These enzymes are α -ketoglutarate-dependent dioxygenases that belong to the Jumonji family of demethylases [6, 8].

It is well documented that the chromatin in cancer cells has different features than in normal differentiated cells [9]. In general, it is less condensed and has broad changes in DNA methylation, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3, and histone acetylation [9]. This is linked to changes in the levels of methylation-modifying enzymes. For example, there is evidence suggesting that UTX/KDM6A may act as a tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia, but the demethylation activity of UTX/KDM6A is required for tumor maintenance through the activation of the NOTCH pathway and Rb dependent tumors [10-12]. It is also known that the loss of heterochromatin in cancer cells, in particular pericentromeric and telomeric chromatin, causes an increase in genome instability that favors the generation of aneuploidy, thus increasing the diversity of tumor cells [13,14]. Furthermore, there are several reports that show that the KDM4A, KDM4B and KDM4C demethylases are overexpressed in different kinds of cancer and are required for maintaining the cancerous phenotype [15].

Although it is evident that heterochromatin undergoes dramatic changes during the generation of a cancer cell, how these alterations occur during the transformation to this phenotype is not well understood. A model is needed to study chromatin changes wherein the transformation to a cancerous phenotype occurs through incubation with an inducer in a cell line that it is immortalized but not cancerous; the MCF10-Er-Src line is such a model [16]. In this model, a transformed phenotype is generated by the transient expression of Src, which induces the epigenetic switch from an immortalized human breast cell line to a stable and highly malignant transformed cell line [16]. In fact this cell line has been acceptable used as a model of oncogenesis in a variety of studies [16-19]. Using this system, we analyzed the broad heterochromatin changes that occur during cell transformation to a cancerous phenotype. After transformation, there is a reduction in heterochromatin centers as well as changes in HP1 α distribution. These changes correlate with a reduction in the global levels of H3K9me3 and H3K27me3, an increase in the KDM4B and KDM6A/UTX histone demethylases and a decrease in the total levels of SUVAR39H1 as well as the components of the PRC2 complex. Furthermore, pericentromeric sequences increase transcription, correlating with a reduction in H3K9me3 and the recruitment of the KDM4B histone

demethylase in these sequences. The depletion of these demethylases compromises the transformed cells. These results indicate that after the induction of a transformed phenotype, there is a reduction in heterochromatin that correlates with changes in the expression of histone modifying enzymes, allowing an increase in the transcription of heterochromatic sequences.

Materials and Methods

Cell cultures

The cell line MCF10A ER-Src was kindly donated by Dr. Kevin Struhl (Harvard Medical School). Treatment of such cells with tamoxifen (TAM) rapidly induces Src and morphological transformation is observed within 24-36 hours [16, 20]. MCF-10A ER-Src cells were cultured as indicated in [16]. Cells were treated with 1 μ M tamoxifen when 80% confluent for transformation. MDA-MB-231 and MCF7 breast cancer cell lines were grown in DMEM, 10% FBS and pen/step.

Western blot analysis

Nuclear extracts were prepared as described in [21]. Cells were washed twice with PBS1X and then resuspended and incubated for 15' in cold lysis buffer A plus inhibitors, followed by adding 10% Triton X100, cytoplasmic lysates were cleared by centrifugation. The pellet was resuspended and incubated for 15' in Nuclear Lysis Buffer (NLB), and then a spin down at high speed was necessary for recovering the nuclear proteins [21]. The proteins were quantitated and separated in SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes, following overnight blocking with 10-20% non-fat milk at 4°C. Membranes were incubated with the primary antibody at different dilutions at room temperature for 2 h and then incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature and detected by Chemiluminescence (Thermo scientific). Antibodies used were: HP1 α (ab77256-abcam), H3K9me3 (07-442-millipore), H3K9me2 (ab1220-abcam), H3K9ac (ab4441-abcam), H3K27me3 (ab6002-abcam), KDM4A (PA5-25057-thermo scientific), KDM4B (ab27531-abcam), KDM4C (PA5-23065-thermo-scientific), KDM6A/UTX (ABE409-millipore), EZH2 (MABE362-millipore), SUZ12 (sc-46264-Santa Cruz) H3 (ab1791-abcam), Actin (JLA20-C-DSHB), Tubulin (E7-C- DSHB).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

ChIP assays were performed as described in ChIP assay kit (Upstate Biotech). For each condition 2

mg of soluble chromatin fragments of 250–500 bp in length were incubated with 50 µg of Dynabeads for 2–4h at 4° C in rotation. The dynabeads were discarded and the pre-cleared chromatin was incubated with 2 µg of anti-H3K9me3 or anti-KDM4B antibodies [22] and rabbit anti-IgG antibody for 16 h at 4 °C. To recover the DNA-protein complexes, 25 µg of Dynabeads were added (previously blocked). Reverse cross-linking was performed by incubation at 65°C for 12h, followed by 4°C incubation for 10 min. Samples were treated with RNase A for 1 h at 37 °C proteinase K was added and incubated for 2 h at 42 °C. DNA fragments were purified and resuspended in water.

Immunofluorescence

40–50% confluent cells were cultured on Nunc-Lab-TekII Chamber Slides. The immunofluorescences were performed according to the manufacturer's instructions (<http://www.abcam.com/protocols/immunocytochemistry-immunofluorescence-protocol>). Cells were incubated overnight with the corresponding antibodies. The chambers were washed six times with PBS1X and incubated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibodies. Nuclei were stained with Hoechst (dilution 1:20000) for 10 min. Samples were examined with Confocal Olympus FV1000 multi-photon microscope.

RT-PCR

Total RNA was extracted with TRIZOL. cDNA synthesis was performed in a reaction mix containing 1 µg of total RNA, oligo-dT, random primer and M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). The DNA was used to perform PCR reactions using the following primers (SATa, SATIII and mcBox) reported in [14].

siRNA assays

siRNA-silencing was performed according to Dharmacon instructions. The cells were seeded in a 6 well plates (60% confluence) and incubated for 12h in starvation medium and then independently the siRNA and the DharmaFECT reagent 1 were diluted in serum free medium and incubated for 5 min at room temperature, after that time those were mixed and incubated once more for 25 min at room temperature and finally added to the cells. The siRNA was used in a 25 and 50nM final concentration and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 48–72h, ready to be analysed by flow cytometry for apoptosis and viability assays.

Intra cellular protein staining for flow cytometry, Viability and apoptosis assays

The intracellular protein staining was performed according to the protocols previously described by [23]. The Viability and apoptosis assays were performed according to the protocols previously described in Affymetrix cat.#65-0865 and Biolegend cat.#640918 respectively. Cells were harvested and stained using Annexin Pacific Blue to label apoptotic cells. The cells were stained with viability solution to label dead cells. Briefly, the cells were washed twice and resuspended in fixable viability dye for 30 min at 4°C protected from light, then the dye was removed with flow staining buffer, later the cells were resuspended in Annexin V binding buffer containing Annexin V and incubated for 15 min at RT (25°C) in the dark; the cells were washed with binding buffer and then fixed with PFA 2% at 37°C for 10min, finally the cells were washed newly with FACS juice and stored at 4°C until the analysis. The cells and the data were analysed with FACSCanto II flow cytometer, and FLOWJO software respectively.

Results

Induction of cell line transformation impairs heterochromatin structure and partial relocalization HP1α

The MCF10-Er-Src line can be induced to transform to a malignant phenotype through the activation of Src by incubation with tamoxifen [16]. Using this model, we determined the changes that occur in heterochromatin after transformation. The first approximation was to analyze the effect on heterochromatic centers. Ethidium bromide staining of transformed and non-transformed cells shows that there is a reduction in the number of heterochromatic centers in cells induced with tamoxifen after 36–48 hrs (Fig. 1A and B). We observed between 2–5 heterochromatic centers in the non-transformed cells and a reduction to 1–2 centers in the transformed cells (Fig. 1B). This result suggests that there is a rapid rearrangement and reduction in heterochromatin when the cancerous phenotype is induced in MCF10-Er-Src cells.

Since HP1α is located in constitutive heterochromatin, we decided to determine if there are changes in the levels or distribution of HP1α changes in the levels or distribution of in transformed cells. HP1α can be identified in heterochromatic centers in non-transformed cells; however, there is a change in the nuclear location of HP1α in the tamoxifen treated cells (Fig. 1C). Some of the HP1α is located in the nuclear periphery, and some HP1α remains in the heterochromatic bodies (Fig. 1B). These changes in

HP1 α distribution occur without affecting HP1 α levels (Fig. 1C). Thus, the generation of a transformed phenotype in MCF10-Er-Src cells correlates with board changes in heterochromatin organization, suggesting a reduction in constitutive heterochromatin.

Global levels of H3K9me3 and H3K27me3 are reduced in transformed MCF10-Er-Src cells

Since the levels of heterochromatic centers are reduced and the nuclear distribution of HP1 α changes after transformation, we next analyzed the histone marks H3K9me3, H3K9me2 and H3K27me3. H3K9me3 and H3K9me2 are recognized by HP1 α , and H3K27me3 is a mark present in genes that are not expressed. Fig. 2A shows immunostains of non-transformed and transformed cells. H3K9me3 and H3K27me3 can be detected forming foci in the

nuclei of normal cells [24-26]. In the case of H3K27me3, a predominant focus near the nuclear membrane can be visualized that corresponds to the inactive X chromosome. Intriguingly, a reduction in the levels of H3K9me3 and H3K27me3 is observed in transformed cells (Fig. 2A). The H3K27me3 signal of the inactive X chromosome is also reduced. The levels of H3K9me2 are not reduced in transformed cells (Fig. 2A). Conversely, significant changes in the levels of H3K9Ac are not detected (Fig. 2A). The reduction in the levels of H3K9me3 and H3K27me3 was confirmed by Western blot analysis using nuclear protein from non-transformed and transformed cells (Fig. 2B). These results suggest that the decrease in heterochromatin is linked to a reduction of both facultative and constitutive histone marks.

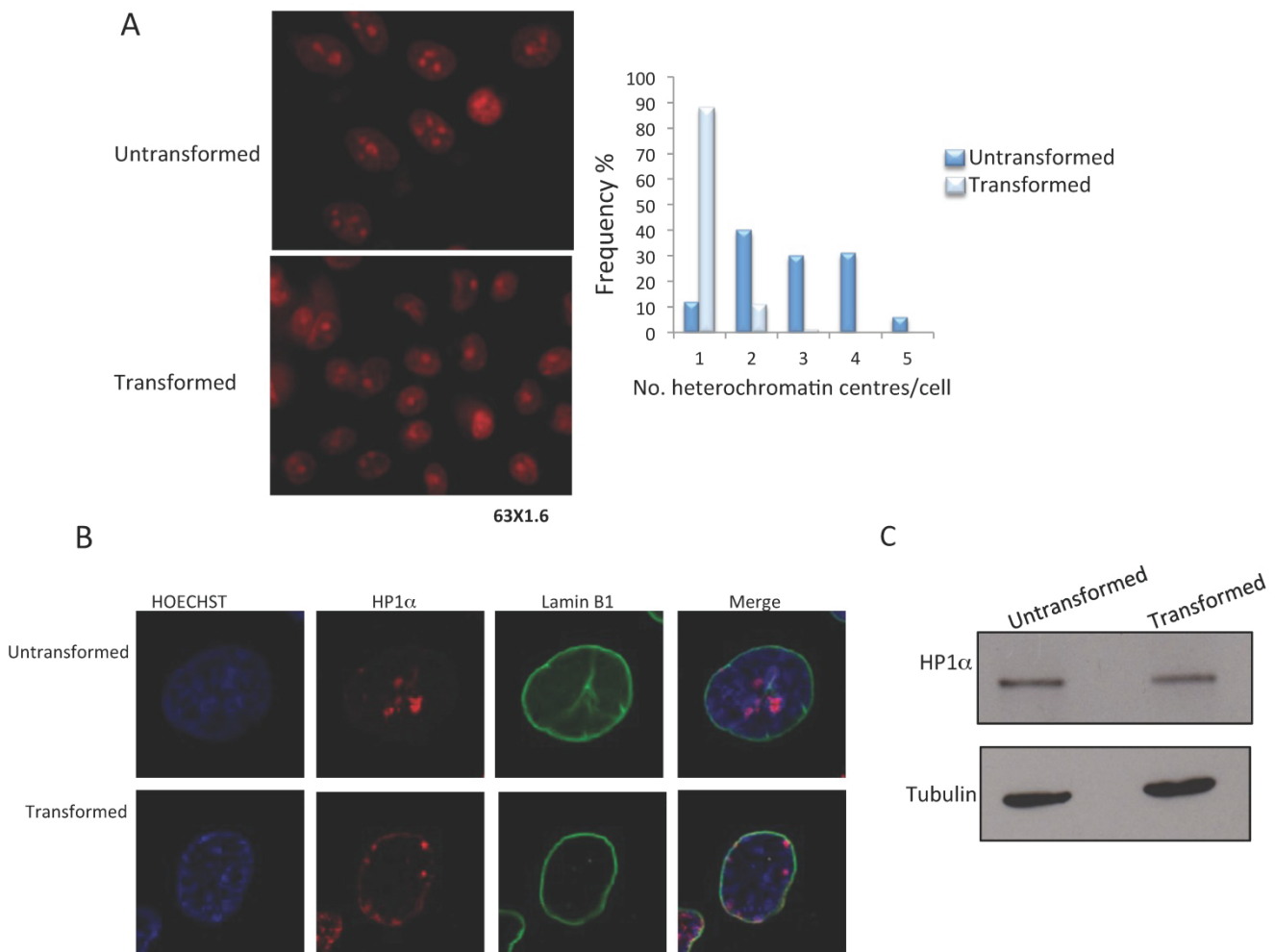


Figure 1. Reduction of heterochromatin bodies and delocalization of HP1 α in transformed MCF10A-Er-Src cells. **A**, Ethidium Bromide staining of non-transformed and transformed cells. Heterochromatin bodies (2-4) are evident in the nuclei of non-transformed cells. A reduction in the number of heterochromatin bodies is observed in the nuclei of transformed cells. The plot indicates the frequency of the number of heterochromatin bodies in non-transformed and transformed cells. **B**, HP1 α and nuclear laminin B1 immunostaining of non-transformed and transformed cells. Note the change in the HP1 α distribution in the transformed cells. **C**, HP1 α western blot experiments from non-transformed and transformed cells. A tubulin antibody was used as loading control.

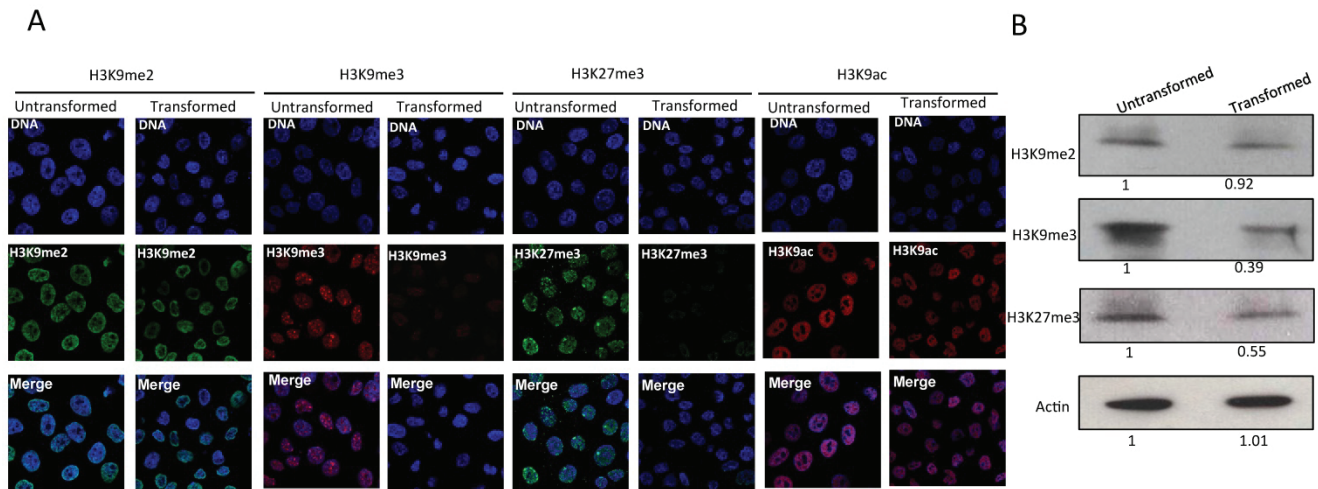


Figure 2. The levels H3K9me3 and H3K27me3 marks are reduced in the MCF10A-Er-Src cells after transformation. **A**, Immunostaining detection of H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3 and H3K9ac in non-transformed and transformed cells. Note the reduction in the signal of H3K9me3 and H3K27me3 marks in the transformed cells. The reduction of the signal is homogeneous in both cases, although the presence of H3K9me3 and H3K27 bodies is maintained in the transformed cells. **B**, Western blot experiments using antibodies that recognize H3K9me3, H3K9me2, H3K27me3 from non-transformed and transformed cells. An Actin antibody was used as loading control. The numbers at the bottom in the western blots indicate the relative levels of the protein signal versus the acting levels determined by densitometry adjusted to 1 in the nontransformed cells.

Transformation causes an increase in KDM4B and UTX/KDM6A and a reduction in SUV39H1 and PRC2 levels

We have observed that a reduction in global heterochromatin in transformed cells correlates with a decrease in H3K9me3 and H3K27me3 levels. Therefore, we determined the effect of transformation on the histone methyl-transferases and demethylases that modulate these modifications. For H3K9me3, we determined the total levels of the stress-inducible KDM4B demethylase as well as the levels of the SUV39H1 methyl-transferase. In the transformed cells, there is an important increase in the levels of KDM4B compared with the non-transformed cells (Fig. 3A). In addition, Western blot analysis confirmed the KDM4B immunostaining data but showed a significant reduction in the levels of other H3K9me3 demethylases (Fig. 3A). Conversely, the levels of SUV39H1 decrease in the transformed cells (Fig. 3A). Thus, the reduction in the H3K9me3 level correlates with an increase of KDM4B and with the decrease of one of the methyl-transferases that incorporates methyl groups into H3K9.

To investigate H3K27me3 demethylases and methyl-transferases, we analyzed the levels of UTX/KDM6A and KDM6B as well as the levels of ENZh2 and SUZ12, which are part of PRC2. Fig. 3B shows that the levels of UTX/KDM6A are increased, but that the levels of KDM6B are reduced in the transformed cells. Interestingly, the levels of the PRC2 components decrease in the cancerous cell nuclei (Fig. 3C). Collectively, these results indicate that in transformed cells, there are changes in the levels of

enzymes that affect the methylation state of the K9 and K27 residues of H3. In particular, the data suggest that there is a reduction in the levels of SUVAR39H1 and an increase of KDM4B, which may explain the reduction in the total levels of H3K9me3 in the transformed cells. Conversely, a reduction in the levels of PRC2 and an increase in UTX/KDM6A may be linked to the decrease in the levels of H3K27me3. Other factors that participate in these modifications also undergo changes during transformation; however, these factors do not correlate with the global changes observed in H3K9me3 and H3K27me3.

KDM4B is recruited to heterochromatin, correlating with an increase in the transcription of heterochromatic sequences in transformed cells

A characteristic of pericentromeric heterochromatin is that it is enriched in H3K9me3. These DNA satellite sequences are only transcribed at low levels in normal cells, but an increase in their transcription has been observed in cancer cells (14). Since we observed a decrease of this mark in the transformed cells, we decided to investigate whether there is also an enhancement in the transcription of Sat a, SatIII and mcBox satellite sequences [27, 28]. We observed an increase in the transcript levels of all these elements in the transformed cells (Fig. 4A). These results suggest that the reduction in the level of H3K9me3 in heterochromatic centers increases the transcription rate of constitutive heterochromatin in transformed cells.

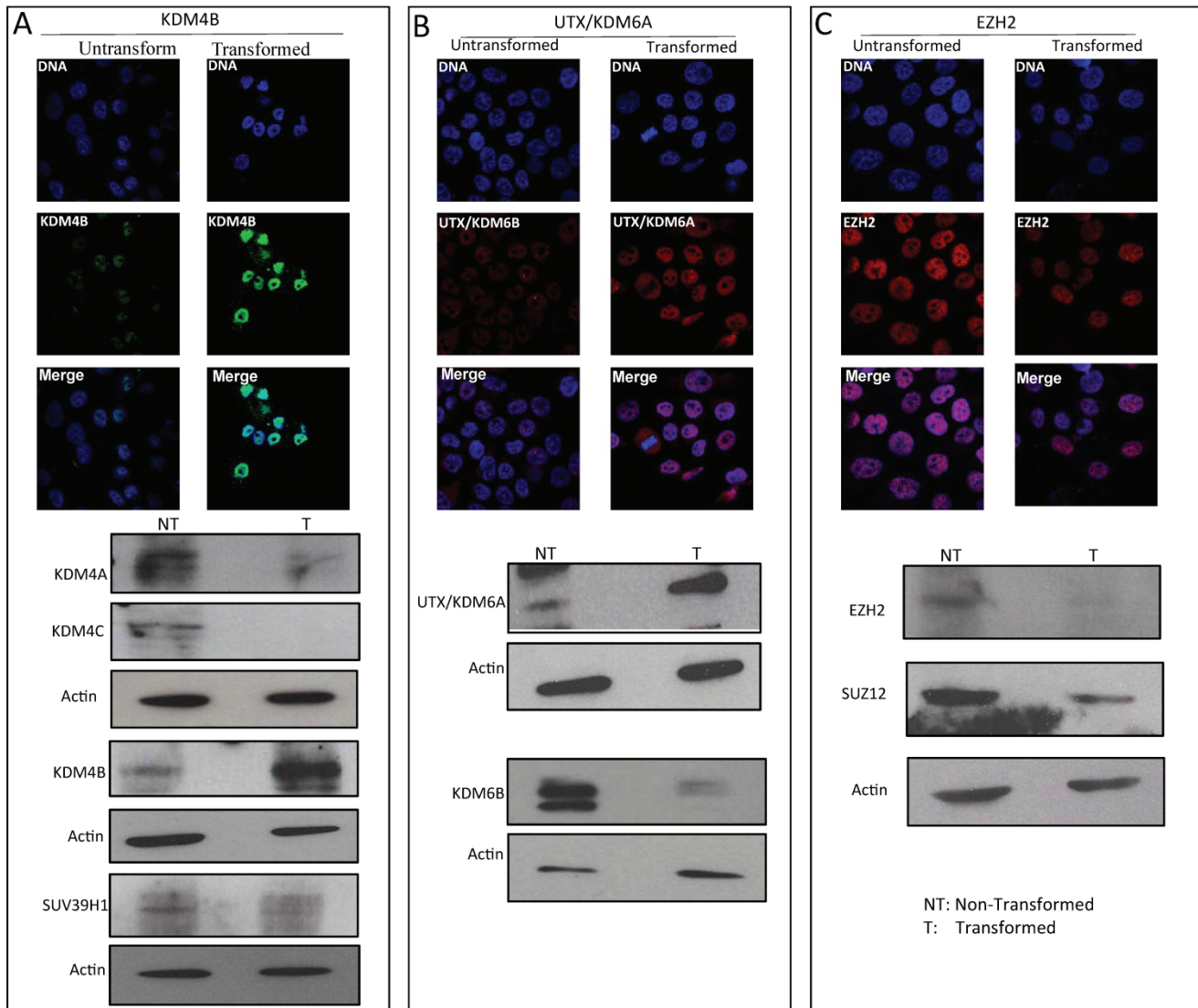


Figure 3. Variation in the levels of enzymes that modify histone H3 in transformed MCF10A-Er-Src cell line. **A**, Immunostaining to detect KDM4B demethylase and western blots detecting KDM4A, KDM4B and KDM4C histone demethylases as well as the methyl transferase SUV39H1 levels in non-transformed and transformed cells. **B**, Immunostaining to detect UTX/KDM6A and western blot experiments detecting UTX/KDM6A and KDM6B in non-transformed and transformed cells. **C**, Immunostaining to detect the methyl transferase EZH2 and western blots to detect EZH2 and SUZ12 in transformed and non-transformed cells. Actin was used as loading control in all the western blot experiments. NT=Non-transformed cells; T= Transformed cells.

To further analyze this possibility, we performed ChIP experiments to test if there is a reduction in H3K9me3 levels in these satellite sequences as well as an increase in the occupancy of KDM4B that may be removing this repressive mark. Fig. 4B shows that in non-transformed cells, the H3K9me3 mark is present in the three satellite sequences and, as expected, it is not present in the GADPH gene. Interestingly, in transformed cells, this H3 modification is not detected, at least no more than the mock antibody. Intriguingly, when we analyzed the non-transformed cells, the presence of KDM4B in the satellite sequences is not detected; however, KDM4B is recruited to these repetitive elements after transformation induction (Fig. 4B) Collectively, these experiments suggest that there is a recruitment of KDM4B to the satellite

sequences that demethylate H3K9, favoring the transcription of these repetitive elements in transformed cells.

Knock down of UTX/KDM6A and KDM4B preferentially kills transformed cells

The fact that the levels of UTX/KDM6A and KDM4B increase after transformation and that in the case of KDM4B this increase correlates with its occupancy in repetitive DNA sequences in which its transcription levels are enhanced opens the question of whether these demethylases are required for the maintenance of transformed cells. To resolve this question, we transfected transformed and non-transformed cells with dsRNA against the UTX/KDM6A and KDM4B transcripts. The levels of

UTX/KDM6A and KDM4B as well as the viability of the cells were analyzed after 48 and 72 hrs. At these two time points, there is a clear reduction in the two demethylases in both non-transformed and transformed cells transfected with the dsRNAs (Fig. 5A and 5C). Interestingly, the reduction of both enzymes significantly reduced the viability of the transformed cells compared with the non-transformed cells (Fig. 5B and 5D). This reduction in viability correlates with an increase in apoptosis in the transformed cells (Fig. 5B and 5D) and suggests that the transformed cells require high levels of UTX/KDM6A and KDM4B to survive.

Discussion

It is known that the global configuration of

chromatin is altered in cancer cells, which is observed as a preferential reduction in the levels of heterochromatin. For instance, recent analysis has found the loss of heterochromatin in large extensions of the genome in cancer cells [29, 30]. In addition, mutations in several factors involved in heterochromatin maintenance have been related to the cancerous phenotype [28, 29]. Interestingly, there are examples in which mutations that favor the formation or the decondensation of heterochromatin favor some types of tumors and suppress the cancerous phenotype in others [31-35, 36]. However, many of the studies analyzing the changes in heterochromatin in cancer cells are not based on comparative studies between the cancerous cell and its progenitor. In this work, we used the

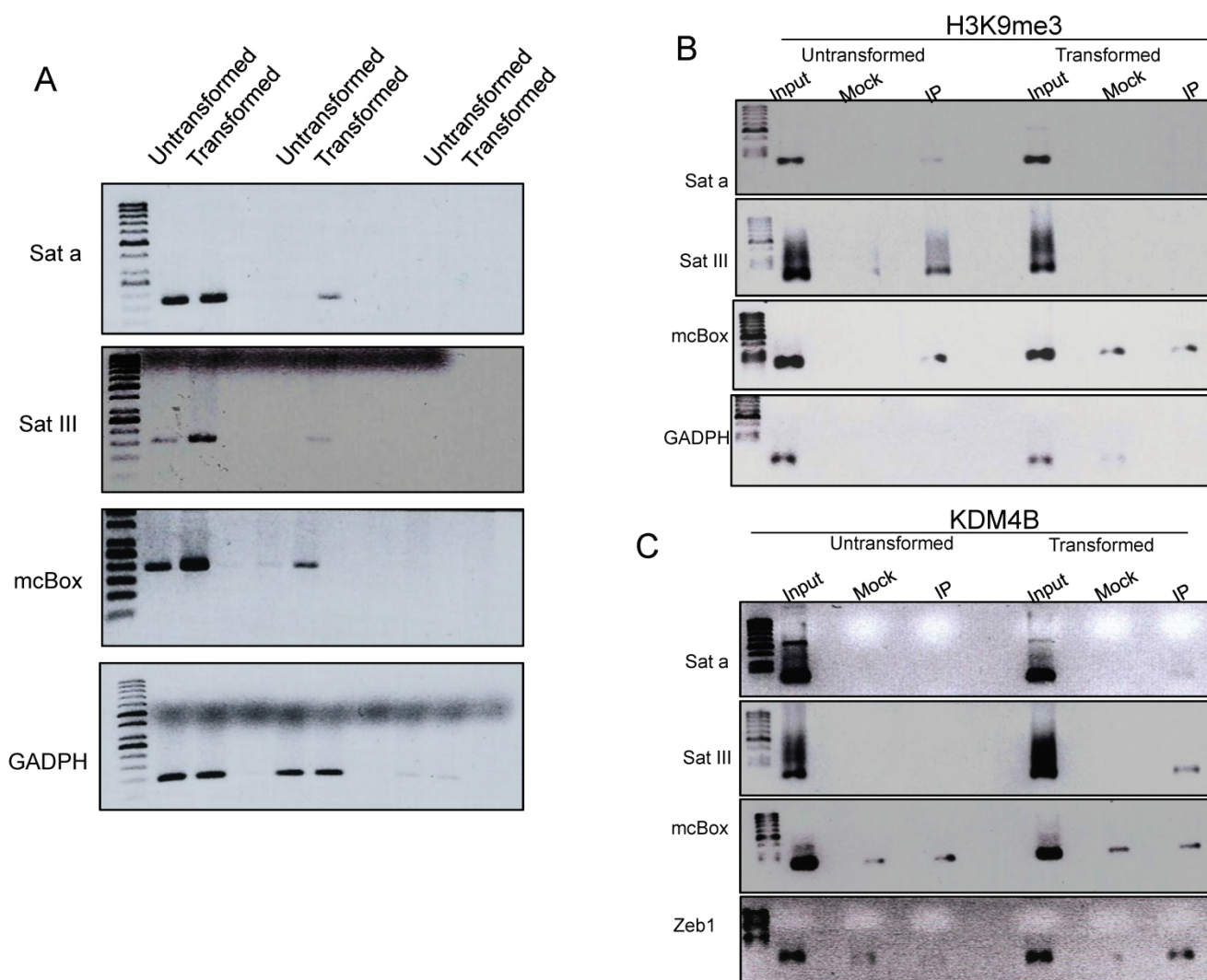


Figure 4. An increase in transcription of pericentromeric sequences in the transformed MCF10A-ER-Src cells correlates with a reduction in H3K9me3 and the presence of KDM4B in these repetitive elements. **A**, Semi quantitative RT-PCR experiments to determine the transcript levels of Sat a, Sat III and mcBox repetitive DNA elements in non-transformed and transformed cells. GAPDH transcript was used as internal control. The number of amplification cycles is indicated at the bottom of the figure. **B**, ChIP-PCR experiments to determine the presence of H3K9me3 at the Sat a, Sat III and mcBox DNA elements in non-transformed and transformed cells. The input, mock and immunoprecipitation lanes are indicated. GAPDH was used as negative control. **C**, ChIP-PCR experiments to determine the occupancy of KDM4B demethylase at the Sat a, Sat III and mcBox DNA elements in not-transformed and transformed cells. The promoter of the Zeb1 gene was used as a positive control, since it is known that the activation of this gene in cancer cells recruits KDM4B [37]. GAPDH was used as a negative control. The mock signal is used to determine nonspecificity in each ChIP experiment.

MCF10-Er-Src cell line to compare the changes that occur in heterochromatin during the generation of a transformed phenotype. In fact we corroborate the advantage to perform comparative experiments between a malignant cell and its direct precursor when we compare the levels of KDM4B as well as the transcript levels of the Sat a, SatIII and mcBox satellite sequences in other breast cancer lines. In particular we analyzed the MCF7 cell line that is positive for the Estrogen Receptor (ER) and the triple negative MDA-MB-231 together with the non-cancerous cell line MCF10A. Intriguingly, when we analyzed the levels of KDM4B, we found that also in these lines the KDM4B protein levels are higher than in the MCF10A non-cancerous line (Fig. S1). However, when we determined the Sat a, SatIII and mcBox transcript

levels, we found that only Sat a and SatIII in the MDA-MB-231 and in the transformed MCF10A-ER-Src cell lines are increased, if compared with the MCF10A line (Fig. 1S). From these experiments it is clear that comparative experiments between cell lines that have different origin are hard to be conclusive, since in the absence of the precursor cells for each cell line, the levels of KDM4B and of the satellite sequences before the transformation of these cells are unknown. However, our comparative results using the MCF10A-Er-Src line after and before transformation indicates that there are severe alterations in heterochromatin in the transformed cells, such as the reduction of heterochromatin centers and a partial delocalization of HP1 α .

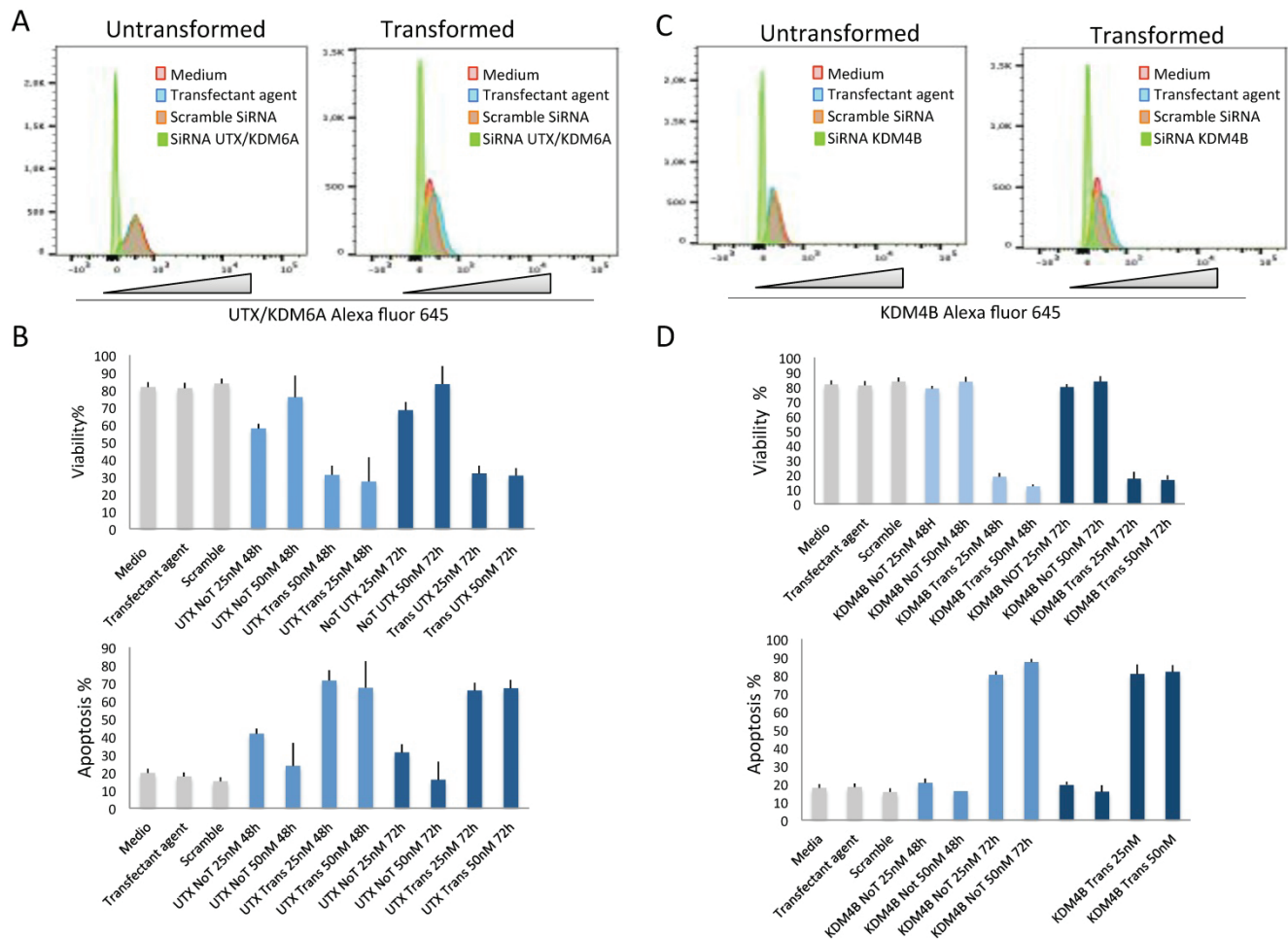


Figure 5. The depletion of KDM4B and UTX/KDM6A preferentially kills transformed cells. A, Flow cytometry quantification of cells stained with an antibody against UTX/KDM6A after the introduction of SiRNA (50 nM) against the UTX/KDM6A transcript. Note the high reduction of cells expressing the demethylase basal levels if compared with the controls. Scramble SiRNA and the transfectant agent were used as controls. **B,** Quantification of cell viability and apoptosis by flow cytometry of transformed (indicated as UTX Trans) and non-transformed (indicated as UTX No T) cells at 25 and 50 nM of the UTX/KDM6A siRNA. Scramble SiRNA and the transfectant agent were used as controls. **C,** Flow cytometry quantification of cells stained with an antibody against UTX/KDM6A after the introduction of SiRNA (50 nM) against the KDM6B transcript. Note the high reduction of cells expressing the demethylase if compared with the controls. Scramble SiRNA and the transfectant agent were used as controls. **D,** Quantification of cell viability and apoptosis by flow cytometry of transformed (indicated as KDM4B Trans) and non-transformed cells (indicated as KDM4B no T) at 25 and 50 nM of the KDM4B siRNA. Scramble SiRNA and the transfectant agent were used as controls.

It is known that HP1 α binds chromatin, recognizing H3K9me2 or H3K9me3 [1, 9]. We observed that the levels of H3K9me3 were reduced after transformation, suggesting that the delocalization of HP1 α from the heterochromatin bodies may be due to the reduction in H3K9me3 levels. In addition, the reduction in H3K9me3 in the transformed cells also correlates with an increase of the H3K9me3 demethylase KDM4B. The levels of the KDM4B enzyme rise significantly 36-48 hrs after the induction of transformation in the MCF10a-Er-Src cells, showing a rapid response during transformation to a cancerous phenotype. Contrary to KDM4B, the levels of KDM4A and KDM4C, which also demethylate H3K9me3 and H39me36, are reduced in the cancerous cells (Fig. 3A). These results show that these three demethylases are differentially regulated during acquisition of the transformed phenotype. This suggests that different factors may associate with these enzymes for performance of their functions and that the reduction in H3K9me3 levels may be controlled in part by KDM4B. However, we cannot disregard the possibility that the reduction in H3K9me3 levels may also be caused by an effect on the H3K9 methyl transferase SUV39H1, since the levels of this enzyme were also affected. Based on these results, we suggest that the combination of an increase of KDM4B and a reduction of SUV39H1 cause an important reduction in the global levels of tri-methylated H3K9 in transformed cells.

Repetitive DNA elements are organized as heterochromatin. Although these elements are transcribed, the loss of heterochromatin increases their transcription, generating genome instability [30, 35, 36]. In addition, it has been reported that mutations in the BRCA1 gene linked to breast cancer induce heterochromatin decondensation in repetitive DNA, increasing its transcription and promoting the generation of cancer [14]. It has also been reported that there is an expansion of SatII sequences mediated by an increase in transcription of this repetitive element in colon cancer cells [37]. Intriguingly, we found that the expression of the Sat a, SatIII and mcBox satellite sequences is increased in the transformed cells and that this increase correlates with a decrease in the H3K9me3 mark in these sequences. Furthermore, the occupancy of KDM4B is increased in these elements after transformation, suggesting that KDM4B is recruited to these DNA sequences, demethylating H3K9me3 and favoring the transcription of these sequences. Based on these observations, it could be important in future experiments to determine if the increase in the presence of transcripts of these repetitive elements contribute to generation of the cancerous phenotype.

Additionally, it will be important to determine what recruits KDM4B to these sequences in the transformed cells as well as the occupancy of SUV39H1 in these regions. These observations agree with recent reports that show that KDM4B may participate in the generation of cancer [38, 39].

We also observed a global reduction in the tri-methylation of H3K27. The decrease in this histone mark correlates with an enrichment of the UTX/KDM6A demethylase, although there is also a reduction of KDM6B. Intriguingly, the levels of EzH2 and Suz12, components of PRC2, also decrease in the transformed cells. As mentioned before, there is evidence that some tumors are linked to an increase in PRC2 activities but that others are associated with a reduction of PRC2 [40]. These results suggest that the global reduction in H3K27me3 occurs with an increase in the UTX/KDM6A demethylase and a decrease in the levels of PRC2 in the MCF10A-Er-Src transformed cells, which may be related to the expression of genes that are necessary for the induction and maintenance of the transformed phenotype.

The high levels of KDM4B and UTX/KDM6A in the transformed cells seem to be necessary for viability of the transformed MCF10A-Er-Src cells since the reduction of both enzymes is more deleterious in these cells than in the progenitor cells. These results suggest that the decondensation of heterochromatic regions is required for the survival of cancerous cells. However, at this point, we do not know if the relaxation of heterochromatin is maintained in mamospheres derived from these cells or in these cells when they are introduced into animals that allow the development of tumors [16]. Although it is not possible to generalize that the relaxation of the heterochromatin is required for the acquisition of the cancerous phenotype in other cancer models, our results strongly suggest that dramatic changes in heterochromatin configuration occur soon after or during transformation and that these changes are important for the survival of cancer cells. In addition, these studies allow further exploration of the mechanisms that cause alterations to heterochromatin in the early stages of transformation, for instance to determine how KDM4B is recruited to heterochromatin. Furthermore, we have identified important candidates that participate in the heterochromatin dynamics during transformation that are suitable for global genomic analysis before and after the acquisition of a cancerous phenotype.

Supplementary Material

Figure S1. <http://www.jcancer.org/v08p2866s1.pdf>

Acknowledgments

This work was supported by grants from CONACyT 219673, CONACyT 250588 and PAPIIT/UNAM IN200315. We thank Arturo Pimentel, Andres Saralegui, Chris Wood and LNMA for the advice in the use of the confocal microscopes.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Eissenberg JC, Elgin SC. HP1a: a structural chromosomal protein regulating transcription. *Trends Genet.* 2014; 30: 103-10.
- Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep.* 2015; 16: 1467-81.
- Chow JC, Ciaudo C, Fazzari MJ, Mise N, Servant N, Glass JL, et al. LINE-1 Activity in Facultative Heterochromatin Formation during X Chromosome Inactivation. *Cell.* 2016; 141: 956-69.
- Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 2008; 32: 503-18.
- Blackledge NP, Rose NR, Klose RJ. Targeting Polycomb systems to regulate gene expression: modifications to a complex story. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16: 643-9.
- Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13: 297-311.
- Shpargel KB, Starmer J, Yee D, Pohlers M, Magnuson T. KDM6 demethylase independent loss of histone H3 lysine 27 trimethylation during early embryonic development. *PLoS Genetics.* 2014; 10: e1004507.
- Holowatyj A, Yang ZQ, Pile LA. Histone lysine demethylases in *Drosophila melanogaster*. *Fly.* 2015; 9: 36-44.
- Déjardin J. Switching between Epigenetic States at Pericentromeric Heterochromatin. *Trends Genet.* 2015; 31: 661-72.
- Van der Meulen J, Sanghvi V, Mavrakis K, Durinck K, Fang F, Matthijssens F, et al. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015; 125: 13-21.
- Benyoucef A, Palié GG, Wang C, Porter CJ, Chu A, Dai F, et al. UTX inhibition as selective epigenetic therapy against TAL1-driven T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev.* 2016; 30: 508-21.
- Herz HM, Madden LD, Chen Z, Bolduc C, Buff E, Gupta R, et al. The H3K27me3 demethylase dUTX is a suppressor of Notch- and Rb-dependent tumors in *Drosophila*. *Mol Cell Biol.* 2010; 30: 2485-97.
- Millanes-Romero A, Herranz N, Perra V, Iturbide A, Loubat-Casanovas J, Gil J, et al. Regulation of heterochromatin transcription by Snail1/LOXL2 during epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell.* 2013; 52: 746-57.
- Zhu Q, Pao GM, Huynh AM, Suh H, Tonnu N, et al. BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature.* 2011; 477:179-84.
- Berry WL, Janknecht R. KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. *Cancer Res.* 2013; 73: 2936-42.
- Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell.* 2009; 139: 693-706.
- Fleming JD, Giresi PG, Lindahl-Allen M, Krall EB, Lieb JD, Struhl K. STAT3 acts through pre-existing nucleosome-depleted regions bound by FOS during an epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Epigenetics Chromatin.* 2015; 14:8:7.
- Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *K. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111:10574-79.
- Hirsch HA, Iliopoulos D, Joshi A, Zhang Y, Jaeger SA, Bulyk M, Tschlis PN, Shirley Liu X, Struhl K. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell.* 2010; 17: 348-61.
- Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods.* 2003; 30: 256-268.
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17: 6419.
- Gao C, Wang L, Milgrom E, Shen WC. On the mechanism of constitutive Pdr1 activator-mediated PDR5 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for enhanced recruitment of coactivators and altered nucleosome structures. *J Biol Chem.* 2004; 279: 42677-86.
- Krutzik PO, Clutter MR, Trejo A, Nolan GP. Fluorescent cell barcoding for multiplex flow cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.* 2011; Chapter 6:Unit 6.31.
- Riclet R, Chendeb M, Vonesch JL, Koczan D, Thiesen HJ, Losson R, Cammas F. Disruption of the interaction between transcriptional intermediary factor 1[β] and heterochromatin protein 1 leads to a switch from DNA hyper- to hypomethylation and H3K9 to H3K27 trimethylation on the MEST promoter correlating with gene reactivation. *Mol Biol Cell.* 2009; 20: 296-305.
- Towbin BD, González-Aguilera C, Sack R, Gaidatzis D, Kalck V, Meister P, et al. Step-wise methylation of histone H3K9 positions heterochromatin at the nuclear periphery. *Cell.* 2012; 150: 934-47.
- Oliveira C, Wright JM. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Res.* 1998; 6: 205-11.
- Valgardsdottir R, Chioldi I, Giordano M, Rossi A, Bazzini S, Ghigna C, et al. Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36: 423-34.
- Ferreira D, Meles S, Escudeiro A, Mendes-da-Silva A, Adegas F, Chaves R. Satellite non-coding RNAs: the emerging players in cells, cellular pathways and cancer. *Chromosome Res.* 2015; 23: 479-93.
- Rafique S, Thomas JS, Sproul D, Bickmore WA. Estrogen-induced chromatin decondensation and nuclear re-organization linked to regional epigenetic regulation in breast cancer. *Genome Biol.* 2015; 16: 145.
- McDonald OG, Wu H, Timp W, Doi A, Feinberg AP. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Struct Mol Biol.* 2011; 18: 867-74.
- Nizialek AE, Sankunny M, Niazi F, Eng C. Cancer-predisposition gene KLLN maintains pericentric H3K9 trimethylation protecting genomic stability. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: 3586-94.
- Morgan SA, Shilatifard A. Chromatin signatures of cancer. *Genes Dev.* 2015; 29: 238-49.
- Sun M, Nie F, Wang Y, Zhang Z, Hou J, He D, et al. LncRNA HOXA11-AS Promotes Proliferation and Invasion of Gastric Cancer by Scaffolding the Chromatin Modification Factors PRC2, LSD1, and DNMT1. *Cancer Res.* 2016; 76: 6299-310.
- Wassef M, Margueron R. The Multiple Facets of PRC2 Alterations in Cancers. *J Mol Biol.* 2016; 429: 1978-1993.
- Frescas D, Guardavaccaro D, Kuchay SM, Kato H, Poleshko A, Basrur V, et al. KDM2A represses transcription of centromeric satellite repeats and maintains the heterochromatic state. *Cell Cycle.* 2008; 7: 3539-47.
- Bierhoff H, Postepska-Igielska A, Grummt I. Noisy silence: non-coding RNA and heterochromatin formation at repetitive elements. *Epigenetics.* 2014; 9: 53-61.
- Bersani F, Lee E, Kharchenko PV, Xu AW, Liu M, Xega K, et al. Pericentromeric satellite repeat expansions through RNA-derived DNA intermediates in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112: 15148-53.
- Wilson C, Qiu L, Hong Y, Karnik T, Tadros G, Mau B, et al. The histone demethylase KDM4B regulates peritoneal seeding of ovarian cancer. *Oncogene.* 2016; 36: 2565-76.
- Li S, Wu L, Wang Q, Li Y, Wang X. KDM4B promotes epithelial-mesenchymal transition through up-regulation of ZEB1 in pancreatic cancer. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2015; 47: 997-1004.
- Serresi M, Gargiulo G, Proost N, Siteur B, Cesaroni M, Koppens M, Xie H, et al. Polycomb Repressive Complex 2 Is a Barrier to KRAS-Driven Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell.* 2016; 29: 17-31.