



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

TFIIH DURANTE LA GENERACION DE UN FENOTIPO CANCEROSO

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

MARITERE URIÓSTEGUI ARCOS

Tutor principal:

Dr. Mario E. Zurita Ortega

Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Leonor Pérez Martínez.
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Hilda Maria Lomeli Buyoli
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca Morelos, Julio 2015



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.

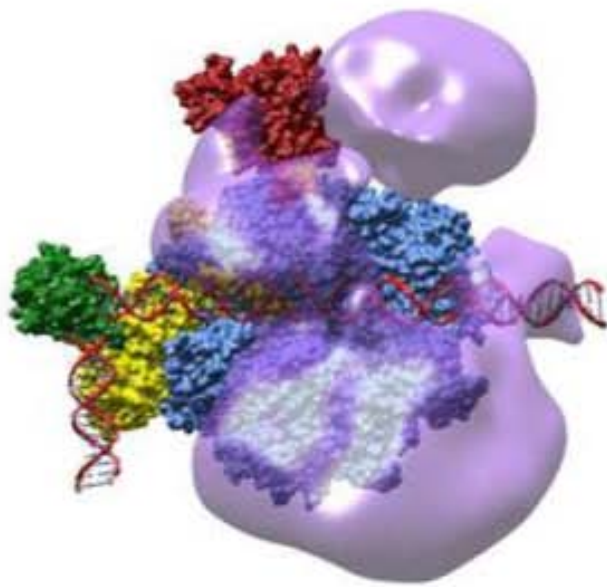


Imagen tomado de (1)

ABREVIATURAS

µg	microgramos
µl	microlitros
6-4 PP	6-4 fotoproducto
BSA	Albumina de suero bovino
CAK	Cinasa Activadora de CDKs
CDK7	Cinasa 7 dependiente de Ciclina
CS	Síndrome de Cockayne
CPD	Dímeros de ciclobutano de pirimidinas
CTD	Dominio C-terminal
Cyc H	Ciclina H
dH ₂ O	Agua destilada
DMEM	Del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSHB	Del inglés Developmental Studies Hybridoma Bank
DTT	Ditiotreito
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ER	Receptor de Estrogeno
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
G	gramo
GG	General del genoma
H ₂ O	Agua
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
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
RNA	Ácido ribonucleico
REN	Reparacion por Escision de Nucleotidos
RNP I	RNA polimesara tipo I
RNP II	RNA polimerasa tipo II
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Serina
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAM	Tamoxifen
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
WB	Western Blot
XP	Xeroderma pigmentosum
XPB	Proteínas xenoderma pigmentosum grupos de complementación B
XPD	Proteínas xenoderma pigmentosum grupos de complementación D

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Cáncer.....	2
1.2. Maquinaria de Transcripción.....	5
1.2.1. Factor de Transcripción IIH.....	6
1.2.1.1. Funciones de TFIIH.....	8
1.2.1.1.1. Papel de TFIIH durante la transcripción.....	8
1.2.1.1.2. La participación de TFIIH en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos	11
1.2.1.1.3. TFIIH en el control del ciclo celular.....	13
1.2.1.2. Síndromes relacionados con mutaciones en TFIIH	14
1.3. Fármacos cuyos blancos terapéuticos son factores transcripcionales	15
1.3.1. Triptolide	15
1.3.2. THZ1	16
1.4. Descripción del modelo experimental	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares.....	23
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Línea celular MCF10A-ER-Src.....	25
6.2. Extractos nucleares.....	26
6.2. Cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford	26
6.3. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	27
6.4. Ensayos de Western Blot	29
6.5. Inmunotinciones	31
6.6. Ensayos de viabilidad y apoptosis con el fármaco Triptolide	32

6.7	Ensayos de viabilidad y apoptosis usando el inhibidor de CDK7: THZ1 ..	33
6.8	Ensayos de apoptosis usando TPL y THZ1	34
7.	RESULTADOS	36
7.1	Cambio en la expresión de las diferentes subunidades de TFIIH	36
7.2	Cambio de la distribución de las diferentes subunidades de TFIIH.....	37
7.3	Efecto del triptolide en células cancerosas y no cancerosas: viabilidad y apoptosis mediante citometría de flujo.	43
7.4	Efecto de THZ1 en células cancerosas y no cancerosas: viabilidad y apoptosis mediante citometría de flujo.	48
7.5	Efecto del Triptolide más THZ1 en células cancerosas y no cancerosas	54
8.	DISCUSIÓN.....	58
9.	CONCLUSIÓN.....	62
10.	PERSPECTIVAS.....	63
11.	REFERENCIAS.....	64

RESUMEN

El cáncer se ha convertido en un problema a nivel mundial y en México es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Cáncer, hace referencia a alteraciones patológicas de las células que provocan que estas se dividan con mayor frecuencia y rapidez que las células sanas. Por lo tanto, es importante realizar estudios sobre el cáncer, acerca de cómo trabaja la maquinaria que regula la expresión de los genes y cuáles son los factores principales que participan en esta. Por otro lado existe un vínculo entre la transcripción y la transformación de una célula no cancerosa a cancerosa, lo que sugiere que la maquinaria basal de transcripción puede ser un blanco prometedor para el diseño de fármacos que bloqueen la proliferación de la célula cancerosa. Uno de los factores limitantes para la transcripción es TFIID, compuesto por 10 proteínas. En este proyecto se trabajó con dos fármacos cuyos blanco son dos de las diferentes subunidades de TFIID: el Triptolide, que se une covalente a la subunidad XPB inhibiendo su actividad ATPasa dependiente de DNA y THZ1 se une covalentemente a CDK7 inhibiendo su actividad de cinasa.

En el proyecto se trabajó con la línea celular MCF10A-ErSrc, con la cual se puede estudiar el proceso de transformación de una célula no cancerosa a cancerosa. Inicialmente determinamos si hay un cambio en la expresión y distribución de algunas de las subunidades de TFIID cuando las células pasan de un estado no canceroso a un estado canceroso y analizamos si en nuestro modelo experimental el uso de algún inhibidor de TFIID tienen como blanco preferencial a las células cancerosas. Los resultados muestran que hay una mayor cantidad de las proteínas correspondientes a TFIID en las células cancerosas con respecto a las no cancerosas, además se observó una mayor intensidad de fluorescencia en las células cancerosas con respecto a las no cancerosas de las subunidades de TFIID evaluadas. En los ensayos de viabilidad mediante citometría de flujo y usando triptolide o THZ1 a diferentes concentraciones, se observó que dichos compuestos afectaron preferencialmente a las células cancerosas. Estos datos nos muestran que las células MCF10A-Er-Src son un buen modelo para estudio del efecto de diferentes moléculas que afectan a TFIID y para determinar cual es el efecto preferencial sobre la expresión genética en las célula cancerosa con respecto a su progenitora.

1. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es una de las enfermedades más devastadoras para la humanidad, en 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes a nivel mundial. Entre los cánceres que causan un mayor número de muertes son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. El 70% de todas las muertes por cáncer registradas en 2012 se produjeron en África, Asia, América Central y Sudamérica. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 en las próximas dos décadas (OMS, 2013).

En México, representa un problema importante de salud pública ya que es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. En el año 2010 la Secretaría de Salud registró 70 mil 445 defunciones por cáncer: 50.9% mujeres y 49.1 % hombres. Entre las mujeres, las principales causas de muerte por tumores malignos fueron: cáncer de mama (14.2%), de cuello del útero (11.3%), de hígado (8.3%) y de estómago (7.3%). Entre los hombres fueron el cáncer de próstata (16.1%), de tráquea, bronquios y pulmón (12.8%), de estómago (8.6%) y de hígado (8.2%) (INEGI, 2013).

1.1. Cáncer

La OMS define cáncer como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. En todos los tipos de cáncer, algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos vecinos, puede empezar casi en cualquier lugar del cuerpo humano. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las remplazan. Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola. A medida que las células se hacen más y más anormales, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas que se llaman tumores.

Muchos cánceres forman tumores sólidos, los cuales son masas de tejido. Los cánceres de la sangre, como las leucemias, en general no forman tumores sólidos.

Los tumores cancerosos son malignos, lo que significa que se pueden extender a los tejidos cercanos o los pueden invadir. Además, al crecer estos tumores, algunas células cancerosas pueden desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original, a este proceso se le denomina metástasis (2).

Algunas de las características de las células cancerosas son: el incremento en la motilidad debido a un aumento en la cantidad de microfilamentos en las proteínas contráctiles, con la pérdida de inhibición de contacto (probablemente causada por la alteración del ion calcio en la membrana celular); la pérdida de adherencia (crecimiento sólido); la inhibición de contacto (entre las células), por los cambios en las glicoproteínas de la superficie celular. Los cambios en la inhibición de la motilidad, adherencia y contacto pueden promover la invasión y después el establecimiento de crecimiento maligno; diferencias en el metabolismo, por lo general las células cancerosas son más anaerobias por la rápida división, soportan condiciones de hipoxia y aumentan los niveles de glucosa (Figura 1).

Además desde hace tiempo es conocido que la célula cancerosa tiene una mayor tasa transcripcional la cual es necesaria para mantener su fenotipo y poder sobrevivir, en particular la expresión se asocia con ciertos oncogenes y factores transcripcionales (3). Por ejemplo, se ha visto que el crecimiento y proliferación descontrolada de la célula cancerosa tiene niveles más elevados de transcripción de los ARN ribosomales (rARN) (4). En algunas células un mayor nivel en la transcripción de los rARN's inducen un crecimiento del nucléolo (marcador de células cancerosas, cuando son altamente agresivas) (5).

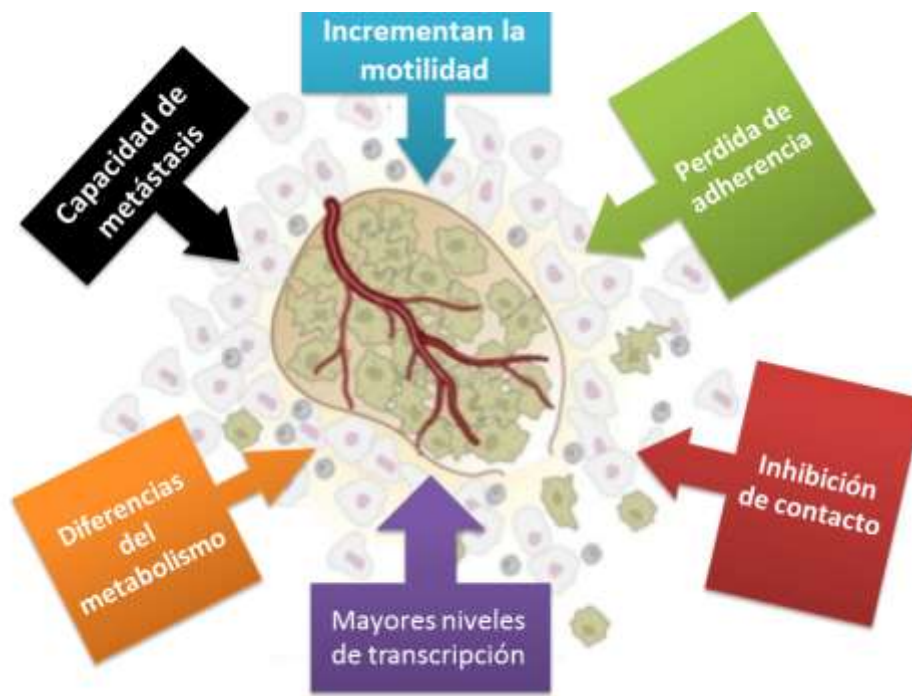


Figura 1. Características de las células cancerosas (Modificada de (6)).

Como se mencionó en el párrafo anterior las células cancerosas requieren un mayor nivel de transcripción. La transcripción mediada por la RNA polimerasa II (RNPII), que transcribe a los ARN mensajeros (mARN) se requiere para mantener una alta demanda transcripcional que incluye oncogenes y factores anti-apoptóticos (7). Se ha descubierto que el oncogene 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 rARN y esto lo hace a través de potenciar la actividad del complejo P-TEFb que estimula la elongación de la transcripción mediada por la RNPII (5). También se ha reportado que la depleción del RNA no codificante Xist, que se encarga de la inactivación del cromosoma X en hembras, induce cáncer hematológico (8, 9). Asimismo, se sabe que las células cancerosas son más sensibles de sufrir apoptosis en respuesta a la inactivación transcripcional (9). Otro aspecto importante a considerar es que la célula cancerosa se encuentra en una situación de estrés constante. El grupo de

S. Lindquist ha publicado 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 malignos (10). 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 con 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 esta, 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 Maquinaria de Transcripción.

La transcripción es un proceso en el que la información genética del DNA pasa al ARN mensajero (ARNm). Es el primer paso de la síntesis de proteínas y para que se lleve a cabo este proceso, es necesario que haya la participación de diversas proteínas que favorecen que se lleve a cabo la transcripción, las cuales se denominan factores transcripcionales, que cumplen funciones específicas durante este proceso. Por ejemplo, se sabe que en la activación de la transcripción, la RNP II no es capaz por sí misma de definir un sitio específico de inicio de la transcripción, por lo que requiere de su asociación con varios factores para poder reconocer al promotor, y así poder determinar el momento de inicio y elongación de la síntesis del RNA (11). Este grupo de factores está conformado por diferentes complejos que tienen diversas funciones y que en conjunto con las subunidades de la RNP II forman el Complejo de Pre-inicio de la transcripción o "PIC" (por sus siglas en inglés) (12). El PIC lo componen más de 100 proteínas y uno de los

complejos que ha sido más estudiado es el factor de transcripción y reparación del DNA TFIIH.

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, Cych y MAT1 (13). TFIIH participa en tres procesos fundamentales para la célula:

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 durante la transición de la fase G2 a M.
3. Cuando los dos complejos están juntos (core y CAK) es cuando operan en la transcripción mediada por la RNA pol I y II (14, 15) (Figura 2 y Figura 3).

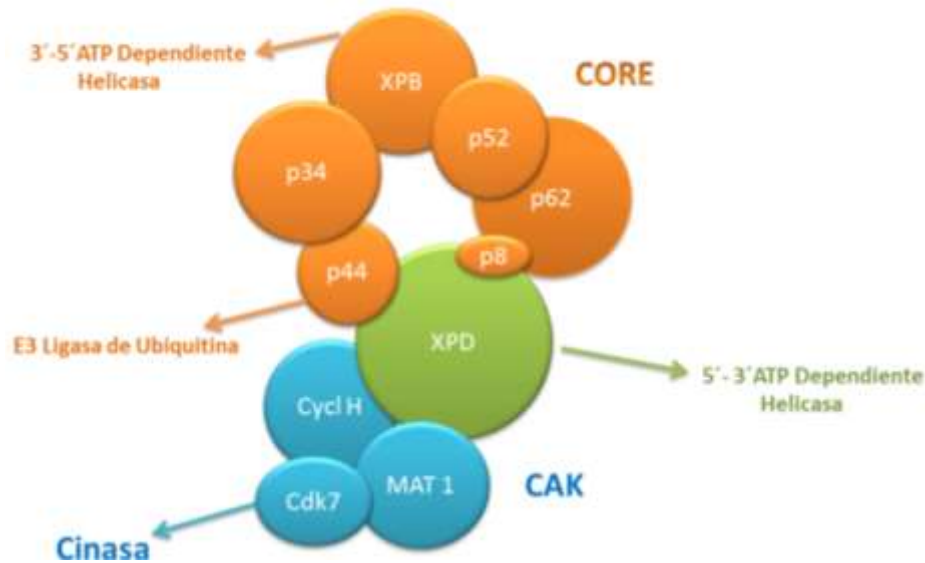


Figura 2. Estructura de TFIIH. El complejo de transcripción TFIIH está formado por diez subunidades organizadas en dos subcomplejos funcionales: el “Core”, compuesto por XPB, p52, p34, p44, XPD, p8 y p62; y el “CAK”, formado por Cdk7, Ciclina H y Mat1. Ambos complejos están conectados a través de la proteína XPD (Modificado de (13)).

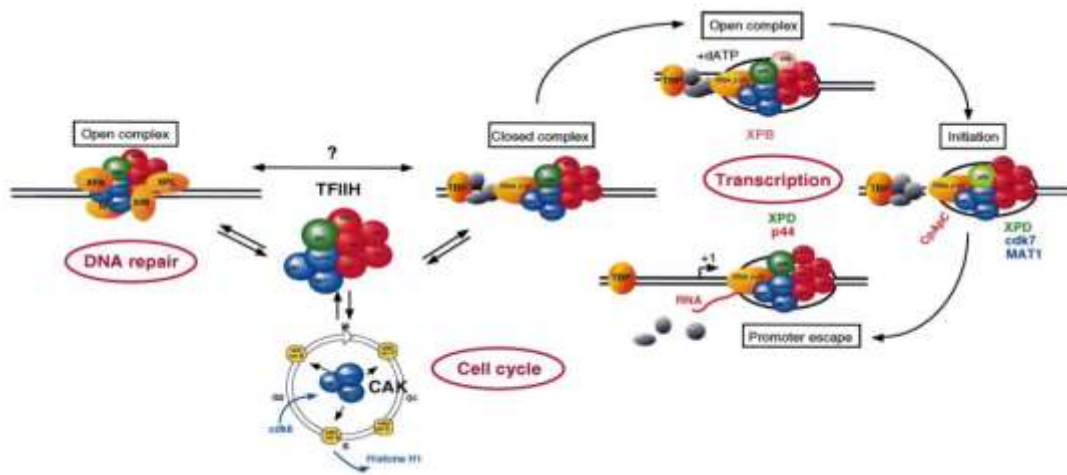


Figura 3. TFIID. Participación de TFIID en la reparación por daño al DNA, en el ciclo celular y en la transcripción (Tomado de (16)).

Algunas de las proteínas que componen a TFIID tienen varias actividades enzimáticas, XPB y XPD son helicasas/ATPasas de ADN y se ha descrito que la subunidad XPD interacciona con MMS19 en el complejo MMXD, el cual es requerido para una correcta segregación cromosomal (13), Cdk7 es una cinasa, mientras que se ha reportado que la subunidad p44 tiene actividad, in vitro, de ligasa de ubiquitina en levadura (17). Por otro lado la subunidad p52 regula la actividad ATPasa de XPB, así como su ensamblaje al complejo. XPB también es una translocasa de DNA, actividad que es importante para ubicar el sitio de inicio de la transcripción (18)

Cuadro 1. Composición del complejo de transcripción TFIIH

Subcomplejo	Subunidad	Función
Core	XPB/ERCC3	Helicasa 3´-5´ dependiente de ATP.
	XPD/ERCC2	Helicasa 5´-3´ dependiente de ATP, forma un puente entre el core y el CAK.
		p62
	p52	Regula la actividad ATPasa de XPB
	p44	Regula la actividad helicasa de XPD.
		Ligada E3 de ubiquitina (en levadura).
	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 RNA Pol II.
	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 tricodistrofia grupo de complementación A (Modificado de (19)).

1.2.1.1 Funciones de TFIIH.

1.2.1.1.1 Papel de TFIIH durante la transcripción.

El DNA es una macromolécula que funciona como reservorio de la información genética. El proceso celular que se encarga de transmitir esta información mediante la síntesis de un RNA mensajero (mRNA) se denomina transcripción. La

enzima responsable de la síntesis de los mRNA en eucariontes es la RNP II. La transcripción mediada por la RNP II se divide en tres fases: la iniciación, la elongación y la terminación. La iniciación consiste en el reconocimiento de la región promotora y la formación del complejo de iniciación, el cual se compone de factores multiproteicos denominados TFIIX y la RNP II. Primero, el promotor es reconocido por el complejo TFIID, el cual está compuesto por la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y sus proteínas asociadas (TAFs). Posteriormente, se reclutan TFIIA, posiblemente para incrementar la afinidad de la TBP por la caja TATA. Después TFIIIF se une a la RNP II permitiendo la unión de la polimerasa al complejo de iniciación. Finalmente TFIIIE se une al complejo de iniciación y recluta a TFIIH mediante la interacción directa con la proteína XPB. Con todo lo anterior queda establecida la maquinaria basal de transcripción (Figura 4). El siguiente paso de la iniciación requiere de la separación de la doble hebra del DNA (formación del complejo abierto). La separación del DNA requiere de la presencia de enzimas con actividad de helicasa para el DNA, dicha actividad se encuentra en el complejo TFIIH, y en particular en las helicasas XPB y XPD (20). Una vez separadas las hebras del DNA, se inicia la síntesis del mRNA. El paso inicial de la síntesis es la formación del primer enlace fosfodiéster. Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad de XPB es esencial para la formación de dicho enlace. Posteriormente, se inicia la elongación, la cual da comienzo cuando el carboxilo terminal de la subunidad grande de la RNP II (CTD) es fosforilada. Esta fosforilación se requiere para que la polimerasa se libere de los TFIIX. Una de las cinasas responsables de la fosforilación del CTD es CDK7, la cinasa de TFIIH (21). Durante la primera fase de la elongación, la polimerasa no puede escapar del promotor, y sintetizar fragmentos cortos de mRNA (22). Mediante la acción de la helicasa XPB, la RNA pol II finalmente escapa del promotor y se inicia la elongación (Figura 5).

1.2.1.1.2 La participación de TFIIH en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos

El mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) se encarga de la remoción de pequeñas distorsiones en el DNA, particularmente generadas por la irradiación de luz ultravioleta (UV). La luz UV genera dos tipos de lesiones en el DNA, los dímeros de ciclobutano de pirimidinas (CPD) y el fotoproducto 6-4 (6-4 PP). En NER participan al menos 20 proteínas, por lo que se le considera como una de las vías de reparación más complejas.

Existen dos tipos de NER, la reparación general del genoma (GG) y la reparación acoplada a la transcripción (TCR). La reparación GG se encarga de la remoción de los dímeros de timina de todo el genoma y se caracteriza por ser un proceso lento. Por su parte, la reparación acoplada a la transcripción es un proceso que consiste en la remoción rápida del daño en las regiones que se transcriben. Ambos mecanismos de reparación difieren en la forma de reconocer la distorsión causada por la presencia del dímero de timina en el DNA. En el caso de la reparación global del genoma, el daño es identificado por el complejo XPC-hHR23B, mientras que en la reparación acoplada a la transcripción los responsables del reconocimiento del daño son la RNP II y CSB. En ambos casos, las proteínas que reconocen el daño reclutan al núcleo de TFIIH, que se encarga de separar la doble hebra de DNA en la zona con el daño, por medio de la acción de las dos helicasas, XPB y XPD. Después se unen las proteínas RPA y XPA que estabilizan este complejo. Posteriormente se reclutan las endonucleasas de cadena sencilla XPF y XPG que cortan los extremos del fragmento dañado liberando un oligonucleótido de alrededor de 29 bases de longitud. Finalmente, la polimerasa ϵ sintetiza el fragmento escindido utilizando la cadena intacta como templado. Mutaciones en componentes de TFIIH claramente pueden afectar este mecanismo, ya que en levadura y *Drosophila* estas mutantes son hipersensibles a la luz UV (24) (Figura 6).

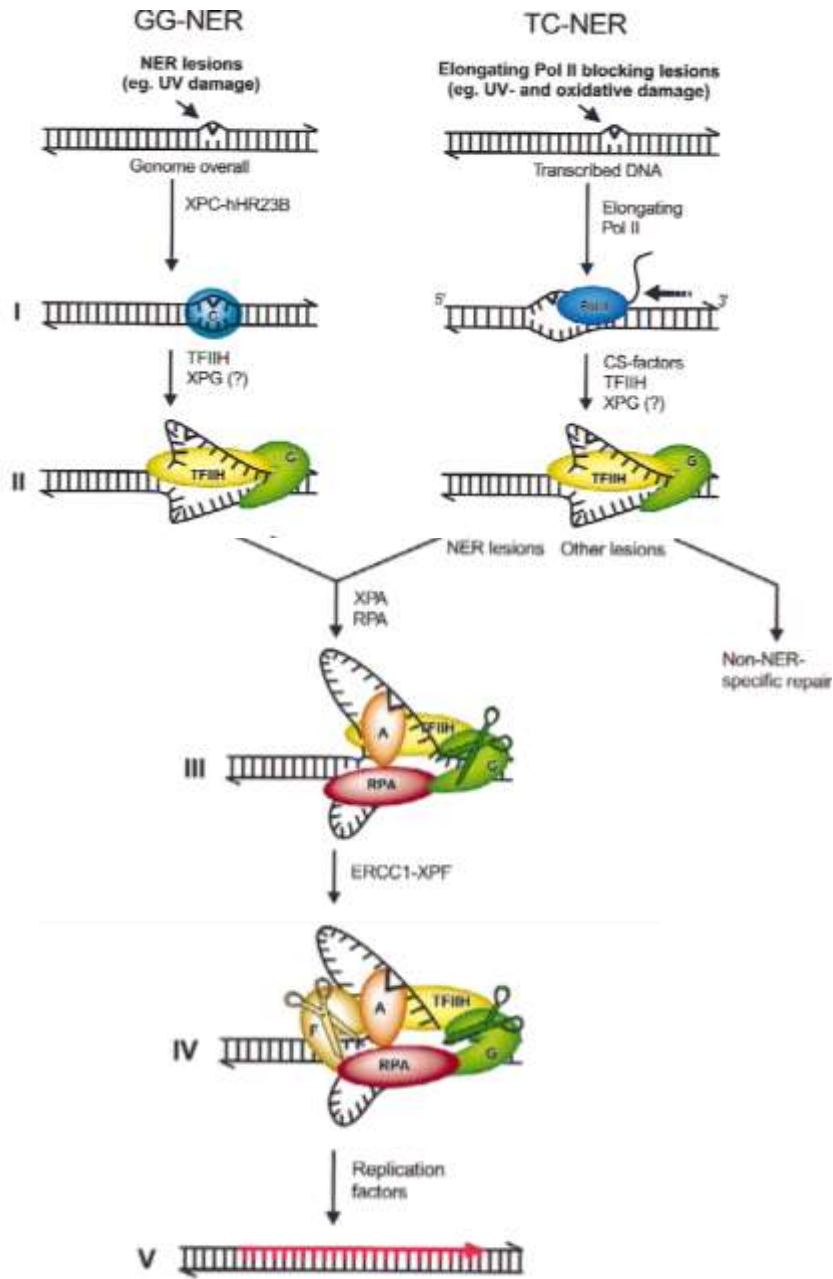


Figura 6. Modelo de la Reparación por Escisión de Nucleótidos (REN). El mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos ocurre en dos regiones diferentes del genoma: las regiones transcripcionalmente inactivas, proceso denominado Reparación Global del Genoma (GGR) y en las regiones donde la transcripción está activa, proceso conocido como Reparación Acoplada a la Transcripción (TCR). Estos mecanismos de reparación remueven lesiones que afectan la estructura del ADN, como los dímeros ciclobutano de pirimidina (CPD's) y los 6-4 fotoproductos (6-4 PP's) generados por agentes químicos y por la luz ultravioleta. Durante la GGR XPC y hHR23B reconocen una distorsión en la hélice de DNA, posteriormente XPC recluta a TFIIH y las subunidad XPB y XPD desenrollan el DNA alrededor de la lesión hasta 6 formar una burbuja estabilizada por RPA y XPA. Las endonucleasas XPG y XPF/ERCC1 liberan el fragmento que contiene el DNA dañado, enseguida el espacio generado por este corte es llenado por la acción de PCNA, RFC y la ADN polimerasa. Finalmente las cadenas de ADN son unidas por una ADN ligasa. Durante la TCR

las proteínas CSA y CSB, son las encargadas de reconocer a la RNA pol II incapaz de continuar con la elongación y reclutan a la maquinaria de reparación, posteriormente ocurre un mecanismo similar al de GGR. (Tomado de (25)).

1.2.1.1.3 TFIH en el control del ciclo celular

El ciclo celular está regulado por la acción sucesiva de diferentes cinasas dependientes de ciclina (CDKs). La actividad de las Cdk's está regulada positiva y negativamente por su asociación con ciclinas, así como, por eventos de fosforilación y defosforilación. La activación completa de las CDKs requiere la fosforilación de un residuo conservado de treonina localizado en el "T-loop", un sustrato común para todas las CDKs y muchas otras cinasas. En moléculas de CDKs monoméricas inactivas, el "T-loop" bloquea el sitio catalítico y obstaculiza la unión del sustrato (26).

El subcomplejo CAK se requiere para la progresión del ciclo celular, CDK7 fosforila a CDK2, lo cual regula la transcripción de G1 a S; mientras que la fosforilación del T-loop del CDK1 es crucial para el ensamblaje del complejo CDK1/Ciclina B1 y con ello la progresión de la fase G2 a M(21) (Figura 7).

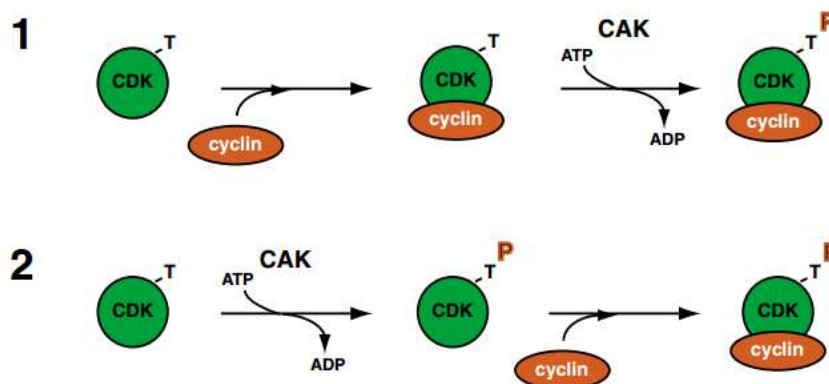


Figura 7. Modelo esquemático del mecanismo de activación de las cinasas dependientes de ciclina (CDKs). 1) Unión de una ciclina para formar un complejo inactivo precede a la fosforilación del T loop por CAK. Este es el mecanismo seguido para la activación del complejo de CDK1-ciclinaB por CDK7 en células animales. 2) CAK fosforila el T loop de CDK, el cual se activa después de la unión de una ciclina (Tomado de (27)).

1.2.1.2 Síndromes relacionados con mutaciones en TFIIH

Un aspecto importante en el estudio de TFIIH es que mutaciones en este complejo en humanos están relacionadas a tres síndromes: Xeroderma pigmentosum (XP), Tricotiodistrofia (TTD) y el síndrome de Cockayne (CS), los cuales se asocian a mutaciones encontradas en XPB, XPD y p8(28). Se describen a continuación de una manera brevemente los fenotipos asociados a cada enfermedad:

- ✓ **Xenoderma pigmentosum:** estos pacientes presenta una alta incidencia de desarrollar cáncer en la piel aproximadamente >1000 veces que la población normal así como >10 veces el desarrollo de tumores internos principalmente en pulmón y vejiga; asimismo, presenta una pigmentación anormal de la piel y en casos severos también exhiben anormalmente neurológicas (29).
- ✓ **Síndrome de Cockayne:** los pacientes presentan calcificación del sistema nervioso, neurodesmielinación, enanismo caquéctico, anormalidades esqueléticas, degeneración mental progresiva, ataxia, degeneración retinal y bajo peso al nacer. La mayoría de los pacientes presentan mutaciones en CSA o CSB aunque hay reportes de mutaciones en XPB, XPB y XPG (30).
- ✓ **Tricotiodistrofia:** presenta descamación de la piel o ictiosis, cabello y uñas quebradizas, anormalidades esqueléticas, retraso mental, estatura corta, anemia, características de envejecimiento prematuro como caquexia, y osteoporosis. Los genes afectados corresponden a las subunidades de TFIIH: XPB, XPD y p8 (31) (Figura 8).



Figura 8. Síndromes asociados a mutaciones en componentes de TFIIH. A. Xenoderma pigmentosum (XP). **B.** Síndrome de Cockayne. **C.** Tricotiodistrofia (TTD). (29)

1.3 Fármacos cuyos blancos terapéuticos son factores transcripcionales

Los fármacos cuyos blancos sea alguno de los componentes de la maquinaria de transcripción basal (Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), RNP o alguno de los componentes de la transcripción asociada a algún complejo) podrían afectar preferencialmente las células cancerosas. (32) En este trabajo se ha trabajado con dos fármacos cuyos únicos blanco son dos subunidades diferentes del complejo de TFIIH, que a continuación se describen.

1.3.1 Triptolide

Triptolide (TPL), es un diterpeno tripóxido, obtenido de la raíz de la planta *Tripterygium wilfordii* (Figura 9), usado en la medicina tradicional china como un potente antiinflamatorio, antiproliferativo y proapoptótico, se encuentra en fases clínicas de tratamiento contra el cáncer (33). Se ha demostrado en estudios que el triptolide inhibe la proliferación celular e induce apoptosis a concentraciones nanomolares (nM), por lo menos en 60 líneas de cáncer (34).

El triptolide se une a la subunidad XPB/ERCC3 del factor de transcripción TFIIH cuyo blanco es la subunidad XPB de TFIIH uniéndose covalentemente a esta subunidad, inhibe su actividad ATPasa dependiente de DNA sin afectar la actividad helicasa, que conduce a la inhibición de la transcripción mediada por la RNP II y a la reparación por escisión de nucleótidos (REN) (35, 36).

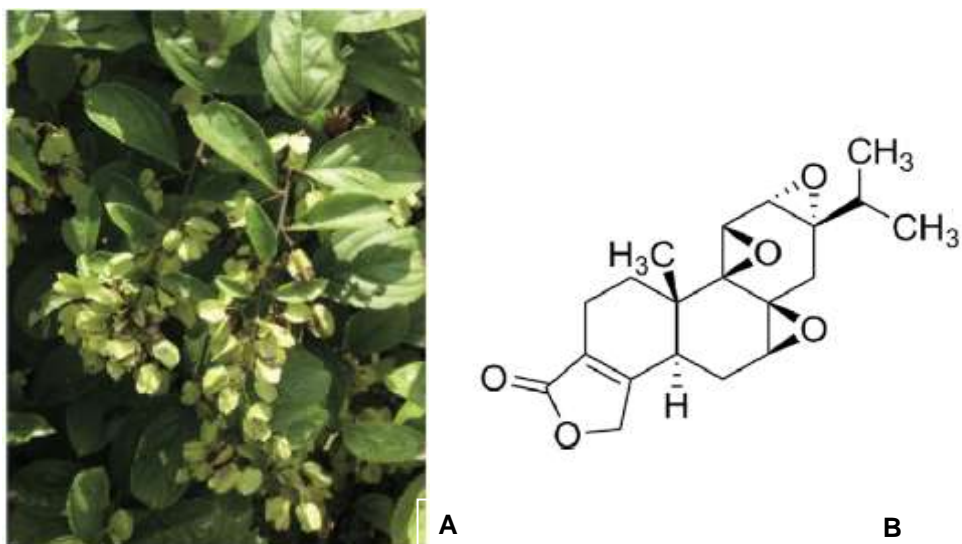


Figura 9 (A) Imagen de la planta *Tripterygium wilfordii* de donde se obtiene el compuesto Triptolide. (B) Estructura química del triptolide. (Tomada de (37)).

1.3.2 THZ1

Como se ha escrito en párrafos anteriores TFIIH es un factor limitante para la transcripción, este factor está formado por 10 subunidades agrupadas en dos subcomplejos: core y CAK, una de las subunidades con actividad enzimática es CDK7 que es la encargada de fosforilar al CTD de la RNA Pol II en la serina 5 y 7 (21).

En tumores malignos algunas de las CDKs están desreguladas, estas son blancos potenciales de fármacos antitumorales, sin embargo la mayor parte de los inhibidores de CDK tienen su blanco en el dominio de 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.

En un estudio reciente de Kwiatkowski et al. (2014) lograron identificar un inhibidor de CDK7 llamado THZ1 (Fenilaminopirimidina) (Figura 10a), el cual a concentraciones nanomolares (nM) es eficaz, ya que reduce la proliferación celular de diferentes tipos de líneas celulares de cáncer. El compuesto THZ1 se une de manera covalentemente a CDK7 a la cisteína (Cys 312) de CKD7, la cual está fuera del dominio cinasa, lo cual lo hace un fármaco específico para CDK7. THZ1 inhibe la actividad cinasa de CDK7, es decir, no puede fosforilar la Ser 5 y 7 del CTD (Figura 10b) (38).

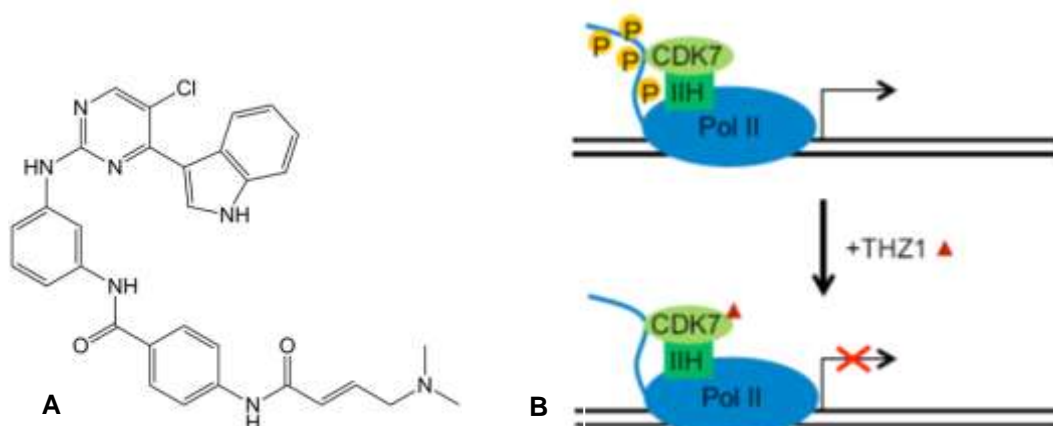


Figura 10. A) Estructura química del compuesto THZ1, **B) Mecanismo de acción de THZ1**, inhibe la actividad cinasa de CDK7.(Tomado de (38) y (39))

Estos aspectos son relevantes para este proyecto ya que como se mencionó anteriormente, la célula cancerosa necesita una actividad transcripcional alta para proliferar y sobrevivir. Es así como TFIIH se convierte en un blanco interesante

para el tratamiento contra el cáncer, en especial porque de todos los componentes del PIC, TFIID es el factor limitante (40).

1.4 Descripción del modelo experimental

Las células MCF10A son células normales inmortalizadas, que se originan de un linaje epitelial, 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). Las células MCF10A-Er-Src 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 está fusionado al dominio de unión a hormona del receptor de estrógeno (ER). Se ha comprobado que el uso del fármaco denominado tamoxifen (TAM) en esta línea produce un cambio conformacional en el sitio de unión de hormona del receptor de estrógenos activando a Src (41), este tratamiento induce la transformación de las células generando un fenotipo canceroso a las 36 horas post-tratamiento, con una transformación mayor del 90%. Por lo tanto la elección de este modelo es adecuado para ver el cambio de las células cuando pasan de un estado no canceroso a un estado canceroso. Con base a ello en este proyecto se realizarán cultivos celulares de la línea epitelial de mama MCF10A ER-Src como modelo, ya que nos permitirá abordar las preguntas planteadas cuando estas células son inducidas cancerosas (42)

El mecanismo por el cual la activación por tamoxifen induce un fenotipo canceroso es cuando Src se activa y con su actividad de cinasa fosforila residuos de serina del inhibidor de NFκB (IκB). Una vez que el inhibidor está fosforilado, se libera el factor NFκB ya que el inhibidor IκB se degrada vía proteosoma. El factor NFκB se transloca al núcleo, y activa la expresión de la interleucina 6 (IL-6). Después la proteína se libera y se une a su receptor (IL6-R).

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, las Stat3 se fosforilan, dimerizan y se translocan al núcleo para regular la transcripción de genes asociados con proliferación celular y anti-apoptosis, la activación de Stat3 es importante para el mantenimiento de la translocación celular.

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 (dominio SH2 de Grb2 se une a péptidos que contienen tirosina fosforilados sobre los receptores o proteínas de andamiaje con una preferencia por PY-XNX, donde X es generalmente un residuo hidrófobo tal como valina), que puede activar a 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.

En esta vía de señalización, también participan varios microRNAs, donde se ve que al activarse NFκB regula de manera positiva a Lin 28 el cual a su vez inhibe a Let7, ya que de manera normal Let 7 inhibe a la IL-6 y la via de RAS(41). 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 a través de la inhibición de los genes supresores de tumores PTEN y CYLD. Este loop también se mantiene activo ya que debido al nivel elevado de Stat3, este es capaz de inhibir a TSC22D3 (también conocido como GILZ, el cual es un regulador transcripcional), ya que de manera activa TSC22D3 es capaz de inhibir a RAS y NFκB (43). Por lo tanto con una simple dosis de tamoxifen se activa un loop que mantiene epigenéticamente el fenotipo canceroso.

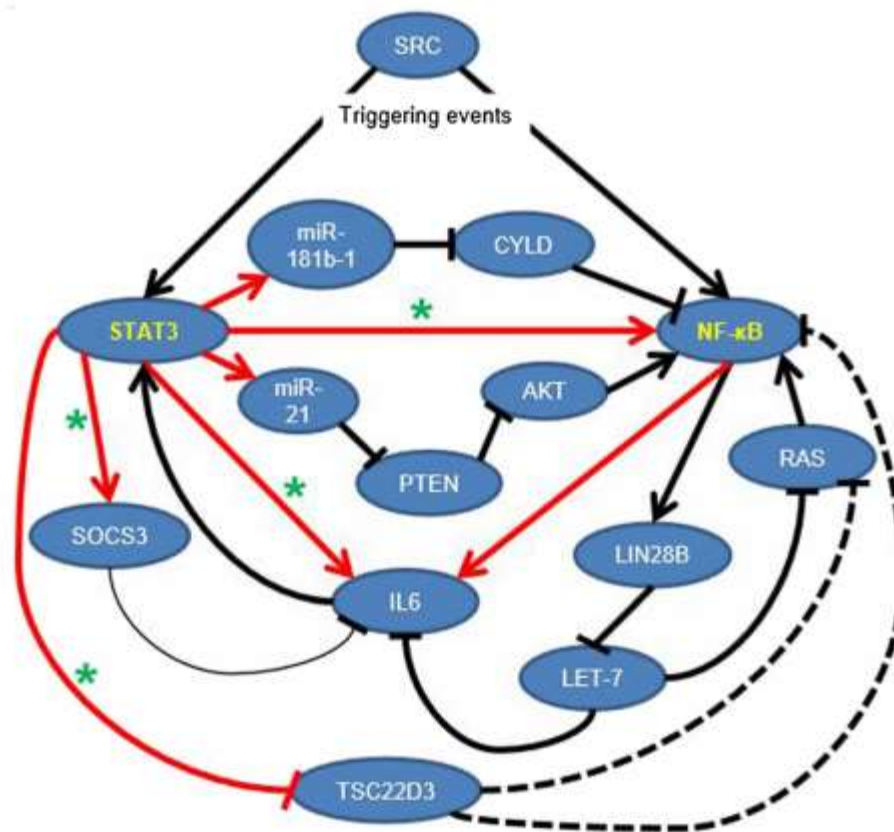


Figura 11. Descripción del esquema del loop epigenético para iniciar y mantener la transformación celular de la línea MCF10AErSrc. Tomado de (43)

2. JUSTIFICACIÓN

La línea de investigación del Dr. Zurita ha sido durante más de 15 años el estudio del factor transcripcional TFIIH usando como modelo de estudio a *Drosophila melanogaster*, en este modelo se ha podido generar una gran cantidad de conocimientos que han permitido dilucidar su importancia como factor limitante para que se lleve a cabo la transcripción. Actualmente se pretende extrapolar el estudio del factor TFIIH y su importancia en un modelo celular inmortalizado que permite la generación de un fenotipo canceroso, para poder determinar cuál es el efecto que tiene en la transformación, por lo tanto se han planteado las siguientes preguntas:

1. ¿Ocurren cambios en los niveles basales de TFIIH cuando una célula se transforma y adquiere un fenotipo canceroso?
2. ¿Ocurren cambios en la distribución de TFIIH en la cromatina cuando se transforma una célula?
3. ¿Qué efecto tiene la supresión parcial de las actividades de TFIIH en una célula cancerosa con respecto a su progenitora?

3. HIPÓTESIS

Al ser TFIIH un factor limitante en la transcripción por RNP II y si se demuestra que se requieren de mayores niveles de transcripción en células cancerosas que en células no cancerosas, las diferentes subunidades de TFIIH pueden ser blanco para tratar preferencialmente células cancerosas.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la inactivación de alguna de las subunidades del complejo TFIIH afecta de manera preferencial a las células cancerosas utilizando un modelo de inducción del fenotipo canceroso.

Objetivos particulares

- ⊕ Determinar si hay cambio en la expresión de algunas subunidades de TFIIH cuando las células pasan de un estado no canceroso a un estado canceroso.
- ⊕ Determinar si hay cambio en la localización de algunas subunidades de TFIIH cuando las células pasan de un estado no canceroso a un estado canceroso.
- ⊕ Determinar si en nuestro modelo experimental el uso de algún inhibidor de TFIIH (Triptolide y THZ1) compromete el fenotipo canceroso.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- ⊕ Para determinar si hay cambio en la concentración proteica de las diferentes subunidades de TFIIH cuando las células pasan de un estado no canceroso a un estado canceroso se realizaron ensayos tipo western blot, para algunas de las subunidad del complejo de TFIIH, y así poder comparar la cantidad de proteína.

- ⊕ Para evaluar si ocurren cambios en la distribución de las diferentes subunidades de TFIIH se realizaron ensayos de inmunotinciones en células cancerosas y células no cancerosas.

- ⊕ Para determinar si en el modelo experimental, el uso del triptolide y/o del THZ1 afecta preferencialmente a las células cancerosas, se probaron diferentes concentraciones de triptolide y THZ1, para así evaluar la proliferación celular mediante citometría de flujo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Línea celular MCF10A-ER-Src

La línea celular utilizada en el presente trabajo fue una donación de Harvard Medical School del laboratorio del Dr. Kevin Struhl, esta línea celular se cultivó en las condiciones que a continuación se describen

Cuadro 2. Componentes del medio de crecimiento para la línea celular MCF10AERsrc

Componente	Medio de crecimiento 0.5µg/ mL de puomicina ^a	Medio de selección 2 µg/ mL de puomicina ^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 µg/ml stock) ^b	100 µl	100 µl
Hidrocortisona (1 mg/ml) ^c	250 µl	250 µl
Toxina del colera (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
Puomicina (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 100µg/ml en dH₂O estéril. Realizar alícuotas y guardarlas a -20°C.

^c Hidrocortisona (Sigma No. H-0888, franco con 1g). Resuspender 1mg/ml en etanol. Realizar alícuotas y guardarlas a -20°C.

^d Toxina del cólera (Sigma No. C-8052, frasco con 2g). Resuspender 1mg/ml en dH₂O estéril y dejar en agitación aproximadamente durante 10 min. Realizar alícuotas y guardar a 4°C.

^e Insulina (Sigma No. I-1882, vial con 100 mg). Resuspender 10 mg/ml en dH₂O estéril con 1% de ácido acético glacial, dejar en agitación de 10 a 15 min. Realizar alícuotas y guardar a -20°C

^f Puomicina (Calbiochem No Cat. 540411) Resuspender 1mg/ml en dH₂O estéril . Realizar alícuotas y guardar a -20°C. Modificado de (44)

La línea se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂.

Al momento de descongelar la línea celular, se realizaron dos pases con el medio de selección (Cuadro 2), posterior a estos pases, la línea celular se cultivó con el medio de crecimiento (Cuadro 2) (44).

6.2 Extractos nucleares

Los extractos proteicos se realizaron de la siguiente forma: las células se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X frío y se lavaron dos veces (2000 rpm durante 5 minutos), después 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), mas inhibidores (complete 50X (Roche), DTT 1 M, PMSF 250 mM y Triton-X100 10%) se mezcló con la ayuda de una micropipeta y se incubo en hielo durante 15 min. Posteriormente se centrifugo durante dos minutos a 13000 rpm a 4°C y se removió el sobrenadante (fracción citosolica), a la pastilla nuclear se le agrego 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 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugo a 13000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante y se alicuotó y almaceno a -80°C.

6.2 Cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford

De acuerdo al protocolo descrito por Marion M. Bradford en 1975, la cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford, este reactivo se puede medir a 595 nM en el espectrofotómetro.

Para poder determinar la concentración de las proteínas, se utilizó una curva de referencia con concentraciones conocidas de BSA. De acuerdo al siguiente cuadro:

Cuadro 3. Curva de cuantificación mediante el método de Bradford

Stock BSA (1 µg/µL)	H ₂ O	Reactivo de Bradford
-	800 µL	200 µL
4 µL	796 µL	
8 µL	792 µL	
16 µL	784 µL	
32 µL	768 µL	

La reacción se mezcló por pipeteo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 min. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo la cuantificación en el espectrofotómetro. Obtenidos los valores de densidad óptica para cada dilución de albúmina y de la muestras problema. Los datos se graficaron de la siguiente manera: cantidad de albúmina (eje de las abscisas), absorbancia obtenida (eje de las ordenadas). La absorbancia obtenida de la muestra problema, se interpola a la curva y se extrapolo al eje X para establecer la cantidad y concentración de las proteínas del extracto nuclear (45).

6.3 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

De acuerdo al protocolo descrito por Towbin, H. Staehelin, T y Gordon, J en 1979. El gel SDS-PAGE consta de dos tipos de geles, el gel concentrador y el gel resolutivo. Primero se preparó el gel resolutivo, para que esta quedara en la parte inferior y posteriormente el gel concentrador el cual se ubicó en la parte superior.

Cuadro 4. Preparación de GEL SEPARADOR

	8 ml 12%	7.5 mL 15%
Sol A:	3.2 mL	3.75 mL
Sol B:	3 mL	2.81 mL
Sol C:	80 µL	75 µL
H₂O	1.66 mL	0.825 mL
10% PSA	32 µL	30 µL
TEMED	6.62 µL	6.3 µL

Solución A: 30% acrilamida-bisacril (30:0.8): para 250 mL (Acrilamida: 75 g y bis acrilamida: 2g) se filtró por Milipore y se guardó a 4°C protegido de la luz.

Solución B: 1M Buffer Tris pH 8.8 (12.11g de Tris, agregar 50 mL de agua. Ajustar el pH a 8.8 con HCl aforar a 100 mL y guardar a 4°C).

Solución C: 10% SDS (10g de SDS disueltos en 100 mL de agua. Guardar a temperatura ambiente).

Cuadro 5. Preparación de GEL CONCENTRADOR AL 4%

	3 ml
Sol A:	390 µL
Sol D:	370 µL
Sol C:	30 µL
H₂O	2.16 ml
10% PSA	30 µL
TEMED	1.5 µL

Solución A: 30% acrilamida-bisacril (30:0.8): para 250 mL (Acrilamida: 75 g y bis acrilamida: 2g) se filtró por Milipore y se guardó a 4°C protegido de la luz.

Solución B: 1M Buffer Tris pH 8.8 (12.11g de Tris, agregar 50 mL de agua. Ajustar el pH a 8.8 con HCl aforar a 100 mL y guardar a 4°C).

Solución D: 1M Buffer Tris, pH 6.8 (6 g de Tris se disolvieron en 20 mL de agua. Ajustar el pH 6.8 con HCl. Aforar a 50 mL. Guardar a 4°C).

Una vez polimerizadas ambas fases del gel, este se colocó en una cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN Gels165-8005EDU, Bio-Rad) y se cargaron las muestras en los pozos del gel concentrador. Previamente las muestras de proteínas fueron preparadas con buffer Laemmli (0.2 M Tris pH 6.8, 0.4% SDS, 2 β -mercaptoetanol 0.4%, glicerol 4%, 0.1% azul de bromofenol) a una concentración final de 1X y hervidas por 5 min a 100°C. Después de esto las muestras se centrifugaron por 15 segundos a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante, el cual quedo listo para cargarse en los pozos del gel. Se inició la electroforesis empleando buffer de corrida (25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 0.1%, SDS) a un voltaje constante de 60 V durante 40 min y después 2 horas a 100 V. Una vez finalizada la migración, se desmonto el gel de la cámara de electroforesis y se tiñó con azul de coomassie (Bio-Rad) (0.2% azul de coomassie R-250, 50% metanol, 7% ácido acético, 40% agua) durante 1 hora con agitación constante. Una vez teñido el gel, se colocó 1 hora en una solución desteñidora (30% metanol, 10% ácido acético) (46).

6.4 Ensayos de Western Blot

De acuerdo al protocolo descrito por Burnette en 1981, los ensayos de Western Blot se realizaron de la siguiente manera: las muestras se resolvieron en un gel SDS_PAGE. El gel se ensambló en un *sándwich* en el siguiente orden: tres esponjas, tres hojas de papel Whatman de 3mm, gel, membrana de nitrocelulosa, tres hojas de papel Whatman y tres esponjas. Posteriormente el *sándwich* se colocó en la cámara de transferencia y se corrió durante toda la noche a 80 mAmp a 4°C y por la mañana 2 horas a 250 mAmp. con buffer de transferencia (20% metanol, 50 mM Tris, 1.92 M Glicina) del polo negativo hacia el polo positivo. Para verificar que las proteínas se hubieran transferido a la membrana de nitrocelulosa, esta se tiño con rojo de Ponceau (0.5g de rojo de ponceau en ácido acético al 2%) durante 30 min. Una vez verificada la transferencia, la membrana se lavó y bloqueó con leche al 10% diluida en PBS 1X/Tween 0.1% durante toda la noche a

4°C. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo de interés disuelto previamente en una solución que contenía leche al 5% diluida en PBS 1X/Tween 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de incubación, la membrana se lavó 6 veces con PBS 1X/Tween 0.1% durante 10 min cada lavado, con el fin de eliminar el exceso del anticuerpo primario.

Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario IgG, el cual también se diluyó en leche al 5% en PBS 1%/Tween 0.1%, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron 6 lavados de 10 min cada uno con PBS 1X/Tween 0.1%.

Cuadro 6. Características de los anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Origen	Marca	Tipo	No. de catalogo
RNA Pol II 8WG16 CTD sin fosforilar	Ratón	BioLegend	Monoclonal	MMS-126R
RNA Pol II H14 CTD S 5 fosforilada	Ratón	BioLegend	Monoclonal	MMS-134R
Actina	Ratón	DSHB		JLA20
TFIID (TBP) (58C9)	Raton	Santa Cruz	Policlonal	sc-421
TFIIH p89 (S-19)	Conejo	Santa Cruz	Policlonal	sc-293
TFIIH p62 (Q-19)	Conejo	Santa Cruz	Policlonal	sc-292
CDK7 (FL-346)	Conejo	Santa Cruz	Policlonal	sc-856
Mat1 (FL-309)	Conejo	Santa Cruz	Policlonal	sc-6234
Cyclin H (FL-323)	Conejo	Santa Cruz	Policlonal	sc-855
Anti-ERCC2 (16-30)	Conejo	Sigma-Aldrich	Policlonal	E1284
Anti-p8/TTD-A	Conejo	Sigma-Aldrich	Policlonal	T9577

Cuadro 7. Títulos de los anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
RNA Pol II 8WG16 CTD in fosforilar	1:1500	1:3500
RNA Pol II H14 CTD S 5 fosforilada	1:1500	1:3500
Actina	1:2000	1:3500
TFIID (TBP) (58C9)	1:1000	1:1000
TFIIH p89 (S-19)	1:200	1:1000
TFIIH p62 (Q-19)	1:200	1:1000
CDK7 (FL-346)	1:200	1:1000
Mat1 (FL-309)	1:200	1:1000
Cyclin H (FL-323)	1:200	1:1000
Anti-ERCC2 (16-30)	1:20000	1:3000
Anti-p8/TTD-A	1:1000	1:3000

Con el objeto de revelar las interacciones antígeno-anticuerpo se utilizó el kit de bioluminiscencia Perkin-Elmer pmol. Brevemente, en un cuarto oscuro, la membrana se colocó en un recipiente que contenía la mezcla 1:1 de los reactivos 1 y 2 durante 5 min de agitación y finalmente la membrana se expuso a una placa radiográfica (Kodak Ultrasensible) Los experimentos se realizaron por triplicado (47).

6.5 Inmunotinciones

Las inmunotinciones se realizaron en la línea celular: MCF10AErSrc en cámaras acopladas a portaobjetos con superficie adherente (Lab-tek Chamber Slide 4 u 8 pozos, No cat. 177402). Una vez que las células alcanzaron el 40-50% de confluencia se comenzó el protocolo descrito por Coons, A. H en 1941.

Las células se lavaron tres veces con PBS 1X frío, después se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente

las células se permeabilizaron con 0.5% Triton-X100 disuelto en PBS1X por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se bloqueó con BSA al 3% disuelto en PBS1X/Tween 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente. Seguido del bloqueo se incubó el anticuerpo primario de interés disuelto previamente en BSA al 1% disuelta en PBS1X/Tween 0.1% durante toda la noche a 4°C. Después se realizaron 6 lavados con PBS1X a temperatura ambiente y las células se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en BSA al 1% disuelta en PBS1X/Tween 0.1%. Posteriormente, las células se lavaron seis veces con PBS1X a temperatura ambiente y finalmente se tiñeron con Hoechst 50 pmolar disuelto en PBS1X durante 15min a temperatura ambiente para poder visualizar el DNA. Los experimentos se realizaron por triplicado.(48).

Cuadro 8. Títulos de los anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
RNA Pol II 8WG16 CTD in fosforilar	1:300	1:1000
TFIIH p89 (S-19)	1:500	1:1000
CDK7 (FL-346)	1:300	1:1000
Mat1 (FL-309)	1:500	1:1000
Cyclin H (FL-323)	1:300	1:500

6.6 Ensayos de viabilidad y apoptosis con el fármaco Triptolide

La línea celular MCF10AErSrc se sembró en cajas de 6 pozos, una caja correspondiente para células no cancerosas y otra cancerosa (1×10^6 células), y se aplicó tratamiento con el fármaco triptolide a diferentes concentraciones (5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM y 100 nM). Para los ensayos de viabilidad se aplicó el tratamiento a 24 y 48 horas y se analizó mediante citometria de flujo, mediante el siguiente protocolo: se lavaron las células dos veces con PBS frío y luego se volvieron a resuspender las células en 400 μ L de PBS y se le agregaron 3 μ L de

yoduro de propidio (PI) y se incubaron durante 5 min antes de analizarlas por el citómetro.

Para los ensayos de apoptosis se sembraron cajas de 6 pozos con células cancerosas y no cancerosas, y se aplicó el mismo tratamiento de triptolide solo que se analizaron las muestras a las 12 horas después del tratamiento. Para el análisis de muestras se siguió el siguiente protocolo: se lavaron dos veces las células con PBS frío y se resuspendieron en 400 μ L de buffer de lavado 1X (1×10^6 células/mL), se agregó 3 μ L de FITC Annexin y 3 μ L de PI, se incubaron las muestras durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad antes de ser analizadas por citometria de flujo (Citometro: BD FACS Canto II, Flow Cytometer 339473).

Los controles internos positivos usados para las células teñidas con yoduro de propidio fue: DMSO al 30% 24 horas antes de ser evaluados mediante citometria y para FITC Annexin V fue Rotenona a 250 nM 24 horas antes de ser evaluados mediante citometria.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.7 Ensayos de viabilidad y apoptosis usando el inhibidor de CDK7: THZ1

La línea celular MCF10AErSrc se sembró en cajas de 6 pozos, una caja correspondiente para células no cancerosas y otra cancerosa (1×10^6 células), y se aplicó tratamiento con el fármaco THZ1 a diferentes concentraciones (20 nM, 40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM y 250 nM). Para los ensayos de viabilidad se aplicó el tratamiento a 24, 48 y 72 horas y se analizó mediante citometria de flujo: Mediante el siguiente protocolo: se lavaron las células dos veces con PBS frío y luego se volvieron a resuspender las células en 400 μ L de PBS y se le agregaron 3 μ L de yoduro de propidio (PI) y se incubaron durante 5 min antes de analizarlas por el citómetro.

Para los ensayos de apoptosis se sembraron cajas de 6 pozos con células cancerosas y no cancerosas, y se aplicó tratamiento con el fármaco THZ1 a diferentes concentraciones (40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM y 250 nM) y se analizaron a 24, 48 y 72 horas postratamiento. Para el análisis de muestras se siguió el siguiente protocolo: se lavaron dos veces las células con PBS frío y se resuspendieron en 400 μ L de buffer de lavado 1X (1×10^6 células/mL), se agregó 3 μ L de FITC Annexin y se incubaron las muestras durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad antes de ser analizadas por citometría de flujo. (Citómetro: BD FACS Canto II, Flow Cytometer 339473).

Los controles internos positivos usados para las células teñidas con yoduro de propidio fue: DMSO al 30% 24 horas antes de ser evaluados mediante citometría y para FITC Annexin V fue Rotenona a 250 nM 24 horas antes de ser evaluados mediante citometría.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.8 Ensayos de apoptosis usando TPL y THZ1

La línea celular MCF10AErSrc se sembró en cajas de 6 pozos, cajas correspondientes para células no cancerosas y cancerosas (1×10^6 células), y se aplicó tratamiento a un grupo de cajas con Triptolide, a otro con THZ1 y a un tercer grupo de cajas con ambos fármacos a diferentes concentraciones (5 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM y 100 nM), se analizaron las muestras a 48 y 72 horas después del tratamiento. Para el análisis de muestras se siguió el siguiente protocolo: se lavaron dos veces las células con PBS frío y se resuspendieron en 400 μ L de buffer de lavado 1X (1×10^6 células/mL), se agregó 3 μ L de FITC Annexin y 3 μ L de PI, se incubaron las muestras durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad antes de ser analizadas por citometría de flujo (Citómetro: BD FACS Canto II, Flow Cytometer 339473).

Los controles internos positivos usados para las células teñidas con yoduro de propidio fue: DMSO al 30% 24 horas antes de ser evaluados mediante citometría y para FITC Annexin V fue Rotenona a 250 nM 24 horas antes de ser evaluados mediante citometría.

Los experimentos se realizaron por triplicado.

7. RESULTADOS

7.1 Cambio en la expresión de las diferentes subunidades de TFIIH

Se determinó si la expresión de algunas de las subunidades del complejo TFIIH cambiaba al inducir la transformación en las células no cancerosas para lo cual se realizaron ensayos tipo Western Blot (WB).

Se cargaron 50 µg de proteína de extractos nucleares de células no cancerosas (Carril A) y células Cancerosas (Carril B) respectivamente, se usó como control de carga actina y TBP.

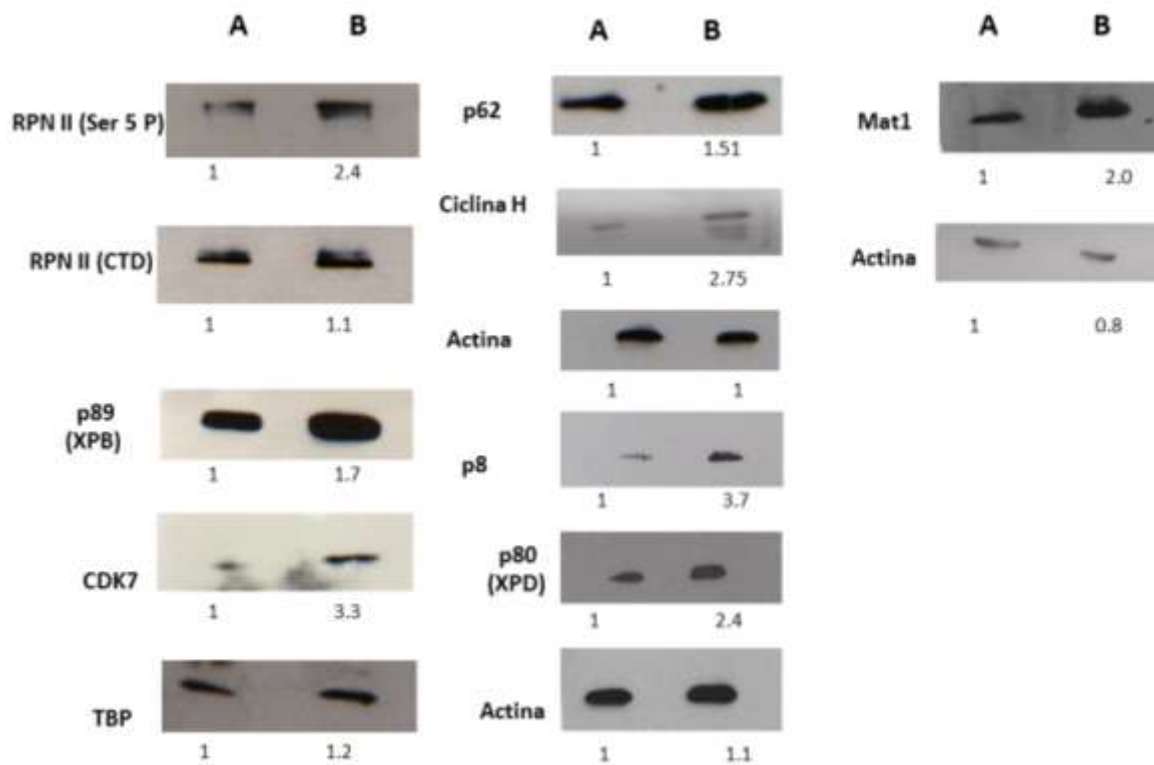


Figura 12. Detección de las algunas subunidades del complejo TFIIH, en extractos nucleares proteicos de las células MCF10A-Er-Src. En la columna A corresponde a células no cancerosas y en la columna B se encuentran células cancerosas. Se usó como control de carga TPB o Actina, además de analizar cómo se encuentran los niveles de la RNP II sin fosforilar (CTD) y la RNP II cuando esta fosforilada la serina 5.

En la Figura 12, se puede observar de manera general que las células cancerosas tienen una mayor expresión de algunas de las subunidades del complejo TFIIH respecto a las células no cancerosas, se cuantificó mediante densitometría y se corroboró el incremento de las subunidades; tomando al carril A como el estado basal de la expresión de las subunidades, al cual se le asignó el valor 1 y la columna B se calculó con respecto a la A, entonces la diferencia entre A y B corresponde al número de unidades que incremento la expresión proteica de cada subunidad del complejo, por lo tanto para la subunidad XPB (p89) se observa un incremento de 0.7, CDK7 se observa un incremento de 2.3, p62 se observa un incremento de 0.51, Ciclina H se observa un incremento de 1.75, p8 un incremento de 2.7, XPD se observa un incremento de 1.4 y para la subunidad de Mat1 se observa un incremento de 1. Estos resultados sugieren que las células cancerosas requieren mayores niveles de TFIIH para sostener la transcripción.

Se usaron como control de carga Actina y TPB y en el análisis de densitometría se encontrando muy pocas o nulas variaciones entre ambos carriles.

Se decidió evaluar otros componentes del PIC, para observar los niveles proteicos: se realizaron WB contra el CTD de la RNP II y la Ser 5 fosforilada del CTD de la RNP II, para el caso de la Ser 5 fosforilada se observa un nivel mayor en la columna que corresponde a las células cancerosas, observando un incremento de 1.4 (valor para las células no cancerosas 1 y para las células cancerosas 2.4) esto sugiere mayores niveles de transcripción en células cancerosas y para CTD de la RNA pol II se observa más o menos la misma proporción.

7.2 Cambio de la distribución de las diferentes subunidades de TFIIH

Ya que los ensayos de WB revelaron que en las células cancerosas hay una mayor cantidad proteica de algunas de las subunidades de TFIIH, se decidió evaluar si además de la sobreexpresión de la proteína ocurría un cambio en la

distribución de algunas de las subunidades del complejo TFIIH en células cancerosas respecto a las no cancerosas. Para lo cual se realizaron inmunotinciones dobles, como control interno dentro de la inmunotinción se utilizó a la RNA Pol II (CTD) ya que no tuvo cambios de expresión en el ensayo de detección de proteína en fase sólida. A continuación se describen los resultados obtenidos:

En las figuras 13 a la 16, se puede observar que hay un incremento en la señal de las diferentes subunidades de TFIIH dentro del núcleo lo que corrobora los datos obtenidos por western blot. Sin embargo no se observa una relocalización de ninguna de estas subunidades cuando la célula se transforma a cancerosa. Por lo tanto podemos sugerir que cuando la línea MCF10A-Er-Src se transforma a cancerosa hay un incremento en los niveles de las diferentes subunidades de TFIIH, pero no es su distribución en la célula. Esto sugiere que cuando esta línea adquiere un fenotipo cancerosa hay un incremento en el requerimiento de TFIIH.

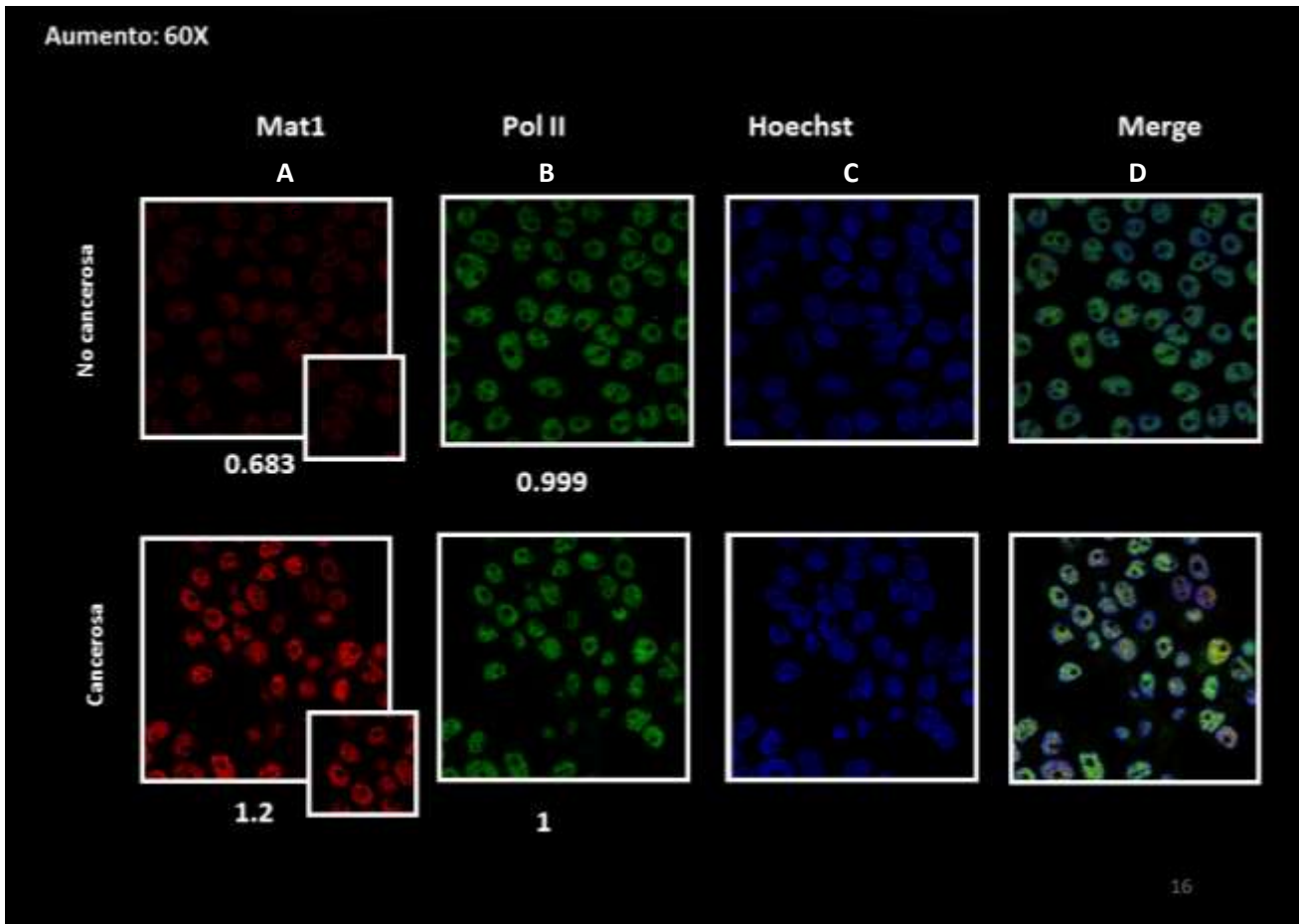


Figura 13 . Localización de la subunidad Mat1 de TFIIF y de la RNA Pol II (CTD) en células MCF10A Er Src. A) Corresponde a la localización de la proteína Mat1 en células no transformadas como en células transformadas. B) Corresponde a la localización de la RNA Pol II en células no transformadas como en células transformadas. C) Corresponde a la localización del núcleo, teñido con un colorante para DNA. D) Empalme de los canales analizados.

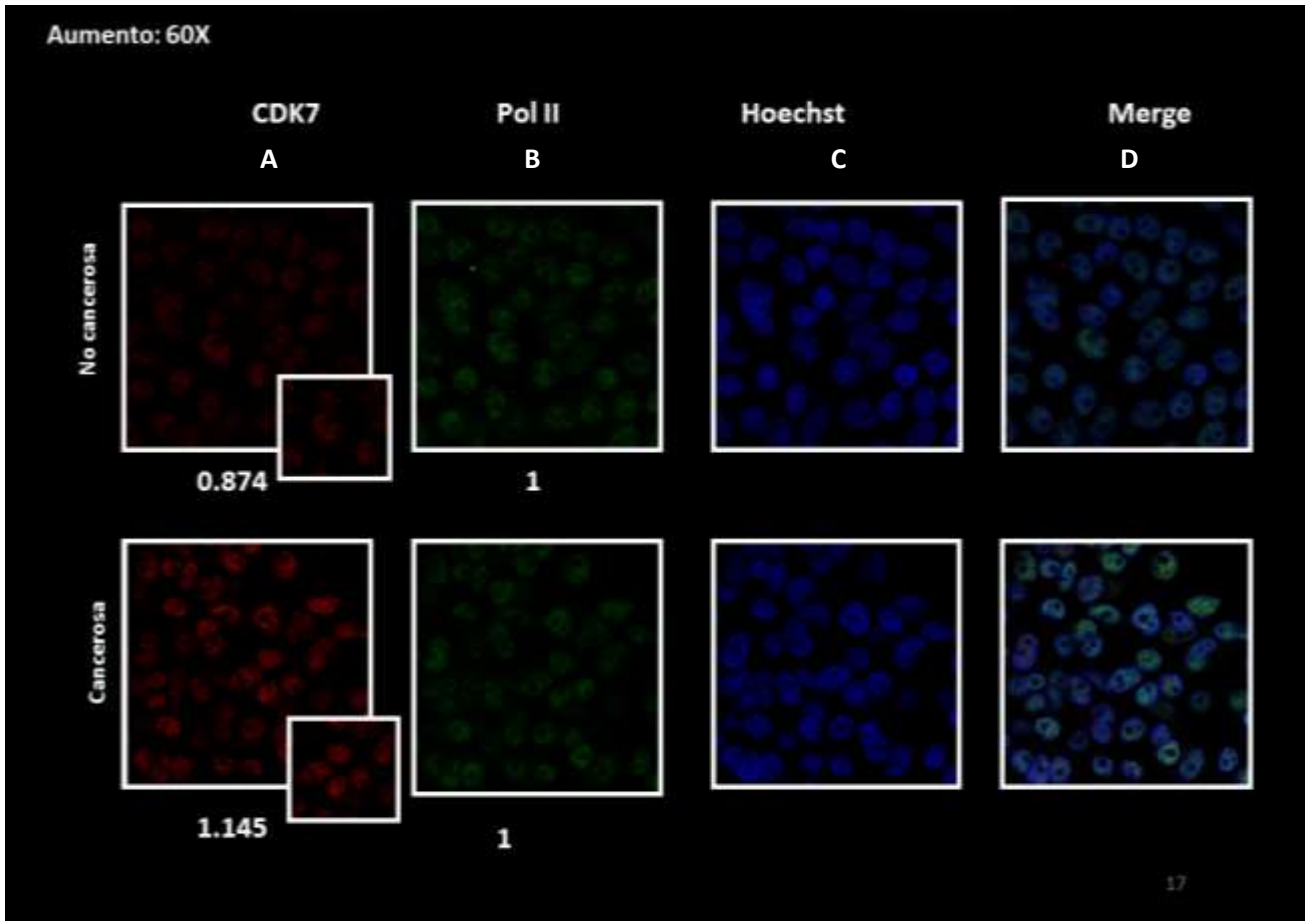


Figura 14. Localización de la subunidad CDK7 de TFIIH y de la RNA Pol II (CTD) en células MCF10A Er Src. A) Corresponde a la localización de la proteína CDK7 en células no transformadas como en células transformadas. B) Corresponde a la localización de la RNA Pol II en células no transformadas como en células transformadas. C) Corresponde a la localización del núcleo, teñido con un colorante para DNA. D) Empalme de los canales analizados.

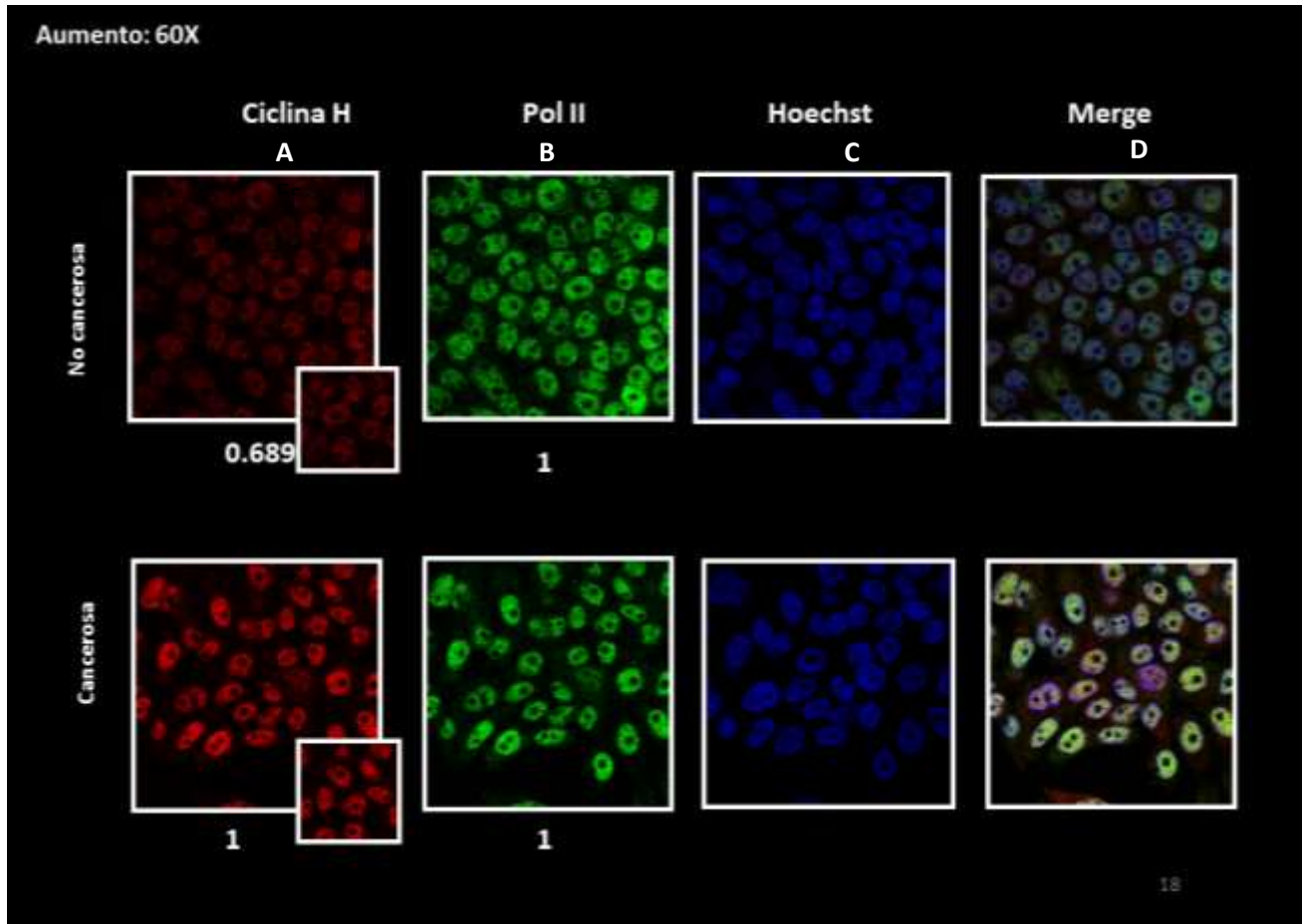


Figura 15. Localización de la subunidad Ciclina H de TFIIH y de la RNA Pol II (CTD) en células MCF10A Er Src. A) Corresponde a la localización de la proteína Ciclina H en células no transformadas como en células transformadas. B) Corresponde a la localización de la RNA Pol II en células no transformadas como en células transformadas. C) Corresponde a la localización del núcleo, teñido con un colorante para DNA. D) Empalme de los canales analizados.

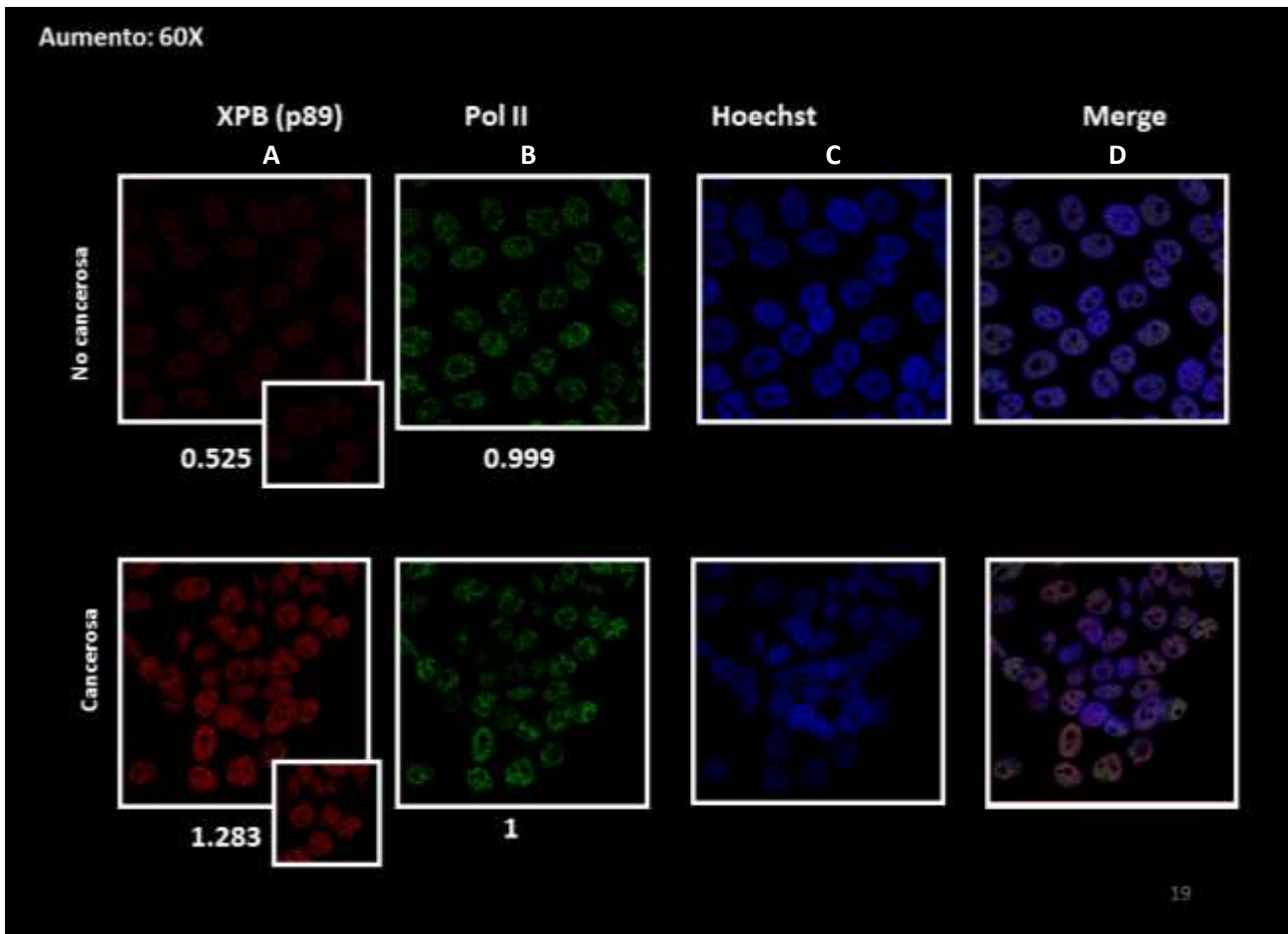


Figura 16. Localización de la subunidad XPB de TFIIH y de la RNA Pol II (CTD) en células MCF10A Er Src. A) Corresponde a la localización de la proteína XPB en células no transformadas como en células transformadas. B) Corresponde a la localización de la RNA Pol II en células no transformadas como en células transformadas. C) Corresponde a la localización del núcleo, teñido con un colorante para DNA. D) Empalme de los canales analizados.

7.3 Efecto del triptolide en células cancerosas y no cancerosas: viabilidad y apoptosis mediante citometría de flujo.

Los experimentos para evaluar viabilidad y muerte celular, se realizaron en células cancerosas y no cancerosas. Los experimentos se realizaron como se describen en la sección de materiales y métodos.

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de triptolide (5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM y DMSO (reactivo en el que se encuentra disuelto el triptolide y así evaluar si la muerte que se observa no es *per se* al DMSO)), una vez transcurrido el tiempo de 24 y 48 horas post-tratamiento, las células fueron teñidas con el colorante vital yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo, evaluando 10,000 células para cada condición mencionada.

Previamente, con el objetivo de establecer los parámetros que definirían las características de las células cuando éstas son tratadas con triptolide se realizaron ensayos para determinar por un lado la complejidad de la membrana, tamaño celular y la toxicidad intrínseca que genera el vehículo en el que se disuelve el inhibidor.

En la Figura 17, se observan dos histogramas de células cancerosas evaluadas en diferentes condiciones. En la Figura 17 A se evalúan células sin DMSO, (población roja) y células con DMSO (población azul). Se observó un empalme de poblaciones lo cual nos indica que el DMSO no promueve muerte celular.

En la Figura 17 B se evalúan células sin triptolide (población roja) y células cancerosas con triptolide (población azul) a una concentración de 100 nM evaluadas 48 horas post-tratamiento donde se observó un desplazamiento de la población azul, lo que nos indicó que esta población está cambiando de tamaño, es decir las células son más pequeñas y también hay un cambio en la granulosidad (complejidad), las cuales son características de células apoptóticas, por lo cual se puede decir que la población tratada con triptolide se está

muriendo, ya que se observa un cambio de posición de la población tratada (azul), con respecto a la control (roja).

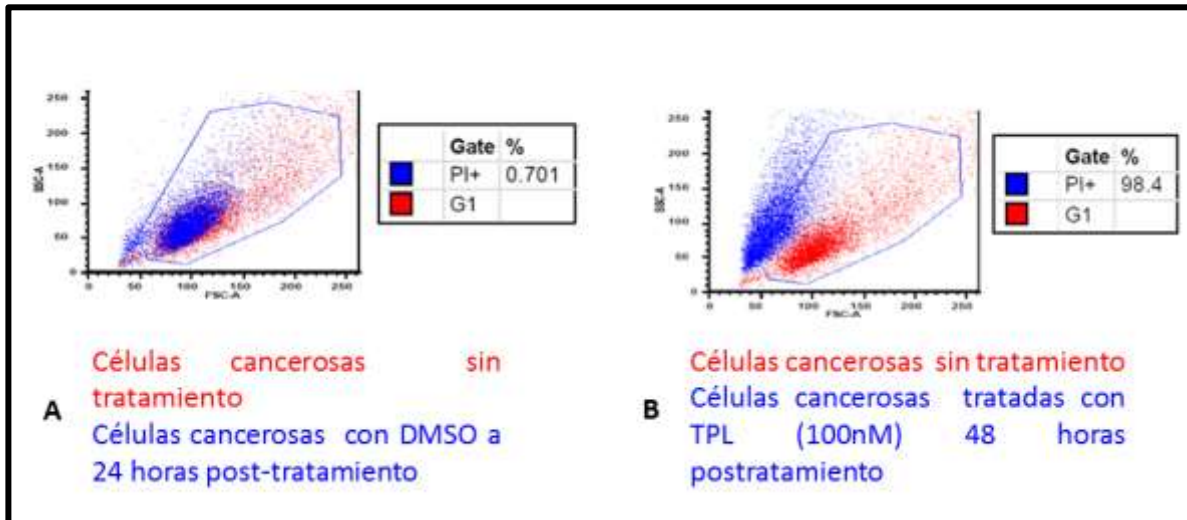
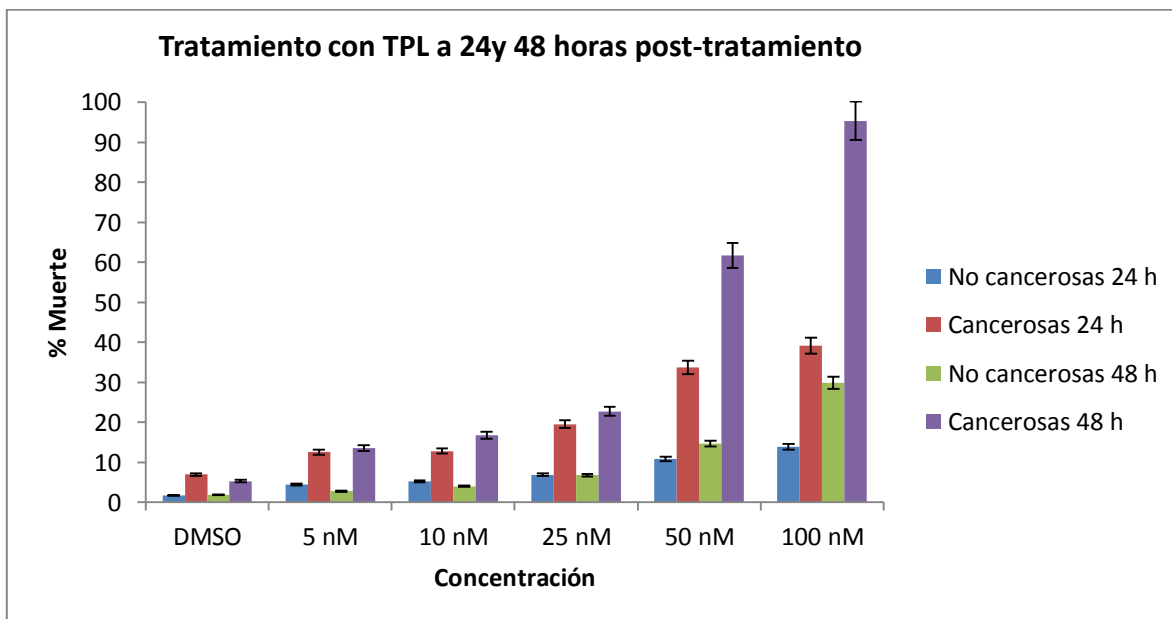


Figura 17. Esquema representativo de poblaciones analizadas mediante citometría de flujo. A. Células cancerosas tratadas con DMSO 24 horas post-tratamiento. B. Células cancerosas tratadas con TPL (100 nM) 48 horas post-tratamiento. En ambas graficas se observa el porcentaje de células que fue positivo para la tinción con PI.

Cuadro 9. Viabilidad celular con Triptolide a 24 y 48 horas post-tratamiento.

Concentración	24 horas post-tratamiento		48 horas post-tratamiento	
	No cancerosas	Cancerosas	No cancerosas	Cancerosas
DMSO	1.745	6.95	1.825	5.3
5 nM	4.45	12.545	2.78	13.6
10 nM	5.195	12.8	4.01	16.8
25 nM	6.875	19.5	6.815	22.75
50 nM	10.895	33.75	14.65	61.75
100 nM	13.85	39.2	29.9	95.4



Grafica 1. Tratamiento con triptolide donde se grafica el porcentaje de muerte contra las diferentes concentraciones: DMSO (vehículo en el que se encuentra disuelto el fármaco), 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM y 100 nM, analizados mediante citometría de flujo a las 24 y 48 horas post-tratamiento. n=3.

En el Cuadro 9 y en la Grafica 1, se observa el efecto del triptolide en células cancerosas y no cancerosas, analizadas a diferentes concentraciones 24 y 48 horas post-tratamiento. Se observa una mayor muerte celular en las células

cancerosas respecto a las no cancerosas, lo cual sugiere que las primeras son más susceptibles al fármaco que las no cancerosas y este comportamiento se mantiene en las diferentes concentraciones usadas.

El mecanismo reportado para el triptolide es mediante la vía de apoptosis, por lo que se decidió realizar ensayos de detección de apoptosis el triptolide (Anexina V (+)) (Figura 18), para poder corroborar el mecanismo de muerte que induce 12 horas post-tratamiento.

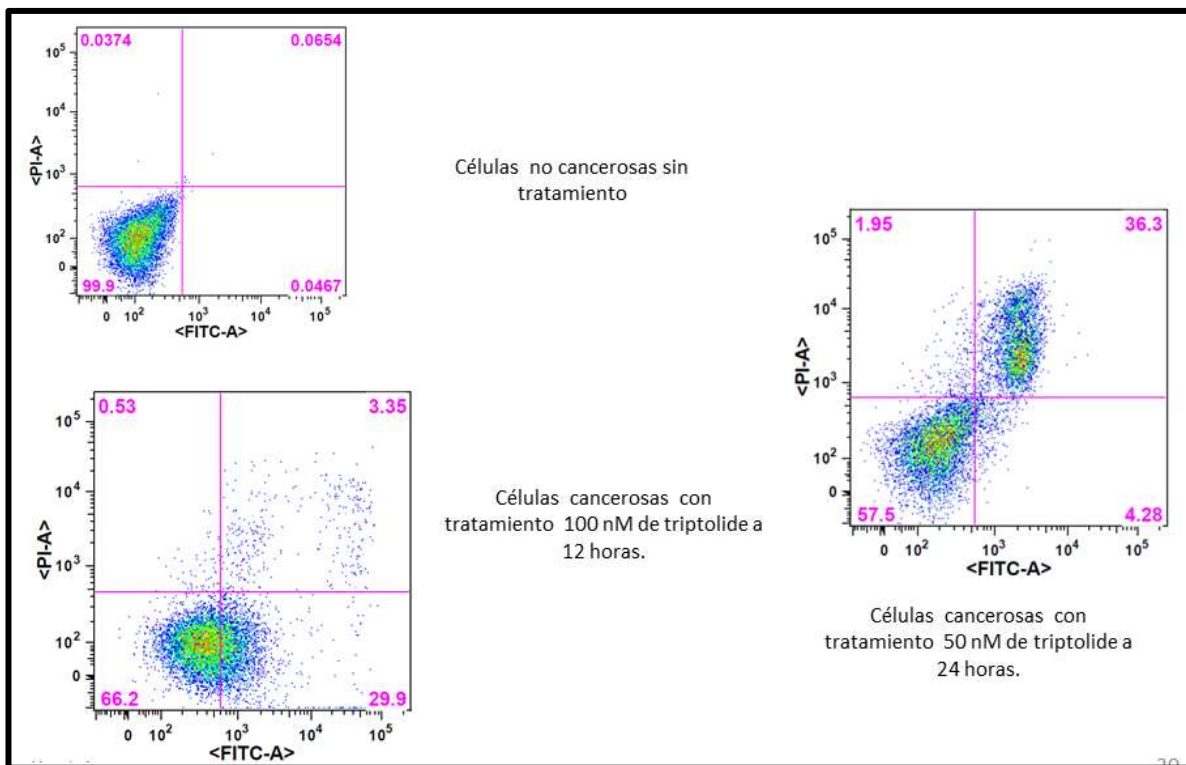
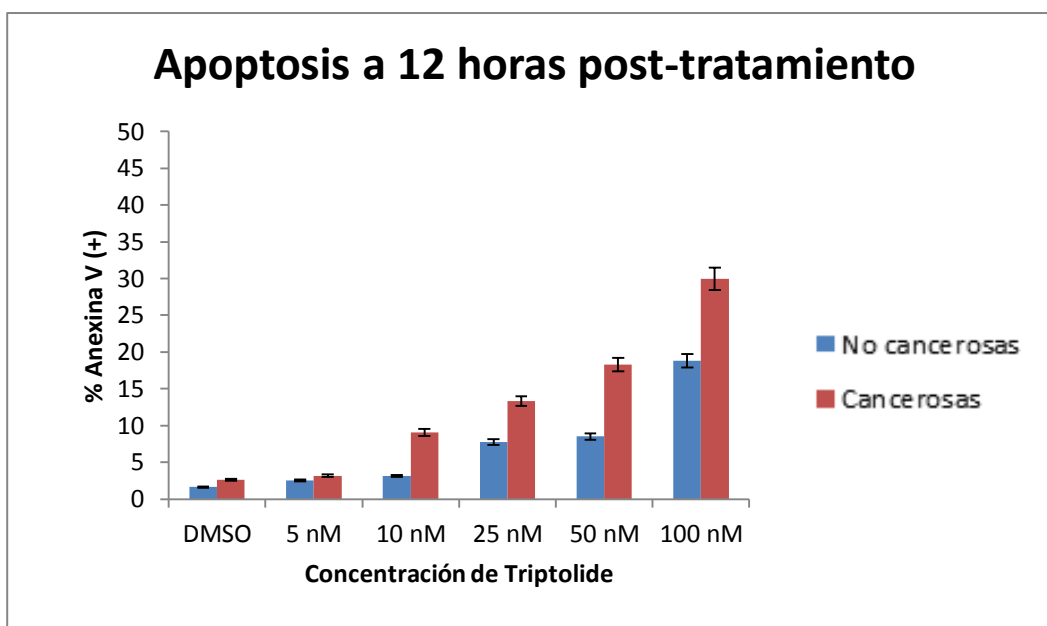


Figura 18. Ilustración representativa, cuando las células son evaluadas con PI y FITC-Anexina. La imagen superior izquierda muestra una población de células no cancerosas sin tratamiento, la imagen inferior izquierda se detecta apoptosis temprana y la imagen derecha se detecta apoptosis tardía.

Cuadro 100 Apoptosis celular 12 horas post-tratamiento con Triptolide

No cancerosas		Cancerosas	
Concentración	% Anexina V (+)	Concentración	% Anexina V (+)
DMSO	1.65	DMSO	2.58
5 nm	2.545	5 nm	3.16
10 nm	3.155	10 nm	9.06
25 nm	7.725	25 nm	13.3
50 nm	8.52	50 nm	18.25
100 nm	18.8	100 nm	29.95



Grafica 2 Tratamiento con triptolide donde se grafica el porcentaje de células que son positivas para Anexina V (apoptosis) contra las diferentes concentraciones: DMSO (vehículo en el que se encuentra disuelto el fármaco), 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM y 100 nM, analizados mediante citometría de flujo a las 12 horas postratamiento n=3.

En el Cuadro 10 y en la Grafica 2, se observa el efecto del triptolide en células cancerosas y no cancerosas, analizadas a diferentes concentraciones 12 horas post-tratamiento. Se observa una mayor muerte celular en las células cancerosas con respecto a las no cancerosas, lo cual sugiere que las primeras son más susceptibles al fármaco que las no cancerosas y este comportamiento se mantiene en las diferentes concentraciones usadas. Por ejemplo para la concentración de 100 nM se observó un porcentaje de muerte de 29.95% para las células cancerosas, mientras que para las células no cancerosas un 18.8%.

Esto indica que la muerte celular por el tratamiento con triptolide es preferencialmente por apoptosis. Sin embargo es importante notar que la proporción de las células muertas totales determinadas con el ensayo de IP es mayor que el encontrado en células en apoptosis, esto se debe a los tiempos en los que fueron realizados los ensayos.

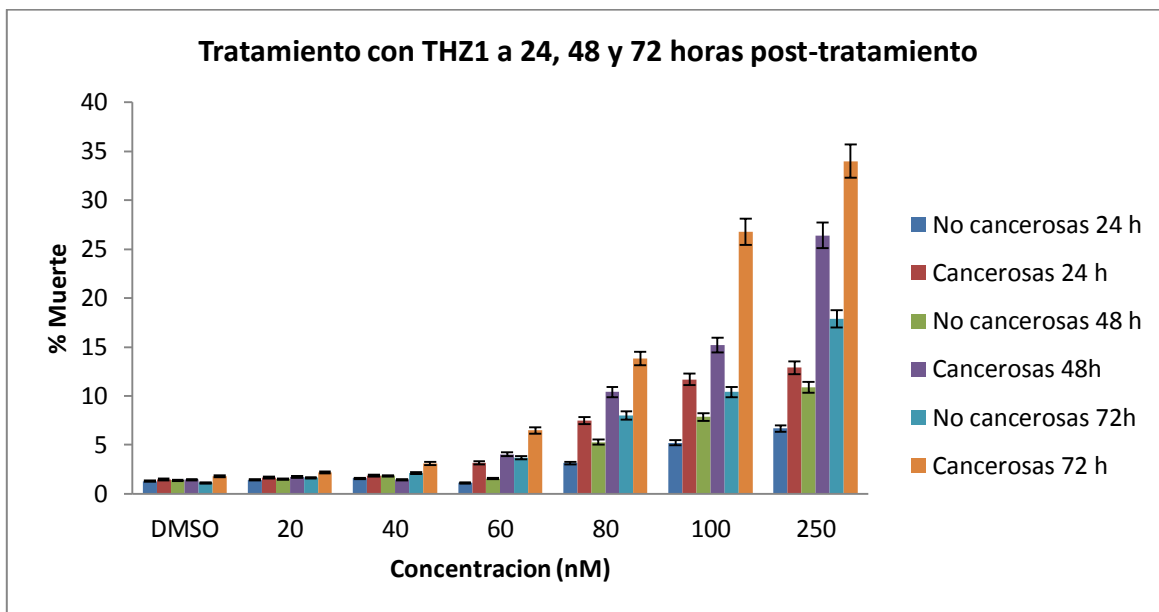
7.4 Efecto de THZ1 en células cancerosas y no cancerosas: viabilidad y apoptosis mediante citometría de flujo.

A continuación determinamos el efecto de THZ1 sobre nuestro modelo de trabajo. Los experimentos para evaluar viabilidad y muerte celular, se realizaron en células cancerosas y no cancerosas. Los ensayos se realizaron como se describen en la sección de materiales y métodos.

En resumen las células se trataron con diferentes concentraciones de THZ1 (20 nM, 40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM y 250 nM), una vez transcurridas de 24, 48 y 72 horas las células se tiñeron con el colorante vital yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo, evaluando 10,000 células, para cada condición mencionada.

Cuadro 111 Viabilidad celular con THZ1 a 24, 48 y 72 horas post-tratamiento.

Concentración (nM)	24 horas post-tratamiento		48 horas post-tratamiento		72 horas post-tratamiento	
	No cancerosas (%Muertas)	Cancerosas (%Muertas)	No cancerosas (%Muertas)	Cancerosas (%Muertas)	No cancerosas (%Muertas)	Cancerosas (%Muertas)
Vehículo (DMSO)	1.286	1.461	1.37	1.435	1.122	1.816
20	1.43	1.681	1.517	1.726	1.639	2.19
40	1.583	1.882	1.829	1.45	2.13	3.09
60	1.13	3.15	1.56	4.04	3.7	6.48
80	3.14	7.48	5.28	10.4	8	13.8
100	5.2	11.7	7.87	15.2	10.4	26.8
250	6.67	12.9	10.9	26.4	17.9	34



Grafica 3 Tratamiento con THZ1 donde se grafica el porcentaje de células que son positivas para Yoduro de propicio (PI) contra las diferentes concentraciones: DMSO (vehículo en el que se encuentra disuelto el fármaco), 20 nM, 40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM y 250 nM, analizados mediante citometría de flujo a las 24 horas post-tratamiento. n=3.

En el Cuadro 11 y en la Grafica 3, se observa el efecto de THZ1 en células cancerosas y no cancerosas, analizadas a diferentes concentraciones 24, 48 y 72

horas post-tratamiento. Se observa una mayor muerte celular en las células cancerosas respecto a las no cancerosas, lo que sugiere que las primeras son más susceptibles al fármaco que las no cancerosas y este comportamiento se mantiene en las diferentes concentraciones usadas.

Los porcentajes obtenidos fueron relativamente bajos. Por lo que se decidió realizar ensayos de apoptosis tiñendo a las células con Anexina V (apoptosis +), a diferentes concentraciones (40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM y 250 nM) evaluando el efecto de THZ1 a 24, 48 y 72 horas.

Previamente, con el objetivo de establecer los parámetros que definirían las características de las células cuando estas son tratadas con THZ1 se realizaron ensayos para determinar por un lado la complejidad de la membrana, tamaño celular, la toxicidad intrínseca que genera el vehículo en el que se disuelve el inhibidor y establecer el control positivo (Rotenona) para las células tratadas.

En la Figura 19, se observan dos histogramas de células cancerosas evaluadas en diferentes condiciones. En la Figura 19 izquierda se evalúan células cancerosas sin tratamiento, (población roja) y células cancerosas con DMSO (población azul). Se observó que hay un sobre empalme de poblaciones lo cual nos indica que el uso del DMSO no está promoviendo la muerte celular, ya que tiene el mismo comportamiento en la gráfica. Por el contrario en la Figura 19 derecha se observan células sin tratamiento (población roja) y células tratadas con rotenona a una concentración de 250 mM evaluadas 24 horas post-tratamiento donde se observó un desplazamiento de la población azul, que el uso de la rotenona está promoviendo la muerte celular ya que esta población es positiva para Anexina V FITC-A.

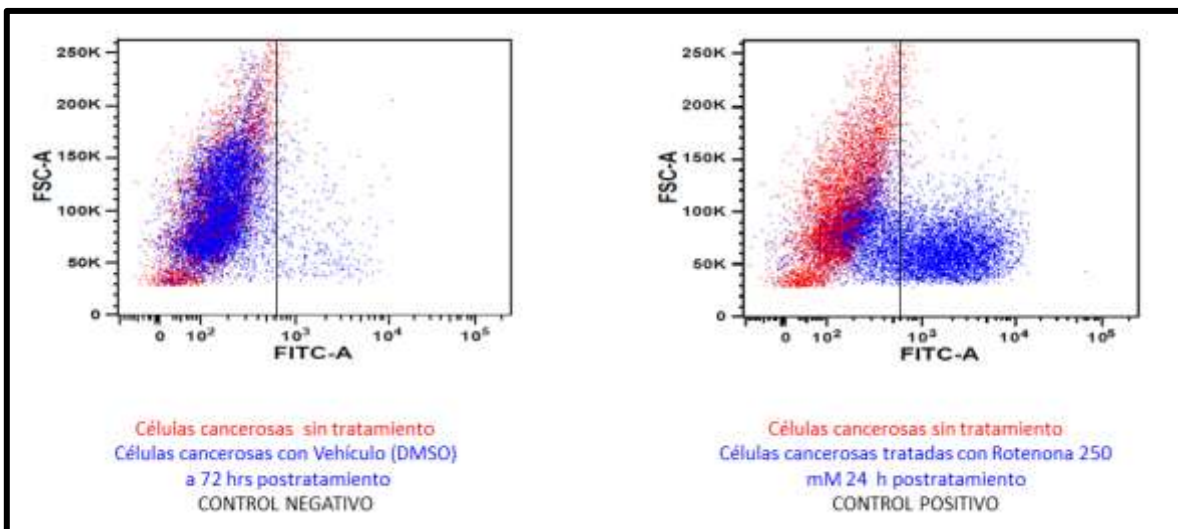
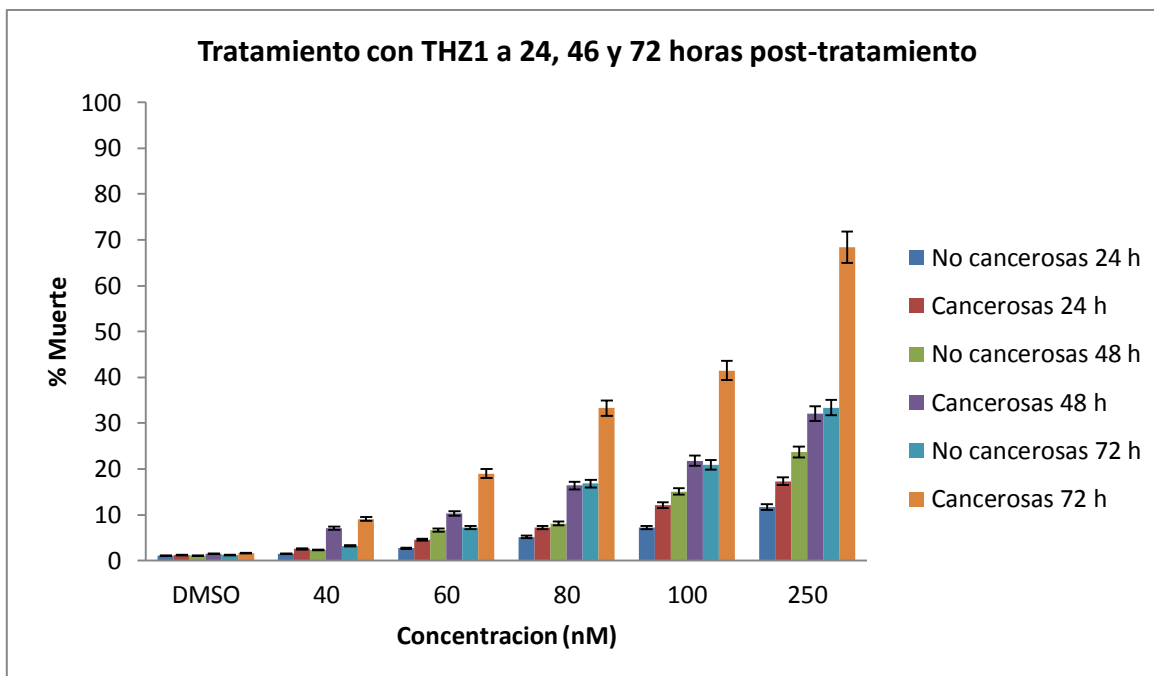


Figura 19. Esquema representativo de poblaciones evaluadas mediante citometría de flujo. Derecha. Células cancerosas tratadas con el vehículo de THZ1. Izquierda. Células cancerosas tratadas con Rotenona (250 mM) 24 horas post-tratamiento.

Cuadro 122. Apoptosis celular 24, 48 y 72 horas post-tratamiento con THZ1

Concentración (nM)	24 horas post-tratamiento		48 horas post-tratamiento		72 horas post-tratamiento	
	No cancerosas (%Muertas)	Cancerosas (%Muertas)	No cancerosas (%Muertas)	Cancerosas (%Muertas)	No cancerosas (%Muertas)	Cancerosas (%Muertas)
Vehículo (DMSO)	1.04	1.15	1.06	1.47	1.23	1.63
40	1.45	2.54	2.31	7.05	3.2	9.07
60	2.71	4.54	6.69	10.3	7.21	19
80	5.15	7.24	8.1	16.4	16.8	33.3
100	7.24	12.1	15.1	21.8	20.9	41.5
250	11.7	17.3	23.7	32.1	33.4	68.4



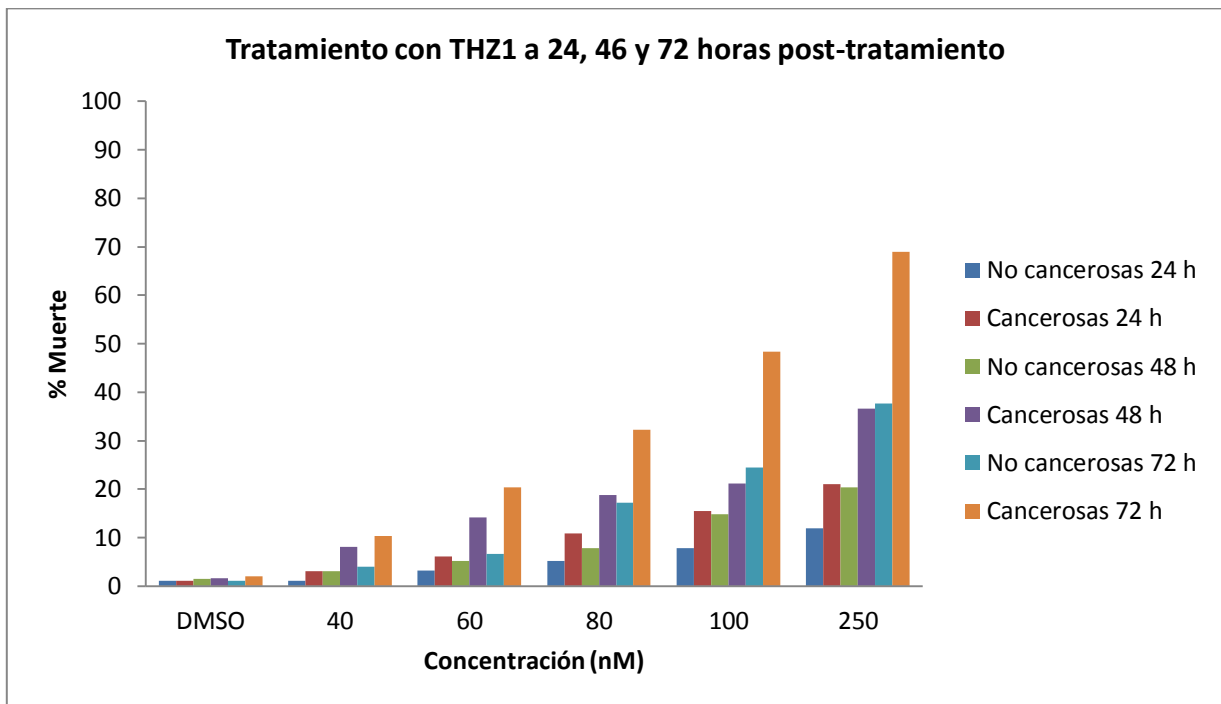
Grafica 4. Tratamiento con THZ1 donde se grafica el porcentaje de células que son positivas para Anexina V contra las diferentes concentraciones: DMSO (vehículo en el que se encuentra disuelto el fármaco), 40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM y 250 nM, analizados mediante citometría de flujo a 24, 48 y 72 horas post-tratamiento.

En el Cuadro 12 y en la Grafica 4, se muestra el efecto de THZ1 en células cancerosas y no cancerosas, analizadas a diferentes concentraciones 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Se observa una mayor muerte celular en las células cancerosas respecto a las no cancerosas, lo que sugiere que las primeras son más susceptibles al fármaco que las no cancerosas y este comportamiento se mantiene en las diferentes concentraciones usadas.

Se decidió realizar ensayos de detección de apoptosis, para poder corroborar el mecanismo de muerte que induce THZ1, mediante la vía de apoptosis, como esta reportado en la literatura. Por lo cual se decidió evaluar el porcentaje de muerte (% Anexina V (+) y PI (+)), 24, 48 y 72 horas post-tratamiento.

Cuadro 133. Apoptosis celular 24, 48 y 72 horas post-tratamiento con THZ1

Concentración (nM)	24 horas post-tratamiento		48 horas post-tratamiento		72 horas post-tratamiento	
	No cancerosas (%Muertas)	Cancerosas (%Muertas)	No cancerosas (%Muertas)	Cancerosas (%Muertas)	No cancerosas (%Muertas)	Cancerosas (%Muertas)
Vehículo (DMSO)	1.07	1.17	1.5	1.71	1.13	1.98
40	1.11	3.09	3.09	8.06	4.04	10.4
60	3.21	6.11	5.2	14.18	6.67	20.4
80	5.2	10.9	7.87	18.83	17.25	32.3
100	7.88	15.52	14.9	21.17	24.53	48.4
250	11.9	21.07	20.36	36.6	37.7	68.9



Grafica 5. Tratamiento con THZ1 donde se grafica el porcentaje de células que son positivas para apoptosis contra las diferentes concentraciones: DMSO (vehículo en el que se encuentra disuelto el fármaco), 40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM y 250 nM, analizados mediante citometría de flujo a 24, 48 y 72 horas post-tratamiento.

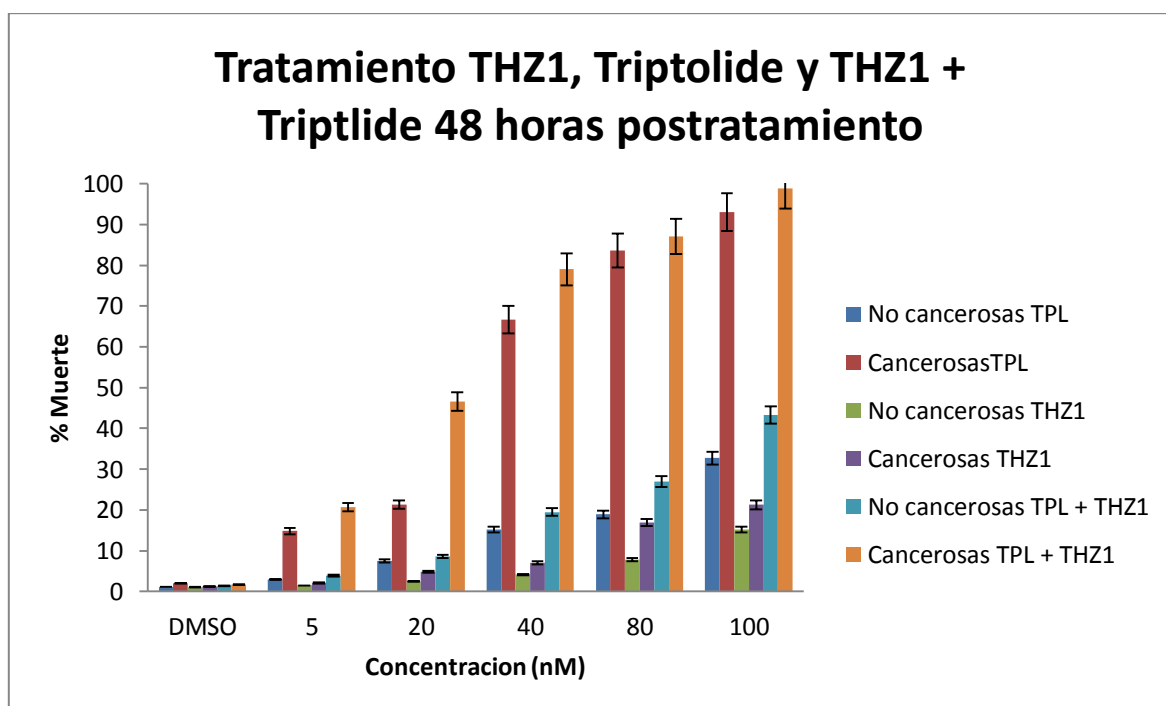
En el Cuadro 13 y en la Grafica 5, se observa el efecto de THZ1 en células cancerosas y no cancerosas, analizadas a diferentes concentraciones 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Se observa una mayor muerte celular en las células cancerosas respecto a las no cancerosas, lo que muestra que las primeras son más susceptibles al fármaco que las no cancerosas.

7.5 Efecto del Triptolide más THZ1 en células cancerosas y no cancerosas

Con el objetivo de evaluar cuál era el efecto que tendrían los dos inhibidores. Se decidió combinar los inhibidores de las subunidades XPB y CDK7 (Triptolide/THZ1) a diferentes concentraciones (5 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM y 100 nM) y evaluar su efecto 48 y 72 horas post-tratamiento. Para ello las células se tiñeron con el colorante vital yoduro de propidio y Anexina V y se analizaron mediante citometría de flujo, se evaluaron 10,000 células, para cada condición mencionada.

Cuadro 14. Apoptosis celular 48 horas post-tratamiento con THZ1 + Triptolide

Concentración (nM)	Triptolide		THZ1		Triptolide + THZ1	
	No cancerosas (% Muerte)	Cancerosas (% Muerte)	No cancerosas (% Muerte)	Cancerosas (% Muerte)	No cancerosas (% Muerte)	Cancerosas (% Muerte)
Vehículo (DMSO)	1.13	1.98	1.1	1.19	1.44	1.71
5	2.94	14.83	1.45	2.09	3.89	20.67
20	7.48	21.3	2.46	4.87	8.59	46.6
40	15.2	66.67	4.14	7.05	19.48	79.06
80	18.94	83.7	7.87	16.88	26.98	87.14
100	32.7	93.06	15.2	21.26	43.3	98.9

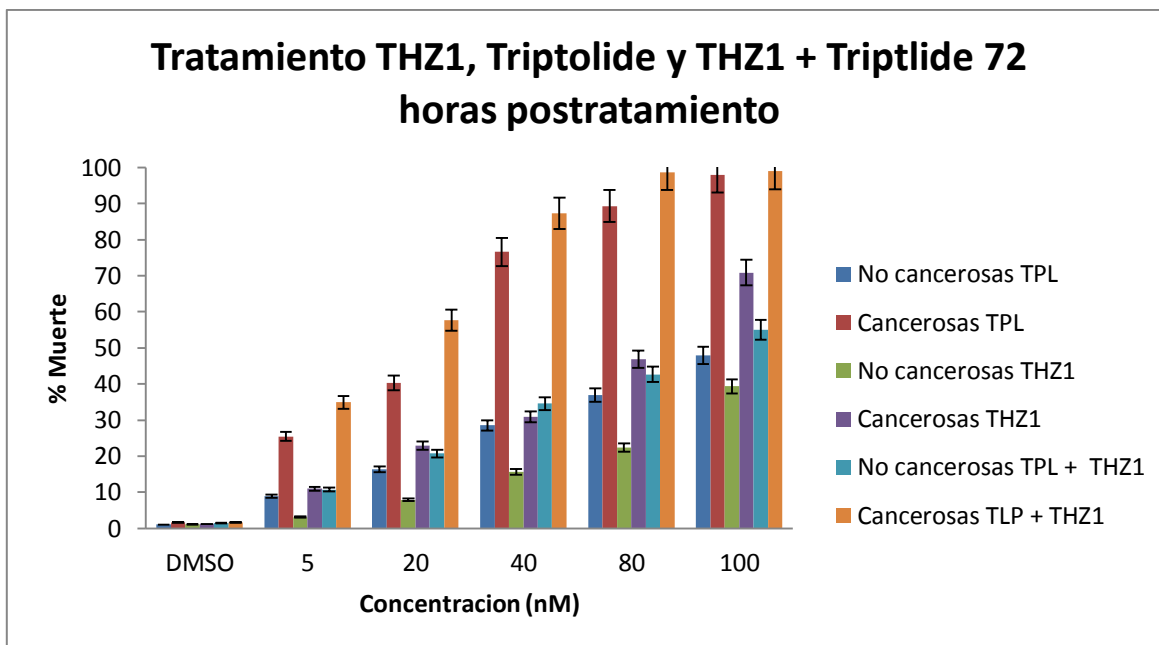


Grafica 6. Tratamiento con THZ1, Triptolide y THZ1 + Triptolide donde se grafica el porcentaje de células que son positivas para apoptosis contra las diferentes concentraciones: DMSO (vehículo en el que se encuentra disuelto el fármaco), 5 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM y 100 nM, analizados mediante citometría de flujo a las 48 horas post-tratamiento. n=3

En el Cuadro 14 y en la Grafica 6, se puede observar el efecto conjunto de THZ1 y Triptolide, en células cancerosas y no cancerosas, a diferentes concentraciones y 48 horas post-tratamiento. Se observa una muerte mayor al 75 % en la concentración de 40 nM (TPL +THZ1) y un porcentaje de muerte mayor al 95% en la concentración de 100 nM (TPL +THZ1), estos resultados no se observaron cuando se evaluaron a los fármacos de manera separada.

Cuadro 15. Apoptosis celular 72 horas post-tratamiento con THZ1 + Triptolide

Concentración (nM)	Triptolide		THZ1		Triptolide + THZ1	
	No cancerosas (% Muerte)	Cancerosas (% Muerte)	No cancerosas (% Muerte)	Cancerosas (% Muerte)	No cancerosas (% Muerte)	Cancerosas (% Muerte)
Vehículo (DMSO)	1.01	1.64	1.15	1.19	1.5	1.63
5	8.9	25.44	3.09	11	10.7	34.9
20	16.34	40.29	7.9	22.9	20.76	57.69
40	28.56	76.59	15.7	30.9	34.54	87.34
80	36.9	89.34	22.35	46.9	42.67	98.7
100	47.9	97.9	39.37	70.9	54.98	99



Grafica 7. Tratamiento con THZ1, Triptolide y THZ1 + Triptolide donde se grafica el porcentaje de células que son positivas para apoptosis contra las diferentes concentraciones: DMSO (vehículo en el que se encuentra disuelto el fármaco), 5 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM y 100 nM, analizados mediante citometría de flujo a las 72 horas post-tratamiento. n=3.

En el Cuadro 15 y en la Grafica 7, se puede observar el efecto conjunto de THZ1 y Triptolide, en células cancerosas y no cancerosas, a diferentes concentraciones 72 horas post-tratamiento, donde se observa una muerte mayor al 50 % en la concentración de 20 nM (TLP +THZ1) y un porcentaje de muerte mayor al 98% en la concentración de 100 nM (TLP +THZ1), estos resultados no se observaron cuando se evaluaron a los fármacos de manera separada.

Con los resultados anteriores se pudo observar un incremento ligero cuando se combinan los dos fármacos, en comparación cuando solo se aplica el Triptolide.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, primero se analizó si hay un cambio en la expresión/distribución de algunas de las subunidades de TFIIH cuando las células pasan de un estado no canceroso a un estado canceroso.

Se realizaron ensayos tipo western-blot en células cancerosas y en células no cancerosas de algunas de las subunidades del complejo TFIIH: CDK7, Mat1, Cicl H, p8, p64, p80 y p89 y se observó un aumento en la expresión de estas proteínas en las células cancerosas lo que sugiere es que estas células requieren mayores niveles de TFIIH y por lo tanto de transcripción por lo tanto se requiere mayor disponibilidad del complejo TFIIH (49). Se sabe que las células cancerosas se están replicando a una velocidad más elevada que las células no cancerosas y algunas de las subunidades del complejo TFIIH participan en el ciclo celular (subcomplejo CAK (CDK7, Mat1, Cicl H)), por lo cual hace sentido que las subunidades que estén implicadas en ciclo celular se observe un mayor nivel de expresión en comparación con las células no cancerosas(50).

Además, se realizó WB contra el CTD de la RNA pol II y contra la Ser 5 fosforilada del CTD de la RNA pol II. En el caso de la Ser 5 fosforilada se observa un nivel mayor en el carril correspondiente a las células transformadas, la cual está asociada con el inicio de la transcripción y apoya lo mencionado anteriormente, que las células cancerosas necesitan mayores niveles de transcripción y correlaciona con un aumento en los niveles del CTD de la RNA pol II fosforilado en la Serina 5 (51).

Para determinar si hubo un cambio en la distribución de las diferentes subunidades de TFIIH se realizaron ensayos de inmunotinciones en células cancerosas y células no cancerosas, se realizaron dobles inmunotinciones, se decidió utilizar como control interno dentro de la inmunotinción una proteína que no cambiara en células no cancerosas y células cancerosas y se optó por utilizar a la RNA Pol II (CTD sin fosforilar). Se analizaron diferentes subunidades de TFIIH, tanto como del core (XPB), como del CAK (Mat1, Cinlina H y CDK7) y se observó

que en estas subunidades no presenta una relocalización de estas proteínas. Estas proteínas se localizan preferencialmente en el núcleo, pero en el caso particular de p8 está también tiene una localización tanto citoplasmática como nuclear, aunque en condiciones de estrés, esta se relocaliza en su totalidad al núcleo(52). En ninguna de las inmunotinciones realizadas se observó este tipo de cambio, pero si hay un incremento en la intensidad de fluorescencia emitida por las diferentes proteínas, lo cual apoya los resultados obtenidos mediante los ensayos de western blot, ya que en estos resultados se observaba un incremento en la cantidad de proteína en las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas. Una perspectiva interesante será evaluar la inmunolocalización de p8.

Para determinar si en nuestro modelo experimental, el uso del triptolide y/o del THZ1 afecta preferencialmente a las células cancerosas, se probaron diferentes concentraciones de triptolide y THZ1, para así evaluar su efecto por citometría de flujo. Para los experimentos donde se evaluó viabilidad/muerte celular, se probaron diferentes concentraciones de triptolide y THZ1 analizándolas a diferentes tiempos, como se muestran en la sección de resultados. Estas células fueron marcadas con yoduro de propidio, el cual es un colorante impermeable a la membrana que generalmente está excluido de las células viables, pero cuando la membrana celular se vuelve permeable por algún proceso de muerte, el colorante se une al DNA de doble cadena por intercalación entre pares de bases. Para ambos fármacos se pudo observar que las células más afectadas son las cancerosas. Las concentraciones usadas fueron obtenidas de la literatura y no se utilizaron concentraciones más elevadas ya que en concentraciones más elevadas, para el caso del triptolide es tóxico y mataría indiferenciadamente a las células (53) y para el caso de THZ1 el usar concentraciones más elevadas disminuiría la especificidad, es decir estaría inhibiendo a otras CDKs (38).

En los ensayos para evaluar apoptosis se decidió utilizar el kit: FITC Annexin V Apoptosis Detection. La apoptosis es un proceso fisiológico normal que se

produce durante el desarrollo embrionario, así como en el mantenimiento de la homeostasis del tejido. La apoptosis se caracteriza la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, condensación del citoplasma y el núcleo. La pérdida de la membrana plasmática es una de las primeras características. En las células apoptóticas, la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido de membrana se transloca desde el interior hacia el exterior de la membrana. Anexina V es una glicoproteína dependiente de unión de Ca^{++} (35-36 kDa) que tiene una alta afinidad por la PS, y se une a las células con PS expuesto. Anexina V se puede conjugar con fluorocromos incluyendo FITC, el cual conserva su alta afinidad para PS y por lo tanto sirve como una sonda sensible para el análisis de citometría de flujo de células que están experimentando apoptosis. 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 (PI negativo, FITC Anexina V positivo), las células que se consideran viables son FITC anexina V y PI negativa; y las células que se encuentran en la apoptosis tardía son tanto FITC anexina V y PI positivo.

Entonces con los ensayos realizados con esta técnica se corrobora que al menos uno de los mecanismos que inducen la muerte para ambos fármacos es mediante apoptosis, siendo detectada en nuestro caso para el triptolide apoptosis en fase temprana(54), por el tiempo a los que fueron evaluados estos resultados, en apoptosis temprana la fosfatidilserina migra a la capa externa de la membrana celular. El triptolide se une covalentemente a la subunidad XPB del factor de transcripción TFIIH cuyo blanco inhibe su actividad ATPasa dependiente de DNA sin afectar la actividad helicasa, que conduce a la inhibición de la transcripción mediada por la RNP II y a la reparación por escisión de nucleótidos (REN) (55). Y para el caso de THZ1 nosotros observamos apoptosis en fase tardía, por los tiempos a los que fueron evaluados los resultados, nos referimos a apoptosis en fase tardía ya que la membrana ha perdido su integridad y el DNA se hace accesible al IP. El THZ1 se une covalentemente a CDK7, inhibiendo la actividad cinasa de CDK7, es decir, no puede fosforilar la Ser 5 y 7 del CTD (56).

Cuando se decidió probar ambos fármacos al mismo tiempo, se encontró que los porcentajes de muerte aumentan un poco con respecto a los encontrados con triptolide, cuando este fármaco se coloca por sí solo. Es posible que los porcentajes no aumenten drásticamente, ya que ambos fármacos tienen como blanco una subunidad de TFIIH, es decir se está afectando a la misma vía, por lo cual sería interesante probar la combinación de alguno de estos fármacos con otro inhibidor, cuyo blanco sea otra proteína del PIC, diferente a TFIIH (32).

9. CONCLUSIÓN

- ✓ Se observó una mayor cantidad de algunas de las proteínas que componen a TFIIH en células cancerosas con respecto a las no cancerosas.
- ✓ Se observó una mayor intensidad de fluorescencia en las células cancerosas con respecto a las no cancerosas de las subunidades de TFIIH.
- ✓ En los ensayos de viabilidad usando triptolide o THZ1 a diferentes concentraciones se observó que dichos compuestos afectan preferencialmente a las células cancerosas.
- ✓ Se comprobó que tanto el triptolide como THZ1, inducen la muerte celular via apoptosis.
- ✓ Al realizar los ensayos de apoptosis utilizando los dos fármacos: Triptolide y THZ1, se encontraron valores un poco mayores de muerte a un periodo de tiempo más corto, siendo las células cancerosas las más afectadas.

10.PERSPECTIVAS

- ✓ Evaluar la inmunolocalización de la subunidad p8 del complejo TFIIH en células cancerosas y en células no cancerosas.
- ✓ Evaluar el efecto de la ausencia de algunas de las subunidades de TFIIH diferentes a CDK7 y a XPB mediante el uso de siRNA, usando células no transformadas y células transformadas.
- ✓ Determinar el efecto sobre la transcripción global por estas dos drogas en células cancerosas y no cancerosas.

11. REFERENCIAS

1. Gibbons, B. J., Brignole, E. J., Azubel, M., Murakami, K., Voss, N. R., Bushnell, D. A., Asturias, F. J., and Kornberg, R. D. (2012) Subunit architecture of general transcription factor TFIID, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1949-1954.
2. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010) Cancer statistics, 2010, *CA: a cancer journal for clinicians* 60, 277-300.
3. Cabarcas, S., and Schramm, L. (2011) RNA polymerase III transcription in cancer: the BRF2 connection, *Molecular cancer* 10, 47.
4. Drygin, D., Rice, W. G., and Grummt, I. (2010) The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer, *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 131-156.
5. Lin, C. Y., Loven, J., Rahl, P. B., Paranal, R. M., Burge, C. B., Bradner, J. E., Lee, T. I., and Young, R. A. (2012) Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc, *Cell* 151, 56-67.
6. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144, 646-674.
7. Luo, Z., Lin, C., Guest, E., Garrett, A. S., Mohaghegh, N., Swanson, S., Marshall, S., Florens, L., Washburn, M. P., and Shilatifard, A. (2012) The super elongation complex family of RNA polymerase II elongation factors: gene target specificity and transcriptional output, *Molecular and cellular biology* 32, 2608-2617.
8. Yildirim, E., Kirby, J. E., Brown, D. E., Mercier, F. E., Sadreyev, R. I., Scadden, D. T., and Lee, J. T. (2013) Xist RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice, *Cell* 152, 727-742.
9. Koumenis, C., and Giaccia, A. (1997) Transformed cells require continuous activity of RNA polymerase II to resist oncogene-induced apoptosis, *Molecular and cellular biology* 17, 7306-7316.

10. Mendillo, M. L., Santagata, S., Koeva, M., Bell, G. W., Hu, R., Tamimi, R. M., Fraenkel, E., Ince, T. A., Whitesell, L., and Lindquist, S. (2012) HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers, *Cell* 150, 549-562.
11. Butler, J. E., and Kadonaga, J. T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression, *Genes & development* 16, 2583-2592.
12. Hahn, S. (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery, *Nature structural & molecular biology* 11, 394-403.
13. Egly, J. M., and Coin, F. (2011) A history of TFIIH: two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor, *DNA repair* 10, 714-721.
14. Akhtar, M. S., Heidemann, M., Tietjen, J. R., Zhang, D. W., Chapman, R. D., Eick, D., and Ansari, A. Z. (2009) TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II, *Molecular cell* 34, 387-393.
15. Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Salz, H. K., and Suter, B. (1998) Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity, *Genes & development* 12, 370-381.
16. Egly, J. M. (2001) The 14th Datta Lecture. TFIIH: from transcription to clinic, *FEBS letters* 498, 124-128.
17. Takagi, Y., Masuda, C. A., Chang, W. H., Komori, H., Wang, D., Hunter, T., Joazeiro, C. A., and Kornberg, R. D. (2005) Ubiquitin ligase activity of TFIIH and the transcriptional response to DNA damage, *Molecular cell* 18, 237-243.
18. Thomas, M. C., and Chiang, C. M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 41, 105-178.
19. Compe, E., and Egly, J. M. (2012) TFIIH: when transcription met DNA repair, *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 343-354.

20. Goel, S., Krishnamurthy, S., and Hampsey, M. (2012) Mechanism of start site selection by RNA polymerase II: interplay between TFIIB and Ssl2/XPB helicase subunit of TFIIH, *The Journal of biological chemistry* 287, 557-567.
21. Glover-Cutter, K., Larochele, S., Erickson, B., Zhang, C., Shokat, K., Fisher, R. P., and Bentley, D. L. (2009) TFIIH-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of C-terminal domain Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II, *Molecular and cellular biology* 29, 5455-5464.
22. Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D., and Egly, J. M. (2000) Molecular structure of human TFIIH, *Cell* 102, 599-607.
23. He, Y., Fang, J., Taatjes, D. J., and Nogales, E. (2013) Structural visualization of key steps in human transcription initiation, *Nature* 495, 481-486.
24. Mittler, G., Kremmer, E., Timmers, H. T., and Meisterernst, M. (2001) Novel critical role of a human Mediator complex for basal RNA polymerase II transcription, *EMBO reports* 2, 808-813.
25. de Laat, W. L., Jaspers, N. G., and Hoeijmakers, J. H. (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair, *Genes & development* 13, 768-785.
26. Larochele, S., Merrick, K. A., Terret, M. E., Wohlbold, L., Barboza, N. M., Zhang, C., Shokat, K. M., Jallepalli, P. V., and Fisher, R. P. (2007) Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells, *Molecular cell* 25, 839-850.
27. Fisher, R. P. (2005) Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription, *Journal of cell science* 118, 5171-5180.
28. Nonnekens, J., Perez-Fernandez, J., Theil, A. F., Gadal, O., Bonnart, C., and Giglia-Mari, G. (2013) Mutations in TFIIH causing trichothiodystrophy are responsible for defects in ribosomal RNA production and processing, *Human molecular genetics* 22, 2881-2893.

29. Lehmann, A. R. (2001) The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases, *Genes & development* 15, 15-23.
30. Velez-Cruz, R., Zadorin, A. S., Coin, F., and Egly, J. M. (2013) Sirt1 suppresses RNA synthesis after UV irradiation in combined xeroderma pigmentosum group D/Cockayne syndrome (XP-D/CS) cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E212-220.
31. Fuss, J. O., and Tainer, J. A. (2011) XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase, *DNA repair* 10, 697-713.
32. Villicana, C., Cruz, G., and Zurita, M. (2014) The basal transcription machinery as a target for cancer therapy, *Cancer cell international* 14, 18.
33. Liu, Q. (2011) Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions, *International immunopharmacology* 11, 377-383.
34. Yang, S., Chen, J., Guo, Z., Xu, X. M., Wang, L., Pei, X. F., Yang, J., Underhill, C. B., and Zhang, L. (2003) Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors, *Molecular cancer therapeutics* 2, 65-72.
35. Titov, D. V., Gilman, B., He, Q. L., Bhat, S., Low, W. K., Dang, Y., Smeaton, M., Demain, A. L., Miller, P. S., Kugel, J. F., Goodrich, J. A., and Liu, J. O. (2011) XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide, *Nature chemical biology* 7, 182-188.
36. Liu, J., Jiang, Z., Xiao, J., Zhang, Y., Lin, S., Duan, W., Yao, J., Liu, C., Huang, X., Wang, T., Liang, Z., Wang, R., Zhang, S., and Zhang, L. (2009) Effects of triptolide from *Tripterygium wilfordii* on ERalpha and p53 expression in two human breast cancer cell lines, *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 16, 1006-1013.

37. Li, X. J., Jiang, Z. Z., and Zhang, L. Y. (2014) Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology, *Journal of ethnopharmacology* 155, 67-79.
38. Kwiatkowski, N., Zhang, T., Rahl, P. B., Abraham, B. J., Reddy, J., Ficarro, S. B., Dastur, A., Amzallag, A., Ramaswamy, S., Tesar, B., Jenkins, C. E., Hannett, N. M., McMillin, D., Sanda, T., Sim, T., Kim, N. D., Look, T., Mitsiades, C. S., Weng, A. P., Brown, J. R., Benes, C. H., Marto, J. A., Young, R. A., and Gray, N. S. (2014) Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor, *Nature* 511, 616-620.
39. Cao, K., and Shilatifard, A. (2014) Inhibit globally, act locally: CDK7 inhibitors in cancer therapy, *Cancer cell* 26, 158-159.
40. Wu, P. P., Liu, K. C., Huang, W. W., Ma, C. Y., Lin, H., Yang, J. S., and Chung, J. G. (2011) Triptolide induces apoptosis in human adrenal cancer NCI-H295 cells through a mitochondrial-dependent pathway, *Oncology reports* 25, 551-557.
41. Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., and Struhl, K. (2009) An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation, *Cell* 139, 693-706.
42. Drost, J., and Agami, R. (2009) Transformation locked in a loop, *Cell* 139, 654-656.
43. Joseph D Fleming, P. G. G., Marianne Lindahl-Allen, Elsa B Krall, Jason D Lieb and Kevin Struhl. (2015) STAT3 acts through pre-existing nucleosome-depleted regions bound by FOS during an epigenetic switch linking inflammation to cancer, In *Epigenetics & Chromatin*.
44. Debnath, J., Muthuswamy, S. K., and Brugge, J. S. (2003) Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures, *Methods* 30, 256-268.
45. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

46. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
47. Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Analytical biochemistry* 112, 195-203.
48. Burnett, R., Guichard, Y., and Barale, E. (1997) Immunohistochemistry for light microscopy in safety evaluation of therapeutic agents: an overview, *Toxicology* 119, 83-93.
49. Kouzine, F., Wojtowicz, D., Yamane, A., Resch, W., Kieffer-Kwon, K. R., Bandle, R., Nelson, S., Nakahashi, H., Awasthi, P., Feigenbaum, L., Menoni, H., Hoeijmakers, J., Vermeulen, W., Ge, H., Przytycka, T. M., Levens, D., and Casellas, R. (2013) Global regulation of promoter melting in naive lymphocytes, *Cell* 153, 988-999.
50. Patel, S. A., and Simon, M. C. (2010) Functional analysis of the Cdk7.cyclin H.Mat1 complex in mouse embryonic stem cells and embryos, *The Journal of biological chemistry* 285, 15587-15598.
51. Pattabiraman, D. R., and Weinberg, R. A. (2014) Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose?, *Nature reviews. Drug discovery* 13, 497-512.
52. Aguilar-Fuentes, J., Fregoso, M., Herrera, M., Reynaud, E., Braun, C., Egly, J. M., and Zurita, M. (2008) p8/TTDA Overexpression Enhances UV-Irradiation Resistance and Suppresses TFIIH Mutations in a Drosophila Trichothiodystrophy Model, *Plos Genet* 4.
53. Zhou, Z. L., Yang, Y. X., Ding, J., Li, Y. C., and Miao, Z. H. (2012) Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms, *Natural product reports* 29, 457-475.

54. Ding, X., Zhang, B., Pei, Q., Pan, J., Huang, S., Yang, Y., Zhu, Z., Lv, Y., and Zou, X. (2014) Triptolide induces apoptotic cell death of human cholangiocarcinoma cells through inhibition of myeloid cell leukemia-1, *BMC cancer* 14, 271.
55. Pan, J. (2010) RNA polymerase - an important molecular target of triptolide in cancer cells, *Cancer letters* 292, 149-152.
56. Christensen, C. L., Kwiatkowski, N., Abraham, B. J., Carretero, J., Al-Shahrour, F., Zhang, T., Chipumuro, E., Herter-Sprie, G. S., Akbay, E. A., Altabef, A., Zhang, J., Shimamura, T., Capelletti, M., Reibel, J. B., Cavanaugh, J. D., Gao, P., Liu, Y., Michaelsen, S. R., Poulsen, H. S., Aref, A. R., Barbie, D. A., Bradner, J. E., George, R. E., Gray, N. S., Young, R. A., and Wong, K. K. (2014) Targeting transcriptional addictions in small cell lung cancer with a covalent CDK7 inhibitor, *Cancer cell* 26, 909-922.