



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Efecto antitumoral de la inhibición de las histonas
demetiladas KDM6A/KDM6B en tumores con
inactivación genética en *SMARCA4* y *SMARCB1***

Andrea Vilarrubi Porta



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Universitat de Barcelona
2023
Programa de Doctorado en Biomedicina

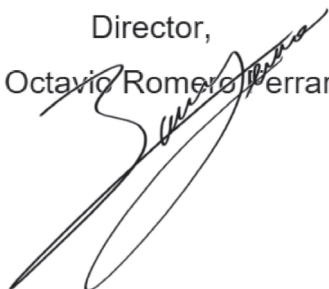
EFFECTO ANTITUMORAL DE LA INHIBICIÓN DE LAS HISTONAS DEMETILASAS KDM6A/KDM6B EN TUMORES CON INACTIVACIÓN GENÉTICA EN *SMARCA4* Y *SMARCB1*

Memoria de tesis doctoral presentada por **Andrea Vilarrubi Porta** para optar al título de doctor por la Universitat de Barcelona

DocuSigned by:
Andrea Vilarrubi
053D3E5234F0496...

Doctoranda,
Andrea Vilarrubi Porta

Director,
Dr. Octavio Romero Ferraro



Directora,
Dra. Montserrat Sánchez Céspedes

Tutor,
Dr. Joan Gil Santano



Als meus pares, per cuidar-me i acompanyar-me en cada pas.

A la meva padrina, per ser els ulls que sempre em miren.

A la meva referent en tot, la meva germana.

Gràcies per no deixar-me mai de la mà.

ABBREVIATIONS

2OG	2-Oxoglutarate	GBAF	GLTSCR1/like-containing BAF
5mC	5-Metilcitosine	gDNA	Genomic DNA
Ac	Acetylation	GFP	Green Fluorescent Protein
ADC	Adenocarcinoma	H&E	Hematoxilina y Eosina
AOD	Amine Oxidase Domain	H2A	Histone H2A
AT/RT	Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor	H2B	Histone H2B
AZA	Azacitidine	H3	Histone 3
BAF	BRG-1 Associated Factors	H4	Histone 4
BRD	Bromodomain	HAT	Histone Acetyl Transferase
Ca	Carcinoma	HDAC	Histone Deacetylase
cDNA	Complementary DNA	HDACi	Histone Deacetylase Inhibitor
ChIP	Chromatin Immuno-Precipitation	HDM	Histone Demethylase
CoA	Coenzyme-A	HDMT	Histone Demethylase
COMPASS	Complex of Proteins Associated with Set1	HMT	Histone Methyl Transferase
DNA	Deoxyribonucleic Acid	KDM	Lysine Demethylase
DNMT	DNA Methyltransferase	KDMi	Lysine Demethylase Inhibitor
DNMTi	DNA Methyltransferase Inhibitor	KMT	Lysine Methyl Transferase
DOX	Doxycycline	LB	Lysogeny broth
EC₅₀	Half maximal effective concentration	LC	Lung Cancer
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	LCC	Large cell carcinoma
EZH2	Enhancer of zester homolog 2	LSD	Lysine-specific histone Demethylase
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide	LuAD	Lung adenocarcinoma
FBS	Fetal Bovine Serum	MBD	Methyl-Binding Domain
FDA	Food and Drug Administration	MBP	Methyl-Binding Protein

Me	Methylation	RTPS1	Rhabdoid Tumor Predisposition Syndrome-1
Me1	Mono-methylation	SAHA	Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid
Me2	Di-methylation	SAM	S-adenosil metionina
Me3	Tri-methylation	SCCOHT	Small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type
miRNA	micro RNA	SCLC	Small-Cell Lung Cancer
MLL	Mixed lineage leukaemia	shRNA	Short hairpin RNA
MPT	Modificaciones Postraduccionales	SRA	SET and RING associated Domain
MRT	Malignant Rhabdoid Tumor	SWI/SNF	Switch/ Sucrose Non-Fermenting
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide	TF	Transcription Factor
Mut	Mutant	TSS	Transcription Start Site
ncBAF	non-canonical BAF	TTD	Tandem Tudor domain
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer	VH/VEH	Vehicle
PBAF	Polybromo-associated BAF	VPA	Valporic Acid
PCG	Polycomb Group	VV	Vector Vacío
PDC	Patient Derived Cells	WB	Western Blot
PDOX	Patient-Derived Orthotopic Xenografts	WT	Wild Type
PRC	Polycomb Repressive Complex	ZnF	Zinc Finger
RFP	Red Fluorescent Protein		
RMS	Rhabdomyosarcoma		
RNA	Ribonucleic Acid		
RNAseq	RNA sequencing		
RT	Rhabdoid Tumor		

ABSTRACT

Cancer genome-sequencing studies have revealed a notably high prevalence of mutations in genes encoding chromatin regulatory elements: approximately 20% of all diagnosed cancers present a mutation in a subunit of the SWI/SNF chromatin-remodeling complexes. The role of SWI/SNF family was first implicated in tumor development with the discovery of biallelic inactivation of *SMARCB1* in the vast majority of rhabdoid tumor (RT). Since then, at least nine different subunits of the SWI/SNF complex have been identified as elements recurrently mutated in various cancers. Importantly, our lab identified frequent *SMARCA4* inactivating mutations in human lung cancer (about 20% of Non-Small Cell Lung Cancer). Moreover, genetic inactivation in this gene play a major role as a driver of small cell carcinoma of ovary hypercalcaemic type (SCCOHT), a rare and very aggressive gynaecological malignancy that predominantly occurs in very young women. However, currently there are no therapies that effectively target *SMARCA4*-deficient tumors, as well as some types of *SMARCB1*-deficient tumors.

In recent years, advancements in our understanding of molecular biology of cancer have led to significant improvements in both, diagnosis and targeted molecular therapies to target specific cancer types, resulting in a notable increase in survival rates. In particular, the identification of the genetic and epigenetic fundamentals of cancer has facilitated the development and utilization of novel, tailored therapeutic agents, representing a substantial breakthrough in precision medicine in cancer.

Previous findings from our group involved the potential therapeutic impact of administering retinoic acid and glucocorticoids, commonly used in certain malignancies, either individually or in combination with AZA and SAHA, in lung cancer cases exhibiting *MYC* amplification. However, these treatments did not yield similar effects in lung cancer cases with *SMARCA4* deficiency. Additionally, these two types of alterations, along with mutations in other SWI/SNF complex members, were exclusively observed in lung cancer, hinting at a potential functional correlation between *MYC* and this chromatin remodeling complex in the context of cancer. Taking all this into account, we aimed to understand the biological mechanisms that underlies the different responses to epigenetic inhibitors observed in cells with *MYC* activation or cells with inactivation of the SWI/SNF complex, to work on the study of new potential epigenetic inhibitors for the treatment of these tumors.

Here, we show that, unlike the cells with amplification of *MYC*, cells with *SMARCA4* inactivation are refractory to the histone deacetylase inhibitor, SAHA, leading to an aberrant accumulation of H3K27me3. This aberrant accumulation is also evidenced in *SMARCB1*-deficient pediatric tumors. Specifically, *SMARCA4* and *SMARCB1* mutant cells shown an impaired transactivation and significantly reduced levels of the histone demethylases KDM6A/UTX and KDM6B/JMJD3. Consequent with this, the *SMARCA4* and *SMARCB1* deficient cancer cells shown a strong dependency on these specific histone demethylases, so its inhibition only in this genetic background context compromises cancer cell viability. Furthermore, administration of the KDM6s inhibitor GSK-J4 demonstrates a strong anti-tumor effect and therapeutic potential in mice orthotopically implanted with *SMARCA4*-mutant lung cancer cells lines, mice implanted with primary tumors of small cell carcinoma of the ovary, hyper calcemic type (SCCOHT) and mice implanted with *SMARCB1*-deficient MRT derived from pediatric patients. In this Thesis we highlight the vulnerability of *SMARCA4* and *SMARCB1* cancer cells to the inhibition of KDM6s inhibitor as a characteristic that could be exploited for treating *SMARCA4* and *SMARCB1* mutant cancer patients. This may be a great opportunity to develop a precision medicine that impacts a field of a wide range of tumors, some of which currently do not have therapeutic options.

TABLA DE CONTENIDO

ABBREVIATIONS

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Cáncer.....	1
1.1.1 Biología y genética del cáncer.....	1
1.1.2 Marcadores distintivos del cáncer	3
1.2 Epigenética en la regulación del cáncer	5
1.2.1 Modificaciones postraduccionales de las histonas.....	6
1.2.2 Reguladores epigenéticos.....	8
1.2.3 Desregulación de mecanismos epigenéticos en el cáncer.....	11
1.3 Rol del complejo PRC2 en la progresión el cáncer.....	12
1.3.1 Estructura y función del complejo PRC2	13
1.3.2 Mecanismo oncogénico de PRC2	15
1.4 Rol de KDM6A/UTX y KDM6B/JMJD3 en cáncer	16
1.4.1 Estructura y función de las KDM6A/UTX y KDM6B/JMJD3	16
1.4.2 Mecanismos moleculares de las H3K27 demetilasas en cáncer	18
1.5 Rol de los complejos SWI/SNF en la progresión de tumores	21
1.5.1 Estructura y función de los complejos SWI/SNF	22
1.5.2 Mecanismo supresor tumoral de SWI/SNF	25
1.5.3 Mutaciones inactivadoras en las subunidades del complejo.....	27
1.5.3.1 Deficiencia de <i>SMARCA4/BRG1</i>	28
1.5.3.2 Inactivación de <i>SMARCB1/INI1</i>	30
1.5.4 Letalidades sintéticas y aproximaciones terapéuticas en tumores deficientes en miembros del complejo SWI/SNF.....	31
1.6 Inhibidores epigenéticos como posibles terapias anticancerígenas	33
2. OBJETIVOS	38
3. METODOLOGÍA.....	40
3.1 Líneas celulares	40
3.1.1 Líneas comerciales tumorales.....	40
3.1.2 Cultivos primarios derivados de tumores de pacientes (PDCs)	40
3.2 Clonaje e infección de los genes de interés.....	42
3.2.1 Vectores de expresión.....	42
3.2.2 Generación de virus e infección de líneas celulares	44
3.3 Tratamientos y shRNA	45

3.3.1 Inducción de la expresión génica de los constructos	45
3.3.2 HDACi (SAHA)	45
3.3.3 EZH2i (GSK126).....	45
3.3.4 KDM6i (GSK-J4).....	46
3.3.5 shRNA	46
3.4 Ensayos de viabilidad	46
3.4.1 MTT y cálculo de EC ₅₀	46
3.4.2 Recuento celular con Azul de Tripano.....	47
3.5 Ensayos proliferación celular	47
3.5.1 Proliferación y formación de colonias.....	47
3.5.2 Ensayo colorimétrico de detección de β-Galactosidasa.....	48
3.6 Extracción de DNA y secuenciación	48
3.6.1 Extracción DNA	48
3.6.2 Secuenciación por Sanger	48
3.7 Extracción de RNA y cuantificación	49
3.7.1 Extracción de RNA, Transcripción Reversa y generación de cDNA	49
3.7.2 RT-Q-PCR	49
3.8 Extracción y análisis de proteínas.....	49
3.8.1 Extracción de proteínas.....	49
3.8.2 Western Blot.....	50
3.9 Técnicas de secuenciación masiva.....	51
3.9.1 Secuenciación con inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-Seq).....	51
3.9.2 Secuenciación de RNA (RNA-seq).....	54
3.10 Estudios in vivo	55
3.10.1 Generación y tratamiento de modelos ortotópicos	55
3.10.1.1 Modelos derivados de líneas de cáncer de pulmón.....	55
3.10.1.2 Modelos derivados de tumores primarios de pacientes de SCCOHT	56
3.10.1.3 Modelos derivados de tumores primarios de pacientes de MRT	56
3.10.2 Examinación inmunohistopatológica de los tumores.....	57
3.10.2.1 Tinción con Hematoxilina y Eosina e Inmunohistoquímica.....	57
3.10.2.2 Tinción con Tricrome de Masson.....	58
3.10.2.3 Inmunofluorescencia.....	58
3.11 Análisis estadísticos.....	59
3.12 Análisis de bases de datos públicas	59
3.13 Códigos de acceso.....	59
4. RESULTADOS	61

4.1. Las células tumorales con deficiencia en <i>SMARCA4</i> muestran una acumulación aberrante de marcas epigenéticas represivas (H3K27me3) tras el tratamiento con SAHA.	61
4.2 La presencia de mutaciones inactivadoras en <i>SMARCA4</i> se correlaciona negativamente con los niveles de expresión de varias KDMs en cáncer	64
4.3 La depleción de la KDM6B mimetiza la respuesta de las células deficientes en <i>SMARCA4</i> al tratamiento con SAHA.	70
4.4 Las células con inactivación en <i>SMARCA4</i> son vulnerables a la inhibición de KDM6A/B	71
4.5 La sobreexpresión de <i>KDM6A</i> y <i>KDM6B</i> revierte la sensibilidad a GSK-J4 en células <i>SMARCA4</i> def.....	74
4.6 GSK-J4 induce la regresión tumoral en modelos <i>in vivo</i> de cáncer de pulmón con mutaciones inactivadoras en <i>SMARCA4</i>	76
4.7 El tratamiento con GSK-J4 disminuye el crecimiento tumoral en ratones implantados con tumores de ovario de célula pequeña (SCCOHT) deficientes en <i>SMARCA4</i>	78
4.8 La inactivación genética en otro miembro específico del complejo SWI/SNF vulnerabilidad las células tumorales a la inhibición de KDM6A/6B	81
4.9 La re-expresión ectópica de <i>SMARCB1</i> reduce la muerte celular mediante la up-regulación de la KDM6A/6B e induce un fenotipo de diferenciación endotelial, promoviendo la parada del ciclo celular y senescencia	83
4.10 GSK-J4 desencadena fibrosis antitumoral y promueve efectos antiangiogénicos en ratones implantados con tumores MRT con inactivación en <i>SMARCB1</i>	88
5. DISCUSIÓN.....	94
6. CONCLUSIONS	101
7. REFERENCIAS	103
8. MATERIAL SUPLEMENTARIO	115
7. PUBLICACIONES	118

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es un alarmante problema de salud pública que emerge a nivel mundial, ya que conforma una de las principales causas de muerte, obstaculizando el incremento de la esperanza de vida de forma global. Su creciente incidencia se ve influenciada tanto por el incremento y envejecimiento de la población, como por la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo del cáncer, varios de los cuales están relacionados con el desarrollo socioeconómico, que impulsa la presencia de contaminantes industriales tanto en los alimentos como a nivel ambiental, junto con malos hábitos, como el sedentarismo y tabaquismo¹.

Según la última actualización estadística de incidencia y mortalidad mundial de cáncer publicada en GLOBOCAN, se calcula que en 2020 se diagnosticaron alrededor de 19.3 millones de nuevos casos y se estimaron casi 10 millones de muertes en todo el mundo. En el mismo estudio se destacó que el cáncer más diagnosticado fue el cáncer de mama en mujeres (11.7%), seguido del cáncer de pulmón (11.4%), los tumores colorrectales (10%), próstata (7.3%) y estómago (5.6%). Por lo que respecta a la mortalidad, el cáncer de pulmón continúa siendo el más letal (18%), seguido del cáncer colorrectal (9.4%), hígado (8.3%), estómago (7.7%) y mama en mujeres (6.9%)².

1.1.1 Biología y genética del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades heterogéneas y de etiología multifactorial que se caracterizan por tener mecanismos comunes de crecimiento celular descontrolado y capacidad de invasión a otros órganos. El cáncer es considerado un proceso dinámico mediante el cual una célula sana termina por desarrollar la capacidad de alterar, de manera independiente del tejido y microambiente de su entorno, los mecanismos que regulan la división celular volviéndose capaz de invadir los tejidos circundantes, e incluso de extenderse a otras partes del cuerpo en un proceso conocido como metástasis. Existe una clasificación con más de cien tipos de cáncer, aunque, de forma general, cada lesión neoplásica se clasifica atendiendo al nombre del órgano donde se origina el cáncer.

En 1976, Peter Norwell propuso por primera vez el modelo de evolución clonal de las células tumorales, en el cual sugirió que el cáncer se origina a partir de una única célula

anormal que progresa a través de una serie secuencial de cambios genéticos que se acumulan y seleccionan de forma similar al concepto darwiniano de mutación y selección durante la evolución. De este modo, una célula pasaría por sucesivas rondas de mutaciones, divisiones y expansión selectiva que le conferirían características ventajosas en el crecimiento frente a otras células, formando poblaciones celulares con fenotipos cada vez más agresivos que sus homólogos sanos, dando lugar al tumor³.

Desde entonces, el cáncer se define como una enfermedad de etiología primordialmente genética que involucra múltiples eventos genéticos, junto con variaciones epigenéticas que no implican alteraciones en la secuencia de DNA, que dan lugar a patrones aberrantes de expresión. De este modo, durante su desarrollo, los tumores acumulan muchas alteraciones en su material genético, que irían desde mutaciones puntuales a grandes aberraciones cromosómicas como aneuploidías, pasando por deleciones, inserciones, translocaciones y cambios no genéticos en la expresión génica, inducidos por modificaciones en la metilación y acetilación de las histonas. La mayoría de los tumores son de origen esporádico y aparecen por la adquisición de mutaciones de forma somática, aunque en algunos casos también pueden ser de origen germinal dando lugar a síndromes hereditarios de predisposición a cáncer, afectando a individuos de más corta edad, incluyendo niños.

En términos generales, y de manera simplificada, los genes asociados al cáncer suelen dividirse en dos grandes grupos: oncogenes y genes supresores tumorales.

- Los **oncogenes** surgen como resultado de la aparición de mutaciones activadoras en genes esenciales implicados en el control de la proliferación, la supervivencia y la división celular. Se denominan **proto-oncogenes** cuando se encuentran no mutados en un tejido sano. En células sanas, la expresión de dichos proto-oncogenes está minuciosamente regulada para evitar el descontrol de la proliferación celular que subyace como la principal característica que conduce al desarrollo tumoral. Las alteraciones genéticas en estos genes están asociadas con un fenotipo dominante, ya que una sola copia mutada en uno de los dos alelos de un proto-oncogén es suficiente para transformar una célula sana y promover el desarrollo del tumor. Los oncogenes se pueden activar de tres formas distintas: (1) mediante mutaciones puntuales específicas, potenciando y activando de manera constitutiva su función biológica, como es el caso paradigmático del gen *KRAS* tanto en cáncer de páncreas, como en cáncer de pulmón y colorrectal; (2) mediante la amplificación génica, donde el gen conserva su secuencia normal, pero se amplifica el número de copias, dando lugar a un incremento descontrolado en la cantidad de

proteína para la que codifica. Un ejemplo de oncogenes que se activan por este mecanismo son los genes *MYC*, *LMYC* y *NMYC* en el cáncer de pulmón o *NMYC* en neuroblastoma, entre otros; (3) mediante fusión génica, como resultado de una translocación, deleción o inversión cromosómica. Las fusiones génicas pueden dar lugar a proteínas híbridas o a la regulación incorrecta de la unidad de transcripción de un gen. Ejemplos de genes activados por este mecanismo incluye *BCR-ABL*, en leucemia mieloide crónica, o *ALK* y *RET* en cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC, del inglés non-small cell lung cancer).

- Los **supresores tumorales** son genes cuya función se relaciona con la inhibición de la proliferación y la supervivencia de las células, mediante el control de la progresión del ciclo y la muerte celular programada/apoptosis. De forma antagónica a los oncogenes, los supresores tumorales se asocian con un fenotipo recesivo, es decir es necesario tener ambos alelos alterados para perder por completo la función de la proteína y favorecer así el desarrollo del cáncer por ausencia de control, siendo las alteraciones en estos genes supresores tumorales las responsables de los síndromes hereditarios del cáncer. En estos síndromes familiares, se hereda una mutación germinal en uno de los alelos, de tal modo que todas las células del organismo se ven afectadas. Por lo tanto, es muy probable que al menos una célula sufra, por azar, la pérdida de función completa por alteración del otro alelo. Como resultado, los síndromes de cáncer hereditario suelen dar lugar a múltiples cánceres que aparecen en etapas tempranas de la vida, como por ejemplo *BRCA1* y *BRCA2* en cáncer de mama y ovario, *SMARCA4* en cáncer de ovario de célula pequeña hipercalcémico (SCCOHT) o *SMARCB1* en el síndrome familiar de predisposición a tumores rabdoides⁴.

1.1.2 Marcadores distintivos del cáncer

Hanahan y Weinberg, en el año 2000, hipotetizaron las características distintivas del cáncer. Estas se refieren a las principales propiedades funcionales que las células normales adquieren durante el proceso de tumorigénesis. En su modelo, los autores proponen que los tumores se comportan a modo de tejidos complejos formados por una gran diversidad de células que interactúan entre ellas estimulando de ésta manera los mecanismos relacionados con la supervivencia y proliferación⁵.

Inicialmente, los autores definieron seis propiedades fundamentales que en una posterior actualización en 2011 se extendieron a ocho: señales proliferativas sostenidas, evasión de señales supresoras del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad, inducción de angiogénesis, capacidad de invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo celular y evasión a la respuesta del sistema inmunitario. Junto a estas propiedades, se añadieron dos características propias del cáncer, facilitadoras del desarrollo del tumor: La inestabilidad genómica e inflamación⁶.

En 2022, Hanahan publicó una última versión dónde, en base a la investigación llevada a cabo en los últimos diez años, las dos características que se describieron como emergentes en 2011 se incorporaron definitivamente en la lista de principales marcadores distintivos del cáncer, sumando un total de diez. Además, en esta última actualización se propusieron dos nuevas características emergentes: plasticidad fenotípica y presencia de células senescentes como componentes del microambiente tumoral, junto a dos nuevas características facilitadoras: microbioma y reprogramación epigenética no mutagénica⁷. Estos cuatro nuevos parámetros propuestos requieren más estudios y validaciones apropiadas para que se integren en el listado central de características comunes y distintivas del cáncer, las cuales sumarían un total de catorce marcadores, tal y como se representa en la Figura 1.



Figura 1. Marcadores distintivos del cáncer. Nueva ampliación del modelo propuesto por Hanahan y Weinberg donde se agrupan y describen los cambios comunes en la fisiología celular que promueve la malignidad en las células tumorales. Figura modificada y adaptada de Hanahan, 2022.

1.2 Epigenética en la regulación del cáncer

Aunque históricamente el cáncer ha sido considerado una enfermedad de origen genético, las alteraciones en los mecanismos epigenéticos se han identificado como un factor común en la práctica totalidad de los tumores, desempeñando un papel fundamental y transversal en la regulación de los programas de expresión génica que son fundamentales para la adquisición de las características distintivas del cáncer. En este contexto, en los últimos años, los proyectos de secuenciación masiva del genoma han demostrado que, en casi la mitad de los tumores, se generan mutaciones en genes que codifican para proteínas de función epigenética. Asimismo, la interacción entre el genoma y el epigenoma abre nuevas ventanas para el estudio de nuevas posibilidades terapéuticas⁸.

El DNA es empaquetado alrededor de las histonas que se organizan en unidades denominadas nucleosomas, las cuales consisten en una vuelta de 147 pares de bases de DNA envuelto alrededor de un octámero de proteínas formado por dos unidades de cada una de las histonas centrales (H2A, H2B, H3 y H4) y la histona H1, actuando fuera del octámero, como *linker* de unión del DNA entre nucleosomas contiguos. La unión del DNA con las proteínas histonas, proteínas no histónicas y RNA es lo que se denomina cromatina. La cromatina puede adquirir dos conformaciones distintas en función de su grado de compactación y accesibilidad para la maquinaria de transcripción:

- **Heterocromatina** o cromatina cerrada, altamente compactada y asociada a zonas de represión transcripcional.
- **Eucromatina** o cromatina abierta, y transcripcionalmente activa.

Las histonas presentan en la región N-terminal unas colas que están sujetas a una batería de múltiples modificaciones postraduccionales orquestadas por diferentes complejos de enzimas modificadoras de la cromatina que, junto con la metilación del DNA, constituyen los dos principales factores reguladores el estado de compactación de la cromatina (Figura 2)⁹. Por otra parte, la metilación del DNA media el silenciamiento de elementos repetitivos y promotores génicos para, por un lado, mantener la estabilidad genómica (cuando la metilación afecta al cuerpo del gen) y, por otro lado, establecer un programa de expresión génica específico. Destacablemente, en cáncer, la hipermetilación de las islas CpG en la zona promotora de los genes es un evento epigenético bien conocido y relacionado con el silenciamiento transcripcional¹⁰. La desregulación de estos patrones epigenéticos orquesta la progresión tumoral y metastática, hecho que les convierte en interesantes puntos de intervención y estudio para posibles nuevas terapias epigenéticas^{11,12}.

1.2.1 Modificaciones postraduccionales de las histonas

Las histonas son proteínas globulares que presentan colas flexibles N- y C-terminales que sobresalen del nucleosoma y que están compuestas, en un alto porcentaje, por residuos básicos de lisinas (Lys, K) y argininas (Arg, R). Estos aminoácidos están sujetos a distintas modificaciones postraduccionales (MPTs), como la fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, acetilación y metilación, que modifican la accesibilidad y estructura de la cromatina¹³ (Figura 2).

La **acetilación** de las histonas es la modificación postraducciona l más estudiada y está catalizada por las enzimas histonas acetiltransferasas (HATs), la acción de las cuales es antagonizada por las histonas deacetilasas (HDACs). La acetilación de los aminoácidos básicos como la lisina, provoca una reducción de la carga positiva en la proteína induciendo así la disociación entre las histonas y el DNA, dando acceso a diversas moléculas de unión al DNA. Por el contrario, la deacetilación de los mismos residuos promueve la compactación de la cromatina y, por tanto, la represión transcripcional. Una de las modificaciones más estudiadas de acetilación es la del grupo ϵ -amino de las lisinas (K) en las colas de las H3 y H4 (H3/H4Kac). La deposición de estas marcas en zonas promotoras y enhancers, así como la acetilación de la lisina 27 en la H3 (H3K27ac), se asocian a un estado de eucromatina y de activación de la transcripción génica.

La **metilación** de las histonas es un proceso mediado por metiltransferasas (HMTs o KMTs) que transfieren grupos metilo a diferentes residuos en la cola de las histonas. Las enzimas que revierten enzimáticamente esta actividad son las histonas demetilasas (HDMs o KDMs) que, en función de la posición del residuo que modifiquen y del grado de metilación (mono- (me1), di- (me2) o tri- (me3)), pueden permitir o reprimir de manera dual la transcripción génica. Los promotores transcripcionalmente activos están enriquecidos, junto con las marcas H3/H4Kac, por trimetilación en la lisina 4 de la H3 (H3K4me3) mientras que los enhancers activos se asocian a marcas de monometilación en la lisina 4 de la H3 (H3K4me1). También existen marcas activas a lo largo del cuerpo del gen, en zonas no promotoras, como la trimetilación de la lisina 36 en la H3 (H3K36me3). Por otro lado, los promotores inactivos presentan acumulación de marcas de trimetilación en la lisina 27 y la lisina 9 de la H3 (H3K9me3 y H3K27me3). Es importante destacar que en las marcas de metilación se reclutan proteínas efectoras que desempeñan un papel esencial en el mantenimiento del estado transcripcional de la cromatina^{14,15}.

Las marcas de activación y represión suelen ser antagónicas para el correcto control de los procesos en los que están involucradas. La deposición de estas modificaciones está coordinada por un conjunto de reguladores epigenéticos que actúan como Readers (lectores), Writers (escritores) o Erasers (borradores), formando redes de interacción reversible para controlar de forma precisa los patrones globales de expresión (Figura 2).

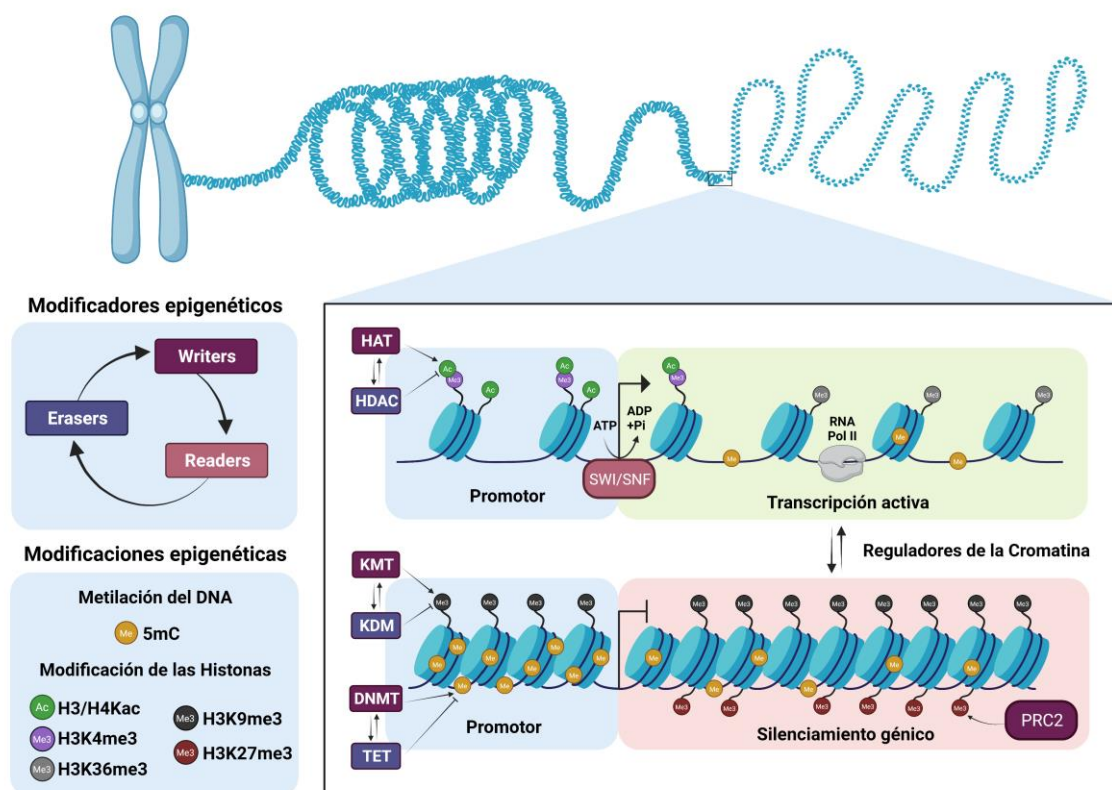


Figura 2. Mecanismos de regulación de la cromatina y control de la transcripción. Las modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas, forman una compleja red de regulación de la compactación de la cromatina y la expresión génica. Las zonas favorables para la transcripción de los genes (eucromatina) están asociadas a marcas de activación como H3/H4Kac y H3K4me3 en zonas promotoras del gen, así como H3K36me3 a lo largo del gen. La eucromatina permite la unión al DNA de complejos reguladores de la cromatina, como SWI/SNF, factores de transcripción y la RNA polimerasa II para el inicio de la transcripción génica. Las zonas de silenciamiento génico (heterocromatina) se asocian a zonas de metilación del DNA (5mC) y marcas de represión como H3K9me3 y dominios de silenciamiento de PRC2 marcados por H3K27me3. Los modificadores epigenéticos que actúan coordinadamente para orquestar el control de los patrones del epigenoma incluyen las enzimas capaces de añadir (writers), reconocer/leer (readers) y eliminar (erasers) las marcas epigenéticas del DNA o las colas de las histonas. La metilación del DNA es catalizada por las DNA metiltransferasas (DNMTs) y es eliminada de forma activa por las enzimas TETs. El estado de metilación de las lisinas de las colas de histonas viene determinado por las acciones opuestas de las lisinas metiltransferasas (KMTs) y las demetilinas (KDMs). La misma interacción se produce entre las histonas acetiltransferasas (HATs) y las histonas deacetilasas (HDACs), que añaden o eliminan grupos acetilo a los residuos de lisina de las colas de las histonas. Esta figura ha sido creada con www.BioRender.com.

1.2.2 Reguladores epigenéticos

Según sus distintas capacidades en el reconocimiento y modificación de las marcas epigenéticas, los reguladores epigenéticos se clasifican en: (1) Writers o Escritores, capaces de modificar las bases nucleotídicas y ciertos aminoácidos de las histonas; (2) Erasers o Borradores, capaces de eliminar las modificaciones epigenéticas añadidas por los writers; (3) Readers o lectores, proteínas o complejos multi-proteicos que son capaces de reconocer, leer y responder a las marcas epigenéticas específicas⁹.

1. Writers (o Escritores): DNA metiltransferasas (DNMTs), histonas acetiltransferasas (HATs) y lisinas metiltransferasas (KDMs).

- Las **DNMTs** conforman una familia de proteínas altamente conservadas formada por DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L, que catalizan la transferencia de los grupos metilo de S-adenosil-L-metionina (SAM) a la posición 5'- de los residuos de citosina en el DNA. La metilación en las citosinas se produce predominantemente en presencia de dinucleótidos de citosina-guanina (CpG), dando lugar a la formación de 5-metilcitosina (5mC) que se asocia a zonas de heterocromatina. La metilación en el DNA también controla la expresión de otros reguladores epigenéticos como los miRNA¹⁴.
- Las **HATs** transfieren los grupos acetilo desde el grupo donador Co-A al grupo ϵ -amino de los residuos de lisinas (K), anulando la carga positiva de estos aminoácidos y permitiendo la apertura de la cromatina. Las HATs se clasifican y diferencian según su localización celular: nucleares o tipo A, responsables de la acetilación de las histonas en la cromatina, y las citoplasmáticas o tipo B, que acetilan las histonas recién traducidas. Una de las HATs nucleares más estudiada es p300/CBP (KAT3A o KAT3B o p300), la cual se asocia a acetilación de las histonas en el nucleosoma que coopera con los miembros de la maquinaria transcripcional basal y con varios factores de transcripción como c-FOS, c-JUN, TP53, entre otros, para regular los patrones de expresión^{12,14}.
- Las **KMTs** catalizan la transferencia de grupos metilo del cofactor S-adenosil-metionina a los residuos de lisina, dando lugar a tres productos de metilación, junto con adenosilhomocisteína. Estas enzimas pueden añadir hasta tres grupos metilo a un único residuo de lisina (K), dando lugar a estados de mono (me1), di (me2) o tri (me3) metilación de los aminoácidos⁹. Estas modificaciones postraduccionales son únicas y con un mecanismo de regulación intrínsecamente complejo, ya que pueden estar asociadas tanto a la activación como a la represión transcripcional en función

de la posición y el estado de los residuos de lisina. Por ejemplo, las marcas de metilación H3K4me2,3, H3K9me1 H3K27me1, H3K36me3 y H4K20me1 se asocian a un estado activo de la transcripción en zonas de eucromatina, mientras que las metilaciones H3K9me2,3, H3K27me2,3 y H4K20me3 son las marcas de heterocromatina. Estos residuos de lisina de las H3 y H4 son algunos de los más estudiados y propensos a la metilación catalizada por KMTs (Figura 3). De entre las metiltransferasas más estudiadas están EZH1 y EZH2, subunidades catalíticas del Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2), que regulan la deposición de marcas de dimetilo (me2) y trimetilo (me3) en H3K27. Las metiltransferasas EZH1/2 no tienen actividad catalítica por sí solas, a menos que formen parte de PRC2 junto a las otras subunidades, hecho que convierte a este complejo esencial para la represión génica y control de la transcripción^{12,10}.

1. **Erasers o Borradores:** DNA demetilinasas, histonas deacetilasas (HDACs) y lisinas demetilinasas (KDMs).
 - La **demetilación del DNA** es el proceso por el cual son eliminados los grupos metilo del DNA de forma activa o pasiva. La demetilación pasiva ocurre a lo largo del ciclo de replicación cuando la enzima de mantenimiento DNMT1 es incapaz de mantener los niveles de metilación del DNA a lo largo de las distintas rondas de replicación. Por otro lado, la demetilación activa requiere la acción enzimática de TET1, TET2 y TET3 para la eliminación de las marcas 5mC a través de una cascada de reducción secuencial de la metilación^{14,8}.
 - Las **HDACs** eliminan los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de las histonas, dando lugar a la compactación de la cromatina y represión de la transcripción génica. Según sus propiedades enzimáticas, podemos distinguir dos clases de HDACs en mamíferos: 1) *deacetilasas dependientes de zinc*, compuesta por 11 proteínas y dividida en cuatro clases según su homología con las proteínas de las levaduras (I, IIa, IIb y IV), y 2) *sirtuinas o HDACs de clase III*, compuesta por 7 proteínas, que actúan de forma dependiente de NAD⁺. Algunas de estas enzimas, como HDAC1 y HDAC2 forman parte de otros complejos como BRG1-RB1-HDAC1 o RCOR/GFI/DKM1A/HDAC2, o del complejo represor PRC2^{10,14}.
 - Las **KDMs** se pueden clasificar en dos familias distintas según su mecanismo enzimático: 1) demetilinasas específicas de lisinas (LSD) de sus siglas en inglés “Lysine Specific Demethylase” que requieren del dinucleótido flavina-adenina (FAD),

y 2) demetilasas con dominio Jumonji C (JmjC), que contiene hierro y dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato. La familia LSD está formada por LSD1/KDM1A y LSD2/KDM1B que presentan un dominio AOD en el extremo N-terminal responsable del mecanismo FAD-dependiente. Los sustratos específicos de la familia LSD se limitan a me1 y me2. La familia JmjC se divide, a su vez, en subfamilias (KDM2, KDM3, KDM4, KDM5, KDM6 y KDM8) capaces de demetilar todos los estados de metilación de los residuos de lisinas (me1, me2 y me3), utilizando 2-oxoglutarato (2OG) como cosustrato y Fe (II) como cofactor. Las principales modificaciones que llevan a cabo las distintas KDMs se especifican en la Figura 3. Cabe destacar que la subfamilia de la KDM6 consiste en tres miembros (KDM6A-6C), dos de los cuales KDM6A (UTX) y KDM6B (JMJD) catalizan la demetilación de una las marcas de represión más estudiadas y más importantes en la regulación global de la expresión, H3K27me3, antagonizando la acción de las metiltransferasas del complejo PRC2, clave en el control de la expresión^{9,10}.

2. Readers o Lectores: Lectores de las metilaciones en el DNA, lectores de las metilaciones en histonas y lectores en las acetilaciones de las histonas.

- Los **lectores de la metilación en el DNA** se pueden clasificar en tres familias distintas de proteínas que se acoplan al DNA metilado: la familia con dominios de unión a metil-CpG (MBD), las proteínas con dominio SRA y las proteínas con dominio Zinc Finger (ZnF). Estas proteínas se unen a grupos CpG metilados (MBP) y son capaces de interpretar el DNA metilado y reclutar complejos remodeladores de la cromatina asociados a la represión génica^{9,12}.
- Los **lectores de la metilación en residuos de lisina de las histonas** son enzimas con dominios especializados para el reconocimiento de estas modificaciones. Estos dominios han sido identificados como: tudor, tudor tándem (TTD), cromodominios, cromobarrel, doble cromodominio (DCD), tumor cerebral maligno (MBT), PWWP (Pro-TrpTrp-Pro), homeodominio de las plantas (PHD), WD40, ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L), Ankyrin, homologo bromo-adyacente (BAH) y zinc finger CW (zf-CW). Muchas de las proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina muestran estos dominios de unión a lisinas metiladas como, por ejemplo, el dominio tudor en PHF1 y PHF19, que son miembros de la familia de proteínas Polycomb y reconocen H3K36me3, o la subunidad EED del complejo PRC2 que reconoce H3K27me3 a través de su dominio WD40, dando lugar a la compactación de la cromatina^{9,12}.

- Los **lectores de las acetilaciones** son proteínas con bromodominios (BRD), dominios dobles PHD finger o dominios Yeats. Los principales lectores de las marcas de acetilación en los residuos de lisina (ϵ -N-acetil lisina) son los BRD, que se dividen en 8 familias basadas en su similitud de secuencia y estructura. Algunos de los lectores más estudiados son SMARCA2/BRM y SMARCA4/BRG1, dos elementos del núcleo del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF, que contienen un dominio BRD y reconocen múltiples sitios de acetilación de la H3 y H4^{9,12}.

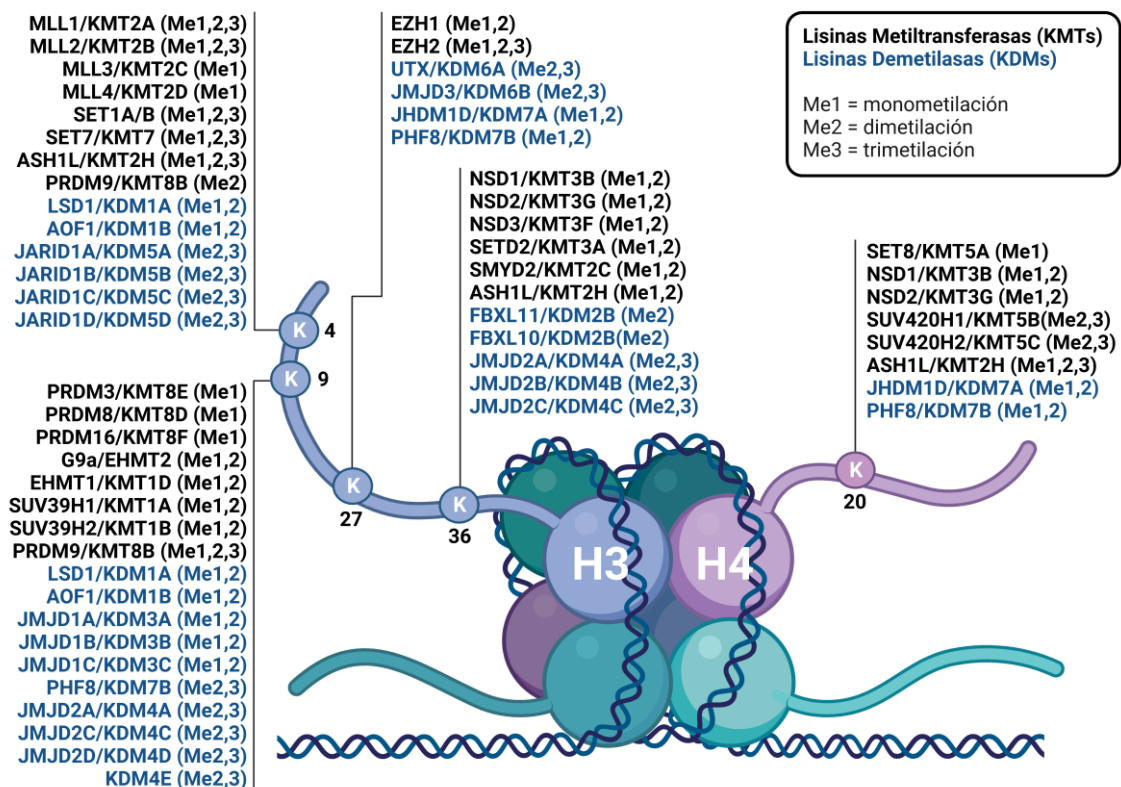


Figura 3. KDMs y KMTs de las principales modificaciones de la histona 3 (H3) y 4 (H4). Se destacan la H3 y H4 en el octámero de histonas. Las lisinas se muestran como K junto al número de la posición que ocupan en las colas de las histonas. Las lisinas metiltransferasas (KMTs), en negro, son los writers que añaden las distintas marcas de metilación (me1, me2 o me3). Las lisinas demetilinas (KDMs), en azul, son los erasers capaces de eliminar la metilación. Esta figura ha sido creada con www.BioRender.com y la información se ha obtenido de www.cellsignal.com/pathways.

1.2.3 Desregulación de mecanismos epigenéticos en el cáncer

Dada la importancia de las modificaciones de la cromatina y la remodelación de los nucleosomas en la regulación de la expresión génica, la pérdida o alteración de las funciones en las proteínas implicadas en su control favorece el inicio y el desarrollo de los mecanismos de tumorigénesis.

En los años 80 se describió por primera vez la conexión entre la metilación del DNA y las células tumorales, observándose que la hipometilación de las islas GpG en los promotores de los genes resultaban en patrones aberrantes de activación de los mismos¹⁶. Del mismo modo, se observó que la hipermetilación en el promotor de un gen, como fue el caso del gen supresor tumoral retinoblastoma (*RB1*), resultaba en el silenciamiento del gen¹⁷. En 2002, se describió otro mecanismo epigenético implicado en cáncer, la modificación postraduccionales de las histonas, cuando se observó que la metilación de la lisina 9 en la H3 correlacionaba con el silenciamiento del supresor tumoral *CDKN2A*^{18,19}. Desde entonces, la secuenciación masiva por bisulfito, ha demostrado por primera vez los mapas globales de metilación del genoma, en los cuales se ha observado que entre el 5% y el 10% de las islas CpG se encuentran metiladas de forma anormal en cáncer¹⁰.

Además, en cáncer, se han descrito alteraciones en varios moduladores epigenéticos como, por ejemplo, la ganancia de función de la metiltransferasa EZH2 en distintos tipos de cáncer, por ejemplo linfoma y melanoma, dando lugar a un incremento de la marca de represión H3K27me3²⁰. Las reorganizaciones cromosómicas en la acetiltransferasa CBP/p300 influyen en la aparición de varios tumores hematopoyéticos mientras que su pérdida de función se ha descrito en tumores sólidos, como el cáncer de pulmón, colorrectal o de mama. Esta HAT, acetila e incrementa la actividad de proteínas no-histonas como TP53, RB1, y CMYC, factores clave en el control de la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación y la estabilidad del DNA²¹. Por otro lado, alteraciones genéticas en forma de mutaciones se han descrito en la metiltransferasa MLL2, en un 90% de los linfomas foliculares²², y en MLL1, en leucemias mieloides agudas y en leucemias linfocíticas agudas. Mutaciones recurrentes también han sido observadas en demetilinasas, tales como KDM5A, en leucemias mieloides agudas, y KDM5C en tumores renales y KDM6A, hasta 12 tumores distintos, tanto hematológicos como de tumores sólidos^{23,24}.

1.3 Rol del complejo PRC2 en la progresión el cáncer

Las proteínas Polycomb (PcG) se conforman por un conjunto de factores de transcripción que desempeñan un papel crucial en muchos procesos fisiológicos, como el mantenimiento celular, la diferenciación, el control del ciclo celular y el desarrollo del cáncer. Se diferencian en dos complejos multiproteicos de represión: PRC1 y PRC2. PRC2 cataliza la metilación de la lisina 27 en la H3 (H3K27me3), a través de las

metiltransferasas EZH1 o EZH2, mientras que PRC1 lee las marcas represivas de H3K27me3 a través del cromodominio CBX7 y se requiere para depositar marcas de ubiquitinación en la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119ub) mediante la acción de las ligasas E3 Ring1a y Ring1b²⁵.

Debido a nuestro interés en el estudio de la metilación y acetilación de los residuos de lisinas en la cola de la histona H3 y sus mecanismos de regulación, nos vamos a centrar únicamente en la descripción del complejo con actividad metiltransferasa PRC2.

1.3.1 Estructura y función del complejo PRC2

El complejo de represión Polycomb 2 (PRC2) es un complejo de proteínas de unión a la cromatina, que actúa como enzima modificadora de las histonas, catalizando la deposición de una de las marcas epigenéticas claves para el silenciamiento génico, H3K27me3²⁶.

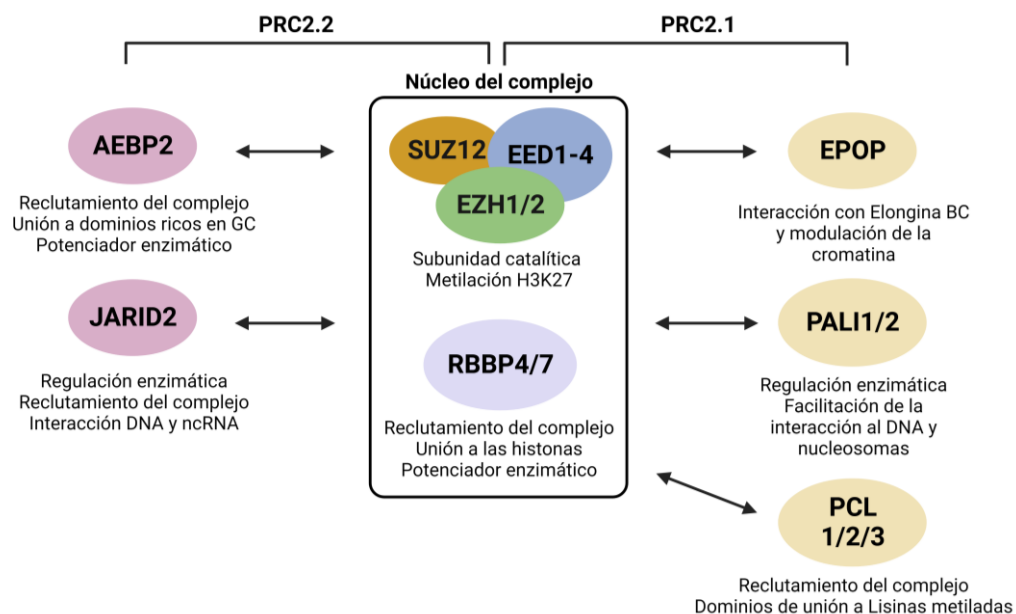


Figura 4. Conformación del complejo PRC2 y sus dos versiones: PRC2.1 y PRC2.2. Las subunidades del núcleo del complejo se indican en la imagen, así como las subunidades accesorias que conforman las dos versiones. Esta figura ha sido creada con www.BioRender.com y la información se ha obtenido de Aranda *et al.* 2015 y Xiuli Liu and Xin Liu 2022.

El núcleo del complejo PRC2 está formado por cuatro componentes principales: la subunidad catalítica EZH1 o EZH2, SUZ12 y EED, que catalizan la mono- di- y trimetilación de H3K27, y por RBBP4/7 o RBAP48/46, que resulta prescindible para el proceso enzimático. Además, PRC2 puede unirse a otras subunidades que regulan su función molecular y biológica, dependiendo del tipo celular. Muchos de estos componentes facultativos se unen al complejo de forma mutuamente excluyente, dando lugar a dos versiones del complejo PRC2: PRC2.1 y PRC2.2. Además de las subunidades principales, la primera variante (PRC2.1) consta de una proteína PCL (PCL1/2/3, también denominadas PHF1, MTF2 y PHF19, respectivamente), así como Elongin BC y EPOP o PAL1/2, mientras que la otra variante (PRC2.2) comprende JARID2 y AEBP2 (Figura 4)^{27,28}.

La subunidad nuclear EED reconoce el producto de la catálisis de PRC2, H3K27me3, lo que conduce a la estimulación alostérica de la actividad enzimática de PRC2 en un mecanismo de retroalimentación positiva que explica la propagación de esta marca de represión en grandes dominios de cromatina. PRC2 cataliza los tres estados de metilación de la histona H3 (H3K27me1/2/3) y su distribución es mutuamente excluyente. Mientras H3K27me3 se deposita en zonas promotoras, H3K27me2 se localiza en regiones intergénicas y H3K27me1 a lo largo del cuerpo de genes que son activamente transcritos. La marca de represión H3K27me3 suele colocalizarse con la marca de activación H3K4me3 en dominios de cromatina bivalentes, preparados tanto para la activación como la represión génica. H3K27me3 se suele colocalizar, también con la marca de represión H2AK119ub en zonas de heterocromatina facultativa²⁶⁻²⁹ La marca de activación H3K27ac, mediada por la HATs como p300/CBP y depositada preferencialmente tanto en promotores como en enhancers activos, es mutuamente excluyente con H3K27me3. Se ha descrito una competición directa entre PRC2 y p300/CBP en la modificación postraducciona de esta histona (Figura 5)³⁰.

El reclutamiento de PRC2 y la deposición de H3K27me3 ocurren tras el silenciamiento transcripcional, de modo que la función principal de este complejo es mantener apagados programas establecidos de expresión génica correspondientes a distintos tipos celulares específicos, antagonizando la deposición de marcas activas, dinamizando la interacción con componentes de la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa II (Pol II) y orquestando la estructura de la cromatina^{31,32}.

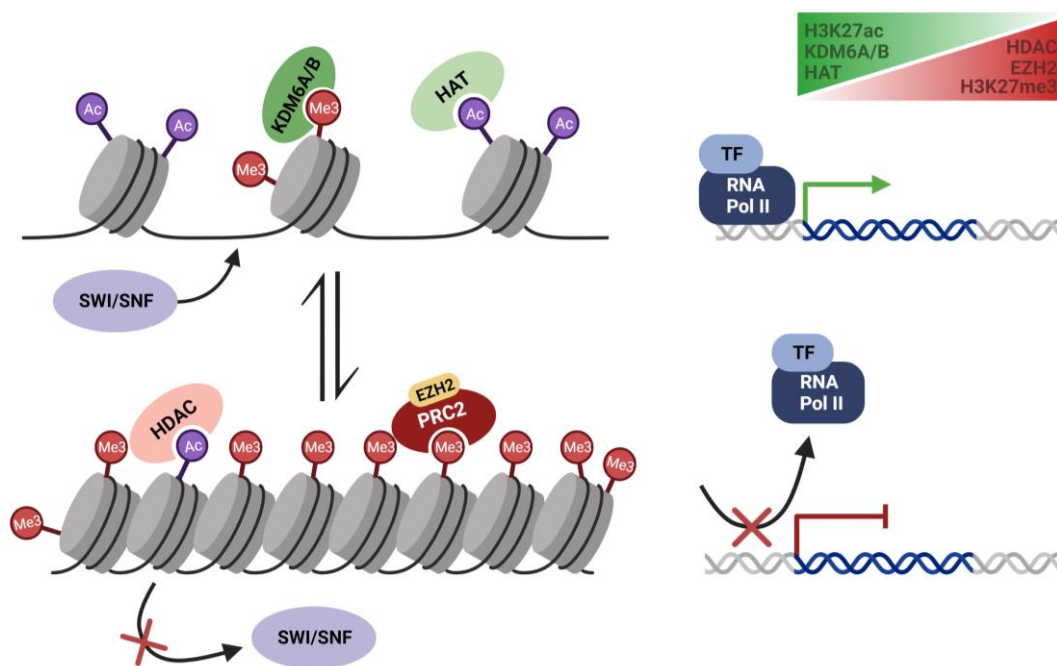


Figura 5. Regulación de la H3K27. La regulación de la H3K27 es un mecanismo dinámico y de interrelación entre complejos epigenéticos clave para el control de la compactación de la cromatina y expresión génica. De este modo, existe una competición directa entre las moléculas involucradas en el control de las marcas de activación (H3K27ac) y la represión (H3K27me3). Como se observa en la parte superior de la imagen, en zonas de transcripción activa las KDM6A/B reconocen y eliminan las marcas de metilación en H3K27 permitiendo que p300/CBP añada grupos acetilo, las cuales generan zonas de reconocimiento y unión del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF, junto a factores de transcripción (TF) que reclutan la RNA polimerasa II (RNA Pol II), permitiendo su unión al DNA y el consiguiente inicio de la transcripción. En la parte inferior de la imagen se observa que, en zonas de represión de la transcripción, el complejo PRC2/EZH2 es reclutado y cataliza el control de la deposición de H3K27me3 mientras que las HDACs eliminan las H3K27ac, cerrando la cromatina e impidiendo la unión de SWI/SNF, TF y RNA Pol II al DNA, dando lugar a un silenciamiento de la expresión génica. Esta figura ha sido creada con www.BioRender.com

1.3.2 Mecanismo oncogénico de PRC2

En general, la alteración en la actividad de PRC2 conduce a cambios globales en los patrones de metilación de la histona H3K27, hecho que promueve la reducción de la heterocromatina facultativa y el aumento de regiones de eucromatina, dando lugar a cambios en la expresión génica que promueven la activación de oncogenes y/o inactivación de supresores tumorales, favoreciendo así el inicio de la carcinogénesis. Aunque la mayoría de los cánceres se asocian a alteraciones de ganancia de función o sobreexpresión de EZH2, la pérdida de función de PRC2 por mutaciones inactivadoras en *EZH2*, *EED* o *SUZ12* también se ha descrito cáncer²⁹, lo que podría indicar un potencial rol dual de este complejo en oncogénesis. La sobreexpresión de *EZH2* se asocia a un peor pronóstico en cáncer de próstata, de mama, endometrio, vejiga y melanoma y con un incremento de la agresividad y estadios avanzados de la

enfermedad³³. Además, se ha observado que la presencia de mutaciones activadoras en el gen *EZH2* junto con estados de hipertrimetilación de H3K27me3 se asocian al desarrollo de un subconjunto de linfomas humanos de células B (linfomas de células B difusas de células grandes y linfomas foliculares)^{34,24}. La inhibición de EZH2 en tumores con alteraciones genéticas inactivadoras en miembros del complejo de remodelador de la cromatina SWI/SNF tiene un efecto de letalidad sintética, lo que sugiere que EZH2 podría ser una potencial diana terapéutica en algunos tipos de cáncer^{35,20}.

1.4 Rol de KDM6A/UTX y KDM6B/JMJD3 en cáncer

Las dos demetilinasas que catalizan la eliminación de la trimetilación de la H3K27 son la KDM6A (o UTX) y KDM6B (o JMJD3) y se describieron por primera vez en 2007³⁶. Desde entonces, la actividad de estas dos demetilinasas se ha visto implicada en el desarrollo de una gran variedad de enfermedades, entre ellas, el cáncer³⁷.

1.4.1 Estructura y función de las KDM6A/UTX y KDM6B/JMJD3

KDM6A y KDM6B pertenecen a la familia de demetilinasas con dominio JmjC y catalizan la eliminación de los grupos di- y tri- metilación de la H3K27, conduciendo a un estado de activación transcripcional.

KDM6A consta de 1401 aminoácidos y es codificada por el gen *KDM6A* situado en el cromosoma X, siendo este uno de los genes conocidos que escapan a la inactivación del cromosoma X. Junto con el dominio catalítico JmJC en el extremo C-terminal, KDM6A presenta 6 dominios de repetición de tricopéptidos (TPR) de mediación de interacciones proteicas y un dominio Zinc finger (ZnF) de unión al DNA. KDM6A (o UTX), tiene un homólogo en el cromosoma Y, UTY, que actúa compensando parcialmente las funciones de KDM6A, ya que presenta una actividad catalítica mínima debido a una mutación en el dominio JmjC. Por otra parte, KDM6B consta de 1679 aminoácidos y es codificado por el gen *KDM6B* situado en el cromosoma 17. Esta demetilasa, sin embargo, no contiene ningún otro dominio característico a parte del de JmjC. KDM6A y KDM6B presentan una similitud de secuencia del 84% en su dominio JmjC³⁸ (Figura 6a).

De forma mecánica, al igual que todas las demetilinasas con dominio JmjC, KDM6A y KDM6B catalizan la descarboxilación oxidativa del 2OG (2-oxoglutarato) de forma dependiente a Fe(II) y O₂, eliminando los grupos metilo en las lisina de la histona a través de una reacción de reducción en cadena³⁹.

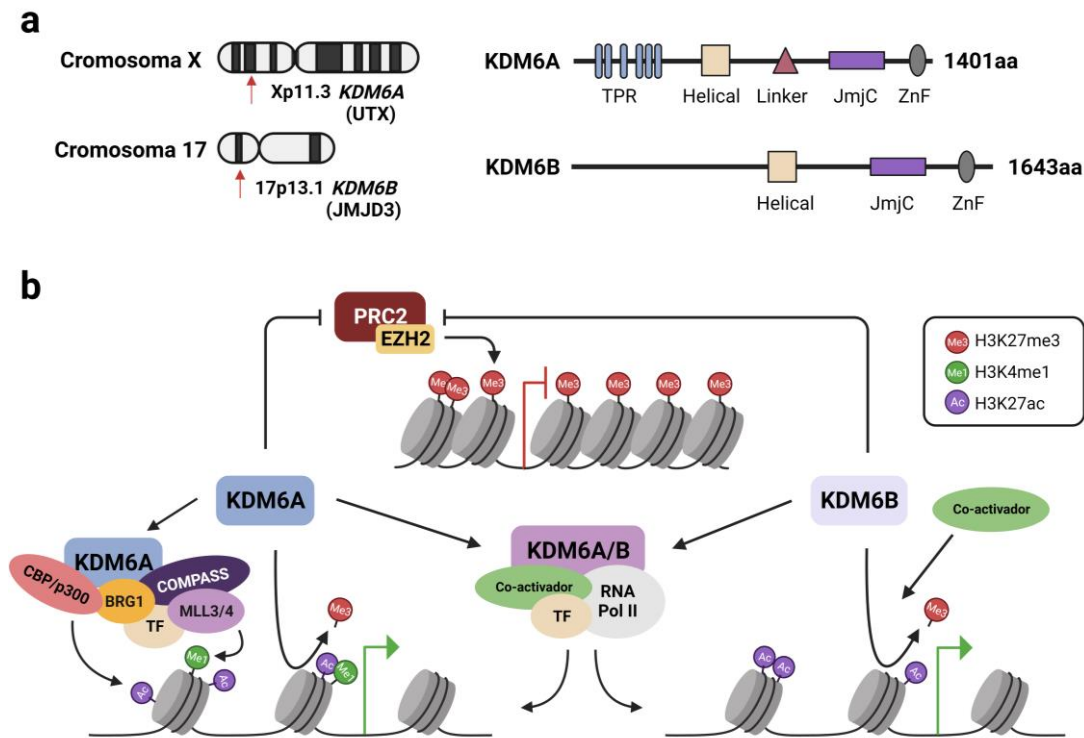


Figura 6. Localización, estructura y mecanismo de acción de KDM6A y KDM6B. **a.** Localización cromosómica y representación esquemática de los dominios proteicos de las KDM6s. Su estructura consta de cinco regiones: dominio de repetición tetratricopéptida (TPR), dominio Helical, Linker, dominio Jumonji C (JmjC) y dominio Zinc Finger (ZnF). El número indica los aminoácidos que conforman la proteína (aa). Los dominios que conforman las KDM6s son de acuerdo con la información de www.uniprot.com. **b.** Mecanismos de demetilación directos e indirectos de KDM6A y KDM6B. Las dos proteínas pueden actuar directamente sobre las marcas H3K27me3 o en competencia directa con PRC2. De forma indirecta, se pueden unir a co-activadores o factores de transcripción para reclutar y activar la RNA Pol II. KDM6A, por otra parte, puede unirse al complejo COMPASS, añadiendo las marcas de activación H3K4me1, que se une a su vez a la HAT CBP/p300, permitiendo añadir H3K27ac, junto con otros remodeladores de la cromatina, como SWI/SNF a través de SMARCA4, que abren la cromatina, siendo activa para la transcripción. Esta figura ha sido creada con www.BioRender.com.

A parte de su función como demetilasas tanto KDM6A como KDM6B están involucradas en actividades críticas para el control de la transcripción, el desarrollo y la diferenciación (Figura 6b). KDM6A forma parte del complejo MLL3/4-COMPASS-like, el cual media la metilación sobre H3K4, como H3K4me1 y H3K4me3, facilitando la activación de enhancers⁴⁰. En este complejo, KDM6A se une a los enhancers en asociación al factor de transcripción LDTF, facilitando el reclutamiento de las metiltransferasas MLL3/4, la H3K27 acetiltransferasa CBP/p300 y el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF. Una vez KDM6A ha ejercido su actividad demetilasa sobre H3K27me3, permitiendo la deposición de grupos acetilo sobre H3K27 por CBP/p300, que son reconocidos por SMARCA4 (o BRG1) del complejo SWI/SNF, KMT2C and KMT2D actúan sobre H3K4. De este modo, se genera una apertura de la cromatina, que activa los enhancers y enciende la transcripción de genes^{41,42}. La transcripción mediada por KDM6A podría

también ser independiente de su actividad demetilasa, debida a su interacción con factores de transcripción, con la RNA polimerasa II, y con proteínas involucradas en el control del ciclo celular⁴³.

KDM6B también puede disminuir los niveles de H3K27me3 de forma directa, compitiendo con la actividad de PRC2/EZH2, o de forma indirecta a través de su unión a coactivadores del complejo de elongación de la RNA polimerasa II, y reclutando factores de transcripción para promocionar la transcripción génica⁴⁴.

Tanto KDM6A como KDM6B desempeñan papeles importantes en el desarrollo y diferenciación celular, ya que están involucradas en la regulación de los genes *HOX*⁴⁵. Además, la actividad de estas dos demetilasas se ha relacionado con el control de la respuesta inflamatoria e inmunidad, regulando los genes responsables de la maduración y la diferenciación terminal de las células T⁴⁶.

1.4.2 Mecanismos moleculares de las H3K27 demetilasas en cáncer

Las KDM6s desempeñan un papel crucial y dual en la aparición y la progresión de los tumores, mediando la activación o represión de la transcripción de genes esenciales para el desarrollo tumoral que, por lo tanto, constituyen dianas terapéuticas potenciales (Apartado 1.6 Inhibidores epigenéticos como terapias anticancerígenas). Debido a la gran diversidad de factores y mecanismos con los que interactúan, KDM6A y KDM6B operan como factores pro-oncogénicos o supresores tumorales dependiendo en gran medida de la tipología celular y el contexto patológico del tumor (Figura 7).

a) KDM6A/UTX

KDM6A es una de las enzimas modificadoras de histonas más mutada en cáncer. La mayoría de las mutaciones identificadas en *KDM6A* son de naturaleza deletérea, provocando la pérdida de función de la proteína. Estas mutaciones han sido descritas en una gran variedad de cánceres, incluyendo distintos tipos de leucemias y linfomas, carcinoma de vejiga, cáncer de mama, adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma de endometrio, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón y glioblastoma, entre otros²⁴.

De forma general, KDM6A funciona como supresor tumoral antagonizando la represión transcripcional mediada por EZH2. Debido a que la reacción catalítica de las KDM6s depende de metabolitos celulares intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (ATC), como Fe (II), 2OG u oxígeno, se ha descrito que la actividad demetilasa de KDM6A puede estar influenciada por mutaciones genéticas en enzimas de este ciclo, como IDH1 o IDH2. Además, se ha descrito que, ante un estado de hipoxia en el microambiente

tumoral, se genera una disminución de 2OG que promueve la inhibición de la actividad de KDM6A dependiente de 2OG y la consiguiente desregulación de la expresión génica necesaria para la promoción, desarrollo y progresión del cáncer^{47,48}. Interesantemente, se ha descrito que KDM6A es un sensor directo de los niveles de oxígeno ya que, en condiciones de hipoxia, su expresión es inhibida a través del complejo HIF-1 α . De este modo, la inactivación por hipoxia de KDM6A promueve la trimetilación de H3K27 impidiendo la reprogramación transcripcional para la diferenciación celular^{49,50}. Se ha observado también que la pérdida de función de KDM6A disminuye la expresión de inhibidores del ciclo celular como CDKN2A y CDKN2B, promoviendo un estado de proliferación celular descontrolada⁵¹.

Aunque la mayoría de los trabajos realizados refuerzan el rol de *KDM6A* como gen supresor tumoral, algunos estudios sugieren un papel pro-oncogénico. Como, por ejemplo, su asociación con el factor de transcripción TAL1 en leucemia linfoblástica aguda de células T, donde actúa como factor coactivador promoviendo la proliferación celular⁵². También se ha observado que KDM6A promueve la progresión y migración celular en cáncer de mama con receptores de estrógenos (ER) positivos, facilitando la regulación de la transcripción mediada por dichos receptores a través de la co-localización con el factor de transcripción ER α . Además, a través de ER α , KDM6A recluta también a CBP para regular los niveles H3K27ac, promoviendo un estado continuado de activación transcripcional⁵³. En cáncer de mama se ha observado que la depleción de KDM6A, incrementa la expresión de factores de transcripción dependientes de MYC, como SNAI y ZEB1 que conducen a un estado de transición epitelio mesénquima (EMT), relacionado con una mayor agresividad y capacidad de invasión tumoral⁵⁴.

b) KDM6B/JMJD3

A diferencia de *KDM6A*, el gen *KDM6B* no se encuentra mutado en cáncer. Aun así, se ha observado que la expresión de *KDM6B* se encuentra significativamente disminuida en varios tipos de cáncer, incluyendo los carcinomas de pulmón e hígado, así como en neoplasias hematopoyéticas. Aunque, por otra parte, también se ha observado que los niveles de KDM6B se encuentran significativamente elevados en algunos tipos de cáncer como el carcinoma renal, el cáncer de próstata y gliomas⁵⁵.

El papel de KDM6B en el control de la proliferación y diferenciación celular es regulado por distintos factores de crecimiento, citoquinas y ligandos involucrados en diferentes vías de señalización, de forma independiente a su actividad demetilasa. De igual modo que ocurre con *KDM6A*, *KDM6B* presenta mecanismos duales en la regulación de la

progresión del tumor, comportándose como supresor tumoral u oncogén, dependiendo del tipo celular y del tejido. Aunque muchos de los mecanismos de acción son comunes, las dos demetilasas de H3K27 llevan a cabo distintas funciones, hecho que puede deberse a la falta del dominio TPR N-terminal en la proteína KDM6B.

KDM6B puede actuar como supresor tumoral a través de varios mecanismos. Se ha descrito que, en cáncer, NOTCH inhibe la expresión de KDM6B⁵⁶. Además, del mismo modo que sucede con KDM6A, KDM6B se regula mediante HIF-1 α , en condiciones de hipoxia y normoxia⁵⁷, por NF- κ B y por RAS-RAF lo que desencadena la activación de la vía de señalización de MAPK y promueve el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales^{58,59}. Adicionalmente, KDM6B interacciona con p53, regulando su estabilización nuclear, hecho que promueve una parada del ciclo celular y la inducción de senescencia o apoptosis⁶⁰.

Por otro lado, la sobreexpresión de *KDM6B* se ha relacionado con la disminución de la supervivencia y aumento de la agresividad en muchos tumores, actuando a través de varios mecanismos oncogénicos. Por ejemplo, en la leucemia linfoblástica aguda de células T, KDM6B se regula mediante una retroalimentación positiva con USP7 y NOTCH, donde KDM6B promueve la expresión de NOTCH1 e induce la expresión del factor de transcripción USP7, reclutándolo y activando la expresión de los genes diana⁶¹. Las cascadas de señalización de SMAD, activadas por BMP4, incrementan la expresión de *KDM6B*, hecho que influye en la regulación de los equilibrios entre auto-renovación y diferenciación celular. Además, se ha descrito una retroalimentación positiva en el microambiente tumoral entre KDM6B y las vías BMP y NF- κ B, modulando la angiogénesis e inflamación tumoral, donde KDM6B se une a regiones promotoras de genes relacionados con la inflamación como TNF α y IL-6, reduciendo así los niveles de H3K27me3^{62,63}. Mediante la señalización de los SMAD activada por TGF β , *KDM6B* se sobreexpresa y, a su vez, regula al alza el factor dependiente de MYC, SNAI1, factor de transcripción clave en la transición epitelio-mesénquima (EMT) y por lo tanto para la progresión del cáncer^{64,65}.

Las demetilasas de H3K27 actúan de forma precisa y estricta para llevar a cabo un control equilibrado de la expresión génica, mediada de forma dependiente y/o independiente de su actividad enzimática. La diversidad de factores de transcripción y vías de señalización con las que interactúan las KDM6s dependen en gran medida del contexto celular, hecho que explicaría su posible papel dual en la oncogénesis. Lo que determina el equilibrio entre las funciones demetilasas y no demetilasas de las KDM6s puede estar directamente relacionado con su expresión relativa, sus modificaciones postraduccionales y la formación e interacción de complejos, como por ejemplo su

interacción con otro complejo maestro de la regulación génica: el remodelador de cromatina SWI/SNF (Figura 5 y Figura 6b).

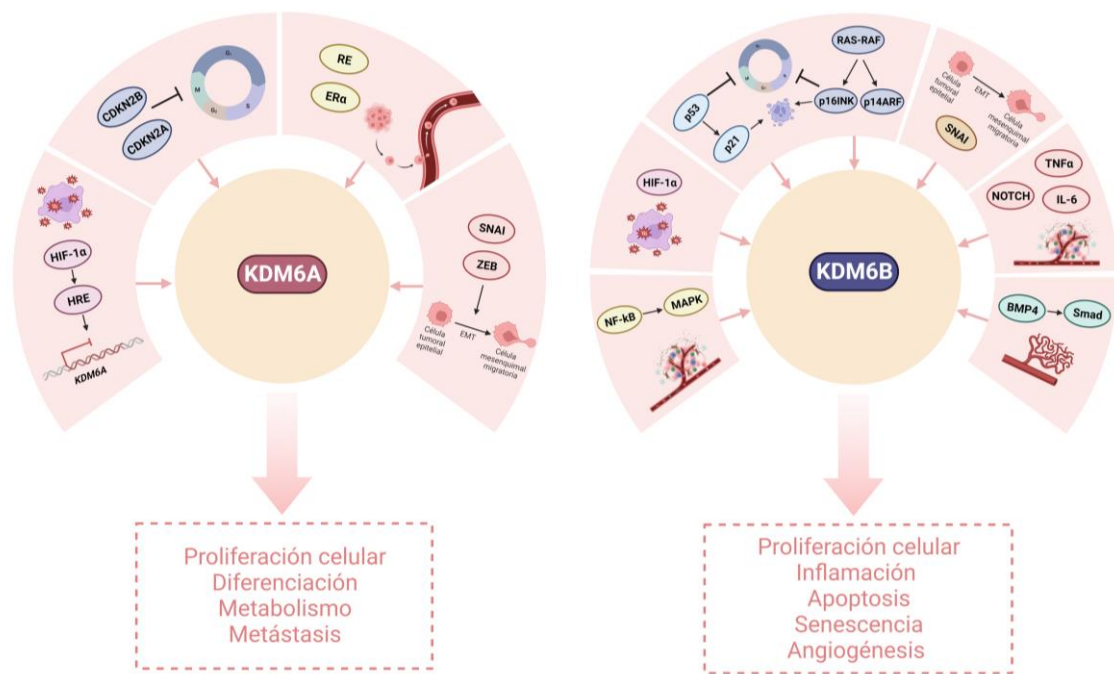


Figura 7. Mecanismos oncogénicos de KDM6A y KDM6B. Las dos KDM6s presentan un mecanismo dual en el inicio y progresión tumoral. La regulación de KDM6A/B puede ser al alza o a la baja dependiendo de las condiciones de oxígeno (HIF-1 α) y su interacción con distintas vías de señalización. KDM6A influye en la proliferación celular, la diferenciación, el metabolismo y la formación de metástasis. KDM6B, por otro lado, participa en la proliferación celular, la inflamación, apoptosis, senescencia y angiogénesis. Esta figura ha sido creada con www.BioRender.com

1.5 Rol de los complejos SWI/SNF en la progresión de tumores

La regulación de la H3K27 se puede ver afectada, también, por alteraciones en complejos remodeladores de la cromatina, como el complejo SWI/SNF. Se trata de un complejo multiproteico clave para el control de la compactación de la cromatina y consiguientemente la regulación fina de la expresión génica, siendo un complejo esencial en los programas básicos de desarrollo embrionario y diferenciación celular. Asimismo, es probablemente el complejo más mutado en cáncer, ya que, gracias a la secuenciación masiva del genoma tumoral, se ha observado que entre el 20% y el 25% de todos los tumores humanos presentan alteraciones en alguna de las subunidades del complejo SWI/SNF. De este modo, durante los últimos años, se le ha dado particular

relevancia al estudio e identificación de posibles vulnerabilidades terapéuticas derivadas de las mutaciones inactivantes en los genes que codifican para las diferentes subunidades de este complejo maestro en la regulación del epigenoma⁶⁶.

1.5.1 Estructura y función de los complejos SWI/SNF

La familia de complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF, también conocidos como complejos asociados a los factores BRG1/BRM (BAF), controlan y regulan el posicionamiento y deslizamiento de los nucleosomas para llevar a cabo un estricto control de la accesibilidad de factores de transcripción y compactación de la cromatina. Estos complejos se identificaron por primera vez en *S.cerevisiae*, donde se descubrieron los genes *swi* (switch) y *snf* (sucrose non-fermenting), responsables de llevar a cabo el cambio y control de la transcripción génica en presencia/ausencia de glucosa⁶⁷. Años más tarde, se descubrieron y caracterizaron sus homólogos en *D.melanogaster* y en mamíferos, encontrándose sus distintos miembros altamente conservados^{68,69}.

Esta familia de remodeladores epigenéticos se agrupan en distintos macrocomplejos ensamblados en combinaciones de 12-15 subunidades variables, codificadas por 29 genes. En mamíferos, los complejos SWI/SNF se clasifican principalmente en tres subfamilias: *BAF canónico* (cBAF), *BAF asociado a Polibromo* (PBAF) y *BAF asociado a GLTSCR1 o GLTSCR1L* (GBAF)⁷⁰. Este último se definió y caracterizó en 2018 con el descubrimiento de los factores GLTSCR1 y GLTSCR1L, conocido hasta entonces como BAF no canónico (ncBAF)^{71,72}. Las tres conformaciones comparten una subunidad catalítica que es una de las dos ATPasas bien SMARCA4 o (BRG1) o SMARCA2 (o BRM), junto con varias subunidades comunes, entre las cuales se encuentran SMARCC1 (BAF155), SMARCC2 (BAF170) y SMARCD1 (BAF60A), que conforman el núcleo mínimo y esencial de los tres complejos, conjuntamente con SMARCE1 (BAF57) y SMARCB1 (SNF5) en BAF y PBAF, y distintas proteínas accesorias que conforman la identidad de cada uno de los complejos^{73,74} (Tabla 1 y Figura 8). El ensamblaje diferencial de las distintas subunidades accesorias permite que puedan existir distintos complejos SWI/SNF diferentes.

De forma constitutiva, SMARCC1/2 y SMARCD1/2/3 se asocian para formar la matriz estructural de los complejos donde se ensamblan el resto de las proteínas. Las subunidades SMARCB1, SMARCE1, ARID1A/1B y ARID2 contienen regiones de interacción con factores de transcripción y/o el DNA. El factor SS18/L también interacciona con activadores transcripcionales. Otras subunidades como BRD7, PBRM1, DPF1/2/3 y PHF10 contienen bromodominios de reconocimiento e interacción

con regiones de acetilación en las colas de las histonas. Otras subunidades esenciales del complejo, como ACTINA B (ACTB) y ACTL6A, actúan formando una hendidura de unión a ATP necesaria para conseguir la máxima actividad ATPasa de SMARCA4, y regular el deslizamiento de nucleosomas. El papel de otras subunidades como BCL7 o GLTSCR1/L, que no tienen ningún dominio funcional, sigue siendo desconocida⁷⁵.

Tabla 1. Subunidades compartidas y específicas de los distintos complejos SWI/SNF en mamíferos. Listado de las distintas subunidades del complejo SWI/SNF, sus alias y su presencia en las distintas variantes del complejo, así como el módulo al cual pertenecen, clasificados según si son comunes o específicos de los distintos complejos. Información extraída de Centore, R.C. *et al.* 2020.

	Gen	Alias	Complejo SWI/SNF	Módulo
Subunidades compartidas	ACTB		cBAF, PBAF, GBAF	ATPasa
	ACTL6A	BAF53A	cBAF, PBAF, GBAF	ATPasa
	ACTL6B	BAF53B	cBAF, PBAF, GBAF	ATPasa
	BCL7A		cBAF, PBAF, GBAF	ATPasa
	BCL7B		cBAF, PBAF, GBAF	ATPasa
	BCL7C		cBAF, PBAF, GBAF	ATPasa
	SMARCA2	BRM	cBAF, PBAF, GBAF	ATPasa
	SMARCA4	BRG1	cBAF, PBAF, GBAF	ATPasa
	SMARCC1	BAF155	cBAF, PBAF, GBAF	núcleo BAF
	SMARCC2	BAF170	cBAF, PBAF, GBAF	núcleo BAF
	SMARCD1	BAF60A	cBAF, PBAF, GBAF	núcleo BAF
	SMARCD2	BAF60B	cBAF, PBAF, GBAF	núcleo BAF
	SMARCD3	BAF60C	cBAF, PBAF, GBAF	núcleo BAF
Subunidades específicas	ARID1A	BAF250A, OSA1	cBAF	accesorio
	ARID1B	BAF250B, OSA2	cBAF	accesorio
	ARID2	BAF200	PBAF	accesorio
	BICRA	GLTSCR1	GBAF	accesorio
	BICRAL	GLTSCR1L	GBAF	accesorio
	BRD7		PBAF	accesorio
	BRD9		GBAF	accesorio
	DPF1	BAF45B, NEUD4	cBAF	accesorio
	DPF2	BAF45D, REQ, UBID4	cBAF	accesorio
	DPF3	BAF45C, CERD4	cBAF	accesorio
	PHF10	BAF45A	GBAF	accesorio
	PBRM1	BAF180	GBAF	accesorio
	SMARCB1	BAF47, INI1	cBAF, PBAF	núcleo BAF
	SMARCE1	BAF57	cBAF, PBAF	núcleo BAF
	SS18	SSXT, SYT	cBAF, GBAF	ATPasa
	SS18L1	CREST	cBAF, GBAF	ATPasa

Aunque la asociación y mecanismo del complejo GBAF sigue sin estar bien definida, mecanísticamente, los tres complejos se asocian de forma similar al DNA. Los complejos BAF se disponen en una conformación de pinza en forma de C alrededor de los nucleosomas, sugiriendo tres módulos funcionales de acción (Figura 8):

1. El módulo ATPasa, formada por SMARCA4 o SMARCA2 como subunidad catalítica que interactúa con la parte superior de los nucleosomas.

2. El módulo estructural, formado por las subunidades SMARCB1, SMARCC, SMARCD, SMARCE1, junto con la subunidad DPF únicamente en cBAF y PBRM1, PHF10, BRD7 en PBAF. En estos dos complejos, SMARCB1 interactúa con la parte inferior del nucleosoma, cerrando la pinza de unión, mientras que en GBAF el complejo se asocia únicamente a SMARCC1 y SMARCD1, junto con BRD9 que podría cerrar la pinza con su bromodominio de unión a histonas.
3. El módulo regulador, conformado por las subunidades ACTB y ACTL6A, que conectan el módulo ATPasa con el módulo base del complejo, siendo reforzado y estabilizado por la asociación de las subunidades ARID1 en cBAF, ARID2 en PBAF y probablemente mediante GLTSCR1 y GLTSCR1L en GBAF⁷³.

De este modo, el acoplamiento bilateral de SMARCB1 y SMARCA4/2 en los nucleosomas es esencial para llevar a cabo la actividad reguladora del complejo, ya que cualquier delección en las secuencias de los genes que codifican para estas proteínas interrumpe la actividad de remodelación de la cromatina del complejo⁷⁶.

Los complejos SWI/SNF desempeñan un amplio papel en el control de la regulación transcripcional que sucede durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular. La especificidad en el control de estos programas se consigue mediante la expresión y el ensamblaje conformacional de las diferentes subunidades para formar los distintos complejos de forma tejido-específica modulando, así, la interacción con factores de transcripción específicos^{70,77}.

Como se ha mencionado anteriormente, el control y equilibrio entre patrones de activación y represión transcripcional es regulado, en gran parte, por la oposición de los complejos SWI/SNF a la represión transcripcional mediada por PCR2 en los enhancers y en los promotores de los genes, donde específicamente cBAF presenta mayor actividad en respuesta a marcas de histonas como la H3K27ac y H3K4me1 (Figura 5). El reclutamiento de estos complejos al DNA conduce al desplazamiento de PRC2 y sus marcas represivas H3K27me3, dando lugar a un estado de apertura de la cromatina y activación transcripcional. El reclutamiento de los complejos SWI/SNF a sus genes diana se puede producir por: 1) interacciones directas entre las subunidades del complejo y factores de transcripción; 2) interacciones directas entre los complejos SWI/SNF y las modificaciones de histonas, a través de los dominios específicos de interacción, como los bromodominios y 3) de forma indirecta, a través de la unión a otros complejos o enzimas, como CBP/p300⁷⁸ (Figura 6). Además del control sobre la

transcripción y la expresión génica, el complejo SWI/SNF está implicado en mecanismos de reparación de daños en el DNA. De este modo, estos remodeladores de la cromatina se ven implicados en el control del mantenimiento de la estabilidad genómica, hecho que contribuye en reforzar la actividad supresora tumoral de este complejo en cáncer.

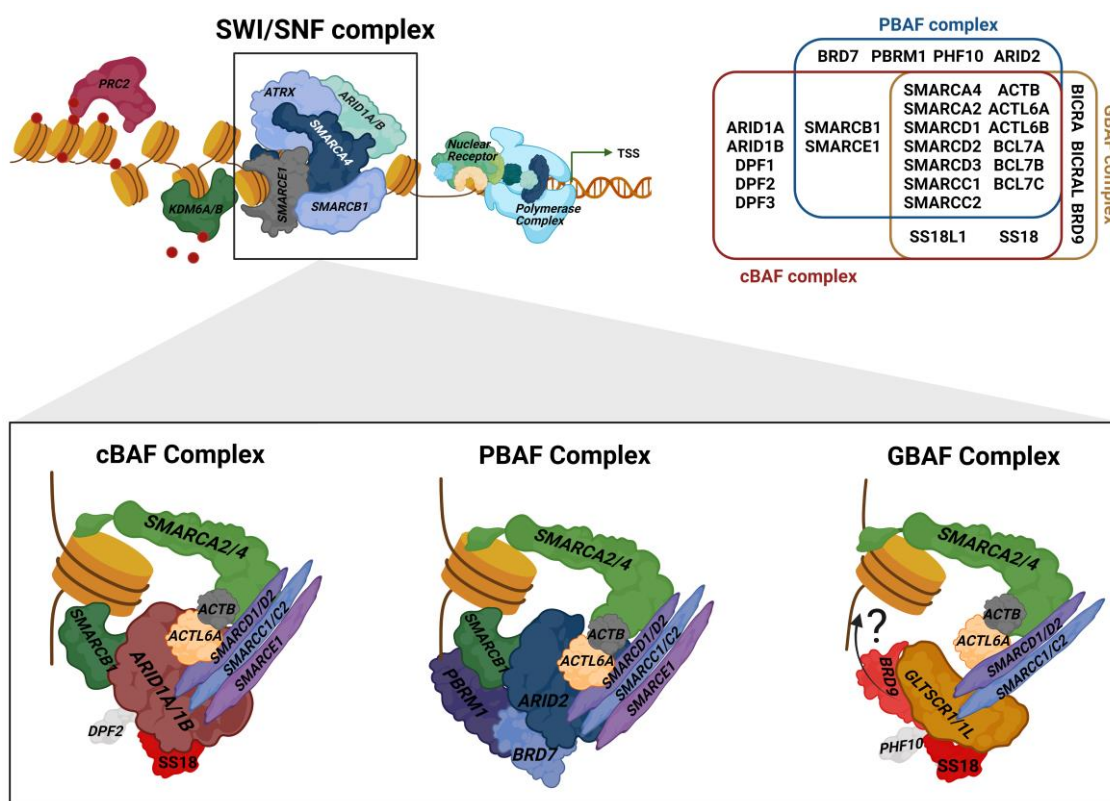


Figura 8. Organización y conformación de los complejos SWI/SNF en mamíferos. En la parte superior derecha de la figura se resumen y engloban las distintas subunidades de los complejos, según si son compartidas o específicas de cada uno de los tres subtipos: cBAF, PBAF, GBAF. En la parte inferior se representa la organización tridimensional y unión a los nucleosomas en pinza en forma de C de los complejos: el dominio ATPasa conformado por SMARCA4/2 interactúa con la parte superior de los nucleosomas; el módulo estructural, formado por SMARCB1, SMARCC, SMARCD, SMARCE1 en cBAF y PBAF, junto con subunidades específicas de cada complejo, interactúa con la parte inferior del nucleosoma cerrando la pinza de unión. En GBAF el complejo se asocia únicamente a SMARCC1, SMARCD1 y BRD9, que presenta un bromodominio de unión a histonas; el módulo regulador, conformado por las subunidades ACTB y ACTL6A, conecta el módulo ATPasa con el módulo estructural del complejo, siendo reforzado y estabilizado por la asociación de las subunidades ARID1 en cBAF, ARID2 en PBAF y GLTSCR1/L en GBAF. Esta figura ha sido creada con www.BioRender.com

1.5.2 Mecanismo supresor tumoral de SWI/SNF

Aunque las alteraciones en otros modificadores de la cromatina y reguladores epigenéticos son frecuentes en muchos tipos de cáncer, las mutaciones que afectan genes que codifican los distintos miembros de los complejos SWI/SNF están presentes

en más del 20% de todos los tumores humanos⁷⁹. Además, los cambios epigenéticos y las mutaciones en otras proteínas de interacción con el complejo, incrementan la frecuencia de desregulación de SWI/SNF en oncogénesis⁸⁰.

Hay un total de 29 genes que codifican las distintas subunidades de SWI/SNF, aunque no todos ellos están mutados en cáncer, siendo *ARID1A*, *PBRM1*, *SMARCB1*, *SMARCA4* y *ARID2* los que presentan mutaciones con una mayor frecuencia. Algunos de estos genes se han incorporado a los paneles de secuenciación para el diagnóstico de cáncer (Tabla 2). Las mutaciones de SWI/SNF se producen en una gran variedad de tumores malignos, incluyendo el cáncer de pulmón, de ovario, de endometrio, de vejiga, de estómago, de hígado, colorrectal, de páncreas, de mama y de boca^{79,81,82,83}. La mayoría de estas alteraciones genéticas son mutaciones que dan lugar a codones stop prematuros en la proteína o deleciones homocigotas que, en ambos casos, conllevan una falta de proteína. Tanto el tipo de alteraciones genéticas como el hecho de que éstas sean bialelicas permite definirlos como genes supresores tumorales en sentido estricto⁷⁰. Aunque con poca frecuencia, también se han identificado algunas mutaciones de cambio de aminoácido que se localizan, preferentemente, en dominios muy conservados, como es el caso del dominio ATPasa de *SMARCA4*⁸⁴.

La regulación transcripcional mediada por el complejo SWI/SNF recae también en el control de los enhancers y, por tanto, la ausencia de dicha regulación también contribuye al desarrollo tumoral⁸⁵. Así pues, en líneas celulares de tumores rabdoides que son deficientes para *SMARCB1*, se ha observado que la re-expresión ectópica de *SMARCB1* induce un incremento de la unión distal de las subunidades de SWI/SNF en sitios de inicio de la transcripción (TSS), así como un aumento de las marcas de histonas asociadas a enhancers activos: H3K27ac y H3K4me1⁸⁶. También se ha visto que la pérdida de *ARID1A* en líneas celulares de cáncer colorrectal promueve la disminución de la unión del complejo SWI/SNF a enhancers de activación relacionados con genes del desarrollo, contribuyendo de forma favorable a la oncogénesis⁸⁷. Por otro lado, se ha visto que la pérdida simultánea de *ARID1A* y *ARID1B* conduce a una disminución de la expresión de enhancers relacionados con factores de crecimiento u oncogenes como *MYC*⁸⁸.

Por otro lado, la desregulación en las interacciones físicas y funcionales del complejo con factores de transcripción oncogénicos como AP-1 y *MYC* promueve, también, el desarrollo del cáncer. La proteína oncogénica AP-1 se encuentra sobreexpresada en distintos tipos de cáncer y activa vías relacionadas con la proliferación y diferenciación

celular, migración y apoptosis a través de RAS/MAPK. AP-1 interacciona de forma directa con algunas subunidades del complejo SWI/SNF, como *SMARCB1* y *SMARCA4*, reclutándolos en sitios específicos de transcripción y dando lugar a la activación de programas oncogénicos⁸⁹. Otra interacción importante es la de SWI/SNF con la familia de oncogenes *MYC* (c-, N- y L-*MYC*), los cuales controlan la expresión de genes relacionados con el crecimiento tumoral, el metabolismo, microambiente tumoral, la angiogénesis y la capacidad de invasión y se encuentran sobreexpresados en más de la mitad de los tumores malignos. La sobreexpresión de este oncogén puede ser mediante la amplificación o translocación del gen, a través de la activación oncogénica de vías de señalización como RAS o NOTCH o mediante la pérdida de función de supresores tumorales como *SMARCB1*, el cual actúa inhibiendo la unión del complejo *MYC/MAX* al DNA^{90,91}. En neuroblastomas, se ha descrito una asociación genética entre la pérdida de función de *ARID1A* y la amplificación de *NMYC*⁹² y en cáncer de pulmón se ha visto que las mutaciones en *SMARCA4* son mutuamente excluyentes con la amplificación de los genes de la familia *MYC*, sugiriendo una relación funcional entre estas proteínas⁹³.

Junto con su papel en el control de la transcripción, el complejo SWI/SNF participa en programas de reparación del daño del DNA. Algunas de las subunidades del complejo, como *ARID1A*, *PBRM1* o *SMARCA4*, desempeñan funciones que van desde la modificación de la estructura de la cromatina alrededor de los sitios de daño del DNA hasta el reclutamiento directo de proteínas necesarias para iniciar el proceso de reparación de estos daños⁹⁴. De este modo, el complejo se muestra también esencial para el mantenimiento de la integridad del genoma, la desregulación del cual contribuye tanto de forma directa como indirecta al desarrollo del cáncer.

1.5.3 Mutaciones inactivadoras en las subunidades del complejo

Desde que se identificó por primera vez la inactivación bialélica de *SMARCB1* en tumores pediátricos malignos⁸¹ y, posteriormente en *SMARCA4* en cáncer de pulmón⁹⁵, mutaciones en genes que codifican para otras subunidades del complejo tales como *ARID1A*, *ARID1B*, *ARID2* o *PBRM1* se han relacionada con varios tipos de cánceres (Tabla 2)^{96,97}. Aunque estas son las subunidades mutadas con más frecuencia, otras subunidades como *SMARCC1/2*, *SMARD1/2/3*, *SMARCE1*, *ACTL6A/B* o *BRD7* también se encuentran alteradas en distintos tipos de tumores como el cáncer gástrico, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, carcinoma escamoso de cabeza y cuello y cáncer de mama, entre otros⁹⁸. En este trabajo nos vamos a centrar en detallar las mutaciones

en *SMARCA4* y *SMARCB1* debido a su alta frecuencia y su relación con la agresividad del tumor y también por su papel en el complejo e interacción directa con los nucleosomas.

Tabla 2. Mutaciones inactivadoras de las subunidades de SWI/SNF más frecuentemente alteradas en cáncer. Representación del tipo de cáncer y la frecuencia a la que se encuentran las mutaciones, en los genes indicados, que dan lugar a proteínas truncadas. Información extraída de Oike, T. *et al.* 2013 y Orlando, K. A., *et al.* 2019

Gen	Tipo de Cáncer	Frecuencia
SMARCA4/BRG1	Cáncer de pulmón de célula no pequeña	35%
	Carcinoma de ovario de célula pequeña de tipo hipercalcémico (SCCOHT)	<95%
	Sarcomas torácicos deficientes en SMARCA4	100%
	Meduloblastoma	100%
	Linfoma de Burkitt	4-13%
	Tumores rabdoides	<95%
SMARCB1/INI1	Sarcomas epiteliales	55-80%
	Carcinomas renales medulares	55-100%
	Carcinoma de ovario de células claras	50%
ARID1A/BAF250A	Cáncer de endometrio	40%
	Cáncer gástrico	19%
	Adenocarcinoma de pulmón	8%
	Carcinoma hepatocelular	11%
ARID1B/BAF250B	Melanoma	7%
	Carcinoma hepatocelular	6-18%
ARID2/BAF200	Melanoma	7-14%
	Carcinoma renal de célula clara	29-41%
PBRM1/BAF180	Cáncer de pulmón de célula no pequeña	3-5%

1.5.3.1 Deficiencia de *SMARCA4/BRG1*

El gen *SMARCA4* (o *BRG1*) se encuentra en la región cromosómica 19p13 y codifica para una enzima de 198kDa. Tal y como se ha comentado anteriormente, *SMARCA4* es una de las dos ATPasas que se encuentra en todos los complejos SWI/SNF de forma mutuamente excluyente con *SMARCA2*. A diferencia de *SMARCA4*, el gen *SMARCA2* no se encuentra mutado en cáncer, aunque sí que se observa epigenéticamente silenciado en distintos tumores^{99,100}. Las mutaciones en *SMARCA4* tienden a asociarse con un aumento de la presencia de PRC2 en la cromatina, hecho que induce cambios en H3K27me3 en los promotores de las islas CpG y que contribuyen de forma indirecta al desarrollo tumoral¹⁰¹.

Las mutaciones en *SMARCA4* fueron identificadas por primera vez por nuestro grupo, en el año 2008⁸³. En este trabajo se describió que, aproximadamente un 35% de cánceres de pulmón de célula no pequeña presentaba inactivación bialélica de este gen, lo que evidenciaba que *SMARCA4* constituía un gen supresor tumoral *bona fide*. Más adelante, el grupo identificó la presencia de mutaciones inactivadoras en *MAX* en el cáncer de pulmón de célula pequeña. *MAX* codifica para el partner obligatorio de *MYC* y, en el mismo trabajo, se evidenció cómo las alteraciones genéticas en los distintos miembros del complejo SWI/SNF, en la familia de oncogenes *MYC* y en *MAX* eran todos eventos mutuamente excluyentes sugiriendo, por lo tanto, una relación funcional entre estas dos familias de proteínas (Figura 9). A día de hoy la inactivación de *SMARCA4* en cáncer de pulmón es un hecho bien establecido y, en algunos estudios, se ha sugerido que puede tener un papel como biomarcador en el tratamiento con inmunoterapia¹⁰². Además de en cáncer de pulmón, *SMARCA4* se encuentra inactivado en otros tipos de cáncer (Tabla 2), dentro de los cuales destaca especialmente las mutaciones de *SMARCA4* asociadas al carcinoma de ovario de célula no pequeña de tipo hipercalcémico (SCCOHT). Este es un tipo de carcinoma de ovario muy agresivo que suele afectar a mujeres jóvenes y niñas (con una mediana edad de aparición alrededor de los 25 años) mostrando índices de supervivencia a largo plazo menores del 30% en estadios tempranos del diagnóstico. A día de hoy no existen terapias efectivas para el tratamiento de los tumores con mutaciones en *SMARCA4*¹⁰³.

Desde el descubrimiento de la potente capacidad antitumoral de los inhibidores epigenéticos de las DNA metiltransferasas (como, por ejemplo, el 5-azacitidina/AZA) y las histonas deacetilasas (como el Vorinostat/SAHA), este campo ha tenido grandes avances y se ha convertido en un atractivo especial para el desarrollo de nuevos fármacos¹⁰⁴. Actualmente, algunos de estos inhibidores están aprobados y siendo aplicados para el tratamiento de ciertos tipos de neoplasias hematológicas^{105,106}. Además, en los últimos años, se han llevado a cabo distintos ensayos clínicos con estos fármacos para el tratamiento del cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) y, aunque en general no se observaron grandes respuestas significativas, se evidenció la estabilización de la enfermedad en un subgrupo de pacientes^{107,108}.

Trabajos derivados de nuestro grupo también evidenciaron que las mutaciones en *SMARCA4* se asociaban a perfiles de expresión de célula stem y que la restitución del gen salvaje incrementaba los niveles de marcadores relacionados con diferenciación^{83,109}. Coherentemente con estas observaciones, las células de cáncer de pulmón que presentaban mutaciones inactivadoras en *SMARCA4* eran refractarias a la

acción de corticoides y retinoides¹⁰⁹ y a la acción del inhibidor de HDACs, SAHA¹¹⁰. En este trabajo también se observó que, a diferencia de las células con inactivación en *SMARCA4*, las células de cáncer de pulmón con activación genética de *MYC* sí que respondían a la administración de retinoides y corticoides y de SAHA, disminuyendo el crecimiento celular. En estas células, la administración combinada de corticoides/retinoides y SAHA tenía un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento¹¹⁰.

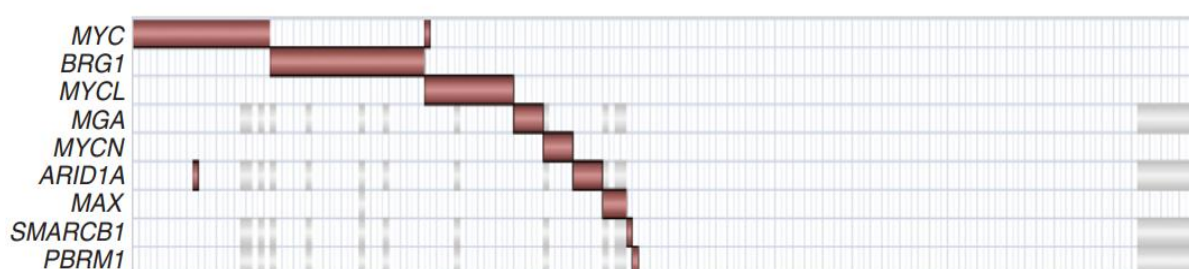


Figura 9. Perfil mutacional de *SMARCA4/BRG1* en cáncer de pulmón. Representación esquemática de las alteraciones co-ocurrentes en los genes indicados en un panel de 180 líneas de cáncer de pulmón. Los datos fueron obtenidos de los resultados de previos estudios y bases de datos públicas (<http://cancer.sanger.ac.uk/> and <http://www.broadinstitute.org/ccle/>). Los cuadrados rojos y blancos indican la presencia y ausencia de alteraciones, respectivamente. Los cuadrados grises indican la falta de datos. Figura extraída y modificada de Romero O.A, *et al.* 2014.

1.5.3.2 Inactivación de *SMARCB1/INI1*

SMARCB1 se encuentra en la región cromosómica 22q11.2 y codifica para una proteína de 47kDa conocida como INI1 o SNF5. *SMARCB1* es un gen supresor tumoral y miembro nuclear de los complejos BAF y PBAF, siendo esencial para la funcionalidad de estos complejos. En 1998, con la identificación de las mutaciones en *SMARCB1* en <95% de tumores rabdoide (RT), se evidenció, por primera vez, la relación del complejo SWI/SNF con el cáncer¹¹¹. Los RT son un tipo tumoral pediátrico muy agresivo, de mal pronóstico y con muy pocas o casi nulas oportunidades terapéuticas que se clasifican según la localización anatómica del tumor. Los RT se clasifican en: tumores rabdoide atípicos (AT/RT) si se localizan en el sistema nervioso central y tumores rabdoide malignos (MRT) si se localizan en tejidos fuera del sistema nervioso, como por ejemplo el riñón. A nivel mutacional, estos tipos de tumores suelen ser muy simples, teniendo la mutación germinal o somática de *SMARCB1* como único evento genético y conductor¹¹². Las mutaciones germinales de *SMARCB1* se engloban en el síndrome de predisposición a tumores rabdoide de tipo 1 (RTPS1) y suelen afectar a niños menores de 3 años. La pérdida de expresión somática de *SMARCB1* también impulsa el desarrollo de otros

tumores agresivos en niños y adultos jóvenes, como el sarcoma de células claras, tumores epitelioides malignos de la vaina del nervio periférico, carcinoma mioepitelial, carcinoma medular renal y condroma poco diferenciado, entre otros⁸⁶.

Mecanísticamente, la pérdida de *SMARCB1* afecta a la integridad del complejo SWI/SNF y su disociación de la cromatina, debido a su interacción directa con los nucleosomas. En consecuencia, se generan complejos BAF residuales que son incapaces de competir con PRC2, dando lugar a un incremento de H3K27me3, especialmente en locus de supresores tumorales como *CDKN2A*, impulsando así la oncogénesis de los RT¹¹³. Además, se ha descrito que *SMARCB1* podría tener un papel en la estabilización de p53, a través de la regulación de MDM2¹¹⁴. También se ha observado que *SMARCB1* regula la transcripción mediada por el oncogén MYC, permitiendo que MYC se una sin impedimentos a la cromatina para promover programas de expresión génica oncogénicos¹¹⁵. Además, en estos tumores, se muestra una dramática activación de la vía MYC-p19ARF-p53, con un incremento de mal plegamiento de proteínas y de respuesta a estrés celular, promoviendo la autofagia¹¹⁶.

1.5.4 Letalidades sintéticas y aproximaciones terapéuticas en tumores deficientes en miembros del complejo SWI/SNF

Una de las estrategias con más proyección para el tratamiento de los tumores con deficiencia en el complejo SWI/SNF, es la explotación de la letalidad sintética. Aplicada a las terapias oncológicas, la letalidad sintética resulta cuando mutaciones en determinados genes no son letales cuando se producen de forma individual pero sí cuando éstas se combinan en una misma célula¹¹⁷. La primera letalidad sintética que se describió relacionada con la inactivación de *SMARCA4* fue la existente entre las dos ATPasas del complejo, *SMARCA4* y *SMARCA2*. En este caso, la depleción de *SMARCA2* en células deficiente para *SMARCA4* induce parada del ciclo celular y senescencia¹¹⁸. Otra letalidad sintética entre parálogos es la existente entre *ARID1A* y *ARID1B*, ya que se ha observado que esta última subunidad es necesaria para la supervivencia de los tumores deficientes en *ARID1A*¹¹⁹. En este contexto, también se ha descrito que los tumores rabdoides malignos deficientes en *SMARCB1*, así como los sarcomas sinoviales con fusión en *SS18-SSX*, son vulnerables a la inhibición de BRD9¹²⁰. Además, en los últimos estudios de cribado genético realizados a gran escala, se han descrito más interacciones letales sintéticas entre otras subunidades del complejo, incluyendo *SMARCC1/SMARCC2*, *SMARCA4/ACTB* y *SMARCA4/ARID2*¹²¹.

Debido al antagonismo epigenético entre los complejos SWI/SNF y PRC2, otra letalidad existente es la de la inhibición de EZH2 en los cánceres con mutación en *ARID1A*, ya sea farmacológicamente con GSK126 o usando short hairpins (sh)RNA¹²². Esta letalidad sintética también se ha descrito en tumores rabdoides malignos deficientes para *SMARCB1*¹²³. Recientemente, se ha aprobado un inhibidor de EZH2, tazemetostat, para el tratamiento de cánceres adultos como el linfoma difuso de células B grandes o tumores sólidos mutantes para *SMARCB1* o *SMARCA4* y tumores pediátricos como los tumores rabdoides malignos, sarcoma sinovial, sarcomas epitelioides u otros cánceres que presenten mutaciones en *SMARCB1*, *SMARCA4* o *EZH2*. Siendo, de ese modo, el primer tratamiento basado en un mecanismo dirigido contra una mutación específica del complejo SWI/SNF⁷⁰.

Se han descrito, también, otras vulnerabilidades de los tumores deficientes para SWI/SNF con proteínas de su interactoma, incluidas proteínas quinasas implicadas en el control del ciclo celular o la reparación de daños en el DNA. En este contexto, se ha descrito que la inhibición de CDK4/CDK6 provoca letalidad sintética en líneas celulares de cáncer de pulmón y de SCCOHT, deficientes para *SMARCA4*^{124,125}.

Debido a las letalidades sintéticas descritas, la utilización de pequeñas moléculas inhibitoras de estas proteínas se presenta como una prometedora terapia para los tumores con deficiencia en los complejos SWI/SNF (Tabla 3). Básicamente el desarrollo de estas moléculas se ha centrado en los dominios ATPasas y bromodominios, como los que presentan *SMARCA2/4*, así como otras subunidades con bromodominios como BRD7, BRD9 y PBRM1.

El primer inhibidor de bromodominios que se diseñó fue PFI-3 contra los bromodominios de *SMARCA4* y *SMARCA2*¹²⁶. En este contexto, aunque la depleción de la expresión de *SMARCA2* usando shRNA o compuestos como degron, provoca letalidad sintética en células deficientes para *SMARCA4*^{118,127}, la utilización de PFI-3 es inefectiva en cuanto a la inhibición del crecimiento celular en estas células⁹⁴. Interesantemente, en estudios posteriores se demostró que el mantenimiento del crecimiento y la supervivencia celular en las líneas *SMARCA4* deficientes, es dependiente del dominio ATPasa de *SMARCA2*, no del bromodominio¹²⁸. Más tarde, con la utilización de un inhibidor PROTAC, ACBI1, el cual se une al bromodominio de *SMARCA2* y *SMARCA4*, induciendo su degradación a través del reclutamiento de la ligasa VHL E3, sí que se fue capaz de inhibir el crecimiento induciendo la muerte celular de las líneas tumorales¹²⁹. En los últimos años, se han desarrollado inhibidores de la actividad ATPasa de *SMARCA2* y *SMARCA4*, que han demostrado tener una gran capacidad de supresión tumoral en líneas celulares, pero su actividad antitumoral en modelos animales fue mínima¹³⁰.

A pesar de que los estudios realizados hasta el momento han sido muy útiles para identificar las vulnerabilidades del complejo SWI/SNF, todavía se necesita una comprensión más detallada de sus interacciones y su implicación en el desarrollo del cáncer, así como la identificación de nuevos tratamientos que aborden la amplia variedad de cánceres asociados con este complejo.

Tabla 3. Letalidades sintéticas de las distintas subunidades de los complejos SWI/SNF y aproximaciones terapéuticas a su tratamiento. #Tratamiento aprobado por la FDA, aunque no sea específico para este tipo de mutaciones *Tratamiento aprobado clínicamente, aunque no sea específico para este tipo de mutaciones. Información extraída de Wanior, M. *et al.* 2021.

Mutación en SWI/SNF	Letalidad sintética	Inhibidores
SMARCA4	SMARCA2	PFI-3, ACBI1
	CDK4/6	Pablociclib [#] , Abemaciclib [#] , Ribociclib [#]
	EZH2	Tazemetostat [*]
	ARID2	n/a
ARID1A	ARID1B	n/a
	EZH2	GSK126 [*]
	HDAC6	Ricolinostat [*] (ACY-1215)
SMARCC1	SMARCC2	n/a
SMARCA2	SMARCA4	dBRD9
PBRM1	EZH2	GSK126 [*]
ARID2	SMARCA4	n/a
SMARCB1	EZH2	Tazemetostat [*]
	HDAC	Panborinostat [#]
SS18-SSX	BRD9	dBRD9

1.6 Inhibidores epigenéticos como posibles terapias anticancerígenas

Tal y como se ha detallado en este estudio, la desregulación epigenética es un evento característico y común en la mayoría de los tumores, viéndose afectada de forma directa la maquinaria epigenética. Además, las enzimas involucradas en las modificaciones epigenéticas son altamente atractivas para su inhibición debido a la reversibilidad de sus modificaciones. Es por eso por lo que en los últimos años se han ido desarrollando nuevas generaciones de fármacos dirigidos a modificadores epigenéticos, ya sean tanto readers, writers como erasers, y algunos de ellos incluso han entrado en fase de ensayos clínicos¹³¹. Entre los moduladores epigenéticos de primera generación aprobados para uso clínico, se incluyen los inhibidores no selectivos de las DNA metiltransferasas (DNMTi) y las histonas deacetilasas (HDACi), que se utilizan en el tratamiento del síndrome mielodisplásico (SMD) y el linfoma cutáneo de células T,

respectivamente. No obstante, estos fármacos han mostrado tener una eficacia limitada en tumores sólidos y, debido en parte a su toxicidad, su combinación sigue siendo un gran desafío¹³².

a) Inhibidores de HDACs

Los inhibidores de las histonas deacetilasas conforman un gran grupo de fármacos epigenéticos que se están utilizando en un amplio conjunto de enfermedades, incluyendo el tratamiento del cáncer. Estos inhibidores se pueden diferenciar según si actúan de forma específica contra un tipo de HDAC o si actúan de forma general sobre estas ellas (pan-inhibidores), y se clasifican en función de su naturaleza química. Los HDACi con grupos hidroximatos, como el SAHA o vorinostat, panbortinostat o belinostat, pueden bloquear todas las HDACs. Los inhibidores con ácidos grasos de cadena corta, como el ácido valproico (VPA) y el butirato, son específicos de las HDAC de clase I y IIa. MS 275 (entinostat), FK228 (romidepsina) pertenecen al grupo de las benzamidas y se utilizan para inhibir las HDAC de clase I. Los tetrapéptidos cíclicos como la trapoxina (TPX) inhiben algunas HDAC de clase I, IIa y IV¹⁰⁴.

Algunos de estos inhibidores han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de distintos tumores, como por ejemplo el SAHA/Vorinostat para el tratamiento de linfoma de células T¹³³.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el trabajo previo de nuestro laboratorio mostró que el SAHA, un pan-inhibidor que bloquea la actividad HDAC de clase I y II de forma inespecífica, uniéndose al átomo de zinc de la cavidad catalítica¹⁰⁴ (Figura 10), mostró capacidad de inhibir el crecimiento en las células tumorales con activación genética de MYC¹¹⁰.

b) Inhibidores de EZH2

En los últimos años, se han desarrollado un gran número de inhibidores de EZH2 (EZH2i), muchos de los cuales han entrado en fase de ensayos clínicos, ya que ofrecen un gran potencial para el tratamiento del cáncer, entre otras enfermedades. En este contexto se incluyen los inhibidores GSK-126, CPI-1205, PF-06821497, SHR2554 y tazemetostat, siendo este último uno de los pocos inhibidores epigenéticos aprobados para su uso en la clínica¹³⁴.

Debido a la actividad metiltransferasa de EZH2, muchos EZH2i se basan en la competición directa con el donador de grupos metilo SAM, uniéndose al dominio de unión de la enzima EZH2 y disminuyendo, así, la actividad metiltransferasa. Uno de

estos compuestos es el GSK-126, un competidor de SAM que afecta la actividad catalítica de EZH2, disminuyendo los niveles globales de H3K27me3, pero sin influenciar a los niveles de proteína de EZH2¹³⁵ (Figura 10).

En 2014, GSK-126 entró en fase clínica para el tratamiento de distintos tumores sólidos y hematológicos, pero se obtuvo una respuesta antitumoral parcial, observándose en algunos casos un incremento en la progresión de la enfermedad, hecho que hizo que quedara descartado para su uso clínico¹³⁶.

c) Inhibidores de KDM6A/B

El año 2012 se descubrió GSK-J1, el primer inhibidor selectivo de las histonas demetilasas con dominio Jumonji, donde se observó que el compuesto inhibe principalmente KDM6B, y también KDM6A, aunque con una menor actividad. Posteriormente se demostró que GSK-J1 también tiene inhibe las KDM5, en particular KDM5B y KDM5C, pero entre 5 y 10 veces menos que las KDM6s¹³⁷.

GSK-J1 se une de forma competitiva a los dos cofactores necesarios para llevar a cabo la actividad enzimática de KDM6: 2OG y Fe (II). Aun siendo un potente inhibidor, GSK-J1 presenta un grupo carboxilato altamente polar que restringe su capacidad de permeabilización a través de las membranas celulares, hecho que no le permite alcanzar concentraciones intracelulares relevantes a nivel farmacológico. En este contexto, se diseñó GSK-J4, al cual se le disminuyó la polaridad añadiendo un grupo etilo éster al fármaco, dándole permeabilidad de membrana, junto con una capacidad inhibitoria farmacológicamente significativa¹³⁸ (Figura 10). Recientemente, se ha desarrollado un nuevo inhibidor de las KDM6s, KDOBA67, análogo de GSK-J4 y con la misma actividad funcional¹³⁹.

La actividad antitumoral de la inhibición de KDM6A y KDM6B con GSK-J4 se ha probado en distintos tipos de tumores. Se ha visto que la inhibición de KDM6A/B con GSKJ4 en leucemias mieloides agudas con elevados niveles de H3K27me3, atenúa la proliferación celular¹⁴⁰. En cáncer colorrectal, donde la expresión de KDM6A/B correlaciona negativamente con la supervivencia de los pacientes, GSK-J4 se ha visto que disminuye la hiperproliferación y la resistencia a la apoptosis de las células tumorales, así como la transformación maligna de las células madre intestinales¹⁴¹. Además de su actividad antitumoral directa, GSK-J4 aumenta la sensibilidad de estas células tumorales a la quimioterapia¹⁴².

Se ha descrito que GSK-J4 media, también, la inflamación en distintas enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide y la osteoartritis. La inhibición de las KDM6s

en artritis reumatoide promueve la inhibición de citoquinas proinflamatorias como TNF α y IFN γ , amortiguando la respuesta inflamatoria a esta enfermedad¹⁴³. En osteoarthritis, la inhibición de KDM6 atenúa la inflamación y la pérdida de cartílago, inhibiendo la respuesta a IL-1 β y TGF β 1¹⁴⁴. GSK-J4 ha demostrado tener una capacidad antitumoral y antiinflamatoria ampliamente descrita, aun así, este fármaco aún no ha sido aprobado para estudios clínicos.

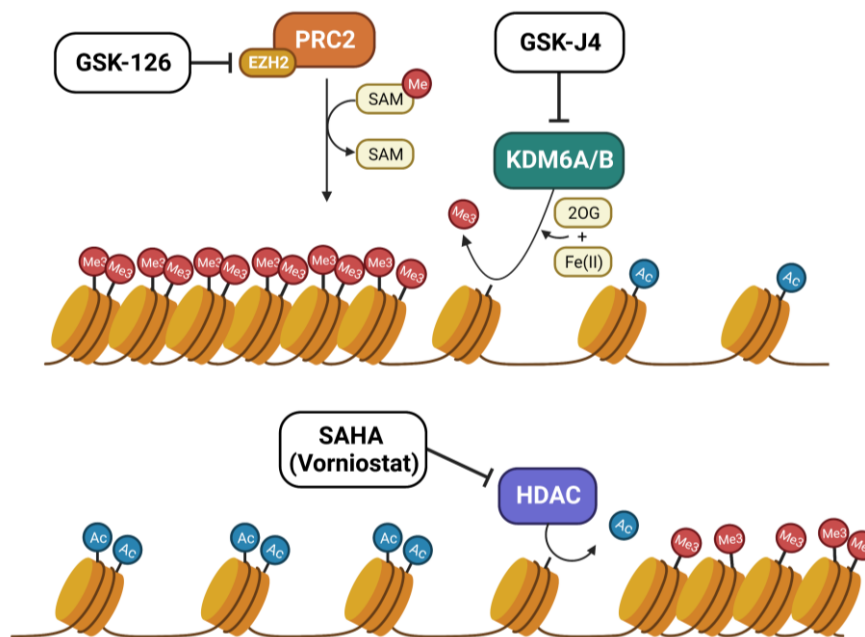


Figura 10. Dianas de inhibición de los distintos fármacos usados. GSK-126 inhibe la actividad catalítica de EZH2 a través de la competición directa con SAM. GSK-J4 se une de forma competitiva a 2OG y Fe (II), inhibiendo la actividad de KDM6A/B. SAHA se une al dominio catalítico de las HDAC de forma inespecífica, actuando como pan-inhibidor. Esta figura ha sido creada con www.BioRender.com

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En los últimos años, los estudios de secuenciación masiva del genoma del cáncer han revelado una prevalencia sorprendentemente alta de mutaciones en genes que codifican elementos reguladores de la cromatina. Algunas de las subunidades que conforman el núcleo del complejo, como *SMARCB1* y *SMARCA4*, se encuentran frecuentemente alteradas en distintos tipos de cánceres, algunos de los cuales con muy pocas oportunidades terapéuticas o incluso nulas.

Como se ha comentado en la introducción, nuestro grupo describió un posible efecto terapéutico del ácido retinoico (AR) y los glucocorticoides (GC), solos o en combinación con AZA y SAHA, en células de cáncer de pulmón con amplificación de *MYC*, pero no en células con mutaciones en *SMARCA4*. En base a ello, se plantea la hipótesis de que, a pesar de que la activación de la vía *MYC* y de *SWI/SNF* están funcionalmente relacionadas, la respuesta de la célula tumoral a la administración de distintos fármacos epigenéticos no es la misma.

Así pues, el objetivo general de la presente tesis doctoral es profundizar en la comprensión de los mecanismos biológicos que subyacen a las distintas respuestas a fármacos epigenéticos observadas en las células con activación de *MYC* o inactivación del complejo *SWI/SNF* y trabajar en la implementación de nuevos fármacos epigenéticos para el tratamiento de éstos tumores.

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Identificar los factores que subyacen a la refractoriedad de las células tumorales con inactivación en *SMARCA4* al SAHA.
2. Identificación de inhibidores epigenéticos que puedan ser utilizados para inhibir en crecimiento en un contexto de inactivación de miembros del complejo *SWI/SNF*.
3. Estudio de la relación funcional entre otros modificadores epigenéticos (e.j. histonas demetilasas, histonas metiltransferasas, histonas acetilasas, histonas desacetilasas, y miembros de interés del complejo *SWI/SNF* en cáncer.
4. Validación de las observaciones trasladando los resultados de líneas celulares de cáncer a modelos murinos.

METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1 Líneas celulares

3.1.1 Líneas comerciales tumorales

La mayoría de las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, UK), RIKEN Cell Bank (Tokyo, Japón) y de Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Todas fueron cultivadas bajo las condiciones recomendadas con suplementos de penicilina-estreptomicina al 1% y suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Tabla 4). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂/95% aire. Para el sub-cultivo celular, las células adherentes con crecimiento en monocapa fueron desprendidas de la superficie utilizando una solución de tripsina-EDTA; en el caso de las células con crecimiento en suspensión, fue transferido el 20% del cultivo a un nuevo matraz y se añadió medio nuevo. Todas las líneas celulares fueron autenticadas mediante el genotipado de *TP53* y otras mutaciones específicas que coincidían con los que figuraban en las bases de datos públicas. Todas las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron negativas para la prueba de infección a micoplasma.

3.1.2 Cultivos primarios derivados de tumores de pacientes (PDCs)

En este estudio se han usado, también, cultivos primarios derivados de líquidos pleurales de pacientes (PDC)¹⁴⁵, así como también líneas primarias de cáncer derivadas de ortoxenoinjertos/PDOX generados en ratones *nude* a partir de tumores primarios de pacientes (Tabla 4).

El cultivo de PDC se estableció a partir del derrame pleural maligno, extraído mediante toracentesis, de paciente con adenocarcinoma de pulmón metastático procedente del Instituto Catalán de Oncología. Tras la centrifugación, se aislaron las células tumorales y se cultivaron en medio ACL-4 modificado, con RPMI-1640 como medio base (GIBCO), suplementado con un 5% de suero fetal bovino y mantenido en condiciones de cultivo estándar (37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂/95%). Las células tumorales se sub-cultivaron una o dos veces por semana. Las células se sometieron a controles rutinarios de contaminación por micoplasma¹⁴⁵.

Los cultivos celulares OVA250L y OVA259L se derivaron de tumores primarios de dos pacientes con SCCOHT del Hospital de Bellvitge y el Instituto Catalán de Oncología

(ICO). Los cultivos primarios T692L y T744L se derivaron del tumor primario y metástasis, respectivamente, de una paciente pediátrica del Hospital Vall Hebrón con diagnóstico de AT/RT y posterior metástasis pulmonar. Los ortoxenoinjertos/PDOX crecidos en los ratones se recogieron después que los ratones fueran sacrificados en el pase #1. Los tumores se diseccionaron con bisturís estériles y las células se transfirieron a placas de cultivo celular con DMEM suplementado al 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina como condiciones de cultivo estándar. Cuando se observaron colonias celulares con morfología de célula epitelial, se disgregaron mediante el uso de tripsina y expandieron las células. Todas las líneas celulares primarias se consideraron establecidas tras más de 10 pases *in vitro*. Las células se sometieron a controles rutinarios de contaminación por micoplasma. Respecto al manejo ético de las muestras derivadas de pacientes, se obtuvo el consentimiento informado específico de todos los pacientes para la implantación tumoral en ratones, y los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del IDIBELL (nº AAALAC-1155).

Tabla 4. Líneas celulares tumorales usadas. Adherente (Adh.); Suspensión (Susp.); Mutante (Mut.); Amplificado (Amp.); No interés (-)

Línea celular	Fuente	Tejido	Tipo	Alteraciones de interés	Crecimiento	Medio de cultivo
A204	ATCC	Músculo	RMS	<i>SMARCB1</i> Mut.	Adh.	DMEM+10%FBS
A427	ATCC	Pulmón	LCC	<i>SMARCA4</i> Mut.	Adh.	RPMI+10%FBS
CAMA-1	ATCC	Mama	ADC	<i>BRD7</i> Mut.	Adh.	DMEM+10%FBS
DMS114	ATCC	Pulmón	SCLC	<i>SMARCA4</i> Mut.	Mixta	Waymouth's MB+10%FBS
DMS273	ECACC	Pulmón	SCLC	<i>MYC</i> Amp.	Mixta	Waymouth's MB+10%FBS
G401	ATCC	Riñón	RT	<i>SMARCB1</i> Mut.	Mixta	McCoy's 5A+10%FBS
HCC1143	ATCC	Mama	Ca	<i>PBRM1</i> Mut.	Adh.	RPMI+10%FBS
HDMYZ	DMSZ	Líquido pleural	Linfoma Hodgkin	<i>SMARCE1</i> Mut.	Adh.	RPMI+10%FBS
HEK 293T	ATCC	Riñón	Epitelio	<i>WT</i>	Adh.	DMEM+10%FBS
KYSE70	ECACC	Esófago	SCC	<i>ARID1A</i> Mut.	Adh.	RPMI+10% FBS
MDAMB231	ATCC	Mama	ADC	<i>ARID1B</i> Mut.	Adh.	RPMI+10% FBS
NCI-H128	ATCC	Pulmón	LCC	<i>KDM6A</i> Mut.	Susp.	RPMI+10% FBS
NCI-H1299	ATCC	Pulmón	LCC	<i>SMARCA4</i> Mut.	Adh.	RPMI+10%FBS
NCI-H1395	ATCC	Pulmón	LuAD	<i>ARID1B</i> Mut.	Adh.	RPMI+10% FBS
NCI-H157	ATCC	Pulmón	SCC	<i>SMARCA4</i> Mut.	Adh.	RPMI+10%FBS
NCI-H1963	ATCC	Pulmón	SCLC	<i>MYC</i> Amp.	Susp.	RPMI+10% FBS
NCI-H1975	ATCC	Pulmón	LuAD	<i>MYC</i> Amp.	Adh.	RPMI+10%FBS
NCI-H2170	ATCC	Pulmón	SCC	<i>MYC</i> Amp.	Adh.	RPMI+10%FBS

NCI-H2172	ATCC	Pulmón	NSCLC	<i>ARID1A</i> Mut.	Adh.	RPMI+10% FBS
NCI-H2228	ATCC	Pulmón	LuAD	<i>MYC</i> Amp	Adh.	RPMI+10% FBS
NCI-H23	ATCC	Pulmón	LuAD	<i>SMARCA4</i> Mut.	Adh.	RPMI+10%FBS
NCI-H266	ATCC	Pulmón	SCC/Mesotelioma	<i>PBRM1</i> Mut.	Adh.	RPMI+10% FBS
NCI-H441	ATCC	Pulmón	LuAD	<i>ARID2</i> Mut.	Adh.	RPMI+10% FBS
NCI-H446	ATCC	Pulmón	SCLC	<i>MYC</i> Amp.	Adh.	RPMI+10%FBS
NCI-H460	ATCC	Pulmón	LCC	<i>MYC</i> Amp.	Adh.	RPMI+10%FBS
NCI-H69	ATCC	Pulmón	SCLC	<i>MYC</i> Amp.	Susp.	RPMI+10%FBS
NCI-H727	ATCC	Bronquio	Ca	<i>SMARCC2</i> Mut.	Adh.	RPMI+10%FBS
NCI-H82	ATCC	Pulmón	SCLC	<i>MYC</i> Amp	Susp.	RPMI+10%FBS
NCI-H841	ATCC	Pulmón	SCLC	<i>SMARCA4</i> Mut.	Mixta	DMEM/F12+HITES +5%FBS
NUGC3	RIKEN	Estómago	ADC	<i>ARID2</i> Mut.	Adh.	RPMI+10% FBS
OVA250L	PDC	Ovario	SCCOHT	<i>SMARCA4</i> Mut.	Adh.	DMEM+10%FBS
OVA259L	PDC	Ovario	SCCOHT	<i>SMARCA4</i> Mut.	Adh.	DMEM+10%FBS
OVCAR-8	DMSZ	Ovario	AC	<i>MYC</i> Amp	Adh.	DMEM+10%FBS
PDC11	PDC	Líquido pleural	LuAD	<i>ARID1A</i> Mut.	Adh.	RPMI+ACL4 +5%FBS
PDC17	PDC	Líquido pleural	LuAD	<i>BRD9</i> Mut.	Adh.	RPMI+ACL4 +5%FBS
SKOV3	ATCC	Ovario	ADC	<i>SMARCC1</i> Mut.	Adh.	McCoy's 5A+10%FBS
SNU423	ATCC	Hígado	Ca	<i>ARID1A</i> Mut.	Adh.	RPMI+10% FBS
SNU5	ATCC	Estómago	Ca	<i>ARID1A</i> Mut.	Susp.	RPMI+10%FBS
SW1573	ATCC	Pulmón	LuAD	<i>SMARCB1</i> Mut.	Adh.	RPMI+10%FBS
T47D	ATCC	Mama	Ca ductal	<i>ARID1A</i> Mut.	Adh.	RPMI+10% FBS
T692L	PDC	Tejido Blando	AT/RT	<i>SMARCB1</i> Mut.	Adh.	DMEM+10%FBS
T744L	PDC	Pulmón	AT/RT	<i>SMARCB1</i> Mut.	Susp.	DMEM+10%FBS
U266B1	ATCC	Sangre periférica	Mieloma	<i>BRD7</i> Mut.	Susp.	RPMI+15% FBS

3.2 Clonaje e infección de los genes de interés

3.2.1 Vectores de expresión

Para el clonaje de los genes de interés se partió del cDNA de la isoforma más frecuentemente expresada en el tejido de estudio, o directamente del DNA genómico, tal y como se explica detalladamente a continuación para cada constructo. Una vez generados los distintos constructos, se transformaron en bacterias competentes DH5 α , las cuales se cultivaron en placas de agar con LB (Caldo de Lisogenia), suplementadas con 100 μ g/ml de ampicilina. Se aislaron las colonias resistentes y los plásmidos fueron purificados mediante el kit de purificación de plásmidos de DNA NucleoSpin (Machinary-

Nagel, Düren, Alemania). Finalmente, los vectores de expresión se secuenciaron mediante Sanger, tal y como se describe en el apartado 3.6.2, para confirmar la presencia de la secuencia completa y *wild type* de los genes clonados. Se usó Mutation surveyor v3.25 (SoftGenetics) como software para analizar dichas secuencias y descartar posibles alteraciones genéticas.

a) *SMARCA4*

Para el clonaje de *SMARCA4* se usaron dos constructos inducibles, generados previamente en nuestro laboratorio¹⁰⁹, uno que expresa la forma *wild type* del gen (*SMARCA4wt*), y otro que presenta una mutación (668-758Δ) en el dominio ATPasa (*SMARCA4mut*). Este modelo se basa en el sistema de expresión inducible por doxiciclina TET-ON, fundamentado por los elementos reguladores que controlan la actividad del operón de resistencia a la tetraciclina en bacterias (TET Operator). En condiciones normales, el constructo está reprimido por la proteína TET que se une a TET Operator (TET OFF). En presencia de doxiciclina, la proteína TET es reclutada, permitiendo la activación de la expresión génica (TET ON).

b) *KDM6A*

Para el clonaje de *KDM6A* (NM_021140.4), el cDNA del gen fue amplificado mediante PCR, a partir de RNA humano previamente retrotranscrito, usando la polimerasa de DNA *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y siguiendo el protocolo estándar. El cDNA amplificado fue clonado dentro del vector pLVX-IRES-ZSGreen (Clontech), entre los sitios de restricción de las endonucleasas XhoI y NotI, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sitios de restricción (5'-XhoI y 3'-NotI) fueron previamente añadidos a las secuencias flanqueadoras de los cebadores de amplificación de *KDM6A* (Tabla 5), con la finalidad de poder insertar el fragmento amplificado en el vector usando ligasa de DNA T4 (BioLabs® Inc), siguiendo el protocolo del fabricante.

c) *KDM6B*

Para el clonaje de *KDM6B*, se amplificó la región codificante del gen al completo (ENSG00000132510.10) mediante PCR de DNA genómico humano, usando la DNA Polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y siguiendo el protocolo estándar. Debido a su gran tamaño, el fragmento fue clonado en el vector pCDNA4/TO (Invitrogen), entre los sitios de restricción de las endonucleasas KpnI y XhoI. Del mismo modo que en el clonaje de *KDM6A*, los sitios de restricción (5'-KpnI y 3'-XhoI) fueron añadidos en las secuencias flanqueadoras de los cebadores de

amplificación de *KDM6B* (Tabla 5), con la finalidad de poder insertar el fragmento amplificado en el vector de interés usando, también, la ligasa de DNA T4 (BioLabs® Inc), siguiendo el protocolo establecido.

c) *SMARCB1*

El cDNA de *SMARCB1* (NM_001362877.2) fue amplificado a partir de RNA humano previamente retrotranscrito, usando la polimerasa de DNA *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y usando los cebadores de amplificación para insertar los sitios de restricción (5'-XhoI y 3'-BamHI) (Tabla 5). El fragmento fue clonado en el vector pLVX-Puro (Clontech), entre los sitios de restricción de las endonucleasas XhoI y BamHI, usando la ligasa de DNA T4 (BioLabs® Inc) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 5. Cebadores usados para el clonaje de *KDM6A*, *KDM6B* y *SMARCB1*.

Nombre	Secuencia 5'-3'
KDM6A-XhoI-F	AAAAAACTCGAGCCGCCACCATGAAATCCTGCGGAGTGTCGCTCGCTAC
KDM6A-NotI-R	AAAAAAGCGGCCGCTCAAGATGAGGCGGATGGTAATGGAGGAGCTAATG
KDM6B-KpnI-F	TTTTTTTGGTACCGCCGCCACCATGCATCGGGCAGTGGACCCTCCAG
KDM6B-XhoI-R	TTTTTTTCTCGAGTCATCGCGACGTGCTGGCTGGGG
SMARCB1-XhoI-F	AAAAAACTCGAGCCGCCACCATGATGATGATGGCGCTGAGCAAGACC
SMARCB1-BamHI-R	AAAAAAAGGATCCTTACCAGGCCGGGGCCGTGTTG

3.2.2 Generación de virus e infección de líneas celulares

Las partículas víricas fueron generadas a partir de la transfección transitoria de las células HEK293T. El día antes de la transfección, se sembraron las células en placas de petri de 100mm, en sus condiciones óptimas de cultivo, con la finalidad de obtener una confluencia cercana al 80% en el momento de la transfección. Los constructos de expresión (10µg) se combinaron con los vectores víricos pMD2.G (4µg) y psPAX2 (6µg) (Addgene, Cambridge, MA, USA) en Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y se añadieron a las células, junto con Lipofectamina LTX y el reactivo Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. A las 6 horas, se cambió el medio del cultivo por DMEM con 10% de FBS y 2 días más tarde se recogió y se filtró el sobrenadante vírico usando filtros de 0.45µm. Para la infección de las líneas celulares de interés, se usó polibreno (8 µg/ml) para

favorecer la adsorción de los virus a las células, y se dejaron expuestas 48 horas al sobrenadante vírico.

Para la expresión ectópica de *KDM6A*, las células se infectaron con lentivirus derivados del vector pLVX-IRESZSGreen-*KDM6A* y fueron seleccionadas sorteando las células GFP positivas, usando BD FACSArea (Becton, Dickinson). Para la expresión de *KDM6B*, las células de internos fueron transfectadas con el constructo pCDNA4/TO-*KDM6B* y se seleccionaron los clones mediante Zeocina (InvivoGen). En el caso de *SMARCB1*, se usó el vector pLVX-Puro-*SMARCB1* y las células fueron seleccionadas con Puromicina (InvivoGen).

3.3 Tratamientos y shRNA

3.3.1 Inducción de la expresión génica de los constructos

La inducción de la expresión génica de los constructos de *SMARCA4* (wt*SMARCA4* y mut*SMARCA4*) se realizó durante 72h con una concentración de 1000 ng/ml de doxiciclina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). En general, la expresión de *SMARCA4* se empezó a detectar 6 horas después de la inducción con doxiciclina.

3.3.2 HDACi (SAHA)

El tratamiento de las líneas celulares con el inhibidor de histona desacetilasas, Vorinostat (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), también conocido como SAHA (Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid), se realizó durante 72 horas a una concentración de 1 μ M para ensayos de crecimiento y extracción y cuantificación de proteínas, y a distintas concentraciones (0.006 μ M-10 μ M) durante 5 días para ensayos de viabilidad. La concentración inicial de SAHA (20mg/ml) fue diluida en PBS (Tampón Fosfato Salino) para obtener una solución final de 2mM

3.3.3 EZH2i (GSK126)

El inhibidor de EZH2, GSK-126 (Selleck Chemical, LLC, USA), se usó durante 72 horas en distintas líneas celulares a una concentración de 1 μ M para ensayos de crecimiento y extracción y cuantificación de proteínas, y a distintas concentraciones (0.006 μ M-10 μ M) durante 5 días para ensayos de viabilidad. La concentración inicial de este fármaco fue 5mM.

3.3.4 KDM6i (GSK-J4)

El tratamiento *in vitro* con el inhibidor de KDM6A y KDM6B GSK-J4 (Selleck Chemical LLC, USA) se realizó durante 72 horas a una concentración de 1 μ M para ensayos de crecimiento y extracción y cuantificación de proteínas, y a distintas concentraciones (0.006 μ M-10 μ M) durante 5 días para ensayos de viabilidad. El stock inicial de GSK-J4 (50mg) fue diluido en DMSO para obtener una concentración final de 10mM.

3.3.5 shRNA

Para la depleción de la expresión de *SMARCA4*, *KDM6A* y *KDM6B*, se adquirieron short hairpin RNAs (shRNA) contra los genes de interés en SIGMA-MISSION (LentiExpress™ Technology, Sigma-Aldrich). Se obtuvieron stocks de glicerol de cinco plásmidos pLKO con las secuencias específicas de los shRNA (Tabla 6). Como control, se usó un shRNA inespecífico o sin objetivo (*non target*- shNT) (Sigma MISSION shRNA non-mammalian control SHC002). A partir de los stocks de glicerol se generaron lentivirus a través del empaquetamiento de virus en las células HEK293T, del mismo modo que se explica en el apartado 3.2.2.

Tabla 6. shRNA usados para *SMARCA4*, *KDM6A* y *KDM6B*

Gen	Referencia	ID Clon	Secuencia específica 5'-3'
<i>SMARCA4</i>	#1	TRCN0000288151	CGCCCGACACATTATTGAGAA
<i>SMARCA4</i>	#4	TRCN0000071384	CCCACGATACAACCAGATGAA
<i>KDM6A</i>	#60	TRCN0000107760	GCACATAGACTAAGGAATAAAA
<i>KDM6A</i>	#61	TRCN0000107761	CCGCGCAAATAGAAATAATTT
<i>KDM6A</i>	#63	TRCN0000107763	GATGCAAGTCTATGACCAATT
<i>KDM6A</i>	#64	TRCN0000107764	GCATGAACACAGTTCAACTAT
<i>KDM6B</i>	#75	TRCN0000236675	AGATTCTTTCTATGGGCTTTA
<i>KDM6B</i>	#77	TRCN0000236677	AGTCCCACTCACCTCTATTTA
<i>KDM6B</i>	#676	TRCN0000236676	AGTGCGATGTGGAGGTGTTTA
<i>KDM6B</i>	#976	TRCN0000359976	GATCTCTATGCATCCAATATT

3.4 Ensayos de viabilidad

3.4.1 MTT y cálculo de EC₅₀

Para la realización de los ensayos de viabilidad, las células se sembraron a una confluencia óptima para su crecimiento en placas de 96 pocillos y se trataron con cada fármaco y sus distintas combinaciones durante 5 días. Se administraron

SAHA, GSK126 y GSK-J4 en rangos de 0,006 μ M a 10 μ M (0.006, 0.015, 0.03, 0.06, 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5.0 y 10 μ M). Pasado este tiempo, se añadieron 10 μ l de la solución a 5 mg/ml de MTT [3-(4.5)-dimetiltiazol-2-yl)- bromuro de 2,5-difeniltetrazolio] (Sigma Chemical Co.). Después de una incubación de 3 horas a 37°C, se descartó el medio del cultivo celular, y se disolvieron los cristales de Formazan metabolizados por las células con 100 μ l de Tampón de lisado celular de MTT (50% N-N-dimetilformamida en H₂O, 20% SDS, 2,5% ácido acético glacial, NaOH 5 mol/L, pH 4.7). Se incubaron de nuevo las placas a 37°C y cuando se observó un lisado homogéneo, se leyó la absorbancia a 590nm.

Las estimaciones de la concentración efectiva media (EC₅₀) se obtuvieron a partir de las curvas dosis-respuesta, que se determinaron utilizando el programa GraphPad Prism. Los resultados se presentan como la mediana de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado para cada línea celular y para cada condición.

3.4.2 Recuento celular con Azul de Tripano

Para el estudio de viabilidad celular con Azul de Tripano (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), se sembraron las células en placas de 6 pocillos en una confluencia óptima para su crecimiento. Las células fueron sometidas al tratamiento de GSK-J4, a una concentración de 1 μ M durante 72 horas. Pasado este período de incubación, se recuperó el medio de cultivo con la finalidad de no descartar las células no viables, se disgregaron las células mediante el uso de tripsina y se juntaron con el sobrenadante. Se realizó una dilución 1:1 del Azul Tripano 10X con la recolección del cultivo celular y se hizo la lectura de los resultados usando la Cámara de Neubauer para el conteo celular. Los resultados se representan como los porcentajes de células viables respecto al total observado, tanto viables como no viables, de tres experimentos independientes.

3.5 Ensayos proliferación celular

3.5.1 Proliferación y formación de colonias

Para el estudio del crecimiento y proliferación celular, se sembraron 5000 células iniciales para cada línea celular, en placas de cultivo de 6 pocillos, y se trataron con SAHA (1 μ M), GSK-J4 (1 μ M) o GSK-126 (1 μ M), durante cinco días. Pasado este período, las células se fijaron con Formaldehído al 4% (Merck KGaA, Darmstadt,

Alemania) y se tiñeron con solución de Cristal Violeta (0.5 % de Cristal Violeta en 25 % de Metanol).

3.5.2 Ensayo colorimétrico de detección de β -Galactosidasa

Para el ensayo de detección de β -galactosidasa, se sembraron las células en condiciones óptimas de confluencia y se trataron a una concentración de $1\mu\text{M}$ de GSK-J4 durante 72 horas. Pasado el tiempo de tratamiento, se fijaron las células con Glutaraldehído al 0.5% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a temperatura ambiente. Pasados 10 minutos, se realizaron 3 lavados con PBS/1mM MgCl_2 a pH=5.7. A continuación se añadió X-Gal (20mg/ml en N-N-Dimetilformamida) a la solución de tinción previamente preparada y pre-calentada a 37°C (Buffer citrato/fosfato 200mM pH=6, NaCl 5M, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 100mM, MgCl_2 1M y PBS/ MgCl_2), se distribuyó por los pocillos de la placa y se dejó en incubación a 37°C protegido de la luz. La tinción se monitorizó a lo largo de las siguientes 24 horas. Se descartó el sobrenadante, se realizaron dos lavados con PBS y se procedió a realizar las fotografías de los cultivos con el microscopio Leica DM4 M. El análisis y recuento celular se hizo con Fiji ImageJ 2.9.

3.6 Extracción de DNA y secuenciación

3.6.1 Extracción DNA

La extracción de DNA genómico (gDNA) se realizó con el kit de purificación Wizard® Genomic DNA (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo el protocolo establecido.

3.6.2 Secuenciación por Sanger

Para verificar el estatus mutacional de los genes de interés, el gDNA y cDNA de las líneas celulares y cultivos primarios se amplificó mediante PCR (cebadores de amplificación especificados en Tabla Suplementaria 1) usando la DNA polimerasa DreamTaq (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa para comprobar la correcta amplificación de los fragmentos y la inexistencia de bandas inespecíficas. Posteriormente, fueron purificados con un mix de exonucleasa I y fosfatasa antártica (New England BioLabs®, UK) y, seguidamente, se secuenciaron de forma directa usando el kit de secuenciación BigDye

Terminator v3.1 Cycle (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para el análisis de las secuencias se usó el software Mutation surveyor v3.25 (SoftGenetics).

3.7 Extracción de RNA y cuantificación

3.7.1 Extracción de RNA, Transcripción Reversa y generación de cDNA

La extracción de RNA total se realizó usando MaxWell® RSC simplyRNA Cells Kit (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. A partir del RNA obtenido, se sintetizó el cDNA siguiendo el protocolo establecido para la Transcriptasa Reversa SuperScript™ II (Invitrogen) y usando Random Primers (Promega, Madison, WI, USA).

3.7.2 RT-Q-PCR

La PCR cuantitativa a tiempo real (RT-Q-PCR) se realizó a partir del cDNA obtenido de la transcripción reversa del RNA, usando QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Quantstudio Design & Analysis v1.5.1) con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, UK) y usando los cebadores descritos a continuación (Tabla 7).

Tabla 7. Cebadores usados para la RT-Q-PCR

Nombre	Secuencia 5'-3'
KDM6A-qPCR-F	GTCCGAGTGTCAACCAACTG
KDM6A-qPCR-R	TGAGAGTCCTGGAGTAGGAG
KDM6B-qPCR-F	CTCAACTTGGGCCTCTTCTC
KDM6B-qPCR-R	GCCTGTCAGATCCCAGTTCT
ACTIN-qPCR-F	GGCATCCTCACCCCTGAGGTA
ACTIN-qPCR-R	AGGTGTGGTCGGAGATTTTC

3.8 Extracción y análisis de proteínas

3.8.1 Extracción de proteínas

Los lisados de proteína se extrajeron directamente de las células con un tampón de lisis compuesto por 2% SDS 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 10% glicerol y un coctel inhibidor de proteasas (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania). Las concentraciones de

proteína se determinaron usando Bio-Rad DC Protein Assay Kit (Life Science Research), leyendo la absorbancia a 750nm en el espectrofotómetro Multiskan Sky Microplate (Thermo Scientific).

3.8.2 Western Blot

Para el análisis de proteínas mediante Western Blot, se partió de la misma cantidad de lisado proteico para la detección de las distintas proteínas y se realizó la electroforesis en geles SDS-PAGE de distinto porcentaje de acrilamida (6-15%), dependiendo del tamaño de las proteínas a observar. La electroforesis se realizó con un tampón activo de Tris/Glicina/SDS 10X (Bio-Rad) diluido al 1X en H₂O. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (0.45µm, Amersham™, Protan™, NC), usando el tampón de transferencia Tris/Glicina/SDS 10X (Bio-Rad) diluido al 1X en H₂O y suplementado con 10% de metanol. Las membranas se bloquearon con una solución de leche en polvo desnatada al 5% durante un período de 1 hora. Después, las membranas se dejaron incubando con el anticuerpo primario, a la respectiva dilución (Tabla 8), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavaron los anticuerpos primarios y se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes IRDye 680CW (925-68022) o IRDye 800CW (925-32213) apropiados para la especie (1:10.000 LI-COR, NE, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las imágenes de las membranas se obtuvieron con el Odyssey Li-Cor CLx y se visualizaron con el software Image Studio Lite v5.2.

Tabla 8. Lista de anticuerpos primarios y secundarios usados en este trabajo. Western Blot (WB); Immunohistoquímica (IHC); Immunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Proteína	Referencia	Distribuidor	Técnica	Dilución (WB)	Dilución (IHC/IF)	Cantidad total (ChIP)
CASPASE-3	#9668	Cell signaling	IHC	1:1000	1:100	
CD31	ab2836	Abcam	IF		1:50	
CLEAVED CASPASE-3	#9664	Cell signalling	IF		1:400	
EZH2	#5246	Cell signaling	WB & ChIP-seq	1:1000		5µg
H3 total	#9715	Cell signaling	WB	1:1000		
H3K27ac	ab4729	Abcam	WB & ChIP-seq & IHC	1:1000	1:100	5µg
H3K27me3	07-449	Sigma	WB & ChIP-seq & IHC	1:1000	1:100	5µg
KDM6A/UTX	#33510	Cell signaling	WB & IHC	1:1000	1:100	

KDM6B/JMJD3	#3457	Cell signaling	WB	1:1000	
KDM6B/JMJD3	ab38113	Abcam	WB & IHC	1:1000	1:50
Ki-67	14-5698-82	Invitrogen	IF		1:100
PARP	#9542	Cell signaling	WB	1:1000	
SMARCA4/BRG1	#49360	Cell signaling	WB & ChIP-seq	1:1000	5µg
SMARCB1/INI1	#91735	Cell signaling	WB	1:1000	
α-ACTIN	A2228	Sigma	WB	1:10000	
αSMA	C6198	Sigma	IF		1:300
β-TUBULIN	200-301-880S	Rockland	WB	1:10000	
Secundario fluorescente Donkey anti-mouse IgG IRDye 680LT	926-68022	Li-Cor	WB	1:10000	
Secundario fluorescente Donkey anti-rabbit IgG IRDye 800CW	926-32213	Li-Cor	WB	1:10000	
Secundario IF Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488®	A11008	Invitrogen	IF		1:200
Secundario IF Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 568®	A11011	Invitrogen	IF		1:200
Secundario IF Monkey anti-Rat Alexa Fluor 488®	21208	Invitrogen	IF		1:200
Secundario IF Mouse anti-Actin α-Smooth Muscle Cy3™	C6198	Sigma	IF		1:200

3.9 Técnicas de secuenciación masiva

3.9.1 Secuenciación con inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-Seq)

Para la inmunoprecipitación de la cromatina y posterior secuenciación (ChIP-Seq), se crecieron las células en placas de P-150cm y se fijaron con formaldehído al 1% (Thermo Scientific) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron hidratadas con 125mM de glicina durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a hacer dos lavados con PBS frío y se centrifugaron las células a 200g, durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, el pellet fue re-suspendido en 1mL de tampón

de lisis celular (10mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, con inhibidor de proteasas) y se mantuvo en rotación durante 30 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en 1mL de tampón de lisis nuclear (1% SDS, 10mmol/L EDTA, 50mmol/L Tris-HCl pH 8.0, inhibidor de proteasas) y se mantuvo en rotación durante 60 minutos a 4°C. Después de una tercera centrifugación, el lisado fue sometido a sonicación usando el sonicador Covaris M220, con la finalidad de obtener fragmentos de cromatina de un tamaño medio de 0.25-1.00 kb que, a continuación, se congelaron a -20°C durante 30 min. Posteriormente, la cromatina fue descongelada en hielo y se centrifugó a 2500g.

Para cada reacción de ChIP, se usaron 50µL de Magna ChIP™ Proteína A + G *Magnetic Beads* o Perlas Magnéticas (Merck Millipore), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Las Perlas se recogieron magnéticamente y se conjugaron con 5µg de anticuerpo primario en 400µl de PBS+BSA (5mg/ml) con inhibidor de proteasa. Antes que los fragmentos de cromatina fueran conjugados a las perlas magnéticas, se añadió Triton X-100 y Na-deoxicolato para obtener una concentración final del 10% para cada reactivo. Como input, se usó el 1% del volumen total de cromatina. La cromatina y las perlas magnéticas se dejaron conjugar toda la noche a 4°C en rotación. Posteriormente, las muestras inmunoprecipitadas se lavaron 3 veces con el tampón TSEI (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA pH=8, 20mM Tris-HCl pH=8, 150mM NaCl, inhibidor de proteasas), tres veces con el tampón TSEII (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA pH=8, 20mM Tris-HCl pH=8, 500mM NaCl, inhibidor de proteasas) y una vez con tampón TSEIII (0.25M LiCl, 1% NP-40, 1% Na-deoxicolato, 1mM EDTA pH=8, 10mM Tris-HCl pH=8). Después de los lavados, La cromatina inmunoprecipitada y el input se eludieron añadiendo 170µl del tampón de elución (10mM Tris-HCl pH=8, 1mM EDTA pH=8, 1% SDS) y se incubaron a 65°C toda la noche. Al día siguiente, las muestras se suplementaron con 150µl de tampón TE (10mM Tris-HCl pH=8, 1mM EDTA pH=8) y se trataron con RNasa A durante 2 horas a 37°C y con proteinasa K durante 2 horas a 65°C. El DNA fue posteriormente purificado añadiendo acetato sódico a una concentración final de 0.5M, 50µg/ml de co-precipitante GlycoBlue (Applied Biosystems) y un volumen de isopropanol. Las muestras se incubaron a -20°C durante 2 horas y se centrifugaron a 30 minutos, a 4°C a 2500g. Finalmente, los pellets de DNA se lavaron dos veces con etanol al 70% y se re-suspendieron en 30µl de H₂O. Se realizaron al menos dos experimentos independientes de ChIP.

El DNA inmunoprecipitado fue secuenciada al completo en la Unidad de Genómica del Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona, España) utilizando el sistema HiSeq 2500 de Illumina y HiSeq Control (HCS) 2.2.68 software (Illumina). De forma breve, la

preparación de la librería incluyó: reparación de extremos, generación de salientes dA, ligación de adaptadores, selección de tamaños y eliminación de adaptadores no ligados mediante la electroforesis en agarosa y amplificación génica (18 ciclos) antes de cargar las muestras en el secuenciador.

Para el análisis de los datos de secuenciación del ChIP, las lecturas se alinearon con el genoma humano de referencia hg38, utilizando Bowtie v1.2.2, usando los parámetros establecidos por defecto y deshabilitando el multi-mapeado (-m 1)¹⁴⁶. Los duplicados de PCR se eliminaron usando PICARD ([http:// broadinstitute.github.io/picard/](http://broadinstitute.github.io/picard/)). Las lecturas multi-mapeadas y ambiguas fueron descartadas. Los picos se denominaron con MACS2 v2.1.141. Para evitar falsos positivos, provocados por uniones inespecíficas del anticuerpo, se descartaron los picos presentes en el ChIP-seq de *SMARCA4* en las células deficientes en *SMARCA4*. La anotación de picos genómicos se realizó con el paquete R ChIPpeakAnno v3.15, considerando la región $\pm 2\text{kb}$ alrededor del TSS como el promotor¹⁴⁷. A menos que se especificara lo contrario, todos los análisis tuvieron en cuenta los picos que se solapaban con las regiones promotoras. A continuación, las listas de picos se transformaron en listas de genes diana. Para la representación de los resultados obtenidos en heatmaps y gráficos de intensidad, los archivos bedgraph se generaron utilizando la función makeUCSCfile de HOMER usando los parámetros establecidos por defecto que normalizan las diferencias entre tamaños de las muestras de la librería, y los archivos BigWig se generaron utilizando la función bedGraphToBigWig de UCSC.

Los heatmaps se obtuvieron usando las funciones computeMatrix, en una ventana de $\pm 2\text{kb}$ alrededor del centro del TSS, y plotHeatmap de deepTools43 (versión 3.5). Para homogeneizar la escala de todos los heatmaps y gráficos de intensidad, la intensidad de la señal se escaló de 0-1 aplicando la fórmula $(X-P05)/(P98-P05)$ a cada matriz generada por computeMatrix. Los análisis de enriquecimiento de los motivos se realizaron con el software HOMER *motif discovery*¹⁴⁸. Para los picos anotados del ChIP-seq, se aplicó una ventana de $\pm 100\text{pb}$ alrededor del centro del pico. Los P-valor < 0.01 definen un motivo como significativamente enriquecido.

Para el análisis de los datos de secuenciación del ChIP, las lecturas se alinearon con el genoma humano de referencia hg38, utilizando Bowtie v1.2.2, usando los parámetros establecidos por defecto y deshabilitando el multi-mapeado (-m 1)¹⁴⁶. Los duplicados de PCR se eliminaron usando PICARD ([http:// broadinstitute.github.io/picard/](http://broadinstitute.github.io/picard/)). Las lecturas multi-mapeadas y ambiguas fueron descartadas. Los picos se denominaron con MACS2

v2.1.141. Para evitar falsos positivos, se descartaron los picos presentes en el ChIP-seq de *SMARCA4* en las células deficientes en *SMARCA4*. La anotación de picos genómicos se realizó con el paquete R ChIPpeakAnno v3.15, considerando la región $\pm 2\text{kb}$ alrededor del TSS como el promotor¹⁴⁷. A menos que se especificara lo contrario, todos los análisis tuvieron en cuenta los picos que se solapaban con las regiones promotoras. A continuación, las listas de picos se transformaron en listas de genes diana. Para la representación de los resultados obtenidos en Heatmaps y gráficas de intensidad, los archivos bedgraph se generaron utilizando la función makeUCSCfile de HOMER usando los parámetros establecidos por defecto que normalizan las diferencias entre tamaños de las muestras de la librería, y los archivos BigWig se generaron utilizando la función bedGraphToBigWig de UCSC.

Los Heatmaps se obtuvieron usando las funciones computeMatrix, en una ventana de $\pm 2\text{kb}$ alrededor del centro del TSS, y plotHeatmap de deepTools⁴³ (versión 3.5). Para homogeneizar la escala de todos los Heatmaps y gráficos de intensidad, la intensidad de la señal se escaló de 0-1 aplicando la fórmula $(X-P05)/(P98-P05)$ a cada matriz generada por computeMatrix. Los análisis de enriquecimiento de los motivos se realizaron con el software HOMER *motif discovery*¹⁴⁸. Para los picos anotados del ChIP-seq, se aplicó una ventana de $\pm 100\text{pb}$ alrededor del centro del pico. Los P-valor < 0.01 definen un motivo como significativamente enriquecido.

3.9.2 Secuenciación de RNA (RNA-seq)

Para la secuenciación de RNA, se enviaron alrededor de unos 2500ng de RNA total de líneas celulares deficientes para *SMARCB1*, con y sin el gen recuperado, y con y sin tratamiento de GSK-J4 ($1\mu\text{M}$), a Novogene (Cambridge, UK). La extracción de RNA total se realizó usando MaxWell® RSC simplyRNA Cells Kit (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Los valores de integridad del RNA oscilaron entre 9.0 y 10.0 cuando se examinaron con el Kit BioA RNA Nano (Agilent). La secuenciación del RNA se llevó a cabo mediante extremos pareados con FlowCell Illumina (HWI-ST1276). Se aplicaron procesos estándares para recortar y ensamblar las lecturas de secuenciación, antes de alinearlas con la versión GRCh38/hg38 del genoma humano con el programa de alineación HISAT2. El análisis de expresión diferencial entre dos condiciones/grupos lo realizó Novogene con el paquete DESeq2 R¹⁴⁹, que proporciona rutinas estadísticas para determinar expresión diferencial en datos de expresión génica utilizando un modelo binomial negativo. Los P-valores se ajustaron usando la aproximación de Benjamini y Hochberg para controlar los falsos positivos. Para el análisis de enriquecimiento, incluyendo GO Enrichment (Gene Ontology,

<http://www.geneontology.org/>), DO Enrichment (Disease Ontology, <https://disease-ontology.org/>) KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.kegg.jp/>) y Reactome database Enrichment (<https://reactome.org/>) se usó el software clusterProfiler¹⁵⁰. Para la formulación de Heatmaps, se usó el software R versión 4.2.2, juntamente con el paquete v1.28.1 y el archivo *Homo_sapiens.GRCh38.94.gtf* de Ensembl. Para la realización de los Volcano Plots, se usó el software R versión 4.2.2 junto con el paquete ggplot2. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para cualquier valor de $P < 0.05$.

3.10 Estudios *in vivo*

3.10.1 Generación y tratamiento de modelos ortotópicos

Los ratones nu/nu atímicos machos y hembras (ENVIGO) de 4-5 semanas de edad se mantuvieron en un entorno estéril antes de ser usados en los experimentos ortotópicos de cáncer de pulmón, de SCCOHT y los modelos de tumores rabdoides malignos (MRT). Para los estudios ortotópicos de cáncer de ovario se utilizaron ratones hembra nu/nu atímicos (ENVIGO) de 4-6 semanas de edad. Los animales se alojaron en jaulas ventiladas individualmente en un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad a 21-23°C y 40-60% de humedad. Los ratones tuvieron libre acceso, de forma constante, a una dieta irradiada y a agua esterilizada.

Todos los experimentos que involucraron manipulación animal fueron aprobados por el Comité Ético del IDIBELL bajo el protocolo 9111 y 11973 aprobado por la Generalitat de Catalunya, la Unidad 1155 acreditada por la AAALAC, y realizados de acuerdo con las directrices establecidas en los Principios Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales, desarrollados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS).

3.10.1.1 Modelos derivados de líneas de cáncer de pulmón

Para la generación de xenoinjertos tumorales ortotópicos de pulmón, se usaron 3 líneas celulares (DMS273X, DMS114X, H841X). Las líneas celulares se inyectaron por vía subcutánea en el dorso de los ratones ($n = 3$ ratones/línea celular). Una vez que el tumor sólido entró en la fase de crecimiento exponencial, se sacrificaron los ratones, se aislaron los tumores en condiciones estériles y se seleccionaron las áreas no necróticas, fragmentándolas en pequeñas porciones de 2-3mm³. A continuación, se implantaron los fragmentos tumorales ortotópicamente en el parénquima pulmonar¹¹⁰. A día 15 de la

implantación, los ratones fueron aleatorizados y tratados por vía intraperitoneal con GSK-J4 (50 mg/kg/día por cada ratón) o solamente con el vehículo correspondiente. En la mayoría de los casos, los animales fueron eutanasiados cuando mostraron dificultades respiratorias graves, que posteriormente se confirmó que estaba asociada al crecimiento del tumor pulmonar.

3.10.1.2 Modelos derivados de tumores primarios de pacientes de SCCOHT

Para la generación de los ortoxenoinjertos o PDOX de pacientes de carcinoma de ovario de célula pequeña de tipo hipercalcémico (SCCOHT), se obtuvieron muestras tumorales primarias de dos pacientes en el Hospital Universitario de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España) y se secuenciaron para confirmar la deficiencia de expresión en el gen *SMARCA4*, tal y como se especifica en el apartado 3.6.2.

Los tumores ortotópicos fueron injertados en los ovarios de los ratones (n=5 ratones para el vehículo y n=7 ratones para el tratamiento), siguiendo el protocolo establecido¹⁵¹. De forma breve, se seleccionaron piezas de carcinoma resecado no necrótico (2–3mm³) y se pusieron en DMEM suplementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina a temperatura ambiente. Bajo anestesia inducida por isoflurano, los animales se sometieron a una laparotomía lateral, quedando sus ovarios expuestos y las piezas del tumor se anclaron a la superficie del órgano con suturas de prolene 7,0. El crecimiento tumoral se monitorizó entre 2 y 3 veces por semana, y cuando el tumor alcanzó un tamaño suficientemente palpable, se extrajo, se cortó en pequeños fragmentos y se trasplantó a animales nuevos. El tratamiento con GSK-J4 (50 mg/kg/día por cada ratón) y su correspondiente vehículo se administró una vez al día, 5 veces por semana, durante 4 semanas consecutivas. Los animales se eutanasiaron pasados 21 días de tratamiento y sus ovarios fueron resecados, midiendo el peso y tamaño de los tumores.

3.10.1.3 Modelos derivados de tumores primarios de pacientes de MRT

Para la generación de los ortoxenoinjertos o PDOX de pacientes con tumores rabdoideos malignos (MRT) se obtuvieron muestras tumorales primarias y metastáticas de dos pacientes pediátricos en el Hospital Universitario de Vall d'Hebron (Barcelona, España). El primer caso (MRT#1) fue de una lactante con AT/RT frontal y con posterior metástasis pulmonar, de la cual se obtuvo muestras del tumor primario y metastático. El segundo caso (MRT#2) fue un paciente con RT en la cavidad abdominal con afectación directa al hígado, del cual se obtuvo únicamente muestras del tumor primario sin derivarse del cultivo primario alguno.

Los tumores ortotópicos fueron injertados en los ratones. Del mismo modo que se procedió con los PDOX de ovario, se seleccionaron piezas del tumor resecado no necrótico (2–3mm³) y se pusieron en DMEM suplementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina a temperatura ambiente. Bajo anestesia inducida por isoflurano, los animales se sometieron a distintas intervenciones para el injerto de los distintos tumores. El tumor primario MRT#1 (T692X) se implantó en el parénquima subcutáneo en la frente de los ratones (n=3/vehículo; n=5/GSK-J4), el tumor metastático MRT#1 (T744X) se implantó en el parénquima pulmonar del ratón (n=4/vehículo; n=5/GSK-J4), del mismo modo que se ha descrito en el apartado anterior 3.10.1.1 y el tumor primario de MRT#2 se (T642X) implantó en el parénquima hepático del ratón (n=4/vehículo; n=5/GSK-J4). El crecimiento tumoral se monitorizó entre 2 y 3 veces por semana, y cuando el tumor alcanzó un tamaño suficientemente palpable, se extrajo, se cortó en pequeños fragmentos y se trasplantó a animales nuevos. El tratamiento con GSK-J4 (50 mg/kg/día por cada ratón) y su correspondiente vehículo se administró una vez al día, 5 veces por semana, durante 4 semanas consecutivas.

En el modelo metastático pulmonar, los animales fueron sacrificados cuando mostraron dificultades respiratorias graves. En los otros dos modelos, los animales se sacrificaron pasados 21 días de tratamiento y sus tumores fueron resecados y medidos a nivel de peso y tamaño.

3.10.2 Examinación inmunohistopatológica de los tumores

3.10.2.1 Tinción con Hematoxilina y Eosina e Inmunohistoquímica

Para el análisis histológico de los tumores, los tejidos tumorales se fijaron e incluyeron en parafina. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) (Panreac Applichem., Barcelona, España) se realizó siguiendo los protocolos estándares y se utilizó para evaluar morfológicamente la necrosis/fibrosis mediante microscopía óptica. Para realizar las tinciones inmunohistoquímicas, los cortes de 4µm de grosor de las muestras tumorales de pulmón, ovario y rabdoides incluidas en parafina, se desparafinaron durante toda la noche a 62°C. Al día siguiente, se sumergieron en xileno durante 30 minutos. Posteriormente, se rehidrataron las muestras con concentraciones decrecientes de etanol (100%-96%-70%) y se sumergieron en Tris/EDTA pH 9,0, previamente calentado, para la recuperación de nuevo de los antígenos. Se procedió a inhibir la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3%, se añadió suero de cabra al 10% como solución de bloqueo y se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (Tabla 8). Se utilizaron

anticuerpos secundarios policlonales de cabra (anti-ratón y anti-conejo) conjugados con HRP (NeoStain ABC Kit, NeoBiotech) en incubaciones de 1 hora a temperatura ambiente. La revelación del anticuerpo secundario se realizó con el kit ImmPACT DAB Peroxidase (HRP) Substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.), y las secciones de tejido se contra-tiñeron con hematoxilina. Una vez deshidratadas en una batería ascendiente de etanol (70%-96%-100%) y aclaradas en xileno durante 1 hora, se procedió a montar las muestras con cubreobjetos y medio de montaje DPX (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

Las secciones fueron evaluadas anatomopatológicamente bajo microscopio (Leica DM1000) por dos observadores independientes. Las áreas de necrosis/fibrosis se cuantificaron con Photoshop (versión 2021). Los criterios de puntuación para determinar la tinción H3K27me3 se basaron en la intensidad de la tinción (cuatro categorías, 1-4) y se determinó la media de los valores de tres evaluadores independientes.

3.10.2.2 Tinción con Tricrome de Masson

Para observar la fibrosis y deposición de colágeno en las muestras de tumores paraфинados, se usó el kit de tinción Trichrome de Masson (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Inicialmente, se desparaфинaron las muestras durante toda la noche a 62°C y, posteriormente, se sumergieron en xileno durante 30 minutos y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de etanol (100%-96%-70%-50%). Finalmente, se procedió a realizar la triple tinción de Masson siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Las secciones fueron fotografiadas con el microscopio Leica DM4B. La fibrosis de los tumores se cuantificó usando ImageJ (versión 2022) y Photoshop (versión 2021).

3.10.2.3 Inmunofluorescencia

Para proceder con la inmunofluorescencia de las muestras tumorales, inicialmente se desparaфинaron durante toda la noche a 62°C. Al día siguiente, se sumergieron en xileno durante 30 minutos y se rehidrataron las muestras con concentraciones decrecientes de etanol (100%-96%-70%-50%). Posteriormente, se sumergieron las muestras en tampón citrato 1X a pH=6 y se hirvieron durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se incubaron con la solución de recuperación de antígenos Tris/EDTA pH 9.0 y se dejaron enfriar durante 20 minutos. Después de 3 lavados con PBS, se procedió a realizar la permeabilización de la membrana haciendo dos incubaciones de 15 minutos en 0.2% PBS-Tween 20. Se hicieron dos nuevos lavados con PBS, se incubaron las muestras

durante 30 minutos a temperatura ambiente con la solución de bloqueo de suero de caballo al 10% y se añadieron los anticuerpos primarios, dejándolos durante toda la noche a 4°C (Tabla 8). Al día siguiente se lavaron las muestras con PBS 1X y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (mezclados con serum 5%, BSA 1% en PBS 1X) (Tabla 8). Pasado el período de incubación, se hicieron dos nuevos lavados con PBS 3X y se procedió a montar las muestras con cubreobjetos y medio de montaje Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Las secciones fueron fotografiadas con los microscopios de fluorescencia Leica DM4B y Nikon Eclipse Ti2. El área de señal de los tumores se cuantificó usando ImageJ (versión 2022) y Photoshop (versión 2021)

3.11 Análisis estadísticos

La prueba t de Student, los cálculos de la EC_{50} , las estimaciones de Kaplan-Meier y las pruebas de long-rank (Mantel-Cox) se realizaron usando el programa Prism (GraphPad Prism 9). Todos los P-valores <5% fueron considerados estadísticamente significativos. Los métodos estadísticos utilizados para cada análisis se especifican en las leyendas de las figuras.

3.12 Análisis de bases de datos públicas

En este estudio se han usado las siguientes bases de datos públicas: cBioPortal para Cancer Genomics, Cancer Cell Line Encyclopedia-CCLE (https://www.cbioportal.org/study/summary?id=cclle_broad_2019), COSMIC-Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines), DepMap Portal-Cancer Dependency Map (<https://depmap.org/portal/achilles/>) y Genomics of Drug Sensitivity in Cancer database (<https://www.cancerrxgene.org/compound/Vorinostat/1012/overview/ic50>, <https://depmap.org/portal/compound/GSK-J4?tab=dependency>). Los estudios y las n utilizados para cada análisis se especifican en las leyendas de las figuras.

3.13 Códigos de acceso

Los datos en bruto de ChIP-seq y RNA-seq obtenidos en este estudio han sido publicados en Gene Expression Omnibus-GEO (NCBI), con el número de acceso GSE155129 y GSE233554, respectivamente.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Las células tumorales con deficiencia en *SMARCA4* muestran una acumulación aberrante de marcas epigenéticas represivas (H3K27me3) tras el tratamiento con SAHA.

Con el propósito de estudiar la respuesta de las células tumorales a distintos tratamientos epigenéticos dependiendo de su base genética, y en base a la refractariedad de las células *SMARCA4* deficientes al inhibidor de histonas desacetilasas (HDACi), comúnmente conocido como SAHA¹¹⁰, y debido a la alta frecuencia de estas mutaciones en cáncer de pulmón, empezamos tratando un panel de líneas celulares de este tipo de cáncer. Teniendo en cuenta que la presencia de alteraciones genéticas en *SMARCA4* y los genes de la familia *MYC* son mutuamente excluyentes, definimos dos grupos de células tumorales: un panel celular con activación oncogénica de *MYC* (*cMYC*, *MYCN* o *MYCL*), debido a los altos niveles de amplificación del gen (referenciadas como MYCamp), y otro panel con inactivación genética de *SMARCA4* (referenciadas como *SMARCA4def*).

Como se puede observar en los ensayos clonogénicos en las líneas celulares indicadas (Figura 11a), tratadas con el vehículo (control) o con SAHA, determinamos que el tratamiento con este fármaco epigenético, por sí solo, tiene un efecto evidente en las células MYCamp, promoviendo una disminución en el crecimiento celular, mientras que las células *SMARCA4def* apenas se ven afectadas.

A continuación, se realizaron una serie de ensayos de MTT para determinar la viabilidad celular en ambos paneles tras el tratamiento con SAHA. En los resultados mostrados en la Figura 11b, se ve representada la distribución y la concentración media efectiva máxima (EC₅₀) del tratamiento con el inhibidor de HDACs en las células MYCamp (n=8) y las *SMARCA4def* (n=6). Como ya habíamos observado a nivel clonogénico, el tratamiento con SAHA provocó una fuerte disminución en el crecimiento y la viabilidad celular en las células MYCamp en comparación con las *SMARCA4def* (EC₅₀ de 0.5 y 1,4μM, para cada grupo, respectivamente). Estos efectos no se vieron influenciados por las distintas histopatologías del cáncer de pulmón (SCLC y NSCLC). Asimismo, esta sensibilidad al SAHA específica de las células MYCamp se validó utilizando la base de datos pública *GDSC2 PANCANCER cell lines*, que incluye más de 750 líneas celulares de cáncer de distinto origen y con diferente fondo de alteraciones genéticas (Figura 11c).

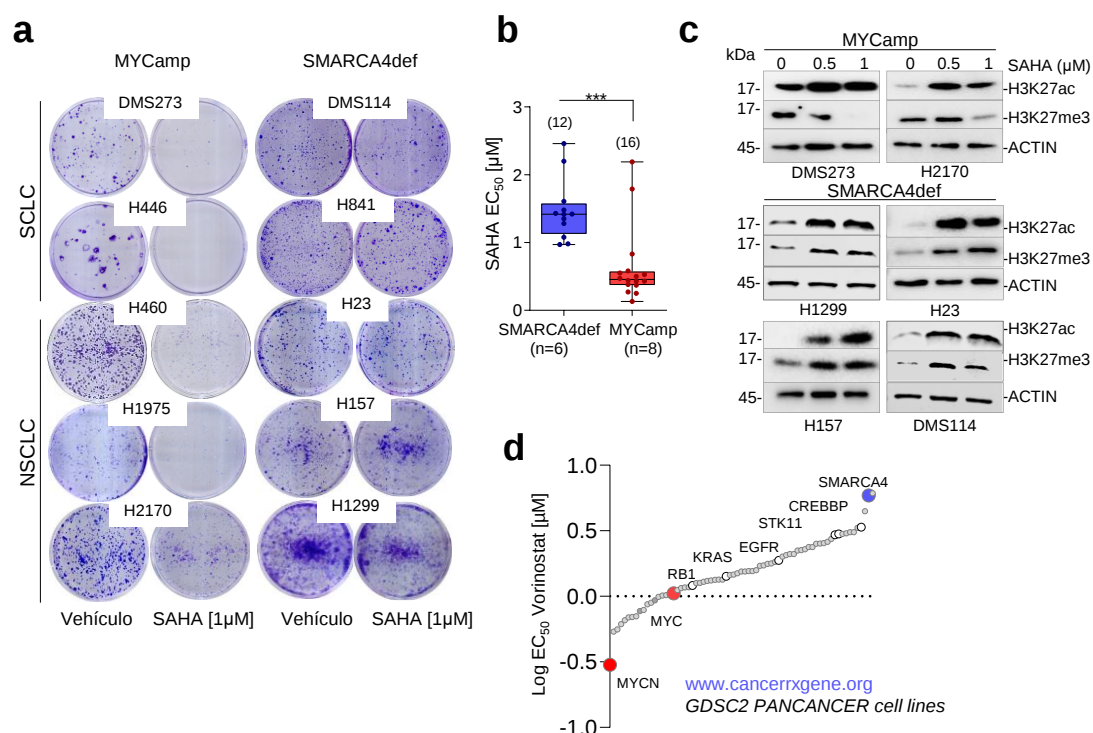


Figura 11. El tratamiento con SAHA reduce el crecimiento celular y los niveles de H3K27me3 en células tumorales MYCamp, pero no en SMARCA4def. **a**, Ensayos clonogénicos en las células de cáncer de pulmón indicadas, sin tratar (vehículo) o tratadas con SAHA a la concentración indicada. **b**, Distribución y media de los valores EC₅₀, obtenidos a partir de estudios de viabilidad celular mediante MTT, para el tratamiento con SAHA en células MYCamp (0.5μM) y SMARCA4def (1.4μM). Las barras muestran la media ± DE; las pruebas estadísticas se realizaron mediante estudios t de Student no pareados. En los gráficos de *box-whisker*, la banda horizontal dentro de la caja indica la mediana, los bordes inferiores y superiores de la caja los percentiles 25-75 y los extremos indican los valores del mínimo al máximo. ***P = 0.0002. Se representan los valores de dos experimentos independientes por línea celular. **c**, Gráfico con los valores comparativos de EC₅₀ para el tratamiento con SAHA (vorinostat) en un panel de 758 líneas celulares de cáncer (de la base de datos www.cancerrxgene.org), en función de la presencia de alteraciones genéticas seleccionadas, incluida la amplificación de los oncogenes MYC y la inactivación de SMARCA4. **d**, Western blots representativos de los niveles globales de las proteínas y marcas de histonas indicadas (H3K27ac y H3K27me3) en las células indicadas tras el tratamiento con SAHA. Se utilizó ACTINA como control de carga proteica.

El SAHA es un inhibidor general de la actividad de las histonas deacetilasas y actúa incrementando los estados de acetilación global, favoreciendo así la apertura de la cromatina¹⁵². Los dominios activos de la cromatina se caracterizan por la presencia de un conjunto de distintas marcas en la cola de las histonas como, por ejemplo, H3K27ac, H3K4me1 y H3K4me3, mientras que las marcas como H3K27me3 y H2AK119ub se encuentran relacionadas con locus o regiones de genes silenciados^{14,15}. Tal y como se observa en la Figura 11d, se analizaron los cambios en los niveles globales de H3K27ac y H3K27me3, dos marcas epigenéticas mutuamente excluyentes y antagónicas en el mismo residuo¹⁵, en diferentes líneas celulares y con distintas concentraciones de SAHA. Tras el tratamiento, se pudo observar como el SAHA desencadenaba el

incremento esperado en H3K27Ac en todas las líneas celulares tratadas. Sin embargo, en las células *SMARCA4*def se observó, de forma específica e inesperada, una acumulación aberrante de la marca H3K27me3 en lugar de la disminución esperada. Este fenómeno rompía el equilibrio en las células *SMARCA4*def, entre estas dos marcas antagónicas, en el mismo residuo y de funciones opuestas responsables de la dinamización y la accesibilidad de la cromatina.

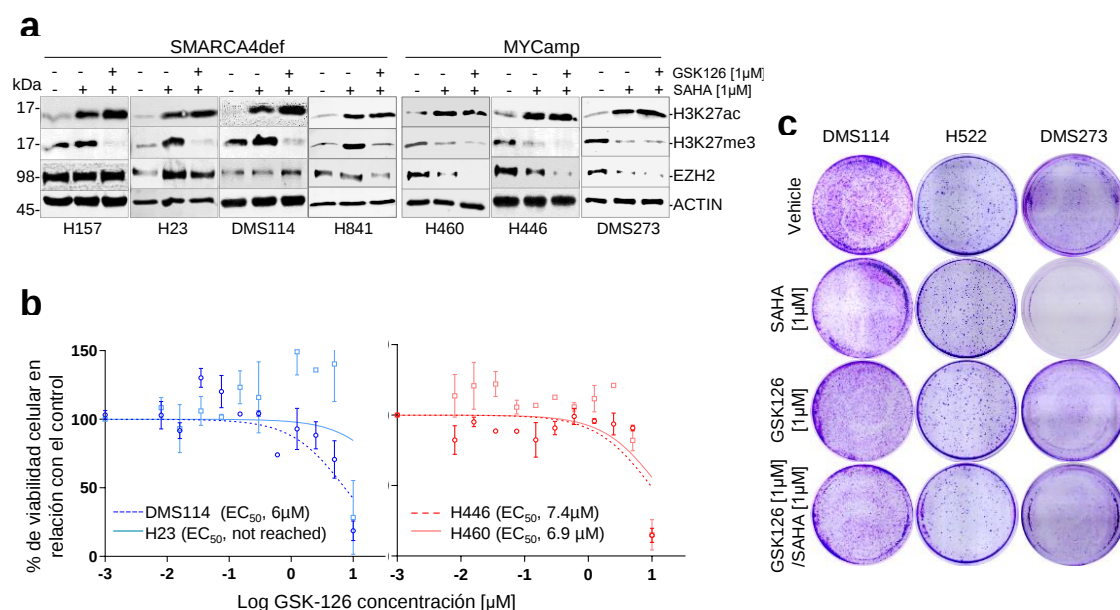


Figura 12. GSK-126 reduce la acumulación de H3K27me3, pero no afecta de manera general el crecimiento y la supervivencia celular de forma dependiente a *SMARCA4*. **a**, Western blots representativos de los niveles globales de las proteínas y marcas de histonas indicadas (H3K27ac y H3K27me3) en las células indicadas tras los tratamientos con SAHA y SAHA combinado con GSK-126. Se utilizó ACTINA como control de carga. **b**, Efectos sobre la viabilidad celular, medida mediante ensayos MTT, en las líneas celulares indicadas tras el tratamiento con concentraciones crecientes de GSK-126. **c**, Ensayos clonogénicos representativos para las células y tratamientos indicados.

Los niveles globales de H3K27me3 están regulados por la acción coordinada y antagónica de las KMTs y las KDMs específicas de este residuo. De este modo, para investigar los mecanismos que determinan la acumulación aberrante de H3K27me3 tras la administración de SAHA en células *SMARCA4*def, se decidió estudiar el efecto del compuesto GSK-126, un inhibidor específico de la actividad metiltransferasa de EZH2, que conforma la subunidad catalítica del complejo PRC2 y que cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3.

En estudios previos se ha observado que el GSK-126, sólo o en combinación con otros inhibidores de HDACs, suprime el crecimiento celular del carcinoma de ovario de células pequeñas de tipo hipercalcémico (SCCOHT) con inactivación en *SMARCA4*¹⁰³. Sin

embargo, en el presente trabajo, la combinación de SAHA con GSK-126, si bien promovía una disminución global de la marca H3K27me3 y potenciaba selectivamente la disminución de los niveles de EZH2 en las células MYCamp (Figura 12a) no afectaba el crecimiento y supervivencia celular de forma dependiente de la inactivación de *SMARCA4* (Figura 12b-c). Ello indicaba que la actividad de EZH2 no era la causante, por sí misma, de la refractariedad al SAHA observada en las células con inactivación en *SMARCA4*.

De este modo, dado que la inhibición de la actividad catalítica de EZH2 no explicaba, *per sé*, el fenotipo observado, se decidió estudiar la posible implicación de las KDMs, en particular la KDM6A y KDM6B, que son las enzimas que revierten la acción de EZH2 sobre H3K27.

4.2 La presencia de mutaciones inactivadoras en *SMARCA4* se correlaciona negativamente con los niveles de expresión de varias KDMs en cáncer.

Mediante un exhaustivo análisis de bases de datos públicas en líneas celulares de cáncer de pulmón (cBioportal/CCLE), se observó que la presencia de mutaciones inactivantes en *SMARCA4* se correlacionaba significativamente con bajos niveles de expresión de varias lisinas demetilinasas, incluyendo la *KDM6A* y *KDM6B* (Figura 13a-b). Estas observaciones fueron validadas posteriormente, tanto a nivel de proteína (Figura 13c) como de mRNA (Figura 13d). En concordancia con la baja expresión de KDM6A y KDM6B, en las células *SMARCA4*def los niveles globales de la H3K27ac estaban especialmente disminuidos, en comparación con los de H3K27me3, mientras que los niveles de EZH2 se mostraron muy similares en ambos grupos (Figura 13c).

SMARCA4 salvaje (H1299-wt*SMARCA4*) desencadenó un incremento en la expresión de *KDM6A* y de *KDM6B*, mientras que la re-expresión ectópica de la forma mutante (H1299-mut*SMARCA4*) reprimió los niveles de expresión estas dos proteínas (Fig. 14a-b). Simultáneamente, y coherentemente con los datos anteriores, los niveles de EZH2 no se vieron afectados en ninguna de las dos condiciones (Figura 14b).

Por otro lado, se indujo la depleción de *SMARCA4* en un panel de líneas celulares MYCamp mediante el uso de shRNA específicos (Figura 14c-d). Los resultados mostraron que la depleción de *SMARCA4* reducía los niveles de expresión de ambas *KDM6s*, tanto a nivel de proteína (Figura 14c) como de mRNA (Figura 14d). Estas observaciones, en conjunto, indican que la función de es necesaria para la activación de la expresión de *KDM6A* y *KDM6B*.

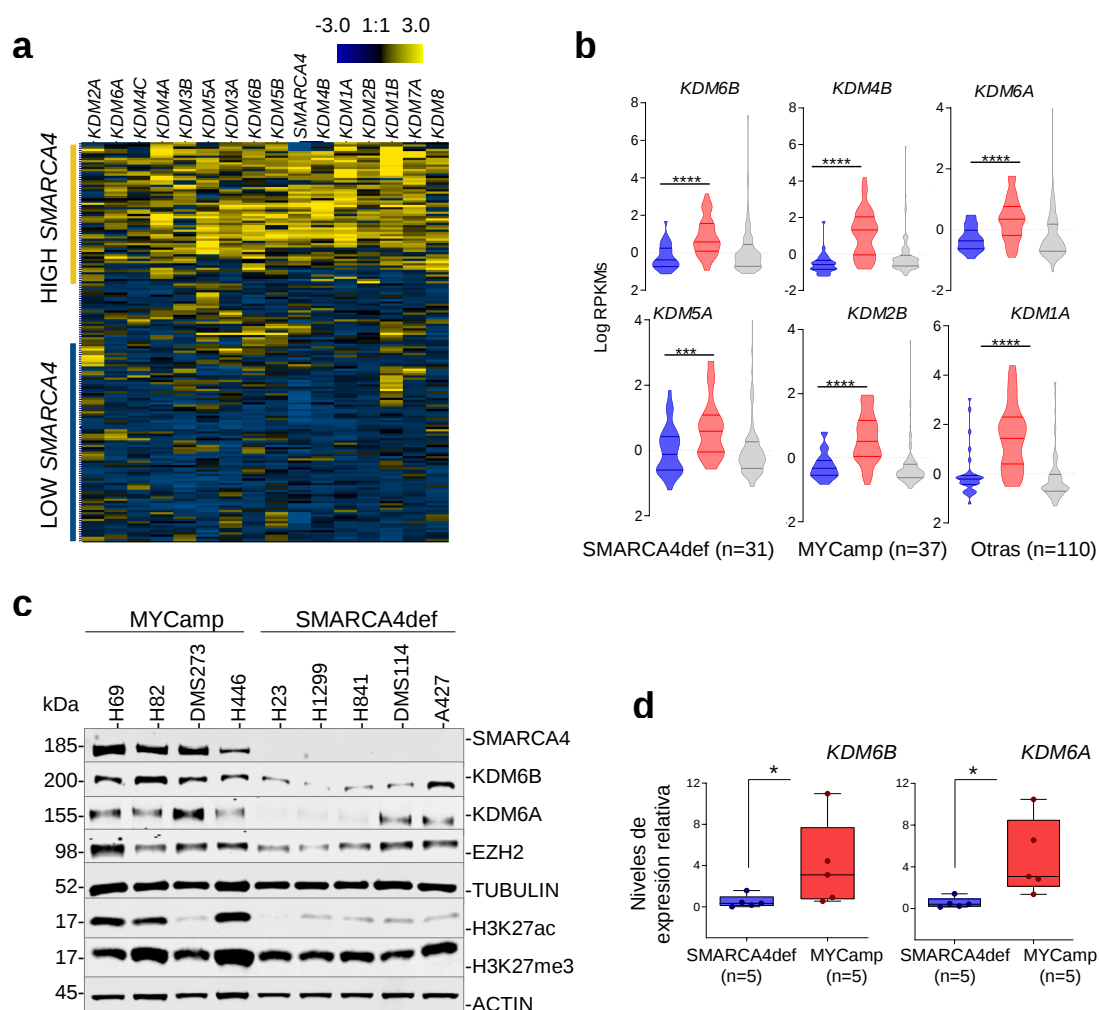


Figura 13. La presencia de mutaciones en *SMARCA4* se asocia a bajos niveles de KDM6s. **a**, Heatmap de los niveles de mRNA de las KDMs indicadas y de *SMARCA4* en un panel de 179 líneas celulares de cáncer de pulmón (Cancer Cell Line Encyclopedia -CCLE en cBioportal). El Heatmap se generó usando Software Genesis. **b**, Violin-plots que comparan los niveles de las KDMs indicadas en los distintos grupos: SMARCA4def, MYCamp y Otras (wild type para *SMARCA4* y para *MYC*). RPKMs (lecturas por millón). Las barras muestran la media $\pm$ DE. Prueba t de Student no pareada: *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. **c**, Western blot de los niveles endógenos de las proteínas indicadas en distintas líneas celulares de cáncer de pulmón. Se usó TUBULINA como control de carga de proteína total. **d**, PCR cuantitativa en tiempo real de *KDM6A* y *KDM6B* (en relación con *ACTB*) para comparar los niveles de mRNA entre los distintos grupos indicados de líneas celulares de cáncer de pulmón. Las barras muestran la media $\pm$ DE; las pruebas estadísticas se realizaron mediante estudios t de Student no pareados. En los gráficos de *box-whisker*, la banda horizontal dentro de la caja indica la mediana, los bordes inferiores y superiores de la caja los percentiles 25-75 y los extremos indican los valores del mínimo al máximo. * $P = 0.032$ (*KDM6B*) and * $P = 0.016$ (*KDM6A*).

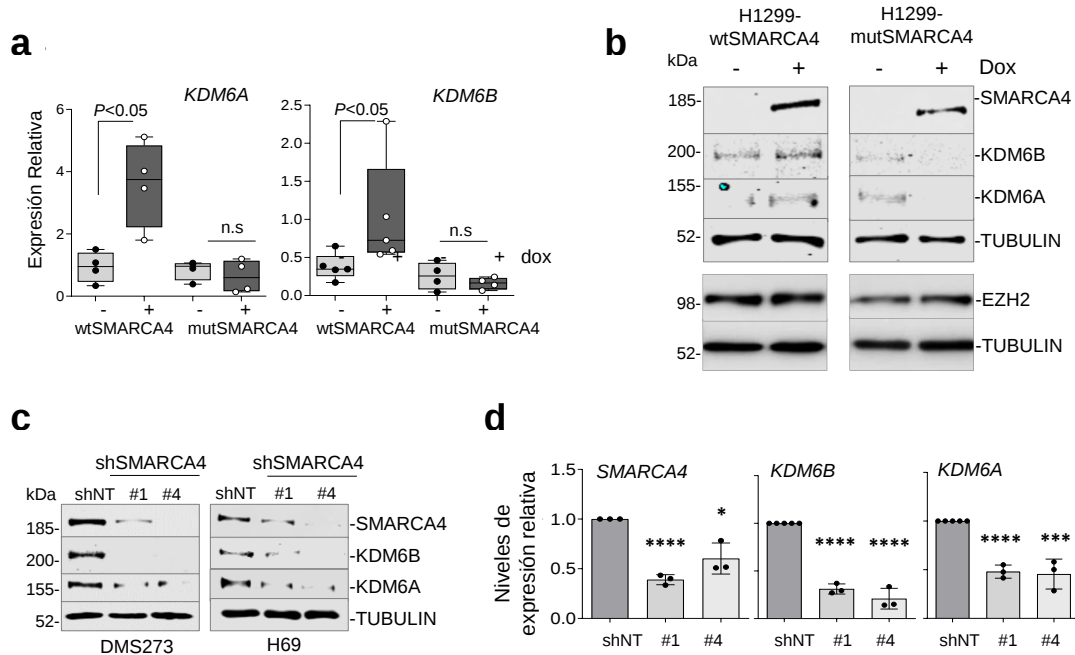


Figura 14. Las células con un *SMARCA4* funcional tienen niveles más altos de KDM6s en comparación con las células con mutaciones inactivantes en dicho gen. **a**, PCR cuantitativa en tiempo real de *KDM6A* y *KDM6B* (en relación con *ACTB*) para comparar los niveles de mRNA en los modelos celulares H1299-wtSMARCA4 y H1299-mutSMARCA4 (doxyciclina, 1 μ g/mL; 72 h). Las barras muestran la media $\pm$ DE; las pruebas estadísticas se realizaron mediante estudios t de Student no pareados. En los gráficos de *box-whisker*, la banda horizontal dentro de la caja indica la mediana, los bordes inferiores y superiores de la caja los percentiles 25-75 y los extremos indican los valores del mínimo al máximo. Se incluyeron cuatro y cinco réplicas biológicas para la determinación de los niveles de *KDM6A* y *KDM6B*, respectivamente, en el modelo celular H1299. * $P = 0.029$ (*KDM6A*) y * $P = 0.032$ (*KDM6B*). **b**, Determinación de los niveles proteicos de KDM6A y KDM6B mediante western blot en los modelos celulares H1299-wtSMARCA4 y H1299-mutSMARCA4 (doxyciclina, 1 μ g/mL; 72 h) con o sin tratamiento con SAHA. Se usa TUBULINA como control de carga. **c**, Western blots de los niveles de las proteínas indicadas en las células indicadas infectadas con shNT y con dos shSMARCA4 distintos (#1, #4). Se utilizó TUBULINA como control de carga. **d**, PCR cuantitativa en tiempo real de *SMARCA4*, *KDM6A* y *KDM6B* (en relación con *ACTB*) para comparar los niveles de mRNA en las células H69 infectadas con el shNT y con dos shSMARCA4 diferentes (#1, #4). $n=3$ para cada gen y shRNA. Barras de error, medias $\pm$ DE de cada réplica. Prueba t de Student no apareada. * $P = 0.011$; *** $P = 0.002$; **** $P < 0.0001$.

Con el propósito de entender los efectos que provoca la restitución de *SMARCA4* sobre la dinámica de las modificaciones de H3K27 a nivel de todo el genoma en el contexto de los tratamientos con SAHA, realizamos la inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación (ChIP-seq) de *SMARCA4*, EZH2, H3K27ac y H3K27me3 en el modelo inducible H1299- wt/mut*SMARCA4*.

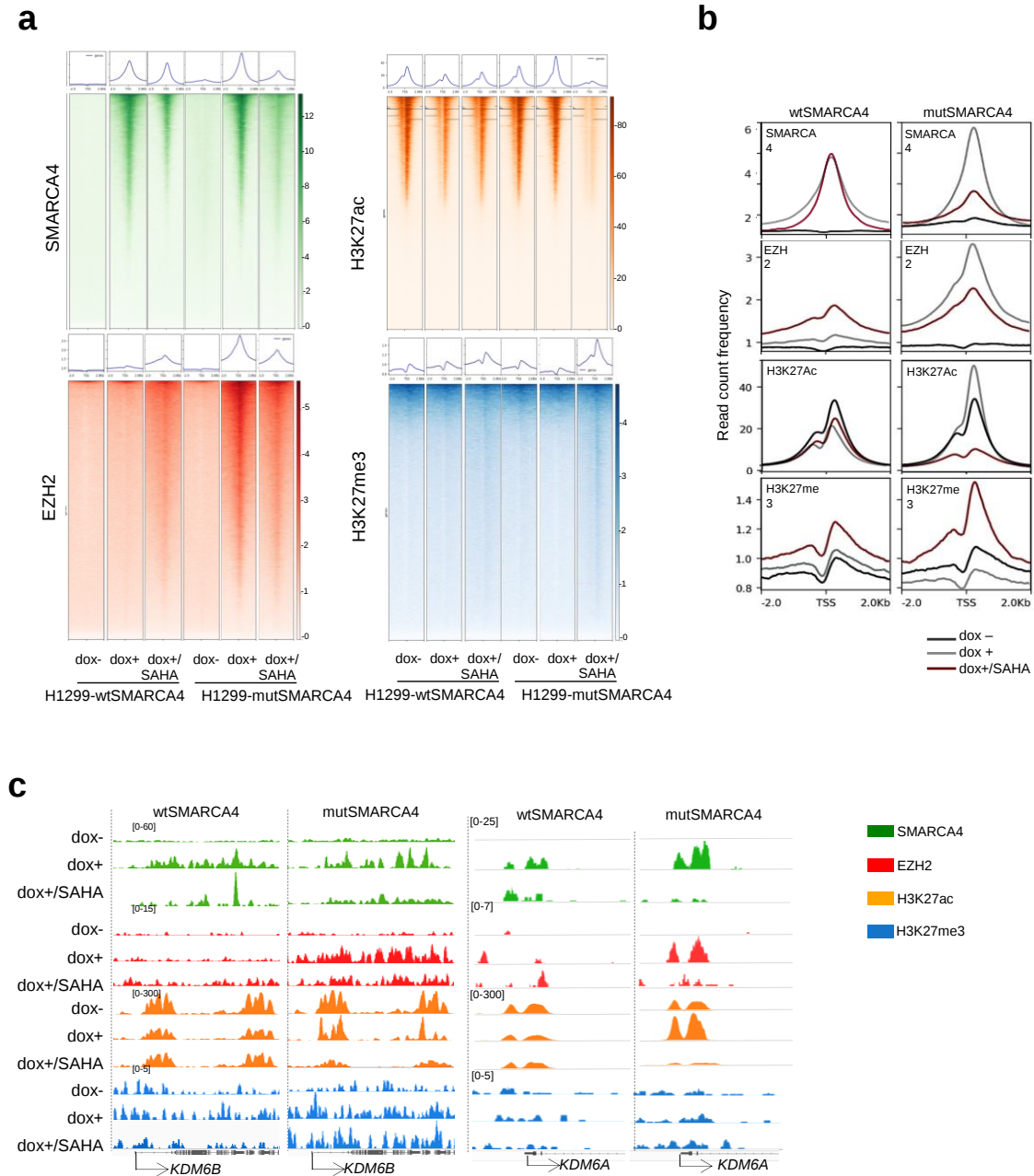


Figura 15. Efectos a nivel genómico de la restitución de *SMARCA4* sobre la dinámica de H3K27. **a**, Heatmaps de las distintas intensidades de ChIP-seq normalizadas, centradas ± 2 kb alrededor de los sitios de inicio transcripcional (TSS) de *SMARCA4*, H3K27ac, H3K27me3 y EZH2, en el modelo H1299. **b**, Frecuencia de recuento de lecturas de heatmaps, en regiones de ± 2 kb centradas en el sitio de inicio transcripcional (TSS) de los genes y en las condiciones indicadas en el modelo inducible H1299 (dox, doxiciclina, 1 μ g/mL y SAHA 1 μ M, durante 72 h). **c**, Snapshots representativos de IGV de los perfiles de ChIP-seq en los locus seleccionados. El modelo inducible se basa en la utilización de H1299-wt*SMARCA4* o H1299-mut*SMARCA4* tras la inducción de *SMARCA4* (dox, doxiciclina, 1 μ M; 72h) con o sin tratamiento con SAHA (1 μ M, 72h).

Como se muestra en la Figura 15a, no se observaron picos de *SMARCA4* antes de la inducción con doxiciclina, como cabía esperar dado que las células H1299 no expresan proteína *SMARCA4* (Figura 15a y Figura 15b). Por otro lado, la ocupación global de la forma salvaje y mutante de *SMARCA4* fue similar en ambos casos, hecho que demuestra que la ausencia del dominio que regula la actividad ATPasa de *SMARCA4* no influye en su reclutamiento a la cromatina (Figura 15a-c y 16a).

La acumulación de la marca H3K27ac sobre los promotores no se vio alterada tras la restitución de la actividad de *SMARCA4* (Figure 16a), aunque se observó una asociación entre la ocupación de *SMARCA4* y la presencia de H3K27ac, en al menos el 80% de los promotores, tanto al expresar la forma salvaje como la mutante (Figura 16b). No obstante, en las células con expresión de la forma *SMARCA4* mutante, los picos de H3K27ac eran más discretos y de mayor intensidad. Además, la expresión ectópica de *SMARCA4* mutante se asoció a una reducción de la distribución de H3K27ac más allá de los picos en los promotores, es decir, hacia el exón 1 y a lo largo del cuerpo del gen. Este fenómeno ocurría en paralelo con un fuerte incremento de la unión de EZH2 al DNA (Figura 15b, c; Figura 16b). En conjunto, estos resultados indican que la sobreexpresión de *SMARCA4* mutante y disfuncional tiene un efecto dominante negativo en la regulación de las modificaciones en H3K27. Este incremento de la unión de EZH2 al DNA tras la expresión de *SMARCA4* mutante estaría en consonancia con hallazgos previos en los que la expresión ectópica de *SMARCA4*-inactivo permitiría la ocupación de los complejos PRC1 y PRC2 en los promotores de las islas CpG a lo largo de todo el genoma¹⁰¹.

En la Figura 15a y 16a, podemos observar que, tras la administración de SAHA, el número de promotores donde se reclutaba la forma ectópica de *SMARCA4* se vieron reducidos a la mitad, sin verse afectada la deposición global de H3K27ac. Se ha descrito que *SMARCA4* no interacciona directamente con el DNA, pero sí que reconoce y se une a las lisinas acetiladas de las colas de las histonas H3 y H4 a través de su bromodominio¹⁵³. De este modo, la reducción en la deposición global de H3K27ac tras el tratamiento con SAHA observada en las células con sobreexpresión de la forma mutante de *SMARCA4*, podría explicar la fuerte disminución en la intensidad global de los picos de *SMARCA4* (Figura 15b).

Por el contrario, el tratamiento con SAHA incrementó el reclutamiento de EZH2 al DNA con el consiguiente aumento de la deposición de la marca H3K27me3, con gran intensidad en especial tras la expresión de *SMARCA4* mutante, de manera coherente con lo expuesto anteriormente. Aunque en las células con expresión de *SMARCA4* salvaje también se observó un incremento en el reclutamiento de EZH2, el efecto fue

mucho menos intenso, lo que se puede atribuir a la menor tasa de eliminación de las marcas H3K27me3 (Figura 15a-b). El hecho de que el SAHA aumente el reclutamiento de EZH2 al DNA y los niveles de H3K27me3 podría ser un efecto de tipo compensatorio para evitar altos niveles potencialmente perjudiciales de acetilación de histonas.

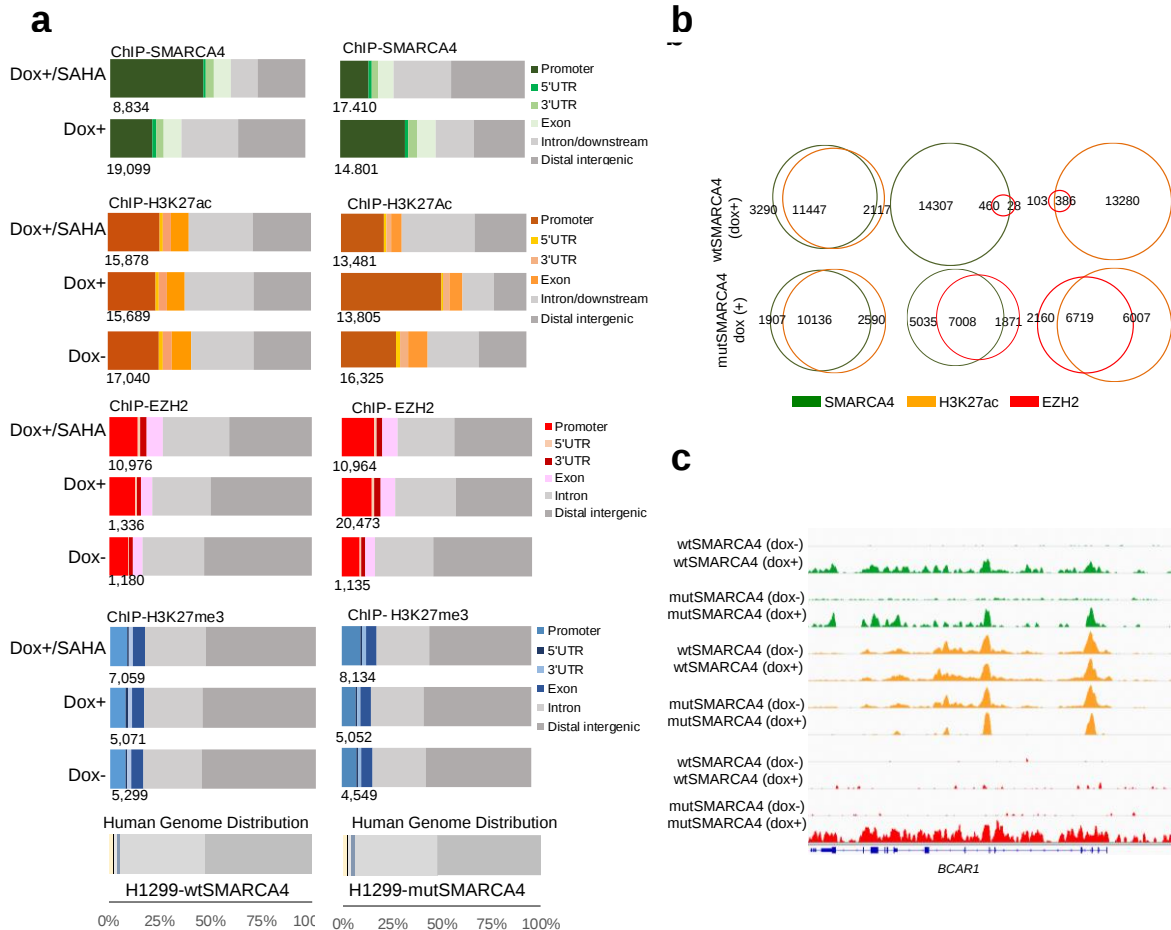


Figura 16. Efectos a nivel de todo el genoma tras la expresión de SMARCA4 salvaje y mutante afuncional tras el tratamiento con SAHA y la dinámica de la modificación de H3K27me3/Ac y la ocupación de EZH2. **a**, Anotaciones funcionales a nivel de todo el genoma para los picos generados mediante el análisis de ChIP-seq. Los promotores se definen como las regiones ± 2 kb alrededor del TSS anotado. Los números debajo de cada barra indican el número absoluto de picos en los promotores para el ChIP-seq de cada proteína y condición indicada. **b**, Diagramas de Venn que representan el solapamiento de los picos de SMARCA4, H3K27ac y EZH2 en las células en las condiciones detalladas. **c**, Snapshots representativos del IGV de perfiles del ChIP-seq en los locus diana seleccionados, realizados en el modelo inducible H1299. El modelo inducible se basa en la utilización de H1299-wtSMARCA4 o H1299-mutSMARCA4 tras la inducción de SMARCA4 (dox, doxiciclina, 1 μ M; 72h) con o sin tratamiento con SAHA (1 μ M, 72h).

SMARCA4 mostró capacidad de unión a los promotores de distintas KDMs, incluyendo la *KDM2B*, *KDM4B*, *KDM6A* y *KDM6B*, entre otras, en paralelo a la presencia de un enriquecimiento en H3K27ac. Sin embargo, también se pudo observar un fuerte aumento concomitante de la ocupación de EZH2 en esas mismas regiones, pero sólo en las células que expresaban la forma mutante de SMARCA4 (Figura 15c).

Estos resultados apoyan la idea de que SMARCA4 regula la expresión de varias KDMs, incluyendo *KDM6A* y *KDM6B*, a través de la ocupación directa del promotor. Por consiguiente, el aumento de EZH2 en el promotor de estos genes es consistente con una falta de activación transcripcional de estas KDMs en las células H1299-mutSMARCA4 (Figura 14a-b).

4.3 La depleción de la KDM6B mimetiza la respuesta de las células deficientes en SMARCA4 al tratamiento con SAHA.

Para profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación de KDM6A/B por SMARCA4 se llevó a cabo primero un análisis minucioso de bases de datos públicas, observándose que los niveles de mRNA de KDM6B estaban inversamente correlacionados con la EC₅₀ de sensibilidad al SAHA (Figura 17a). A continuación, se decidió determinar si la depleción de KDM6A/B incrementaba la resistencia al SAHA en las células de cáncer de pulmón MYCamp. Para ello se seleccionó una batería de shRNAs específicos con la finalidad de disminuir la expresión de *KDM6A* y *KDM6B* en distintas líneas celulares MYCamp (Figura 17b). Se observó que, imitando el comportamiento de las células SMARCA4def, la depleción de los niveles de KDM6B disminuían la capacidad de reducir los niveles globales de la H3K27me3 (Figura 17c) y la capacidad de inhibir el crecimiento celular (Figura 17d) después del tratamiento con SAHA. Por el contrario, la depleción de *KDM6A* no mostró ningún efecto sobre estas características.

Además, en las mismas células MYCamp, la administración de un inhibidor específico de la actividad de las KDM6A/B, el GSK-J4, revirtió la sensibilidad al SAHA de forma dosis-dependiente (Figura 17e). La depleción de KDM6s evitó, también, la capacidad de disminuir H3K27me3 después de la administración de SAHA (Figura 17c).

Estos resultados indican que la resistencia de las células SMARCA4def a la inhibición del crecimiento por SAHA podría deberse a los bajos niveles de KDM6B.

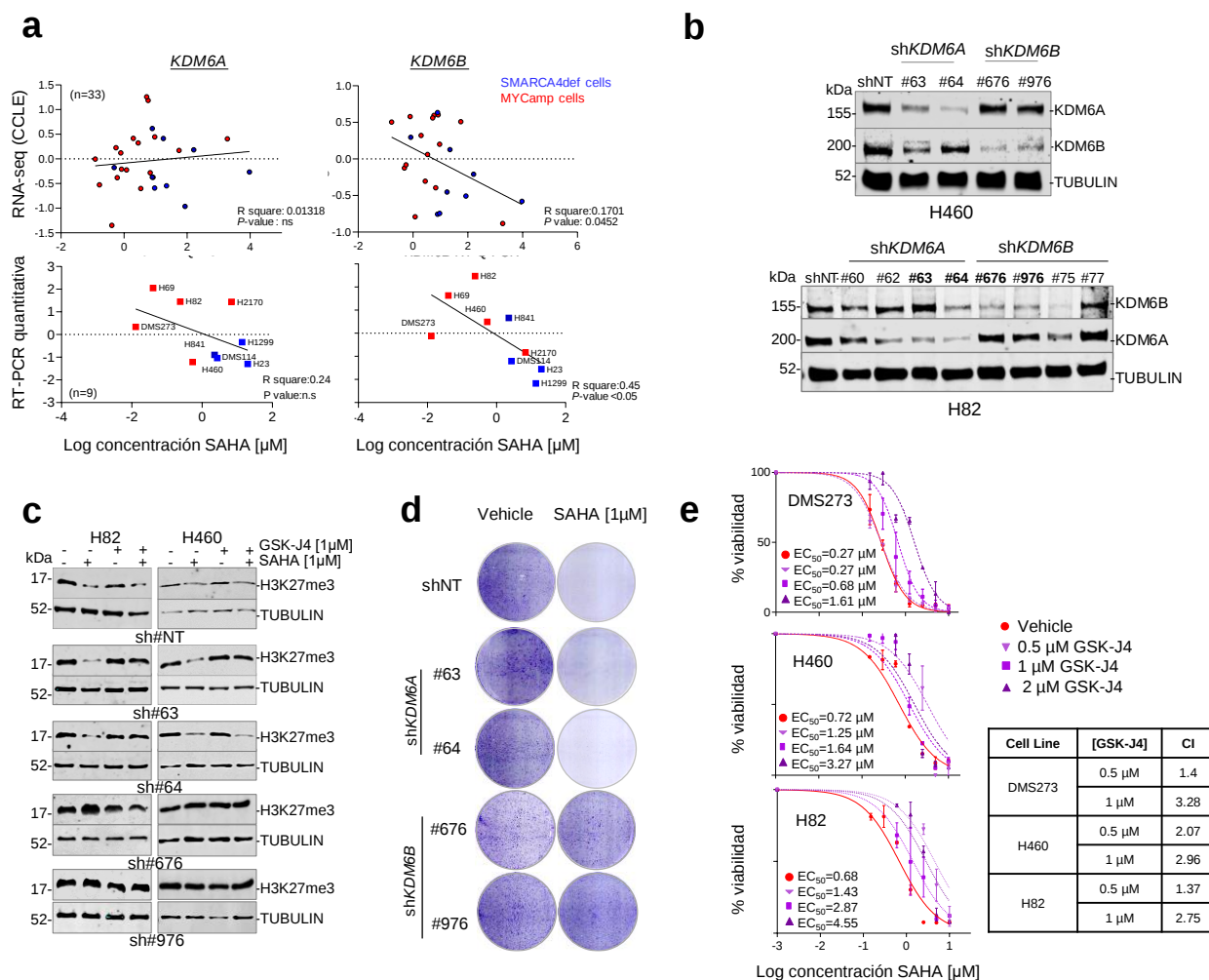


Figura 17. La depleción de KDM6B mimetiza la respuesta de las células SMARCA4def al SAHA. **a**, Correlación significativa entre los niveles de mRNA de *KDM6B* (secuenciación de RNA de la base de datos Sanger o datos de RT-QPCR de nuestro estudio actual) y EC₅₀ para SAHA (paneles superiores, de www.cancerrxgene.org o paneles inferiores, de nuestros propios datos). Cada punto representa una única línea celular tumoral. Análisis de regresión lineal simple. *P < 0.05; n.s, no significativo. **b**, Western blot representativo de los niveles de KDM6s en las líneas celulares indicadas infectadas con un shRNA inespecífico (shNT) y con diferentes shRNA para KDM6A y KDM6B. **c**, Western blot de los niveles de H3K27me3 en las células infectadas con shNT, shKDM6A (#63, #64) o shKDM6B (#676, #976), con y sin tratamiento con GSK-J4 y/o SAHA durante 72h. **d**, Ensayos clonogénicos para las células H460 infectadas con shNT, shKDM6A (#63, #64) o shKDM6B (#676, #976) tratadas con SAHA durante 5 días. **e**, Curvas de viabilidad de las líneas celulares indicadas, medida mediante ensayos MTT, 5 días después del tratamiento con concentraciones crecientes de SAHA y con o sin co-tratamiento con GSK-J4 a distintas concentraciones. Los datos se presentan como media $\pm$ DE de tres replicados técnicos de dos experimentos distintos. A la derecha, tabla que indica el índice de combinación (CI) a las concentraciones indicadas de GSK-J4 (CI medio de dos experimentos independientes). CI < 1, CI = 1 y CI > 1 indican sinergismo, efecto aditivo y antagonismo, respectivamente.

4.4 Las células con inactivación en SMARCA4 son vulnerables a la inhibición de KDM6A/B

Los bajos niveles intrínsecos, junto con la alteración en la regulación de *KDM6A* y *KDM6B* en las células SMARCA4def, además de los defectos observados en la

modificación de H3K27me3, sugieren que estas células podrían ser particularmente susceptibles a la inhibición de la actividad de las KDM6s. Para explorar esta posibilidad, se utilizó el inhibidor GSK-J4, que inhibe varias KDMs principalmente KDM6A y KDM6B. Como se observa en la Figura 18a, el fármaco era tóxico de manera casi específica en células portadoras de un SMARCA4 disfuncional, con una EC_{50} cinco veces menor que en las células MYCamp (Figura 18a). Para los estudios posteriores se decidió emplear GSK-J4 a una concentración de 1 μ M, la cual se aproxima al valor medio de la EC_{50} de las células MYCamp. Como se puede apreciar en la Figura 18b, la inhibición de KDM6s muestra un impacto evidente en el crecimiento celular en las células con inactivación de *SMARCA4*.

A continuación, se usaron dos shRNA contra *SMARCA4* (#1 y #4) en tres líneas celulares de cáncer de pulmón con MYCamp. En comparación con las células control, la depleción de *SMARCA4* redujo significativamente la EC_{50} , lo que demuestra que GSK-J4 es más tóxico en las células tumorales que sin *SMARCA4* funcional (Figura 18c).

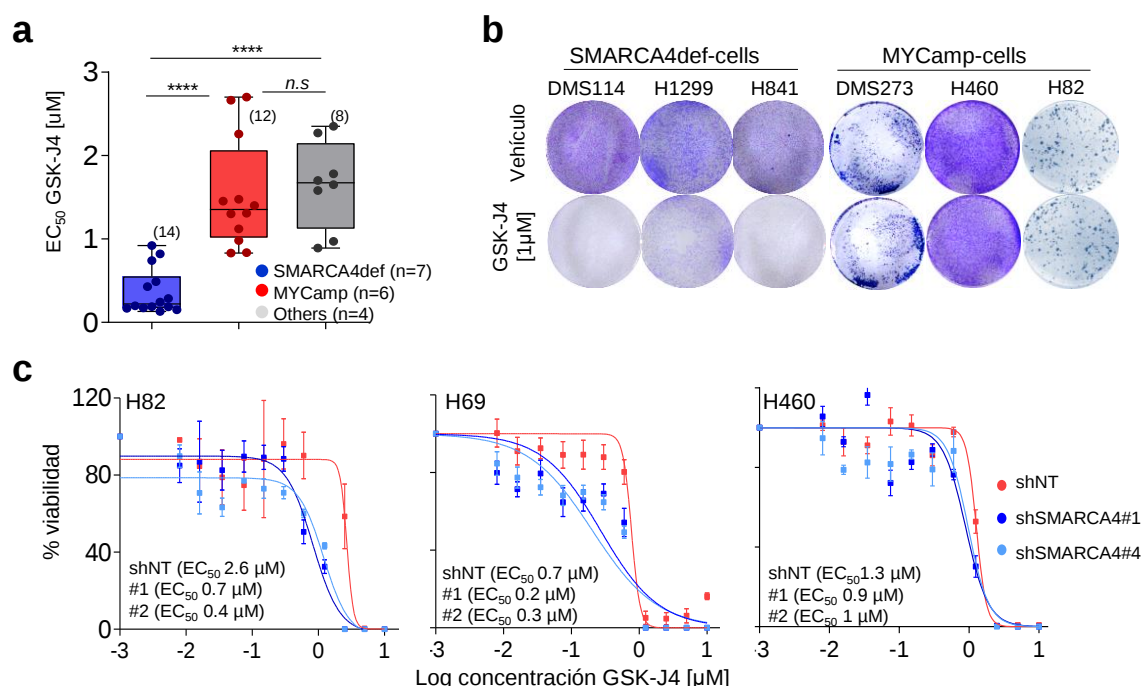


Figura 18. Las células SMARCA4def son vulnerables a la inhibición de las KDM6s. **a**, Distribución y media de los valores EC_{50} para el tratamiento con GSK-J4 en los grupos celulares indicados. Los valores son representativos de cada línea celular y de dos replicados independientes para cada una de ellas. Prueba t de Student no pareada. **b**, Ensayos de colonias representativos para las células y tratamientos indicados. **c**, Ensayo de viabilidad, mediante MTT, de las células indicadas infectadas con un shRNA inespecífico como control (shNT) o con dos shRNA contra *SMARCA4* (#1 y #4) tras el tratamiento con concentraciones crecientes de GSK-J4 durante 5 días. Los datos se presentan como media y DE de tres réplicas biológicas de dos experimentos distintos.

GSK-J4 es un potente inhibidor de las KDM6s, pero se ha descrito que puede suprimir, también, la actividad de otras KDMs¹³⁷. Para determinar hasta qué punto los efectos observados son específicos de las KDM6s se deplecionó *KDM6A* y *KDM6B* en varias líneas celulares. Los resultados mostraron una fuerte inhibición del crecimiento en las células SMARCA4def mientras que la proliferación apenas quedaba afectada en las células MYCamp (Figura 19a). Asimismo, se observó que los niveles reducidos de *KDM6A*, y en menor medida de *KDM6B*, en las células MYCamp mostraron un aumento en la sensibilidad al GSK-J4 (Figura 19b-c).

En conjunto, estos resultados indican que la ausencia de *SMARCA4* en células tumorales genera sensibilidad a la inhibición de KDM6s.

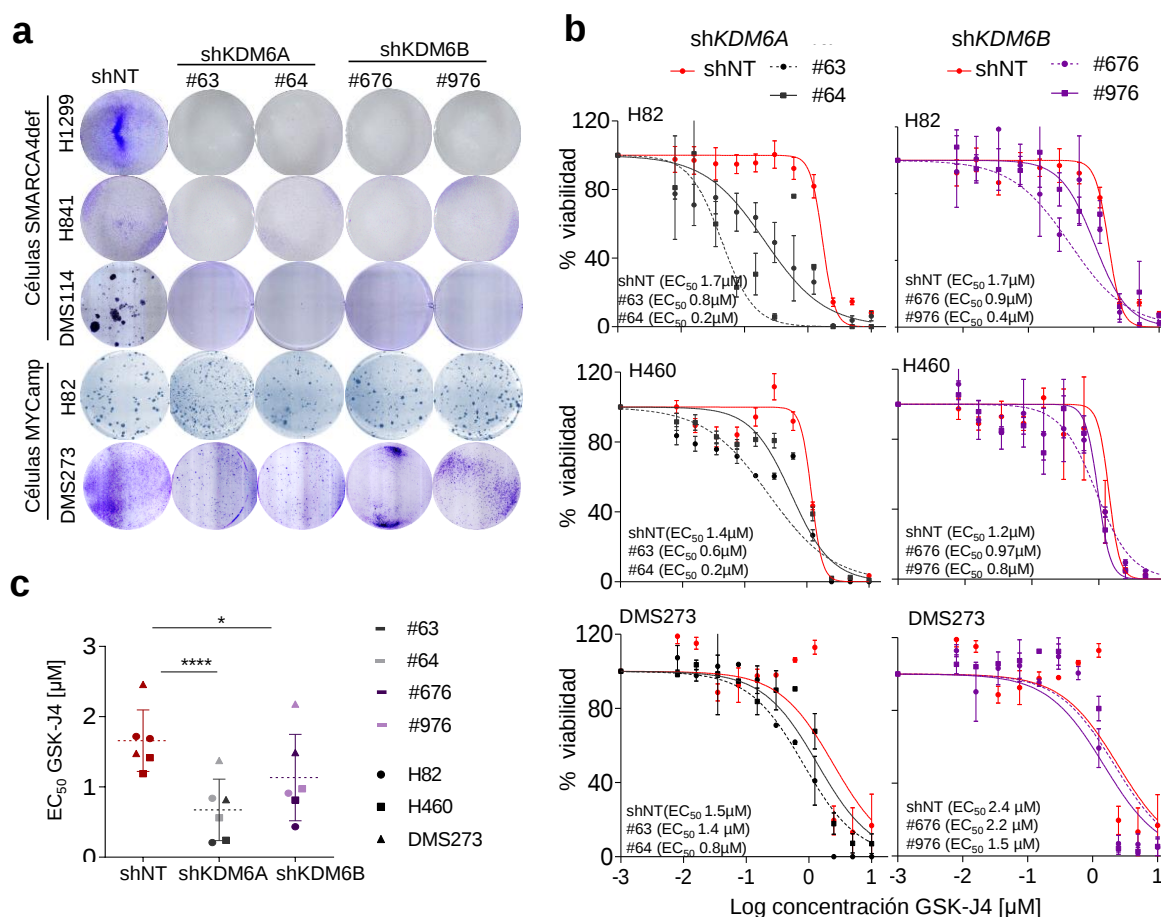


Figura 19. Los niveles de KDM6s influyen en la vulnerabilidad de las células tumorales al tratamiento con GSK-J4. **a**, Ensayos de colonias representativos para las células indicadas infectadas con shNT, shKDM6A (#63, #64) o shKDM6B (#676, #976). **b**, Ensayos de viabilidad mediante MTTs de las líneas celulares indicadas, infectadas con un shRNA control (shNT) o con dos shRNA dirigidos contra *KDM6A* o *KDM6B*, tras el tratamiento con concentraciones crecientes de GSK-J4 durante 5 días. Barras de error, media $\pm$ DE de los triplicados. **c**, Distribución y media de la EC₅₀ de dos experimentos independientes. Las líneas muestran la media $\pm$ DE. Los P valores se calcularon mediante la prueba t de Student pareada. *P < 0.05, **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001; n.s., no significativo.

4.5 La sobreexpresión de *KDM6A* y *KDM6B* revierte la sensibilidad a GSK-J4 en células *SMARCA4def*

A partir de los hallazgos previos, los cuales indican que las células con deficiencia en *SMARCA4* son sensibles al tratamiento con GSK-J4, se decidió evaluar si el aumento en los niveles de *KDM6A* y *KDM6B* por se revertían la sensibilidad a la inhibición del crecimiento inducida por GSK-J4. Para llevar a cabo este estudio, se indujo la sobreexpresión estable de ambas proteínas en un conjunto de células *SMARCA4def* (H1299, H841, DMS114 y A427) (Figura 20a). Tal y como se muestra en la Figura 20b-c, la sobreexpresión tanto de *KDM6A* como de *KDM6B*, provocó un aumento en la EC_{50} en respuesta a GSK-J4 en todas las líneas celulares analizadas. Cabe destacar que este efecto fue mucho más pronunciado tras la sobreexpresión de *KDM6A*.

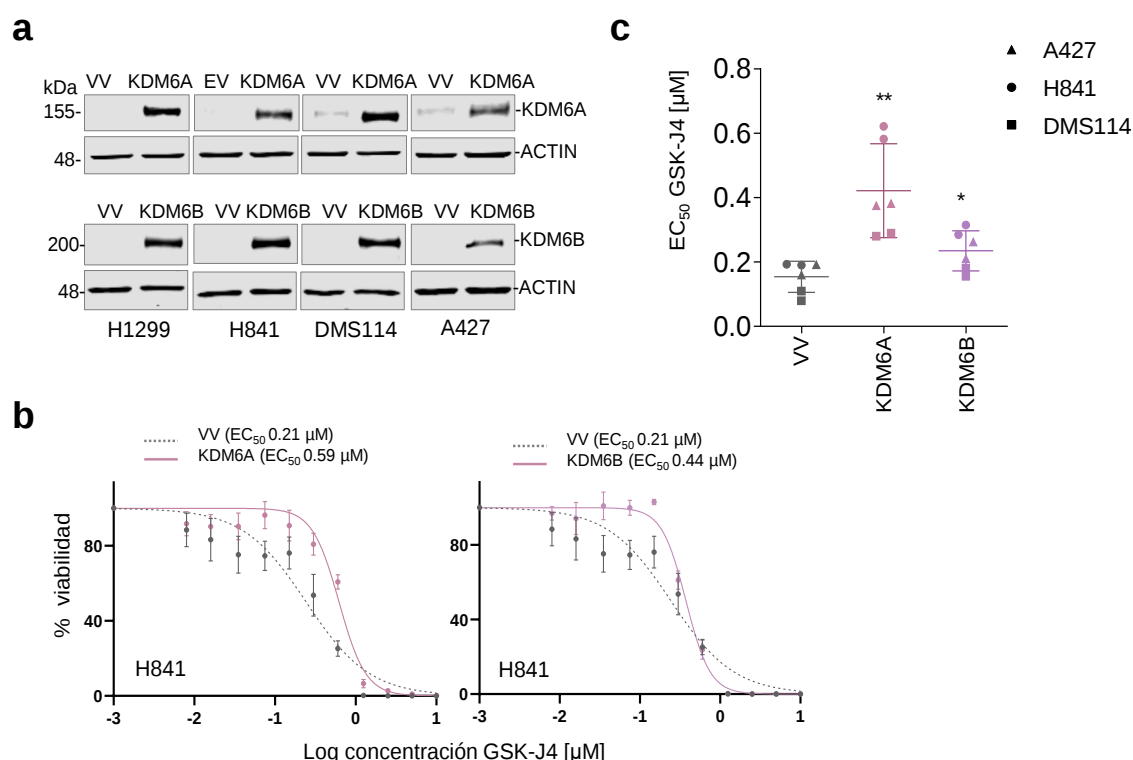


Figura 20. La sobreexpresión de *KDM6s* revierte la sensibilidad a GSK-J4. **a** Western blot que muestra los niveles ectópicos y de sobreexpresión de *KDM6A* y *KDM6B* en las células *SMARCA4def* indicadas, que sobreexpresan las proteínas indicadas. VV, Vector vacío. **b** Ensayo de viabilidad mediante ensayos de MTT de la línea celular H841, 5 días después del tratamiento con concentraciones crecientes de GSK-J4. Líneas, número de células viables en relación con las células no tratadas. Los datos se presentan como media $\pm$ DE de tres replicados en dos experimentos distintos. **c** Distribución y media de la EC_{50} de dos experimentos independientes por cada una de las tres líneas celulares. Las líneas muestran la media $\pm$ DE. Los valores p se calcularon mediante la prueba t de Student pareada. **P = 0.0017; *P = 0.031.

De forma adicional, se llevó a cabo la sobreexpresión simultánea de *SMARCA4* y de *KDM6A* o *KDM6B* en las células H1299 (Figura 21a) y se llevaron a cabo MTTs para medir la sensibilidad de los distintos modelos a GSK-J4 (Figura 21b). Tal y como se muestra en las Figuras 21b-c, la sobreexpresión de *SMARCA4*, por sí sola, triplicó la EC_{50} de la línea celular (EC_{50} de $0.27\mu M$ vs $0.64\mu M$), mientras que la sobreexpresión por de *KDM6A* y *KDM6B*, la incrementó entre 4 y 5 veces (EC_{50} de $1.22\mu M$ y $1.23\mu M$, respectivamente). En ambos casos, la sobre expresión conjunta de *SMARCA4* y *KDM6A* o *KDM6B* indujo un fuerte incremento de la EC_{50} con un valor casi el doble que el de la sobreexpresión de *SMARCA4*.

En conjunto, estos hallazgos apoyan que la vulnerabilidad de las células *SMARCA4*def al tratamiento con GSK-J4 es, al menos en parte, debida a los niveles intrínsecamente bajos de KDM6s.

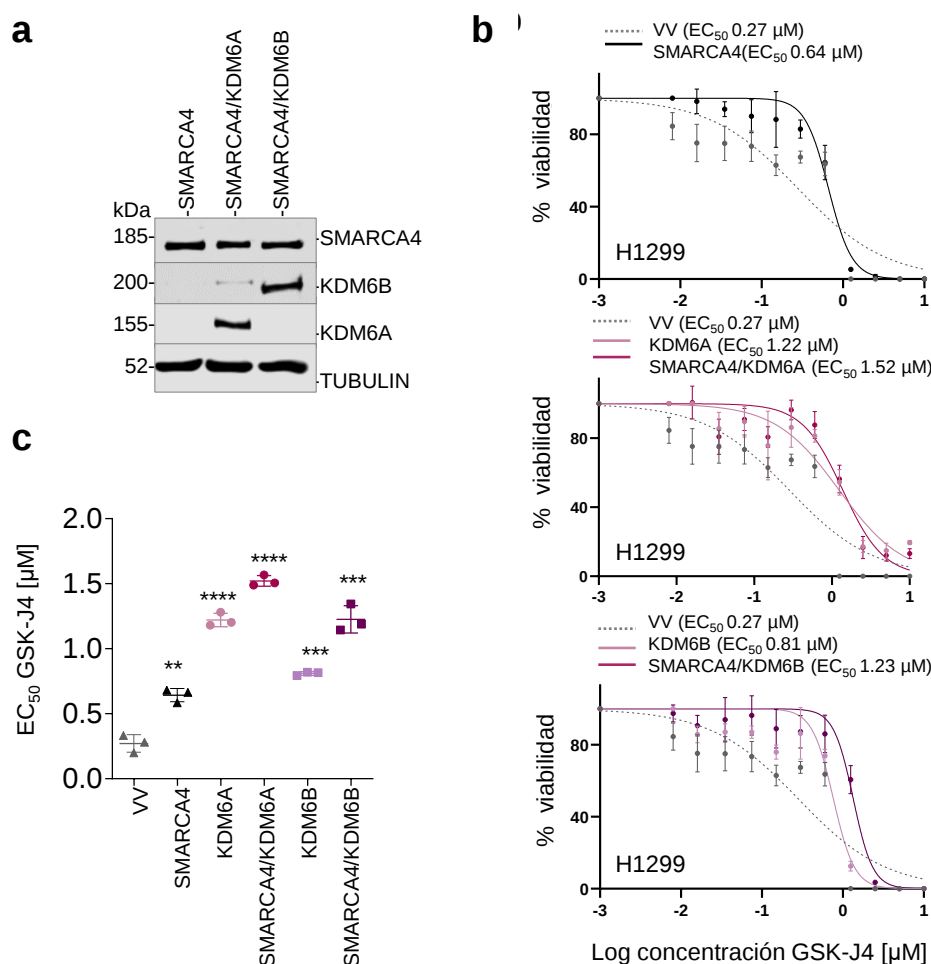


Figura 21. La expresión ectópica de *SMARCA4* aumenta la resistencia a GSK-J4 mediada por la sobreexpresión de *KDM6A* y *KDM6B*. **a**, Western blot de los niveles de KDM6s y *SMARCA4* en las células H1299 que sobreexpresan las proteínas indicadas. **b**, Viabilidad de las líneas celulares indicadas, medida mediante ensayos MTT, 5 días después del tratamiento con concentraciones crecientes de GSK-J4. Los datos se presentan como media $\pm$ DE de tres replicados en dos experimentos distintos. **c**, Distribución y media de la EC_{50} de tres experimentos independientes. Las líneas muestran la media $\pm$ DE. Los P valores se calcularon mediante la prueba t de Student pareada. **P = 0.0016; ***P = 0.0002; ****P < 0.0001.

4.6 GSK-J4 induce la regresión tumoral en modelos in vivo de cáncer de pulmón con mutaciones inactivadoras en *SMARCA4*

Para validar aún más los resultados previos y trasladarlos de líneas celulares a modelos *in vivo*, evaluamos la capacidad del compuesto GSK-J4 para suprimir el crecimiento tumoral en modelos murinos. Se implantaron subcutáneamente dos líneas celulares deficientes en *SMARCA4* (DMS114 y H841) y una línea MYCamp (DMS273) en la espalda de los ratones (n=3 ratones por línea celular). Cuando los tumores alcanzaron una fase de crecimiento exponencial, los ratones fueron eutanasiados y los tumores fueron extraídos y fragmentados. Posteriormente estos tumores se implantaron de forma ortotópica en el parenquima pulmonar de otra cohorte de ratones para generar tumores ortotópicos¹¹⁰. Los animales se asignaron aleatoriamente al grupo de tratamiento o vehículo.

Los resultados del tratamiento con GSK-J4 en los tumores ortotópicos implantados, mostraron un efecto muy significativo en el aumento de la supervivencia de los ratones implantados con tumores *SMARCA4*def (DMS114X y H841X) en comparación con el grupo control tratado con el vehículo, mientras que por el contrario no se observó diferencia alguna entre el grupo control y tratado en los animales implantados con tumores MYCamp (DMS273X) (Figura 22a). Es muy importante destacar que, de manera sorprendente, cinco de los ratones implantados con H841X y dos de los implantados con DMS114X, y que fueron tratados con GSK-J4, sobrevivieron hasta el final del experimento sin mostrar dificultades respiratorias ni otros síntomas asociados a la progresión tumoral, a pesar de que se encontró una masa tumoral fibrótica en el momento de la eutanasia de los animales, lo que sugiere que el tratamiento con GSK-J4 puede inducir la regresión tumoral casi total, en modelos in vivo de cáncer de pulmón con inactivación genética en *SMARCA4*.

Nuestro análisis histopatológico de las masas tumorales reveló la presencia de grandes áreas necróticas en los tumores de los ratones tratados con GSK-J4 en comparación con los tumores de los ratones tratados con el vehículo (Figura 22b-c). La inhibición de la actividad de las KDM6s, responsables de la eliminación de grupos trimetilo y dimetilo de la H3K27me3, puede aumentar la acumulación de esta marca y, por lo tanto, llevar a la represión de la expresión génica en las células tumorales tratadas con GSK-J4, hecho que como consecuencia resulta finalmente en la inhibición del crecimiento tumoral. Consecuentemente con ello, el aumento en los niveles de H3K27me3 observado mediante inmunohistoquímica después del tratamiento con GSK-J4, nos indicó que el compuesto llegó de manera efectiva a los tumores modulando de esta manera la actividad de las KDM6 en las células tumorales (Figura 22d)

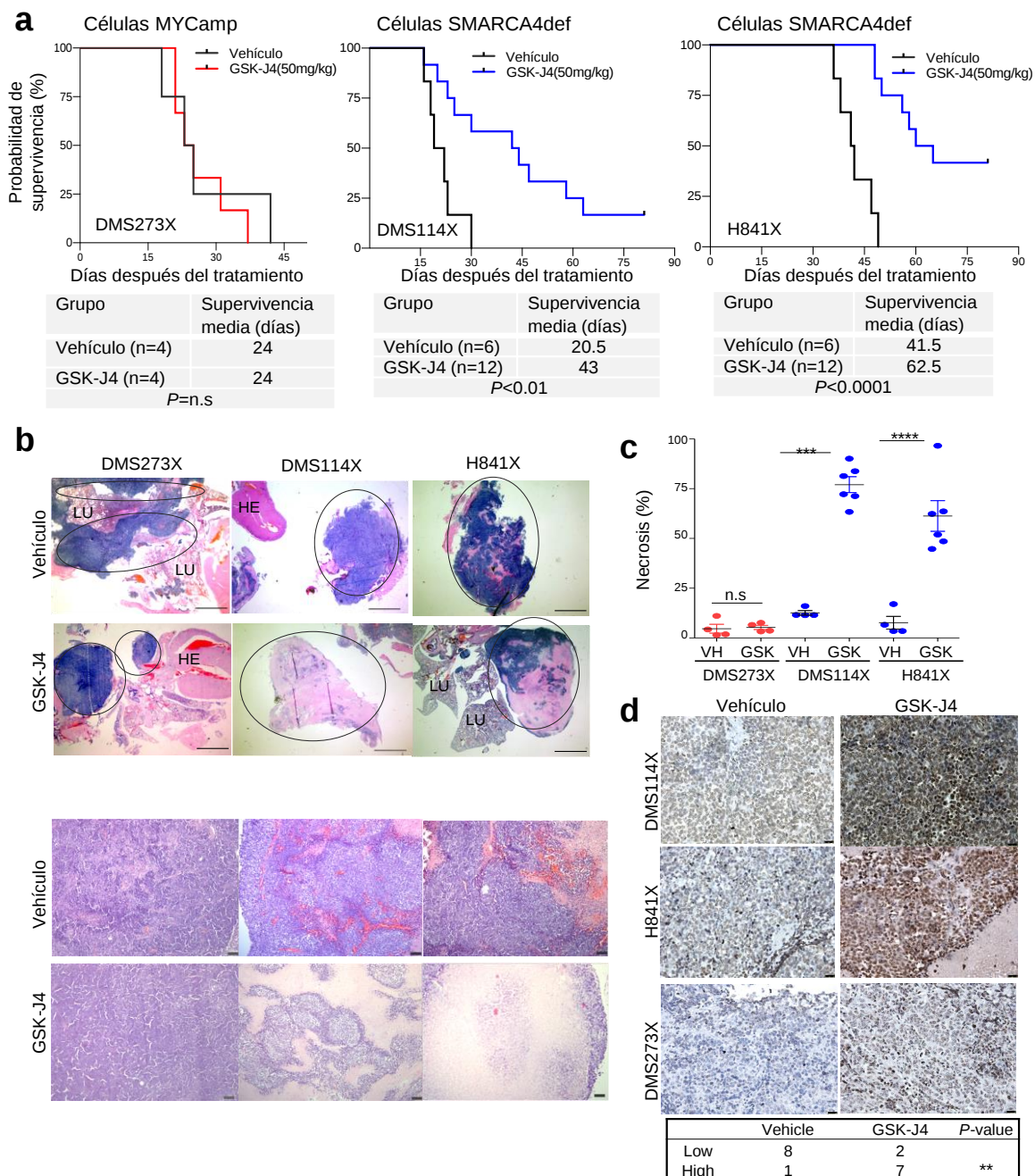


Figura 22. GSK-J4 induce la regresión tumoral de los tumores de pulmón deficientes en *SMARCA4* in vivo. **a**, Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia global de los grupos tratados con GSK-J4 en comparación con los grupos control de cada modelo de ratón con el tumor implantado ortotópicamente indicado. Paneles inferiores, número de ratones (n) y tiempos medios de supervivencia para cada grupo. Se incluyen los P valores de la prueba *two-sided log-rank* (Mantel-Cox). ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$; n.s., no significativo. **b**, Secciones representativas de H&E de los tumores de las líneas celulares indicadas, tratados con GSK-J4 o vehículo. En los paneles superiores, las regiones tumorales están marcadas con círculos. Barras de escala, 2,5mm. Las zonas rosadas dentro de los tumores indican necrosis. HE corazón, LU pulmón. Paneles inferiores, secciones representativas a mayor aumento. Barras de escala, 50 μ m. **c**, Cuantificación de las áreas necróticas. Se indica la media $\pm$ DE para cada grupo. El número de tumores fue n=4 en cada grupo VH y GSK-J4 para los ratones DMS273X; n=4 en el grupo VH y n=5 en los grupos GSK-J4 para los ratones DMS114X; n=4 en el grupo VH y n=6 en el grupo GSK-J4 para los ratones H841X. Prueba t de Student no pareada. *** $P = 0,0006$; **** $P < 0,0001$. VH vehículo. **d**, Inmunotinción representativa de H3K27me3. Barras de escala, 25 μ m. Tabla inferior: valoración de la tinción H3K27me3 en los tumores DMS273X, H841X y DMS114X (tres tumores por cada línea celular y condición) tratados con vehículo o GSK-J4. Valores: Bajo (valores de intensidad 1 y 2); alto (valores de intensidad 3 y 4). Test Two-sided Fisher's Exact. * $P < 0.05$.

Teniendo en cuenta su potencial aplicación clínica, el hallazgo más significativo que se demuestra aquí, es la notable susceptibilidad de las células mutantes en *SMARCA4* a la inhibición de las KDM6s, hecho que se evidenció tanto en cultivos celulares *in vitro* como en modelos de ratón con trasplantes ortotópicos de cáncer de pulmón *in vivo*. Debido a la alta frecuencia y al mal pronóstico de los tumores mutantes en *SMARCA4*, el uso de GSK-J4 u otros compuestos similares podría tener un gran impacto en su tratamiento clínico.

4.7 El tratamiento con GSK-J4 disminuye el crecimiento tumoral en ratones implantados con tumores de ovario de célula pequeña (SCCOHT) deficientes en *SMARCA4*

Con el objetivo de ampliar nuestros hallazgos trasladándolas en otros tipos de cánceres, decidimos usar modelos de carcinoma de ovario de célula pequeña de tipo hipercalcémico (SCCOHT). El SCCOHT es un tipo de cáncer de ovario muy agresivo y poco frecuente que presenta prácticamente como única inactivación genética la pérdida de *SMARCA4* en la práctica totalidad de los casos¹⁰³. Para este estudio, se crearon xenoinjertos ortotópicos derivados de pacientes (PDOXs) a partir de los tumores primarios de dos pacientes (OVA250 y OVA259), implantando los tumores directamente del paciente de manera ortotópica en los ovarios de ratones¹⁵¹. Utilizamos los PDOX derivados en los ratones, en su primer pase, para derivar los cultivos celulares primarios tumorales (OVA250L y OVA259L) (Figura 23d).

En estos modelos derivados de paciente, se confirmó la presencia de mutaciones inactivantes bialélicas en *SMARCA4*, así como se confirmó la ausencia de expresión de la proteína tanto en las células tumorales derivadas de los dos pacientes como en los PDOX (Figura 23a).

En los resultados mostrados en las Figuras 23b y 23c se encuentra la evaluación de los efectos del tratamiento con SAHA y GSK-J4 en los cultivos celulares primarios de SCCOHT, incluyendo, como referencia, dos líneas celulares comerciales de carcinoma epitelial de ovario con *SMARCA4* funcional (OVCAR-3 y OVCAR-8). Se decidió utilizar células de carcinoma de ovario como controles, ya que no se encuentran prácticamente líneas comerciales de SCCOHT, y las pocas que existen son deficientes en *SMARCA4*. Se observó coherentemente con lo observado en líneas de cáncer de Pulmón que el tratamiento con GSK-J4 redujo de manera muy significativa la viabilidad celular, así como la capacidad clonogénica de las células OVA250L y OVA259L, mientras que las líneas con *SMARCA4* salvaje no se veían afectadas. Por otra parte, el tratamiento con

SAHA no afectó el crecimiento celular en ninguno de los tipos celulares deficientes en *SMARCA4* (SCCOHT) mientras sí afectó el crecimiento de los controles (OVCAR-8). A nivel de proteína se pudo observar que las líneas celulares OVA250L y OVA259L presentaban niveles globales muy bajos de H3K27ac, incluso después del tratamiento con SAHA (Figura 23e). También se observó que, de manera similar a lo que sucedió en las células de cáncer de pulmón, los niveles globales basales de H3K27me3 aumentaron tras la administración de SAHA (Figura 23e).

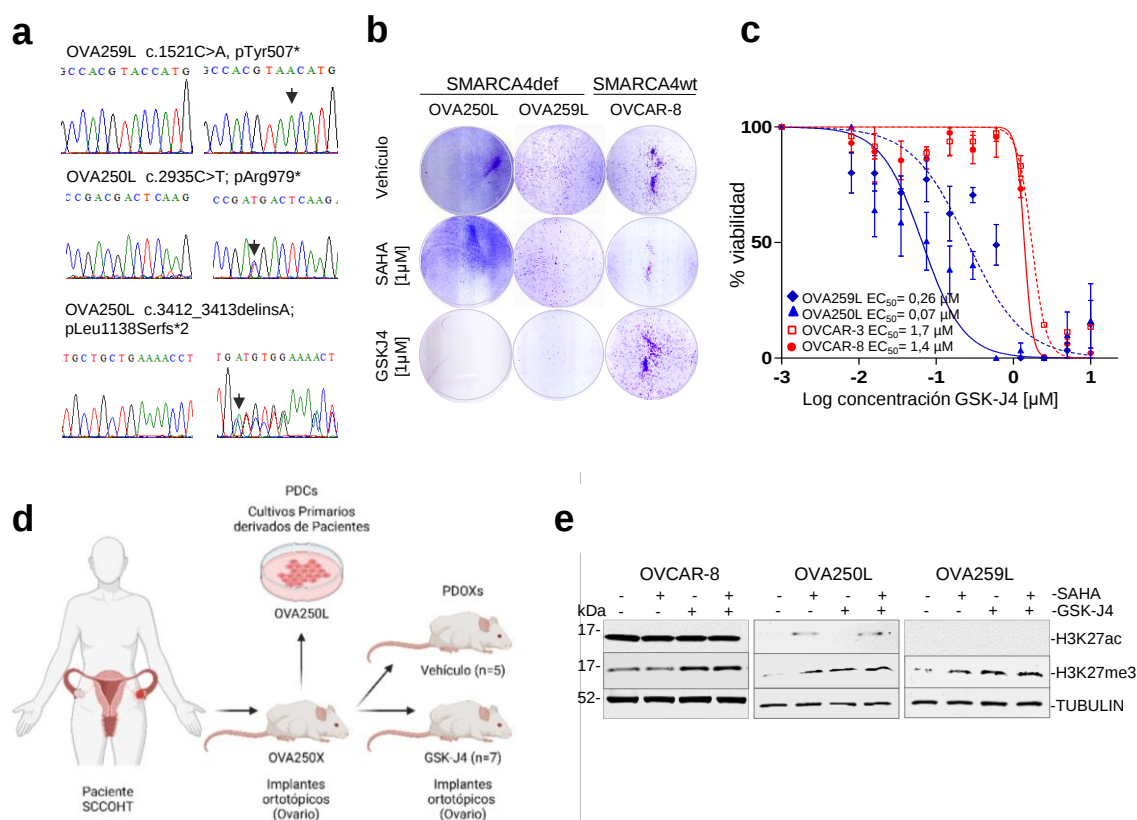


Figura 23. GSK-J4 reduce la viabilidad de los cultivos primarios de SCCOHT generados a partir de tumores primarios derivados de pacientes. **a**, Cromatograma que muestra las alteraciones bialélicas en *SMARCA4*, a nivel de DNA genómico, presentes en los tumores de las dos pacientes de SCCOHT. También se incluye un DNA de referencia normal. **b**, Ensayos de colonias representativos para las células y tratamientos indicados. **c**, Ensayos de viabilidad mediante MTT, tras el tratamiento con concentraciones crecientes de GSK-J4 durante 5 días. Barras de error, media $\pm$ DE de tres réplicas distintas. **d**, Western blot de los niveles endógenos de las proteínas indicadas en las líneas tumorales indicadas. Se utilizó TUBULINA como control de carga. Los tratamientos fueron de 48h, excepto 24h en el caso de GSK-J4 para las células OVA250L. **e**, Representación esquemática del desarrollo de los modelos tumorales en ratones y líneas primarias desarrollados a partir del tumor OVA-250. Este modelo ha sido creado con www.BioRender.com

A continuación, evaluamos el impacto del tratamiento con GSK-J4 en el crecimiento *in vivo* del tumor OVA250X. Implantamos ortotópicamente tumores primarios en los ovarios de hembras de ratón nude y observamos que, tras el tratamiento con GSK-J4, se provocaba una reducción en el tamaño y en el peso de los tumores de los ratones tratados en comparación con los controles (vehículo) (Figura 24a). Aunque las diferencias de tamaño entre los grupos no alcanzaron significación estadística, por el contrario, el examen histológico reveló la presencia de muy pocas células viables en los tumores de los ratones tratados con GSK-J4.

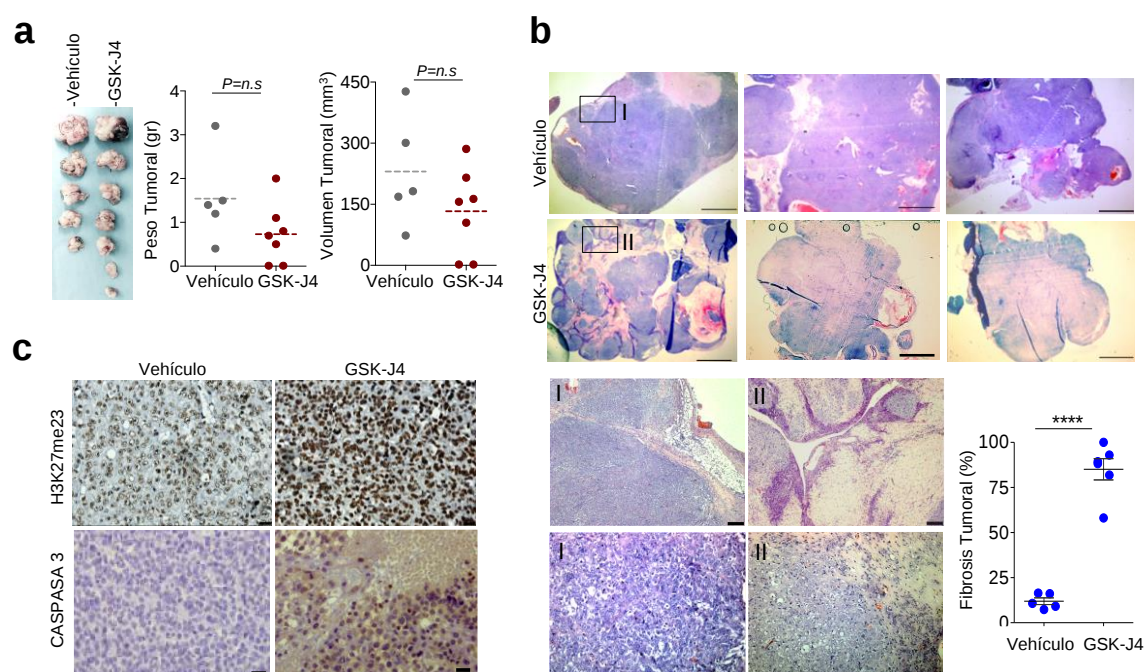


Figura 24. GSK-J4 reduce la viabilidad de las células tumorales de SCCOHT implantadas ortotópicamente en ratones. **a**, Panel izquierdo, fotografías patológicas macroscópicas de las necropsias de los tumores ováricos implantados en los ratones y resecados al final del experimento, después de ser tratados con el vehículo (n=5) o GSK-J4 (n= 7). Paneles de la derecha, volumen y peso de cada tumor. Prueba t de Student no pareada. n.s. no significativo. **b**, Secciones representativas de tinción H&E de los tumores del grupo de ratones tratados, tal y como se indica (n = 5 en cada grupo). Las zonas rosadas del interior de los tumores indican fibrosis. Barras de escala, 2,5 mm; paneles inferiores, ampliación de las zonas indicadas (rectángulo); barra de escala, 50 μ m (arriba) y 25 μ m (abajo); panel inferior derecho, cuantificación de las zonas fibróticas. Prueba t de Student no pareada. ****P < 0.0001. **c**, Inmunotinción representativa de H3K27me3 y de CASPASE-3 para los tumores OVA250X tratados con el vehículo o GSK-J4. Barras de escala, 25 μ m.

En contraste con el modelo ortotópico de cáncer de pulmón, en el modelo de OVA250X se observó una muy abundante cantidad de tejido fibroso en lugar de necrosis. Esto podría deberse a que los tumores OVA250X fueron derivados directamente de tumores primarios de pacientes en lugar de las líneas celulares de cáncer (Figura 24b). Por otro

lado, el tratamiento con GSK-J4 en el modelo OVA250X, coherentemente con su función como inhibidor de las KDM6s, provocó un aumento de los niveles de H3K27me3, similarmente a lo observado en el modelo de cáncer de pulmón. Además, se observó un aumento de la actividad de la Caspasa 3, indicando la presencia de apoptosis, en los ratones tratados con GSK-J4. de los tumores SCCOHT (Figura 24c).

4.8 La inactivación genética en otro miembro específico del complejo SWI/SNF vulnerabilidad las células tumorales a la inhibición de KDM6A/6B

Desde un punto de vista epidemiológico, las mutaciones inactivadoras en los distintos miembros de los complejos SWI/SNF suelen mostrarse de forma mutuamente excluyente (Figura 25a). En este estudio, se investigó si las mutaciones en otros miembros del complejo SWI/SNF, además de *SMARCA4*, conferían, también, sensibilidad a la inhibición de KDM6 por GSK-J4. Dado que no todos los miembros del complejo presentan mutaciones truncantes en cáncer (Figura 25a), decidimos realizar un análisis mediante la utilización de bases de datos (DepMap, n=260 líneas celulares de cáncer) con la finalidad de comparar la expresión de los distintos miembros del complejo SWI/SNF con mutaciones inactivantes, así como la expresión de *KDM6A* y *KDM6B*, en líneas celulares deficientes y proficientes en SWI/SNF (Figura 25b).

En ambos gráficos se puede apreciar como la expresión de *KDM6A* y *KDM6B* tiende a ser menor en líneas celulares de cáncer con deficiencia en el complejo SWI/SNF, en comparación con las células de control (MYCamp y Otras). De manera más específica, se ha podido observar que los niveles de expresión de *KDM6B* se muestran de forma significativamente más dependientes del estado genético de algunos miembros del complejo SWI/SNF que los niveles de expresión de *KDM6A* (Figura 25b).

A parte de la correlación de expresión de las KDM6s, realizamos un extenso análisis de cribado de dianas específicas para GSK-J4 (Figura 25c), evaluando la sensibilidad a GSK-J4 en un panel de 105 líneas celulares de cáncer disponible en la base de datos DepMap. En este contexto, descubrimos que, del mismo modo que sucede en los tumores deficientes para *SMARCA4*, GSK-J4 es especialmente tóxico en líneas celulares con inactivación en *SMARCB1* y *BRD7*. Para corroborar esta observación, llevamos a cabo una validación *in vitro* mediante ensayos de viabilidad MTT en un panel de distintas líneas celulares de cáncer con inactivación genética en diferentes componentes del complejo SWI/SNF (Figura 25c).

Con el ensayo de MTT realizado, se confirmó que, además de *SMARCA4*, las mutaciones en *BRD7* y *SMARCB1* son claramente susceptibles a la inhibición de

KDM6s, mientras que las mutaciones en otros miembros del complejo SWI/SNF no mostraron diferencias significativas en comparación con los modelos control, validando así nuestra observación *in silico* previa (Figura 25c). Debido a su interacción directa con los nucleosomas, *SMARCA4* y *SMARCB1* son subunidades esenciales para la funcionalidad del complejo. En este contexto, *BRD7* también presenta dominios de unión de reconocimiento y unión al DNA⁷⁶.

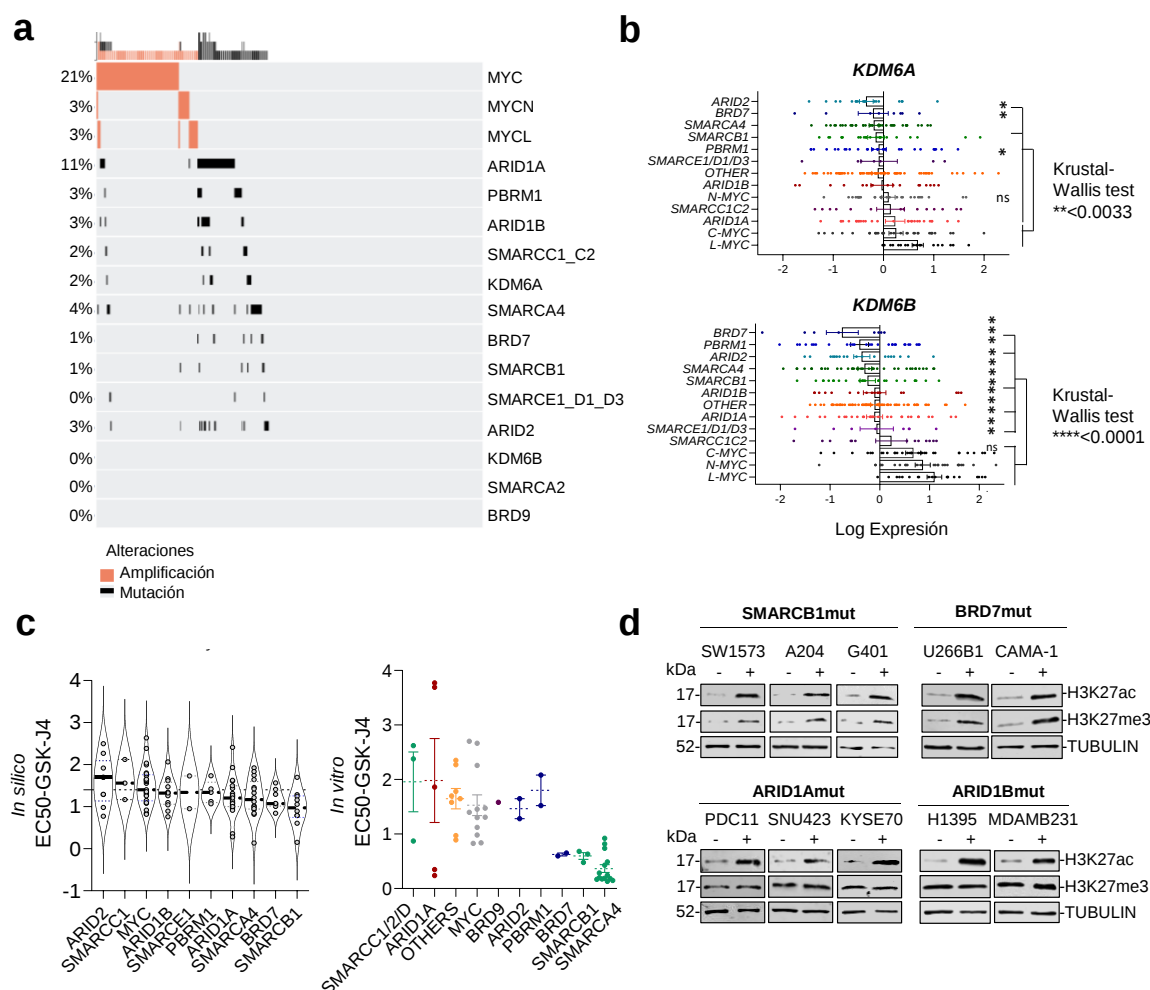


Figura 25. Sensibilidad de otros miembros del complejo SWI/SNF a la inhibición de KDM6A/B. **a**, Oncoprint de la presencia de mutaciones truncantes en los miembros del complejo SWI/SNF en distintas líneas celulares cancerígenas (información extraída de la base de datos www.depmap.org, n=168). **b**, Correlación entre los niveles de expresión de mRNA de *KDM6A* y *KDM6B* (información extraída de la base de datos www.depmap.org, n=268) y la presencia de mutaciones inactivadoras en los genes que codifican subunidades del complejo SWI/SNF en distintas líneas tumorales. Las líneas celulares se seleccionaron en función de la presencia de mutaciones truncantes en una subunidad única y específica del complejo SWI/SNF (n=113), la amplificación en genes de la familia MYC (n=55) y líneas celulares sin mutación en ningún miembro de SWI/SNF y sin amplificación de MYC (n=100). Se incluyen los P valores de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis de los gráficos. **c**, Panel izquierdo, distribución y media del cribado de dianas de la EC₅₀ de GSK-J4 de la base de datos www.depmap.org (n=103), en los grupos celulares indicados portadores de mutaciones en distintos miembros del complejo SWI/SNF. Panel derecho, distribución y media de la compilación de la validación *in vitro* de las EC₅₀ en un panel de n=50 líneas celulares comerciales de cáncer. Cada punto representa la mediana de dos réplicas independientes. **d**, Western blots representativos de los niveles globales de las proteínas y marcas de histonas indicadas tras el tratamiento con SAHA en las células con mutaciones inactivadoras en *SMARCB1*, *BRD7*, *ARID1A* y *ARID1B*. Se usó TUBULINA como control.

Además, se observó que, del mismo modo que sucede con las células SMARCA4def, el tratamiento con SAHA incentivó la acumulación anómala de H3K27me3 en las líneas celulares que se mostraron vulnerabilidad a la inhibición de KDM6A/B (Figura 25d). Este aumento inesperado indica un defecto específico en la actividad desmetilasa encargada de eliminar estas marcas represivas. Asimismo, esta acumulación aberrante de H3K27me3 podría ser un posible factor predictivo de la respuesta a GSK-J4 en líneas celulares tumorales.

4.9 La re-expresión ectópica de *SMARCB1* reduce la muerte celular mediante la up-regulación de la KDM6A/6B e induce un fenotipo de diferenciación endotelial, promoviendo la parada del ciclo celular y senescencia

Dado el papel fundamental que desarrolla *SMARCB1* en la tumorigénesis de la mayoría de los Tumores Rabdoides Malignos (MRT), en los que prácticamente todos los casos están impulsados por la inactivación genética de *SMARCB1*¹¹¹, decidimos continuar nuestro proyecto profundizando en el estudio de la relación entre *SMARCB1* y *KDM6A/6B*. Los MRT son una forma poco común pero altamente agresiva de tumores sólidos pediátricos con una tasa de supervivencia global a 5 años de tan solo el 23%. Estos tumores pueden clasificarse principalmente en tumores teratoides/rabdoides atípicos (AT/RTs), que se localizan en el cerebro, y MRTs extracraneales (ecMRTs), que se pueden encontrar en una gran variedad de tejidos como el riñón, hígado, pulmón y tejidos blandos¹¹².

En primer lugar, restauramos la expresión ectópica de *SMARCB1* en dos líneas tumorales mutantes para este gen: una línea celular de cáncer de pulmón adulto (SW1573) y un modelo tumoral rabdoide pediátrico (G401). Como podemos observar en la Figura 26a, de forma similar a los tumores con inactivación en *SMARCA4*, la re-expresión ectópica de este componente central del complejo SWI/SNF induce la recuperación de los niveles de expresión de *KDM6A* y *KDM6B*, que se mostraban reducidos tras el tratamiento con GSK-J4. Además, hemos observado que la expresión de *SMARCB1* tiende a disminuir los niveles globales de H3K27me3, mientras que aumenta los niveles de H3K27Ac tras el tratamiento con inhibidores de KDM6s. Asimismo, como se puede apreciar en el ensayo clonogénico (Figura 26a), la presencia de *SMARCB1* reduce la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con GSK-J4 induciendo la inhibición de la proliferación celular.

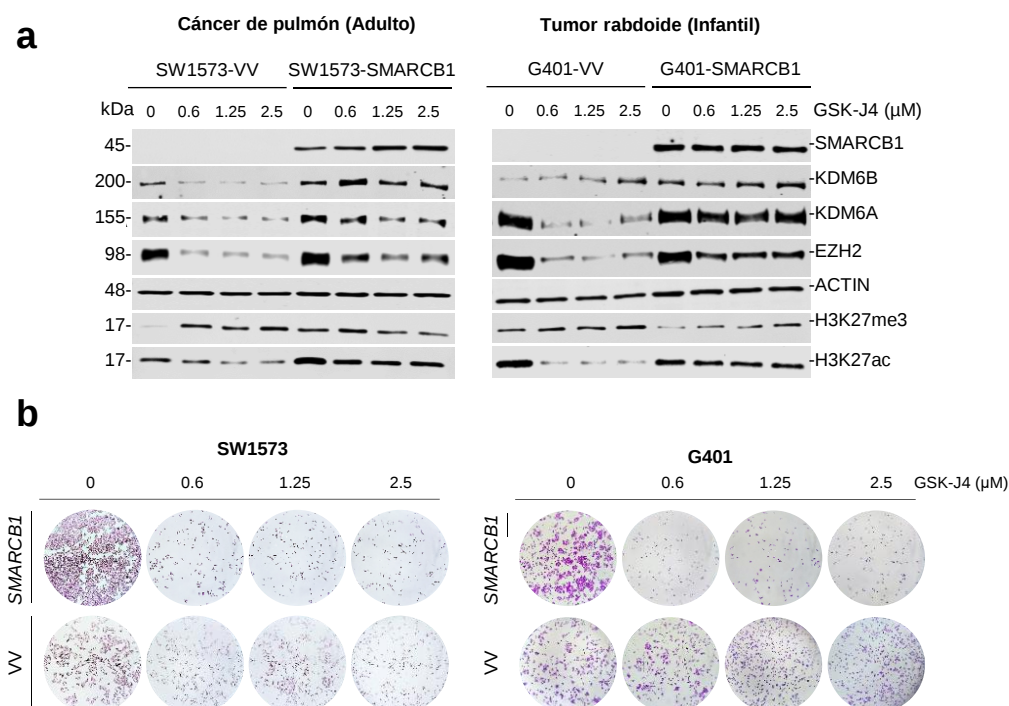


Figura 26. Influencia de la reexpresión ectópica de *SMARCB1* en la respuesta a GSK-J4. **a**, Western blot de los niveles de las proteínas indicadas en los dos modelos celulares utilizados (Modelo adulto de cáncer de pulmón – SW1573 y modelo infantil de tumor rabdoide – G401) antes y después de la recuperación ectópica de *SMARCB1* y en función de la dosis de tratamiento con GSK-J4. Se usó ACTINA control de carga de proteínas. **b**, Ensayos clonogénicos representativos para las líneas celulares, con las condiciones y tratamientos indicados. VV, vector vacío.

Con la finalidad de comprender los mecanismos moleculares subyacentes a la detención de la proliferación celular y la resistencia a la inhibición de KDM6 observada tras la restauración de *SMARCB1*, decidimos realizar la secuenciación del RNA (RNA-seq) de ambos modelos tumorales (pediátrico y adulto), tanto antes como después de la restauración del gen y con y sin ser tratadas con GSK-J4 (Figura 27). Tal y como se muestra en el Heatmap de la Figura 27a, observamos que el impacto de *SMARCB1* en la modificación global de la expresión génica muestra un perfil bastante distinto entre el modelo pediátrico y el adulto. Este hecho podría explicarse porque los tumores rabdoides infantiles tienen genomas relativamente homogéneos en cuanto al estado mutacional, siendo *SMARCB1* la principal mutación conductora de estos tumores. Sin embargo, ambos modelos comparten similitudes importantes en las principales vías alteradas por *SMARCB1* y GSK-J4.

Tal y como observamos en nuestros resultados previos, el tratamiento con GSK-J4 induce parada del ciclo celular y apoptosis (Figura 27b) en ambos modelos deficientes para *SMARCB1*. Además, como se muestra en la ontología génica (GO) de la Figura

27c, en ambos modelos, pero especialmente en el modelo pediátrico, observamos que *SMARCB1* por sí solo induce un aumento en la expresión de genes implicados en la angiogénesis y organización de la matriz extracelular, así como una disminución en las vías de división celular, promoviendo la detención del ciclo celular y desencadenando marcadores de senescencia celular.

Estos procesos se observan también en combinación con GSK-J4 (Figura 27d). Interesantemente, en el modelo adulto no se observa parada del ciclo celular ante la restauración ectópica de *SMARCB1*. Hecho que pudiera relacionar-se con la presencia de mutaciones en SW1573 en el regulador del ciclo celular *CDKN2A*. En este contexto, se ha descrito que *SMARCB1* es un co-activador del factor oncogénico *MYC*, promoviendo y estimulando su actividad¹¹⁵. Además, este factor se ha descrito, también, como regulador crítico de la agresividad en los tumores rabdoides con inactivación para *SMARCB1*¹⁵⁴, además de relacionarse con la senescencia inducida por oncogenes¹⁵⁵. *SMARCB1* también se ha descrito como estabilizador de p53, a través de la regulación de MDM2, la cual promueve la degradación de p53, promoviendo la progresión tumoral en tumores deficientes para *SMARCB1*¹¹⁴. Interesantemente, p53 es un máster regulador del ciclo celular y apoptosis¹⁵⁶, así como la angiogénesis¹⁵⁷ y la autofagia¹¹⁶, a través de la interacción con distintas vías de señalización que podrían ser de gran interés para nuestra comprensión de estos mecanismos.

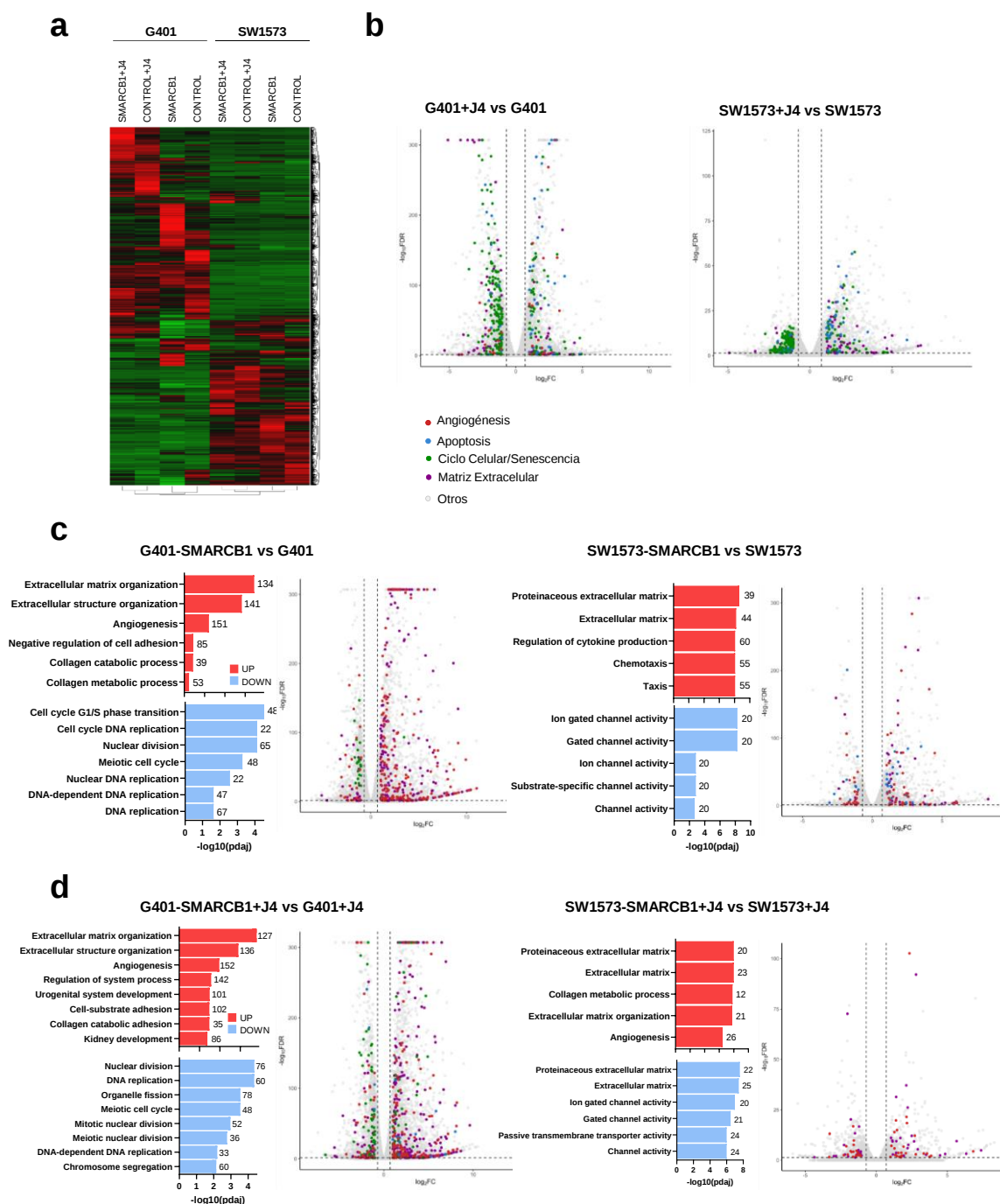


Figura 27. Perfil de expresión de RNAseq de la recuperación ectópica de *SMARCB1* y/o con GSK-J4. **a**, Heatmap de los niveles de RNA total (RPKM, lecturas/kb/millón) de las líneas celulares indicadas y con las condiciones indicadas. **b**, Volcano plots representativos de los resultados del estudio Gene Ontology (GO) obtenidos a partir del RNAseq para los p valores ajustados (pdaj) de los genes significativamente enriquecidos que suben o bajan en las líneas y condiciones indicadas: G401 tratada con GSK-J4 comparada con la línea sin tratar (G401+J4 vs G401) y SW1573 G401 tratada con GSK-J4 comparada con la línea sin tratar (SW1573+J4 vs SW1573). Los genes relacionados en cada mecanismo se muestran coloreados según la leyenda. **c-d**, Barras representativas para p valor ajustado (pdaj) del estudio Gene Ontology (GO) para los genes significativamente enriquecidos que suben (UP, rojo) o bajan (DOWN, azul) comparando las condiciones indicadas en la líneas indicadas: G401 y SW1573 con re-expresión ectópica de *SMARCB1* en comparación con la línea parental (c) y G401 y SW1573 con re-expresión ectópica de *SMARCB1* y tratamiento con GSK-J4 en comparación con la línea parental tratada (G401-SMARCB1+J4 vs G401+J4). Se indica el número de genes que cambian y el mecanismo al cual están relacionados. Volcano plots representativos de los resultados del estudio Gene Ontology (GO). Se muestran los genes involucrados en cada mecanismo, según la leyenda indicada en b.

En relación con los resultados obtenidos previamente en el ensayo clonogénico (Figura 26b) y la firma de expresión del RNA-seq (Figura 27a-c), quisimos validar si el efecto citostático de *SMARCB1* observado *in vitro* y la regulación a la baja de genes relacionados con el ciclo celular y la mitosis estaban relacionados con la inducción de senescencia celular. Para ello, realizamos un ensayo de detección de la actividad de la enzima β -galactosidasa, un clásico marcador de senescencia¹⁵⁸, antes y después del tratamiento con GSK-J4.

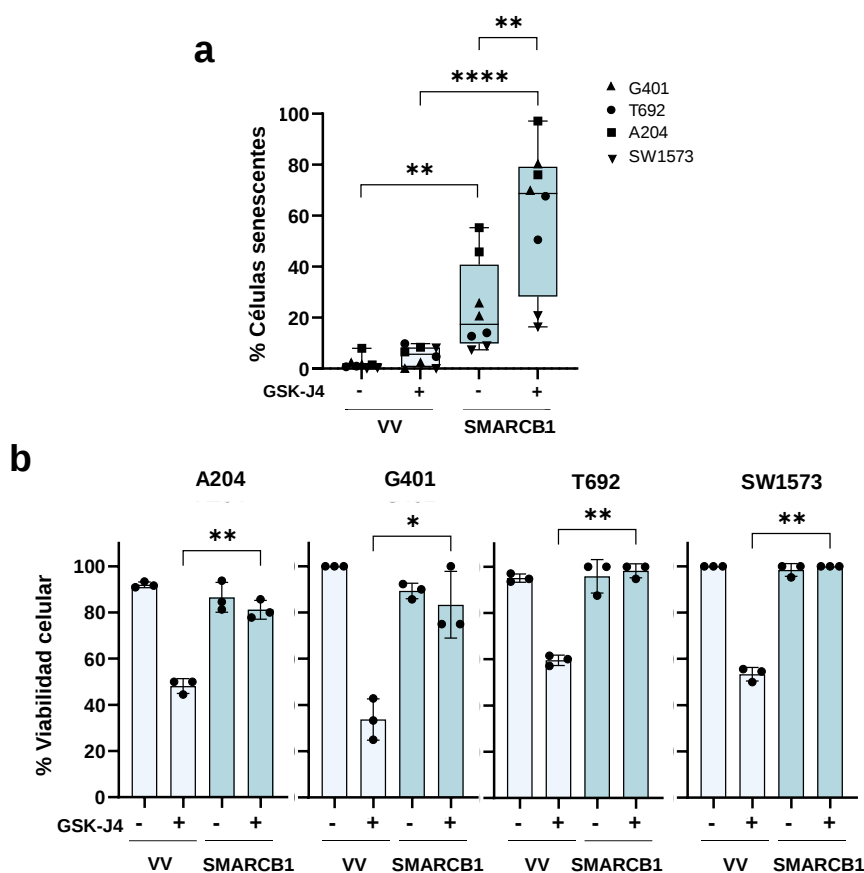


Figura 28. *SMARCB1* reduce la muerte celular promoviendo parada del ciclo celular y senescencia. **a**, Distribución y media del porcentaje de células senescentes, detectadas mediante un ensayo de β -Galactosidasa, en las líneas celulares indicadas antes y después de la recuperación de *SMARCB1* y el tratamiento con GSK-J4 (1 μ M; 72h). Cada punto representa una réplica biológica. Las barras de error muestran +/- DE de la media, los P valores se calcularon mediante la prueba t de Student pareada. **P = 0.0039; ****P < 0.0001; *P = 0.009. **b**, Ensayo de viabilidad celular detectada mediante azul de tripano en distintas líneas celulares antes y después de la recuperación de *SMARCB1* y el tratamiento con GSK-J4 (1 μ M; 72h). Las barras de error muestran +/- DE de la media, los P valores se calcularon mediante la prueba t de Student pareada. **P = 0.0062; *P = 0.0381; **P = 0.0054; **P = 0.0013, respectivamente.

Este análisis se realizó utilizando un total de 4 modelos de cáncer: 3 modelos de tumores pediátricos, utilizando dos líneas celulares comerciales (G401 y A204), junto con un cultivo primario rabdoide (T692L), obtenido a partir de la expansión de un PDOX de un tumor primario de un paciente pediátrico con MRT, y una línea celular de cáncer de pulmón (SW1573) como modelo adulto. Como se puede apreciar en la Figura 28a, la expresión ectópica de *SMARCB1* provocó un aumento significativo en el porcentaje de células senescentes, el cual se acentuó aún más después del tratamiento con GSK-J4. De hecho, tras la apoptosis celular inducida por este tratamiento, solo quedaron células vivas no senescentes. Este fenómeno fue más evidente en los modelos pediátricos que en el modelo adulto, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica por RNA-seq, en donde, tras la restauración ectópica de *SMARCB1*, solo se ve parada de ciclo en el modelo infantil (G401) (Figura 27c).

Además, para confirmar que las células que no proliferan tras la restauración de *SMARCB1* seguían siendo viables, se realizó un ensayo de viabilidad con Azul Tripano, tal y como se muestra en la Figura 28b. Los resultados de este ensayo, junto con los obtenidos en el RNAseq (Figura 27d), confirmaron que, efectivamente, la expresión de *SMARCB1* permite a las células evadir la muerte celular tras el tratamiento con GSK-J4.

4.10 GSK-J4 desencadena fibrosis antitumoral y promueve efectos antiangiogénicos en ratones implantados con tumores MRT con inactivación en *SMARCB1*

Finalmente, y con la finalidad de trasladar nuestras observaciones in vitro, llevamos a cabo la validación in vivo de los efectos de la inhibición de KDM6 en tumores con inactivación en *SMARCB1*. Para ello, utilizamos modelos ortotópicos de tumores sólidos pediátricos (PDOX) de dos pacientes distintos con diagnóstico de MRT: caso #1 y caso #2. Ambos con deficiencia en *SMARCB1* como principal alteración promotora (Figura 29a). El primer caso se trata de una niña de un mes de vida que presentaba una lesión cutánea frontal, la cual se le identificó inicialmente como un hemangioma. A los 10 meses fue diagnosticada como MRT, y se le realizó una resección completa del tumor, seguida de tratamiento quimioterapéutico. Sin embargo, a los 19 meses, la niña sufrió una recidiva metastásica pulmonar y, aunque fue operada, falleció a los 20 meses debido a la progresión del tumor. El segundo caso, se trata de un niño de 8 meses, el cual fue diagnosticado con MRT después de haber sido remitido por una masa hepática.

Se le inició tratamiento antitumoral, pero falleció a los 11 meses de edad debido a la falta de respuesta y progresión del tumor.

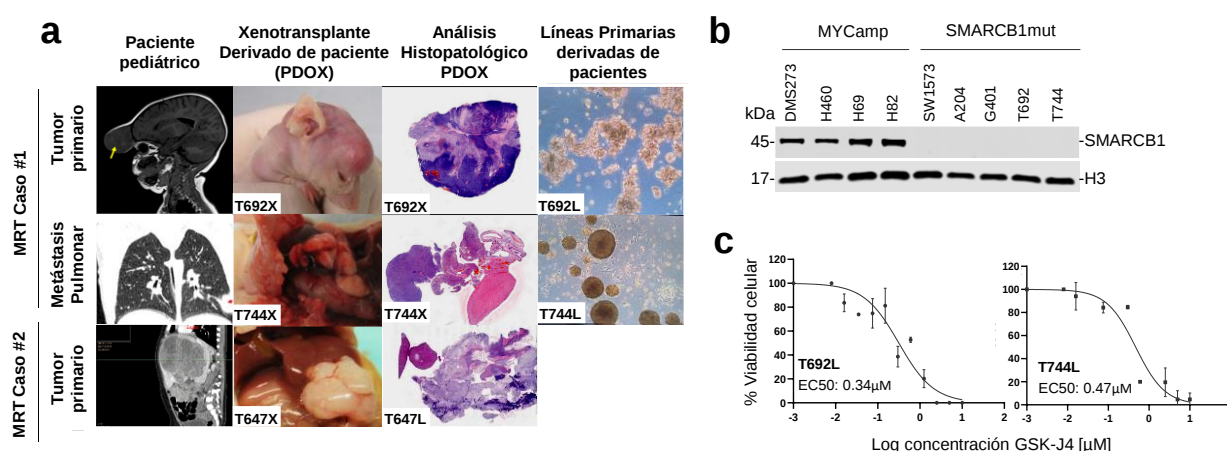


Figura 29. Modelos derivados de pacientes MRT. **a**, Representación gráfica de los distintos modelos tumorales *in vivo* desarrollados a partir de 2 pacientes pediátricos con MRT. **b**, Western blot que muestra los niveles endógenos de SMARCB1. Se utiliza H3 como control de carga proteica. **c**, Ensayos de viabilidad y porcentaje de células viables de las líneas indicadas, medida mediante ensayos MTT, tras el tratamiento con concentraciones crecientes de GSK-J4 durante 5 días.

Generamos xenoinjertos ortotópicos derivados de pacientes (PDOXs) utilizando el tumor primario (T692X) y la metástasis (T744X) del caso #1, así como el tumor primario del caso #2 (T647X), implantando ortotópicamente el tumor en ratones. Utilizamos, también, estos PDOXs en su primer pase, para derivar cultivos celulares primarios de cáncer del caso #1 (T692L y T744L) en su primera fase (Figura 29a). Empezamos verificando la presencia de mutaciones inactivadoras en *SMARCB1* (Figura 29b) y, posteriormente, realizamos ensayos de viabilidad en los dos cultivos primarios generados, T692L y T711L, para verificar la sensibilidad de estas líneas al tratamiento (Figura 29c). Ambos cultivos mostraron unas EC₅₀ similares a las de los grupos celulares con deficiencia en *SMARCA4* (EC₅₀ de 0.34 μ M y 0.47 μ M).

A continuación, investigamos el efecto del tratamiento con GSK-J4 sobre el crecimiento de los tres tumores *in vivo*. Como se muestra en el panel de la izquierda de la Figura 30a, los resultados demostraron que hubo una disminución significativa del volumen tumoral de los tumores T692X después de 7 ciclos de tratamiento con GSK-J4 en comparación con el grupo control (vehículo) (Panel izquierdo Figura 30a). También se observaron diferencias significativas de volumen y peso tumoral entre ambos grupos al final del experimento. En el caso de la metástasis pulmonar (T744X), el grupo tratado

con GSK-J4 mostró un incremento en la supervivencia media de casi el doble que el grupo vehículo (38 vs. 56 días, respectivamente) (Fig. 30b).

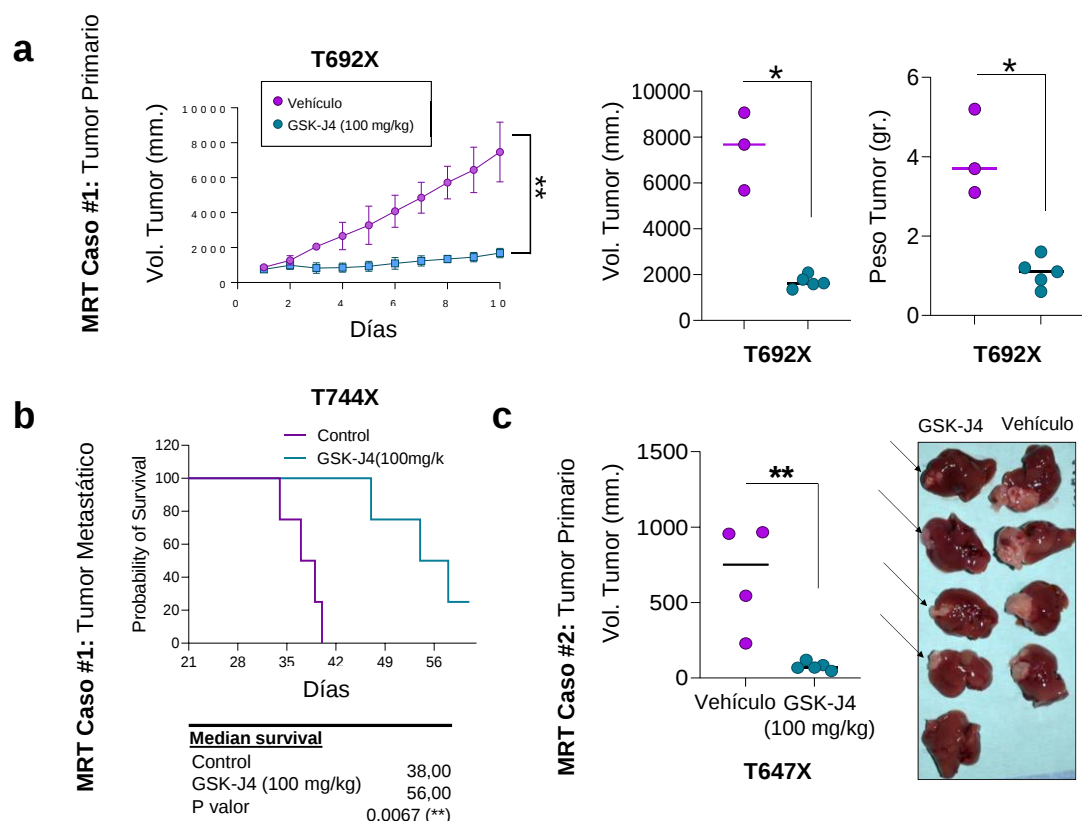


Figura 30. GSK-J4 promueve la regresión tumoral *in vivo* de los tumores MRT con deficiencia en *SMARCB1*. **a**, Panel izquierdo, variación en el volumen de cada tumor del caso MRT#1 a partir del tumor primario a lo largo de los días. Prueba t de Student no pareada. $^{**}P=0.0011$. Panel derecho, volumen y peso de cada tumor al final del experimento (7 días). Prueba t de Student no pareada. $^{***}P=0.0002$; $^{**}P=0.0012$. **b**, Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia global del grupo tratado con GSK-J4 en comparación con el grupo control de los tumores ortotópicos derivados de la metástasis pulmonar del caso 1 de MRT. Panel inferior, tabla con la supervivencia media para cada grupo indicados y P valores de two-sided log-rank (Mantel-Cox). **c**, Panel izquierdo, volumen de cada tumor del caso MRT#2. Prueba t de Student no pareada. $^{**}P=0.0067$. Panel derecho, fotografías patológicas macroscópicas de la necropsia de los tumores derivados de MRT#2 en los ratones tratados con vehículo (n=4) o GSK-J4 (n=5). Los tumores del grupo tratado están marcados con una flecha.

En los resultados obtenidos del estudio *in vivo* del caso #2 (T647X), también pudimos observar una disminución significativa del volumen tumoral, tal y como se muestra en el gráfico de la Figura 30c. Además, interesantemente, tal y como se aprecia en la imagen con tumores implantados en el hígado de la Figura 30c, después del tratamiento con GSK-J4 el tumor mostró una recesión casi completa.

A continuación, procedimos a realizar un examen histopatológico de los tumores mediante la tinción tricrómica de Masson con la finalidad de examinar la fibrosis celular. Como se muestra en el panel superior de la Figura 31a, y del mismo modo que pasaba

en el RNAseq (Figura 27c y Figura Suplementaria 3c), observamos que tras el tratamiento con GSK-J4 se induce un aumento de las fibras musculares (tinción roja) y en el colágeno (tinción azul) en las células *SMARCB1* deficientes, en comparación con el control (VEH), indicando un cambio en la capacidad de remodelación de la matriz extracelular. La cuantificación de estos cambios en los tres tumores alcanzó la significación estadística en los tres casos, tal y como se observa en la figura Figura 31b. En estas mismas muestras tumorales, realizamos, también, el estudio inmunohistoquímico de H3K27me3, con el objetivo de confirmar que el fármaco había alcanzado el tumor. Como se puede ver en las imágenes y en la cuantificación, vimos una clara diferencia entre ambos grupos de tumores, donde la marca H3K27me3 mostró un notable incremento después del tratamiento con GSK-J4, corroborando su efecto específico en el tumor (Panel inferior Figura 31a).

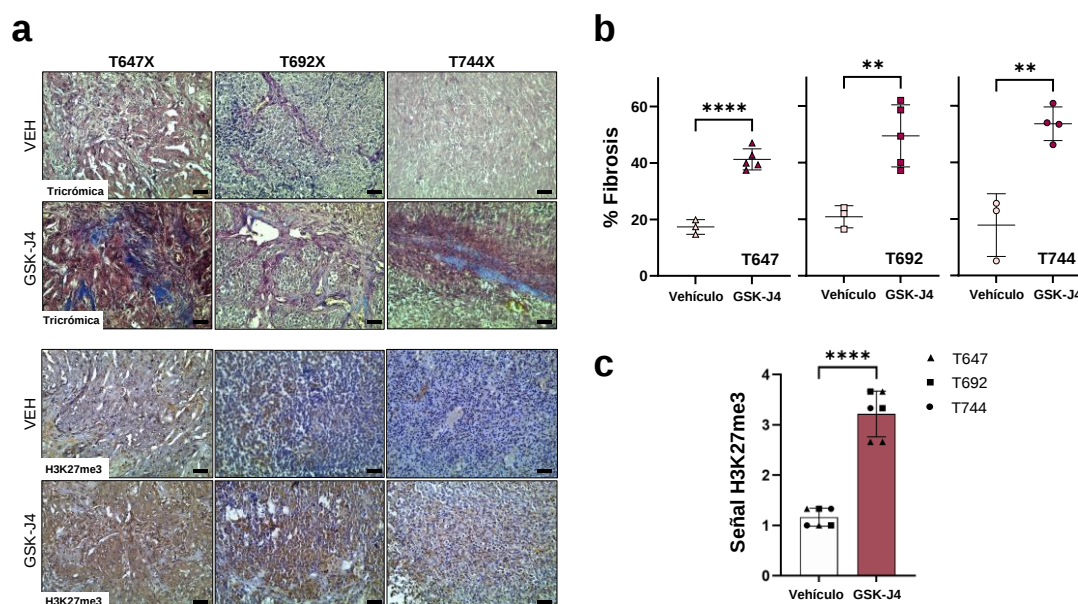


Figura 31. Análisis histopatológico de los tumores derivados de pacientes, con deficiencia en *SMARCB1*, tratados con GSK-J4 *in vivo*. **a**, Secciones representativas de la tinción Tricrómica de Masson (Panel superior) e inmunohistoquímica de H3K27me3 (Panel inferior) en los tumores PDOX derivados de las células indicadas y tratados con GSK-4 o vehículo. Triple tinción de Masson: rojo (fibras musculares), azul (colágeno) y negro (núcleos). Barra de escala: 25µm **b**, Cuantificación de las áreas fibróticas mediante la triple tinción de Masson. Prueba t de Student no pareada. Barras de error, media ± DE de los distintos replicados. ****P<0.0001; **P=0.0054; **P=0.0026. **c**, Cuantificación de la señal de H3K27me3. Barras de error, media ± DE de repeticiones. ****P<0.0001.

Tras nuestros hallazgos obtenidos en el RNA-seq, llevamos a cabo la inmunofluorescencia en nuestras muestras tumorales contra CD31 (un marcador de células endoteliales) y α SMA (marcador de actina de musculo liso) para evaluar los cambios en la fibrosis y la angiogénesis tras el tratamiento con GSK-J4 (Figura 32a). Tras cuantificar CD31, encontramos una marcada reducción en la formación de vasos sanguíneos después del tratamiento. Sin embargo, en el caso#1, no pudimos cuantificar α SMA, ya que las células tumorales derivan de un subtipo endotelial y α SMA es una proteína constitutiva de su citoesqueleto que marcaba todo el tejido tumoral, enmascarando los pericitos de los vasos sanguíneos. Además, realizamos la inmunofluorescencia Ki67 y la Caspase3 activada. La cuantificación mostró una disminución en la proliferación celular y una tendencia a la activación de caspasas después del tratamiento con GSK-J4. En conjunto, estos resultados sugieren que GSK-J4 provoca efectos antitumorales y antiangiogénicos en las células *SMARCB1* deficientes, hecho que conduce a la muerte celular (Figura 32b).

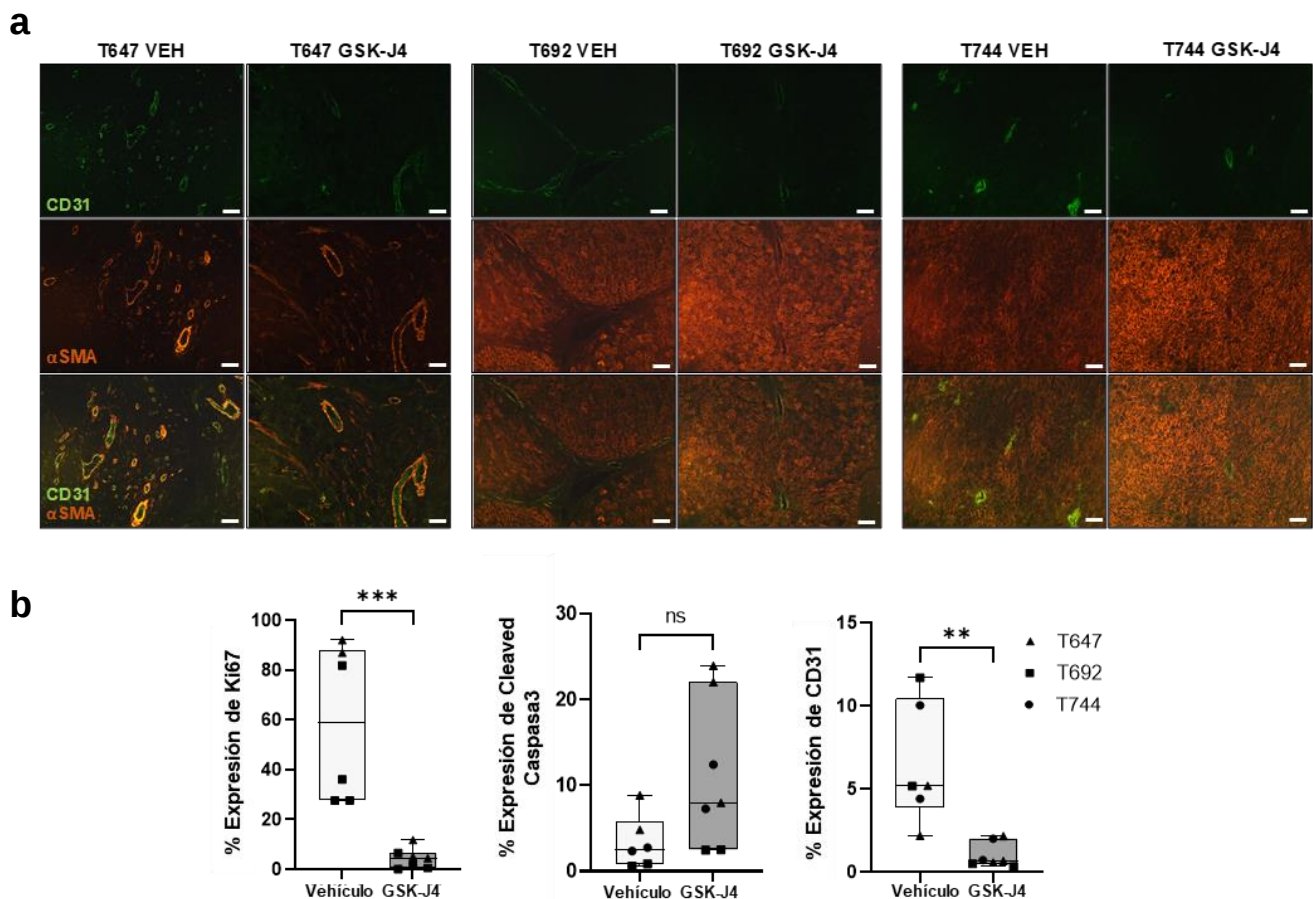


Figura 32. Efectos antitumorales y antiangiogénicos de GSK-J4 en los tumores MRT con deficiencia en *SMARCB1*. **a**, Secciones representativas de inmunofluorescencia contra CD31 (canal verde) y α SMA (canal rojo), junto con ambos canales fusionados, en los tumores indicados. VEH, Vehículo. Barra de escala: 25 μ m. **b**, Prueba t de Student no pareada. Barras de error, media $\pm$ DE de los distintos replicados. ***P<0.0008; ns. no significativo; **P=0.0025.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Este estudio parte de una observación previa de nuestro laboratorio, en el que las células tumorales de cáncer de pulmón que presentan amplificación en el oncogén *MYC* eran particularmente susceptibles a la inhibición de la actividad de las histonas deacetilasas, en concreto el SAHA. Desde que se descubrió la potente capacidad antitumoral de este inhibidor epigenético se han realizado numerosos ensayos clínicos en distintos tipos de tumores. El SAHA (o Vorinostat) ha sido aprobado aunque su efecto antitumoral se limita, a día de hoy, únicamente a ciertos tipos de neoplasias hematológicas^{105,159}.

La amplificación génica de *MYC* es mecanismo más frecuente de activación de este oncogén en cáncer. La amplificación de *MYC* se asocia a una mayor agresividad y menor supervivencia¹⁶⁰. Así pues, en base a las observaciones del presente trabajo se plantea la posibilidad de que, en pacientes de cáncer cuyos tumores presentan activación genética en cualquiera de los genes de la familia *MYC*, el uso de HDACi, en particular SAHA, podría constituir una opción terapéutica personalizada o de precisión. Ejemplos de estos tipos de cáncer incluyen, entre otros, algunas leucemias, neuroblastomas y cánceres de pulmón de células pequeñas, entre otros. Estos resultados, están respaldados por otros estudios independientes que también han demostrado sensibilidad a estos inhibidores en el mismo contexto genético^{161,162}.

El SAHA es un inhibidor que bloquea la actividad de las HDAC de clase I y II de forma no específica, promoviendo un incremento en el estado de acetilación global favoreciendo así la apertura de la cromatina y la activación de la transcripción¹⁵². Los dominios activos en la cromatina se caracterizan por la presencia de distintas marcas de activación en la cola de las histonas como, por ejemplo, H3K27ac, H3K4me1 y H3K4me3, mientras que otras marcas como la H3K27me3 y la H2AK119ub se encuentran relacionadas con estados de represión y silenciamiento de la transcripción^{14,15}. En este trabajo, y de forma inesperada, se observó una acumulación aberrante de la marca represiva H3K27me3 tras la administración de SAHA, sólo en aquellas células tumorales con inactivación genética en *SMARCA4*, tanto las de cáncer de pulmón como las de cáncer de ovario. Estos mismos resultados se reprodujeron en células de tumores infantiles rabdoides y tumores adultos de cáncer de pulmón con inactivación en el gen *SMARCB1*. Estas observaciones ponen de manifiesto la existencia de deficiencias en los mecanismos encargados de regular esta marca

represiva en tumores con inactivación genética de ciertos miembros del complejo SWI/SNF. Dicho de otro modo, debido a la competencia directa existente entre diferentes moléculas responsables de la regulación y el control de éstas dos marcas antagónicas de activación (H3K27ac) y represión (H3K27me3), este descubrimiento revelaba una descompensación en el equilibrio de estas marcas epigenéticas³⁰.

Aunque se comprobó que la actividad metiltransferasa de EZH2 no estaba implicada en la refractariedad al SAHA de las células con inactivación en *SMARCA4*, no podemos descartar por completo la posible implicación de la actividad no catalítica de EZH2. En este sentido estudios previos muestran que funciones no relacionadas con la actividad metiltransferasa de EZH2 podrían afectar la supervivencia en células tumorales mutantes para SWI/SNF¹²². De este modo, la utilización de inhibidores de la actividad metiltransferasa de EZH2, como GSK-126, en un contexto genético dependiente principalmente de la actividad no catalítica de EZH2, podría no lograr una supresión total de la actividad oncogénica de EZH2, hecho que explicaría el por qué el crecimiento tumoral no se ve afectado de manera dependiente del estado de *SMARCA4*.

Además de todo ello llevamos a cabo análisis exhaustivos de bases de datos comparando diferentes líneas celulares con o sin mutaciones en las diferentes subunidades del complejo SWI/SNF, junto con nuestras validaciones *in vitro*. Estos análisis nos permitieron demostrar que la regulación de los niveles de expresión de *KDM6A* y *KDM6B*, así como el de otras enzimas demetilinasas de lisinas, dependía de la presencia de actividad de *SMARCA4* y de otros miembros del complejo SWI/SNF. Además, los distintos experimentos llevados a cabo en los que bien se sobreexpresaba o deplecionaba *SMARCA4* o las *KDM6s* apoyaron que la transactivación de *KDM6A* y *KDM6B* se ve alterada en las células que carecen de *SMARCA4* o *SMARCB1* funcionales, lo que conduce a una fuerte disminución en la regulación basal de los niveles de estas enzimas.

En el presente trabajo también se ha observado que las células con inactivación genética de *SMARCA4* son incapaces de modular los niveles de expresión de EZH2 en respuesta a SAHA, lo que apoya investigaciones previas^{109,110,163,164}. Además, se conoce que la ausencia de *SMARCB1* genera complejos BAF residuales que no pueden competir con PRC2, resultando en un incremento de las marcas H3K27me3¹¹³. Estos hallazgos respaldan la noción de que las células deficientes en *SMARCA4* o *SMARCB1* pierden la capacidad de remodelación de la cromatina, lo cual podría reflejarse en una falta de adaptabilidad de la célula tumoral a cambios de expresión mediados por el microambiente. Ello estaría de acuerdo con los resultados previos de nuestro grupo que

muestran que las células tumorales con inactivación de *SMARCA4* son incapaces de responder adecuadamente a la modulación de la expresión génica en presencia de estímulos externos como los retinoides y corticoides (referencia). Adicionalmente, y en referencia a este mecanismo de desregulación, se ha observado que, en líneas celulares de tumores rabdoides deficientes en *SMARCB1*, la expresión ectópica de este gen induce un incremento de la unión de las subunidades de SWI/SNF en los sitios de inicio de la transcripción (TSS) de la cromatina, así como un aumento en las marcas de histonas asociadas a enhancers activos: H3K27ac y H3K4me1⁸⁶. Este contexto de represión transcripcional se ajusta a los resultados obtenidos en las células tumorales con inactivación en *SMARCA4*, donde observamos bajos niveles globales de H3K27ac en comparación con H3K27me3, característica que se evidenció de manera muy acentuada en los tumores tanto de SCCOHT, deficientes en *SMARCA4*, como en los MRTs, deficientes en *SMARCB1*.

Independientemente de que el dominio catalítico de la KDM6A y la KDM6B compartan un alto grado de similitud en su secuencia, estas dos enzimas también desempeñan algunas funciones específicas y distintas entre sí. La KDM6A está asociada principalmente con la desmetilación de H3K27me3 en los sitios de inicio transcripcional de los genes *HOX*, tras recibir la célula estímulos pro-diferenciación, mientras que la KDM6B está implicada en procesos de angiogénesis e inflamación entre otros procesos fisiológicos³⁸. Por otro lado, mientras que la *KDM6A* se encuentra inactivada por mutación en una gran variedad de tumores, incluyendo distintos tipos de leucemias y linfomas, cáncer de mama, adenocarcinoma colorrectal, cáncer de pulmón de célula no pequeña y glioblastoma, entre otros, la *KDM6B* parece no inactivarse genéticamente en cáncer. Además, es importante destacar que mutaciones en *KDM6A*, pero no en *KDM6B*, han sido identificados como los responsables directos del síndrome de Kabuki (KS), una enfermedad hereditaria poco frecuente que se caracteriza por la presencia de trastornos neurológicos, endocrinos y autoinmunes en niños³⁹. En referencia a estas diferencias funcionales entre estos dos parálogos, en nuestros resultados observamos que la deficiencia en *KDM6B*, pero no en *KDM6A*, es la responsable de la refractariedad de las células deficientes para *SMARCA4* al SAHA. Esta deficiencia podría explicar, también, la acumulación global de H3K27me3 tras la inhibición de las HDACs por SAHA. Este hecho, es coherente con la función más general de la KDM6B en la deposición de H3K27me3 en relación con el de la KDM6A que es más puntual y específico¹⁶⁵. No se puede descartar que estos fenómenos se expliquen también por la actividad no catalítica, ya que ambas enzimas interactúan con una gran diversidad de factores de

transcripción y vías de señalización que dependen, en gran medida, del contexto celular¹⁶⁶.

El descubrimiento más relevante de este trabajo de tesis es la notable susceptibilidad de las células tumorales que presentan inactivación de los genes *SMARCA4* o *SMARCB1* a la inhibición de la actividad de KDM6A y la KDM6B, lo cual tiene implicaciones clínicas relevantes. Esta vulnerabilidad se ha demostrado tanto *in vitro*, a través de estudios en cultivos celulares, como *in vivo*, utilizando modelos de ratones con trasplantes ortotópicos de células de cáncer de pulmón, de SCCOHTs y MRTs derivados de pacientes. Debido a la relativa alta frecuencia de estas alteraciones genéticas, al mal pronóstico con el que se asocian, y a la carencia de tratamientos, el posible uso del GSK-J4 u otros compuestos similares, puedan tener un impacto muy significativo en la supervivencia de estos pacientes. Esto puede ser de especial relevancia en el caso de pacientes con SCCOHT con MRT ambos tumores muy agresivos que afectan a personas muy jóvenes^{123,167}.

Aunque la actividad antitumoral^{140,141,142} y antiinflamatoria^{143,144} de la inhibición de KDM6A y KDM6B mediante GSK-J4 se ha evidenciado en distintos tipos de tumores, este fármaco aún no ha sido utilizado para ensayos clínicos. En modelos celulares y animales, se ha observado un efecto antitumoral de GSK-J4, asociado preferentemente a la inhibición de KDM6B, en algunas leucemias y gliomas con mutaciones *H3F3A*^{168,169}. Sin embargo, en nuestro caso se ha observado que la depleción, tanto de *KDM6A* como de *KDM6B*, afecta la viabilidad de las células con inactivación en *SMARCA4* al mismo tiempo que revierte la refractariedad de las células *MYCaml* al tratamiento con GSK-J4. Además, a esta última observación podemos añadir que la depleción de *SMARCA4* en las células *MYCaml* promueve la sensibilidad de estas células a GSK-J4. Por el contrario, la sobreexpresión de *KDM6A*, *KDM6B* o de *SMARCA4* en las células con inactivación en *SMARCA4*, revierte la sensibilidad al tratamiento con GSK-J4. Estas observaciones indican que la sensibilidad a la inhibición de las KDM6s depende del estado funcional de *SMARCA4* y que, en un contexto genético de inactivación de *SMARCA4*, la inhibición de la actividad de una de las dos demetilasas, pudiera no ser compensada por la otra. Además, la restitución de *SMARCB1* en células deficientes revierte la sensibilidad al tratamiento con GSK-J4. En conjunto, estos resultados indican que la supresión en el crecimiento observada tras la inhibición de las KDM6s es dependiente de un complejo SWI/SNF afuncional.

La cantidad limitante de KDM6s, debido a la falta de transactivación y regulación mediada por SMARCA4 o SMARCB1, parece subyacer a la toxicidad a la inhibición de las KDM6s. Se ha demostrado que las KDM6s aumentan la accesibilidad del complejo SWI/SNF a la histona H3 y promueven la remodelación de la cromatina^{168,45}. Además, KDM6A interacciona con SMARCA4 mediante el complejo MLL3/4-COMPASS-like, el cual media la metilación de otras marcas activadoras de la transcripción y antagónicas a la H3K27me3 como la H3K4, facilitando así la activación de enhancers^{40,41,42}. Este hecho podría explicar por qué la sobreexpresión de la *KDM6A* en células con inactivación en *SMARCA4* promueve un incremento de la EC₅₀ al tratamiento con GSK-J4. Aunque hasta la fecha no se conoce ninguna interacción directa de SMARCB1 con KDM6A/B, tanto SMARCA4 como SMARCB1 forman parte del núcleo esencial de los complejos BAF, ya que su acoplamiento directo a los nucleosomas es indispensable para llevar a cabo la actividad remodeladora del complejo⁷⁶. SMARCA4 solo puede ser compensado de manera parcial por SMARCA2 y está presente en todos los complejos, mientras que SMARCB1 se encuentra ausente en los complejos no canónicos gBAF. Se ha descrito que la pérdida de *SMARCB1* genera complejos BAF residuales (no canónicos) que son incapaces de competir con PRC2, dando lugar a un incremento aberrante de la H3K27me3¹¹³. De este modo, la pérdida de función de estas dos proteínas afecta a la integridad del complejo SWI/SNF y su disociación de la cromatina, generando un estado disfuncional de los complejos, que impide la competición directa con PRC2, promoviéndose así un estado de alta compactación de la cromatina que conduce al silenciamiento transcripcional, debido al impedimento de unión de factores de transcripción, así como RNA Pol II, a los promotores de los genes en la cromatina.

Aunque nuestros hallazgos actuales se centran en la toxicidad del compuesto GSK-J4 en células con inactivación en *SMARCA4* y *SMARCB1*, es posible que sus efectos sean más extensos, ya que observamos indicios de sensibilidad en las células con mutaciones en *BRD7*, aunque se requerirían más estudios para llegar a una conclusión definitiva. Por ejemplo, del mismo modo que ocurría en las células deficientes para *SMARCA4* y *SMARCB1*, las células con mutaciones inactivadoras en *BRD7* también mostraron un incremento en la H3K27me3 tras el tratamiento con SAHA. De este modo, los errores en la regulación de trimetilación podrían servir como un biomarcador para destapar potenciales vulnerabilidades a la inhibición de las KDM6A/6B.

Finalmente, la recuperación de *SMARCB1* en líneas deficientes induce la expresión genes que promueven la diferenciación celular, angiogénesis, organización de la matriz extracelular, senescencia y que frenan la división celular. Estos procesos se incentivan con el tratamiento con GSK-J4. En este contexto, *SMARCB1* se ha descrito como un

estabilizador de p53, a través de la regulación de MDM2, la cual promueve la degradación de p53, promoviendo así la progresión tumoral en tumores deficientes para SMARCB1¹¹⁴. Interesantemente, p53 es un regulador maestro del ciclo celular y apoptosis¹⁵⁶, así como la angiogénesis¹⁵⁷, a través de la interacción con distintas vías de señalización que podrían explicar el mecanismo de muerte celular de estos tumores. Los resultados obtenidos en esta tesis implican que la presencia mutaciones inactivadoras en ciertos miembros del complejo SWI/SNF tiene un efecto “letal sintético” con la inhibición de las KDM6A y KDM6B. Esta sinergia representa una gran oportunidad para el desarrollo de medicina de precisión, con el potencial de abordar una amplia gama de tumores, pero sobre todo en tumores pediátricos que actualmente carecen casi por completo de opciones terapéuticas.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONS

1. SAHA treatment induces growth inhibition and the expected decrease of the repressive mark H3K27me3, in cancer cells with genetic activation of the *MYC*-family of oncogenes. As opposed to that, *SMARCA4*- and *SMARCB1*-deficient cells do not show cell growth inhibition after treatment with SAHA while showing an aberrant increase H3K27me3.
2. Treatment with the inhibitor of EZH2, GSK126 promotes a reduction of H3K27me3 in all the cancer cell tested but without affecting cell growth of *SMARCA4*-deficient cells, indicating that EZH2 is not mediating the resistant to SAHA in these cells.
3. Regulation of the expression levels of *KDM6A* and *KDM6B*, among other KDMs, depends on the activity of *SMARCA4* through direct promoter occupancy.
4. Levels of *KDM6B* account for the resistance of *SMARCA4*-deficient cells to growth inhibition by SAHA, and hint at a more widespread role for *KDM6B* in the global removal of H3K27me3.
5. The lack of *SMARCA4* and *SMARCB1* confers vulnerability to KDM6s inhibition in cancer cells and this is due to defects in the levels and in the activity of KDM6s.
6. The GSK-J4 anti-tumoral effects observed in *SMARCA4*- and *SMARCB1*-deficient cancer cells can be extended to animal models, in particular to mouse models with orthotopically implanted lung cancer, SCCOHT and pediatric MRTs.
7. The restitution of *SMARCB1* expression in *SMARCB1*-deficient cells promotes an endothelial cell-phenotype, cell cycle arrest and senescence.

REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

1. Omran, A. The Epidemiological Transition: A Theory of Epidemiological Population Changes. *Milbank Mem. Fund Q.* **49**, 509–538 (1971).
2. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
3. Nowell, P. C. Linked references are available on JSTOR for this article : The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science (80-.).* **194**, 23–28 (1976).
4. Nenclares, P. & Harrington, K. J. The biology of cancer. *Med. (United Kingdom)* **48**, 67–72 (2020).
5. Weinberg, D. H. and R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
7. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46 (2022).
8. Chalovich, J. M. & Eisenberg, E. Interplay Between the Cancer Genome and Epigenome Hui. *Biophys. Chem.* **257**, 2432–2437 (2005).
9. Biswas, S. & Rao, C. M. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur. J. Pharmacol.* **837**, 8–24 (2018).
10. Baylin, S. B. & Jones, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 726–734 (2011).
11. Suvà, M. L., Riggi, N. & Bernstein, B. E. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science*, **339** (2013).
12. Mirabella, A. C., Foster, B. M. & Bartke, T. Chromatin deregulation in disease. *Chromosoma* **125**, 75–93 (2016).
13. Völkel, P. & Angrand, P. O. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **89**, 1–20 (2007).
14. Jones, J. S. Y. and P. A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell* **22**, 9–20 (2012).
15. Acharjee, S., Chauhan, S., Pal, R. & Tomar, R. S. Mechanisms of DNA methylation and histone modifications. Progress in Molecular Biology and Translational Science. *Elsevier Inc.*, **197** (2023).
16. Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89–92 (1983).
17. Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E. & Horsthemke, B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of

- retinoblastoma. *Hum. Genet.* **83**, 155–158 (1989).
18. Nguyen, C. T. *et al.* Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **62**, 6456–6461 (2002).
 19. Feinberg, A. P. & Tycko, B. The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* **4**, (2004).
 20. M. Christopher, A. M. L. S. Targeting EZH2 in cancer Kimberly. *Physiol. Behav.* **176**, 100–106 (2016).
 21. Iyer, N. G., Özdag, H. & Caldas, C. p300/CBP and cancer. *Oncogene* **23**, 4225–4231 (2004).
 22. Morin, R. D. *et al.* Frequent mutation of histone modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* **476**, 298–303 (2011).
 23. Dawson, M. A. & Kouzarides, T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell* **150**, 12–27 (2012).
 24. Van Haaften, G. *et al.* Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat. Genet.* **41**, 521–523 (2009).
 25. Pasini, D. & Di Croce, L. Emerging roles for Polycomb proteins in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **36**, 50–58 (2016).
 26. Liu, X. & Liu, X. PRC2, Chromatin Regulation, and Human Disease: Insights From Molecular Structure and Function. *Front. Oncol.* **12**, 1–18 (2022).
 27. Chammas, P., Mocavini, I. & Di Croce, L. Engaging chromatin: PRC2 structure meets function. *Br. J. Cancer* **122**, 315–328 (2020).
 28. Piunti, A. & Shilatifard, A. Epigenetic balance of gene expression by polycomb and compass families. *Science* **352** (2016).
 29. Lee, S. H. *et al.* The role of EZH1 and EZH2 in development and cancer. *BMB Rep.* **55**, 595–601 (2022).
 30. Tie, F. *et al.* Polycomb inhibits histone acetylation by CBP by binding directly to its catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E744–E753 (2016).
 31. Shilatifard, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: Implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 243–269 (2006).
 32. Aranda, S., Mas, G. & Di Croce, L. Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci. Adv.* **1**, 1–15 (2015).
 33. Bachmann, I. M. *et al.* EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J. Clin. Oncol.* **24**, 268–273 (2006).
 34. Bödör, C. *et al.* EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* **25**, 726–729 (2011).

35. Ishi, Y. *et al.* Therapeutic Targeting of EZH2 and BET BRD4 in Pediatric Rhabdoid Tumors. *Mol. Cancer Ther.* **21**, 715–726 (2022).
36. Hong, S. *et al.* Identification of JmJc domain-containing UTX and.pdf. *Pnas* **104**, 18439–18444 (2007).
37. Abu-Hanna, J. *et al.* Therapeutic potential of inhibiting histone 3 lysine 27 demethylases: a review of the literature. *Clin. Epigenetics* **14**, 1–21 (2022).
38. Kelly Marie Arcipowski, Carlos Alberto Martinez, and P. N. Histone demethylases in physiology and cancer: A tale of two enzymes, JMJD3 and UTX. *Curr Opin Genet Dev* **36**, 59–67 (2016).
39. Chen, L. J. *et al.* The role of lysine-specific demethylase 6A (KDM6A) in tumorigenesis and its therapeutic potentials in cancer therapy. *Bioorg. Chem.* **133**, 106409 (2023).
40. Sera, Y. *et al.* UTX maintains the functional integrity of the murine hematopoietic system by globally regulating aging-associated genes. *Blood* **137**, 908–922 (2021).
41. Tran, N., Broun, A. & Ge, K. Lysine Demethylase KDM6A in Differentiation, Development, and Cancer. *Mol. Cell. Biol.* **40**, 1–15 (2020).
42. Cenik, B. K. & Shilatifard, A. COMPASS and SWI/SNF complexes in development and disease. *Nat. Rev. Genet.* **22**, 38–58 (2021).
43. Wang, L. & Shilatifard, A. UTX Mutations in Human Cancer. *Cancer Cell* **35**, 168–176 (2019).
44. Lagunas-Rangel, F. A. KDM6B (JMJD3) and its dual role in cancer. *Biochimie* **184**, 63–71 (2021).
45. Agger, K. *et al.* UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* **449**, 731–734 (2007).
46. Manna, S. *et al.* Histone H3 Lysine 27 demethylases Jmjd3 and Utx are required for T-cell differentiation. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
47. Intlekofer, A. M. *et al.* Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate. *Cell Metab.* **22**, 304–311 (2015).
48. Hua, C. *et al.* KDM6 Demethylases and Their Roles in Human Cancers. *Front. Oncol.* **11**, 1–14 (2021).
49. Chakraborty, A. A. *et al.* Histone demethylase KDM6A directly senses oxygen to control chromatin and cell fate. *Science* **363**, 1217–1222 (2019).
50. Batie, M. *et al.* Hypoxia induces rapid changes to histone methylation and reprograms chromatin. *Science* **363**, 1222–1226 (2019).
51. Wu, Q. *et al.* In vivo CRISPR screening unveils histone demethylase UTX as an important epigenetic regulator in lung tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E3978–E3986 (2018).

52. Benyoucef, A. *et al.* UTX inhibition as selective epigenetic therapy against TAL1-driven T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev.* **30**, 508–521 (2016).
53. Xie, G. *et al.* UTX promotes hormonally responsive breast carcinogenesis through feed-forward transcription regulation with estrogen receptor. *Oncogene* **36**, 5497–5511 (2017).
54. Choi, H. *et al.* UTX inhibits EMT -induced breast CSC properties by epigenetic repression of EMT genes in cooperation with LSD 1 and HDAC 1 . *EMBO Rep.* **16**, 1288–1298 (2015).
55. Xu, Z. *et al.* Comprehensive profiling of JMJD3 in gastric cancer and its influence on patient survival. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
56. Labban, D. Al *et al.* Notch-effector CSL promotes squamous cell carcinoma by repressing histone demethylase KDM6B. *The Journal of clinical investigation*, **128**, 2581–2599 (2018).
57. Nanduri, J., Wang, N., Wang, B. L. & Prabhakar, N. R. Lysine demethylase KDM6B regulates HIF-1 α -mediated systemic and cellular responses to intermittent hypoxia. *Physiol. Genomics* **53**, 385–394 (2021).
58. Hiroto Ohguchi, Takeshi Harada, Morihiko Sagawa, Shohei Kikuchi, Yu-Tzu Tai, Paul G. Richardson, Teru Hideshima, and K. C. A. KDM6B modulates MAPK pathway mediating multiple myeloma cell growth and survival. *Leukemia* **31**, 139–148 (2017).
59. Barradas, M. *et al.* Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev.* **23**, 1177–1182 (2009).
60. Ene, C. I. *et al.* Histone Demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a Tumor Suppressor by Regulating p53 Protein Nuclear Stabilization. *PLoS One* **7**, (2012).
61. Jin, Q. *et al.* USP7 cooperates with NOTCH1 to drive the oncogenic transcriptional program in T cell leukemia. **25**, 222–239 (2019).
62. Park, W. Y., Hong, B. J., Lee, J., Choi, C. & Kim, M. Y. H3K27 demethylase JMJD3 employs the NF- κ B and BMP signaling pathways to modulate the tumor microenvironment and promote melanoma progression and metastasis. *Cancer Res.* **76**, 161–170 (2016).
63. Grivennikov, F. R. G. and S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms and Consequences. *Immunity* **51**, 27–41 (2019).
64. Ramadoss, S., Chen, X. & Wang, C. Y. Histone demethylase KDM6B promotes epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **287**, 44508–44517 (2012).
65. David, C. J. & Massagué, J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 419–435 (2018).
66. Mittal, P. & Roberts, C. W. M. The SWI/SNF complex in cancer — biology, biomarkers and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 435–448 (2020).

67. L Neigeborn, M. C. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **108**, 845–858 (1984).
68. Dingwall, A. K. *et al.* The *Drosophila* snr1 and brm proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. *Mol. Biol. Cell* **6**, 777–791 (1995).
69. Wang, W. Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J.* **15**, 5370–5382 (1996).
70. Mittal, P. & Roberts, C. W. M. The SWI/SNF complex in cancer — biology, biomarkers and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 435–448 (2020).
71. Michel, B. C. *et al.* A non-canonical SWI/SNF complex is a synthetic lethal target in cancers driven by BAF complex perturbation *Brittany*. **20**, (2018).
72. Alpsoy, A. & Dykhuizen, E. C. Glioma tumor suppressor candidate region gene 1 (GLTSCR1) and its paralog GLTSCR1-like form SWI/SNF chromatin remodeling subcomplexes. *J. Biol. Chem.* **293**, 3892–3903 (2018).
73. Mashtalir, N. *et al.* Modular Organization and Assembly of SWI/SNF Family Chromatin Remodeling Complexes. **175**, 1272–1288 (2018).
74. Centore, R. C., Sandoval, G. J., Soares, L. M. M., Kadoch, C. & Chan, H. M. Mammalian SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes: Emerging Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Trends Genet.* **36**, 936–950 (2020).
75. Reddy, D., Bhattacharya, S. & Workman, J. L. (mis)-Targeting of SWI/SNF complex(es) in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **5**, (2023).
76. Mashtalir, N. *et al.* A structural model of the endogenous human BAF complex informs disease mechanisms. *Cell* **183**, 802–817 (2021).
77. Reddy, D., Bhattacharya, S. & Workman, J. L. (mis)-Targeting of SWI/SNF complex(es) in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **5**, (2023).
78. Kadoch, C., Williams, R. T., Calarco, J. P., Miller, E. L., Weber, C. M., Braun, S. M., Pulice, J. L., Chory, E. J., & Crabtree, G. R. Dynamics of BAF- Polycomb Complex Opposition on Heterochromatin in Normal and Oncogenic States. *Nat. Genet.* **49**, 213–222 (2017).
79. Kadoch, C. *et al.* Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat. Genet.* **45**, 592–601 (2013).
80. Marquez, S. B., Thompson, K. W., Lu, L. & Reisman, D. Beyond mutations: Additional mechanisms and implications of SWI/SNF complex inactivation. *Front. Oncol.* **4**, 1–20 (2014).
81. Corporation, O. & Scientific, F. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* **394**, 203–206 (1998).
82. Shain, A. H. & Pollack, J. R. The Spectrum of SWI/SNF Mutations, Ubiquitous in Human Cancers. *PLoS One* **8**, (2013).

83. Medina, P. P. *et al.* Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Hum. Mutat.* **29**, 617–622 (2008).
84. Courtney Hodges, H. *et al.* Dominant-negative SMARCA4 missense mutations alter the accessibility landscape of tissue-unrestricted enhancers HHS Public Access Author manuscript. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 61–72 (2018).
85. Jones, C. A., Tansey, W. P. & Weissmiller, A. M. Emerging Themes in Mechanisms of Tumorigenesis by SWI/SNF Subunit Mutation. *Epigenetics Insights* **15**, (2022).
86. Wang, X., Lee, R. S., Alver, B. H., Haswell, J. R., Wang, S., Mieczkowski, J., Drier, Y., Gillespie, S. M., Archer, T. C., Wu, J. N., Tzvetkov, E. P., Troisi, E. C., Pomeroy, S. L., Biegel, J. A., Tolstorukov, M. Y., Bernstein, B. E., Park, P. J., & Rober, C. W. SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation. *Nat. Genet.* **49**, 285–295 (2017).
87. Mathur, R., Alver, B. H., San Roman, A. K., Wilson, B. G., Wang, X., Agoston, A. T., Park, P. J., Shivdasani, R. A., & Roberts, C. W. ARID1A loss impairs enhancer-mediated gene regulation and drives colon cancer in mice. *Nat. Genet.* **49**, 296–302 (2017).
88. Kelso, T. W. R. *et al.* Chromatin accessibility underlies synthetic lethality of SWI/SNF subunits in ARID1A-mutant cancers. *Elife* **6**, 1–29 (2017).
89. Vierbuchen, T., Ling, E., Cowley, C. J., Couch, C. H., Wang, X., Harmin, D. A., Roberts, C. W. M., & Greenberg, M. E. AP-1 transcription factors and the SWI/SNF complex mediate signal-dependent enhancer selection Thomas. *Mol. Cell* **68**, 1067–1082 (2017).
90. Cheng, S. W. G. *et al.* c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat. Genet.* **22**, 102–105 (1999).
91. Stojanova, A. *et al.* MYC interaction with the tumor suppressive SWI/SNF complex member INI1 regulates transcription and cellular transformation. *Cell Cycle* **15**, 1693–1705 (2016).
92. García-López, J. *et al.* Large 1p36 Deletions Affecting Arid1a Locus Facilitate Mycn-Driven Oncogenesis in Neuroblastoma. *Cell Rep.* **30**, 454-464.e5 (2020).
93. Romero, O. A. *et al.* MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discov.* **4**, 293–303 (2014).
94. Hodges, C., Kirkland, J. G. & Crabtree, G. R. The Many Roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF Complexes in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, 1–24 (2016).
95. Medina, P. Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Hum. Mutat.* **29**, 617–622 (2008).
96. Oike, T., Ogiwara, H., Nakano, T., Yokota, J. & Kohno, T. Inactivating mutations in SWI/SNF chromatin remodeling genes in human cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **43**, 849–855 (2013).

97. Orlando, K. A. *et al.* Remodeling the cancer epigenome: mutations in the SWI/SNF complex offer new therapeutic opportunities. *Expert review of anticancer therapy*, **19**, 375–391 (2020).
98. Li, Z., Zhao, J. & Tang, Y. Advances in the role of SWI / SNF complexes in tumours. *J Cell Mol Med* **27** (8):1023-1031 (2023).
99. Bai, J. *et al.* BRG1 Is a Prognostic Marker and Potential Therapeutic Target in Human Breast Cancer. *Plos One* **8**, 1–9 (2013).
100. Glaros, S. The reversible epigenetic silencing of BRM: implications for clinical targeted therapy. *Oncogene* **26**, 7058–7066 (2007).
101. Stanton, B. Z. *et al.* Smarca4 ATPase mutations disrupt direct eviction of PRC1 from chromatin. *Nat. Genet.* **49**, 282–288 (2017).
102. Zhou, H., Shen, J., Liu, J., Fang, W. & Zhang, L. Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in SMARCA4-Mutant NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* **15**, e133–e136 (2020).
103. Tischkowitz, M. *et al.* Small-Cell Carcinoma of the Ovary , Hypercalcemic Type – Genetics , New Treatment Targets , and Current Management Guidelines. *Cancer Research*, **26** (15), 3908–3917 3908–3917 (2018).
104. Shanmugam, G., Rakshit, S. & Sarkar, K. HDAC inhibitors: Targets for tumor therapy, immune modulation and lung diseases. *Transl. Oncol.* **16**, 101312 (2022).
105. Piekarz, R. L. *et al.* Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5410–5417 (2009).
106. Xie, M., Jiang, Q. & Xie, Y. Comparison between decitabine and azacitidine for the treatment of myelodysplastic syndrome: A meta-analysis with 1392 participants. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* **15**, 22–28 (2015).
107. Luchenko, V. L. *et al.* Histone deacetylase inhibitor-mediated cell death is distinct from its global effect on chromatin. *Mol. Oncol.* **8**, 1379–1392 (2014).
108. John R.Giudicessi, BA.Michael J.Ackerman., 2013 *et al.* Combination Epigenetic Therapy Has Efficacy in Patients with Refractory Advanced Non Small Cell Lung Cancer Rosalyn. *Cancer Discov.* **7**, 1031–1043 (2011).
109. Romero, O. A. *et al.* The tumour suppressor and chromatin-remodelling factor BRG1 antagonizes Myc activity and promotes cell differentiation in human cancer. *EMBO Mol. Med.* **4**, 603–616 (2012).
110. Romero, O. A. *et al.* Sensitization of retinoids and corticoids to epigenetic drugs in MYC-activated lung cancers by antitumor reprogramming. *Oncogene*, **36** (9), 1287–1296, (2016).
111. Versteeg, I. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* **394**, 203–206 (1998).
112. Lee, R. S. *et al.* Brief report A remarkably simple genome underlies highly

- malignant pediatric rhabdoid cancers. *The Journal of clinical investigation*, **122**, (2012).
113. Wilson, B. G. *et al.* Epigenetic antagonism between Polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer cell*, **18**, 316–328 (2011).
 114. Oppel, F. *et al.* p53 Pathway Inactivation Drives SMARCB1-deficient p53-wildtype Epithelioid Sarcoma Onset Indicating Therapeutic Vulnerability Through MDM2 Inhibition. *Molecular cancer therapeutics*, **21**(11), 1689–1700 (2022).
 115. Weissmiller, A. M. *et al.* Inhibition of MYC by the SMARCB1 tumor suppressor. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
 116. Carugo, A. *et al.* p53 Is a Master Regulator of Proteostasis in SMARCB1-Deficient Malignant Rhabdoid Tumors. *Cancer Cell* **35**, 204-220.e9 (2019).
 117. Chan, D., A. and Giaccia A., J. Harnessing synthetic lethal interactions in anticancer drug discovery. *Bone* **10**, 351–364 (2011).
 118. Hoffman, G. R. *et al.* Functional epigenetics approach identifies BRM/SMARCA2 as a critical synthetic lethal target in BRG1-deficient cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3128–3133 (2014).
 119. Helming, K. C. *et al.* ARID1B is a specific vulnerability in ARID1A-mutant cancers. *Nat. Med.* **20**, 251–254 (2014).
 120. Wang, X. *et al.* BRD9 defines a SWI/SNF sub-complex and constitutes a specific vulnerability in malignant rhabdoid tumors. *Nat. Commun.* **10**, 1–11 (2019).
 121. Schick, S. *et al.* Systematic characterization of BAF mutations provides insights into intracomplex synthetic lethality in human cancers. *Nat. Genet.* **51**, 1399–1410 (2019).
 122. Kim, K. H. *et al.* SWI/SNF mutant cancers depend upon catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nature medicine* **21**, 1491–1496 (2015).
 123. Knutson, S. K. *et al.* Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7922–7927 (2013).
 124. Xue, Y. *et al.* CDK4/6 inhibitors target SMARCA4-determined cyclin D1 deficiency in hypercalcemic small cell carcinoma of the ovary. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
 125. Xue, Y. *et al.* SMARCA4 loss is synthetic lethal with CDK4/6 inhibition in non-small cell lung cancer. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
 126. Gerstenberger, B. S. *et al.* Identification of a chemical probe for family VIII bromodomains through optimization of a fragment hit. **59**, 4800–4811 (2017).
 127. Rago, F. *et al.* Degron mediated BRM/SMARCA2 depletion uncovers novel combination partners for treatment of BRG1/SMARCA4-mutant cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **508**, 109–116 (2019).
 128. Vangamudi, B. *et al.* The SMARCA2/4 ATPase domain surpasses the bromodomain as a drug target in SWI/SNF-mutant cancers: Insights from cDNA

- rescue and PFI-3 inhibitor studies. *Cancer Res.* **75**, 3865–3878 (2015).
129. Farnaby, W. *et al.* BAF complex vulnerabilities in cancer demonstrated via structure-based PROTAC design. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 672–680 (2019).
 130. Papillon, J. P. N. *et al.* Discovery of Orally Active Inhibitors of Brahma Homolog (BRM)/SMARCA2 ATPase Activity for the Treatment of Brahma Related Gene 1 (BRG1)/SMARCA4-Mutant Cancers. *J. Med. Chem.* **61**, 10155–10172 (2018).
 131. Berdasco, M. & Esteller, M. Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 109–127 (2019).
 132. Mohammad, H. P., Barbash, O. & Creasy, C. L. Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer. *Nat. Med.* **25**, 403–418 (2019).
 133. Mann, B. S. *et al.* Vorinostat for treatment of cutaneous manifestations of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2318–2322 (2007).
 134. Li, C. *et al.* Finding an easy way to harmonize: a review of advances in clinical research and combination strategies of EZH2 inhibitors. *Clin. Epigenetics* **13**, 1–12 (2021).
 135. Tan, J. Z., Yan, Y., Wang, X. X., Jiang, Y. & Xu, H. E. EZH2: Biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**, 161–174 (2014).
 136. Yap, T. A. *et al.* Phase I study of the novel enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitor GSK2816126 in patients with advanced hematologic and solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **25**, 7331–7339 (2019).
 137. Heinemann, B. *et al.* Inhibition of demethylases by GSK-J1/J4. *Nature* **514**, E1–E2 (2014).
 138. Kruidenier, L. *et al.* A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* **488**, 404–408 (2012).
 139. Cottone, L. *et al.* Inhibition of histone H3K27 demethylases inactivates brachyury (TBXT) and promotes chordoma cell death. *Cancer Res.* **80**, 4540–4551 (2020).
 140. Li, Y. *et al.* Therapeutic potential of GSK-J4, a histone demethylase KDM6B/JMJD3 inhibitor, for acute myeloid leukemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **144**, 1065–1077 (2018).
 141. Zhang, J. *et al.* Targeted inhibition of KDM6 histone demethylases eradicates tumor-initiating cells via enhancer reprogramming in colorectal cancer. *Theranostics* **10**, 10016–10030 (2020).
 142. Wang, Q. *et al.* Elevating H3K27me3 level sensitizes colorectal cancer to oxaliplatin. *J. Mol. Cell Biol.* **12**, 125–137 (2020).
 143. Jia, W. *et al.* Histone demethylase JMJD3 regulates fibroblast-like synovioyte-mediated proliferation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *FASEB J.* **32**, 4031–4042 (2018).
 144. Yapp, C., Carr, A. J., Price, A., Oppermann, U. & Snelling, S. J. B. H3K27me3

- demethylases regulate in vitro chondrogenesis and chondrocyte activity in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 1–10 (2016).
145. Pros, E. *et al.* Genome-wide profiling of non-smoking-related lung cancer cells reveals common RB1 rearrangements associated with histopathologic transformation in EGFR-mutant tumors. *Ann. Oncol.* **31**, 274–282 (2020).
 146. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, (2009).
 147. Zhu, L. J. *et al.* ChIPpeakAnno: A Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC Bioinformatics* **11**, (2010).
 148. Heinz, S. *et al.* Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol. Cell* **38**, 576–589 (2010).
 149. Anders, S. and W. H. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, 4310–4315 (2010).
 150. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. & He, Q. Y. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi. A J. Integr. Biol.* **16**, 284–287 (2012).
 151. Vidal, A. *et al.* Lurbinectedin (PM01183), a new DNA minor groove binder, Inhibits growth of orthotopic primary graft of cisplatin-resistant epithelial ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 5399–5411 (2012).
 152. Shanmugam, G., Rakshit, S. & Sarkar, K. HDAC inhibitors: Targets for tumor therapy, immune modulation and lung diseases. *Transl. Oncol.* **16**, 101312 (2022).
 153. Chandrasekaran, R. & Thompson, M. Polybromo-1-bromodomains bind histone H3 at specific acetyl-lysine positions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 661–666 (2007).
 154. Alimova, I. *et al.* Inhibition of MYC attenuates tumor cell self-renewal and promotes senescence in SMARCB1-deficient Group 2 atypical teratoid rhabdoid tumors to suppress tumor growth in vivo. *Int. J. Cancer* **144**, 1983–1995 (2019).
 155. Wu, C. H. *et al.* Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13028–13033 (2007).
 156. Ozaki, T. & Nakagawara, A. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers (Basel)*. **3**, 994–1013 (2011).
 157. Ravi, R. *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia- inducible factor 1 α . *Genes Dev.* **14**, 34–44 (2000).
 158. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase - Lee - 2006 - Aging Cell - Wiley Online Library
 159. Xie, M., Jiang, Q. & Xie, Y. Comparison between decitabine and azacitidine for the treatment of myelodysplastic syndrome: A meta-analysis with 1392

- participants. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* **15**, 22–28 (2015).
160. Kalkat, M. *et al.* MYC deregulation in primary human cancers. *Genes (Basel)*. **8**, 2–30 (2017).
 161. Ecker, J. *et al.* Targeting class I histone deacetylase 2 in MYC amplified group 3 medulloblastoma. *Acta Neuropathol. Commun.* **3**, 22 (2015).
 162. Valinciute, G., Ecker, J., Selt, F., Hielscher, T. & Sigaud, R. Class I HDAC inhibitor entinostat synergizes with PLK1 inhibitors in MYC - amplified medulloblastoma cells. *J. Neurooncol.* (2023).
 163. Seo, S., Richardson, G. A. & Kroll, K. L. The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* **132**, 105–115 (2005).
 164. Chi, T. H. *et al.* Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity* **19**, 169–182 (2003).
 165. Gozdecka, M. *et al.* UTX-mediated enhancer and chromatin remodeling suppresses myeloid leukemogenesis through noncatalytic inverse regulation of ETS and GATA programs. *Nat. Genet.* **50**, 883–894 (2018).
 166. Das, P. & Taube, J. H. Regulating methylation at h3k27: A trick or treat for cancer cell plasticity. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–33 (2020).
 167. Connor, Y. D. *et al.* Germline mutations of SMARCA4 in small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type and in SMARCA4-deficient undifferentiated uterine sarcoma: Clinical features of a single family and comparison of large cohorts. *Gynecol. Oncol* **157** (1), 106–114 (2020).
 168. Ntziachristos, P. *et al.* Contrasting roles for histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukemia. *Nature* **514**, 513–517 (2014).
 169. Hashizume, R. *et al.* Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat. Med.* **20**, 1394–1396 (2015).

PÁGINAS WEB:

www.cellsignal.com/pathways

<https://www.cbioportal.org>

<https://cancer.sanger.ac.uk>

<https://depmap.org>

<https://www.cancerrxgene.org>

MATERIAL SUPLEMENTÁRIO

Tabla Suplementaria 1. Lista de cebadores para la secuenciación de *KDM6A*, *KDM6B*, *SMARCA4* y *SMARCB1*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
KDM6A_F1	ATGAGTCTAGTTTAAAGCATTTTCAG
KDM6A_F2	ATTAAATGCTACTTAAATGCAACTAG
KDM6A_F3	GGAGTTGCACAGGTAC
KDM6A_F4	GGTGGACAACAAGGC
KDM6A_F5	TAAAAATGGCTTATCTAACAGTAGC
KDM6A_F6	TGACTAAACTTCCTGCTTTTG
KDM6A_F7	GCACGAAATATCAAGGTCTCAGATCCAAAGC
KDM6B_F1	AACGGAAGTATGGAGCC
KDM6B_F2	CTCCAGCGTTTCACC
KDM6B_F3	AGGATTCTCACACCCC
KDM6B_F4	CCGCTGAAGGAGCCC
KDM6B_F5	CGAAGAGCCAGTCCC
KDM6B_F6	TGCCCAGCCCACACC
KDM6B_F7	GTGGAAGCGAGTGGC
KDM6B_F8	ACGAGCACTACTGGG
KDM6B_F9	AAGAAAATCGCTTACCAGGGC
SMARCB1-F1	ATGATGATGATGGCGCTGAGCAAGACC
SMARCB1-F2	ATGGGCCGAGACAAGAAGAGAACC
SMARCB1-R1	CTTCTGCCCATCGATCTCCATGT
SMARCB1-R2	TTACCAGGCCGGGGCCGTG
SMARCA4-E2F	TGACCGTATGATTGTCCCTTG
SMARCA4-E2R	CAGGACACCTCCAACAAGAAG
SMARCA4-E3F	TCGAGCTTCTCTCGGGCAGC
SMARCA4-E3R	CATCCTGTGGGAACCCAGGG
SMARCA4-E4F	TGCCCTGTCTCAGAGTAGGAG
SMARCA4-E4R	ACAGAGCACGGTCTGTCCAC
SMARCA4-E5F	GGCCGCTGGTTAATAGGTGT
SMARCA4-E5R	CCCTGACAAAGCTCATCTCAA
SMARCA4-E6F	AGTGCCTCAAGCAGCTCAG
SMARCA4-E6R	AAGGAGGTGTAGGCCAAGTG
SMARCA4-E7F	ACTAGTGCCTGCCTCTCTCG
SMARCA4-E7R	GGCTCTGCAGTGATTGAGTG
SMARCA4-E8F	TTAGCGGTGAAGCATGTGAC
SMARCA4-E8R	AGGAACAAAGCAAACACAGC
SMARCA4-E9F	TGGGATTACAGGCCAATATTCTA
SMARCA4-E9R	AACTCCGAGCTGTGAAATGC
SMARCA4-E10F	CAGTGCGCTTCTGGATTGAC
SMARCA4-E11R	ACACCCTGGGATTCTCACC
SMARCA4-E12F	ACAGTTGAGTGGGTGCTTCC
SMARCA4-E13R	AGGAGACGGTCACAACACAC
SMARCA4-E14F	CAGCACACATTCCAGGATAGG
SMARCA4-E14R	GCTGAATGTCAGCTAGGGATG

SMARCA4-E15F	CGGCTGCACCTCTATGTGT
SMARCA4-E15R	GGTCTGCCTGAGGTCTGAAG
SMARCA4-E16F	CAGTAGAGGGTGGGATGTGG
SMARCA4-E16R	TTAAGCCACCTCGTTTGTGG
SMARCA4-E17F	ACAGTTTCTCTGCCCCACTCG
SMARCA4-E17R	GCATTCTCAGGTTCACTGTCC
SMARCA4-E18F	GTCAGTGGGCAGTTGCAG
SMARCA4-E18R	GTAGGGGCTTTGGAGGAGAC
SMARCA4-E19F	CTCTTCCACCTGGAGCCTTC
SMARCA4-E19R	GCAGATGCAGACTCTCACCA
SMARCA4-E20F	CCACATCCGCACCTTCTAGT
SMARCA4-E20R	CTGGGACTGTGGGGAGAG
SMARCA4-E21F	GGGGTCAGAGCTGGGTTC
SMARCA4-E21R	CAGATCATGACCCGATGGT
SMARCA4-E22F	CAACACCCACCCATCCAC
SMARCA4-E22R	AAGAGCTGTGAGGAGAAGC
SMARCA4-E23F	GAGCACGAGCGGTGTGTG
SMARCA4-E23R	CTGCCTTTGAAATTGGACAAC
SMARCA4-E24F	GTGGGTGACGTCTGCTTAGG
SMARCA4-E24R	AGGGAATGCCAGTGAGGAG
SMARCA4-E25F	CTCAGAAGCAGGTGTTCCCTTG
SMARCA4-E25R	GGGTCCAAGACAATGTGGAG
SMARCA4-E26F	GCACAGCACACCTCTCCAG
SMARCA4-E26R	TCAGCCCACACTCCCTTTAC
SMARCA4-E28F	CATTCAATCCTCGGCTTCTC
SMARCA4-E28R	ATACCACCATGGGCACTAGG
SMARCA4-E29F	GCCACTGAAAAATCGAGAGC
SMARCA4-E29R	CCAAGGAAAGCATTTTGGAC
SMARCA4-E30F	AGTCAAGCTGAAGGGAGAGC
SMARCA4-E30R	TGTGCAGAGTCAGAGTGCAG
SMARCA4-E31F	AACAATGTGGGAACCTGCTG
SMARCA4-E31R	CCACACACCACAGCTCTCAG
SMARCA4-E32F	TCCTCATAGGCACGAGGAAT
SMARCA4-E32R	CATCAATTCAGAAGGGAAGGA
SMARCA4-E33F	CTGTCCAGGGGCAACACAG
SMARCA4-E34R	CAGGTCAAGCCTCAGCTTTC
SMARCA4-E35F	CGGCCACATCAGTGTTTTTC
SMARCA4-E35R	ATCTCAGCTCTGGAACGAGG

PUBLICACIONES

ARTICLE


<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24618-3>

OPEN

SMARCA4 deficient tumours are vulnerable to KDM6A/UTX and KDM6B/JMJD3 blockade

Octavio A. Romero ^{1,11}✉, Andrea Vilarrubi ^{1,11}, Juan J. Alburquerque-Bejar ¹, Antonio Gomez ², Alvaro Andrades^{3,4}, Deborah Trastulli ⁵, Eva Pros ¹, Fernando Setien¹, Sara Verdura⁵, Lourdes Farré ⁶, Juan F. Martín-Tejera⁶, Paula Llabata ¹, Ana Oaknin ⁷, Maria Saigi ^{1,8}, Josep M. Piulats⁸, Xavier Matias-Guiu⁹, Pedro P. Medina ^{3,4}, August Vidal ^{9,10}, Alberto Villanueva ^{6,10} & Montse Sanchez-Cespedes ¹✉

Despite the genetic inactivation of *SMARCA4*, a core component of the SWI/SNF-complex commonly found in cancer, there are no therapies that effectively target *SMARCA4*-deficient tumours. Here, we show that, unlike the cells with activated *MYC* oncogene, cells with *SMARCA4* inactivation are refractory to the histone deacetylase inhibitor, SAHA, leading to the aberrant accumulation of H3K27me3. *SMARCA4*-mutant cells also show an impaired transactivation and significantly reduced levels of the histone demethylases KDM6A/UTX and KDM6B/JMJD3, and a strong dependency on these histone demethylases, so that its inhibition compromises cell viability. Administering the KDM6 inhibitor GSK-J4 to mice orthotopically implanted with *SMARCA4*-mutant lung cancer cells or primary small cell carcinoma of the ovary, hypercalcaemic type (SCCOHT), had strong anti-tumour effects. In this work we highlight the vulnerability of KDM6 inhibitors as a characteristic that could be exploited for treating *SMARCA4*-mutant cancer patients.

¹Cancer Genetics Group, Josep Carreras Leukaemia Research Institute (IJC), Badalona, Barcelona, Spain. ²Rheumatology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain. ³Department of Biochemistry and Molecular Biology I. Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain. ⁴GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer, University of Granada, Andalusian Regional Government, Granada, Spain. ⁵Genes and Cancer Group, Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute-IDIBELL Barcelona, Barcelona, Spain. ⁶Chemoresistance and Predictive Factors Group, Program Against Cancer Therapeutic Resistance (ProCURE), Catalan Institute of Oncology (ICO), Oncobell Program, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain. ⁷Department of Medical Oncology, Vall d'Hebrón Hospital, Barcelona, Spain. ⁸Department of Medical Oncology, Catalan Institute of Oncology (ICO), Barcelona, Spain. ⁹Department of Pathology, University Hospital of Bellvitge, IDIBELL, CIBERONC, L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain. ¹⁰Xenopat S.L., Parc Científic de Barcelona (PCB), Barcelona, Spain. ¹¹These authors contributed equally: Octavio A. Romero, Andrea Vilarrubi. ✉email: oromero@carrerasresearch.org; mcespedes@carrerasresearch.org

Chromatin remodelling is one of the epigenetic processes that is commonly disturbed in cancer, mainly through alterations in the mammalian switch/sucrose non-fermentable (SWI/SNF) complex. This complex modifies the structure of the chromatin by the ATP-dependent disruption of DNA–histone interactions at the nucleosomes, thereby activating or repressing gene expression. The various functions and components of the SWI/SNF complex have been thoroughly reviewed elsewhere^{1,2}.

Alterations at genes encoding different components of the SWI/SNF complex are present in a variety of tumour types and are thus an important feature of cancer development³. The *SMARCA4* (also known as *BRG1*) gene codes a core catalytic component of the SWI/SNF complex that features a bromodomain and helicase/ATPase activity^{1,2}. Our own previous work produced the first evidence that *SMARCA4* is genetically inactivated in cancer and that *SMARCA4* deficiency prevents the response to pro-differentiation stimuli in cancer cells^{4–6}. In lung cancer, *SMARCA4* inactivation affects about one-third of non-small cell lung cancers (NSCLCs) and preferentially occurs against a background of wild type MYC (either C, L or N) or of members of the MYC-axis, such as MAX or MGA^{4–7}. This hints at the existence of an important network that connects SWI/SNF and MAX/MYC functions. Mutations of *SMARCA4* also occur in other types of cancer, notably in the rare and very aggressive small cell carcinoma of the ovary, hypercalcaemic type (SCCOHT)⁸, in which *SMARCA4* inactivation has been reported in almost 100% of cases^{9–11}.

The progress made towards understanding the role of chromatin remodelling in cancer development highlights the great potential of new epigenetic-based therapeutic strategies. With particular reference to *SMARCA4*, some previous studies have sought the vulnerabilities of *SMARCA4*-deficient tumours with a view to exploiting them for cancer treatment. *SMARCA4* and *SMARCA2* are mutually exclusive catalytic subunits of the SWI/SNF complex, and the inhibition of *SMARCA2* activity appears to be synthetic lethal in cancer cells carrying *SMARCA4*-inactivating mutations, an effect that could be explained by paralogue insufficiency^{12,13}. Further, SWI/SNF-mutant cancer cells with a wild type *KRAS* background depend on the non-catalytic action of the histone methyltransferase, EZH2¹⁴. However, we currently know of no small compounds that are capable of suppressing the ATPase or non-catalytic functions of *SMARCA2* and EZH2, respectively, so these molecules are not yet suitable for use in therapeutic interventions. More recently, it has been proposed that cancer cells with an inactive *SMARCA4* may be susceptible to CDK4/6 inhibitors¹⁵.

On the other hand, components of the SWI/SNF complex bind to various nuclear receptors (e.g., oestrogen, androgen, glucocorticoid and retinoid receptors), thereby adapting the gene expression programmes to the demands of the cell environment^{16–19}. We have reported that *SMARCA4* is required to promote cell growth inhibition triggered by corticoids and retinoids in cancer cells⁶ and that such effects are enhanced by combination with the pan-histone deacetylase (HDAC) inhibitor suberanilohydroxamic acid (SAHA)²⁰. We observed that MYC-amplified but not *SMARCA4*-mutant cancer cells were sensitive to these treatments.

Here, we show that cancer cells that lack *SMARCA4* have a defective regulation of H3K27ac/H3K27me3 and exhibit low levels of KDM6s, indicative of a deficient activity of these demethylases. This forms not only the basis of the refractoriness to SAHA, but also sensitises the cancer cells to inhibition of the demethylase activity of KDM6s, heavily compromising their viability.

Results

Refractoriness to growth inhibition and increase H3K27me3 by SAHA in *SMARCA4*def cells. We studied the differential response to SAHA in lung cancer cells with oncogenic activation

of MYC (hereafter referred to as MYCamp) with respect to those with genetic inactivation of *SMARCA4* (hereafter, *SMARCA4*-def). The administration of SAHA was more effective at reducing the growth of MYCamp cells than of *SMARCA4*def cells (mean of half-maximum effective concentrations (EC₅₀) of 0.5 and 1.4 μM, for each group, respectively) (Fig. 1a, b, Supplementary Fig. 1a). Flow cytometric analysis showed that, in the MYCamp cells, SAHA blocked cell cycle progression at the G0/G1 or SubG1 phases and increased apoptosis, whereas no changes were observed in *SMARCA4*def cells (Supplementary Fig. 1b–d; Supplementary Fig. 2). These effects were not influenced by lung cancer histopathological subtypes, since they occurred in NSCLC and SCLC types. The selective sensitivity to SAHA of MYCamp cells was validated using publicly available datasets including more than 750 cancer cell lines of different origin and genetic background (Fig. 1c).

SAHA increases global histone acetylation, favouring an open chromatin structure and promoting transcriptional activation²¹. Transcriptionally active chromatin domains are characterised by a distinct array of histone marks, e.g., H3K27ac, H3K4me1 and H3K4me3, whereas H3K27me3 and H2AK119ub are often found at silent gene loci^{22,23}. We first tested the effects of SAHA in global H3K27ac and H3K27me3, two different marks on the same residue, but with opposite functions^{22,23}. As expected, SAHA triggered an increase in global H3K27ac in all the cells, while we observed an aberrant accumulation of H3K27me3 in the *SMARCA4*def cells, rather than the expected decrease (Fig. 1d). To determine whether this was due to a defective *SMARCA4*, we used H1299 cells, which lack *SMARCA4* expression owing to an intragenic homozygous deletion⁴, and restored wild type *SMARCA4* (H1299-wt*SMARCA4*), using a doxycycline-inducible system, as previously reported⁶. As a control, we expressed a mutant form that lacked the ATPase domain (p.Glu668_Gln758del)⁴ (hereafter referred to as H1299-mut*SMARCA4*). Administration of SAHA did not affect global H3K27me3 in the H1299-wt*SMARCA4* cells, whereas the H1299-mut*SMARCA4* cells underwent an increase in H3K27me3 concomitantly with a decrease in global H3K27ac (Fig. 1e). A dominant negative function of an overexpressed mutant *SMARCA4* protein may underlie this effect in the H1299-mut*SMARCA4* cells. Thus, the absence of a functional *SMARCA4* induces defects in the dynamics of the H3K27me3 mark, following administration of SAHA.

The net levels of H3K27me3 are dictated by the coordinated action of histone methyltransferases (EZH2) and demethylases (KDM6A and KDM6B)²³. The administration of SAHA did not alter the levels of EZH2 in most *SMARCA4*def cells (except in the H23 cells which showed an increase), indicating that over-activation of the methyltransferase activity of EZH2 is unlikely to account for the defects in H3K27me3 triggered by SAHA in these cells (Fig. 1f; Supplementary Fig. 3a). In contrast, treatment with SAHA alone reduced EZH2 levels in the MYCamp cells, consistent with the fact that SAHA triggers inhibition of cell cycle progression and increases apoptosis in cancer cells with this genetic context. These effects were enhanced by the addition of GSK126, an inhibitor of the enzymatic activity of EZH2. Previous studies have shown that GSK126, alone or combined with HDAC inhibitors, suppress the growth of the small cell carcinoma of the ovary hypercalcaemic type (SCCOHT)^{24,25}. Here, the administration of GSK126, alone or in combination with SAHA, did not reduce the proliferation or viability of the *SMARCA4*def lung cancer cells (Supplementary Fig. 3b–d), implying that EZH2 activity does not, by itself, cause the refractoriness to cell growth inhibition by SAHA in *SMARCA4*def lung cancer cells.

Regulation of KDM6 expression by *SMARCA4*. The histone demethylases KDM6A (also known as UTX) and KDM6B (also

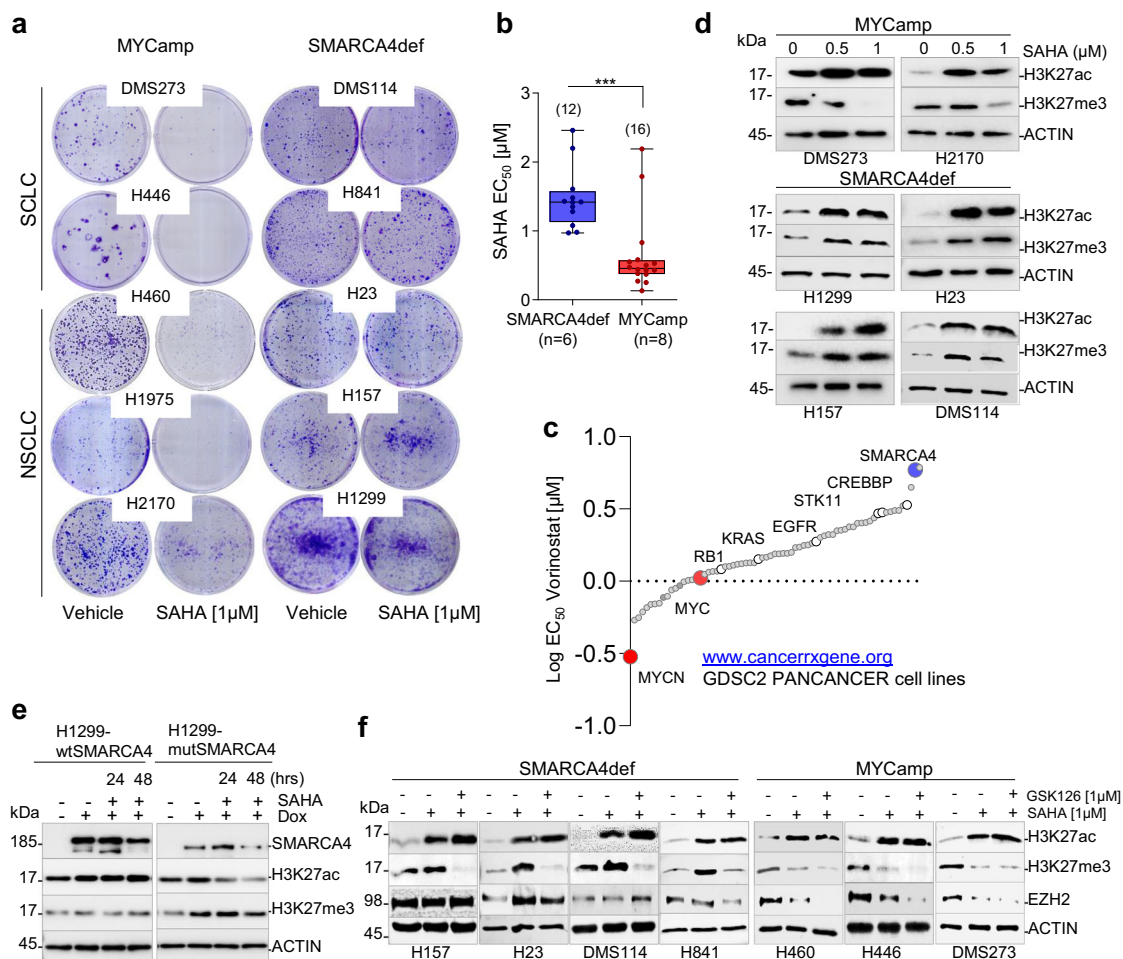


Fig. 1 SAHA reduces growth and H3K27me3 levels in MYCamp, but not in SMARCA4def cancer cells. **a** Clonogenic assays of the indicated lung cancer cells, untreated (vehicle) or treated with SAHA. NSCLC, non-small cell lung cancer; SCLC small cell lung cancer. **b** Distribution and mean of EC₅₀ values for treatment with SAHA in MYCamp (0.5 μM) and SMARCA4def cells (1.4 μM) (from MTT assays for cell viability; Supplementary Fig. 1). Bars show mean ± SD; two-sided unpaired Student's *t*-test. Values from two independent experiments per cell line are represented. In box-whisker plots, the horizontal band inside box indicates the median, the bottom and top edges of the box 25th–75th percentiles and the whiskers indicate the min to max. ****P* = 0.0002. **c** Plot with the comparative half maximal effective concentration (EC₅₀) values for treatment with SAHA (vorinostat) in a panel of 758 cancer cell lines (from www.cancerrxgene.org database), according to the presence of selected gene alterations, including amplification of MYC oncogenes and inactivation of SMARCA4. **d–f** Representative western blots depicting global levels of the indicated proteins and histone marks (H3K27ac and H3K27me3) in the indicated cells following treatment with SAHA (**d**), in the H1299-wtSMARCA4 and H1299-mutSMARCA4 cell models after induction of SMARCA4 (dox, doxycycline, 1 μg/mL; 72 h), with or without SAHA treatment at 24 and 48 h (**e**), or in the indicated cells following treatments with SAHA and SAHA plus GSK126 (**f**). ACTIN, protein-loading control. A Source Data file is available for this figure.

known as JMJD3) have H3K27 as a substrate and play a central role in the development of some types of tumours²³. Searching the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) we found significantly lower levels of expression of several histone demethylases (KDMs), including *KDM6A* and *KDM6B*, in SMARCA4def compared with MYCamp cells or with LC cells that are wild type for SMARCA4 and MYC (Fig. 2a and Supplementary Fig. 4a). The basal levels of EZH2 were similar in the different groups (Fig. 2b; Supplementary Fig. 4b). We validated our observations in a panel of LC cell lines at the mRNA and protein levels in which, with few exceptions, SMARCA4def cells carry lower levels of *KDM6A* and *KDM6B*, as compared to the MYCamp cells (Fig. 2b, c; Supplementary Fig. 4b). The same observations were made in lung primary tumours (Supplementary Fig. 4c). Further, the ectopic expression of the SMARCA4 wild type (H1299-wtSMARCA4 cells), triggered an upregulation of *KDM6A* and *KDM6B*, albeit subtle. An opposite effect was observed for the mutant (H1299-mutSMARCA4 cells). The levels of EZH2 were unaffected (Fig. 2d; Supplementary Fig. 4d). Conversely, in the

MYCamp cells, the depletion of SMARCA4 reduced the levels of both KDM6s (Supplementary Fig. 4e). Finally, the analysis of the changes in gene expression from publicly available databases (Sanger CRISPR) support the down-regulation of several KDMs, specially *KDM6A* and *KDM6B*, following the knockout of SMARCA4 using CRISPR/CAS9 in a panel of human cancer cell lines (<https://depmap.org/portal/depmap/>) (Supplementary Fig. 4f). Collectively, these observations indicate that a functional SMARCA4 is required to activate KDM6 expression.

To study the genome-wide effects of wild type and mutant SMARCA4 and of SAHA on the dynamics of H3K27 modification, we performed chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq) of SMARCA4, EZH2, H3K27ac and H3K27me3, in the H1299 cell model. No peaks were observed for SMARCA4 before adding doxycycline, which is consistent with the absence of SMARCA4 in these cells (Fig. 2e; Supplementary Fig. 5a). The global occupancy of wild type and mutant SMARCA4 was similar, indicating that ATPase activity does not influence recruitment to the chromatin (Fig. 2e–g; Supplementary

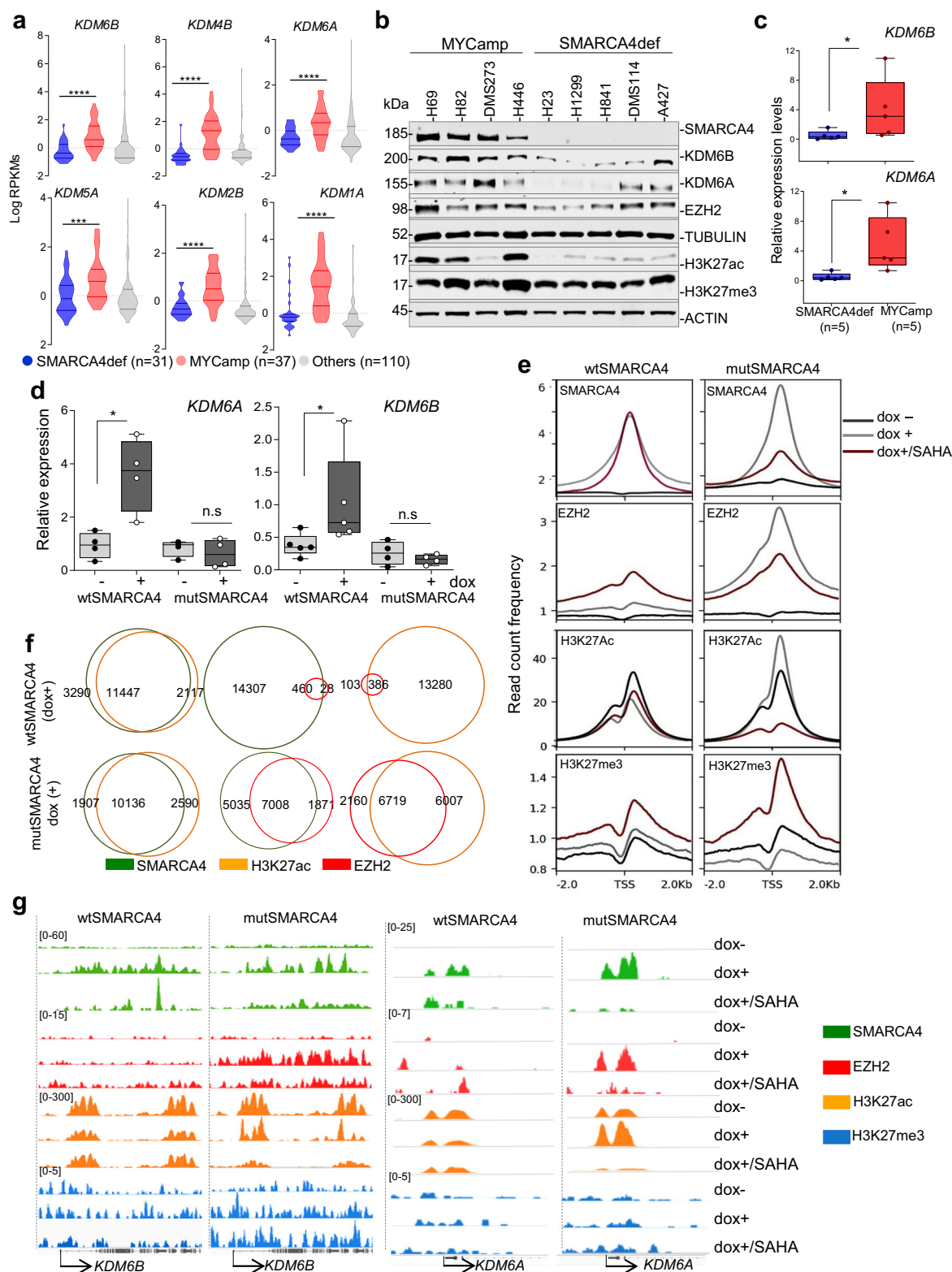


Fig. 5a, b). The H3K27ac deposition at promoters was not affected following restitution of SMARCA4 activity (Fig. 2f). However, in the SMARCA4 mutant cells, the H3K27ac peaks were sharper and it was evident a reduction of H3K27ac downstream of the peaks at promoters, in the gene body regions. This was in parallel with a strong increase in EZH2 binding to the DNA in SMARCA4 mutant-expressing cells (Fig. 2e, g; Supplementary Fig. 5c). The latter observation suggests that the

overexpressed mutant protein has a dominant negative effect. H3K27ac marks were present in at least 80% of the promoters bound by SMARCA4 and some also showed EZH2 occupancy (Fig. 2f; Supplementary Fig. 6a). The increase in EZH2 binding following expression of the SMARCA4 mutant is consistent with previous findings that ectopic expression of an SMARCA4-inactive protein allows the occupancy of PRC1 and PRC2 in CpG island promoters throughout the genome²⁶.

Fig. 2 SMARCA4 regulates the levels of the KDM6s. **a** Violin plots comparing levels of the indicated KDMs in SMARCA4def ($n = 31$), MYCamp ($n = 37$) and other (wild type for SMARCA4 and for MYC) ($n = 110$) lung cancer cell lines (from the Cancer Cell Line Encyclopedia—CCLE at cBioportal). RPKMs (reads per million). Bars show mean $\pm$ SD. Two-sided unpaired Student's t -test: *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. **b** Western blot depicting endogenous levels of the indicated proteins in lung cancer cell lines. TUBULIN and ACTIN, protein-loading control. **c** and **d** Real-time quantitative PCR of *KDM6A* and *KDM6B* (relative to *ACTB*) for comparing mRNA levels, for each individual cell line, among the indicated groups of lung cancer cell lines * $P = 0.032$ (*KDM6B*) and * $P = 0.016$ (*KDM6A*) (**c**), or in the H1299-wtSMARCA4 and H1299-mutSMARCA4 cell models (dox, doxycycline, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 72 h). * $P = 0.029$ (*KDM6A*) and $P = 0.032$ (*KDM6B*) (**d**). In box-whisker plots, the horizontal band inside box indicates the median, the bottom and top edges of the box 25th–75th percentiles and the whiskers indicate the min to max. Four and five biological replicates were included for the determination of the *KDM6A* and *KDM6B* levels, respectively, in the H1299 cell model. Bars show mean $\pm$ SD. Two-sided unpaired Student's t -test, **e** Read count frequency of heatmaps, at ± 2 kb regions centred on the transcriptional start site (TSS), of the indicated proteins and conditions in the H1299 cell model (dox, doxycycline, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and SAHA 1 μM , for 72 h). **f** Venn diagrams representing overlap of SMARCA4, H3K27ac and EZH2 peaks in the indicated cells and under the stipulated conditions. **g** Representative snapshots from IGV of ChIP-seq profiles at selected target loci performed in H1299 cell models. A Source Data file is available for this figure.

The administration of SAHA reduced the number of promoters recruiting SMARCA4 wild type by half, without producing major changes in global H3K27ac deposition (Supplementary Fig. 5a, b). SMARCA4 does not interact directly with the DNA, but rather recognises and binds acetylated lysines within histone H3 and H4 tails²⁷. Given this, the severe reduction of global H3K27ac deposition observed in SMARCA4 mutant-overexpressing cells following SAHA treatment, also shown by western blot (Fig. 1e), could be the reason for the strong reduction in the global intensity of the SMARCA4 peaks (Fig. 2e). Conversely, the treatment with SAHA prompted the recruitment of EZH2 to the DNA and the increase in H3K27me3 deposition in promoter regions, in mutant and wild type SMARCA4-expressing cells. However, the effect in the latter cell type was less dramatic, and we attribute this to the slow rate of H3K27me3 removal (Fig. 2e; Supplementary Fig. 6a). The observation that SAHA increases EZH2 recruitment and H3K27me3 deposition is somewhat counterintuitive but may be a compensatory effect to avoid detrimental high levels of histone acetylation.

SMARCA4 was bound to different KDMs, including *KDM2B*, *KDM4B*, *KDM6A* and *KDM6B*, among others, in association with H3K27ac. However, there was also a concomitant increase in EZH2 occupancy in the SMARCA4 mutant-expressing cells (Fig. 2g; Supplementary Fig. 6b). These results support the idea that SMARCA4 regulates the expression of various KDMs, including *KDM6A* and *KDM6B*, through direct promoter occupancy. The increase in EZH2 in the promoter of these genes is consistent with a lack of transcriptional activation and even some transcriptional repression of these KDMs in the H1299-mutSMARCA4 cells (Fig. 2d; Supplementary Fig. 4d).

KDM6B depletion mimics the response of SMARCA4def cells to SAHA. We wondered to what extent the lack of *KDM6A* or *KDM6B* regulation is involved in the greater H3K27me3 and refractoriness to SAHA in the SMARCA4def cells, and whether their relative contributions differ. First, we found that the mRNA levels of the *KDM6B* were inversely correlated with the EC_{50} to SAHA (Supplementary Fig. 7a). Next, using shRNAs, we down-regulated *KDM6A* and *KDM6B* expression in different MYCamp cells (Fig. 3a; Supplementary Fig. 7b), and noted that, mimicking the behaviour of the SMARCA4def cells, the reduction in *KDM6B* levels, but not of *KDM6A*, suppressed the ability to inhibit cell growth (Supplementary Fig. 7c) by SAHA. The depletion of *KDM6B*, but not *KDM6A*, also prevented SAHA from decreasing overall levels of H3K27me3 deposition (Fig. 3b), hinting at a more widespread role for *KDM6B* in the global removal of H3K27me3. The administration of the small molecule compound GSK-J4²⁸, a very specific inhibitor of *KDM6A/KDM6B*, has similar effects, reverting the sensitivity to SAHA in a dose-

dependent manner (Fig. 3c, d) and prevented the SAHA-triggered global decrease in H3K27me3 in both *KDM6s*-depleted cells (Fig. 3b).

These findings suggest that a deficiency in *KDM6B* account for the resistance of the SMARCA4def cells to growth inhibition by SAHA.

Inhibition of *KDM6A/B* is toxic in SMARCA4def cancer cells.

We hypothesised that the low levels and impaired regulation of *KDM6s* expression and the defects in H3K27 modification may render SMARCA4def cells particularly susceptible to *KDM6s* inhibition. We tested the effects of GSK-J4 on the growth of our panel of cancer cells and found that the drug was more toxic in the SMARCA4def cells, with a five-fold lower EC_{50} than in the MYCamp cells or in the lung cancer cells that are wild type for both *SMARCA4* and *MYC* (Fig. 4a, b; Supplementary Fig. 8a). The greater sensitivity of the SMARCA4def cancer cells for GSK-J4 is supported by studies available from databases (Supplementary Fig. 8b). For the next stage of the study, we chose to use GSK-J4 at a concentration of 1 μM (Fig. 4a). We depleted SMARCA4 in three MYCamp cells and observed a decrease in the EC_{50} for GSK-J4, which is further evidence that GSK-J4 is more toxic in cancer cells with a non-functional SMARCA4 (Fig. 4c). We also tested the effects of rescuing SMARCA4 on the response to GSK-J4 using the H1299 cell model. Overexpression of the mutant SMARCA4 increased sensitivity to GSK-J4 relative to the restitution of wild type SMARCA4 (EC_{50} , 0.11 μM versus 0.2 μM) (Supplementary Fig. 8c, d). The toxicity was even greater in the H1299-mutSMARCA4 than in the parental H1299 cells, supporting the existence of a dominant negative effect of overexpressing a SMARCA4-mutant protein.

GSK-J4 is a potent inhibitor of *KDM6s* but can also suppress the activity of other KDMs, so we investigated how the low levels of *KDM6s* suppress cell viability by depleting *KDM6A*- and *KDM6B*. Downregulation of *KDM6A* or *KDM6B* inhibited the growth of the SMARCA4-def cells without affecting the MYCamp cells (Fig. 4d). In a large scale public CRISPR-based genetic screen the effect of *KDM6s* knock down in cell survival of SMARCA4def cancer cell was also observed (Supplementary Fig. 8e). Moreover, the lower levels of *KDM6A*, and to a lesser extent of *KDM6B*, in the MYCamp cells, sensitised the cells to the treatment with GSK-J4 (Fig. 4e, f).

Overexpression of *KDM6A* and *KDM6B* in SMARCA4def cells reverts sensitivity to *KDM6A/B* inhibition. Next, we aimed to determine whether the increase in the levels of *KDM6A* and *KDM6B* will revert the sensitivity of the cells to *KDM6A/B* inhibition. To do that, we have stably overexpressed the two different *KDM6s* in a panel of SMARCA4def cells (H1299, H841,

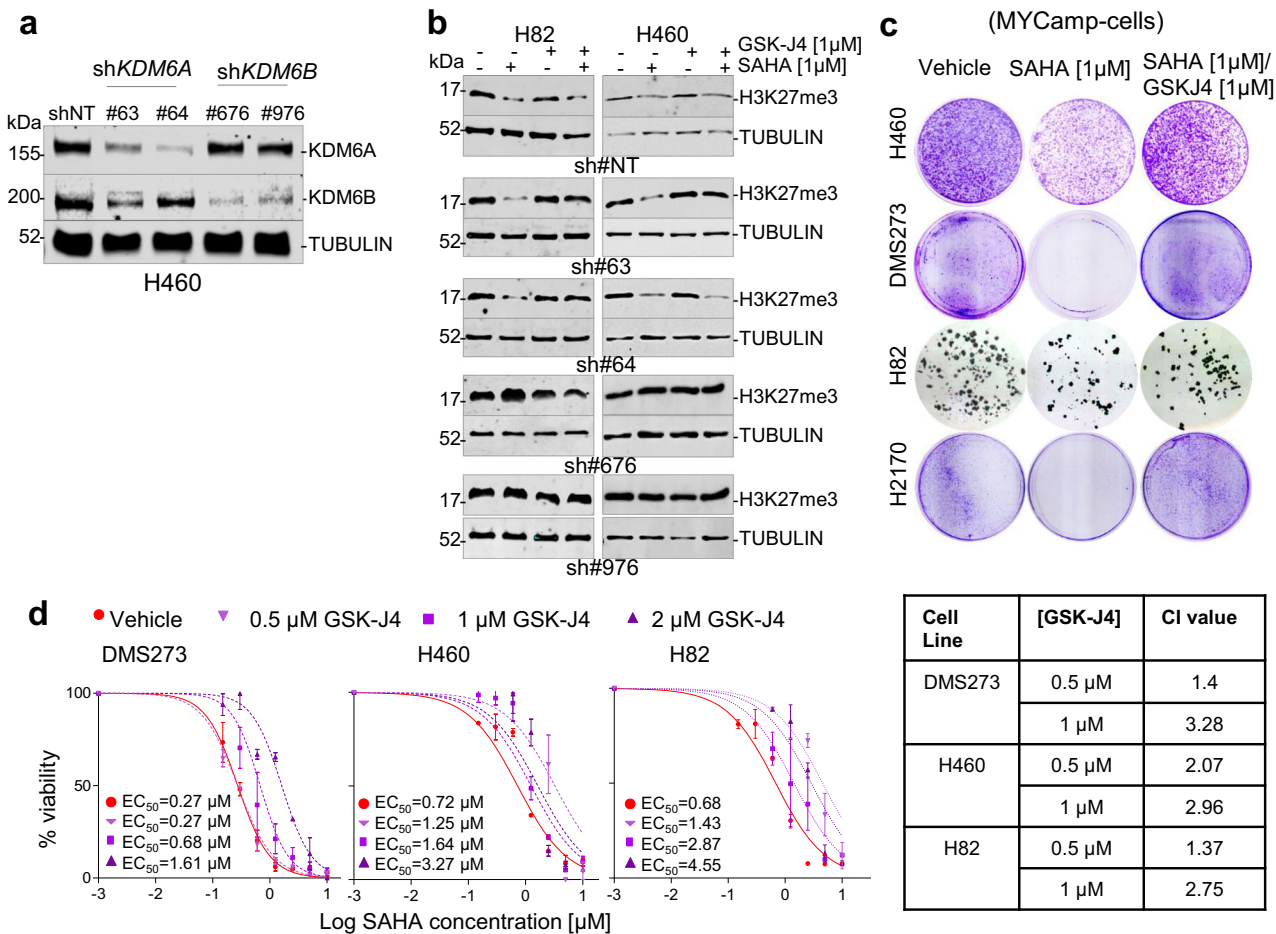


Fig. 3 KDM6B depletion mimics the response of SMARCA4-deficient cells to SAHA. **a** Western blot depicting levels of KDM6s in H460 cells infected with the non-target short hairpin (shNT) and with different shKDM6A (#63 and #64) and shKDM6B (#676, #976). **b** Western blot depicting levels of H3K27me3 and cells infected with the shNT, shKDM6A (#63, #64) or shKDM6B (#676, #976) treated with GSK-J4 and/or SAHA for 72 h. **c** Representative clonogenic assays for the indicated cells and treatments. **d** Viability of indicated cell lines, measured using MTT assays, 5 days after treatment with increasing concentrations of SAHA and co-treated or not with GSK-J4 at different concentrations. Lines, number of viable cells relative to the untreated cells. Data are presented as mean $\pm$ SD from three replicate cell cultures in two experiments. EC₅₀, half-maximal effective concentration. On the right, table presenting the combination index (CI) at the indicated concentrations of GSK-J4 (average CI from two independent experiments). CI < 1, CI = 1 and CI > 1 indicate synergism, additive effect, and antagonism, respectively. A Source Data file is available for this figure.

DMS114 and A427) (Fig. 5a). The overexpression of both KDM6A and KDM6B increased the EC₅₀ to GSK-J4 in all the cell lines tested. This effect was stronger after overexpressing the KDM6A (Fig. 5b, c).

Furthermore, we simultaneously overexpressed SMARCA4 and KDM6A or KDM6B in the H1299 cells (Fig. 5d) and measured the effects in cell viability upon treatment with GSK-J4. Wild type SMARCA4 increased the resistance to GSK-J4 mediated by KDM6A and KDM6B overexpression (Fig. 5e, f).

Together, these findings imply that the lack of SMARCA4 confers vulnerability to KDM6s inhibition on cancer cells, and that the intrinsically low levels of KDM6s, caused by the defective function of SMARCA4, underpin these effects.

Anti-tumour effects of GSK-J4 in SMARCA4def lung cancer orthotopic mouse models. We investigated the ability of the GSK-J4 compound to suppress tumour growth in vivo. To this end, we first grew two of the SMARCA4def (DMS114 and H841) and one MYCamp (DMS273) cell lines subcutaneously into the back of the mice ($n = 3$ mice/cell line). Once the solid tumour had entered the exponential growth phase, mice were euthanized,

and the tumours we minced into small fragments and orthotopically implanted into the lungs of another cohort of mice^{20,29}, to generate the orthotopic tumours. We randomly assigned the animals, implanted with each of the tumours, to treatment or vehicle groups of mice. Treatment with GSK-J4 strongly increased the overall and median survival of the animals implanted with the SMARCA4def tumours (DMS114X and H841X) relative to their matched vehicle group, whereas we found no differences between vehicle and treated groups in the animals implanted with the MYCamp tumours (DMS273X) (Fig. 6a). Remarkably, five of the mice implanted with the H841X and two of those implanted with the DMS114X and treated with GSK-J4 were alive at the end of the experiment, but had to be sacrificed despite not having respiratory difficulties or other symptoms associated with tumour progression. Our histopathological examination of tumour masses revealed the existence of large areas of necrosis in the tumours from GSK-J4-treated mice in comparison with the tumours from the vehicle-treated mice (Fig. 6b, c; Supplementary Fig. 9). We also used immunohistochemistry to determine the changes in the levels of H3K27me3 in the tumour samples following treatment with GSK-J4. We noted a significant increase in the levels of

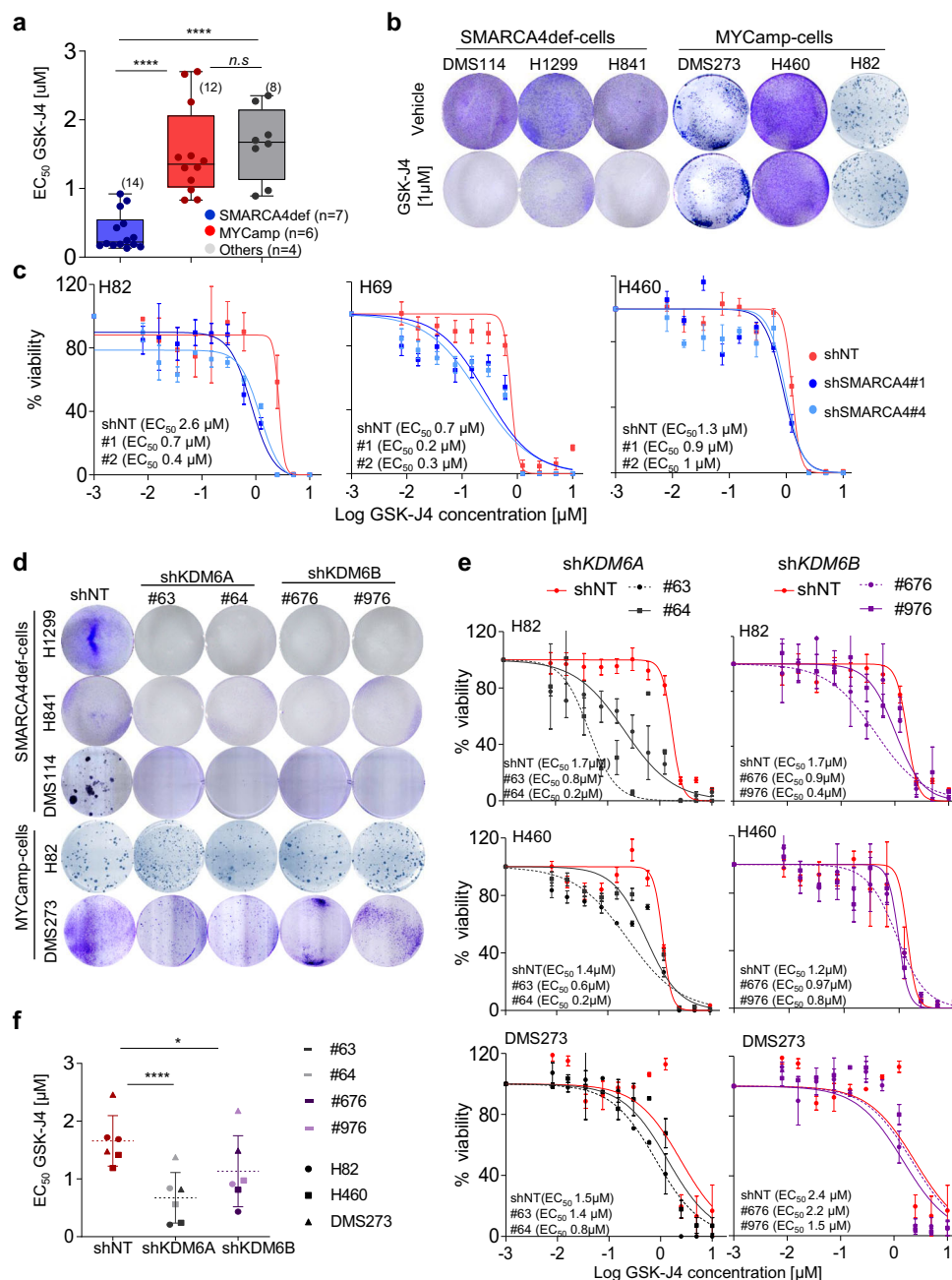


Fig. 4 **SMARCA4def cells are vulnerable to KDM6s inhibition.** **a** Distribution and mean of half-maximal effective concentration (EC_{50}) values for GSK-J4 (MTT assays. Supplementary Fig. 6a) in the indicated groups of cells. Values, from each cell line and from two independent experiments are represented. Two-sided unpaired Student's *t*-test. **** $P < 0.0001$. In box-whisker plots, the horizontal band inside box indicates the median, the bottom and top edges of the box 25th–75th percentiles and the whiskers indicate the min to max. **b** Representative clonogenic assays for the indicated cells and treatments. **c** Viability of the indicated cells infected with a short hairpin non-target (shNT) control or with two shRNAs targeting SMARCA4 (#1 and #4), measured using MTT assays, after treatment with increasing concentrations of GSK-J4 for 5 days. Lines, number of viable cells relative to untreated cells. Data are presented as mean and SD from three replicates and two experiments. **d** Representative clonogenic assays for the indicated cells infected with shNT, shKDM6A (#63, #64) or shKDM6B (#676, #976). **e** Viability of the indicated cell lines, measured using MTT assays, infected with a non-target (shNT) control or with two shRNAs targeting KDM6A or KDM6B after treatment with increasing concentrations of GSK-J4 for 5 days. Lines, number of viable cells relative to the untreated cells. Error bars, mean $\pm$ SD from triplicates. **f** Distribution and mean of the EC_{50} from two independent experiments per each of the three LC cell lines. Lines show mean $\pm$ SD. *P*-values were calculated using paired two-tailed Student's *t* test. * $P = 0.015$; **** $P < 0.0001$; ns, not significant. A Source Data file is available for this figure.

H3K27me3 in all the tumours treated with GSK-J4, suggesting that the compound had effectively reached the tumours (Fig. 6d).

GSK-J4 reduces tumour growth in mice implanted with SMARCA4def SCCOHT. As previously mentioned, SCCOHT is

a very aggressive and rare type of ovarian cancer that features inactivation of SMARCA4 in almost all cases^{9–11}. Here, we generated patient-derived orthotopic xenografts (PDOXs) using the primary tumours of two SCCOHT patients (OVA250 and OVA259), by orthotopically implanting the tumour in the mouse

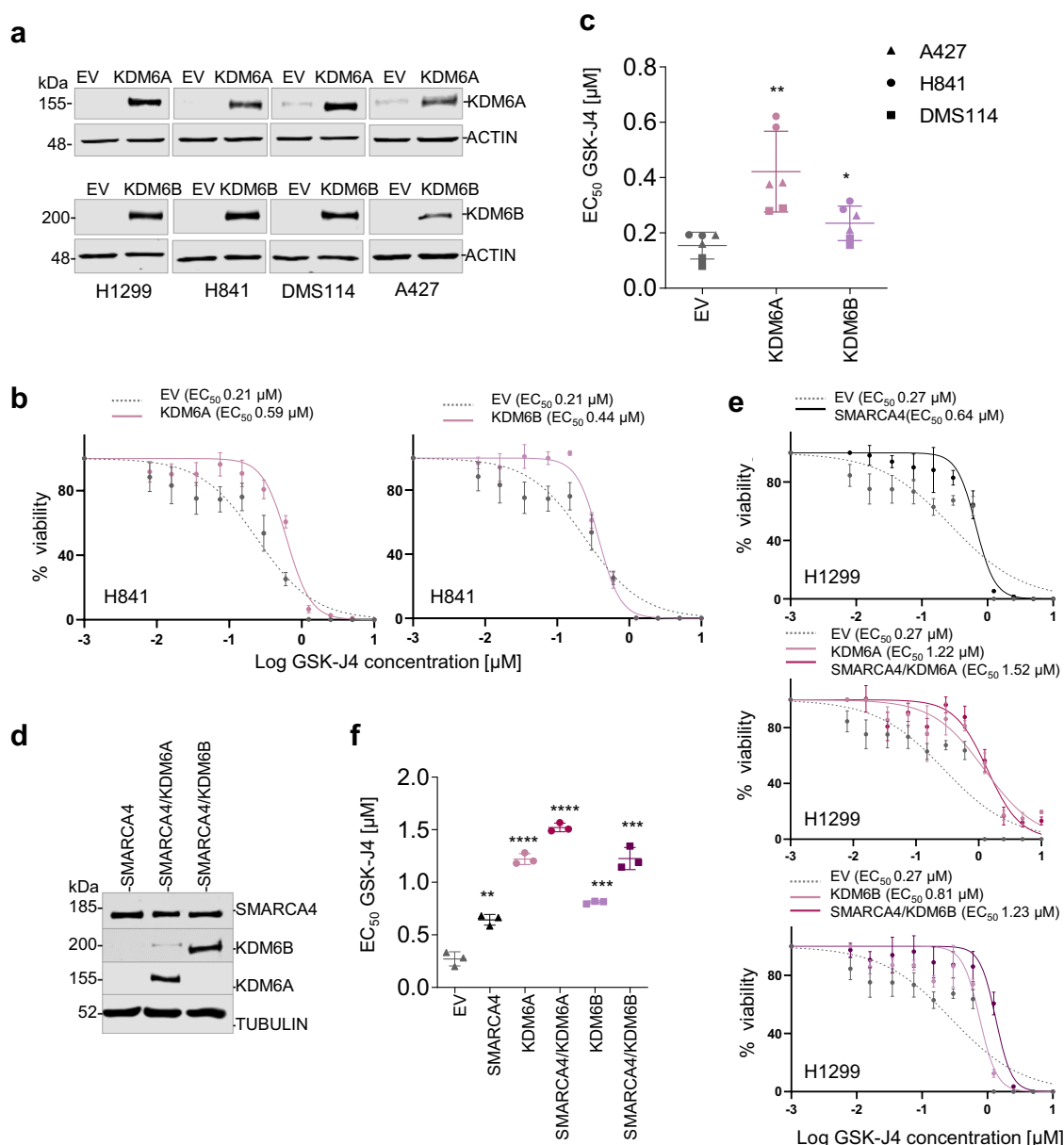
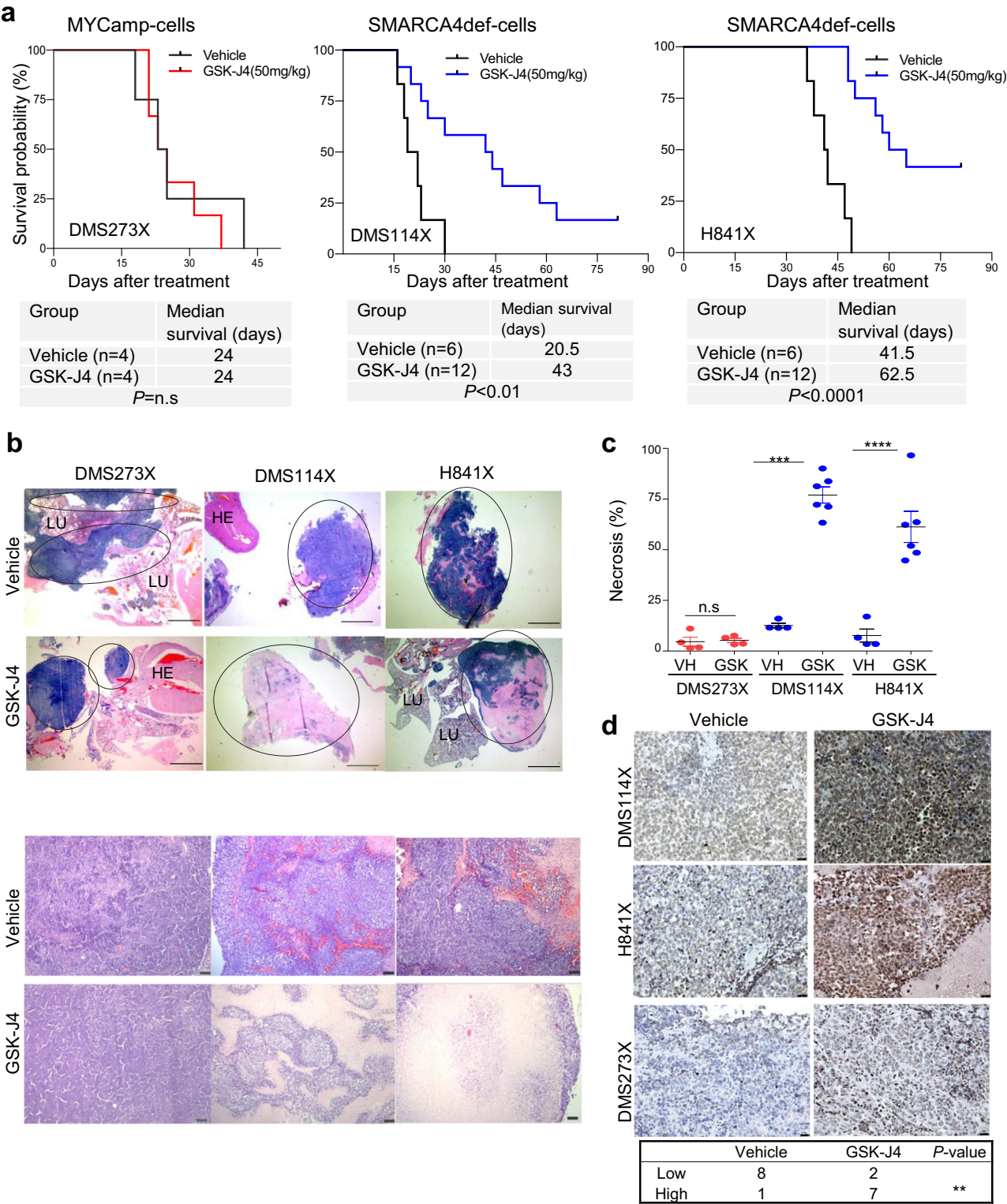


Fig. 5 Overexpression of KDM6s reverts sensitivity to KDM6s inhibition. **a** Western blot depicting levels of ectopic KDM6s and KDM6B in the indicated SMARCA4^{def} cells overexpressing the indicated proteins. EV Empty vector. **b** Example of viability of H841 cell line, measured using MTT assays, 5 days after treatment with increasing concentrations of GSK-J4. Lines, number of viable cells relative to the untreated cells. Data are presented as mean $\pm$ SD from three replicate cell cultures in two experiments. EC₅₀, half-maximal effective concentration. **c** Distribution and mean of the EC₅₀ from two independent experiments per each of the three LC cell lines. Lines show mean $\pm$ SD. *P*-values were calculated using paired two-tailed Student's *t* test. ***P* = 0.0017; **P* = 0.031. **d** Western blot depicting levels of KDM6s and SMARCA4 in the H1299 cells overexpressing the indicated proteins. **e** Viability of indicated cell lines, measured using MTT assays, 5 days after treatment with increasing concentrations of GSK-J4. Lines, number of viable cells relative to the untreated cells. Data are presented as mean $\pm$ SD from three replicate cell cultures in two experiments. **f** Distribution and mean of the EC₅₀ from three independent experiments. Lines show mean $\pm$ SD. *P*-values were calculated using paired two-tailed Student's *t* test. ***P* = 0.0016; ****P* = 0.0002; *****P* < 0.0001; A Source Data file is available for this figure.

ovary³⁰. We used the PDOXs, in their first pass, to derive primary cancer cell cultures (OVA250L and OVA259L). We confirmed the presence of biallelic inactivating mutations at SMARCA4 and the lack of protein in the two patients' tumour cells and PDOXs (Fig. 7a; Supplementary Fig. 10a). First, we tested the effects of the SAHA and GSK-J4 compounds in the primary cultures and included, as a reference, two commercial epithelial ovarian carcinoma cell lines (OVCAR-3 and OVCAR-8), which are wild type for SMARCA4 (https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines). Treatment with GSK-J4 strongly suppressed cell viability and clonogenic

capability, exclusively in the OVA250L and OVA259L cells, whereas SAHA did not affect cell growth (Fig. 7b, c). The levels of induced cleavage at poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) were increased in the SMARCA4^{def} cells indicating apoptosis (Supplementary Fig. 10b). It was puzzling to observe that the OVA250L and OVA259L cells had extremely low levels of global H3K27ac, even after treatment with SAHA. Similar to what happened in the lung cancer cells, the global basal levels of H3K27me3 were increased after administration of SAHA (Fig. 7d).



Next, we investigated the influence of GSK-J4 treatment on the growth of the OVA250 tumour in vivo. We orthotopically implanted primary tumours, either treatment-naïve or derived from mice previously treated with cisplatin (CDDP) (see the “Methods” section for further details), in the ovary of female nude mice to generate the OVA250X and OVA250XR tumours, respectively (Fig. 7e; Supplementary Fig. 10c–f). We observed a

reduction in the size and weight of the tumours from mice treated with the GSK-J4 inhibitor in the OVA250X model (Fig. 7f). Although the differences did not reach statistical significance, histological examination revealed the presence of a few viable tumour cells in the tumours from mice treated with GSK-J4. These tissues contained a large amount of fibrosis, instead of the necrosis observed in the lung cancer orthotopic model, possibly

Fig. 6 GSK-J4 induces tumour regression of SMARCA4def lung tumours in vivo. **a** Kaplan–Meier curves showing overall survival for GSK-J4-treated compared with vehicle control groups of each indicated orthotopically implanted mice model. Panels below, number of mice (*n*) and mean survival times for each group of treatment and cell line. *P*-values from the two-sided log-rank (Mantel–Cox) test of the plots are included. ***P* < 0.01; *****P* < 0.0001. n.s., not significant. **b** Representative sections of haematoxylin and eosin (H&E) staining of tumours from the indicated cells, from mice treated with either GSK-J4 or vehicle. Upper panels, tumour regions are marked within circles. Scale bars, 2.5 mm. The pink areas inside the tumours indicate necrosis. HE heart, LU lung. Bottom panels, representative sections, at higher magnification, of tumours from the indicated cells and treatments. Scale bars, 50 µm. **c** Quantification of necrotic areas. Mean ± SD are indicated for each group. The number of tumours, each from a different individual, were *n* = 4 in each VH and GSK-J4 treated groups for the DMS273X mice; *n* = 4 in the VH and *n* = 5 in the GSK-J4 groups, for the DMS114X mice and *n* = 4 in the VH and *n* = 6 in the GSK-J4 groups, for the H841X mice. Two-sided unpaired Student's *t*-test. ****P* = 0.0006; *****P* < 0.0001. VH vehicle. **d** Representative immunostaining of H3K27me3 in tumours from the indicated cells and treatments. Scale bars, 25 µm. Below, distribution of H3K27me3 staining among tumours (three tumours per cell line and condition) from the DMS273X, H841X and DMS114X tumours treated with vehicle or GSK-J4. Low (intensity values 1 and 2); high (intensity values 3 and 4) (Supplementary Table 6). Two-sided Fisher's Exact test. **P* < 0.05. A Source Data file is available for this figure.

because the OVA250X was derived from a primary tumour and not from cancer cell lines (Fig. 7g). Similar to what was observed in the lung cancer mouse models, the GSK-J4 treatment triggered an increase in H3K27me3 (Fig. 7h). Further, the levels of caspase 3, indicative of apoptosis were increased in the SMARCA4def tumours in those mice treated with GSK-J4 (Fig. 7h). Next, we generated the OVA250XR tumours to determine the benefits of GSK-J4 in tumours that have been pre-treated with CDDP, the standard treatment for SCCOHT. The morphology of the OVA250XR tumours was similar with that of the primary tumour and of the OVA250X (Supplementary Fig. 10e). The OVA250XR showed greater refractoriness to CDDP than did OVA250X (Supplementary Fig. 10f). The treatment with GSK-J4 significantly decreased tumour growth in the OVA250XR. Taken together, these observations demonstrate that the KDM6s inhibitor could constitute a therapeutic option for SCCOHT patients even after they have become resistant to CDDP (Supplementary Fig. 10g–i).

Discussion

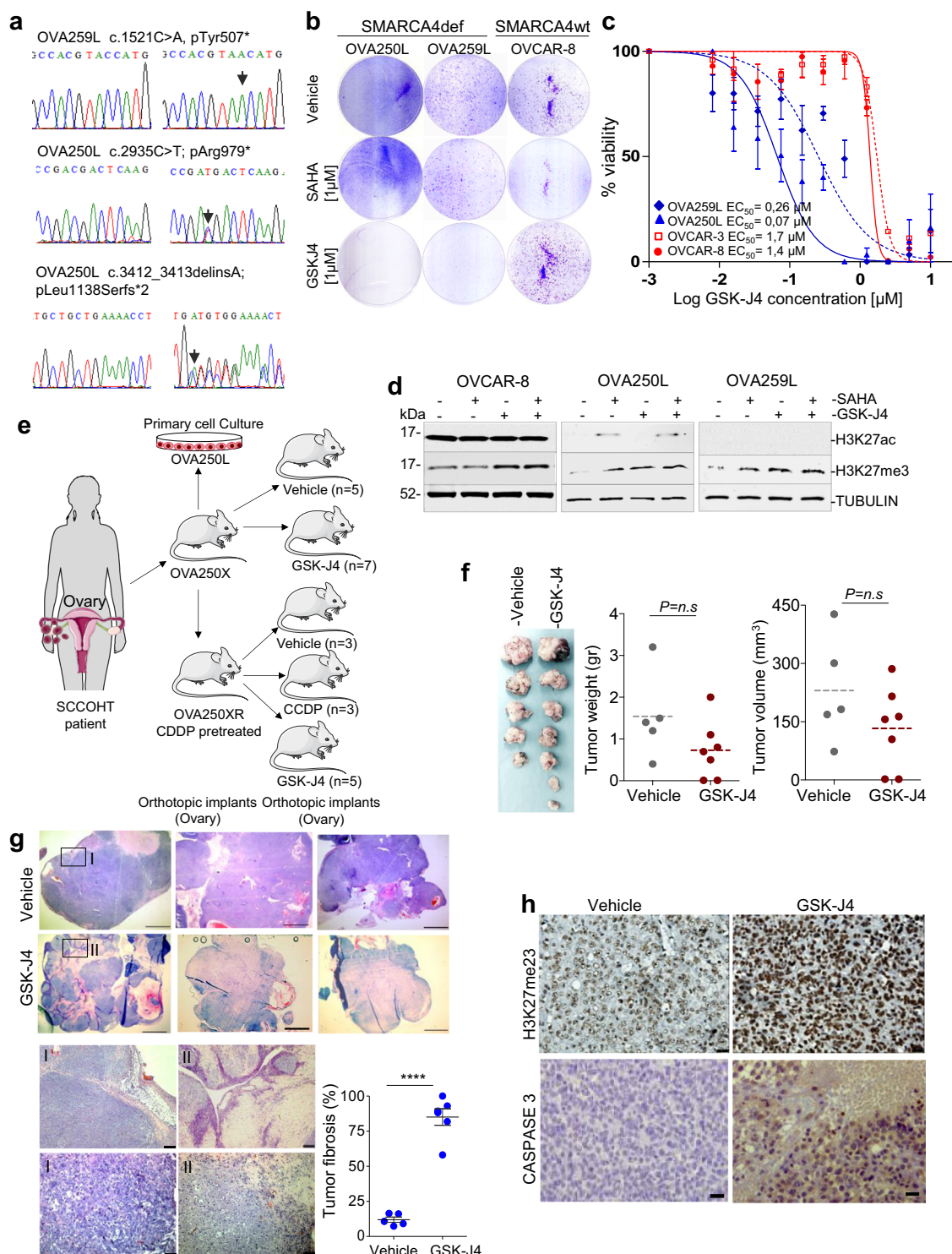
Here, we present evidence that cancer cells carrying oncogenic MYC are susceptible to growth inhibition by treatment with the HDAC inhibitor, SAHA. HDAC inhibitors, including SAHA, have come to be recognised as biologically active compounds of value for treating cancers, although their use is currently limited to some haematological malignancies³¹. Our current findings indicate that the pre-selection of patients with tumours in which any of the MYC family of genes have been genetically activated will have better response rates to SAHA, which suggests that SAHA could be used to treat neuroblastomas and lung cancers, among other types of cancer, in which the MYC genes are amplified.

Second, we found that lung or ovarian cancer cells with inactivated SMARCA4 not only were refractory to the growth suppression triggered by SAHA, but also aberrantly accumulated H3K27me3 following the administration of this inhibitor. The levels of global H3K27ac were low in the SMARCA4def cells, a characteristic that was accentuated in the SCCOHT cells. We ruled out a central role for EZH2 methyltransferase activity in the refractoriness to SAHA in these cells, although the dependency on a non-catalytic role for EZH2 cannot be completely discounted, as it is known to affect the survival of the SWI/SNF-mutant cancer cells¹⁴. Additionally, we demonstrate that the transactivation of several lysine demethylases (KDMs), including KDM6A and KDM6B, is impaired in cells that lack SMARCA4, leading to a downregulation of basal KDM6s. This, coupled with inability of these cells to modulate the levels of EZH2 expression in response to SAHA and, in keeping with other knowledge^{6,16–20}, is evidence that defective chromatin remodelling in SMARCA4def cells promotes a closed chromatin structure and a transcriptionally rigid scenario that maintains the

refractoriness of these cells to the appropriate modification of gene expression upon different stimuli.

Despite the high degree of sequence similarity in the catalytic domain of KDM6A and KDM6B, these two enzymes have also some specific roles³². KDM6A is mainly associated with the demethylation of H3K27me3 at the transcriptional start sites of the HOX genes upon differentiation stimuli, whereas KDM6B is involved in inflammation and other, general physiological processes³². Furthermore, KDM6A, but not KDM6B, is responsible for Kabuki syndrome (KS), an infrequent, inherited disease that is characterised by neurological, endocrine and autoimmune disorders³³. Here, we found that a deficiency in KDM6B is responsible for the refractoriness to SAHA in SMARCA4def cells. Further, a deficiency in KDM6B also accounts for the global increase in H3K27me3 upon administration of SAHA, which is consistent with a broader role for KDM6B in H3K27me3 deposition than that of KDM6A³⁴. Non-catalytic activities have been proposed for the KDM6s which may also account for some of these differences³².

Considering its potential clinical applicability, the most relevant finding presented here is the great vulnerability of the SMARCA4def cells to KDM6s inhibition, which was evident in cell culture and in mouse models with orthotopic transplants of lung cancer cells and SCCOHTs. Their frequency and poor prognosis mean that the use of GSK-J4 or similar compounds can have a great impact on the treatment of SMARCA4-mutant tumours. Likewise, SCCOHT is an aggressive carcinoma with rhabdoid characteristics and, though infrequent overall, predominantly affects young women^{8–11}. Our current results, which show that GSK-J4 strongly suppresses its growth in vivo, emphasises the huge potential of KDM6s inhibitors in treating this disease, which otherwise has very limited treatment options and, consequently, a dismal prognosis. Currently, there is only limited, preclinical information about the use of KDM6s inhibitors in cancer treatment. Anti-tumorigenic activities of GSK-J4 have been shown in some leukaemias and in gliomas with H3F3A mutations, both of which are attributable to the inhibition of KDM6B^{35,36}. In our case, the depletion of either KDM6A or KDM6B affected the viability of SMARCA4def cells, suggesting that, in this context, the depletion of either of them cannot be compensated. A limiting amount of KDM6s, due the lack of SMARCA4-mediated transactivation and regulation, seems to underlie the toxicity to the KDM6 inhibitor, GSK-J4, in SMARCA4def cells. It has also been shown that the KDM6s enhance the accessibility of the SWI/SNF complex to H3 and promote chromatin remodelling^{37,38} which may also contribute to the strong dependency of SMARCA4def cells, which rely only in the SMARCA2-dependent SWI/SNF complex, on these demethylases for survival. Despite our current findings about the toxicity of the GSK-J4 compound in SMARCA4def cells, the effects could be broader, and cancer cells in which other members of the SWI/



SNF-complex or of related pathways are genetically inactivated, may also be vulnerable to this inhibitor.

Methods

Cancer cell cultures. The cell lines NCI-H841, NCI-H23, NCI-H82, NCI-H69, NCI-H157, NCI-H1975, NCI-H2170, NCI-H460, NCI-H1963, NCI-H446, DMS114, NCI-H727, NCI-H228, NCI-H128 and NCI-H1299 cell lines are from the American Type Culture Collection (ATCC). The DMS273 cell line is from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). The Lu165 cells were obtained from the RIKEN Cell Bank (Japan). The cells were grown under recommended conditions and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. The cell lines were authenticated by genotyping for *TP53* and other known mutations. All cell lines used in this study were mycoplasma-free.

Genomic DNA and total RNA were extracted by standard protocols. One primary lung cancer cell line PCD11 was derived from malignant pleural effusions³⁹. Two primary cancer cell lines cultures were derived from orthoxenografts/PDOXs generated in nude mice from two primary tumours of two SCCOHT patients (OVA250L and OVA259L) that were obtained from Bellvitge Hospital and the Catalan Institute of Oncology (ICO) with the approval of the Ethical Committee (CEIC Bellvitge). Ethical and legal protection guidelines of human subjects, including informed consent, were followed. Fresh orthoxenografts/PDOXs grown in the mouse ovaries were collected when mice were sacrificed at passage #1, then minced with sterile scalpels. Single cells and clumps were transferred to cell culture plates and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS plus 50 U/mL penicillin and 50 mg/mL streptomycin under standard culture conditions. When cell colonies with epithelial cell morphology were observed, cells were trypsinized and expanded. Both primary cell lines were considered established after >6

Fig. 7 GSK-J4 reduces cancer cell viability of SCCOHT orthotopically implanted in mice. **a** Chromatogram depicting changes in SMARCA4, at the genomic DNA level, in the SCCOHTs of two patients. The alterations were biallelic, confirming the complete inactivation of SMARCA4. A normal reference DNA is also included. **b** Representative clonogenic assays for the indicated cells and treatments. **c** Percentage of viable cells of the indicated cells, measured using MTT assays, after treatment with increasing concentrations of GSK-J4 for 5 days. Lines show the number of viable cells relative to the total number at 0 h. Error bars, mean $\pm$ SD from three replicates. EC₅₀ half-maximal effective concentration. **d** Western blot of the endogenous levels of the indicated proteins and cancer cells. TUBULIN, protein-loading control (48 h treatments, except 24 h in the GSK-J4 for the OVA250L cells). **e** Schematic representation of different models and treatments in mice developed from the OVA-250 tumour. SCCOHT small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. CDDP cisplatin. Figure schematics were generated using <https://smart.servier.com/> (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). **f** Left panel, gross pathological photographs at necropsy of the ovarian tumours that arose in mice treated with vehicle ($n = 5$) or GSK-J4 ($n = 7$). Right panels, volume and weight of each tumour. Two-sided unpaired Student's *t*-test. n.s. not significant. **g** Representative sections of H&E staining of tumours from the group of mice treated as indicated ($n = 5$ in each group). Pink areas inside the tumours indicate fibrosis. Scale bars, 2.5 mm; Lower panels, magnification of the areas indicated (rectangle); scale bar, 50 μ m (above) and 25 μ m (below); Lower right panel, quantification of fibrotic areas. Two-sided unpaired Student's *t*-test. Error bars, mean $\pm$ SD from replicates. **** $P < 0.0001$. **h** Representative immunostaining of H3K27me3 and of CASPASE-3 for OVA250X tumours treated with vehicle or GSK-J4. Scale bars, 25 μ m. The quantification of the immunostaining is provided in Supplementary Table 6. A Source Data file is available for this figure.

passages in vitro. Specific informed consent was obtained from all patients for tumour implantation into mice, and the study was approved by the IDIBELL Ethics Committee (No. AAALAC-1155).

Antibodies and western blots. The following primary antibodies were used for western blots: anti-TUBULIN, T6199 mouse (1/10,000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); anti-Beta-ACTIN, 13854 (1/20,000 Sigma Aldrich); anti-SMARCA4 49360S (1:1000, Cell Signaling Technology); anti-EZH2 5246S (1:1000, Cell Signaling); anti-H3K27ac D5E4 (1:1000, Cell Signaling) anti-H3K27me3 07-449 (1:1000, Cell Signaling); anti-UTX (KDM6A) D3Q11 (1:1000, Cell Signaling); anti-KDM6B (JMJD3) #3457 (1:1000, Cell Signaling) for western blots or anti-KDM6B (JMJD3) ab38113 (Abcam) for immunostaining (see also Supplementary Table 1). For western blots, whole-cell lysates were collected in a buffer containing 2% SDS 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10% glycerol and protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science). Protein concentrations were determined using a Bio-Rad DC Protein Assay kit (Life Science Research). Equal amounts of lysates (20 μ g) were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane that was blocked with 5% nonfat dry milk. Membranes were incubated with the primary antibody overnight at 4 °C, then washed before incubation with species-appropriate IRDye 680CW (925-68022) or IRDye 800CW (925-32213) fluorescent secondary antibodies (1:10,000 LI-COR, NE, USA) for 1 h at room temperature. Membrane imaging was performed on the Odyssey Li-Cor CLx i software: Image Studio Lite v5.2.

Quantitative RT-PCR. To assess mRNA levels of the KDMs in different cells qPCR analysis was performed. 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed using SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen) and Random primers (Promega), according to the manufacturers' instructions. qRT-PCR was performed in a Quantstudio Real-Time PCR (Quantstudio Design & Analysis v1.5.1) instrument using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Three biological replicates were carried out. Primer sequences are provided in the Supplementary Table 2.

Treatments and shRNAs. Chemicals were obtained from the following sources: SAHA, suberoyl anilide hydroxamic acid (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA); GSK-J4 (Shellectchem); GSK-126 (Cayman Chemical Company). shRNAs against SMARCA4, KDM6A and KDM6B were purchased from SIGMA-MISSION (LentiExpress™ Technology, Sigma-Aldrich) as a glycerol stock of five pLKO plasmids carrying specific shRNA sequences. A non-target shRNA (shNT) (Sigma MISSION shRNA non-mammalian control SHC002) was used as a control. The lentiviruses were generated within the 293T packaging cells. Oligonucleotide sequences are provided in the Supplementary Table 3.

Flow cytometry. The cells were collected with PBS and the cell suspension was transferred into the tubes, containing 70% ethanol, and fixed for 2 h. Cells were centrifuged, ethanol was decanted and cells were suspended in 5 mL PBS, and then treated with 1 mL propidium iodide (PI)/Triton X-100 staining solution (PI/Triton X-100 staining solution with RNase A, freshly made (to 10 mL of 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma) in PBS add 2 mg DNase-free RNase A (Sigma) and 200 μ l of 1 mg/mL PI) for 30 min at room temperature. Flow cytometry experiments for detecting PI emission were performed in BD FACSCanto II Cell Analyzer (Becton, Dickinson) and the data analysis was performed using DNA content frequency histogram deconvolution software (FACSDiva v6.1.2). The visualisation graphs were prepared with FlowJo software version 7.6.

Cell growth analysis and calculation of EC₅₀ and CI. For cell viability assays, cell lines were incubated in 96-well plates. Before harvesting, cells were treated for

5–7 days with the indicated concentrations of each compound (SAHA, GSK-J4, GSK-126) or combinations. For the assays, 10 μ L of a solution of 5 mg/mL MTT [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma Chemical Co.) was added. After incubation for 3 h at 37 °C, the medium was discarded, the formazan crystals that had formed were dissolved in 100 μ L of lysis buffer (50% N-N-dimethylformamide in H₂O, 20% SDS, 2.5% glacial acetic acid, NaOH 5 mol/L, pH 4.7), and absorbance was measured at 596 nm. Results are presented as the median of at least two independent experiments performed in triplicate for each cell line and for each condition. For EC₅₀ calculations, cells were treated with each drug and their various combinations for 5 days. Estimates of EC₅₀ were derived from the dose response curves. To assess the drug concentration effect and to calculate the combination index (CI), cells were plated in 96-well plates and incubated with a concentration of SAHA ranging from 0.07 to 10 μ M (0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5.0 and 10 μ M), and the same for GSK-J4 for 5 days. MTT assays were performed and the EC₅₀ was determined by fitting the dose-response curve utilising the CompuSyn software. The CI values for each dose and the corresponding effect level were calculated. The CI offers a quantitative definition for drug combinations in which CI < 1, CI = 1 and CI > 1 indicate synergism, an additive effect, and antagonism, respectively.

For clonogenic assays, the plates were seeded with 5000 cells from each cell line, then treated with SAHA (1 μ M), GSK-J4 (1 μ M) or GSK-126 (1 μ M) for 5 days. Cells were stained with crystal violet solution (0.5% Crystal Violet in 25% of methanol).

ChIP-sequencing. For ChIP, cells were grown in P-150 cm cell dishes and fixed with 1% methanol-free formaldehyde (Thermo Scientific) for 10 min at room temperature, then quenched by 125 mmol/L glycine for 15 min at room temperature, washed with ice-cold PBS twice and centrifuged at 200 $\times$ g, 4 °C for 5 min. The pellet was resuspended in 1 mL of cell lysis buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, protease inhibitor) and kept at 4 °C, rotating for 30 min. After centrifugation, the pellet was resuspended in 1 mL of nuclear lysis buffer (1% SDS, 10 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, protease inhibitor) and kept at 4 °C for 60 min. After another centrifugation, the lysate was sonicated with a Covaris M220 instrument to yield chromatin fragments of an average size of 0.25–1.00 kb, and then frozen at –20 °C for 30 min. The chromatin was thawed on ice and centrifuged at 2500 $\times$ g. For each ChIP reaction, 60 μ L of Magna ChIP™ Protein A + G Magnetic Beads (Merck Millipore) was used in accordance with the manufacturer's protocol. Before addition of the sheared chromatin to the beads, Triton X-100 and Na-deoxycholate was added to a final concentration of 10% each. 1% of the chromatin volume was used for input. At least two independent ChIP experiments were performed.

Immunoprecipitated chromatin was deep-sequenced in the Genomics Unit of the Centre for Genomic Regulation (CRG, Barcelona, Spain) using the Illumina HiSeq 2500 system and HiSeq Control Software (HCS) 2.2.68 software (Illumina). Briefly, library preparation included end-repair, generation of dA overhangs, adapter ligation, size selection and removal of non-ligated adapters by agarose gel electrophoresis and amplification (18 cycles) before loading the samples into the sequencer.

For ChIP-sequencing data analysis, reads were aligned to the human reference genome hg38, using Bowtie v1.2.2, with default parameters and disallowing multi-mapping ($-m\ 1$)⁴⁰. PCR duplicates were removed using PICARD (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Ambiguous and multi-mapped reads were discarded. Peaks were called using MACS2 v2.1.1⁴¹. To avoid false positives, peaks were discarded if they were present in the ChIP-seq of SMARCA4 in the SMARCA4-deficient cells. Genomic peak annotation was performed with the R package ChIPpeakAnno v3.15, considering the region ± 2 kb around the TSS as the promoter⁴². All analyses considered peaks overlapping with promoter regions, unless otherwise specified. Peak lists were then transformed to gene target lists.

For heatmap and intensity plot representation of ChIP-seq signal, bedgraph files were generated using the `makeUCSCfile` function in HOMER with default parameters normalising for differences in sample library size, and BigWig files were generated using the function `bedGraphToBigWig` from UCSC. Heatmaps were derived using the functions `computeMatrix`, in a window of ± 2 kb around the centre in the TSS, and `plotHeatmap` from `deepTools`⁴³ (version 3.5).

Construction of expression vectors and infections. The complete KDM6A cDNA (NM_021140.4) was PCR-amplified, from a retrotranscribed human RNA pool (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) following standard protocols. The cDNA fragments were cloned into the pLVX-IRES-ZSgreen vector (Clontech), between the XhoI and NotI endonuclease restriction sites, following the manufacturer's instructions. For the KDM6B, the complete KDM6B coding region (ENS00000132510.10) was PCR-amplified, from a human DNA pool (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), following standard protocols. The fragment was cloned into the pCDNA4/TO vector (Invitrogen), between the KpnI and XhoI endonuclease restriction sites, following the manufacturer's instructions. The KDM6A and KDM6B inserts were then Sanger-sequenced. All the primers used are listed in Supplementary Tables 4 and 5. For KDM6A ectopic expression, the cells were infected with lentiviruses derived from the pLVX-IRES-ZSgreen vector and then selected by sorting GFP positive cells, using an BD FACSarea (Becton, Dickinson). For KDM6B ectopic expression, the cells of interest were transfected with a pCDNA4/TO-KDM6B construct and clones expressing KDM6B were selected with Zeocin (InvivoGen) and pooled.

Generation of orthotopic tumour models and treatments. Male and female athymic nu/nu mice (ENVIGO) aged 4–5 weeks were maintained in a sterile environment before use in the lung cancer orthotopic experiments. Female athymic nu/nu mice (ENVIGO), 4–6 weeks old, were used for the ovarian cancer orthotopic studies. The animals were housed in individually ventilated cages on a 12-h light–dark cycle at 21–23 °C and 40–60% humidity. Mice were allowed free access to an irradiated diet and sterilised water. All animal experiments were approved by the IDIBELL Ethical Committee under protocol 9111 approved by the Government of Catalonia, AAALAC accredited Unit 1155, and performed in accordance with guidelines stated in the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). To generate orthotopic lung tumour xenografts the cell lines were injected subcutaneously into the back of the mice ($n = 3$ mice/cell line). Once the solid tumour had entered the exponential growth phase, mice were sacrificed, the tumour was isolated under sterile conditions, and the non-necrotic areas were selected and minced in small fragments of 2–3 mm³. These were then orthotopically implanted in the lung parenchyma^{20,29}. On day 15, the mice were randomised and intraperitoneally treated with GSK-J4 (50 mg/kg/day for each mouse) or corresponding vehicle only. For the lung orthotopic models, in most cases the animals were sacrificed when they displayed serious respiratory difficulty, which was subsequently confirmed to be associated with lung tumour growth.

Orthoxenografts or PDOXs of SCCOHT were generated. The primary tumour specimens for the two primary SCCOHT samples were freshly obtained at Hospital Universitario de Bellvitge (Hospital de Llobregat, Barcelona, Spain). The study was approved by the Institutional Review Board, and written informed consent was obtained from both patients. The orthotopic ovarian tumours were engrafted in mice, following an established protocol³⁰. Briefly, non-necrotic tissue pieces (2–3 mm³) from resected carcinoma were selected and placed in DMEM (BioWhittaker) supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin at room temperature. Under isoflurane-induced anaesthesia, animals were subjected to a lateral laparotomy, their ovaries exposed, and tumour pieces anchored to the ovary surface with prolene 7.0 sutures. Tumour growth was monitored 2 or 3 times per week and when the tumour had reached a sufficient size, it was harvested, cut into small fragments, and transplanted into between two and four new animals. Engrafted tumours (named OVA250X) at early mouse passages were cut into 6–8 mm³ pieces and stored in liquid nitrogen in a cryopreservation solution of 90% FBS and 10% dimethyl sulfoxide, awaiting subsequent implantation.

To generate the cisplatin-resistant ovarian xenograft mouse model, orthotopically engrafted OVA250X tumours at passage#1 were allowed to grow ($n = 3$ mice) until palpable intra-abdominal masses were noted. Cisplatin was i.v.-administered to the animals (cycle #1, 3, 5 mg/kg dose) for 3 consecutive weeks (days 0, 7 and 15; cycle#1 of treatment) (Supplementary Fig. 9b). Post-cisplatin tumours at relapse were harvested and engrafted in new animals. This process of cisplatin treatment was repeated up to four times by treating tumour-bearing mice with stepwise-incremental doses of cisplatin: cycle #2, 4 mg/kg; cycle #3, 5 mg/kg and cycle #4, 5 mg/kg (see Supplementary Fig. 9b). Cisplatin-resistant tumours were obtained (OVA250XR). At doses higher than 3.5 mg/kg, signs of cisplatin induced some toxicity that were ameliorated by 2 days administration of saline containing 5% glucose. Mice were transplanted with fragments of OVA250X and OVA250XR tumours, and when tumours reached a homogeneous palpable size were randomly allocated into the treatment groups ($n = 3$ –7 mice/group): (i) Placebo; (ii) GSK-J4 (50 mg/kg) and (iii) cisplatin (3.5 mg/kg); drugs were administered once a day, 5 days per week, for 4 consecutive weeks. Animals were

sacrificed on day 21 of treatment, and their ovaries dissected out and weighed. Representative fragments were either frozen in nitrogen or fixed and processed for paraffin embedding.

Histopathology and immunostaining. For histological analysis, tumours were fixed and embedded in paraffin. Necrosis/fibrosis were morphologically assessed after staining with haematoxylin and eosin (H&E), using standard protocols, and then examined by light microscopy in a blinded fashion. For immunostainings, 4- μ m-thick paraffin-embedded sections of lung and ovarian tumour samples were deparaffinized overnight at 62 °C and then immersed in xylene. Samples were rehydrated and, after microwaving with Tris/EDTA pH 9.0 for antigen retrieval, endogenous peroxidase was inhibited with a 3% hydrogen peroxide solution, blocked in 10% goat serum and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C (Supplementary Table 1). HRP-conjugated polyclonal goat (anti-mouse and anti-rabbit) secondary antibodies (NeoStain ABC Kit, NeoBiotec) were used in 1-h incubations at room temperature. Labelling detection was done using an ImmPACT DAB Peroxidase (HRP) Substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and tissue sections were counterstained with haematoxylin. Once dehydrated in an ethanol battery and cleared in xylene for 1 h, samples were mounted with coverslips with DPX mounting medium (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Sections were evaluated under a Leica DM1000 microscope by two independent observers in a blind fashion. Areas of necrosis/fibrosis were quantified using Photoshop (version 2021). The scoring criteria for determining H3K27me3 staining were based on the staining intensity (four categories, 1–4) (Supplementary Table 6). The mean of values from three independent evaluators was determined.

Statistical analysis. Student's *t*-tests, EC₅₀ calculations, Kaplan–Meier estimates and log-rank (Mantel–Cox) test were performed using Prism software (GraphPad Prism 9). Values of *P* < 5% were considered statistically significant. The statistical methods used for each analysis are specified in the figure legends.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The ChIP-seq raw data obtained in this study has been uploaded to the Gene Expression Omnibus-GEO (NCBI), under accession number [GSE155129](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE155129). Uncropped western blot images are also present in a Source Data file. Databases/Datasets used in the study were: cBioPortal for Cancer Genomics, Cancer Cell Line Encyclopedia-CCLE (https://www.cbioportal.org/study/summary?id=cclle_broad_2019), COSMIC-Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines), DepMap Portal-Cancer Dependency Map (<https://depmap.org/portal/achilles/>), Genomics of Drug Sensitivity in Cancer database (<https://www.cancerrxgene.org/compound/Vorinostat/1012/overview/ic50>), <https://depmap.org/portal/compound/GSK-J4?tab=dependency>). The authors declare that other data supporting the findings of this study are provided in the Supplementary Information/Source Data file. Source data are provided with this paper.

Received: 30 October 2020; Accepted: 23 June 2021;

Published online: 14 July 2021

References

- Clapier, C. R. & Cairns, B. R. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 273–304 (2009).
- Mohrmann, L. & Verrijzer, C. P. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1681**, 59–73 (2005).
- Romero, O. A. & Sanchez-Cespedes, M. The SWI/SNF genetic blockade: effects in cell differentiation, cancer and developmental diseases. *Oncogene* **33**, 2681–2689 (2014).
- Medina, P. P. et al. Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Hum. Mutation* **29**, 617–622 (2008).
- Rodriguez-Nieto, S. et al. Massive parallel DNA pyrosequencing analysis of the tumor suppressor BRG1/SMARCA4 in lung primary tumors. *Hum. Mutation* **32**, E1999–E2017 (2011).
- Romero, O. A. et al. The tumour suppressor and chromatin-remodelling factor BRG1 antagonizes Myc activity and promotes cell differentiation in human cancer. *EMBO Mol. Med.* **4**, 603–616 (2012).
- Romero, O. A. et al. MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discov.* **4**, 292–303 (2014).
- Matias-Guiu, X. et al. Human parathyroid hormone related protein in ovarian small cell carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* **73**, 1878–1881 (1994).

9. Jelinic, P. et al. Recurrent SMARCA4 mutations in small cell carcinoma of the ovary. *Nat. Genet.* **46**, 424–426 (2014).
10. Witkowski, L. et al. Germline and somatic SMARCA4 mutations characterize small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. *Nat. Genet.* **46**, 438–443 (2014).
11. Ramos, P. et al. Small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type, displays frequent inactivating germline and somatic mutations in SMARCA4. *Nat. Genet.* **46**, 427–429 (2014).
12. Oike, T. et al. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res.* **73**, 5508–5518 (2013).
13. Hoffman, G. R. et al. Functional epigenetics approach identifies BRM/SMARCA2 as a critical synthetic lethal target in BRG1-deficient cancers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 3128–3133 (2014).
14. Kim, K. H. et al. SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat. Med.* **21**, 1491–1496 (2015).
15. Xue, Y. et al. SMARCA4 loss is synthetic lethal with CDK4/6 inhibition in non-small cell lung cancer. *Nat. Commun.* **10**, 557 (2019).
16. Chiba, H., Muramatsu, M., Nomoto, A. & Kato, H. Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila* brahma are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1815–1820 (1994).
17. De la Serna, I. L., Carlson, K. A. & Imbalzano, A. N. Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat. Genet.* **27**, 187–190 (2001).
18. Chi, T. H. et al. Sequential roles of Brg1, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity* **19**, 169–182 (2003).
19. Seo, S., Richardson, G. A. & Kroll, K. L. The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* **132**, 105–151 (2005).
20. Romero, O. A. et al. Sensitization of retinoids and corticoids to epigenetic drugs in MYC-activated lung cancers by antitumor reprogramming. *Oncogene* **36**, 1287–1296 (2017).
21. Richon, V. M., Sandhoff, T. W., Rifkind, R. A. & Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 10014–10019 (2000).
22. Tessarz, P. & Kouzarides, T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 703–708 (2014).
23. Black, J. C., Van Rechem, C. & Whetstone, J. R. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol. Cell* **48**, 491–507 (2012).
24. Chan-Penebre, E. et al. Selective killing of SMARCA2- and SMARCA4-deficient small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type cells by inhibition of EZH2: in vitro and in vivo preclinical models. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 850–860 (2017).
25. Wang, Y. et al. Histone deacetylase inhibitors synergize with catalytic inhibitors of EZH2 to exhibit antitumor activity in small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 2767–2779 (2018).
26. Hodges, H. C. et al. Smarca4 ATPase mutations disrupt direct eviction of PRC1 from chromatin. *Nat. Genet.* **49**, 282–288 (2017).
27. Chandrasekaran, R. & Thompson, M. Polybromo-1-bromodomains bind histone H3 at specific acetyl-lysine positions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 661–665 (2007).
28. Kruidenier, L. et al. A selective jumoni H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* **488**, 404–408 (2012).
29. Ambrogio, C. et al. Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRAS-driven lung adenocarcinoma. *Nat. Med.* **22**, 270–277 (2016).
30. Vidal, A. et al. Lurbinectedin (PM01183), a new DNA minor groove binder, inhibits growth of orthotopic primary graft of cisplatin-resistant epithelial ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 5399–5411 (2012).
31. Li, Y. & Seto, E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026831 (2016).
32. Arcipowski, K. M., Martinez, C. A. & Ntziachristos, P. Histone demethylases in physiology and cancer: a tale of two enzymes, JMJD3 and UTX. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **36**, 59–67 (2016).
33. Bogershausen, N. & Wollnik, B. Unmasking Kabuki syndrome. *Clin. Genet.* **83**, 201–211 (2013).
34. Gozdecka, M. et al. UTX-mediated enhancer and chromatin remodeling suppresses myeloid leukemogenesis through noncatalytic inverse regulation of ETS and GATA programs. *Nat. Genet.* **50**, 883–894 (2018).
35. Ntziachristos, P. et al. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **514**, 513–517 (2014).
36. Hashizume, R. et al. Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat. Med.* **20**, 1394–1396 (2014).
37. Miller, S. A., Mohn, S. E. & Weinmann, A. S. Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Mol. Cell* **40**, 594–605 (2010).
38. Narayanan, R. et al. Loss of BAF (mSWI/SNF) complexes causes global transcriptional and chromatin state changes in forebrain development. *Cell Rep.* **13**, 1842–1854 (2015).
39. Pros, E. et al. Genome-wide profiling of non-smoking-related lung cancer cells reveals common RB1 rearrangements associated with histopathologic transformation in EGFR-mutant tumors. *Ann. Oncol.* **31**, 274–282 (2020).
40. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25 (2009).
41. Zhang, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* **9**, R137 (2008).
42. Zhu, L. et al. ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC Bioinforma.* **11**, 237 (2010).
43. Ramirez, F. et al. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* **44**, w160–w165 (2016).

Acknowledgements

The authors thank Isabel Bartolessis (Cancer Genetics Group) at IJC for technical assistance. This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness-MINECO (grant number SAF-2017-82186R, to M.S.-C., and grant PI19/01320 to A. Villanueva) and from the Fundación Científica de the Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) (grant number GCB14142170MONT) to M.S.-C. A. Villanueva is also funded by the Department of Health of the Generalitat de Catalunya (2014SGR364). O.A.R. received a Juan de la Cierva postdoctoral contract (grant No. IJCI-2016-28201, until November 2019) and an AECC research contract (INVES19045ROME from December 2019). A. Vilarubi, P.L. and A.A. are supported by pre-doctoral contracts from the Spanish MINECO (FPI-fellowship: PRE2018-084624, BES-2015-072204 and FPU17/00067). M.S. was supported by a Rio Hortega contract from the Instituto de Salud Carlos III (CM17/00180). L.F. received a European Union Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie Actions grant agreement, number 799850.

Author contributions

O.A.R. and M.S.-C. conceived and designed the study; An.V., Al.V., A.G., A.A., D.T., E.P., J.J.A.-B., F.S., P.L. and S.V. performed the experiments and analysed data with assistance from L.F., J.F.M.-T., M.S.; A.O., J.M.P., X.M.-G., P.P.M. and Au.V. provided essential reagents and intellectual input. O.A.R. and M.S.-C. coordinated the project, interpreted results, wrote the manuscript and supervised the project.

Competing interests

Al.V. and Au.V. are co-founders of Xenopat S.L. The remaining authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24618-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to O.A.R. or M.S.-C.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

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

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

SMARCA4 deficient tumours are vulnerable to KDM6A/UTX and KDM6B/JMJD3 blockade

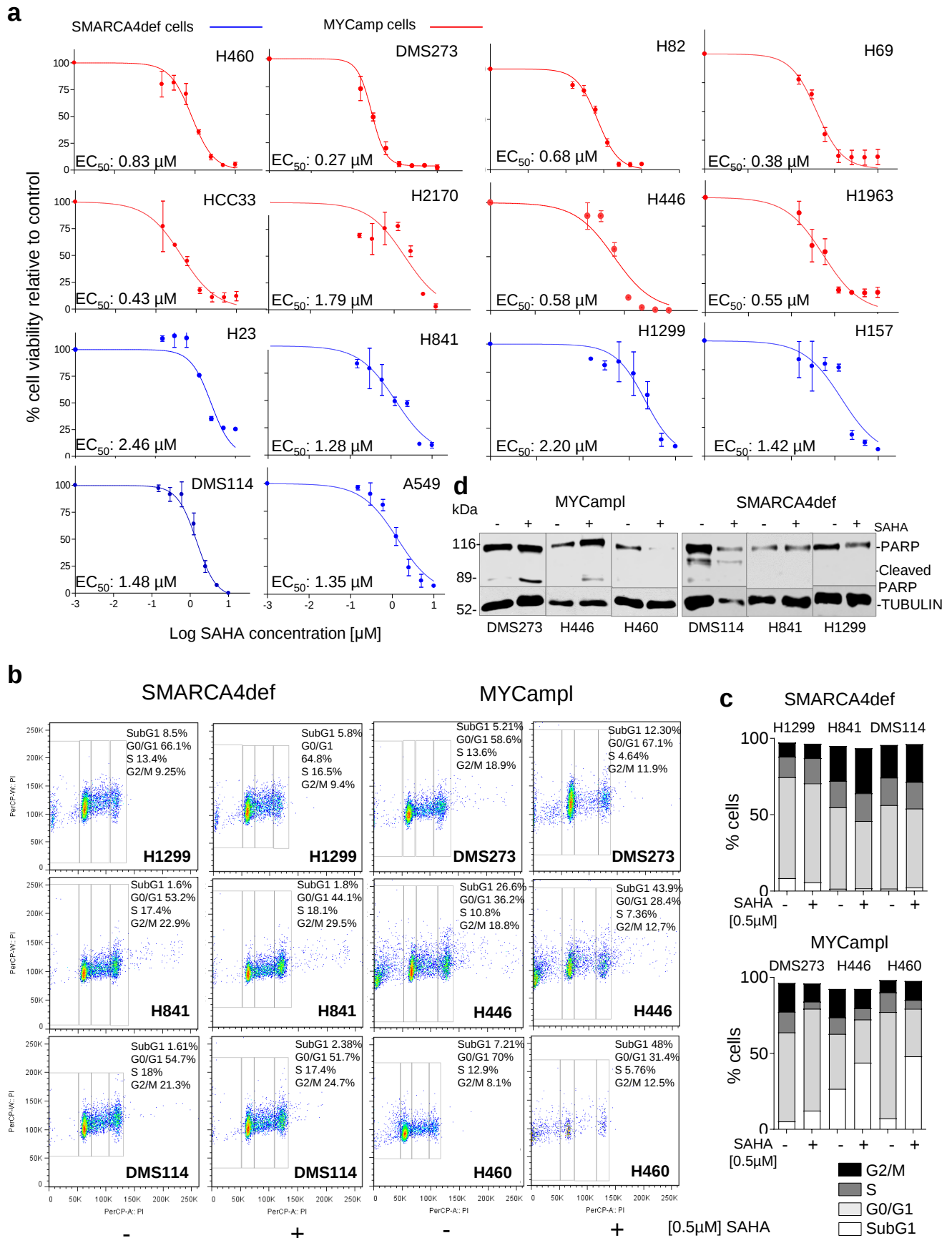
Octavio A. Romero^{1#*}, Andrea Vilarrubi^{1#}, Juan J. Alburquerque-Bejar¹, Antonio Gomez², Alvaro Andrades^{3,4}, Deborah Trastulli⁵, Eva Pros¹, Fernando Setien¹, Sara Verdura⁵, Lourdes Farré⁶, Juan F. Martín-Tejera⁶, Paula Llabata¹, Ana Oaknin⁷, Maria Saigi^{1,8}, Josep M. Piulats⁸, Xavier Matias-Guiu⁹, Pedro P. Medina^{3,4}, August Vidal^{9,10}, Alberto Villanueva^{6,10}, Montse Sanchez-Cespedes^{1*}

Author affiliations:

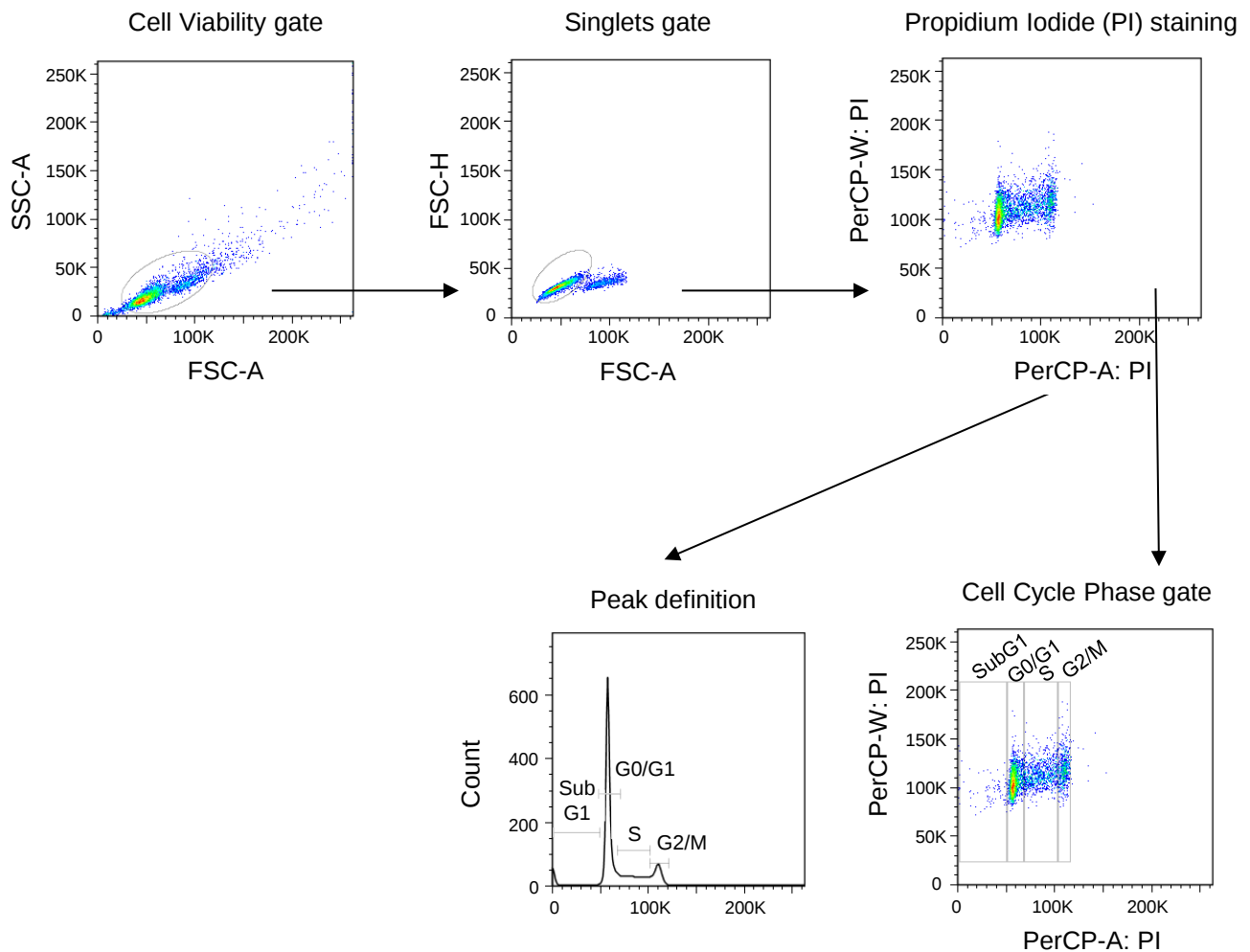
¹Cancer Genetics Group, Josep Carreras Leukaemia Research Institute (IJC), Badalona, Barcelona, Spain. ²Rheumatology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain. ³Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), Granada, Spain. ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology III, University of Granada, Granada, Spain. ⁵Genes and Cancer Group, Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute-IDIBELL Barcelona, Spain. ⁶Chemoresistance and Predictive Factors Group, Program Against Cancer Therapeutic Resistance (ProCURE), Catalan Institute of Oncology (ICO), Oncobell Program, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain. ⁷Department of Medical Oncology, Vall d'Hebrón Hospital, Barcelona, Spain. ⁸Department of Medical Oncology, Catalan Institute of Oncology (ICO), Barcelona, Spain. ⁹Department of Pathology, University Hospital of Bellvitge, IDIBELL, CIBERONC, L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain. ¹⁰Xenopat S.L., Parc Científic de Barcelona (PCB), Barcelona, Spain.

Corresponding authors mscespedes@carrerasresearch.org; oromero@carrerasresearch.org

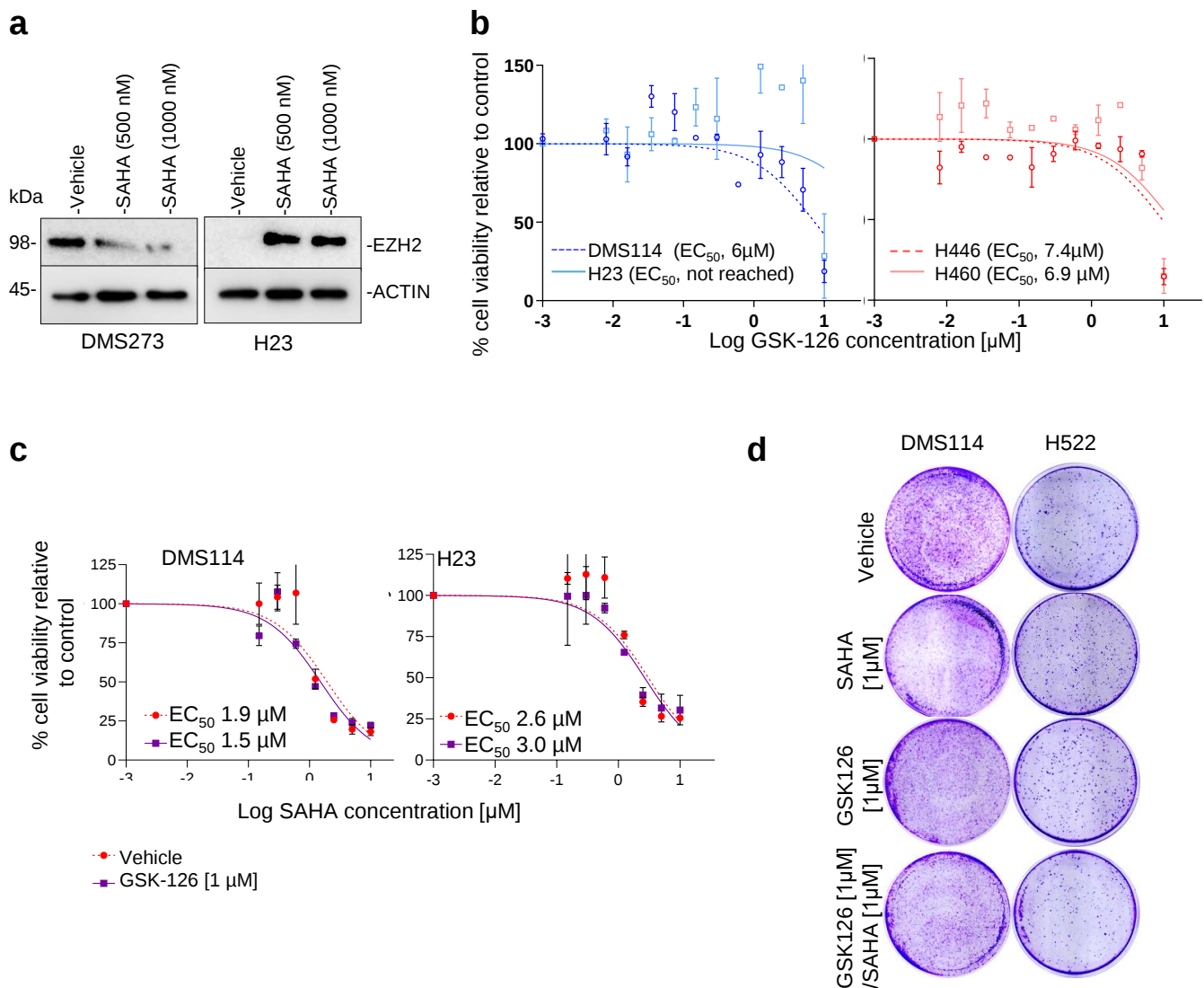
#These authors contributed equally: Octavio A. Romero, Andrea Vilarrubi



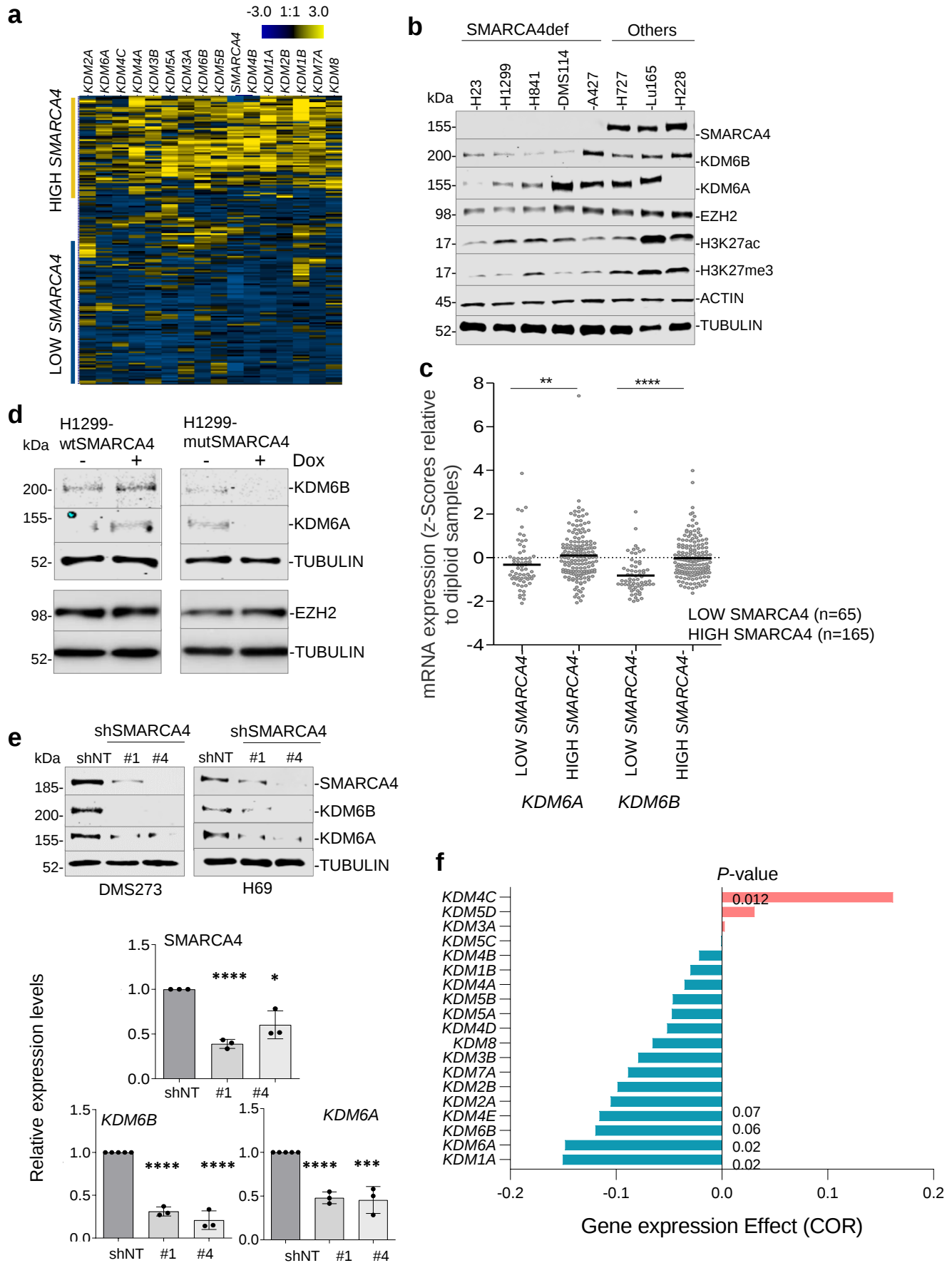
Supplementary Fig.1. SAHA reduces growth in MYCamp, but not in SMARCA4def cancer cells. a, Representative examples of effects on cell viability, measured using MTT assays, in the indicated cell lines after treatment with increasing concentrations of SAHA for 5 days. EC₅₀, half maximal effective concentration. Error bars, means $\pm$ SD of three replicates. **b,** SAHA induced G1 phase arrest in the cell cycle, in MYCamp but not in SMARCA4def cells. Cell cycle distribution was obtained by PI staining and flow cytometry analysis in cells following treatment with 0.5 μ M of SAHA for 48hrs. **c,** Bar graphs depicting the percentage of the indicated cell in each of the cell cycle phases with and without SAHA treatment. **d,** Western blotting depicting the cleavage of PARP in the indicated cells, following the treatment with SAHA or vehicle. A Source Data file is available for this figure.



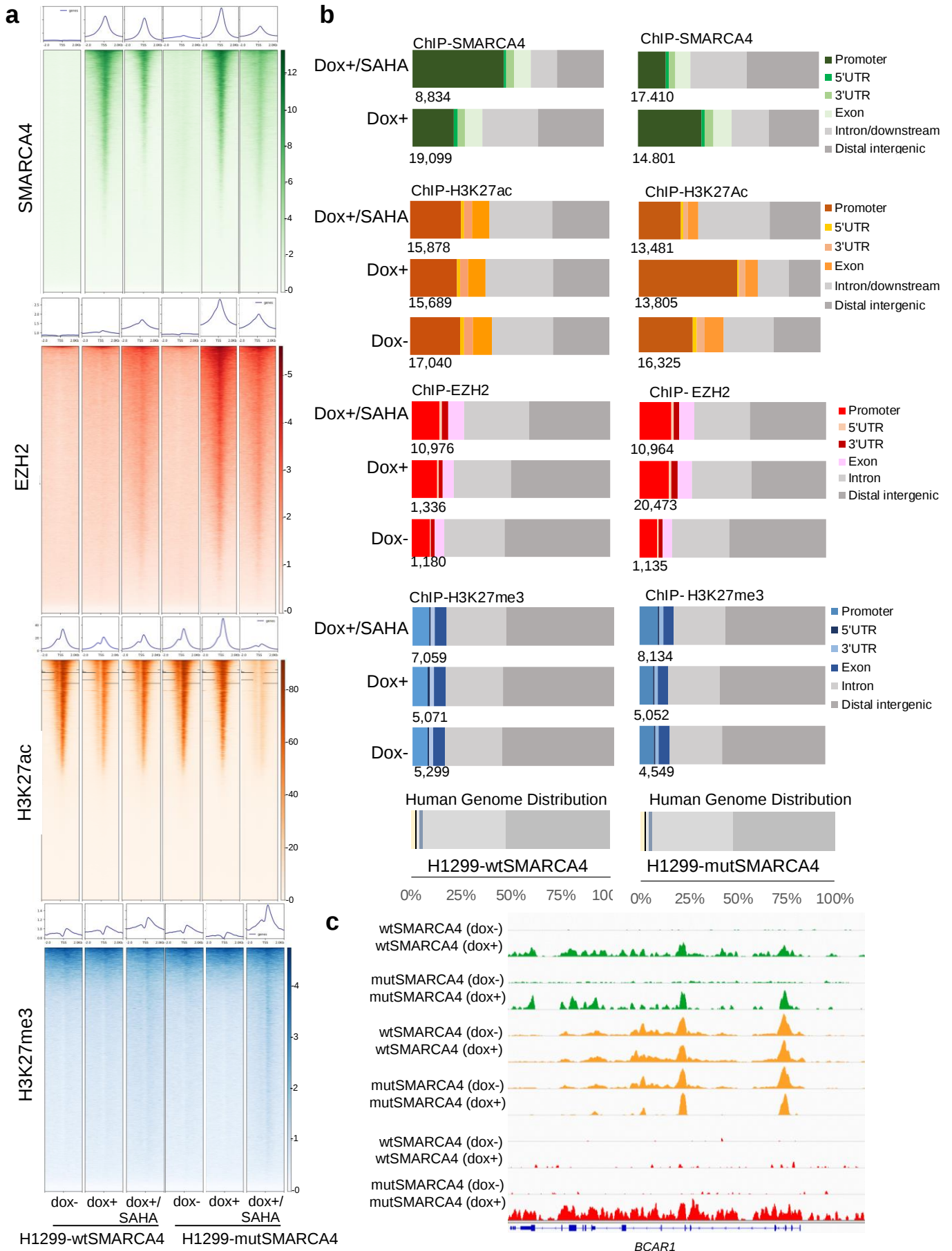
Supplementary Fig.2. Gating strategy for cell cycle analysis of stained MYCamp and SMARCA4def cells with Propidium iodide (PI) as per Supplementary Figure 1b. The gating strategy is based on first morphology of viable cells (excludes cell death) > singlets cells (excludes doublets) > PI staining (DNA content estimation). First FACS plot represent relative size (FSC-A) and complexity (SSC-A) of lung cancer cells. Second plot represent FSC-A and FSC-H parameters indicating singlets cells to exclude doublets. Third panel show PI-A and PI-W parameters to detect DNA content of stained cells with Propidium Iodide (PI). Next FACS plot and histogram showing the defined gates to identify SubG1, G0-G1, S and G2-M phase and the associated percentage.



Supplementary Fig.3. GSK126, alone or in combination with SAHA, do not affect proliferation or viability in SMARCA4def cells **a**, Western blot depicting the levels of EZH2 in the indicated cancer cells, following SAHA treatment. ACTIN, protein-loading control. **b**, **c**, Effects on cell viability, measured using MTT assays, in the indicated cell lines after treatment with increasing concentrations of GSK-126 (**b**) or of SAHA and 1 μ M of GSK-126, for 5 days (**c**). EC₅₀, half maximal effective concentration. Values from two independent experiments per cell line are represented. Error bars, means $\pm$ SD of three replicates. **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$. **d**, Representative clonogenic assays for the indicated cells and treatments. A Source Data file is available for this figure.

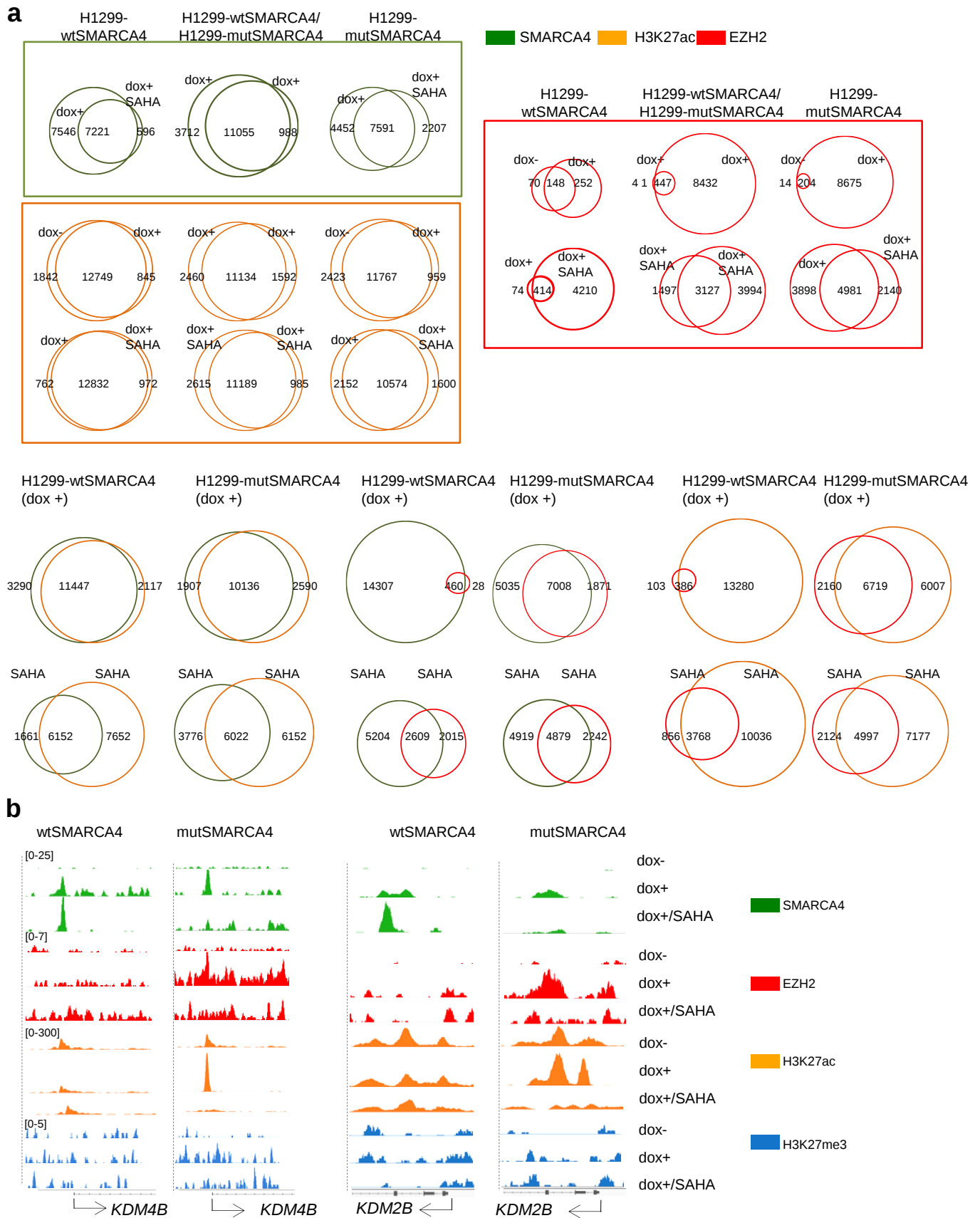


Supplementary Fig. 4. SMARCA4def cells carry lower levels of KDM6A and KDM6B, as compared to the MYCamp cells. **a**, Heatmap depicting mRNA levels (RPKMs, reads/kb/ million) of the indicated *KDMs* and of *SMARCA4* from a panel of 179 lung cancer cell lines (from Cancer Cell Line Encyclopedia-CCLE at cBioportal; <https://www.cbioportal.org/>). RPKMs (reads per million). The heatmap was generated using the Software Genesis. **b**, Western blot depicting endogenous levels of the indicated proteins in lung cancer cell lines. ACTIN and TUBULIN, protein-loading controls. The H228 cells do not have KDM6A protein due to a genetic inactivating alteration at the *KDM6A* gene. **c**, Plot comparing the mRNA levels of the indicated *KDMs* of the SMARCA4-low expressing and SMARCA4-high expressing tumors (lung primary adenocarcinomas from TCGA, Nature 2014 (<https://www.cbioportal.org/>)). Each dot represents a single tumor. Bars show mean $\pm$ SD. Two-sided unpaired Student's t-test. **, $P = 0.01$; ****, $P < 0.0001$. **d**, Determination of protein levels of KDM6A, KDM6B and EZH2 by western blot in the H1299-wtSMARCA4 and H1299-mutSMARCA4 cell models (dox, doxycycline, 1 μ g/mL; 72 h) with or without SAHA treatment for 72 h. Bars show mean $\pm$ SD. Two-sided unpaired Student's t-test. **e**, Upper panel, western blots depicting levels of indicated proteins in the indicated cells infected with the shNT and with different shSMARCA4 (#1, #4) (see Ref. 7 for more information). Lower panel, real-time quantitative PCR of *SMARCA4*, *KDM6A* and *KDM6B* (relative to ACTB) for comparing mRNA levels in the H69 cells infected with the shNT and with two different shSMARCA4 (#1, #4). $n=3$, for each gene and shRNA. Error bars, means $\pm$ SD of replicates. Two-sided unpaired Student's t-test. *, $P = 0.011$; ***, $P = 0.002$; ****, $P < 0.0001$. **f**, Analysis of the changes in the expression levels of the indicated transcripts from a panel of 242 genomically characterized human cancer cell lines after knockout of SMARCA4 using CRISPR/CAS9 (Sanger CRISPR). Data and statistics are available at the Depmap portal (<https://depmap.org/portal/depmap/>). A Source Data file is available for this figure.

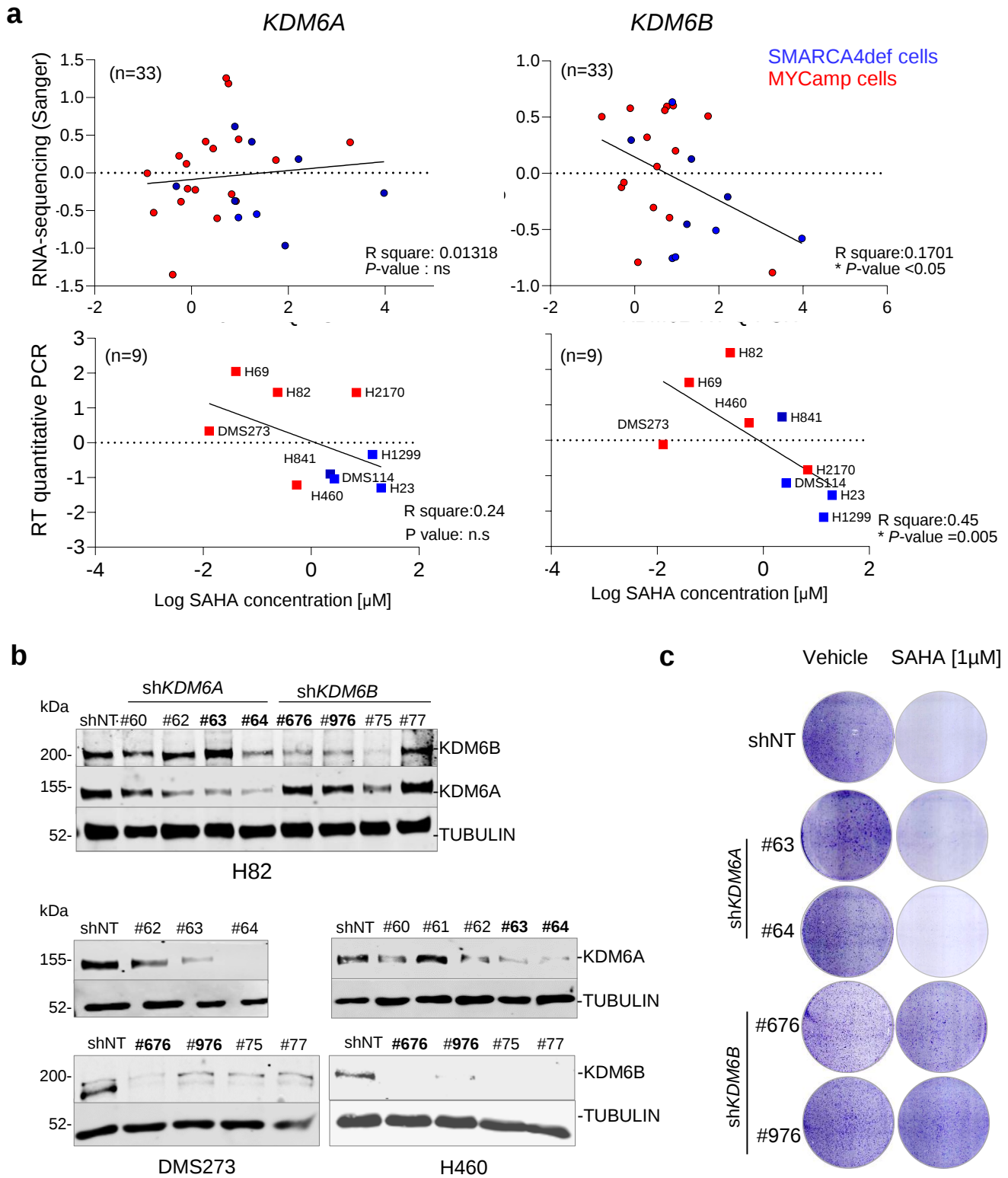


Supplementary Fig. 5. Genome-wide effects of wild type and mutant SMARCA4 and of SAHA on the dynamics of H3K27 modification and on EZH2 occupancy. **a**, Heatmaps of normalised ChIP-seq intensities, centred ± 2 kb around the transcriptional start sites (TSS), of SMARCA4, H3K27ac, H3K27me3 and EZH2, in the H1299 cell model. **b**, Genome-wide functional annotations for peaks generated by ChIP-seq analyses. Promoters are defined as the regions ± 2 kb around the annotated TSS. Numbers below each bar indicate the absolute number of peaks at promoters called for the ChIP-seq of each indicated protein and condition. **c**, Representative snapshots from IGV of ChIP-seq profiles at selected target loci, performed in the H1299 cell model. H1299-wtSMARCA4 or H1299-mutSMARCA4 cell models after induction of SMARCA4 (dox, doxycycline, 1 μ g/mL; 72 h) with or without SAHA treatment (1 μ M, 72 h).

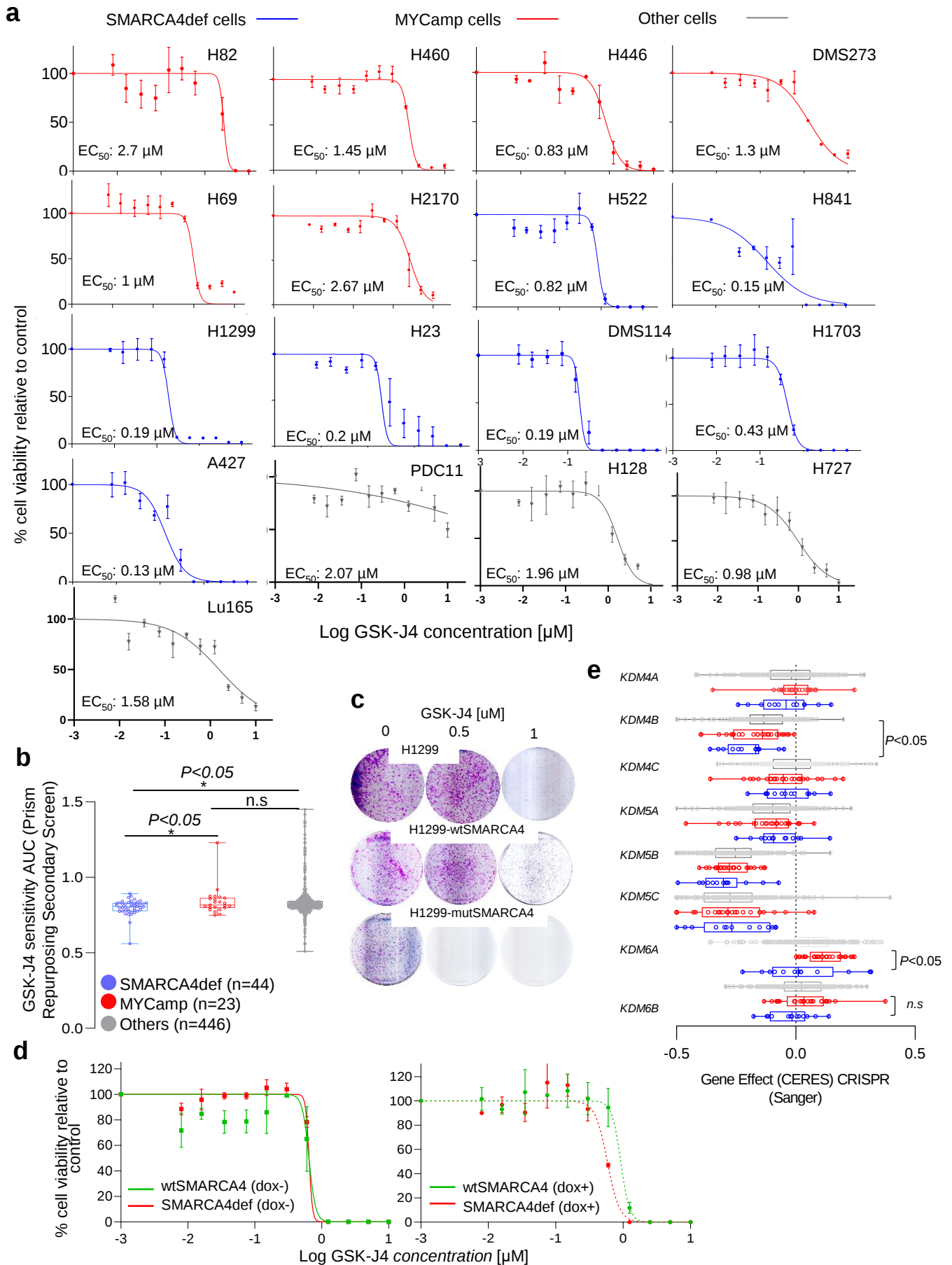
Supplementary Fig.6



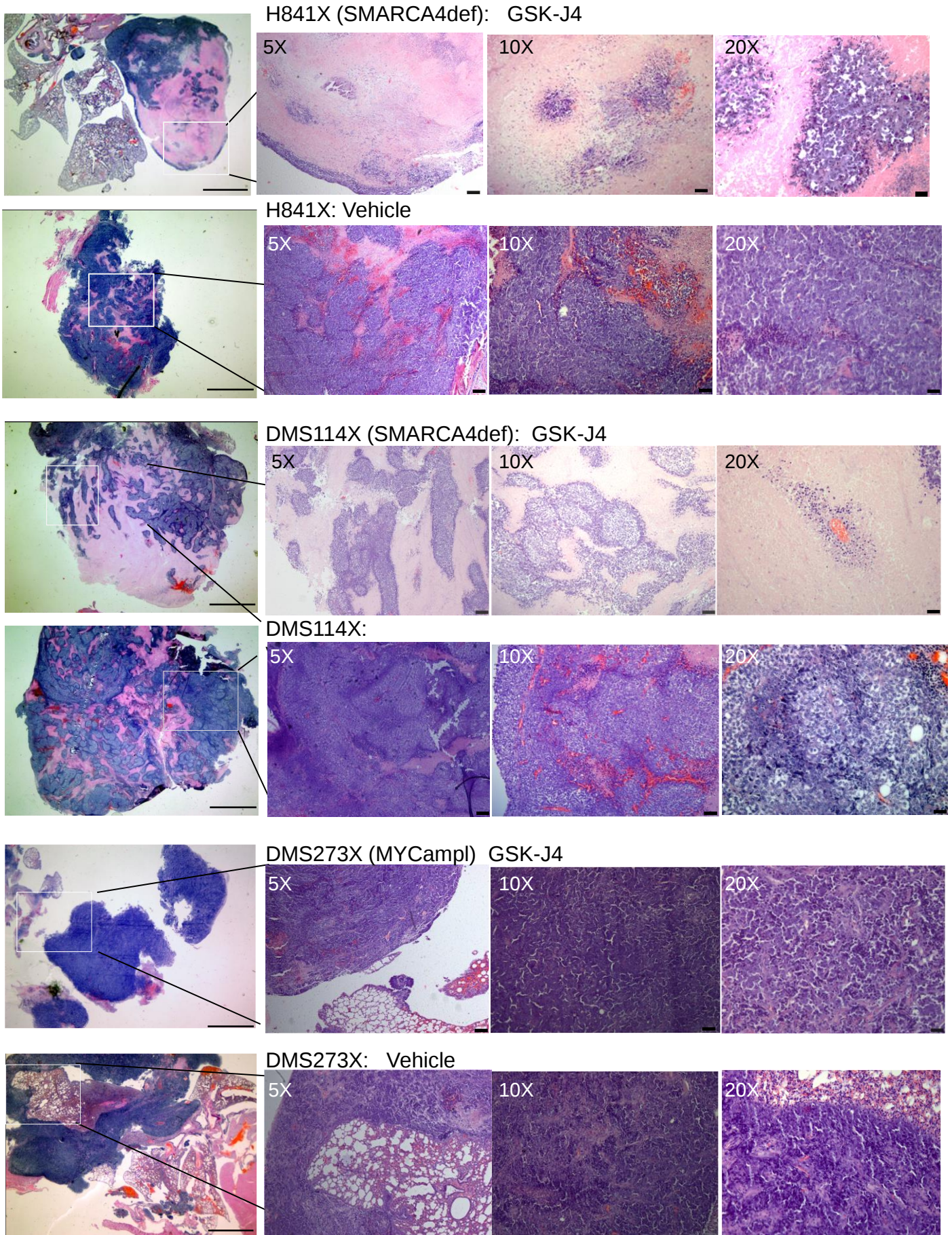
Supplementary Fig. 6. Venn diagrams showing shared occupancies and examples of snapshots for the different ChIP-sequencing experiments. a, Venn diagrams of the overlap of SMARCA4, H3K27ac and EZH2 peaks in the H1299 cell model. **b,** Representative snapshots from IGV of ChIP-seq profiles at selected target loci, performed in the H1299 cell model. H1299-wtSMARCA4 or H1299-mutSMARCA4 cell models after induction of SMARCA4 (dox, doxycycline, 1 µg/mL; 72 h) with or without SAHA treatment (1 µM, 72 h).



Supplementary Fig. 7. Lower levels of KDM6A and KDM6B in the SMARCA4def cells and shRNAs, to downregulate KDM6A and KDM6B expression in different MYCamp cells. **a**, Significant correlation between mRNA levels of *KDM6B* (RNA-sequencing from the Sanger database or RT-QPCR data from our current study) and EC_{50} (half maximal effective concentration) for SAHA (upper panels, from www.cancerrxgene.org or lower panels, from our own data). Each dot represents a single cancer cell line. Simple linear regression analysis. *, $P < 0.05$; n.s, not significant. **b**, Western blots depicting levels of the indicated proteins in the indicated cells infected with the shNT and with different shKDM6 (#60, #61, #62, #63 and #64) and shKDM6B (#676, #976, #75 and #77). **c**, Clonogenic assays for the H460 cells infected with shNT, shKDM6 (#63, #64) or shKDM6B (#676, #976) treated with SAHA for 5 days. A Source Data file is available for this figure.



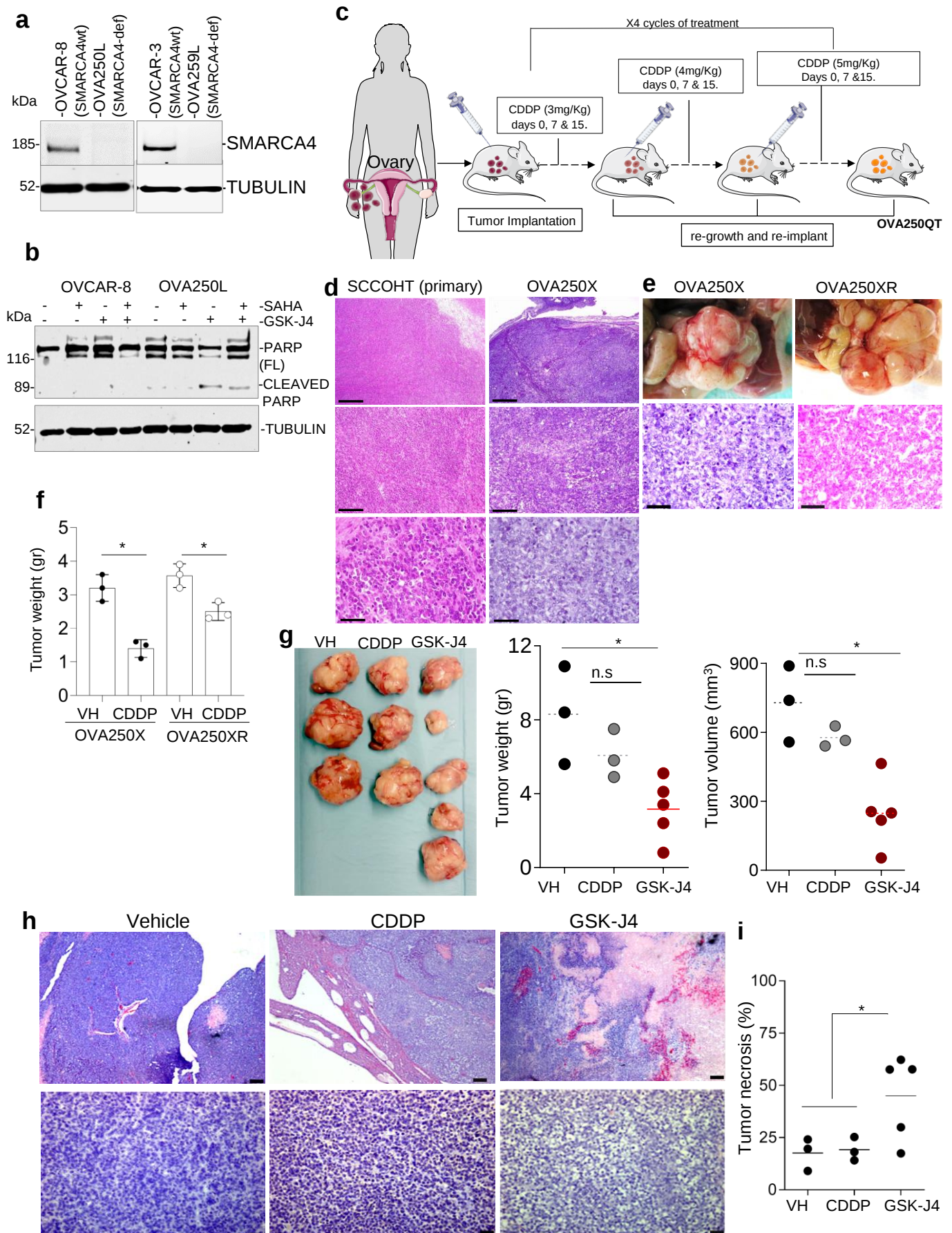
Supplementary Fig. 8. GSK-J4 induces cell growth inhibition of SMARCA4def lung cancer cells. **a**, Examples of the effects on cell viability, measured using MTT assays, after treatment with increasing concentrations of GSK-J4 in the indicated lung cancer cell lines. Lines, percentage of viable cells relative to the total number at 0 h. Error bars, means $\pm$ SD of three replicates. **b**, Analysis of the sensitivity to the GSK-J4 drug in a panel of 750 genomically characterized human cancer cell lines using the PRISM (Profiling Relative Inhibition Simultaneously in Mixtures) technology. Each dot represents a single cancer cell line. In box-whisker plots, the horizontal band inside box indicates the median, the bottom and top edges of the box 25th–75th percentiles and the whiskers indicate the min to max. Two-sided unpaired Student's t-test. *, $P = 0.032$ in both cases; n.s, not significant. Data available at the Achilles project at the depmap portal (<https://depmap.org/portal/achilles/>). **c-d**, clonogenic (**c**) and cell viability (MTT) (**d**) assays in the H1299-wtSMARCA4 or H1299-mutSMARCA4 cell models before and after induction of SMARCA4 (doxycycline, 1 μ g/mL; 5 days) treated with GSK-J4. Lines, percentage of viable cells relative to the total number at 0 h. Error bars, mean $\pm$ SD of three replicates. **e**, Dependency of different cancer cell lines for each of the indicated KDM from the Achilles project at the depmap portal (<https://depmap.org/portal/achilles/>). Blue, SMARCA4def cell lines (n=13); Red, MYCamp cell lines (n=25) and grey (n=204), cancer cell lines that are wild type for both SMARCA4 and MYC. Two-sided unpaired Student's t-test. *, $P < 0.05$; n.s, not significant. In box-whisker plots, the horizontal band inside box indicates the median, the bottom and top edges of the box 25th–75th percentiles and the whiskers indicate the min to max. A Source Data file is available for this figure.



Supplementary Fig. 9. GSK-J4 induces tumour regression of SMARCA4def lung tumours *in vivo*

Representative sections of H&E staining of the indicated tumours developed from the indicated lung cancer cells grown in nude mice (lung orthotopic implantation of small solid fragments of engrafted cell lines previously grown subcutaneously), treated with GSK-J4 or vehicle. Left panels, scale bars, 2.5 mm. Magnification as indicated (5x, 10x and 20x panels; scale bars, 100 µm, 50 µm and 25 µm, respectively).

Supplementary Fig.10



Supplementary Fig. 10. *In vivo* establishment of paired cisplatin-resistant SCCOHT xenografted tumour and effect of cisplatin and GSK-J4 treatments. **a**, Western blot to show presence or absence of SMARCA4 in the indicated ovarian cancer cells. **b**, Western blot depicting the cleavage of PARP in the indicated cells, following the different treatments or vehicle. TUBULIN, protein-loading control. **c**, The experimental approach used for cisplatin (CDDP)-resistant tumour generation combines: (i) iterative cycles of cisplatin treatment (3 doses of cisplatin administered by i.v. injection on days 0, 7 and 15); (ii) successive increase of administered doses through four cycles applied to different mice. Lateral laparotomy was conducted in isofluorane-anaesthetised mice. The ovary was mobilised and small tumour pieces of primary tumour were anchored on the mouse ovarian surface with prolene 7.0 sutures. Engrafted OVA250X tumours grew as large solid masses, usually to 1,000–1,500 mm³ in diameter, which determined the time of sacrifice. Figure schematics were generated using <https://smart.servier.com/> (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). **d**, Representative H&E staining, from at least five different tumours of each group, reveals a similar morphology between primary SCCOHT and paired engrafted OVA250X. Top panels, scale bar 500 µm, middle panels scale bar, 200 µm. Bottom panels scale bar, 50 µm. **e**, Gross pathological photographs at necropsy (top panels) and representative H&E staining (bottom panels) of the OVA250X and OVA250XR tumours, from at least five different tumours of each group. Scale bar, 50 µm. **f**, Measure of the weight of each of the tumours from mice treated with vehicle (VH) (n=3) or cisplatin (CDDP) (n=3). *, $P = 0.046$ (OVA250X) and *, $P = 0.018$ (OVA250XR); Error bars, means $\pm$ SD of replicates. **g**, Left panel, gross pathological photographs of all ovarian tumours that developed in the mice treated with vehicle (VH) (n=3), cisplatin (CDP) (n=3) or GSK-J4 (n=5). Right panels, volume and weight of each tumour. *, $P = 0.036$ in both cases; n.s, not significant. **h**, Representative H&E staining of OVA250XR tumours, from at least five different tumours of each group, treated as indicated. Scale bar, 100 µm (upper panels) and 25 µm (lower panels). **i**, Quantification of necrotic areas from the tumours from mice treated with vehicle (VH) (n=3) or cisplatin (CDDP) (n=3) or GSK-J4 (n=5). *, $P = 0.044$; All tests are two-sided unpaired Student's t-test. n.s, not significant. A Source Data file is available for this figure.

Supplementary Table 1. List of antibodies used. WB, western-blot; IHC, immunohistochemistry; ChIP, chromatin immunoprecipitation

Protein	Reference	Supplier	Technique	Dilution (WB)	Total amount (ChIP)	Dilution (IHC)
KDM6B/JMJD3	#3457	Cell signaling	WB	1:1000		
	ab38113	Abcam	WB & IHC	1:1000		1:50
KDM6A/UTX	#33510	Cell signaling	WB & IHC	1:1000		1:100
H3K27me3	07-449	Sigma	WB & ChIP-seq & IHC	1:1000	2µg	1:100
H3K27ac	ab4729	Abcam	WB & ChIP-seq & IHC	1:1000	2µg	1:100
EZH2	#5246	Cell signaling	WB & ChIP-seq	1:1000	2µg	
SMARCA4	#49360	Cell signaling	WB & ChIP-seq	1:1000	2µg	
ACTIN	A2228	Sigma	WB	1:10000		
TUBULIN	200-301-880S	Rockland	WB	1:10000		
PARP	#9542	Cell signaling	WB	1:1000		
CASPASE-3	#9668	Cell signaling	IHC	1:1000		1:100
Donkey anti-rabbit IgG IRDye 800CW fluorescent secondary antibody	926-32213	Li-Cor	WB	1:10000		
Donkey anti-mouse IgG IRDye 680LT fluorescent secondary antibody	926-68022	Li-Cor	WB	1:10000		

Supplementary Table 2. List of primers used for the quantitative RT-PCRs.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Scale (µmols)	Supplier
<i>ACTB</i>	GGCATCCTCACCCTGAGGTA	AGGTGTGGTCGGAGATTTTC	0.025	Sigma
<i>GUSB</i>	CTGTACACGACACCCACCAC	GATGAGGAAGTGGCTCTTGA	0.025	Sigma
<i>KDM1A/LSD1</i>	GCCATGGTGGTACAGGTCTA	TGGCCAGTTCCATATTTACA	0.025	Sigma
<i>KDM2A</i>	CGGATAGTTGAGAAAGCCAT	CTCTTTGGTGGGCCTCTGTA	0.025	Sigma
<i>KDM3A</i>	ACCTGCAGTTATTCTTCAGC	TAATGCCAGTCCTATGCCAT	0.025	Sigma
<i>KDM4A/JMJD2A</i>	CCTCACTGCGCTGTCTGTAT	CCAGTCGAAGTGAAGCACAT	0.025	Sigma
<i>KDM4B/JMJD2B</i>	GATCTCCATGGACGTGTTTCG	CGTTTCCGGTGAGACCTGCC	0.025	Sigma
<i>KDM4C/JMJD2C</i>	GGCATAGGTGACAGGGTGTG	CGGGGACCAAACTCTGGAAA	0.025	Sigma
<i>KDM4D/JMJD2D</i>	CGGGATCTGCACAGATTATC	AGTTTCTGAGGAGGGCGACC	0.025	Sigma
<i>KDM5A</i>	GGTTTCTTAAGGTGGCAAGT	TTCTTTTGTACTGTTCCCTA	0.025	Sigma
<i>KDM5B</i>	AGCTTTTCTCAGAATGTTGG	GCAGAGTCTGGGAATTCACA	0.025	Sigma
<i>KDM5C</i>	GGGTTTCTAAAGTGTAGATC	CCCACACATCTGAGCTTTAG	0.025	Sigma
<i>KDM6A/UTX</i>	GTCCGAGTGTCAACCAACTG	TGAGAGTCCTGGAGTAGGAG	0.025	Sigma
<i>KDM6B/JMJD3</i>	CTCAACTTGGGCCTCTTCTC	GCCTGTCAGATCCCAGTTCT	0.025	Sigma

Supplementary Table 3. References for the shRNAs

Name	Clone ID	Vector	Target gene	Supplier
#60	TRCN0000107760	pLKO.1	<i>KDM6A</i>	Sigma
#61	TRCN0000107761	pLKO.1	<i>KDM6A</i>	Sigma
#63	TRCN0000107763	pLKO.1	<i>KDM6A</i>	Sigma
#64	TRCN0000107764	pLKO.1	<i>KDM6A</i>	Sigma
#77	TRCN0000236677	pLKO.1	<i>KDM6B</i>	Sigma
#78	TRCN0000236678	pLKO.1	<i>KDM6B</i>	Sigma
#676	TRCN0000236676	pLKO.1	<i>KDM6B</i>	Sigma
#976	TRCN0000359976	pLKO.1	<i>KDM6B</i>	Sigma

Supplementary Table 4. List of primers used for the cloning of KDM6A and KDM6B.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Scale (μmols)	Supplier
<i>KDM6A</i>	aaaaaaaaCTCGAGCCGCCACCAT GAAATCCTGCGGAGTGTCTGCTC GCTAC	aaaaaaaaGCGGCCGCTCAAGATGAGGCG GATGGTAATGGAGGAGCTAATG	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	tttttttGGTACCGCCGCCACCATGC ATCGGGCAGTGGACCCTCCAG	tttttttCTCGAGTCATCGCGACGTGCTGGCT GGGG	0.025	Sigma

Supplementary Table 5. List of primers used for the sequencing of KDM6A and KDM6B.

Gene	Forward (5'-3')	Scale (μmols)	Supplier
<i>KDM6A</i>	ATGAGTCTAGTTTAAAGCATTTTCAG	0.025	Sigma
<i>KDM6A</i>	ATTAAATGCTACTTAAATGCAACTAG	0.025	Sigma
<i>KDM6A</i>	GGAGTTGCACAGGTAC	0.025	Sigma
<i>KDM6A</i>	GGTGGACAACAAGGC	0.025	Sigma
<i>KDM6A</i>	TAAAAATGGCTTATCTAACAGTAGC	0.025	Sigma
<i>KDM6A</i>	TGACTAAACTTCCTGCTTTTG	0.025	Sigma
<i>KDM6A</i>	GCACGAAATATCAAGGTCTCAGATCCAAAGC	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	AACGGAACATATGGAGCC	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	CTCCAGCGTTTCACC	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	AGGATTCTCACACCCC	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	CCGCTGAAGGAGCCC	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	CGAAGAGCCAGTCCC	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	TGCCCAGCCCACACC	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	GTGGAAGCGAGTGGC	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	ACGAGCACTACTGGG	0.025	Sigma
<i>KDM6B</i>	AAGAAAATCGCTTACCAGGGC	0.025	Sigma

Supplementary Table 6. Distribution of H3K27me3 staining among tumours (three replicates per cell line and condition) from the DMS273X, H841X, DMS114X and OVA250X tumours treated with vehicle or GSK-J4. Low (intensity values 1 & 2); high (values 3 & 4).

	Replicate	Eval 1		Eval 2		Eval 3		Mean		Categories	
		H3K27me3		H3K27me3		H3K27me3		H3K27me3		H3K27me3	
		Vehicle	GSK-J4	Vehicle	GSK-J4	Vehicle	GSK-J4	Mean-Vehicle	Mean-GSK-J4	Categories Vehicles	Categories GSK-J4
DMS114X	R1	1	3	1	2	1	1	1	2	Low	Low
	R2	2	4	2	3	2	3	2	3.3	Low	High
	R3	2	4	2	4	2	4	2	4	Low	High
H841X	R1	1	3	1	3	1	3	1	3	Low	High
	R2	3	4	3	3	3	3	3	3.3	High	High
	R3	2	4	2	4	2	3	2	3.6	Low	High
DMS273X	R1	2	3	1	2	1	2	1.3	2.3	Low	Low
	R2	1	3	2	3	2	3	1.6	3	Low	High
	R3	2	4	2	3	2	4	2	3.6	Low	High
OVA250X	R1	2	3	1	3	2	3	1.6	3	Low	High
	R2	2	4	1	4	2	4	1.6	4	Low	High
	R3	2	3	2	4	3	4	2.3	3.6	Low	High