



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**LA CINASA INDUCTORA DE NF-KAPPAB REGULA EL FENOTIPO TRONCAL EN
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS

Que para optar por el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx, agosto, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuelita Jovita quien vivirá por siempre en mi corazón.

A mi madre por ser un ejemplo de fortaleza para salir adelante sin importar los obstáculos en el camino. Gracias por tanto amor, por cuidarme siempre y por todos los valores que me inculcaste. Gracias por tu empeño y sacrificio para sacar adelante a nuestra familia.

A mi padre por darme ánimo siempre y por demostrarme su amor a cada instante. Gracias por las enseñanzas que me has dado y por el valor que me has demostrado para levantarte ante cualquier adversidad. Gracias por las palabras que me has dicho cuando lo he necesitado.

A mi hermana por su apoyo, su cariño y por compartir la vida conmigo. Gracias por estar en los momentos importantes de mi vida.

A Pilo gracias por generar en mi la sed de conocimiento y por impulsarme a salir adelante. Gracias por haber sido mi inspiración para ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS

A mi querida universidad.

Por brindarme las herramientas necesarias para continuar con mi formación académica.

Al CONACYT y al Instituto Carlos Slim de la Salud

Por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

A la Dra. Vilma Maldonado

Por las asesorías constantes que sin duda han fortalecido enormemente mi formación académica. Gracias por su paciencia, dedicación y apoyo durante este tiempo. Y sobretodo gracias por confiar en mi e impulsarme a seguir en este camino que tanto me apasiona.

Al Dr. Jorge Melendez Zajgla

Gracias por su ejemplo de tenacidad y por sus acertadas sugerencias para enriquecer el trabajo. Gracias por sus enseñanzas y por compartir sus conocimientos.

A los miembros de mi comité tutorial

Gracias por sus aportaciones, críticas y sugerencias que sin lugar a duda enriquecieron el proyecto.

A los miembros del Jurado

Dr. Ivan Velasco, Dr. Miranda Rios, Dr. Hector Mayani y al Dr. Alfonso Dueñas. Gracias por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión de la tesis

A mis amigos de laboratorio

Por orden de antigüedad gracias a Luis, Lau, Gus, Javi, Ro, Majo y Geo por su amistad, por esas charlas interminables para reírnos, quejarnos y animarnos. Pero sobre

todo gracias por hacerme reír hasta morir. Gracias por alegrar mis días en el laboratorio, han dejado una huella permanente en mi.

A mis amigas de toda la vida

A Brenda, gracias por recorrer parte de este camino juntas, ha sido tan divertido y enriquecedor. Gracias por tus críticas y consejos que me han impulsado a ser mejor.

A Paty, gracias por compartir conmigo tu experiencia y ser un ejemplo de fortaleza y sobretodo gracias por tu apoyo para realizar parte de este proyecto.

A Ceci y Tere gracias por escucharme y alentarme a seguir adelante y por estar siempre presentes.

A Miriam, Wendy y Anita gracias por sus palabras de animo y por su cariño. Aunque no nos vemos muy seguido siguen estando presentes.

A mi familia

Gracias a toda mi familia en especial a mi mama, papa, hermana y primas por todo el apoyo incondicional que me han brindando durante toda mi vida. No tengo palabras para agradecer tanto amor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de “Epigenética” bajo la dirección de la Dra. Vilma Maldonado Lagunas en la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

ÍNDICE:

1.- Resumen.....	8
2.- Abstract.....	9
3.- Introducción.....	10
3.1.- Cáncer.....	10
3.2.- Cáncer de Mama.....	12
3.3.- Clasificación.....	12
3.4.- Células Troncales Cancerosas (CTC).....	17
3.5.- Características de CTC.....	19
3.6.- Identificación de CTC.....	20
3.7.- La vía de señalización del Factor Nuclear kappa B.....	24
3.8.- Cinasa Inductora de NF- κ B (NIK).....	29
3.9.- Activación de NF- κ B en células troncales de cáncer de mama.....	32
4.- Planteamiento del problema.....	35
5.- Justificación.....	36
6.- Hipótesis.....	37
7.- Objetivo General.....	37
7.1.- Objetivos Particulares.....	37
8.- Material y Método.....	38
8.1.- Cultivo celular.....	38
8.2.- Citometría de flujo.....	38
8.3.- Extracción de RNA.....	39
8.4.- RT-PCR y PCR cuantitativa en tiempo real.....	39
8.5.- Extracción de proteínas.....	39
8.6.- Western blot.....	40
8.7.- Inhibición de NIK y ERK1/2 mediante shRNAs.....	40
8.8.- Inhibición de la vía de ERK.....	41
8.9.- Sobreexpresión de NIK.....	41
8.10.- Activación de NF-kappa B.....	42
8.11.- Inmunofluorescencia.....	42
8.12.- Ensayos tumorigénicos in vivo.....	43
8.13.- Ensayos de formación de colonias.....	43
8.14.- Ensayos de formación de mamoesferas.....	44
8.15.- Construcción de microarreglo de tejidos.....	44
8.16.- Inmunohistoquímica.....	44
8.17.- Microarreglos de expresión.....	45
8.19.- Análisis estadístico.....	45
9.- Resultados.....	46
9.1.- NIK se expresa preferencialmente en líneas celulares de cáncer de mama triple negativas.....	46
9.2.- Aislamiento de CTC de líneas celulares de cáncer de mama.....	47
9.3.- Caracterización de CTC de la línea MCF7 y MDA-MB-231.....	51
9.4.- Las CTC de cáncer de mama expresan niveles más altos de NIK.....	53

9.5.- La inhibición de NIK reduce la población de CTC y afecta la expresión de marcadores de troncalidad.....	55
9.6.- La inhibición de NIK impacta el potencial clonogénico y tumorigénico de las líneas celulares de cáncer de mama.....	57
9.7.- La expresión forzada de NIK aumenta la expresión de marcadores troncales.....	60
9.8.- La expresión de NIK aumenta la clonogenicidad y tumorigenicidad...	61
9.9.- NIK regula la expresión de proteínas de la vía de NF- κ B.....	64
9.10.- Expresión de NIK en pacientes con cáncer de mama.....	69
9.11.- NIK afecta la expresión de genes relacionados con troncalidad.....	72
9.12.- NIK regula el fenotipo troncal a través de la vía de ERK.....	77
10.- Discusión.....	80
11.- Conclusiones.....	86
12.- Referencias.....	87
13.- Anexos.....	98
13.1.- Secuencias de Oligonucleótidos.....	98
13.2.- Diseño y clonación de shRNAs para el gen NIK (MAP3K14).....	99
13.3.- Digestión del vector pSIREN para verificar la clonación del shRNA.....	100
13.4.- Secuencia de los shRNAs clonados en el vector pSIREN.....	101
13.5.- Estrategia para generar un vector de expresión con el ORF del gen MAP3K14.....	102
13.6.- Digestión del vector pT-REx-DEST30 para verificar la recombinación.....	103
13.7.- Secuencias de los vectores de expresión.....	104
13.8.- Genes diferencialmente expresados en células MCF7 que sobreexpresan NIK.....	105
13.9.- Genes diferencialmente expresados en células deficientes en NIK.....	108
14.- Artículos.....	110
14.1- NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer.....	112
14.2.- NF- κ B signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target?.....	129

1.- RESUMEN

Las células troncales cancerosas (CTC) son células capaces de auto-renovarse y diferenciarse en las distintas poblaciones heterogéneas que forman un tumor. Las CTC expresan componentes de la cascada de señalización del factor nuclear kappaB (NF-κB) y tienen activa esta vía. Las líneas celulares de cáncer de mama con un gran número de CTC expresan altos niveles de la cinasa inductora de NF-κB (NIK). La cinasa NIK es esencial para la activación de la vía no canónica de NF-Kappa B, la cual controla la expresión transcripcional de los genes implicados en los procesos de desarrollo. El papel de NIK en la regulación de células troncales de cáncer de mama es poco conocido, por lo que este proyecto evalúa el efecto de NIK en la regulación de células troncales cancerosas. La expresión de NIK se analizó por RT-PCR cuantitativa en CTC obtenidas de líneas celulares de cáncer de mama. Los niveles de NIK fueron modificados a través de la transfección de shRNAs específicos o de un vector de expresión. El efecto de NIK en las propiedades de las CTC se evaluó mediante la formación de mamoesferas, xenotransplantes en ratones y expresión de marcadores de CTC. Para profundizar en el mecanismo de acción de NIK, se analizó la expresión global en células con expresión forzada de NIK, células con NIK inhibido y células control. Finalmente, se determinó la expresión de la proteína NIK en muestras de cáncer de mama. Los resultados indican que las CTC de mama expresan niveles más altos de NIK y su inhibición reduce la proporción de CTCs y disminuye la expresión de marcadores de CTC, el potencial clonogénico y la tumorigénesis. La sobre-expresión de NIK, por el contrario, provoca un aumento en la expresión de marcadores de CTCs y aumenta el potencial clonogénico y tumorigénico de las células. De manera interesante, la expresión de NIK correlaciona con la localización física de la enzima Aldehído Deshidrogenasa 1 (ALDH1), un marcador de CTC, en muestras de pacientes con cáncer de mama. El análisis de la expresión global, sugiere que NIK participa en la regulación fenotípica de las CTC de mama a través de la vía de ERK1/2. Estos

resultados apoyan la participación esencial de NIK en la regulación fenotípica de las células troncales de cáncer de mama. La inhibición de NIK puede brindar una oportunidad terapéutica para la erradicación de CTC, las cuales son responsables de la progresión del cáncer.

2.- ABSTRACT

Breast cancer stem cells (BCSCs) overexpress components of the Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling cascade and consequently display high NF- κ B activity levels. Breast cancer cell lines with high proportion of BCSCs exhibit high NF- κ B-inducing kinase (NIK) expression. NIK is required for the activation of the non-canonical NF- κ B pathway, which controls the transcriptional expression of genes involved in developmental processes. The role of NIK in the phenotype of cancer stem cell regulation is poorly understood. Expression of NIK was analyzed by quantitative RT-PCR in BCSCs. NIK levels were manipulated through transfection of specific shRNAs or an expression vector. The effect of NIK in the cancer stem cell properties was assessed by mammosphere formation, mice xenografts and expression of stem markers. BCSCs expressed higher levels of NIK and its inhibition through small hairpin (shRNA), reduced the expression of CSC markers and impaired clonogenicity and tumorigenesis. Genome-wide expression analyses suggested that NIK acts on ERK1/2 pathway to exert its activity. In addition, forced expression of NIK increased the BCSC population and enhanced breast cancer cell tumorigenicity. The *in vivo* relevance of these results is further supported by a tissue microarray of breast cancer samples in which we observed correlated expression of Aldehyde dehydrogenase (ALDH) and NIK protein. Our results support the essential involvement of NIK in BCSC phenotypic regulation via ERK1/2 and NF- κ B.

3.- INTRODUCCIÓN

3.1.- Cáncer

El cáncer es un término utilizado para definir a un grupo de enfermedades multifactoriales caracterizadas por la proliferación descontrolada de las células, las cuales pueden eventualmente invadir y establecer un nuevo tumor en otro tejido. El desarrollo del cáncer inicia con la transformación de las células normales hacia un fenotipo maligno. Esta transformación es provocada por la acumulación de alteraciones genéticas o epigenéticas en genes que controlan la proliferación, apoptosis, migración, reparación de DNA, entre otros ^{1,2}.

Existen más de 100 tipos de cáncer que pueden originarse en diferentes órganos, los más comunes son el cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, estómago, hígado, cérvix, esófago y vejiga³. Independientemente del tejido en el que se desarrolle el tumor, las células cancerosas comparten ciertas características que promueven el crecimiento maligno. Estas características son la autosuficiencia para generar señales proliferativas sostenidas, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, evasión de la muerte celular programada, inducción de angiogénesis, capacidad de invasión y metástasis en otros tejidos, evasión de la destrucción inmunológica y reprogramación del metabolismo energético ^{4,5} (Figura 1).

En general, el cáncer posee dos rasgos distintivos que favorecen la adquisición de muchas de las características arriba mencionadas. Uno de estos rasgos es la inestabilidad genómica, la cual facilita el desarrollo de nuevas alteraciones en genes involucrados en el control de la proliferación, diferenciación o muerte celular. La inestabilidad genómica promueve la formación de una gran diversidad de genotipos con distintas características. Durante la progresión tumoral, las clonas con ventajas

proliferativas y/o con capacidad de invadir tejido adyacente promoverán el crecimiento tumoral. La inflamación es otro rasgo que facilita la adquisición de múltiples características malignas y favorece la tumorigénesis y progresión. Actualmente se sabe que todos los tumores tienen células inmunes que pueden presentarse en pequeñas o grandes cantidades. Estas células pueden proveer de factores de crecimiento, factores de supervivencia, factores pro-angiogénicos y enzimas que remodelan la matriz extracelular y que facilitan angiogénesis, invasión y metástasis ⁴.

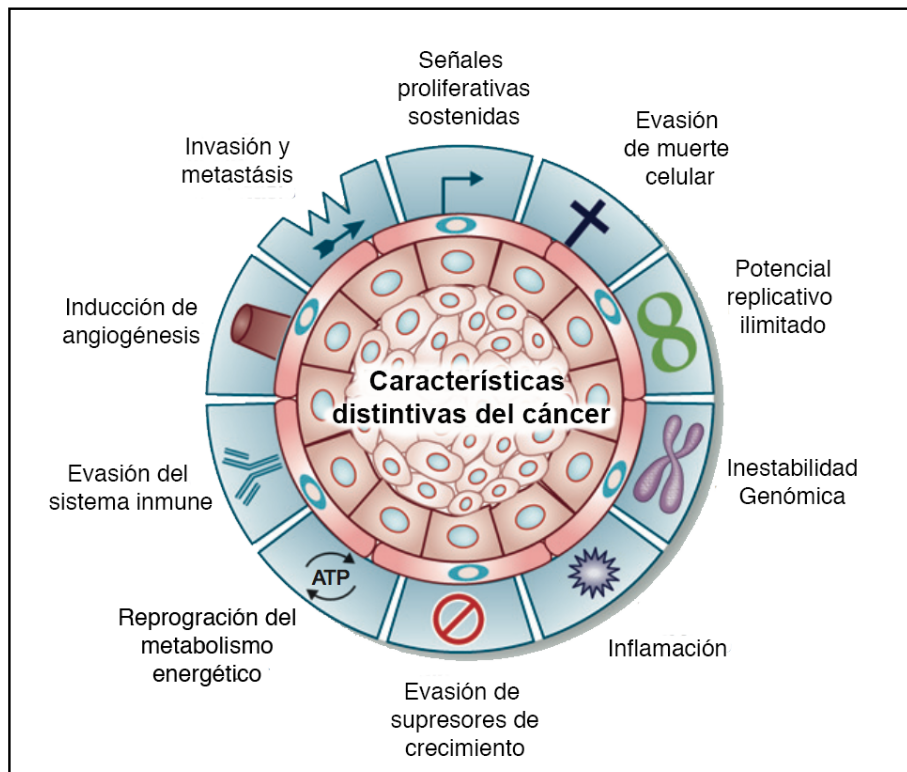


Figura 1.- Características distintivas de las células malignas adquiridas a lo largo del desarrollo tumoral. Tomada y modificada de Kang et al ⁶.

3.2.- Cáncer de Mama

A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia más común entre la población femenina. Tan sólo en el año 2012 se presentaron cerca de 1.67 millones de nuevos casos y 521,907 decesos⁷. En México, el cáncer de mama también es la neoplasia más diagnosticada entre la población femenina y representa aproximadamente el 25% de todas las neoplasias. Este tipo de cáncer ocupa el primer lugar por mortalidad en mujeres en edad reproductiva y se estima que su incidencia ha aumentado un 50% en los últimos 20 años^{8,9}.

Actualmente el cáncer de mama sigue siendo un problema primordial de salud debido a las elevadas tasas de incidencia y mortalidad¹⁰. En nuestro país, aproximadamente 30% de las pacientes diagnosticadas con cáncer desarrollan metástasis lo que dificulta la sobrevivencia y posibilidad de erradicación de la enfermedad⁷.

Hoy en día existen un gran número de terapias para tratar el cáncer de mama, sin embargo, gran parte de los pacientes (60-67%) que reciben estas terapias volverán a desarrollar la enfermedad en un plazo entre 1 a 10 años¹¹. El problema de las recurrencias es que los nuevos tumores son siempre más resistentes a las terapias convencionales lo cual reduce drásticamente la esperanza de vida del paciente¹².

3.3.- Clasificación

El cáncer de mama es un conjunto de enfermedades genética y molecularmente muy heterogéneas que pueden desarrollarse en distintas partes del tejido mamario (ductos, lóbulos o tejido de soporte). Los tipos de cáncer de mama más frecuentes

se originan en las células que recubren los ductos o lóbulos de la glándula mamaria. Estos tumores se dividen principalmente en carcinomas *in situ* o invasivos¹³ (Figura 2).

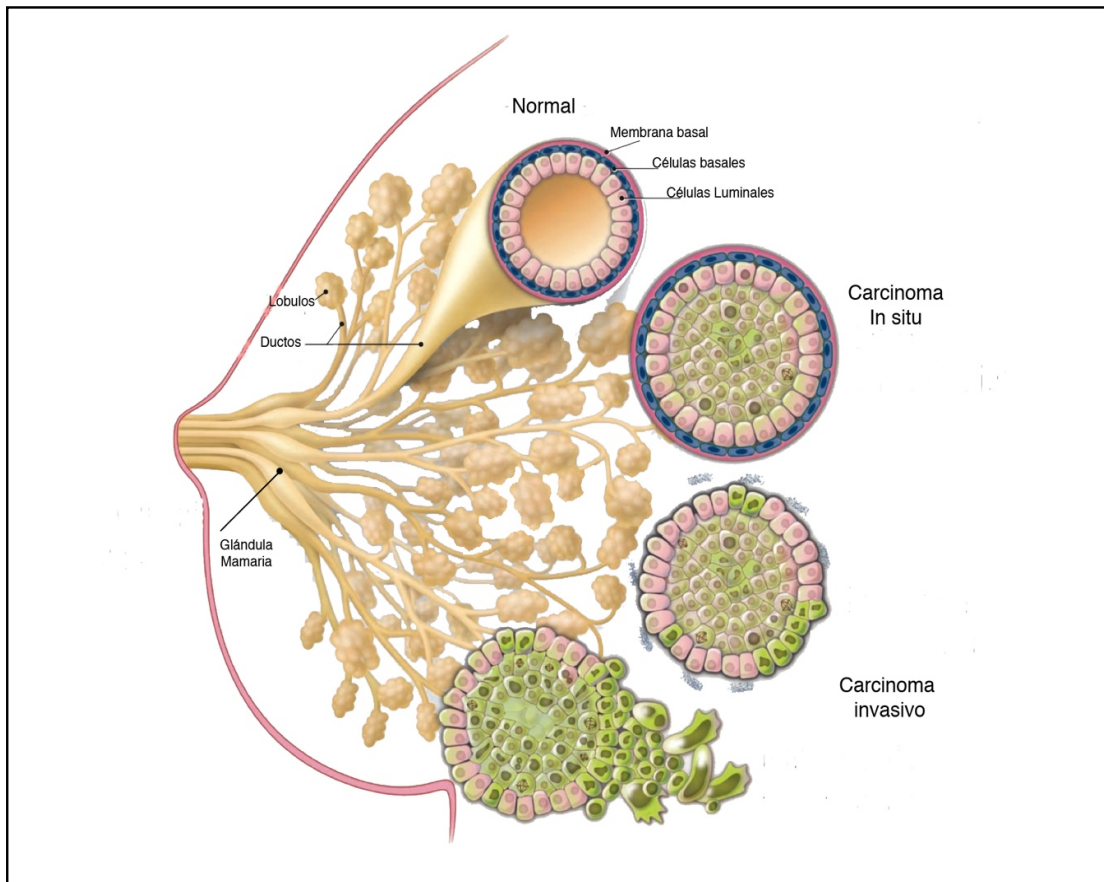


Figura 2.- Representación de un carcinoma in situ o invasivo. La glándula mamaria está compuesta de ductos y lóbulos en los cuales puede originarse el cáncer de mama. El carcinoma *in situ* se caracteriza por tener células malignas localizadas exclusivamente en la pared de los lobulillos o de los ductos. En el carcinoma invasivo, las células degradan los componentes de la membrana basal e invaden los tejidos adyacentes. Imagen tomada y modificada de¹⁴

Los carcinomas *in situ* se localizan dentro de los ductos o lóbulos y se caracterizan por que aún no han invadido los tejidos mamarios circundantes. Por el contrario, las células del carcinoma invasivo se caracterizan por infiltrar el tejido adyacente. Los carcinomas invasivos (75%) tienen el potencial de expandirse a

otros sitios del cuerpo y establecer metástasis en otros órganos. Aproximadamente 80% de los carcinomas invasivos son del tipo ductal y 10% de tipo lobular, el resto son carcinomas invasivos poco frecuentes de tipo medular, papilar, mucinoso entre otros ¹⁵.

Independientemente de su origen, el cáncer de mama puede clasificarse de acuerdo a sus perfiles globales de expresión. Actualmente esta clasificación molecular es la más aceptada y está directamente relacionada con el comportamiento clínico de las neoplasias (Figura 3). Dicha clasificación ha sido definida gracias a la tecnología genómica que se ha desarrollado en las últimas décadas. Los microarreglos de cDNA permiten evaluar la expresión de muchos de los genes que se están expresando en los tumores y de esta manera se puede predecir el comportamiento de la neoplasia ¹⁶. Inicialmente, Perou y colaboradores identificaron un perfil de expresión de 496 genes que permitió clasificar a los tumores en 5 subtipos principales: luminal A, luminal B, HER2, basal y el subtipo normal¹⁷ (Figura 3). Recientemente otros autores han identificado otro subtipo denominado “bajo en Claudina” ¹⁸.

El subtipo luminal posee un patrón de expresión similar al componente epitelial de la glándula mamaria. Estos tumores expresan citoqueratinas luminales, receptores de estrógeno (RE) y genes asociados con la activación del RE. Los subtipos luminales corresponden al 70% de todos los carcinomas de mama y su pronóstico es generalmente bueno ¹⁹. Dentro de esta categoría existe el subtipo luminal A y B. El subtipo luminal A expresa bajos niveles de genes proliferativos y el subtipo B expresa altos niveles de genes proliferativos y generalmente son tumores con un mal pronóstico ²⁰.

El subtipo HER2 (Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) engloba a todos los tumores que tienen una expresión elevada del receptor HER2. La sobre-expresión del receptor HER2 generalmente se produce debido a eventos de amplificación génica. Estos tumores presentan altos niveles de genes proliferativos, expresión moderada de genes luminales y baja expresión de genes

basales. Este tipo de tumores tiene una tasa exacerbada de proliferación por lo que son considerados tumores con un mal pronóstico ²¹.

El subtipo basal engloba a los tumores conocidos como triples negativos, los cuales se caracterizan por expresar bajos o nulos niveles del receptor de estrógenos, receptor de progesterona (PR) o HER2. Estos tumores expresan altos niveles de genes proliferativos y citoqueratinas típicas de células basales o mioepiteliales de la glándula mamaria. Generalmente estos tumores tienen mutaciones en los genes p53 y BRCA1. Los tumores de tipo basal tienen un comportamiento clínico agresivo, generalmente son resistentes a los tratamientos convencionales y presentan un riesgo elevado de metástasis ^{22,23}

El subtipo normal comprende tumores con un perfil de expresión génica similar a las células normales de los conductos mamarios, este tipo de tumor representa entre el 1 y el 4% de los tumores de mama.

El subtipo bajo en Claudina abarca tumores generalmente triple negativos que se caracterizan por expresar bajos niveles de genes involucrados con uniones estrechas como las claudinas, ocludinas o caderinas y por expresar altos niveles de genes mesenquimales. Estos tumores generalmente representan sólo el 6% de todos los tumores y generalmente tienen un fenotipo pobremente diferenciado ¹⁸.

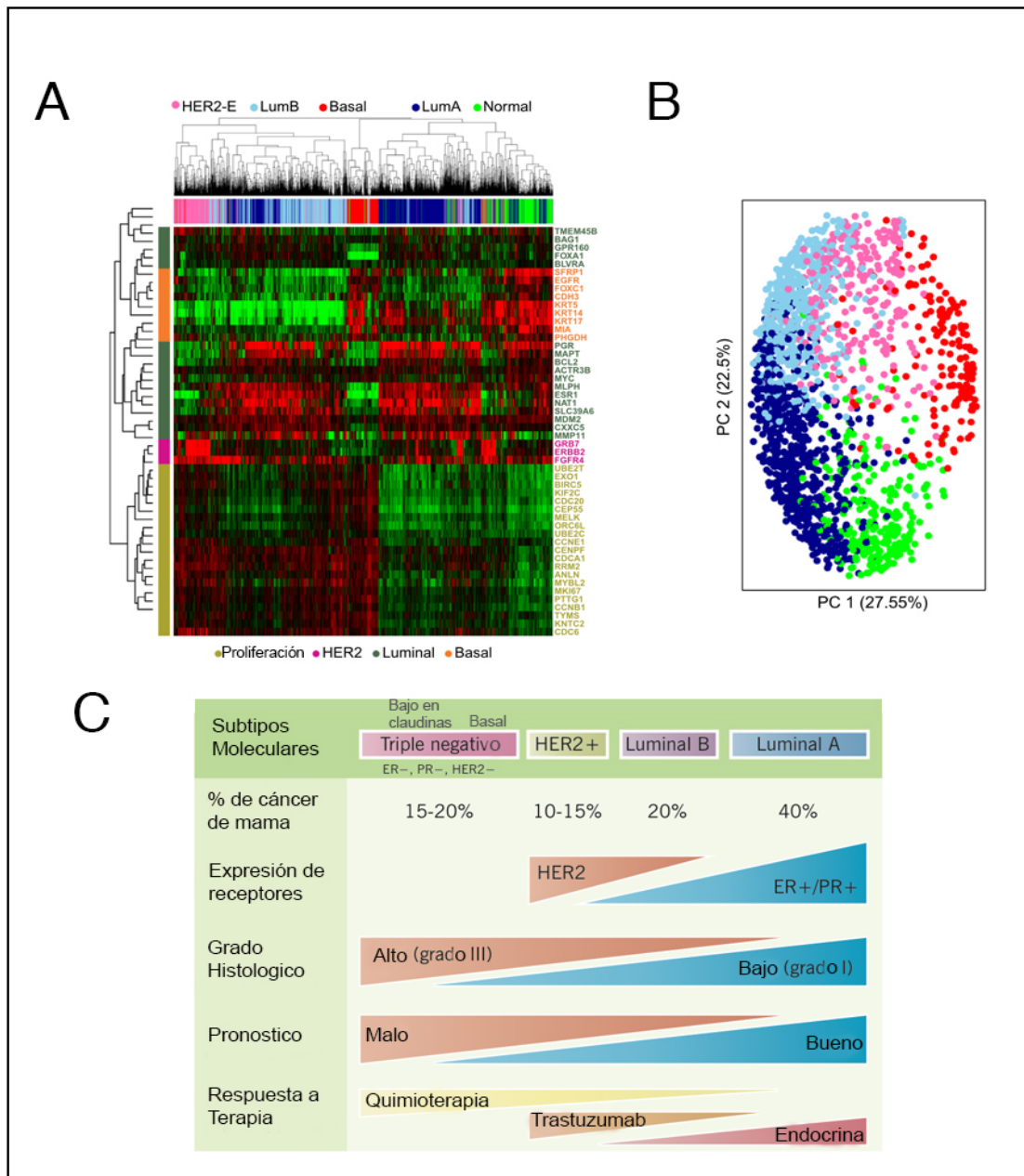


Figura 3.- Clasificación molecular del cáncer de mama. A) El mapa de calor muestra el agrupamiento jerárquico no supervisado de los tumores de acuerdo a sus perfiles de expresión. B. Análisis de componentes principales que muestra la variación general entre los 5 subtipos moleculares. C. Características clínicas de los distintos subtipos moleculares. Tomada y modificada de Winer et al 24

3.4.- Células Troncales Cancerosas (CTC)

Los tumores están compuestos de poblaciones celulares con diversos grados de diferenciación, diferentes fenotipos y características funcionales. Dentro de la diversidad de fenotipos celulares que hay en un tumor, existen células con características similares a las células troncales normales²⁵. Estas células llamadas células troncales cancerosas (CTC) tienen la capacidad de dividirse de manera asimétrica y generar una célula troncal idéntica y una célula que está destinada a diferenciarse²⁶. A través de este mecanismo, las CTC son capaces de auto-renovarse y de originar progenie fenotípicamente diversa que forma parte de un tumor²⁷ (Figura 4).

Actualmente, se ha descrito que no todas las células en un tumor son capaces de dividirse infinitamente y contribuir al desarrollo tumoral. De acuerdo con la teoría de las CTC, sólo esta población es la responsable del desarrollo y progresión del tumor mientras que las otras células cancerosas localizadas dentro del tumor no son tumorigénicas^{28,29} (Figura 4).

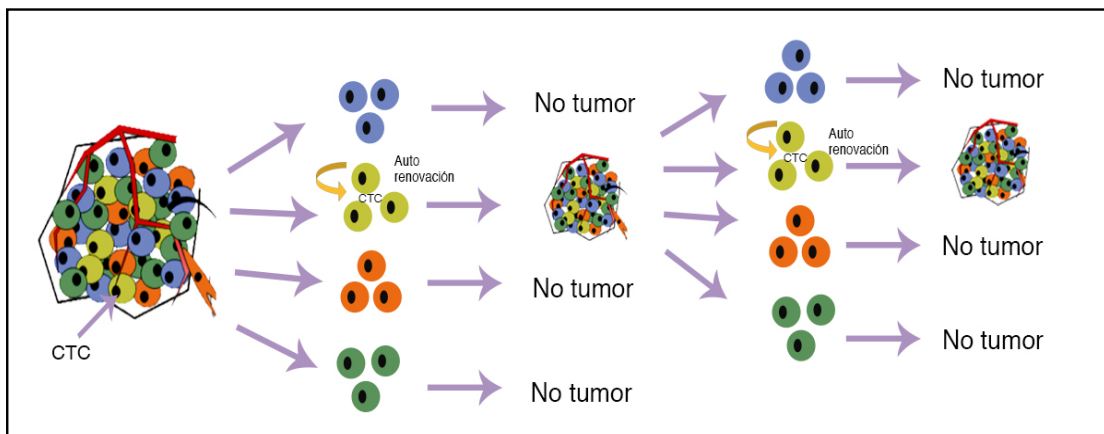


Figura 4. Características principales de las CTC. Las CTC tiene la capacidad de auto-renovarse y formar CTC con las mismas características o pueden “diferenciarse” en progenie fenotípicamente diversa que forma parte del tumor. Las CTC son las únicas capaces de formar un tumor en modelos in vivo.

Las primeras evidencias de la existencia de las CTCs provienen de los estudios realizados por John Dick en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda. Dick y colaboradores demostraron que dentro de la gran variedad de células leucémicas existe una población de células cancerosas que expresa las mismas proteínas de membrana que las células troncales hematopoyéticas. Estas células, identificadas por la expresión de la proteína membranal CD34 y la ausencia de CD38 fueron nombradas CTC debido a su semejanza con las células troncales normales. Los estudios de Dick y colaboradores demostraron que las CTC tienen la capacidad de auto-renovarse y de transferir la enfermedad cuando se inoculan en modelos murinos ^{30,31}.

Experimentalmente se ha comprobado que aun cuando sólo 100 células troncales son trasplantadas, estas pueden formar un tumor en ratones inmunodeficientes. Las CTC mantienen su capacidad de auto-renovarse después de que son trasplantadas serialmente y tienen la capacidad de recrear la heterogeneidad inicial del tumor del cual fueron obtenidas.

Actualmente se han identificado y aislado CTC de tumores de mama, cerebro, próstata, vejiga, colon, páncreas, ovario y piel ³². En cáncer de mama, se ha identificado una población de células troncales cancerosas que se caracterizan por expresar CD44, EPCAM y no expresan CD24 o expresan niveles muy bajos de esa proteína ³³.

El número de CTC no es constante en todos los tumores y se ha demostrado que el porcentaje de estas células es muy variable. Actualmente se ha reportado que el grado de agresividad y las características clínico-patológicas del cáncer de mama están en función del contenido de células troncales en el tumor ^{34,35}. En los tumores de tipo basal se detecta un gran porcentaje de células troncales, mientras que en los tumores de tipo luminal el porcentaje de CTC es menor al 5% ³⁶⁻³⁸. Estas diferencias en el porcentaje de CTC tal vez expliquen el comportamiento clínico de estos tumores.

3.5.- Características de CTC

Las CTC pueden identificarse gracias a sus características funcionales y fenotípicas que las distinguen del resto de las células del tumor (Figura 5):

- Expresan proteínas específicas de superficie celular. Generalmente estas proteínas son expresadas de manera heterogénea en los tumores y se emplea un panel de dos o tres marcadores para aislar una población más pura de CTC. En cáncer de mama se utilizan los marcadores CD44, CD24 y EpCAM^{33,39}.
- Poseen alta actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1). Estas enzimas detoxificantes son responsable de la oxidación de aldehídos intracelulares y proveen mecanismos de protección contra agentes tóxicos^{40,41}.
- Expresan marcadores de células troncales normales, algunos son factores de transcripción que se expresan principalmente en etapas embrionarias, los más comunes son SOX2, OCT4, NANOG, c-Kit y Nestina⁴².
- Las CTC tienen un fenotipo invasivo que les permite invadir el tejido adyacente, salir al torrente sanguíneo y establecer un nuevo tumor en órganos distantes⁴³.
- Son capaces de sobrevivir y formar colonias esféricas cuando son cultivadas en condiciones de baja adherencia^{32,44}.

- Tienen mecanismos más eficientes de expulsión de fármacos, como es la sobre-expresión de transportadores de membrana de tipo ABC⁴⁵.

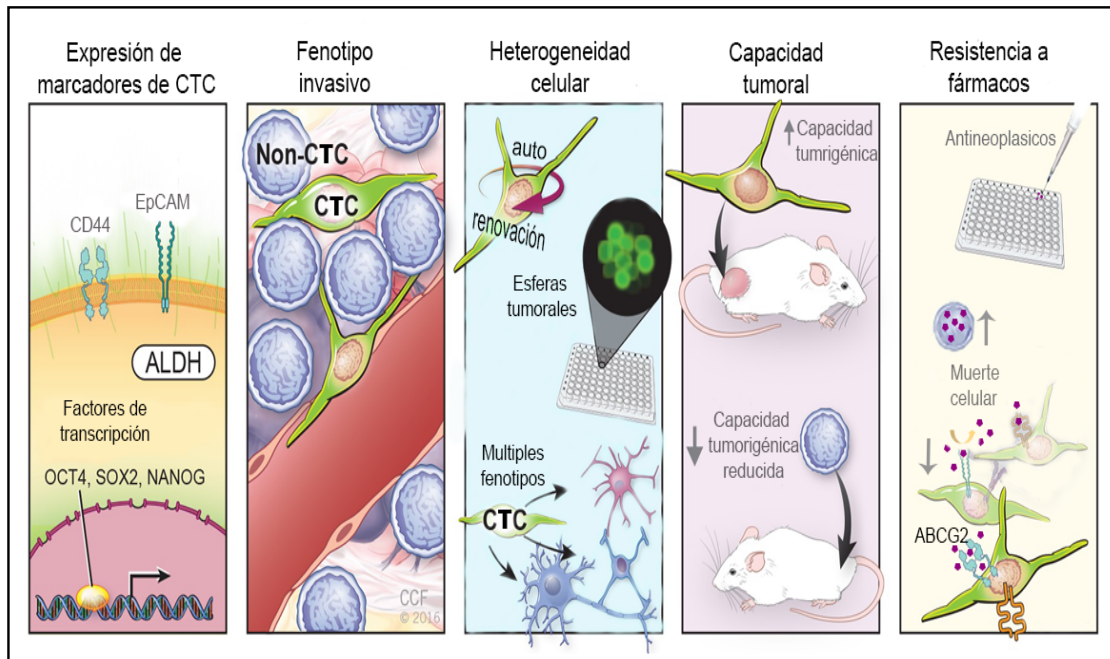


Figura 5.- Las CTC se distinguen del resto de las células del tumor (Non-CTC) porque presentan ciertas características fenotípicas y funcionales. Las CTC expresan marcadores de células troncales, tienen un fenotipo invasivo, pueden auto-renovarse o generar células con distintos fenotipos que forman parte de la heterogeneidad tumoral. Tienen mayor capacidad tumorigénica, pueden crecer en condiciones no adherentes y formar esferas tumorales y son resistentes a la mayoría de los antineoplásicos convencionales. Tomado y modificado de Thiagarajan et al⁴⁶

3.6.- Identificación de CTC

Gracias a sus características principales las CTC pueden distinguirse del resto de las células del tumor. Actualmente existen muchas estrategias para identificar y aislar células troncales de distintos tipos de tumores (Figura 6). La estrategia más común se basa en las características inmunofenotípicas de las CTC como son la expresión de ciertas proteínas de superficie celular. Algunos marcadores que han sido utilizados para aislar CTC de tumores sólidos son CD44, CD24, EpCAM, CD133, CD117, CD20, CD90, ABCB5, entre otros. Estos marcadores pueden variar

dependiendo del tejido y son expresados de manera heterogénea en los tumores. Generalmente se emplea un panel de dos o tres marcadores para aislar una población más pura de CTC, por ejemplo, en tumores de mama, se aíslan células con un fenotipo CD44+/CD24-/EpCAM+ ^{33,36} .

En muchos tumores, las CTC se caracterizan por tener actividad elevada de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1). Los miembros de la familia ALDH, son enzimas citosólicas que se encargan de la oxidación de aldehídos intracelulares y por ende protegen al organismo del daño inducido por aldehídos activos. Las CTC se han aislado mediante ensayos fluorométricos que permiten determinar la actividad de esta enzima. Generalmente se utiliza un aldehído fluorescente no tóxico (BAAA, BODIPY-aminoacetaldehyde), el cual entra a las células por difusión pasiva y en presencia de ALDH es convertido a BAA- (BODIPY-aminoacetate). Una vez convertido a BAA-, éste es incapaz de salir de la célula debido a su carga negativa y es posible identificar a las células que retienen el aldehído fluorescente (ALDH+) de las que no lo hacen (ALDH-). Diversos estudios han demostrado que las células con una actividad elevada de ALDH tienen una mayor capacidad de autorrenovación y son más eficientes para formar tumores que las células que carecen de esta enzima ^{41,47,48} .

Otra estrategia se basa en la tinción de las células con el colorante Hoechst 33342, lo que permite diferenciar a la población de células que expulsan el colorante de las células que lo retienen. Este fenómeno se debe al incremento en la expresión de proteínas de membrana de la familia ABC (ATP binding cassette, por sus siglas en inglés), las cuales expulsan una gran variedad de moléculas citotóxicas. A la población de células que expulsan el colorante se le denomina población lateral o “side population” y se considera que estas células son CTC capaces de autorenovarse y formar tumores en ratones inmunodeficientes ^{49,50} . Esta metodología ha sido extensamente utilizada para aislar CTC de muchos tipos de tumores. Sin embargo, la población lateral no es exclusiva de células troncales ya que también se ha descrito en varias células diferenciadas⁵¹ .

Actualmente también se han aislado poblaciones enriquecidas de CTC mediante estrategias basadas en métodos de cultivo celular, por ejemplo, la capacidad de formación de esferas⁵² o la resistencia a fármacos⁵³. Las CTC tienen la habilidad de crecer en forma de esferas cuando son cultivadas en condiciones independientes de anclaje. Estas condiciones de cultivo impiden que las células diferenciadas sobrevivan, ya que mueren por anoikis debido a la falta de adherencia⁵⁴. De manera que, las esferas están constituidas de poblaciones enriquecidas en CTC. En algunos tumores, esta estrategia es muy útil para aislar CTC debido a que no se conocen aún los marcadores de superficie que identifican a la población troncal.

Algunos investigadores han obtenido poblaciones enriquecidas de CTC por medio de la administración de fármacos antineoplásicos^{53,55}. Las células que sobreviven al tratamiento con los fármacos son en general células que tienen mecanismos más eficientes de expulsión de fármacos o de evasión de daño al DNA. Estas células generalmente poseen un fenotipo troncal, sin embargo, la quimioresistencia no es una propiedad estricta de las CTC y por tanto no es recomendable para aislar fidedignamente CTC.

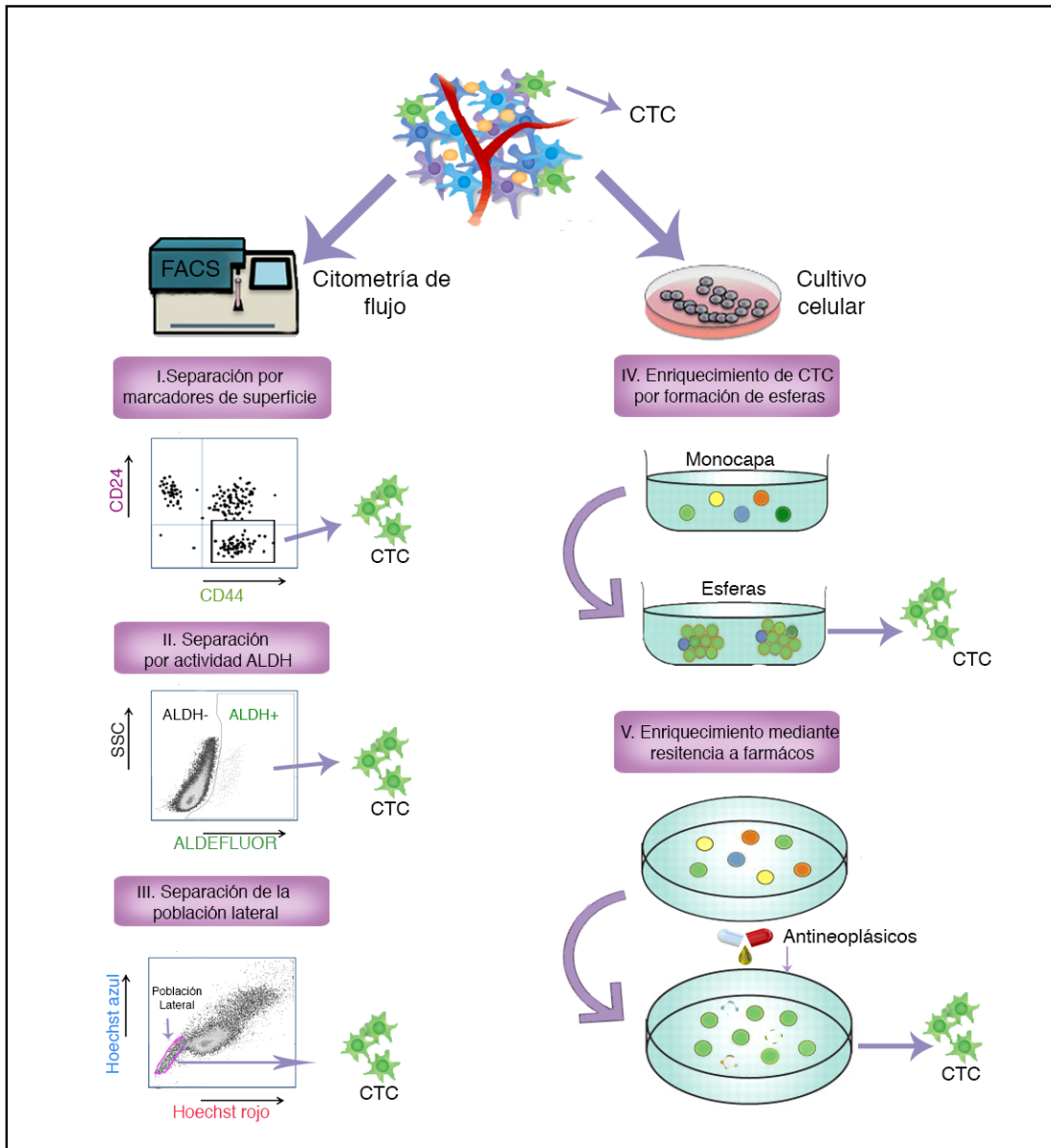


Figura 6.- Métodos de identificación de células troncales de cáncer. Las CTC generalmente se aíslan por medio de separación asistida por fluorescencia utilizando un citómetro de flujo o mediante técnicas de cultivo. Generalmente las células troncales se separan utilizando anticuerpos que reconocen proteínas de membrana que sólo se encuentran en la superficie de estas células. Otros métodos utilizan citometría de flujo para identificar y aislar la población de células que tienen una actividad elevada de la enzima ALDH1. Estudios recientes también han utilizado citometría de flujo para identificar y aislar la población de células troncales que excluyen el colorante Hoechst como un indicador de la expresión de bombas de tipo ABC en su membrana. Otros métodos menos sofisticados se basan en el uso de técnicas de cultivo celular que permiten seleccionar sólo aquellas células que son capaces de formar esferas cuando son cultivadas en condiciones de baja adherencia y/o que son resistentes a los antineoplásicos convencionales.

3.7.- La vía de señalización del Factor Nuclear Kappa B (NF-κB)

Las CTC son reguladas por vías de señalización que regulan el proceso de auto-renovación o diferenciación de estas células, entre ellas están la vía de Notch, Hedgehog, Wnt, PI-3K, Jak/STAT y NF-κB^{56,57}.

El factor de transcripción nuclear kappa B fue descubierto por primera vez como un regulador de la cadena ligera kappa de los linfocitos B⁵⁸. Actualmente, el término NF-κB es usado para nombrar a una familia de factores de transcripción que controlan la expresión de un gran número de genes relacionados con respuesta inmune, desarrollo, sobrevivencia, proliferación, angiogénesis, apoptosis, invasión y metástasis⁵⁹.

La familia de NF-κB comprende 5 factores de transcripción, RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p50/105) y NF-κB2 (p52/p100), los cuales pueden dimerizarse y formar homodímeros o heterodímeros. En conjunto, estos dímeros regulan la expresión de cientos de genes que codifican citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, factores de transcripción y muchos otros⁶⁰.

En general, todos los miembros de la familia NF-κB comparten en su extremo N-terminal un dominio de homología a Rel (DHR), el cual es responsable de la dimerización, la interacción con proteínas inhibitoras (IκBs), la translocación nuclear y la unión al DNA. A pesar de estas similitudes, los 5 miembros de la familia NF-κB difieren en su secuencia C-terminal y en el modo en que son sintetizadas.

Las proteínas RelA, RelB y c-Rel tienen en su extremo C-terminal un dominio necesario para la activación transcripcional (DAT) y son sintetizadas como proteínas maduras. A diferencia de éstas, las proteínas p50 y p52 carecen de un dominio de transactivación y son sintetizadas como proteínas precursoras nombradas p105 y p100 respectivamente. Las proteínas p105 y p100 contienen en su extremo C-terminal un dominio de repetidos de ankirina (DRA). La presencia de estos repetidos de ankirina en la secuencia de las proteínas p105 y p100 provoca que éstas

funcionen como una molécula inhibidora de la vía, de manera que estas proteínas tienen que ser parcialmente procesadas por el proteosoma para poder translocarse a núcleo y participar en la activación de sus genes blanco (Figura 7 y Figura 8).

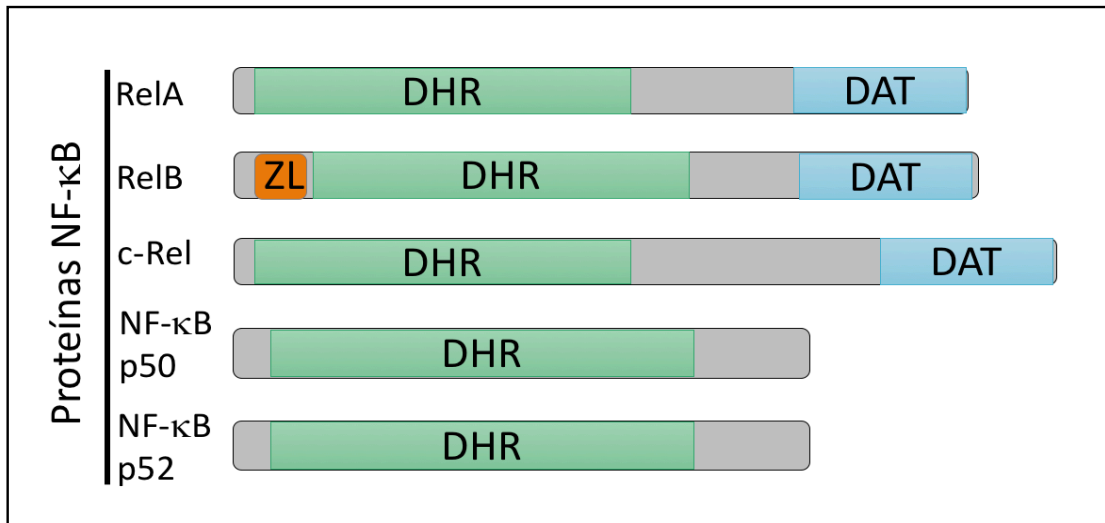


Figura 7. Representación esquemática de los miembros de la familia NF-κB. Los 5 miembros de la familia contienen un dominio de homología a Rel. Sin embargo, sólo RelA, RelB y c-Rel tienen un dominio de activación transcripcional. DHR: dominio de homología a Rel, DAT: dominio de activación transcripcional, ZL: zipper de leucina. Tomado y modificado de Perkins N et al ⁶¹.

Debido a que p50 y p52 no poseen un dominio de transactivación, estas proteínas por sí solas no pueden activar la transcripción génica. Por esta razón, para regular positivamente la transcripción es necesario que se formen heterodímeros que contengan por lo menos una proteína con un dominio DAT. De esta forma, se pueden generar diferentes dímeros de NF-κB que pueden ser expresados de manera tejido y estímulo específico, los dímeros con mayor importancia fisiológica son RelA:p50, cRel:p50 y RelB:p52 ⁶²⁻⁶⁴.

En la mayoría de las células, los dímeros de NF-κB se encuentran retenidos en el citoplasma por medio de una familia de proteínas inhibidoras de NF-κB (IκB). En general existen 5 tipos de proteínas inhibidoras (IκBα, IκBβ, IκBε, IκBζ, IκBNS, BCL3, p100 y p105) y cada una de ellas se asocia preferencialmente a un dímero específico de NF-κB ⁶⁵ (Figura 8). Estas proteínas se caracterizan por tener de 5 a

7 repetidos de ankirina en su secuencia, los cuales median la interacción con el dominio DHR y enmascaran la señal de localización nuclear de las proteínas NF- κ B. De esta forma, las proteínas NF- κ B son secuestradas en el citoplasma hasta que la vía es activada por diversos estímulos o señales que causan la degradación de los inhibidores I κ B y la subsecuente translocación de los dímeros a núcleo. Dentro del núcleo, los dímeros de NF- κ B se unen a un sitio consenso (κ B) dentro de las secuencias promotoras/potenciadores de sus genes blanco para regular su transcripción a través del reclutamiento de coactivadores y complejos remodeladores de cromatina ^{59,66}.

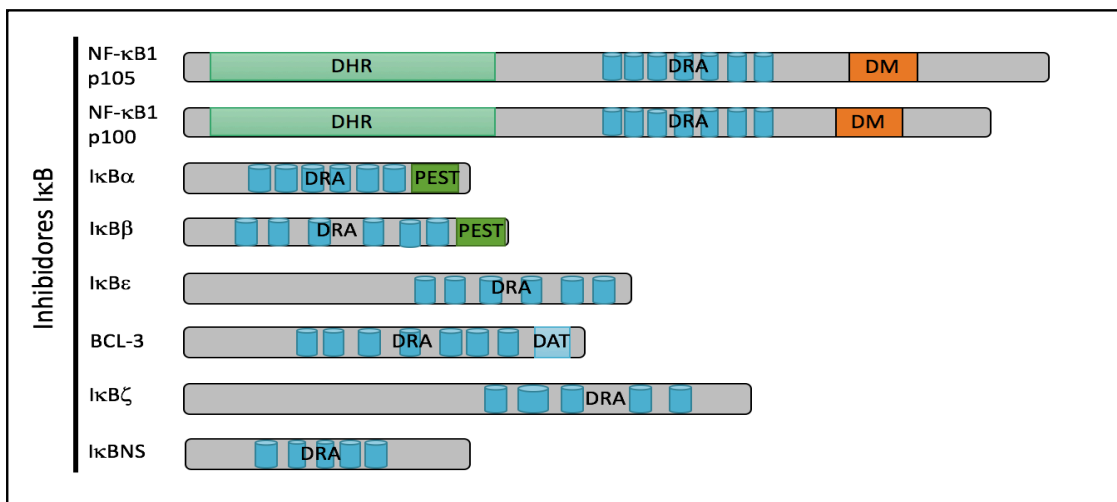


Figura 8. Representación esquemática de los inhibidores de NF- κ B. Los inhibidores de NF- κ B mantienen inactivos a los dímeros de NF- κ B. Estas moléculas tienen repetidos de ankirina que ocultan la señal de localización nuclear e impiden que los dímeros sean translocados al núcleo. Las proteínas p105 y p100 tienen también dominios de repetidos de ankirina en su extremo C-terminal, por lo que funcionan como inhibidores o como factores de transcripción. DHR: dominio de homología a Rel, DRA: dominio de repetidos de ankirina, DM: dominio de muerte, PEST: región rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina. Tomado y modificado de Perkins et al ⁶¹.

La activación de NF- κ B puede llevarse a cabo por dos vías principales, la vía canónica y la vía no canónica, ambas vías se basan en la fosforilación y degradación de una molécula inhibitoria de NF- κ B permitiendo así la liberación y translocación del heterodímero al núcleo. Las dos vías difieren en los estímulos y señales que las

activan, las moléculas inhibitorias que las regulan, los heterodímeros de NF- κ B y los genes blanco que regulan (Figura 9) ^{67,68}.

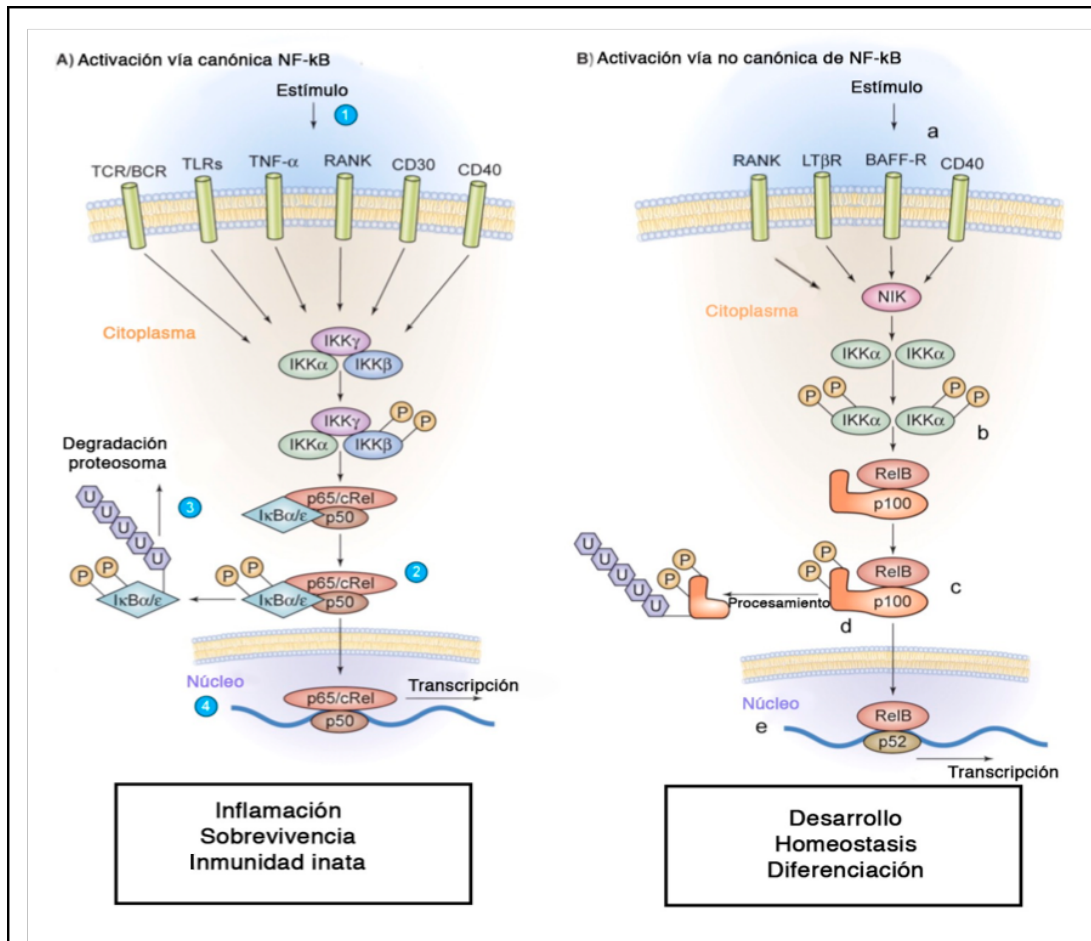


Figura 9. Principales vías de activación de NF- κ B. La vía canónica (izquierda) depende de la formación y activación del complejo IKK (IKK α , IKK β e IKK γ), el cual fosforila a las moléculas inhibitorias de NF- κ B (I κ B) provocando su ubiquitinación y degradación vía proteosoma. De esta forma se liberan los heterodímeros de NF- κ B y se translocan a núcleo para regular la transcripción de sus genes blanco. La vía no canónica (derecha) depende de la cinasa NIK, la cual fosforila a IKK α y promueve la degradación parcial del extremo carboxy-terminal de p100. Una vez procesado, los heterodímeros pueden translocarse a núcleo y favorecer la transcripción de sus genes blancos. Tomada y modificada de Philipp y Jürgen ⁶⁹.

La vía canónica es activada por un gran número de ligandos entre ellos IL1 β , TNF α , RANKL, CD30L, CD40L, LPS entre otros. La unión de estos ligandos a sus receptores provoca la activación de un complejo de cinasas llamado IKK, constituido

por IKK α , IKK β y la subunidad regulatoria IKK γ (NEMO). Este complejo provoca la fosforilación y degradación del inhibidor de NF- κ B (I κ B) lo cual permite que los heterodímeros p50/RelA se transloquen a núcleo, donde pueden unirse a sus secuencias blanco para controlar su transcripción ⁷⁰.

La vía no canónica responde a un número más limitado de estímulos, entre ellos el ligando LTBR, BAFF, CD40L y RANKL. Estos ligandos se unen a sus receptores y regulan procesos biológicos específicos a través de la vía no canónica de NF- κ B. La activación de esta vía se lleva a cabo únicamente a través de 4 receptores (LTBR, BAFFR, CD40 y RANK). LTBR (Lymphotoxin Beta Receptor) es un miembro de la familia TNFR que se expresa principalmente en células linfoides y regula el desarrollo y mantenimiento de órganos. BAFFR (B cell-activating factor receptor) se expresa predominantemente en las células B y ejerce una función importante en la sobrevivencia y maduración de células B periféricas. CD40 (cluster of differentiation 40) es un receptor de la familia TNFR que se expresa en varios tipos celulares y participa en procesos de diferenciación, proliferación y sobrevivencia. Finalmente, RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B) es conocido por su participación en el desarrollo y maduración de osteoclastos, pero también ejerce funciones importantes en la sobrevivencia y desarrollo.

Los receptores que activan la vía no canónica de NF- κ B poseen un dominio de unión a TRAFs, el cual recluta principalmente a TRAF2 y TRAF3 provocando la degradación de las moléculas TRAFs e induciendo la activación de NIK y la inducción de la vía no canónica.

Esta vía depende principalmente de la cinasa inductora de NF- κ B (NIK). NIK fosforila y activa al complejo IKK compuesto únicamente de dos subunidades de IKK α . Juntas IKK α y NIK fosforilan a la proteína precursora p100⁷¹, la cual funciona como un inhibidor de NF- κ B. La fosforilación de p100 provoca la proteólisis parcial de esta proteína y la liberación del heterodímero p52/RelB⁶⁷.

La vía canónica y no canónica de NF- κ B también difieren en las funciones biológicas que ejercen en las células. La vía canónica es una vía de respuesta rápida que se activa por un gran número de estímulos y está involucrada principalmente en procesos como inflamación, respuesta inmune y sobrevivencia. Por el contrario, la vía no canónica requiere de síntesis de nueva proteína y por tanto no responde rápidamente a los estímulos. La vía no canónica funciona principalmente en desarrollo y diferenciación.

3.8.- Cinasa Inductora de NF- κ B (NIK)

NIK es una proteína MAP cinasa codificada por el gen MAP3K14, el cual se localiza en la región q21.21 del cromosoma humano 17⁷². Inicialmente fue identificada como una cinasa que se une a TRAF2 y activa la vía de NF- κ B a través de la señalización de los receptores TNF e IL1⁷³. Actualmente se sabe que NIK principalmente media la señalización a través de otros receptores como CD40, CD27, BAFFR y LTBR.

En condiciones basales la cinasa NIK es continuamente degradada por el proteosoma. La estabilidad de esta proteína es regulada principalmente por TRAF3, TRAF2, cIAP1 y cIAP2. De manera continua NIK es reclutada por TRAF3 a un complejo formado por TRAF2 y las ubiquitin ligasas cIAP1 y cIAP2, las cuales son responsables de ubiquitinar a NIK para su posterior degradación por medio del proteosoma⁷⁴. Cuando se produce un estímulo, generalmente TRAF2 y TRAF3 son degradadas permitiendo la estabilización de NIK. De esta forma, la cinasa NIK puede realizar sus funciones río abajo participando en la fosforilación de IKK α e induciendo el procesamiento de p100.

De acuerdo a la secuencia y la función de esta cinasa, se han identificado 4 dominios diferentes: la región básica y la región rica en prolina localizadas en el extremo N-terminal, el dominio cinasa y el dominio C-terminal. La región C-terminal de NIK es responsable de la interacción de NIK con las proteínas IKK α y p100, así como con proteínas adaptadoras (TRAF 1, 2, 5 y 6). La región N terminal permite la interacción con TRAF3, proteína que regula la estabilidad de NIK a través del reclutamiento del complejo TRAF2/cIAP1/cIAP2. NIK también cuenta con secuencias de importación/exportación nuclear y señales de localización nucleolar, las cuales permiten la entrada o salida de NIK al núcleo⁷⁵ (Figura 10).

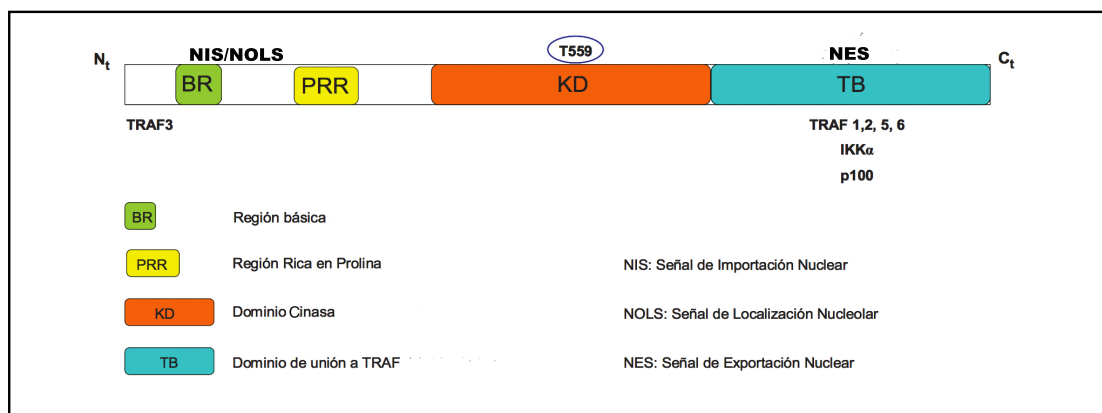


Figura 10. Esquema de los dominios identificados en la cinasa NIK, los cuales interactúan con sustratos y reguladores específicos de NIK. Tomado y modificado de Thu y Richmond 2010⁷⁶.

NIK es esencial para la activación de la vía no canónica de NF- κ B. Esta cinasa actúa fosforilando y activando a IKK α y participando en el procesamiento de p100⁷¹. Algunos estudios también han demostrado que NIK puede interactuar y fosforilar en menor grado a la cinasa IKK β y participar en la activación de la vía canónica. Sin embargo, la participación de NIK en la activación de esta vía sólo es requerida en respuesta a ciertos ligandos y en condiciones tejido-específicas. Posiblemente NIK juega un papel dinámico en la activación de NF- κ B coordinando el equilibrio entre la regulación canónica y no canónica de NF- κ B.

La cinasa NIK está involucrada en procesos como diferenciación celular, desarrollo y embriogénesis. Esta proteína desempeña un papel muy importante en el mantenimiento del estado pluripotente de las células embrionarias⁷⁷. Estudios en ratones con defectos en NIK y en la vía no canónica de NF- κ B muestran que la insuficiencia de NIK provoca anomalías en el desarrollo de la glándula mamaria⁷⁸⁻⁸⁰. Estos datos sugieren que NIK ejerce una función importante en la regulación del comportamiento de las células troncales.

Estudios recientes han demostrado que en cáncer de mama la expresión de NIK es más elevada que en tejido normal⁸¹. De manera interesante, NIK se expresa principalmente en cáncer de mama de tipo basal y su expresión conduce a la activación constitutiva de la vía de NF- κ B y a la proliferación de las células tumorales⁸². Si bien los niveles de NIK son diferentes entre los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama, la estabilidad del mensajero y la actividad del promotor son muy similares. Yamamoto et al, demostraron que la expresión de NIK es regulada por alteraciones epigenéticas causadas por la acetilación y metilación de la histona H3⁸³. En el subtipo luminal por ejemplo, la metilación y la desacetilación de la histona H3 crean una conformación de cromatina cerrada evitando así que NIK sea expresado. Cualquier alteración en este mecanismo de supresión produce un incremento en la expresión de NIK y por tanto un incremento en la actividad de NF- κ B.

Recientemente se ha demostrado la importancia clínica de NIK en un grupo de pacientes con cáncer de mama. En este estudio muestran que la expresión de NIK correlaciona positivamente con el desarrollo de metástasis a nodos linfáticos y con una disminución drástica de la tasa de supervivencia a 5 años⁸¹. En conjunto, estos datos sugieren que NIK puede afectar el pronóstico de los pacientes con cáncer de mama debido a la activación constitutiva de la vía de NF- κ B, la cual además confiere propiedades tumorigénicas a las células y participa en los procesos de iniciación y progresión del cáncer.

3.9.- Activación de NF- κ B en células troncales de cáncer de mama

La vía de señalización NF- κ B es una vía evolutivamente conservada que controla muchos procesos biológicos esenciales, recientemente se ha demostrado que la vía de NF- κ B también ejerce un papel muy importante en la auto-renovación y mantenimiento las células troncales (Figura 11).

Estudios recientes han demostrado que la vía de NF- κ B está activa en células troncales de diversas neoplasias incluyendo leucemias, glioblastomas, cáncer de próstata, ovario, páncreas, colon y mama ⁸⁴. En cáncer de mama, las células troncales caracterizadas por expresar altos niveles de CD44, EpCAM y bajos niveles de CD24, poseen una mayor actividad de NF- κ B que las células sin este fenotipo ⁸⁵⁻⁸⁷.

La actividad de NF- κ B en las CTC de mama, está directamente relacionada con la ausencia de la proteína CD24, un estudio reciente demostró que la expresión forzada de CD24 en las CTC (CD44+CD24-) de la línea celular MDA-MB-231, inhibe la señalización producida por NF- κ B, afectando la proliferación de las CTC. ⁸⁸. Estos resultados sugieren que la vía de NF- κ B está activa en la población de CTC que no expresa la proteína CD24.

Diversos estudios han demostrado que la supresión de la vía de NF- κ B afecta la auto-renovación y mantenimiento de la población troncal. Liu y colaboradores demostraron que la inhibición de la vía de NF- κ B mediante la expresión de una proteína súper represora (I κ B-SR, proteína carente de sitios de fosforilación para IKK), provoca una disminución en la proporción de CTC y afecta la formación de mamoesferas. Esto se debe en gran medida a la reducción de los niveles de expresión de dos factores de transcripción (SOX2 y NANOG) que regulan la población troncal en muchos tejidos ⁸⁹. Cao et al, demostraron que ratones con mutaciones en IKK α presentan un retraso en el desarrollo tumoral y las células

provenientes de esos tumores mostraron una reducción drástica en la formación de mamoesferas secundarias, sugiriendo que IKK α es muy importante para la auto-renovación de las CTC de mama⁹⁰. Apoyando estos resultados, un estudio muestra que la delección de IKK α en células epiteliales de la glándula mamaria, afecta la generación de tumores en un modelo de tumorigénesis inducido por un derivado de la progesterona. La activación de IKK α por el contrario provoca la proliferación celular mediada por ciclina D1 y la expansión de las células progenitoras luminales.^{91,92} De manera interesante, las células provenientes de tumores en ratones deficientes en un receptor activador de NF- κ B (RANK), son prácticamente incapaces de formar mamoesferas secundarias⁹¹. Por el contrario, la expresión exógena de RANK incrementa la población de células troncales de cáncer posiblemente debido a la inducción de la transición epitelio mesénquima⁹³, proceso por el cual las células adquieren un fenotipo similar al de las células troncales. La activación de la vía de NF- κ B también favorece un ambiente inflamatorio, el cual permite el mantenimiento de la población troncal. NF- κ B induce la expresión de muchas citocinas entre ellas IL-6 e IL-8, las cuales han sido asociadas con la población troncal.

El rol de NF- κ B en la regulación de las CTC es bien conocido, sin embargo, aún se desconoce cuál es la participación de ambas vías (canónica y no canónica) en el fenotipo troncal, que moléculas participan en su activación y los genes blancos que son transcritos en respuesta a la activación constitutiva de NF- κ B en CTC. Hasta el momento, la mayor parte de la investigación se ha enfocado en determinar la función de la vía canónica en la regulación de las CTC, pero, aún se sabe muy poco de la función de la vía no canónica.

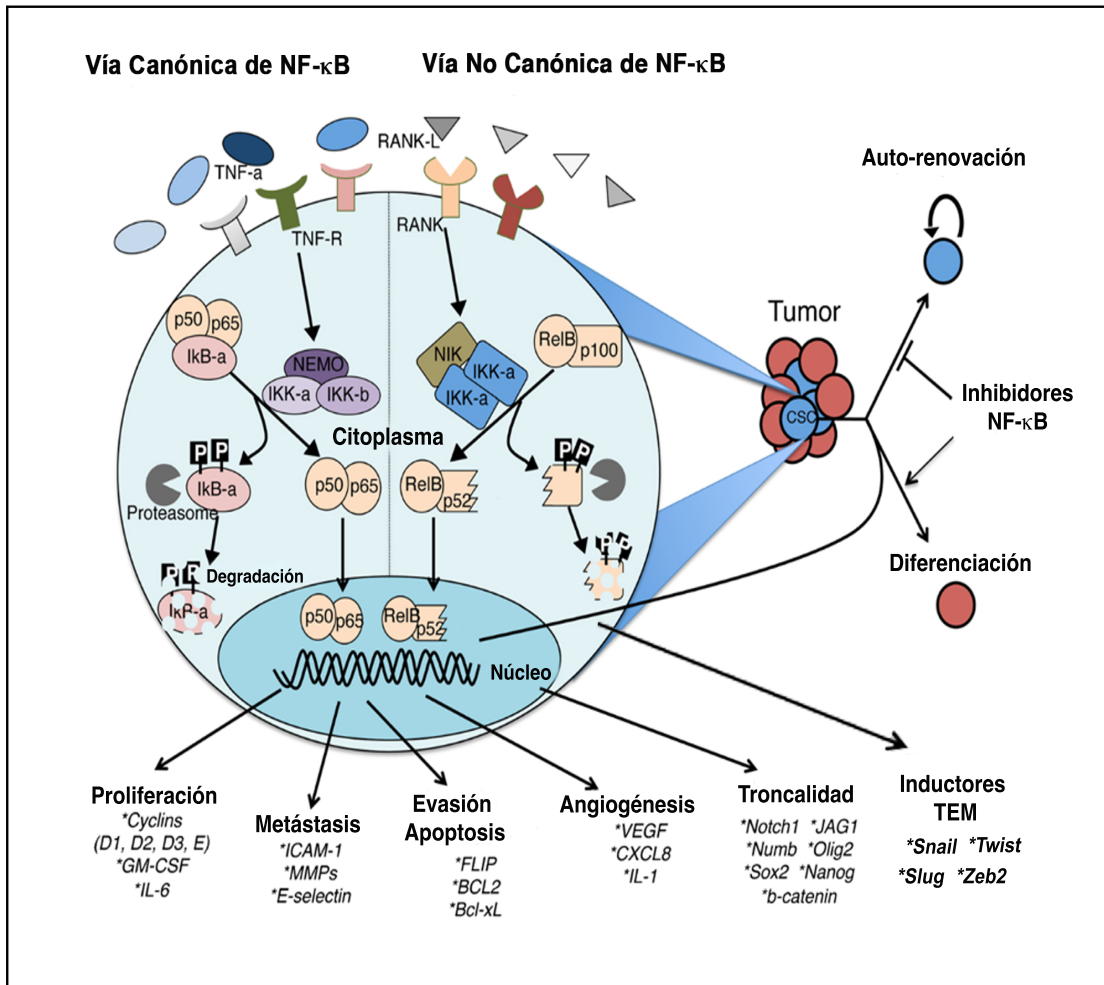


Figura 11. La vía de señalización NF-κB promueve la autorrenovación de las CTC e impide su diferenciación. Diversos reportes han indicado que ambas vías canónica y no canónica participan en la regulación de la población troncal. Es bien conocido que los genes expresados en respuesta a la activación de NF-κB participan en diversos procesos oncogénicos como proliferación, metástasis, evasión de apoptosis y angiogénesis. La activación de NF-κB también induce la expresión de genes involucrados en la adquisición del fenotipo troncal y la transición epitelio mesénquima (TEM). Tomada y modificada de Vázquez-Santillán et al ⁸⁴.

Evidencias recientes sugieren que NIK influye en el comportamiento de las células troncales. Esta cinasa actúa fosforilando a IKK α y favorece la expansión de la población troncal a través de la regulación negativa de p27⁹². Otros estudios han demostrado que NIK es esencial para la activación de la vía de Notch, la cual regula la expansión de CSC en cáncer de mama de tipo basal ⁹⁴. Aún se desconoce el

papel de NIK en la regulación de la población troncal en los tumores de cáncer de mama.

A pesar de los avances en el conocimiento de la función que ejerce la vía de NF- κ B en la regulación de la población troncal, aún es necesario determinar que moléculas son esenciales para la auto-renovación y mantenimiento de las CTC. Estos conocimientos permitirán en un futuro desarrollar terapias específicas que permitan eliminar a las células troncales de cáncer y aumentar la esperanza de vida de los pacientes con cáncer.

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células troncales cancerosas (CTC) desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento, progresión del tumor, metástasis y resistencia tumoral. Las CTC son molecularmente y funcionalmente distintas a las células del resto del tumor, la función de estas CTC es orquestada por varias vías de señalización que regulan su auto-renovación y/o diferenciación. Entre ellas, está la vía de NF- κ B, la cual desempeña funciones esenciales en las células troncales. Estudios recientes indican que las CTC dependen de la vía de NF- κ B para auto-renovarse. El papel de NF- κ B en las CTC de mama no ha sido completamente elucidado, aún se desconoce cuál es la vía de NF- κ B que está activa en CTC, cuales son las moléculas que participan en la activación de esta vía y los genes blanco que son transcritos en respuesta a la activación constitutiva de NF- κ B en CTC. La cinasa NIK desempeña un papel crucial en la activación de la vía no canónica de NF- κ B, estudios recientes han demostrado que NIK promueve la expansión de la población troncal al inducir la expresión de ciclina D1 y JAG1. Dada la relevancia de la vía no canónica de NF- κ B en la regulación de la población troncal, se propone evaluar la

expresión de NIK en CTC de mama y determinar cómo afecta la inhibición de NIK al fenotipo troncal.

5.- JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama sigue siendo un problema de interés en salud pública a nivel mundial. En México, esta enfermedad representa la neoplasia maligna con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina. A pesar de que actualmente existen tratamientos más eficaces para tratar de manera oportuna el cáncer de mama, las tasas de incidencia y mortalidad a causa de esta neoplasia siguen siendo muy elevadas. Esto es debido en parte a que las CTCs son resistentes a los tratamientos convencionales lo cual conduce eventualmente a la recurrencia y progresión de la enfermedad. La caracterización de las CTC es un paso clave en la investigación en cáncer, la evaluación de las vías de señalización que regulan el mantenimiento de la población troncal puede representar un avance importante en el conocimiento de los mecanismos que permiten su sobrevivencia y expansión. Los avances en el campo de las CTC, eventualmente permitirán el desarrollo de fármacos selectivos dirigidos a eliminar eficientemente a la población de CTC y brindar una oportunidad para erradicar la enfermedad.

El papel de la cinasa inductora NF- κ B (NIK) en la regulación de las células troncales cancerosas no ha sido completamente elucidado. Los mecanismos moleculares que permiten a la cinasa NIK regular el fenotipo troncal no han sido descritos aún. Esclarecer como funciona NIK en la regulación del fenotipo troncal puede sentar las bases para el uso de Inhibidores de NIK como herramientas terapéuticas que nos permitan eliminar la fracción de CTC.

6.- HIPÓTESIS

La cinasa NIK se expresa en las células troncales provenientes de líneas celulares de cáncer de mama y la regulación de los niveles de NIK afecta el potencial de autorenovación y mantenimiento de la población troncal.

7.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de NIK en células troncales de cáncer de mama y analizar el efecto de la modificación de los niveles de NIK en la regulación del fenotipo troncal.

7.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y caracterizar poblaciones de células troncales de cáncer en un panel de líneas celulares de cáncer de mama.
2. Evaluar la expresión de NIK en CTC aisladas de líneas celulares de cáncer de mama.
3. Evaluar el efecto de la inhibición de NIK en el fenotipo troncal de líneas celulares de cáncer de mama.
4. Analizar el efecto de la sobre-expresión de NIK en MCF7 en el fenotipo troncal.
- 5.- Determinar el efecto de NIK en el transcriptoma de la línea celular MCF7.

6.- Evaluar la expresión de NIK en muestras de pacientes mexicanas con cáncer de mama

8.- MATERIAL Y MÉTODO

8.1.- Cultivo celular

Las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3 se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA, EE.UU.; www.atcc.org). Las células MCF7 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, las células MDA-MB-231 se cultivaron en medio DMEM con 5% de SFB y las células SKBR3 se cultivaron en medio McCoy's 5A con 10% de SFB. Todas las líneas celulares se cultivaron en una atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO₂.

8.2.- Citometría de flujo y separación celular

Las células fueron separadas con Accutase (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se resuspendieron en un buffer de tinción (PBS con SFB 1%). En total, 1×10^6 células se incubaron con los anticuerpos fluorescentes CD44-FITC y CD24-PE durante 30 min en hielo. Las células MDA-MB-231 también fueron marcadas con ESA-APC durante 30 min. Como controles de tinción se utilizaron los isotipos IgG2a-PE, IgG2a-FITC y IgG2a-APC. Todos los anticuerpos fueron adquiridos de BD Biosciences (San Jose, CA, EE.UU.) Para la separación de células troncales, aproximadamente 1×10^8 células MCF7 fueron separadas en dos subpoblaciones celulares (CD44⁺/CD24^{-/low} y CD44⁻/CD24⁺). Las células MDA-MB-231 fueron separadas en CD44⁺/ESA⁺ y CD44⁻/ESA⁻. La separación celular se llevó a cabo en un citómetro FACSAria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Después de la separación, las células se cultivaron en medio suplementado con 1% de

penicilina/estreptomicina durante 24 horas antes de cualquier procedimiento adicional.

8.3.- Extracción de RNA

El RNA total se aisló utilizando TRIzol (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad del RNA fue analizado en geles de agarosa como se ha descrito previamente⁹⁵. Cada muestra de RNA fue cuantificada en el Nanodrop y se determinó la pureza del RNA mediante la relación 260/280nm.

8.4.- RT-PCR y PCR cuantitativa en tiempo real

Brevemente, 2 µg de RNA fueron retro-transcritos con el kit Maxime first strand cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). Las PCRs en tiempo real se realizaron en el equipo 7900HT (Applied Biosystems) o en el QuantStudio 7 (Applied Biosystems). La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl utilizando 10 ng de cDNA, 150 mM de cada primer y 10 µl del kit SYBR-select Master Mix (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa Primer 3 plus con base en los criterios descritos previamente⁹⁶, los oligos utilizados se muestran en el anexo 13.1. Las condiciones de PCR para los oligos que tienen Tms arriba de 60°C fueron las siguientes: 50°C por 2 min, 94°C por 2 min, 40 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Para los oligos con Tms por debajo de 60°C se utilizaron las siguientes condiciones: 50°C por 2 min, 94°C por 2 min, 40 ciclos a 95°C por 15 seg, 55-58°C por 15s y 72°C por 1 min. Al final de cada programa, se obtuvo la curva de disociación entre 70°C y 90°C. Los experimentos fueron realizados en triplicado. Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron con base en la expresión de TBP y las diferencias en los niveles de expresión se calcularon con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁹⁷.

8.5.- Extracción de proteínas

Las células adherentes fueron despegadas usando una espátula de silicón y se lavaron dos veces con un buffer de solución salina (PBS). Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm a 4°C. La pastilla de células se resuspendió en 500 µl de buffer RIPA (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, Nueva York, EE.UU.) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las proteínas de la fracción citosólica y nuclear fueron obtenidas con el kit Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Scientific, MA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

8.6.- Western Blot

Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y se transfirieron en membranas (PVDF) (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Las membranas se bloquearon con 5% de leche en buffer Tris salino con 0.1% Tween 20 (TBST) durante 2 hrs. Las membranas fueron incubadas a 4°C durante la noche con los anticuerpos correspondientes, posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón (Promega, Madison, WI, EE.UU.) o IgG anti-cabra (Zymax, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). El anticuerpo secundario se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en TBST. La unión del anticuerpo se detectó con el kit Western Immobilon (Millipore), y las imágenes se visualizaron con el sistema VersaDoc Imaging (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). Los anticuerpos utilizados fueron anti-NIK, anti-p52, anti-p65, anti-RelB, anti-tubulina, anti-Gapdh, anti-laminina, anti-ERK y anti-p50. La mayoría de los anticuerpos se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania). El anticuerpo p52 fue adquirido de Millipore y el anticuerpo de ERK de la marca Cell Signaling.

8.7.- Inhibición de NIK y ERK1/2 mediante shRNAs

Para abatir la expresión de NIK, se diseñaron tres shRNAs (1: CCGAGAGTCTTGATCAGAT, 2: GGCAACATCTTCATGGA y 3: GAGGAATACCTAGTGCAT,) con el programa RNAi Target Sequence Selector (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.). Los shRNAs fueron clonados en el vector

RQ-Psiren (Clontech) (Anexo 13.2). Un shRNA contra luciferasa fue utilizado como control. La eficiencia teórica de los siRNAs se determinó con el programa e-RANI⁹⁸. Para verificar la clonación del shRNA, el vector se digirió con la enzima Mlu1 y se analizó el cambio en la movilidad del producto de digestión en un gel de agarosa. El plásmido proveniente de las colonias bacterianas que fueron eficientemente digeridas con la enzima Mlu1 (Anexo 13.3) fueron utilizadas para los ensayos de transfección. Dos de los tres shRNAs fueron utilizados para experimentos posteriores, la secuencia de cada shRNA se muestra en el anexo 13.4. Las células MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3 se cultivaron a una confluencia de 70-80% y se transfectaron con 3 µg de plásmido en presencia de 7.5 µg de Lipofectamina 2000 (Life Technologies) en medio OptiMem. Para generar células estables, las células MCF7 se seleccionaron con 0.5 µg/ml de puomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), las células MDA-MB-231 se seleccionaron con 7.5 µg/ml de puomicina (Sigma-Aldrich) y las células SKBR3 se seleccionaron con 0.6 µg/ml durante 4 semanas. La inhibición de NIK se comprobó mediante RT-PCR. Para inhibir la expresión de ERK1/2, se diseñaron dos shRNAs para cada gen (ERK1: GGATCAGCTCAACCACATT y CCTCCAACCTGCTCATC; ERK2: CACCAACCATCGAGCAAAT y CAGCCAGGATACAGATCTT) y se clonaron en el vector pSIREN. Los plásmidos fueron transfectados de manera transitoria en las células MCF7 con 3 µg de plásmido en presencia de 7.5 µg de lipofectamina 2000.

8.8.- Inhibición de la vía de ERK

Para inhibir la vía de ERK1/2 se utilizó un inhibidor selectivo de ERK (FR180204, Tocris Biosciences) con la finalidad de explorar la función de ERK en el fenotipo troncal mediado por NIK. Las células MCF7 fueron tratadas con 30 µM de FR180204 durante 24 horas y las células control fueron tratadas con un volumen equivalente de DMSO. La inhibición de ERK fue verificada en un ensayo de *western blot*.

8.9.- Sobreexpresión de NIK

Para sobreexpresar a la cinasa NIK se generó un vector de expresión mediante la recombinación del vector pENTR221 (Life Technologies) que contiene el ORF de NIK con el vector pTREX-DEST30 (Life Technologies). El anexo 13.5 muestra el procedimiento realizado para la recombinación. La recombinación se verificó mediante la digestión del vector con las enzimas HindIII, EcoRV y MluI (Anexo 13.6). El anexo 13.7 muestra la secuencia de los dos vectores utilizados (LacZ y NIK), en la cual se observa que el vector pTrex-Gw30 contiene el ORF de LacZ (vector control) y el vector pTrex-DEST30 contiene el ORF del gen MAP3K14. Las células MCF7 fueron transfectadas con 4 μ g del vector de expresión (pT-Rex-NIK) en presencia de Lipofectamina 2000 (Life Technologies) durante 24 hrs. Las células se seleccionaron con 300 mg/ml de G418 (Gibco, Life Technologies) durante 4 semanas. Como control, las células MCF7 fueron transfectadas con 3 μ g de pTREX-lacZ. La sobreexpresión de NIK se corroboró mediante RT-PCR.

8.10.- Activación de NF-kappa B

Para evaluar el nivel de activación de NF- κ B, se transfectó la línea celular MCF7 con un vector que contiene al gen luciferasa bajo el control de un promotor responsivo a NF- κ B. Las células se seleccionaron con 300 mg/ml de G418 durante 4 semanas. Posteriormente, las células estables fueron transfectadas con 4 μ g de PT-Rex-NIK o PT-Rex-Lac y 1 μ g de pCMV-Sport-Gal (Life Technologies) utilizando Lipofectamina 2000. La actividad de la enzima luciferasa y beta-galactosidasa se determinó 48 horas después de la transfección utilizando el kit luciferasa Dual-Reporter (Promega) o el kit de detección luminiscente Beta-galactosidasa (Clontech) respectivamente.

8.11.- Inmunofluorescencia

Brevemente, 1×10^6 células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio y cultivadas durante 24 horas. Los cubreobjetos se lavaron con PBS, y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 20 min, y se permeabilizaron con 0.1% de Triton(Sigma-Aldrich) durante 30 min. Las

células se lavaron y se bloquearon con albúmina al 5% en PBS durante 1 h e inmediatamente se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron p52; p65; RelB; p50; NIK; fosfo-p65, fosfo-RelB y fosfo-p52. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo acoplado a Cy3 (Millipore). Finalmente, los cubreobjetos se lavaron y fueron montados en laminillas con medio de montaje Everbrite con DAPI (Biotium, Inc., Hayward, CA, EE.UU.) y se almacenaron a 4°C. El análisis de fluorescencia se realizó en un microscopio confocal (Zeiss LSM 510).

8.12.- Ensayos tumorigénicos in vivo

Para los ensayos tumorigénicos se inocularon 1000, 10000, 100,000 y 1,000,000 de células resuspendidas en 100 ml de PBS con 50% de Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.). Las células fueron inyectadas por vía subcutánea en ratones nu/nu hembras de 4-6 semanas. Los ratones fueron adquiridos y mantenidos en instalaciones de animales de la Universidad Autónoma Metropolitana, de acuerdo con las normas éticas del cuidado de animales aprobados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (aprobación # AUT-BC-0215-016). Los trasplantes se dejaron crecer durante 150 días. Después de este intervalo o cuando los tumores alcanzaron un volumen de 700 mm³, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical tratando de minimizar el sufrimiento. El tamaño del tumor se midió con un vernier y el volumen tumoral se calculó de la siguiente forma: volumen del tumor = (diámetro más largo) x (diámetro más corto²)/2. La frecuencia de CTC se determinó mediante el programa ELDA (extreme limited dilution assay, por sus siglas en inglés) ⁹⁹.

8.13.- Ensayos de formación de colonias

Para determinar la capacidad clonogénica, se realizaron ensayos de formación de colonias. Brevemente, 4000 células individuales se sembraron en medio DMEM con 0.3% de agarosa de bajo punto de fusión y 5% de SFB. Las células se sembraron

en placas de 12 pozos recubiertas con 0.5% de agarosa de bajo punto de fusión. Después de 40 días en cultivo, las colonias se tiñeron con 0.1% de cristal violeta y se contaron utilizando el software ImageJ.

8.14.- Ensayos de formación de Mamoesferas

Un total de 2.5×10^4 células individuales se sembraron en frascos de cultivo no adherentes. Las células se cultivaron en Mammocult (tecnologías StemCell) suplementado con 0.48 mg/ml de hidrocortisona y 4 mg/ml de heparina. Después de 7 días, las esferas se contaron y se disgregaron con tripsina hasta obtener células individuales. Estas células fueron sembradas nuevamente en frascos no adherentes y las esferas formadas fueron contadas después de siete días.

8.15.- Construcción de microarreglo de tejidos

Para evaluar la expresión de NIK en muestras de pacientes con cáncer de mama se utilizó un microarreglo de tejido construido previamente en el hospital de oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Para la construcción del microarreglo, un fragmento del tejido de 191 pacientes con cáncer de mama fue embebido en parafina. Una sección de 4mm de cada paciente se tiño con Hematoxilina y Eosina para seleccionar áreas morfológicamente representativas. Los tejidos seleccionados de cada muestra fueron perforados con una aguja de 1 mm y se transfirieron a un bloque de parafina receptor utilizando un Tissue Microarray ATA 100 Chemicon (Chemicon, Temecula, CA, EE.UU.). Posteriormente, secciones de 4 mm de este microarreglo de tejido se colocaron en portaobjetos con carga positiva (VWR Superfrost Plus).

8.16.- Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica fue realizada con anticuerpos dirigidos contra el receptor de estrógenos (Ventana, Roche, Estrasburgo, Francia), el receptor de progesterona (Ventana) y HER-2/neu (Ventana). Para colocalizar la proteína NIK y ALDH, se emplearon los anticuerpos anti-NIK (Santa Cruz Biotechnologies) y anti-ALDH (BD).

La inmunohistoquímica se realizó utilizando el kit de detección universal DAB UltraView (Ventana). Para ALDH se utilizó el kit de detección de fosfatasa alcalina Rosa (Ventana). Como cromógeno se empleó Diaminobencidina o Fast Red y se utilizó hematoxilina para teñir los núcleos. Todas las laminillas se procesaron en un procesador XT BenchMark Ventana (Ventana, Tucson, AZ, EE.UU.) y se montaron con resina sintética. Las laminillas fueron escaneadas en ScanScope CS2 (Aperio) y el análisis de imágenes se realizó en ImageJ. Dos observadores independientes revisaron las laminillas y estimaron el porcentaje de células tumorales con expresión de las proteínas de interés.

8.17.- Microarreglos de expresión

Para determinar los perfiles de expresión génica asociados a NIK, las células MCF7 se transfectaron con el shRNA de NIK, el shRNA de Luciferasa y el Vector de expresión pT-Rex-DEST30. El RNA total de las células se obtuvo 48 horas después de la transfección. Todas las muestras fueron tratadas con DNAsa 1 (Ambion). La integridad del RNA se evaluó con el Bioanalizador 2100 (Agilent) y sólo las muestras con un número de integridad (RIN) mayor a 9 fueron utilizados. Se utilizaron tres réplicas biológicas independientes las cuales fueron hibridadas en el arreglo Affymetrix Gen ST 2.0 en la unidad de microarreglos del INMEGEN. Los datos fueron depositados en la plataforma Gene Expression Omnibus (GSE63382).

8.19.- Análisis estadístico

Los datos de citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo (TreeStar, Ashland, Oregón, EE.UU.). El análisis densitométrico y el conteo de células se realizaron utilizando el software ImageJ. El análisis estadístico se realizó en GraphPad considerándose un nivel de significancia del 5%. La capacidad clonogénica y tumorigénica se compararon mediante la prueba t de Student no pareada de dos colas. Los análisis de NIK y la expresión de ALDH en pacientes con cáncer de mama se realizaron utilizando el software JMP. Para determinar diferencias significativas se utilizó análisis de varianza (ANOVA). El Análisis de

datos de microarreglos se realizó con el paquete de Bioconductor. Los datos crudos fueron normalizados con el método Robust Multi-array average (RMA) contenido en el paquete oligo. El paquete Limma R se utilizó para detectar genes expresados diferencialmente considerando conjuntos de datos replicados [74]. Los genes con una tasa de cambio de >1.8 o > -1.8 y una $p < 0.05$ se consideraron para su posterior análisis. El software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen, EE.UU.) fue utilizado para identificar las redes enriquecidas en los datos.

9.- RESULTADOS

9.1.- NIK se expresa preferencialmente en líneas celulares de cáncer de mama triple negativas

Con el objetivo de evaluar la expresión de NIK entre los diferentes subtipos moleculares, se utilizaron líneas celulares de cáncer de mama de tipo luminal, triple negativo y HER2. De acuerdo a nuestros resultados, las líneas luminales se caracterizan por expresar niveles muy bajos de NIK y las líneas triple negativas en general expresan niveles elevados de este gen (Figura 12). En comparación con las líneas luminales, la línea HER2+ también posee una mayor expresión de NIK. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por el grupo del Dr. Inoue, quienes demostraron que NIK se sobreexpresa principalmente en el subtipo triple negativo^{82,83}.

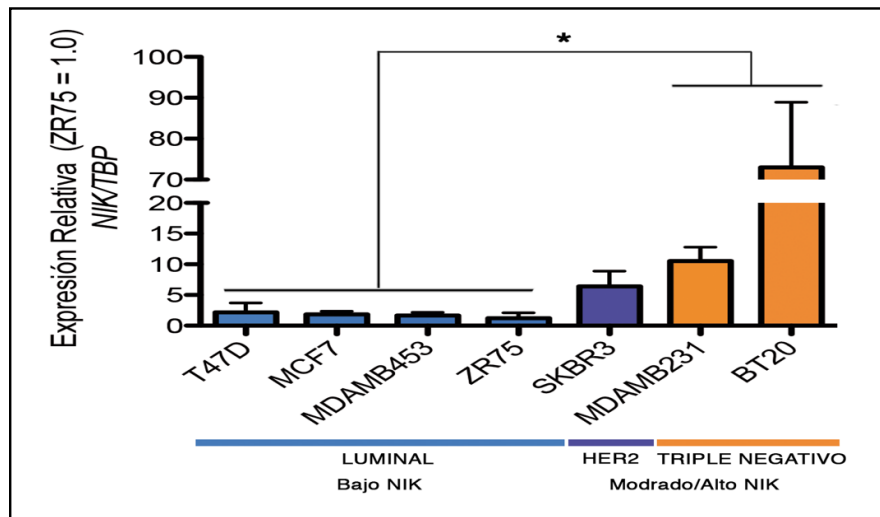


Figura 12. Expresión del gen MAP3K14 (NIK) en un panel de líneas celulares de cáncer de mama. El gen NIK es expresado en mayor medida en las líneas triple negativas en comparación con las líneas luminales (* $p > 0.05$). La expresión relativa de NIK se cuantificó mediante PCR en tiempo real y se normalizó con respecto al gen TBP (Tata binding protein). La gráfica de barras muestra la tasa de cambio respecto a la línea ZR75, la cual posee menor expresión de NIK. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

Estos resultados apoyan la idea que NIK se expresa diferencialmente en los distintos subtipos moleculares del cáncer de mama. Al igual que NIK, los marcadores troncales y el porcentaje de CTC también varían de acuerdo al subtipo molecular del cáncer de mama.

9.2.- Aislamiento de CTC de líneas celulares de cáncer de mama

Las células troncales de cáncer de mama se definen por la expresión elevada de CD44, EpCAM y por la baja o nula expresión de CD24³³. El número de CTC es muy variable en todos los tumores^{34,35}, actualmente se ha reportado que las líneas triple negativas contienen un gran número de CTCs mientras que las líneas de tipo luminal tienen un número limitado de CTCs^{94,100}. Nuestros resultados corroboran lo reportado anteriormente (Figura 13), de manera interesante, las líneas que

expresan niveles más elevados de NIK son las que tienen un mayor porcentaje de CTC.

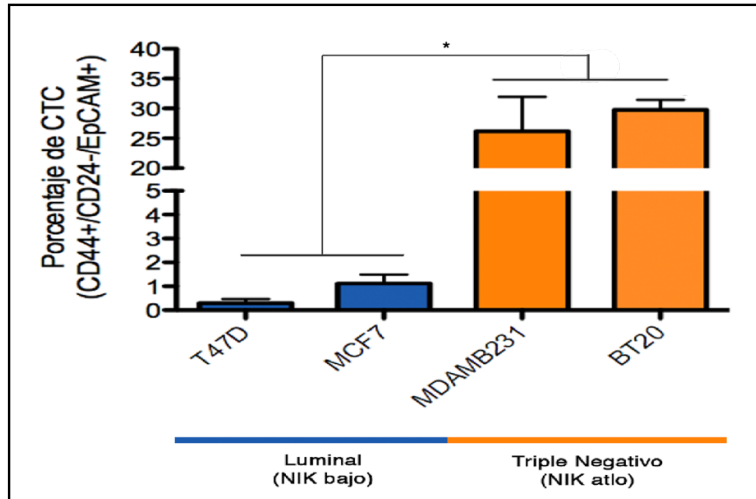


Figura 13. Porcentaje de células troncales de cáncer en las líneas luminales T47D, MCF7 y en las líneas triple negativas MDA-MB-231 y BT20. El porcentaje de CTC es mucho más elevado en las líneas MDA-MB-231 y BT20 (* $p < 0.05$). La gráfica de barras representa el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

La expresión de los marcadores troncales también varía dependiendo del subtipo molecular³⁵. Generalmente los tumores pertenecientes a los subtipos triple negativos (bajo en Claudina y basal) expresan altos niveles de CD44 y los subtipos luminales se caracterizan por expresar bajos niveles de CD44 y niveles elevados de CD24. En este proyecto se utilizó la línea MCF7 como representante del subtipo luminal y la línea MDA-MB-231 como representante del subtipo triple negativo. Corroborando lo reportado, nuestros resultados muestran que la mayoría de las células provenientes de la línea celular MDA-MB-231 expresan la proteína CD44 y el 100% de estas células expresan nulos o muy bajos niveles de la proteína CD24. Por el contrario, la mayoría de las células provenientes de la línea celular MCF7 expresan bajos niveles de CD44 y altos niveles de CD24 (Figura 14). La expresión de EpCAM también se analizó en ambas líneas celulares. La Figura 14 muestra que todas las células de la línea celular MCF7 expresan la proteína EpCAM, mientras que sólo el 20-30% de las células MDA-MB-231 expresan esta proteína.

De acuerdo a estos resultados se determinó que el enriquecimiento de las CTC en la línea celular MCF7 puede llevarse a cabo a partir de dos marcadores (CD44 y CD24) debido a que EpCAM se expresa en todas las células. En la línea MDA-MB-231 el aislamiento de CTC puede llevarse a cabo empleando los marcadores CD44 y EpCAM, debido a que todas las células provenientes de esta línea expresan bajos o nulos niveles de CD24.

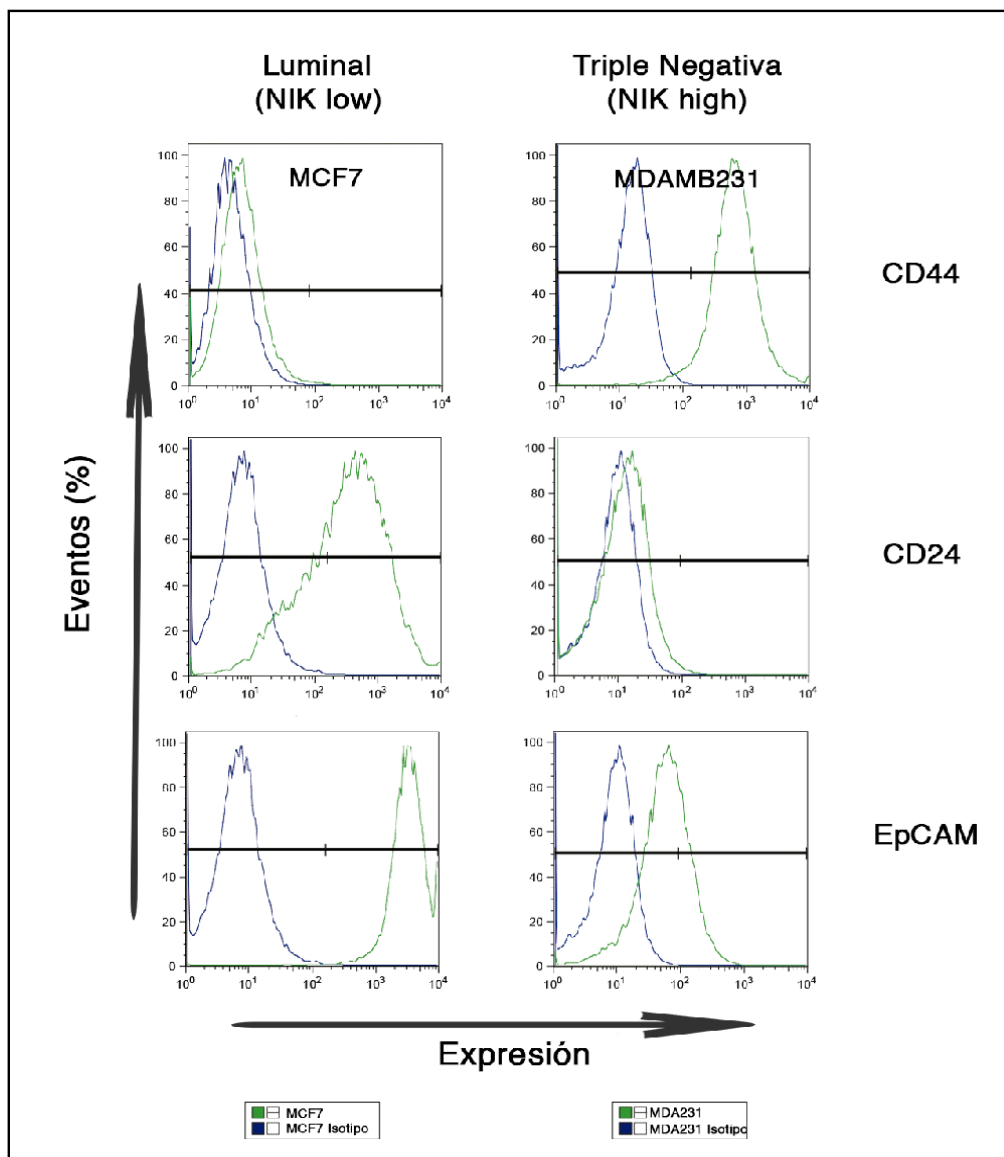


Figura 14. Expresión de CD44, CD24 y EpCAM en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. Los histogramas representan una imagen representativa de tres réplicas independientes. Las líneas verdes representan la expresión de CD44, CD24 o EpCAM y las líneas azules representan el control de isotipo para cada línea celular.

De acuerdo a estos marcadores, el contenido de CTC en la línea luminal MCF7 es muy bajo, aproximadamente menos del 1% de las células tienen el fenotipo troncal (CD44+/CD24-/bajo), en la línea celular MDA-MB-231 por el contrario, aproximadamente más del 30% de las células tienen el fenotipo CD44+/EpCAM+ (Figura 15).

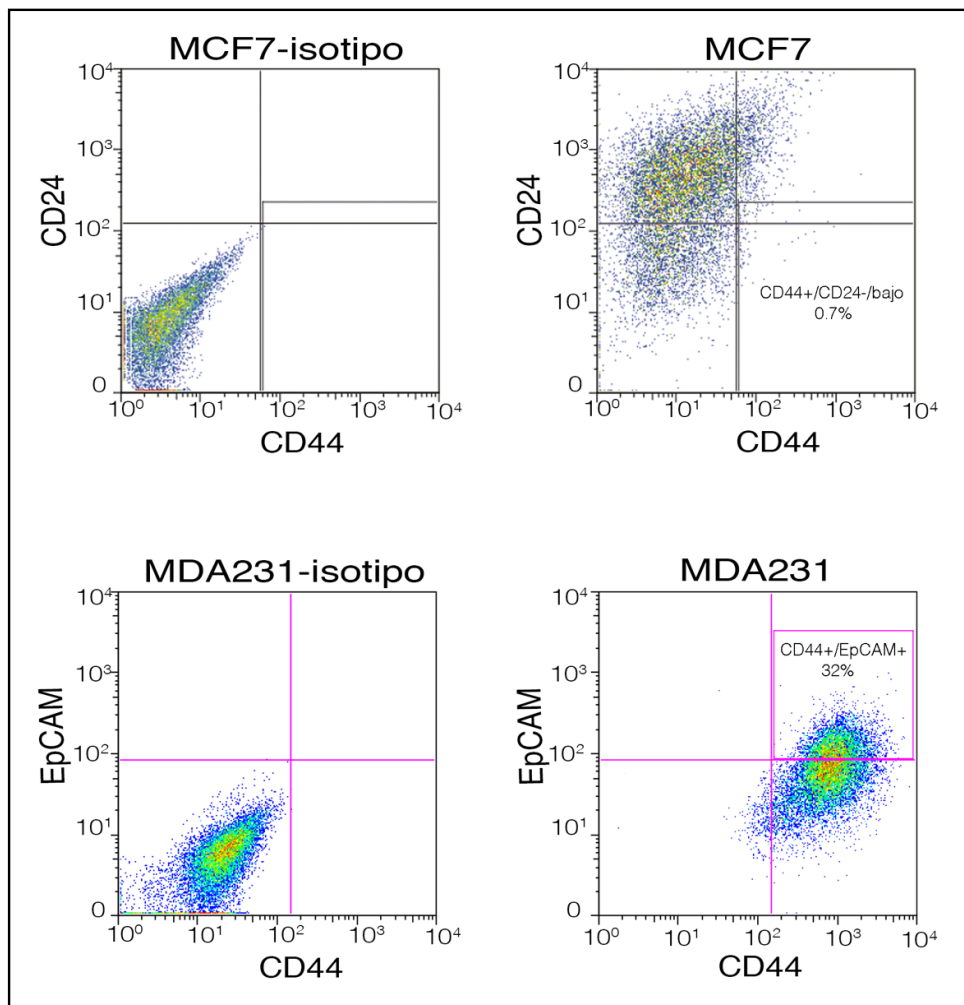


Figura 15. Separación de CTC asistida por fluorescencia utilizando anticuerpos que reconocen a CD44 (FITC), CD24 (PE) o EpCAM (APC). Para la línea celular MCF7 se aislaron CTC con el fenotipo CD44+/CD24-/bajo y células no troncales CD44-/CD24+. Para la línea MDA-MB-231 se aislaron CTC con el fenotipo CD44+/EpCAM+ y CD44-/EpCAM-. Los diagramas de la izquierda muestran los controles de isotipo (IgG-FITC, IgG-PE o IgG-APC) para cada línea. La proporción de CTC en la línea luminal es del 0.7% y en la línea triple negativa es del 32%.

9.3.- Caracterización de CTC de la línea MCF7 y MDA-MB-231

Las CTC tienen la capacidad de autorrenovarse para promover el desarrollo y la progresión tumoral. Para validar el enriquecimiento de las CTC se realizaron diferentes pruebas que determinan el potencial troncal. Para verificar el potencial tumorigénico de las CTC, se inyectaron células con el fenotipo troncal y células cancerosas no troncales en ratones inmunodeficientes nu/nu. Las células MCF7 con el fenotipo CD44+/CD24- se compararon con las células CD44-/CD24+. Después de 120 días, todos los ratones inoculados con CTC de la línea MCF7 desarrollaron tumores visibles, a diferencia de las células sin el fenotipo troncal (Tabla 1). Con respecto a la línea MDA-MB-231, las células con el fenotipo troncal CD44+/EpCAM+ fueron capaces de formar tumores dentro de los 90 días, mientras que la mayoría de los ratones inoculados sin el fenotipo troncal no formaron tumores (Tabla 1).

Subpoblación	Número de células	Tumores formados
MCF7 CD44+/CD24-	1x10 ⁵ células	3/3
MCF7 CD44-/CD24+	1x10 ⁵ células	0/3
MDA-MB-231 CD44+/EpCAM+	1x10 ⁵ células	3/3
MDA-MB-231 CD44-/EpCAM+	1x10 ⁵ células	1/3

Tabla 1. Número de tumores formados por CTC en la línea celular MCF7 y MDA-MB-231.

Para verificar su potencial clonogénico, las células troncales y no troncales aisladas de la línea celular MCF7 se sembraron en placas de agar suave. El número de colonias formadas por las CTC (CD44+/CD24-) fue significativamente mayor que

las colonias formados por las células no troncales (818 vs. 236 colonias) (Figura 16A). El potencial clonogénico de las CTC de la línea MDA-MB-231 se evaluó en ensayos de dilución limitada. Los resultados muestran que las células EpCAM+ son más clonogénicas que las células EpCAM- (6 vs. 2 colonias) cuando son sembradas a baja densidad celular (Figura. 16B).

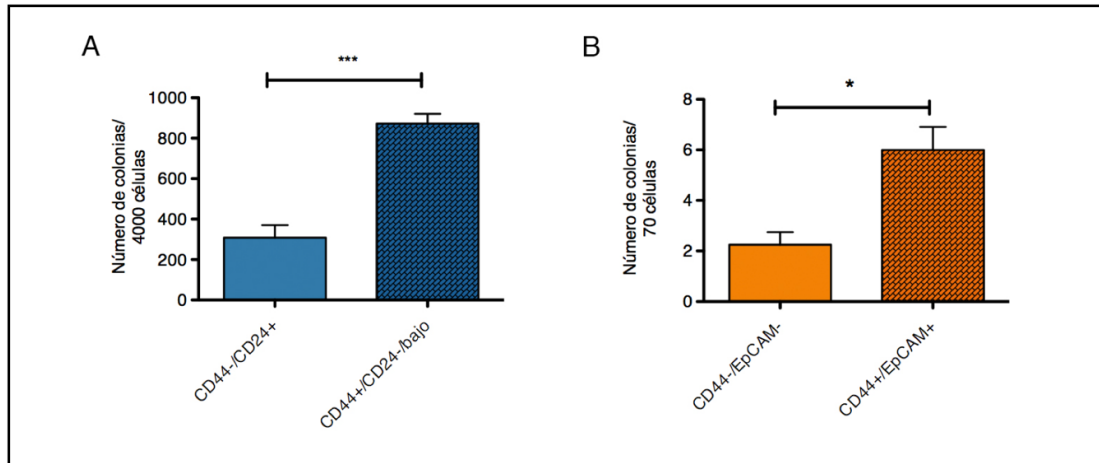


Figura 16. Formación de colonias en agar suave Potencial clonogénico de células troncales cancerosas. A) Las células troncales (CD44+/CD24-/bajo) aisladas de la línea celular MCF7 forman más colonias que las células no troncales. B) Las células troncales (EpCAM+) aisladas de la línea celular MDA-MB-231 tienen un mayor potencial clonogénico que las células no troncales. La gráfica de barras representa el promedio 3 réplicas biológicas, *p<0.05.

Las CTC expresan altos niveles de marcadores de pluripotencia o troncalidad, los cuales contribuyen en gran medida a sus propiedades de auto-renovación^{41,101}. La expresión de marcadores de pluripotencia fue comparada entre la fracción troncal y no troncal con la finalidad de verificar el enriquecimiento de las CTC.

Como se esperaba, las células troncales de la línea MCF7 expresaron niveles más altos de los transcritos NANOG (24 veces más), ALDH1A1 (15 veces más), OCT4 (18 veces más), ALDH1A3 (5 veces más) y ALDH8A1 (17 veces) en comparación con la población no troncal (Figura 17A). Los niveles de expresión de SOX2 en las células troncales fueron muy similares a la expresión de SOX2 en las células MCF7 no troncales. En la línea celular MDA-MB-231, las CTC también expresaron niveles más altos de algunos marcadores de células troncales,

incluyendo NANOG (3 veces más), OCT4 (2.5 veces más), SOX2 (8 veces más) y ALDH8A1 (2.5 veces más), en comparación con células sin el fenotipo troncal (Figura 17B).

Todos estos resultados demuestran que la fracción CD44+/CD24- representa una población enriquecida de CTC en la línea MCF7, y la fracción CD44+/EpCAM+ es una población enriquecida de CTC en la línea MDA-MB-231.

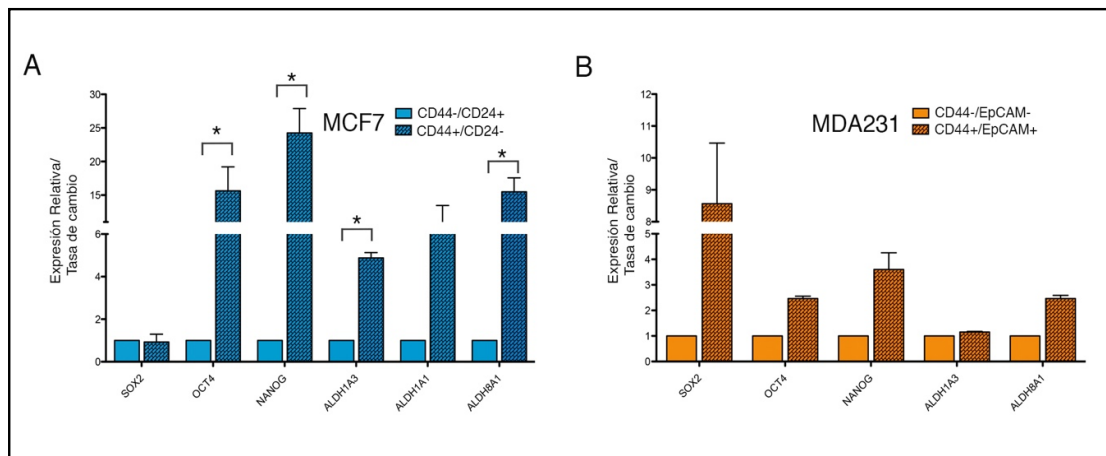


Figura 17.- Perfil de expresión de genes de pluripotencia en la fracción de CTC de la línea MCF7 (A) y la línea MDA-MB-231 (B). Las gráficas muestran la tasa de cambio de los marcadores en las CTC respecto a la expresión de la fracción no troncal. Los datos fueron normalizados utilizando TBP (tata binding protein) como gen de referencia. Las gráficas representan tres ensayos independientes, *p<0.05.

9.4.- Las CTC de cáncer de mama expresan niveles más altos de NIK

De manera interesante, la cinasa NIK (Cinasa Inductora de la vía NF-κB) se sobreexpresó principalmente en líneas celulares caracterizadas por su alto contenido de CTC. Con la finalidad de determinar si NIK está relacionada con el fenotipo troncal, se analizó la expresión de NIK en CTC aisladas de la línea celular MCF7 y MDA-MB-231. La Figura 18 muestra que la fracción troncal proveniente de ambas líneas celulares expresa niveles más altos de NIK en comparación con la población de células no troncales (Figura 18).

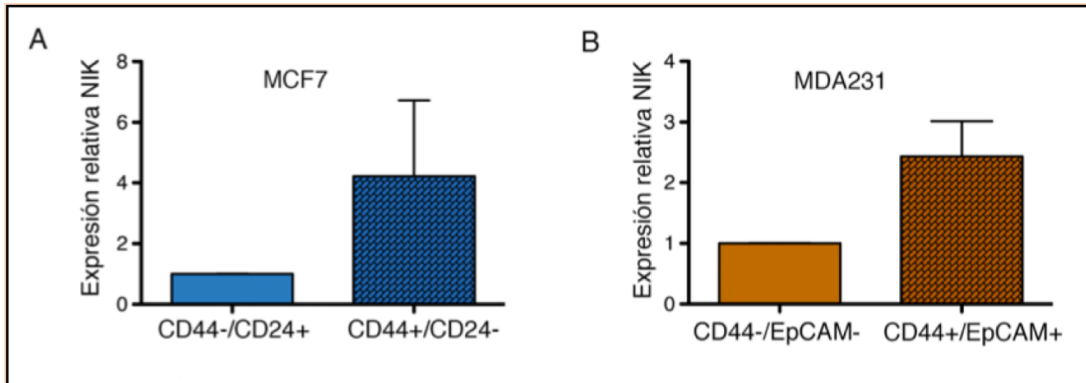


Figura 18. Expresión de NIK en CTC de la línea MCF7(A) y MDA-MB-231 (B). Las gráficas representan la tasa de cambio en la expresión de NIK entre la fracción troncal y no troncal. Los datos se normalizaron utilizando TBP como gen de referencia. La gráfica muestra tres ensayos independientes.

Notablemente, las CTC también expresan niveles más altos de p52 y RelB (Figura 19), las cuales forman parte de la familia no canónica de NF- κ B. Estos resultados sugieren que la vía no canónica de NF- κ B inducida por NIK, regula el fenotipo troncal en la línea MCF7.

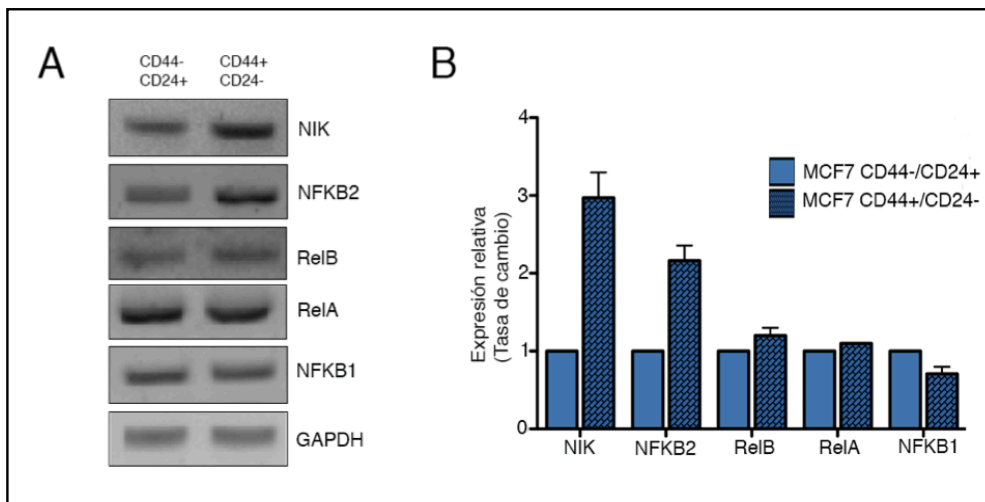


Figura 19. (A) Análisis de la expresión de NIK, NF- κ B2 (p100/p52), RelB, RelA y NF- κ B1 (p105/p50) mediante PCR en tiempo final en CTC de la línea celular MCF7. (B) La gráfica muestra la cuantificación relativa de dos ensayos independientes realizada mediante densitometría.

9.5.- La inhibición de NIK reduce la población de CTC y afecta la expresión de marcadores de troncalidad

Para explorar el efecto de NIK en el fenotipo troncal, se generaron células estables con 2 shRNAs dirigidos contra el mensajero de NIK. Como control se utilizó una línea celular estable transfectada con un shRNA dirigido contra el mensajero de luciferasa. Ambos shRNA de NIK reducen de manera significativa la expresión de NIK en la línea celular SKBR3 y el shNIK2 lo hace en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, (Figura 20). En todas las líneas el shNIK2 inhibe en mayor medida la expresión de NIK.

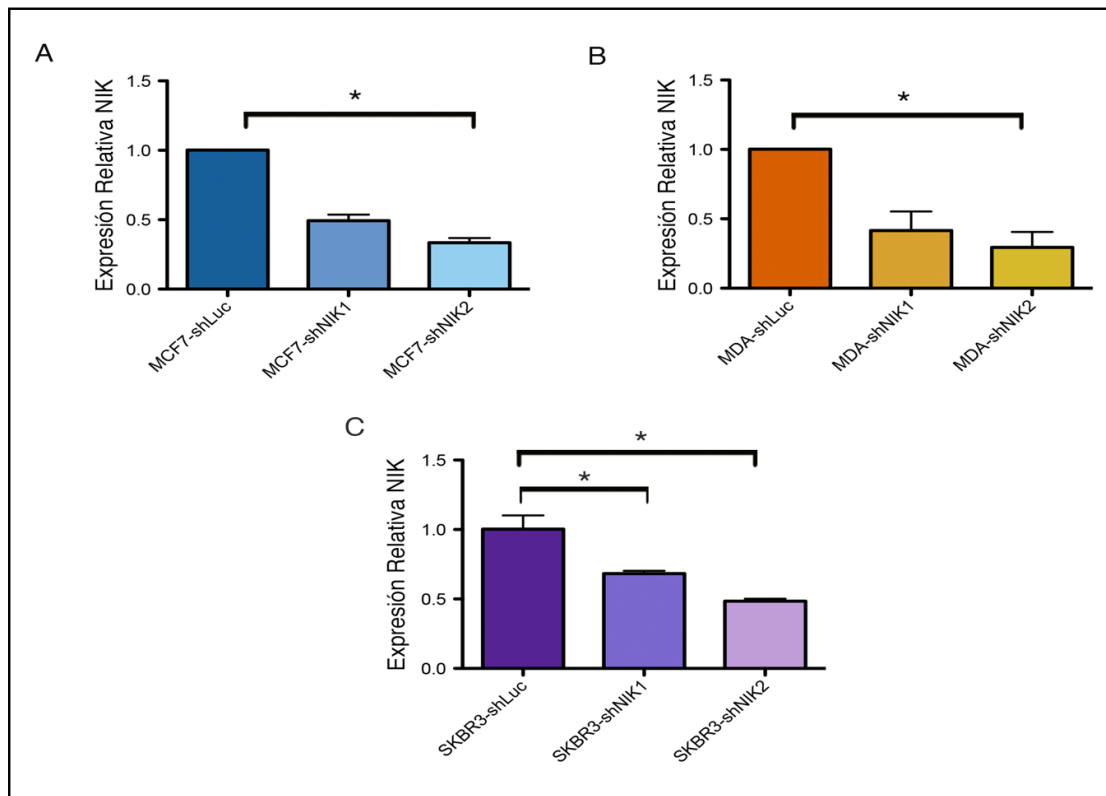


Figura 20. Inhibición de NIK mediante shRNAs. Las líneas MCF7 (A), MDA-MB-231(B) y SKBR3(C) fueron transfectadas con dos shRNAs dirigidos contra NIK. Como control se utilizó un shRNA dirigido contra Luciferasa. La gráfica muestra la tasa de cambio en la expresión de NIK entre las células control y las células transfectadas con los shNIK. Los datos fueron normalizados con la expresión del gen de referencia TBP y las gráficas representan 3 experimentos independientes *p<0.05.

La inhibición de NIK en las tres líneas celulares provoca una disminución en la expresión de los marcadores troncales. En MCF7, la deficiencia de NIK ocasionada por el shNIK2 redujo la expresión de SOX2 (94%), OCT4 (59%), NANOG (40%) ALDH1A3 (48%) y ALDH8A1 (39%) (Figura 21A). En apoyo de estos resultados, la inhibición de NIK ocasionada por el shNIK2 en células MDA-MB-231 también redujo la expresión de SOX2 (93%), ALDH1A3 (49%) y ALDH8A1 (52%) (Figura 21B). La inhibición de NIK en la línea SKBR3 también disminuyó la expresión de OCT4 (58%), SOX2 (73%) y ALDH1A3 (41%) (Figura 21C). En general se obtuvieron resultados similares empleando el otro shRNA contra NIK en las 3 líneas celulares.

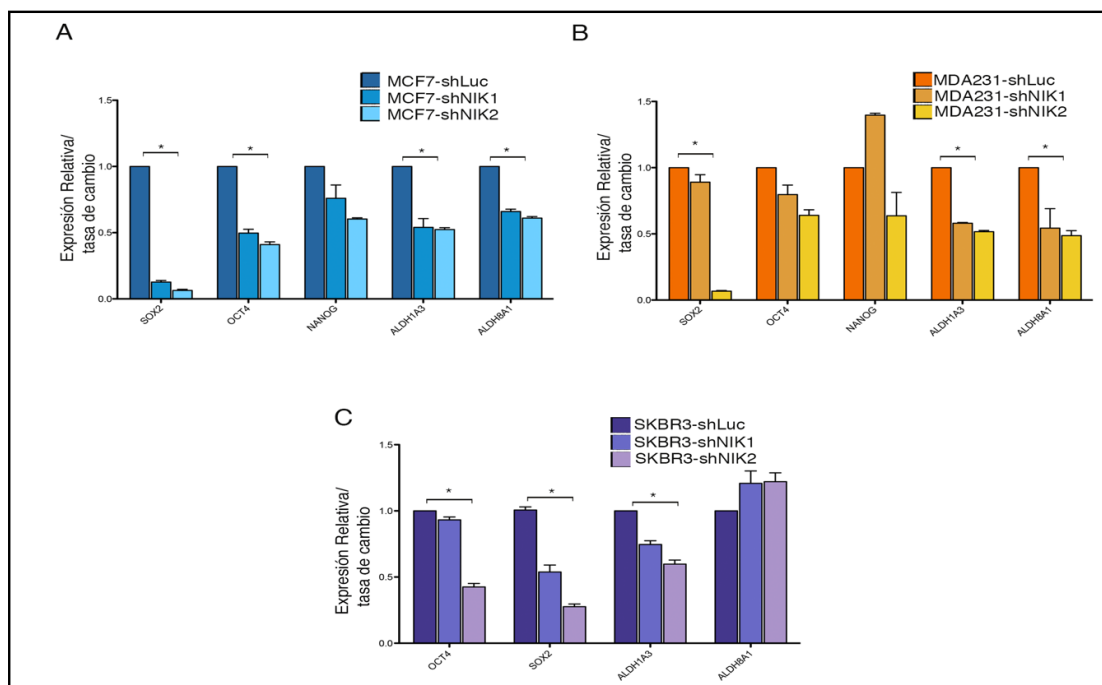


Figura 21.- Efecto de la Inhibición de NIK en la expresión de marcadores de CTC mediante PCR en tiempo real. Las gráficas muestran que la inhibición de NIK afecta la expresión de marcadores troncales en la línea MCF7 (A), en la línea MDA-MB-231 (B) y en la línea SKBR3 (C). Los datos se normalizaron usando TBP como gen de referencia. Las gráficas muestran tres réplicas biológicas independientes. El nivel de expresión génica en las células shLuc se designó como 1 y se reportó la tasa de cambio en la expresión génica en las células shNIK1 y shNIK2.

La expresión de las proteínas de superficie celular también se modificó debido a la inhibición NIK (Figura 22). En la línea celular MCF7, la inhibición NIK provocó un

aumento del 10% en la proporción de células que expresan CD24 (Figura 22B). Por el contrario, la inhibición de NIK provocó una ligera reducción en los niveles de CD44 en comparación con las células control (Figura 22A). De manera interesante, la población troncal se redujo en un 60% en la línea con deficiencia de NIK ocasionada por el shNIK2 (Figura 22C).

Apoyando estos resultados, encontramos que la inhibición de NIK también disminuyó la subpoblación de células positivas a CD44 (Figura 22D) y EpCAM (Figura 22E) en la línea celular MDA-MB-231. De manera interesante, la línea celular deficiente de NIK (shNIK2) mostró una reducción del 79% de las células troncales (Figura 22F).

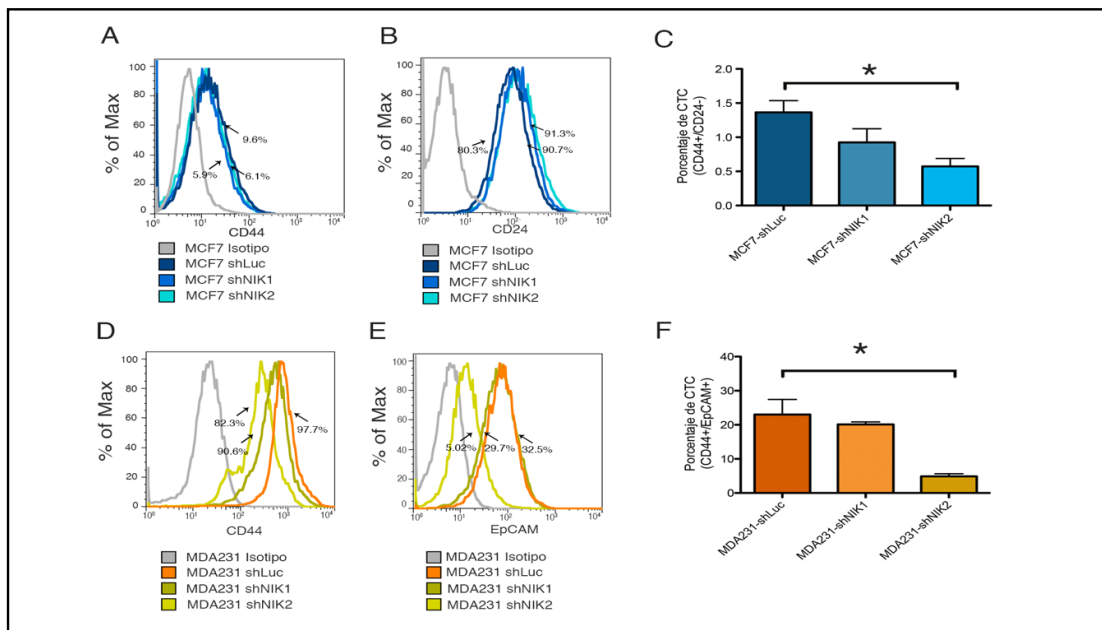


Figura 22.- Efecto de la inhibición de NIK en el fenotipo troncal. Análisis de citometría de flujo de los marcadores de superficie CD44 (A, D), CD24 (B) y EpCAM (C) en células MCF7 y MDA-MB-231 con deficiencia en NIK. Las imágenes muestran un ejemplo representativo de 3 réplicas independientes. Proporción de CTC en células MCF7 (C) y MDA-MB-231 (F) deficientes en NIK. Las gráficas muestran el porcentaje de CTC de tres réplicas independientes, *p<0.05.

9.6.- La inhibición de NIK impacta el potencial clonogénico y tumorigénico de las líneas celulares de cáncer de mama.

Los resultados muestran que NIK se asocia con la expresión de marcadores de células troncales. Para determinar la relevancia de NIK en el fenotipo troncal se realizaron ensayos clonogénicos y tumorigénicos. La figura 23A muestra que las células MCF7 con NIK inhibido forman significativamente menos colonias que las células control. El potencial clonogénico de las células MDA-MB-231 con NIK inhibido se analizó con ensayos de dilución limitante. La deficiencia de NIK ocasiona una reducción del potencial clonogénico de la línea MDA-MB-231 (Figura 23B). Notablemente, los dos shRNAs dirigidos contra NIK ejercen el mismo efecto en el potencial clonogénico de las células. Estos resultados indican que la deficiencia de NIK deteriora el potencial clonogénico de las células de cáncer de mama.

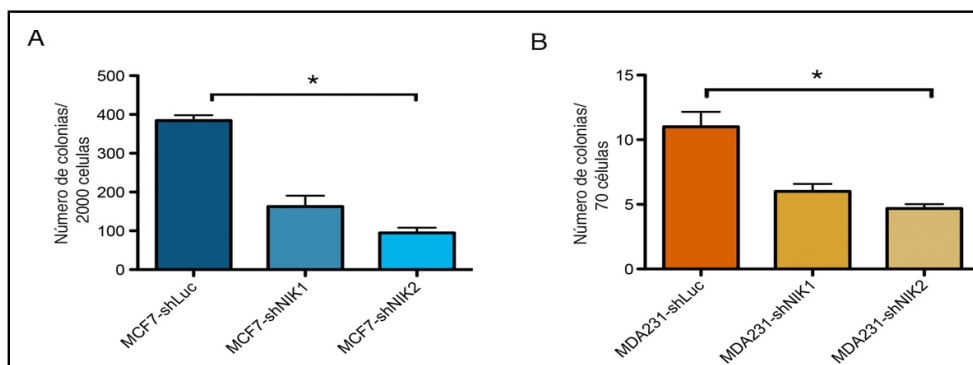


Figura 23.-Efecto de la inhibición de NIK en la capacidad clonogénica de las células MCF7 (A) y MDA-MB-231 (B). La gráfica muestra el número de colonias formadas por las células control y las células con deficiencia de NIK. Los datos representan 3 réplicas independientes. * $p < 0.05$.

La deficiencia de NIK en la línea celular MCF7 altera la capacidad de las células para formar mamo esféricas (Figura 24A). La gráfica muestra que la deficiencia de NIK provoca una disminución en el número y tamaño de las esferas formadas. Esto puede deberse principalmente a la disminución de la población troncal, la cual es responsable de la formación y crecimiento de las esferas. Para evaluar el impacto de la deficiencia de NIK en la tumorigenicidad, se utilizó la línea celular MDA-MB-2312, debido a que es más tumorigénica que la línea MCF7. Las células con NIK inhibido y células control se inocularon en ratones nu/nu y se analizó el potencial

tumorigénico y la frecuencia de CTC en las líneas analizadas. Los resultados mostraron que las células que tienen NIK inhibido poseen una menor capacidad tumorigénica que las células control. La figura 24B muestra el número de células inoculadas en ratones inmunodeficientes e indica la frecuencia de CTC con base en la fracción de células que no formaron ningún tumor. Los datos muestran que la frecuencia de CTC en la línea celular con deficiencia de NIK fue drásticamente menor, en esta línea hay una célula troncal por cada 98,685 células, mientras que las células control poseen una célula troncal por cada 10,335 células. La inhibición de NIK, también redujo el volumen de los tumores formados (Figura 24C). Estos hallazgos apoyan la idea de que NIK es esencial para las capacidades tumorigénicas de las CTC.

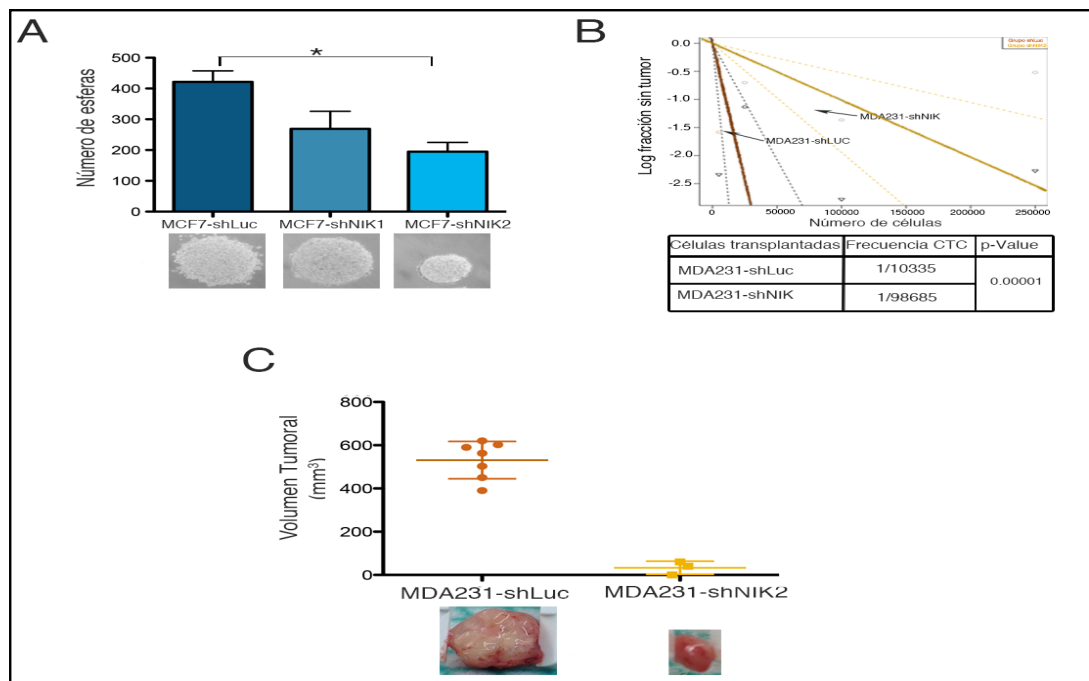


Figura 24.- NIK afecta la capacidad clonogénica y tumorigénica de las células MCF7 (A) y MDA-MB-231 (B-C). (A) La gráfica muestra el número de esferas formadas por las células MCF7 control y las células con NIK inhibido. La gráfica representa 3 experimentos independientes, *p<0.05. (B). El análisis de dilución limitante (ELDA) calcula la frecuencia de CSC en células MDA deficientes en NIK y células MDA control xenotransplantadas en ratones desnudos. Se transplantaron un total de 24 ratones con 5000 (n=5), 25000 (n=6), 100000 (n=8) y 250000 células (n=5). Las células deficientes en NIK se inocularon en el flanco derecho y las células control en el izquierdo. Los tumores fueron monitoreados cada semana y la frecuencia de CTC se calculó utilizando el software ELDA. (C) Volumen de los tumores formados por las células MDA-MB-231 control y las células MDA-MB-231 con NIK inhibido. El tamaño del tumor se midió con un vernier y se calculó el volumen tumoral.

9.7.- La expresión forzada de NIK aumenta la expresión de marcadores troncales

Para investigar el efecto de la sobreexpresión de NIK en el fenotipo troncal se desarrolló una línea celular estable que sobreexpresa NIK (NIK+) y como control una línea estable que sobreexpresa el gen de lacZ (LAC) en la línea celular MCF7 y SKBR3. El análisis de expresión mostró que la línea MCF7-NIK expresa aproximadamente 60 veces más NIK que la línea control (MCF7-LAC) (Figura 25A). La sobreexpresión de NIK también fue más elevada en la línea SKBR3 transfectada con NIK (SKBR3-NIK) en comparación con la línea control (SKBR3-LAC) (Figura 25C).

Posteriormente, se analizó la expresión de los marcadores de troncalidad en células con expresión forzada de NIK en las líneas MCF7 y SKBR3. Los resultados muestran que la sobreexpresión de NIK provoca un incremento la expresión de los marcadores de troncalidad (Figura 25B-D) en ambas líneas celulares. Los cambios más dramáticos fueron el incremento en SOX2 y ALDH1A3. Estos resultados apoyan la idea de que la regulación de los niveles de NIK modula la expresión de marcadores de troncalidad.

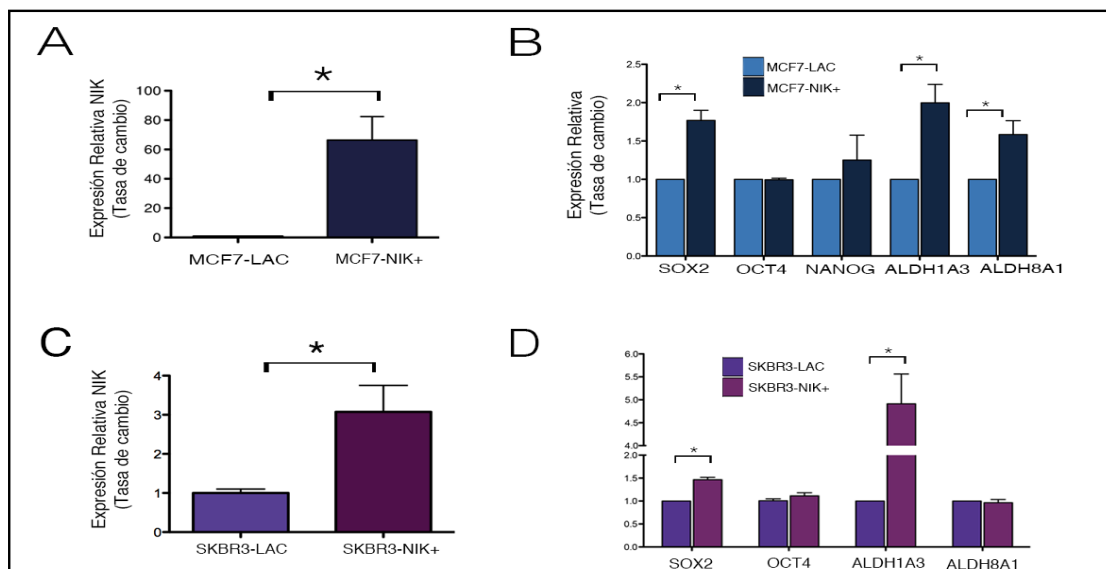


Figura 25. La sobreexpresión de NIK aumenta la expresión de marcadores troncales. (A,C) La expresión de NIK se determinó mediante PCR en tiempo real en las líneas MCF7 y SKBR3. Las gráficas muestran la tasa de cambio en las células que sobreexpresan NIK respecto a las células control. Los datos representan tres réplicas independientes, * $p < 0.05$. (B,D) Expresión de marcadores troncales en células MCF7 y SKBR3 con sobreexpresión de NIK. Los niveles de los marcadores fueron determinados por PCR en tiempo real y se normalizaron a la expresión del gen TBP. Los datos representan tres réplicas independientes, * $p < 0.05$.

La sobreexpresión de NIK también afectó la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD24. El porcentaje de células que expresan CD44 aumentó 38% en las células con sobreexpresión de NIK, mientras que el porcentaje de células que expresan CD24 disminuyó un 20% (Figura 26 A-B). Estos datos muestran que NIK incrementa la expresión de CD44 y reduce los niveles de CD24. Aunado a esto, la sobreexpresión de NIK provocó un incremento en la proporción de CTC (Figura 26C). Estos resultados demuestran que NIK promueve la expansión de la población troncal en la línea celular MCF7.

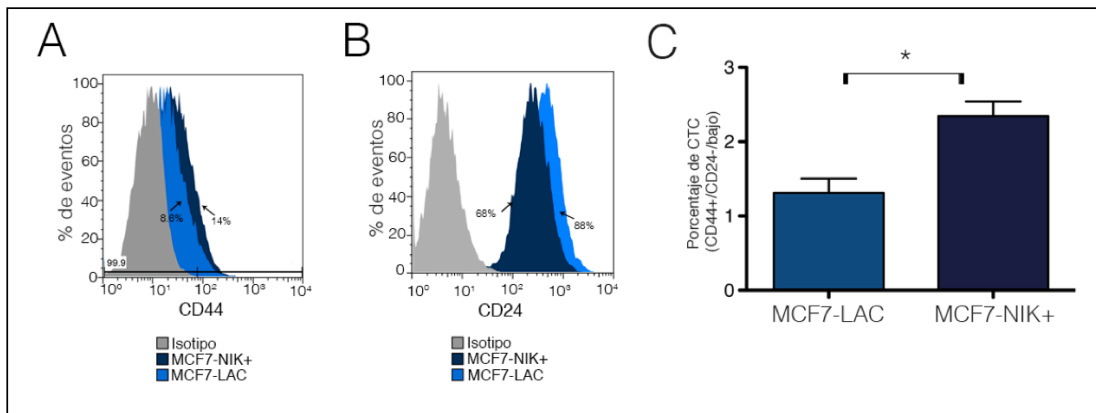


Figura 26. Comparación de la expresión de CD44 (A) y CD24 (B) en células MCF7 con sobreexpresión de NIK (azul marino) y en las células MCF7 control (azul claro). La expresión de estas proteínas fue analizada mediante citometría de flujo, las flechas indican el porcentaje de células que expresan CD44 o CD24. Las imágenes representan un ejemplo de tres experimentos independientes. (C) Porcentaje de CTC en células MCF7 control y células MCF7 con sobreexpresión de NIK. La gráfica representa el promedio de tres réplicas independientes, * $p < 0,05$.

9.8.- La expresión forzada de NIK aumenta la clonogenicidad y tumorigenicidad

Para investigar más a fondo el potencial clonogénico de las células con sobreexpresión de NIK, se realizaron ensayos de clonogenicidad en agar suave o ensayos de formación de mamoesferas. La Figura 27A muestra que las células MCF7 con sobreexpresión de NIK tienen una mayor eficiencia para formar colonias que las células control. Los ensayos de formación de esferas también mostraron que NIK incrementa el número (Figura 27B) y tamaño (Figura 27C) de las mamoesferas formadas en la línea celular MCF7. De manera interesante, el potencial de formación de esferas se mantiene incluso después de un segundo paso. En apoyo a estos resultados, la sobreexpresión de NIK en la línea celular SKBR3 también incremento el número (Figura 27D) y tamaño (Figura 27E) de las mamoesferas.

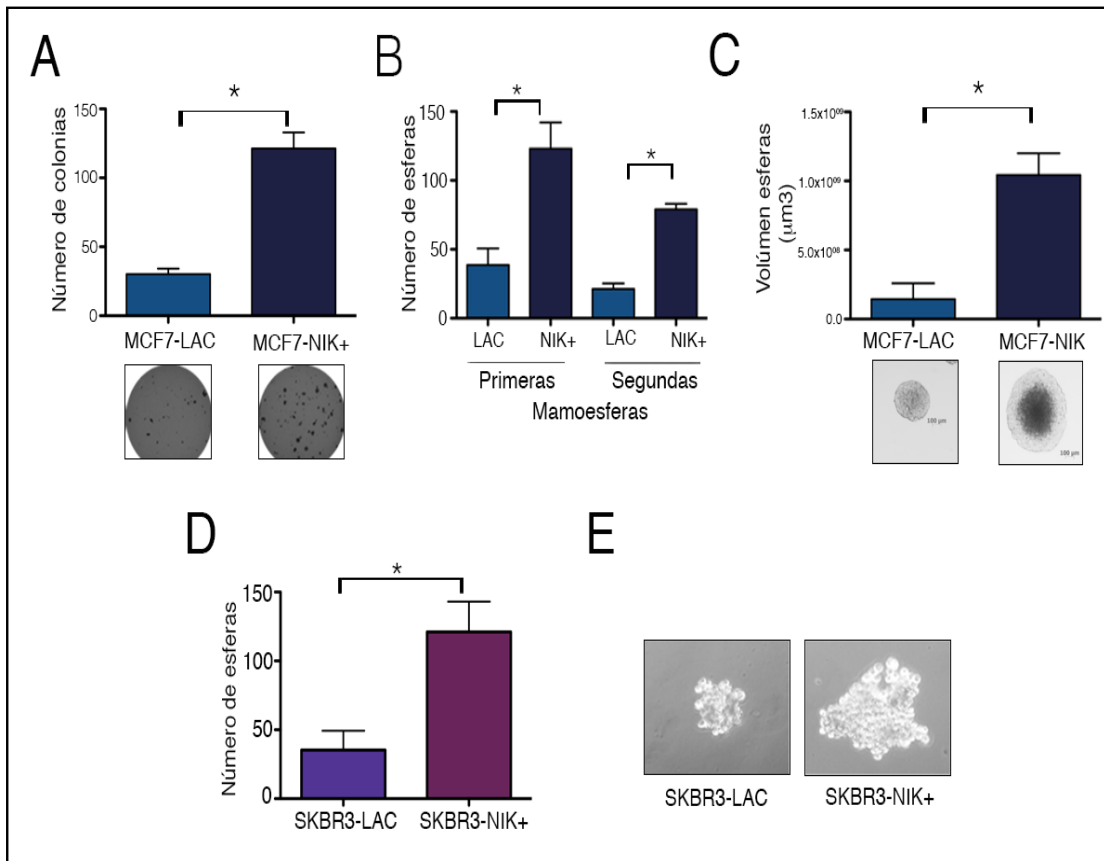


Figura 27. Potencial clonogénico de células con sobreexpresión de NIK (A) Los ensayo clonogénicos en agar suave mostraron que la expresión forzada de NIK aumenta la capacidad clonogénica de las células MCF7. Los datos representan 3 réplicas independientes, * $p < 0.05$. (B-C) Número y tamaño de mamoesferas derivadas de células control y células MCF7 con sobreexpresión de NIK en el primer y segundo pase. Los datos representan tres réplicas biológicas * $p < 0.05$. (C) La gráfica muestra el volumen de esferas, los datos representan tres réplicas independientes, * $p < 0.05$. (D-E) Número y tamaño de mamoesferas derivadas de células control y células SKBR3 con sobreexpresión de NIK. Los datos representan tres réplicas biológicas * $p < 0.05$. Estos resultados muestran que NIK incrementa el número y tamaño de las esferas formadas.

Por último, para evaluar la capacidad tumorigénica de las células con expresión forzada de NIK, se realizaron ensayos de inducción tumoral en ratones nu/nu. Esta prueba es el estándar de oro para determinar la frecuencia de CTC en una población tumoral. Para esto se inocularon diluciones limitadas de células control y células NIK+. Utilizando este abordaje, se encontró que la sobreexpresión de NIK aumentó el número de tumores formados en las líneas celulares MCF7 y SKBR3. En general, la línea MCF7 tiene un bajo potencial tumorigénico, sin embargo, la sobreexpresión de NIK incrementa la formación de tumores. El análisis de dilución limitada mostró que la frecuencia de CTC en la línea control es de $1/387,857$ y en la línea NIK+ es de $1/61,471$ (Figura 28A). De manera interesante, los tumores formados por las células con sobreexpresión de NIK fueron de mayor tamaño que los tumores formados por las células control (Figura 28B). En cuanto a la línea celular SKBR3, la frecuencia de CTC en la línea celular control fue de $1/569482$ y en la línea NIK+ fue de $1/95489$ (Figura 28C). Además, los tumores formados por las células que sobreexpresan NIK fueron notablemente más grandes que los tumores control (Figura 28 D). Estos resultados indican que las líneas celulares con mayor expresión de NIK tienen una proporción más elevada de CTC.

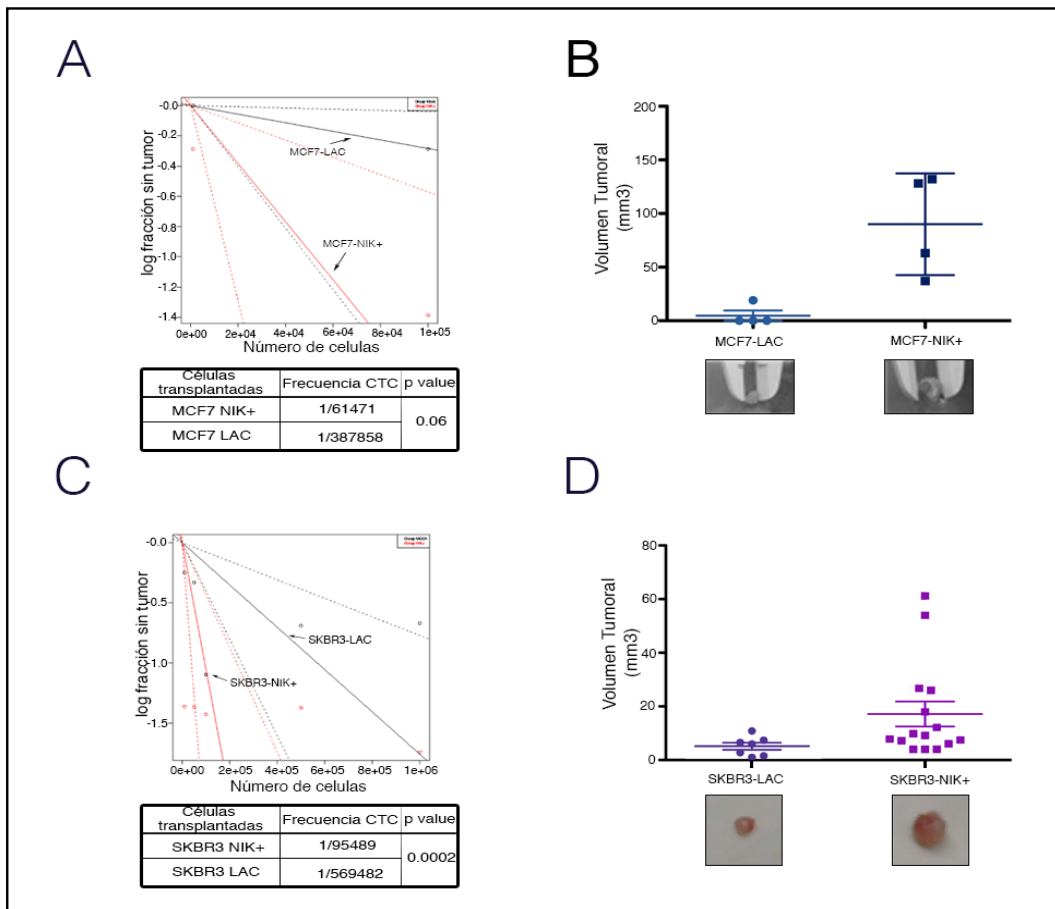


Figura 28.- La sobreexpresión de NIK incrementa la frecuencia de CTC. (A-C) El análisis de dilución limitada (ELDA) demuestra la frecuencia de CSC en células control y en células con sobreexpresión de NIK en la línea MCF7 (A) y en la línea SKBR3 (B). Para la línea MCF7 se transplantaron un total de 8 ratones con 10000 (n=4) y 100000 (n=4) células. Para la línea SKBR3 se transplantaron 16 ratones con 10000 (n=4), 50000 (n=4), 100000 (n=4), 500000 (n=4) y 1000000 (n=4) células. Las células con sobreexpresión de NIK se inocularon en el flanco derecho y las células control en el izquierdo. Los tumores fueron monitoreados cada semana y la frecuencia de CTC se calculó utilizando el software ELDA. (C-D) Volumen de los tumores formados por las células control y las células NIK+ en MCF7 (C) y SKBR3 (D). El tamaño del tumor se midió con un vernier y se calculó el volumen tumoral.

9.9.- NIK regula la expresión de proteínas de la vía NF- κ B.

NIK es una cinasa esencial que induce principalmente la activación de la vía no canónica de NF-kappa B mediante la fosforilación de IKK α y p100¹⁰². Algunos estudios han demostrado que NIK también puede fosforilar IKK β y activar la vía canónica de NF-kappa B^{75,103}. Con el fin de verificar la activación de NF- κ B, se

realizó un análisis de gen reportero en células MCF7. Los resultados muestran que la sobreexpresión de NIK aumenta dramáticamente la activación de NF- κ B mientras que la deficiencia de NIK impide la activación de NF- κ B (Figura 29A-B).

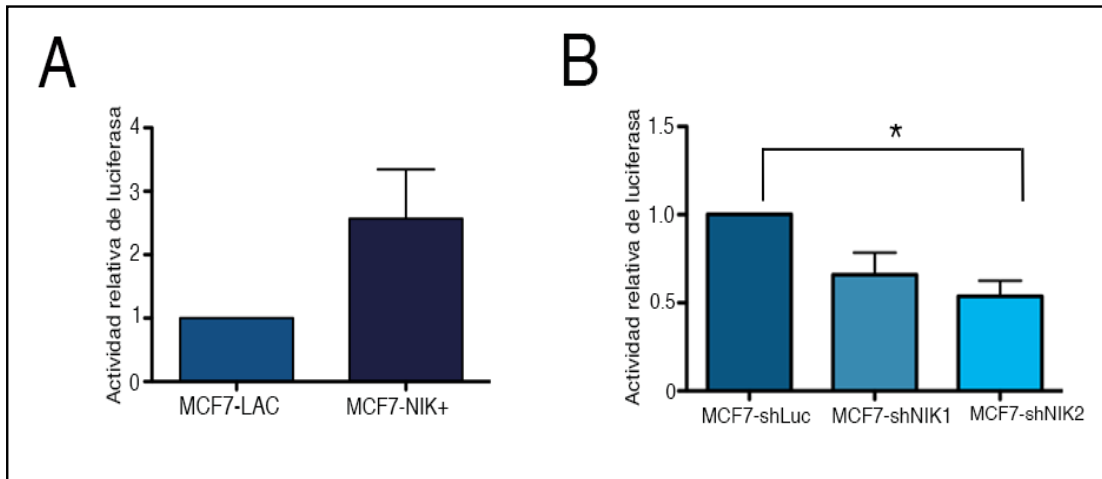


Figura 29. NIK induce la activación de la vía de NF- κ B. Las gráficas demuestran los niveles de actividad de NF- κ B medidos por ensayos de gen reportero (luciferasa) en células con sobreexpresión de NIK (A) o en células con deficiencia de NIK (B). Los ensayos se realizaron en una línea celular transfectada establemente con un vector reportero (luciferasa) el cual está bajo el control de un promotor responsivo a NF- κ B. Las células estables se transfectaron transitoriamente para sobreexpresar o inhibir NIK. La actividad de NF- κ B se calculó como tasa de cambio. Los datos representan tres réplicas biológicas, * $p < 0.05$.

Se ha reportado que NIK media el procesamiento de p100 a p52 y promueve la translocación nuclear del heterodímero p52:RelB. Para corroborar si NIK promueve la translocación de p52 al núcleo, se utilizó la línea celular MCF7 con sobreexpresión de NIK y la línea MDA-MB-231 con inhibición de NIK. La figura 30 muestra que las células MCF7 NIK+ (Figura 30A-B) presentan una fuerte acumulación de p52 nuclear, mientras que las células MDA-MB-231-shNIK2 (Figura 30C-D) tienen niveles reducidos de p52 nuclear.

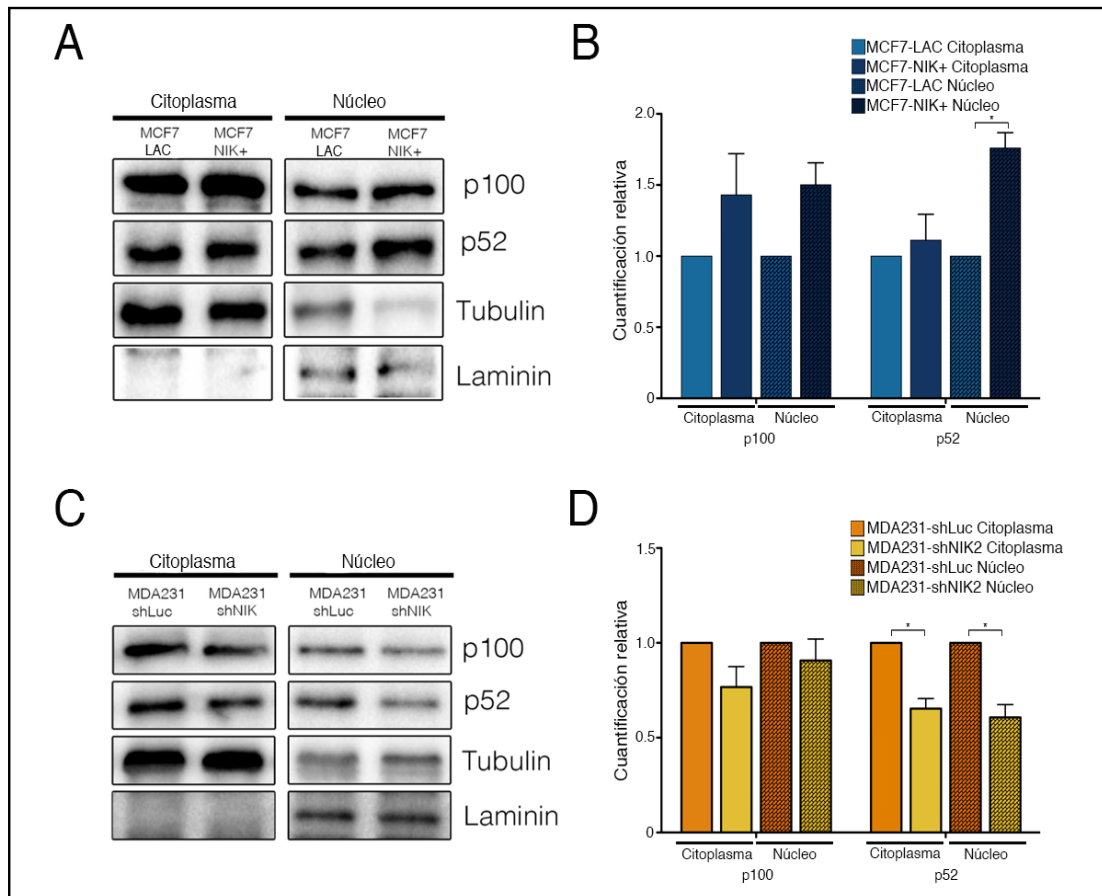


Figura 30. NIK promueve el procesamiento de p100 a p52. (A-B): La fracción subcelular se llevó a cabo con 1×10^6 células control o células que sobreexpresan NIK. (A) El análisis por *Western Blot* de p100 y p52 se realizó en la fracción nuclear y citosólica de cada línea celular. (B) La gráfica muestra la cuantificación realizada por densitometría de tres ensayos independientes. La expresión nuclear fue normalizada a lamina A/C y la expresión citosólica se normalizó a α tubulina. Los datos se expresan como tasa de cambio en relación con las células control, $*p < 0.05$). (C-D): La fracción subcelular se llevó a cabo con 1×10^6 células MDA-MB-231 deficientes en NIK o células control. El análisis por *Western Blot* de p100 y p52 se realizó en la fracción nuclear y citosólica. (D) La gráfica muestra la cuantificación realizada por densitometría de tres ensayos independientes. La expresión nuclear fue normalizada a lamina A/C y la expresión citosólica se normalizó a α tubulina. Los datos se expresan como tasa de cambio en relación con las células control, $*p < 0.05$).

Para determinar qué moléculas de la vía de NF-kappa B están implicados en la regulación de CTC mediada por NIK, se realizó *Western-Blot* e inmunofluorescencia de los factores de transcripción NF- κ B. Los resultados revelaron que NIK aumenta principalmente la expresión de p52, RelB y RelA/p65 (Figura 31A-B).

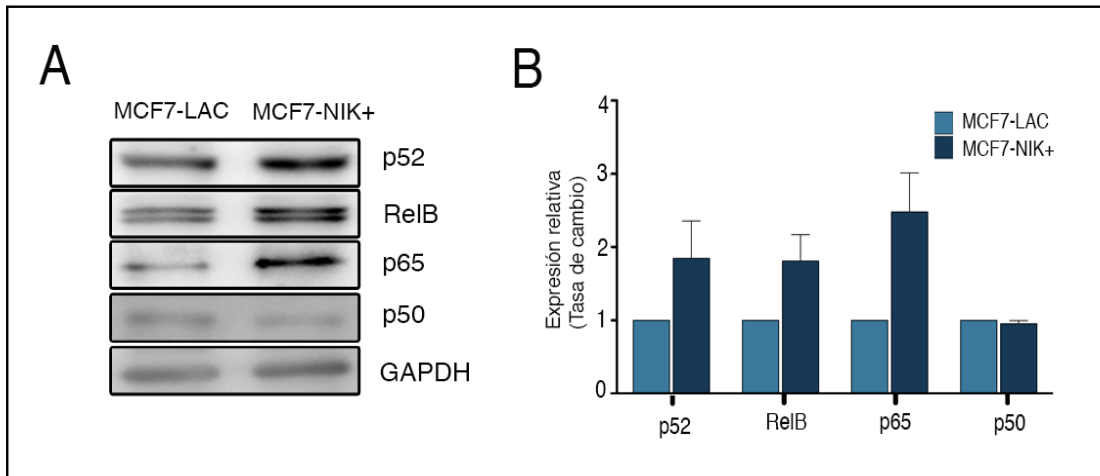


Figura 31.- La sobreexpresión de NIK induce la expresión de moléculas de la vía de NF- κ B. (A) Expresión de las proteínas de la vía NF- κ B mediante *western blot* en células que sobreexpresan NIK. Como control de carga se analizó la expresión de GAPDH. (B) La gráfica muestra la cuantificación de la expresión proteica realizada mediante densitometrías de tres ensayos independientes. Los datos se expresan como tasa de cambio en relación a las células control (MCF7-LAC).

Los resultados del análisis mediante *Western blot* fueron corroborados mediante inmunofluorescencia. Mediante esta estrategia, se confirmó que las células con sobreexpresión de NIK tienen niveles más elevados de p52 (Figura 32A), RelB (Figura 32B) y p65 (Figura 32D). Además, la sobreexpresión de NIK también induce la fosforilación de p52 (Figura 32E) y p65 (Figura 32F). De manera interesante, p50 se expresó menos en las células con sobreexpresión de NIK (Figura 32C).

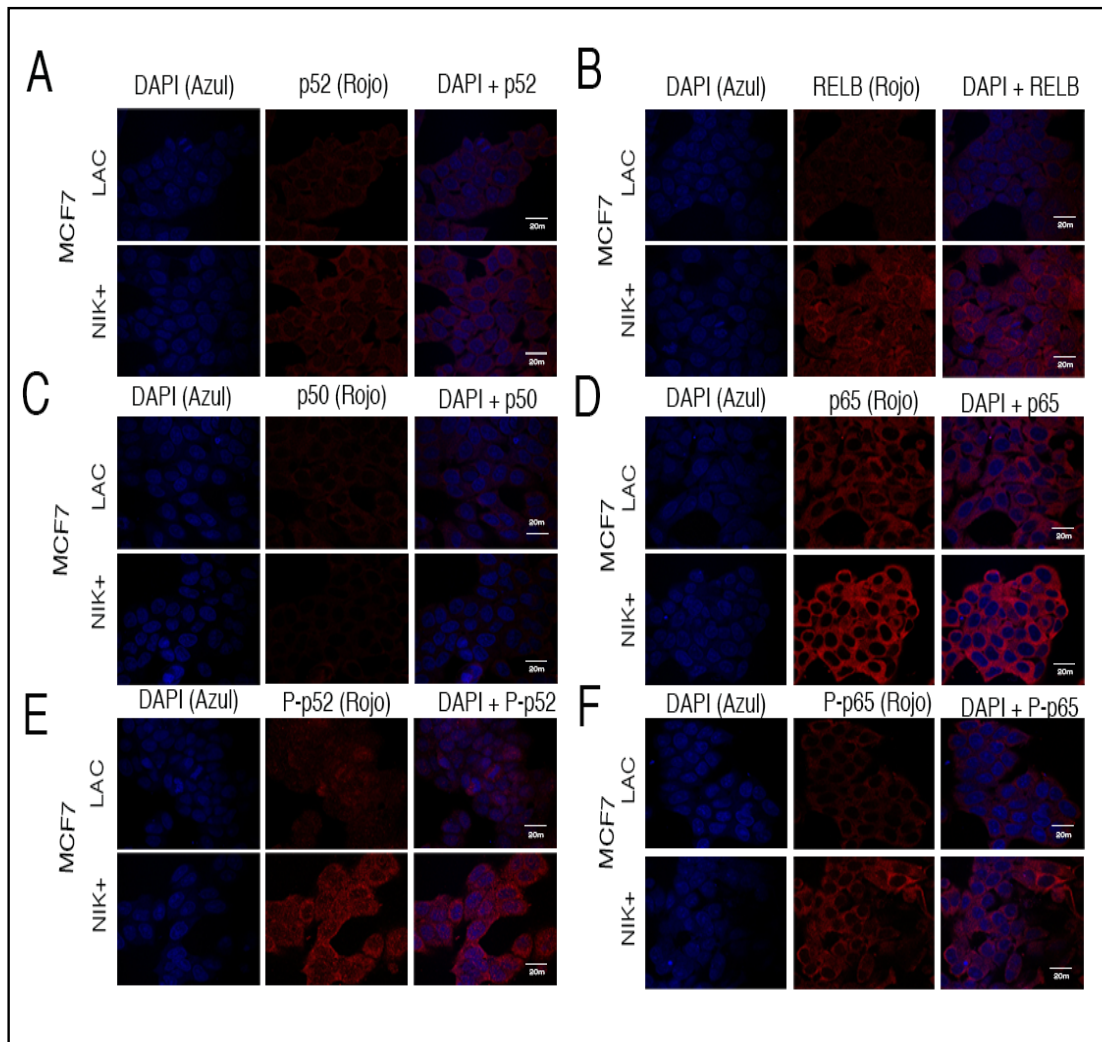


Figura 32.- Análisis de la expresión de p52 (A), RelB (B), p50 (C), p65 (D), fosfo-p52 (E) y fosfo-p65 (F) mediante inmunofluorescencia en células control y células con sobreexpresión de NIK. Las proteínas de la familia NF- κ B fueron detectadas mediante anticuerpos secundarios acoplados a Cy3 (rojo), los núcleos celulares fueron teñidos con 4'-6-Diamidino-2-phenolindole (DAPI). Las fotografías son ejemplos representativos de tres experimentos independientes. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal usando un objetivo 63x.

En conjunto estos datos sugieren que la expresión de NIK promueve la activación de NF- κ B e induce la expresión de p52, RelB y p65. Estos resultados sugieren que NIK podría regular el fenotipo troncal a través de la vía no canónica de NF- κ B, sin embargo, también podría inducir la activación de la vía canónica a través de p65.

9.10.- Expresión de NIK en pacientes con cáncer de mama

Para determinar la relevancia biológica de NIK en muestras de pacientes mexicanas con cáncer de mama, se determinaron los niveles de NIK en 191 muestras de tejido de cáncer de mama. Los tejidos utilizados fueron previamente incluidos a manera de matriz o arreglo en un bloque receptor de parafina, el cual fue posteriormente usado para detectar la expresión de las proteínas HER2, ER, PR, NIK y ALDH. En base a la expresión de HER2, ER y PR se determinó que el 60.7% de los tejidos fueron de tipo luminal, 13.6% triple negativo y el 9.4% pertenecen al subtipo HER2 (Figura 33A.). Para determinar si la expresión de NIK está relacionada con un subtipo de cáncer de mama en particular, la expresión de NIK se examinó mediante inmunohistoquímica. Los resultados muestran que la expresión de NIK fue significativamente mayor en tumores positivos a HER2 (Figura 33B) y la expresión de NIK correlacionó positivamente con los niveles de expresión de HER2 (Figura 33C). También se encontró que los carcinomas triples negativos exhibieron la expresión más baja de NIK, contrariamente a los informes anteriores de líneas celulares de cáncer de mama.

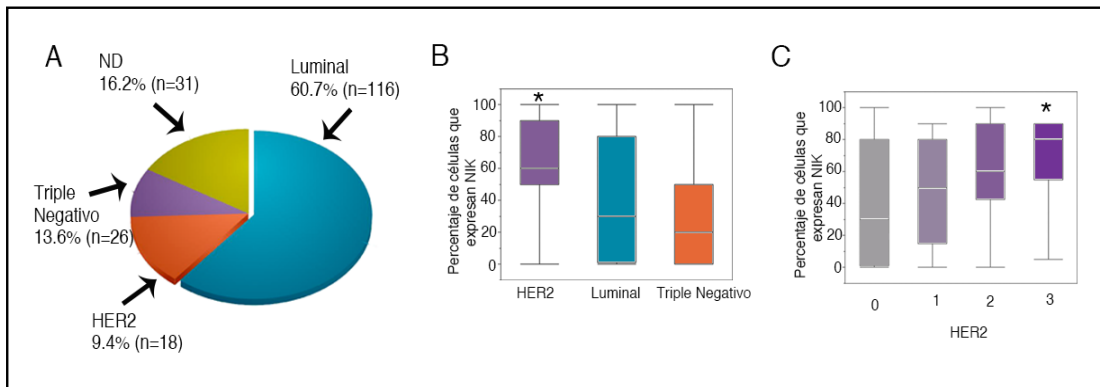


Figura 33. Expresión NIK en tumores de pacientes con cáncer de mama. (A) La gráfica muestra el porcentaje de tumores HER2+, Luminales o Triple negativos utilizados para este estudio (n=191). (B) Porcentaje de células que expresan NIK en los subtipos HER2, Luminal y triple negativo. Los datos muestran que NIK se expresa principalmente en tumores HER2+ (*p=0.01). (C) Porcentaje de células que expresan NIK en tumores con diferentes niveles de expresión de HER2 (0=ausente; 1= débil; 2= moderado; 3=alta). Los niveles de expresión de NIK son más elevados en tumores con alta expresión de HER2 en comparación con los tumores que no expresan HER2 (valor cero, *p<0.05).

Por otra parte, también se evaluó la relación entre la expresión de NIK y los distintos grados tumorales (Figura 34A). De manera interesante, se observó una asociación positiva entre la expresión de NIK y el grado tumoral (Figura 34B). Estos resultados sugieren que los tumores de alto grado poseen una mayor expresión de NIK, lo cual podría promover el incremento de la población troncal en esos tumores.

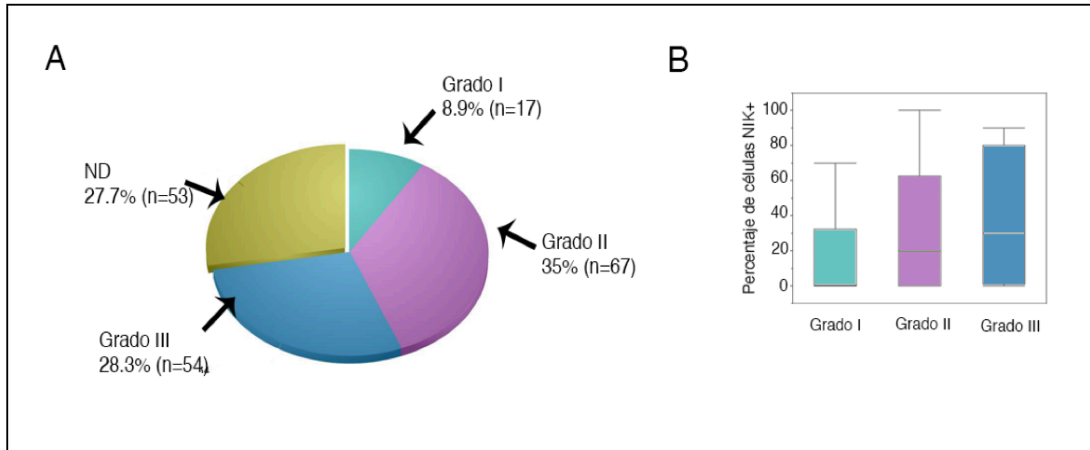


Figura 34. Expresión de NIK en muestras con cáncer de mama. (A) La gráfica muestra el porcentaje de tumores de mama de grado I, II y III (n=191) (B) Porcentaje de células que expresan NIK en tumores de grado I, II y III. Los niveles de expresión de NIK fueron mayores en los tumores de grado III ($p=0,07$).

El análisis inmunohistoquímico reveló que NIK se expresa en 79.5% (152) tumores de cáncer de mama (Figura 35A). El porcentaje de expresión de NIK en los tumores fue muy variable, la tabla 2 muestra el porcentaje de células que expresan esta cinasa en los tumores NIK+.

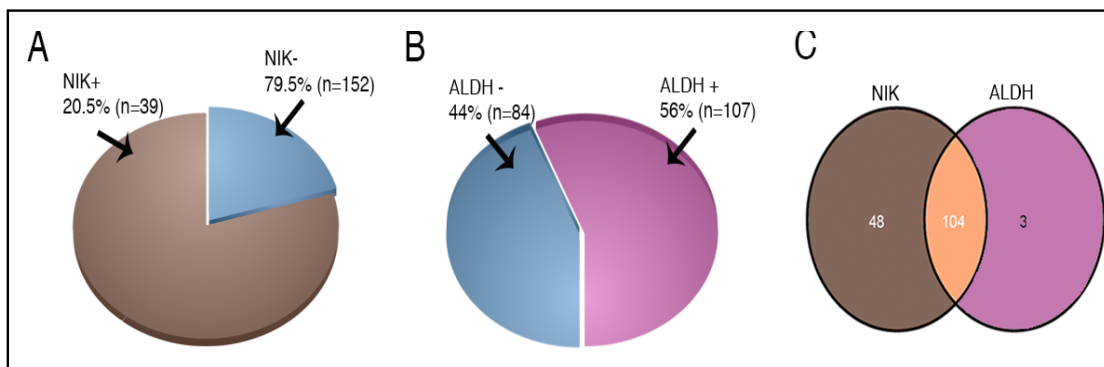


Figura 35. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de NIK y ALDH en carcinomas de mama (n= 191). (A) Porcentaje de tumores que expresan la cinasa NIK. (B) Porcentaje de tumores positivos para ALDH. (C) Diagrama de Venn que muestra los tumores que expresan ambas proteínas (NIK y ALDH).

Porcentaje de células	Tumores NIK	Tumores ALDH
0%	39 (20.5%)	85 (44.7%)
1-10%	30 (15.7%)	55 (28.9%)
11-50%	47 (24.7%)	29 (15.2%)
51-70%	17 (8.9%)	11 (5.9%)
70-100%	57 (30%)	10 (5.2%)
Total	190	190

Tabla 2.- Expresión de NIK y ALDH en carcinomas de mama. Los tumores fueron clasificados de acuerdo al porcentaje de células que expresan NIK o ALDH.

Para correlacionar la expresión de NIK con un marcador de células troncales, se analizó la co-localización de NIK con el marcador de células troncales ALDH. La proteína ALDH se expresó en el 56% de los tumores estudiados (Figura 35B), la tabla 2 muestra el porcentaje de células que expresan esta proteína. De manera interesante, de los tumores ALDH+, el 97% de estos también expresa la proteína NIK (Figura 35C). Notablemente, 89,4% de los tumores que expresan NIK y ALDH presentan una co-localización celular de ambas proteínas como se muestra en la figura 36A. La Figura 36B representa tumores que expresan NIK y ALDH en diferentes células del mismo tumor. La Figura 36C-D representa los tumores que expresan solamente NIK o ALDH respectivamente y no existe ninguna co-localización. En un bajo número de casos, también hubo tumores que carecen de la expresión de ambas proteínas (Figura 36E).

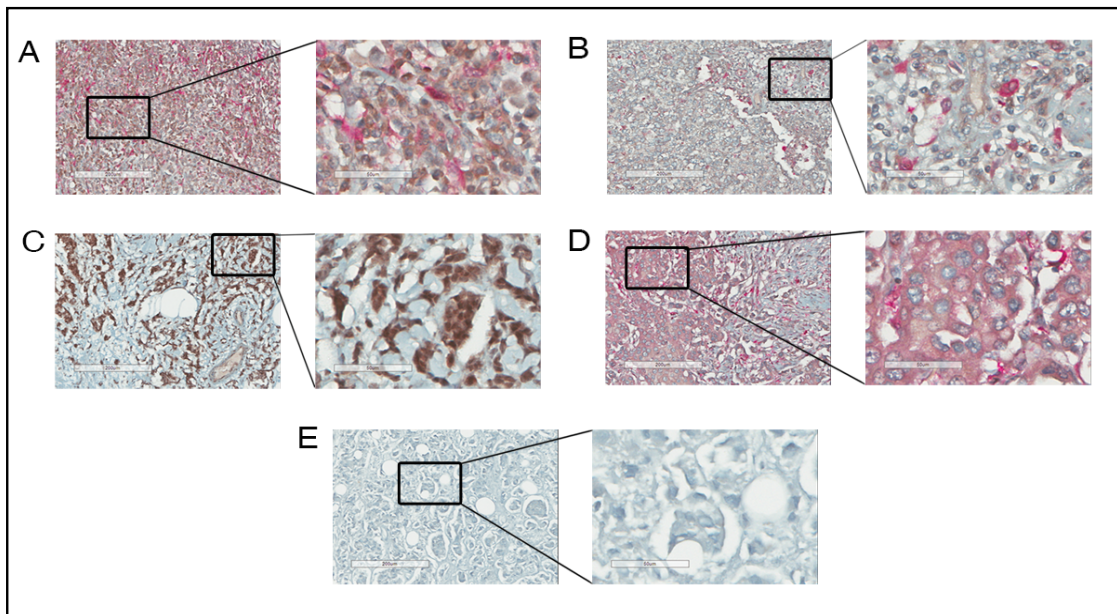


Figura 36.- Expresión de NIK y ALDH en pacientes con cáncer de mama. (A-E) Las imágenes representan un ejemplo de las inmunohistoquímicas realizadas para detectar NIK o ALDH en tumores de cáncer de mama. Las células positivas para NIK se visualizan en color café debido al cromógeno DAB (diaminobencidina), las células positivas para ALDH son rosas debido al cromógeno FAST RED (rojo rápido) y los núcleos son azules debido a tinción con hematoxilina (azul). La segunda columna de cada imagen representa una ampliación del área seleccionada en el panel izquierdo. (A) La imagen es una representación de los tumores (n=93) que expresan ALDH y NIK en las mismas células. (B) La inmunohistoquímica representa los tumores (n=10) que expresan NIK y ALDH en diferentes células. (C-D) Las imágenes representan tumores que expresan únicamente NIK (C) o ALDH (D). La última imagen (E) representa los tumores que no expresaron ninguna de las dos proteínas.

9.11.- NIK afecta la expresión de genes relacionados con troncalidad y transición epitelio mesénquima

Para elucidar el posible mecanismo por el cual NIK afecta el fenotipo troncal, se realizaron microarreglos de expresión de células MCF7 con NIK sobreexpresado, NIK-inhibido y células control. Como era de esperarse, el análisis del componente principal no supervisado separó a las muestras en tres grupos principales; las muestras con alta expresión NIK (NIK +), los muestras con baja expresión de NIK (NIK-) y las muestras control (Figura 37A). El análisis de los perfiles de expresión

de las células con sobreexpresión o inhibición de NIK arrojó diferencias significativas en la expresión de 79 genes desregulados en las células NIK+ y 53 genes diferencialmente expresados en células NIK- (Anexo 13.8 y 13.9). El mapa de calor muestra el agrupamiento de las 3 muestras analizadas de acuerdo a sus perfiles de expresión, observándose un patrón distintivo para cada grupo de muestras (Figura 37B).

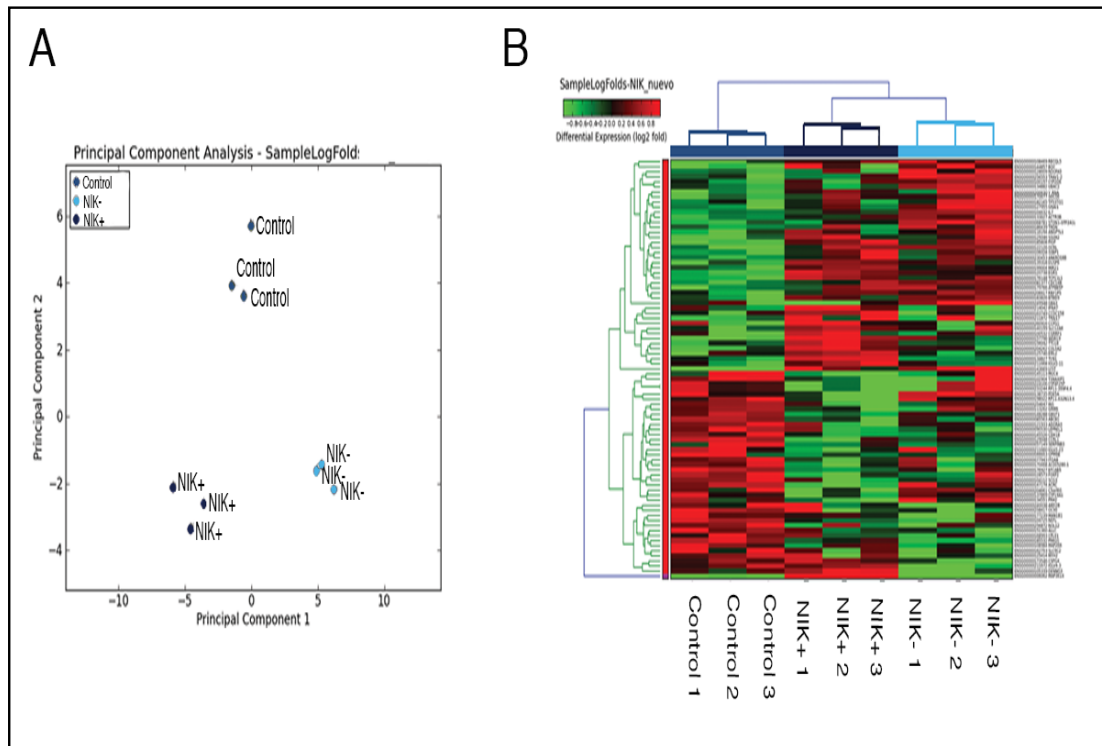


Figura 37.- Análisis del componente principal de los perfiles de expresión génica para las células MCF7 control, células que sobreexpresan NIK(NIK+) y células con deficiencia de NIK (NIK-). (B) Diagrama de agrupamiento jerárquico de las muestras y los genes expresados diferencialmente en células MCF7 control, NIK+ y NIK-. El logaritmo de la tasa de cambio de los genes expresados diferencialmente se representan en un mapa de calor. La escala va desde bajos niveles (verde) hasta altos niveles (rojo) de expresión. Los experimentos se realizaron en tres independientes con células transfectadas transitoriamente en la línea celular MCF7.

Como era de esperarse, el análisis de enriquecimiento de genes, identificó que las células NIK+ tienen un enriquecimiento de la vía de señalización NF- κ B. En este análisis se identificaron genes de la familia TNF-NF- κ B y genes blanco de NF- κ B

como quimiocinas y citocinas, los cuales se encontraron enriquecidos en las células con sobreexpresión de NIK (Figura 38). Estos datos confirman que la vía de NF- κ B se activa tras la sobreexpresión de NIK.

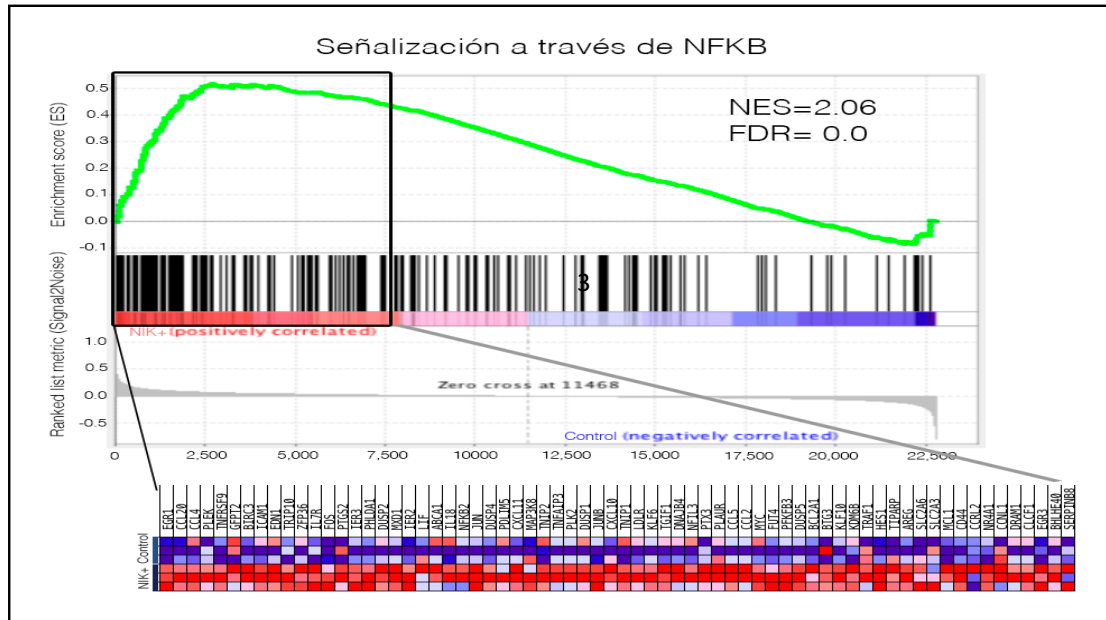


Figura 38.- Gráfica que muestra el análisis de enriquecimiento de un set de genes (GSEA, gene set expression analysis) para la vía de señalización de NF- κ B en células MCF7 con sobreexpresión de NIK y en células control. La línea verde representa el enriquecimiento y las líneas negras (código de barras) representan a cada uno de los genes analizados. El score de enriquecimiento normalizado (NES) es de 2.06 y la tasa de falsos descubrimientos (FDR) es 0. El mapa de calor muestra la intensidad de fluorescencia de los 70 genes desregulados de la vía, las columnas representan cada uno de los genes y las filas muestran las muestras NIK+ y control. En el mapa, el color rojo indica los valores sobreexpresados y el color azul los subexpresados.

De manera interesante, los resultados muestran que los genes más alterados están involucrados en la regulación de células troncales y en la transición epitelio mesénquima, proceso por el cual las células adquieren un fenotipo troncal. (Figura 39). Estos resultados apoyan el papel de NIK en la regulación de las células troncales cancerosas.

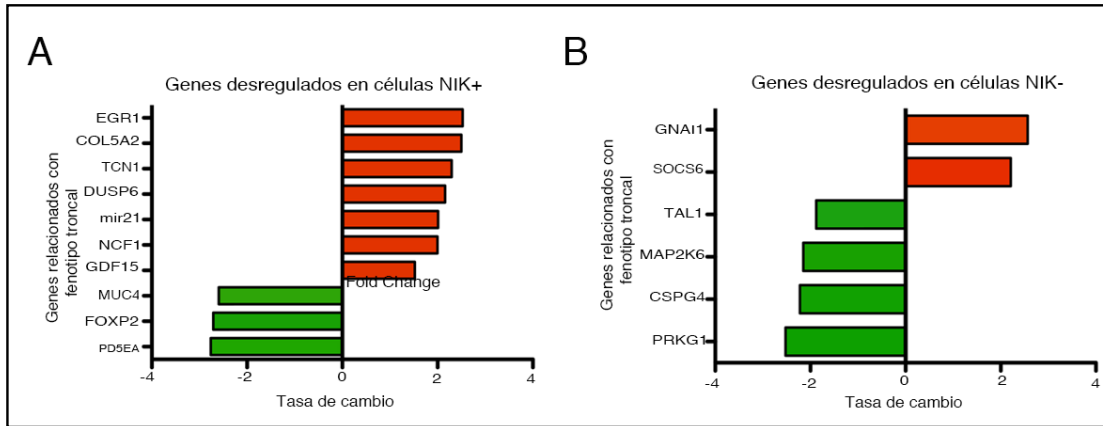


Figura 39.- Gráfico que muestra la tasa de cambio de los genes relacionados con el fenotipo troncal en células con sobreexpresión de NIK (A) y células con deficiencia de NIK comparados con los controles respectivos (B).

Para validar los datos de los microarreglos, se analizó la expresión de 7 genes mediante PCR en tiempo real. Los genes analizados fueron seleccionados en base a la tasa de cambio y a su función en la regulación de células troncales. Todos los genes analizados correlacionan bien con los resultados obtenidos a partir de los microarreglos (Figura 40). Como era de esperarse, se observó que los genes EGR1 (early growth response), TCN1 (transcobalamin) y DUSP6 (Dual specificity Phosphatase 6) que incrementaron en las muestras con alta expresión de NIK también disminuyeron en células con NIK inhibido.

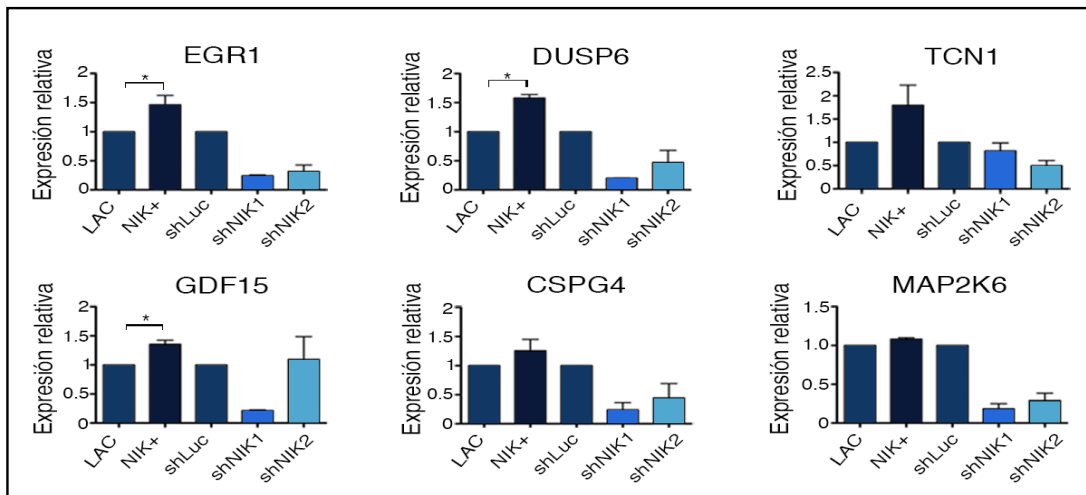


Figura 40.- Análisis de la expresión de EGR1, TCN1, DUSP6, GDF15, CSPG4 y MAP2K6 mediante PCR en tiempo real en células MCF7 que sobreexpresan NIK, células control (LAC o shLuc) y células MCF7 deficientes en NIK (shNIK1 y shNIK2). Los datos se normalizaron a TBP y representan el promedio de tres réplicas independientes *p <0.05.

El análisis de IPA (Ingenuity Pathway Analysis, por sus siglas en inglés) mostró que en las células con sobre-expresión de NIK hay un enriquecimiento de las vías de crecimiento, proliferación celular, muerte celular y supervivencia, movimiento celular y desarrollo del sistema hematológico. Estos resultados indican que la alteración de NIK puede afectar la proliferación, supervivencia y migración de las células troncales de cáncer. Los resultados derivados de los microarreglos, sugieren que NIK podría activar la vía de ERK1/2 para regular varias moléculas involucradas en la modulación de células troncales como EGR1, NCF1, COL5A2 y GDF15 (Figura 41A). Los datos también sugieren que la deficiencia de NIK regula a la baja la expresión de genes asociados con células troncales como MAP2K6, CSPG4 y TAL1, probablemente por la vía MAPK y ERK1/2 (Figura 41B). El análisis de los genes desregularizados en células MCF7 con alta expresión NIK reveló que ERK podría ser una de las vías clave que contribuyen a regular el fenotipo de CTC.

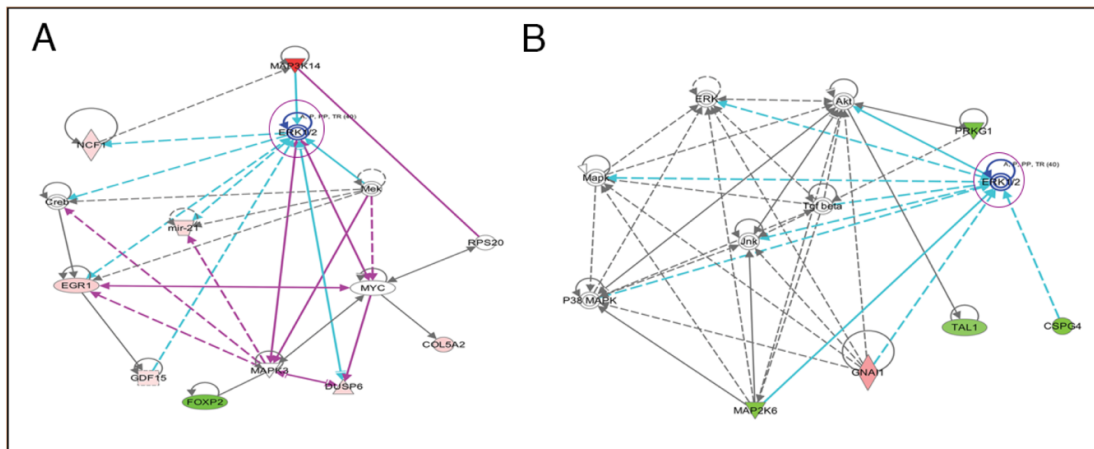


Figura 41.- Las imágenes muestran a los genes desregularizados ante la sobreexpresión (A) o inhibición de NIK (B), los cuales están relacionados con la vía de señalización ERK1/ERK2. Para el análisis se incluyeron los genes significativamente más alterados. Las imágenes muestran que ERK1/2 es el nodo central en ambas vías. El color rojo indica genes inducidos y el color verde representa a los genes suprimidos

9.12.- NIK regula el fenotipo troncal a través de la vía de ERK

La vía de ERK está involucrada en la activación de muchos factores de transcripción, los cuales promueven el crecimiento celular y tumorigénesis. De manera interesante, nuestros resultados mostraron que NIK podría regular la vía ERK para modular los genes blancos involucrados en el fenotipo troncal o en la transición epitelio mesénquima. Para determinar el papel de NIK en la activación de ERK, se analizó el estado de fosforilación de ERK en células MCF7 con NIK inhibido y células con sobreexpresión de NIK. La expresión forzada de NIK promovió la fosforilación de ERK, mientras que la deficiencia de NIK redujo la expresión de ERK fosforilado (Figura 42A). Para determinar la función de ERK en el fenotipo troncal mediado por NIK, se utilizó un inhibidor químico (FR180204) de la cinasa ERK1/2. Como se esperaba, la inhibición de ERK con FR180204 dio como resultado la reducción en la expresión de los genes que se encontraban sobreexpresados en los datos de microarreglos (EGR1, GDF15, TCN1 y DUSP6, Fig 42B). Estos resultados sugieren que NIK promueve la expresión de genes que regulan el fenotipo troncal a través de la fosforilación y activación de ERK en las células troncales de cáncer de mama.

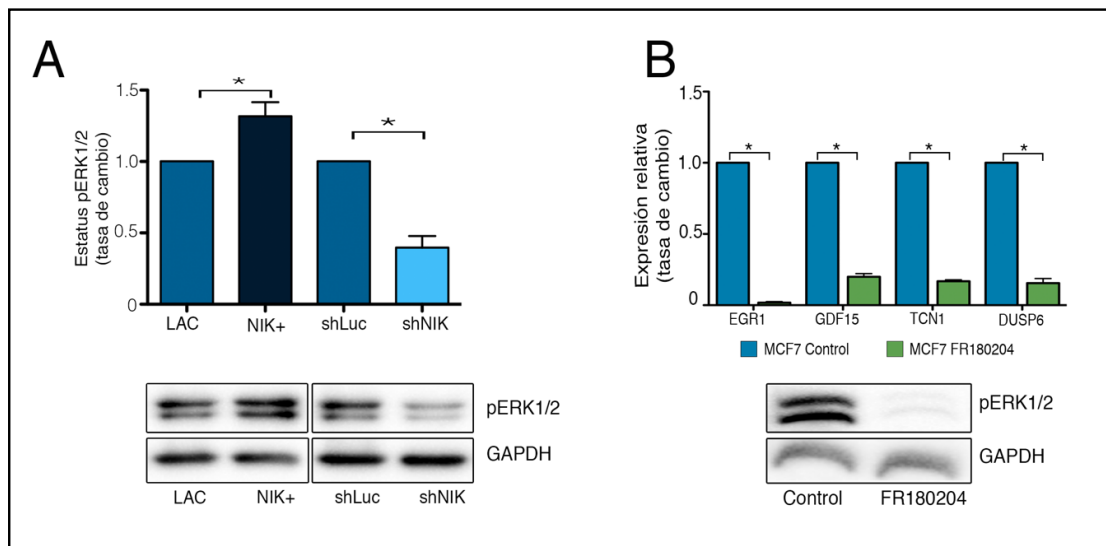


Figura 42.- NIK regula la expresión de genes blanco a través de la vía de ERK. (A) Análisis de la expresión de las proteínas fosforiladas ERK1 y ERK2 en células MCF7 mediante *Western Blot*. El análisis se llevó a cabo en células con sobreexpresión de NIK, en células control y en células con deficiencia de NIK. Los datos se normalizaron a la expresión de GAPDH, la gráfica representa tres réplicas independientes * $p < 0.05$. En el panel inferior se muestra una imagen representativa del *western blot* identificando a las proteínas pERK1/2 y GAPDH. (B) Expresión relativa de genes blanco en células MCF7 tratadas con 30uM de el inhibidor FR180204 o una cantidad equivalente de DMSO durante 24 horas. La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$. En el panel inferior se muestra una imagen representativa del efecto de FR180204 en la inhibición de las proteínas ERK1/2.

Para verificar el papel de ERK en la regulación de los genes blanco, también se utilizaron shRNAs dirigidos específicamente contra ERK o ERK2. En la figura 43A, se observa que los shRNAs dirigidos contra ERK1 o ERK2 inhiben cerca del 40% y 30% la expresión de ERK1 y ERK2 respectivamente. A pesar de que la eficiencia de inhibición de los shRNAs no fue buena, los resultados muestran que el nivel de inhibición de ERK fue suficiente para modular la expresión de EGR1 y GDF15 (Figura 43B).

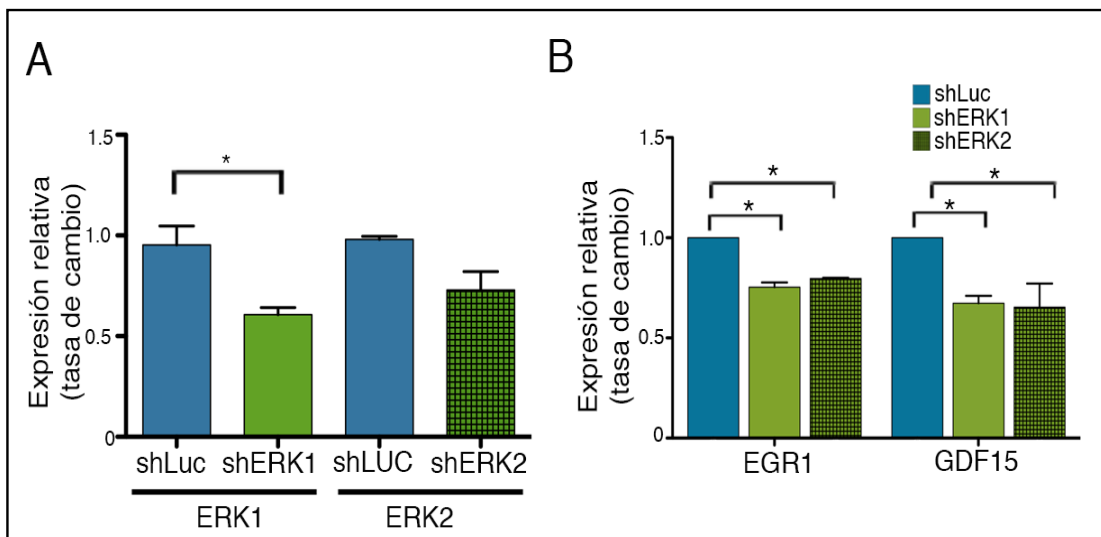


Figura 43.- (A) Para inhibir la expresión de ERK1 y ERK2, se utilizaron shRNAs contra ERK1 y ERK2 en la línea celular MCF7. La expresión de ERK1/2 se analizó mediante PCR en Tiempo Real y se normalizó a TBP. Los datos se expresan como tasa de cambio en relación con las células control y representan el promedio de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$. (B): Análisis de la expresión de EGR1 y GDF15 mediante PCR en tiempo real. Los datos se normalizaron a TBP. La gráfica muestra la tasa de cambio en relación con las células troncales. La gráfica representa tres réplicas independientes, * $p < 0.05$).

De manera interesante, la exposición de FR180204 en células con sobreexpresión de NIK impidió la regulación de sus genes blanco. En la figura 44A se muestra que los genes inducidos tras la sobreexpresión de NIK, son reducidos a sus niveles basales después de la inhibición de ERK1/2.

Finalmente, se analizó el efecto de la vía de señalización de ERK en la regulación de la fracción troncal mediada por NIK. En la figura 44B, se observa que la inhibición de ERK disminuye la capacidad de NIK para incrementar la fracción de células troncales presentes en la línea celular MCF7. Los resultados muestran que la administración del inhibidor FR180204 en células MCF7 con sobreexpresión de NIK, disminuye dramáticamente la fracción de CTC a niveles cercanos a los de las células control. Estos resultados sugieren que NIK depende de la vía de ERK para inducir la activación de los genes involucrados en la regulación del fenotipo troncal.

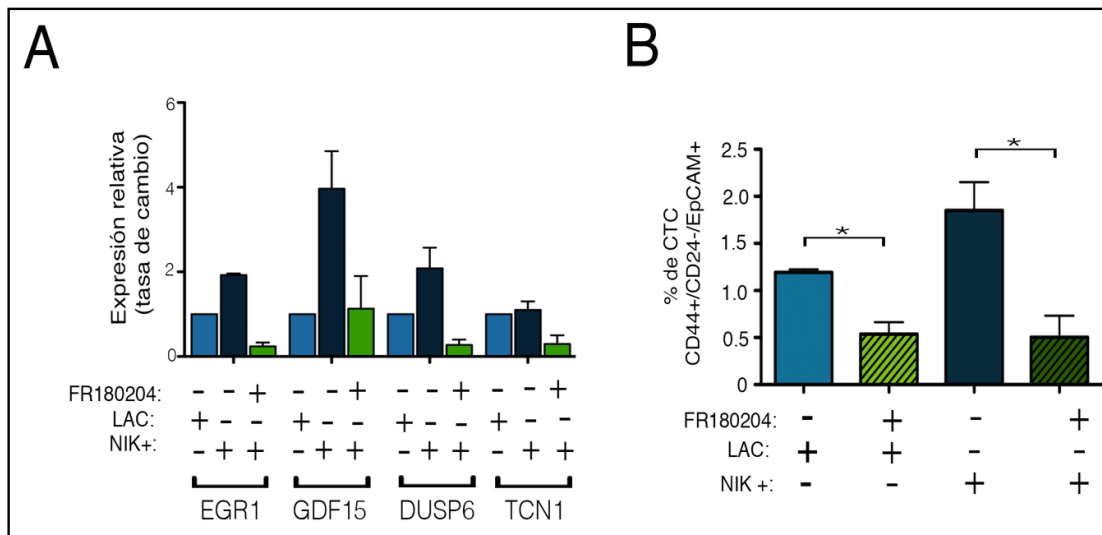


Figura 44.- Análisis de la expresión de los genes EGR1, GDF15, DUSP6 y TCN1 en células MCF7 con expresión forzada de NIK, las cuales fueron cultivadas con 30 μ M de FR180204 o DMSO durante 24 h. La gráfica muestra la tasa de cambio en relación con las células control (LAC). Los datos representan dos experimentos independientes. (B) Porcentaje de CTC (CD44+/CD24-/EpCAM+) en células MCF7 control y células con sobreexpresión de NIK cultivadas con 30 μ M de FR180204 o DMSO durante 24 horas. El análisis de la expresión conjunta de CD44, CD24 y EpCAM se realizó mediante citometría de flujo. Los datos representan tres experimentos independientes, * p <0.05.

10.- DISCUSIÓN

Se ha propuesto que una subpoblación de células troncales de cáncer es capaz de iniciar y sostener el crecimiento de un tumor³⁹, lo que permite la propagación y formación de focos metastásicos en sitios distantes^{36,104,105}. De acuerdo con esta hipótesis, sólo las CTC pueden auto-renovarse indefinidamente y diferenciarse en todos los tipos de células tumorales¹⁰⁶. La identificación de nuevos blancos terapéuticos dirigidos contra las CTC podría ser muy útil, sobre todo para los tumores con altas tasas de mortalidad y recurrencia.

Los perfiles de expresión génica han definido los siguientes subtipos de cáncer de mama: el subtipo luminal, basal, Her-2, el subtipo bajo en claudina, y el subtipo normal^{16,17,107}. En líneas celulares de cáncer de mama, la actividad de NF-κB se representa diferencialmente en el subtipo luminal y basal. Las líneas celulares de cáncer de mama basales poseen una alta actividad de NF-κB y alta expresión de NIK^{82,94}.

A pesar de que las líneas celulares son ampliamente utilizadas en investigación en cáncer, la necesidad de validar la información obtenida en muestras de pacientes es crucial para asegurar su utilización con fines traslacionales. La expresión de NIK en tejidos de cáncer de mama no ha sido completamente explorado, un estudio reciente demostró que NIK se expresa de manera elevada en tejido tumoral y en bajos niveles en tejido normal. De manera interesante se ha reportado una asociación entre la expresión de NIK y el estadio tumoral y la presencia de nodos linfáticos⁸¹. Cabe resaltar que el análisis de la expresión de NIK en una cohorte de pacientes mexicanas con cáncer de mama, mostró que NIK se expresa en mayor medida en los tumores de grado III. Sorprendentemente, los tumores positivos para HER2 expresaron mayores niveles de NIK que los tumores triple negativos.

La discrepancia observada entre las líneas celulares y las muestras de pacientes con cáncer de mama puede deberse a muchos factores tales como heterogeneidad tumoral, diferencias genéticas entre una línea celular y el tumor original del que deriva, entre otras. Actualmente, la clasificación clínica de los subtipos tumorales se basa en la expresión de los marcadores en la mayoría del tumor. Sin embargo, de acuerdo a la hipótesis de las CTC, es posible que los tumores contengan diversos subtipos de cáncer de mama ^{108,109}, lo cual podría dificultar la interpretación de los datos y la estimación inapropiada de la expresión de NIK en los distintos subtipos de cáncer de mama.

Esta investigación establece la relación entre NIK y HER2 en pacientes mexicanas con cáncer de mama. Apoyando este resultado, se ha demostrado que el factor de transcripción NF- κ B es detectado principalmente en tumores pertenecientes al subtipo HER2+/ER- ¹¹⁰. Evidencias recientes mostraron que los tumores HER2+, poseen mayor expresión de p97, una ATPasa indispensable para la degradación parcial de p100 y la activación consecutiva de la vía no canónica de NF- κ B ¹¹¹. Merkhofer et al, demostraron que HER2 activa la vía de NF- κ B a través de IKK α posiblemente debido a la participación de NIK ¹¹². Además, es bien sabido que la sobreexpresión de HER2 induce la activación de NF- κ B ¹¹²⁻¹¹⁴, posiblemente a través de la activación de NIK/RIP ¹¹⁵. Por otra parte, HER2 también es un importante regulador de CTC de mama en tumores HER2 positivos ¹¹⁶. HER2 regula la auto-renovación de CTC a través del ligando del receptor activador de NF-kappa B (RANKL) en tumores de mama que carecen de amplificación de HER2 ¹¹⁷. Notablemente, el receptor RANK participa en la activación de la vía no canónica de NF- κ B ⁶⁷, de esta forma, HER2 podría promover la autorenovación de las CTC a través de la activación de la vía no canónica de NF- κ B.

En este estudio, hemos establecido una fuerte asociación entre NIK y el fenotipo troncal. Los datos demuestran que la expresión de NIK es mayor en CTCs derivadas de ambas líneas celulares (luminal y triple negativo), lo cual sugiere que NIK participa en la regulación del fenotipo troncal independientemente del subtipo

molecular. Además, los resultados indican que la mayoría de los marcadores de células troncales analizados fueron co-regulados por NIK.

De manera interesante, la deficiencia de NIK reduce la subpoblación de CTC y deteriora drásticamente las propiedades troncales como la tumorigenicidad y clonogenicidad en las tres líneas celulares analizadas (MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3). Curiosamente, incluso cuando las células MCF7 expresan bajos niveles de NIK, la inhibición de este gen fue suficiente para reducir la población troncal y afectar la capacidad clonogénica de las células. Estos resultados sugieren que NIK participa en la regulación de la población troncal independientemente del subtipo molecular.

La expresión forzada de NIK induce la expresión de marcadores de CTC, de manera interesante, las enzimas de la familia ALDH (ALDH1A1 y ALDH1A3) tienen promotores con elementos putativos de respuesta a NF-kappa B. El análisis de los carcinomas de mama reveló que las células que expresan NIK también expresan la proteína ALDH en la mayoría de los tumores analizados. Estos resultados sugieren que NIK-ALDH pueden regular la población de CTC in vivo.

La cinasa NIK regula la fracción troncal (CD44+/CD24-/EpCAM+) en la línea MCF7 y/o MDA-MB-231. Los resultados muestran que NIK regula negativamente la expresión de CD24. Vesuna et al, reportaron que Twist, un inductor de la TEM regulado por NF- κ B, es capaz de reprimir la transcripción de CD24 en CTC¹¹⁸. Curiosamente, nuestro grupo ha demostrado que la modulación de NIK afecta los niveles de Twist (datos no mostrados). Además, se ha descrito que CD24 suprime la señalización de NF-kappa B y potencia la apoptosis inducida por daño a ADN¹¹⁹. Por lo tanto, CD24 y NF- κ B podrían estar participando en una retroalimentación negativa que en última instancia determina la fracción final de CTC de un tumor.

NIK puede activar las vías canónica y no canónica de NF- κ B¹²⁰. NIK fosforila preferentemente a la cinasa IKK α , aunque también puede fosforilar a IKK β en una manera dependiente de IKK α ¹²¹. En este proyecto, se ha demostrado que la

sobreexpresión de NIK induce la activación de NF- κ B y aumenta la expresión de p52, RelB y p65, lo que sugiere que los componentes de la vía canónica y no canónica de NF- κ B participan en la modulación del fenotipo troncal mediada por NIK. Curiosamente, encontramos que p52 y p65 son las moléculas más reguladas en células con sobre-expresión de NIK; esto podría sugerir que el heterodímero p52:p65 participa en el mantenimiento de fenotipo troncal mediado por NIK. Sin embargo, el análisis de la expresión de las moléculas de la familia NF- κ B en las CTC aisladas de la línea celular MCF7, sugieren que la vía no canónica está preferencialmente activa en estas células. No obstante, se requieren más estudios para identificar el heterodímero de NF- κ B responsable de la regulación de CTC. En CTC de páncreas se ha observado una alta actividad de NF- κ B y se ha determinado que el heterodímero p52:p65 es uno de los más representativos de la población troncal ¹²².

El papel de las vías de NF- κ B en CTC de mama no ha sido completamente dilucidado; sin embargo, es claro que NF- κ B está implicado en la regulación de CTC. En este estudio, hemos demostrado que las CTC de mama expresan mayores niveles de NIK, lo cual sugiere que NF- κ B desempeña un papel importante en la biología de las CTC. De manera interesante, las CTC obtenidas de la línea celular MCF7 expresan principalmente a las proteínas p52 y RelB, lo que sugiere que la fracción troncal depende de la vía no canónica de NF- κ B. De manera interesante, se ha demostrado que inhibidores de la vía NF- κ B inhiben preferencialmente la proliferación de CTC de mama y no ejercen efectos significativos en la población no troncal⁸⁷. Por lo tanto, los inhibidores de NF-kappa B podrían ser utilizado como un enfoque terapéutico para eliminar a las CTC. Sin embargo, aún queda trabajo por hacer para aclarar el papel de las vías canónica y no canónica de NF- κ B en CTC de cáncer de mama. Actualmente sabemos que ambas vías pueden regular CTC. Es bien sabido que la supresión de la vía canónica de NF- κ B mediada por IKK β reduce significativamente las poblaciones de CTC, deteriora la capacidad de formación de mamoesferas, y reduce la tumorigenicidad ^{87,123,124}. Del mismo modo,

IKK α también contribuye a la auto-renovación de CTC. Un estudio mostró que los ratones que carecen de IKK α muestran retrasos en el desarrollo de tumores y las células troncales son incapaces de autorenovarse ¹²⁵.

En apoyo a nuestros resultados, un estudio reciente mostró que NIK/IKK α promueve la expansión de células basales y la capacidad de formación de mamoesferas en un modelo de ratón. La cascada de NIK-IKK α actúa como un regulador importante del inhibidor de cinasas dependiente de ciclina que entra en el núcleo y fosforila a p27 para estimular su exportación nuclear ⁹². Además, se ha demostrado recientemente que la inducción de la vía no canónica de NF- κ B a través de NIK regula la expresión JAG1 y expande la población de células troncales en cáncer de mama del subtipo basal ⁹⁴.

El mecanismo por el cual NIK regula el fenotipo troncal es poco conocido. Los resultados mostraron que NIK regula la expresión de genes relacionados con células troncales a través de la activación de la vía de NF- κ B y de ERK1/2. Los datos muestran que la modulación de los niveles de NIK afectan la fosforilación de ERK1/2, sin embargo, queda por ser establecido si la expresión forzada de NIK incrementa los niveles basales de ERK1/2 o solo induce la fosforilación de estas proteínas. Los datos obtenidos muestran que ambas proteínas son requeridas para regular el fenotipo de células troncales de cáncer de mama en la línea MCF7. Apoyando nuestros resultados, Dhawan et al, demostraron que la sobreexpresión transitoria de NIK provoca un aumento de la fosforilación de ERK1, mientras que la expresión de una proteína NIK dominante negativo reduce la fosforilación de ERK en células de melanoma ¹²⁶. Entre las moléculas reguladas por ERK1, se encuentran varios genes que se expresan en varios tipos de células troncales, tales como miR-21, EGR1 y GDF15. Recientemente se ha demostrado que miR21 y EGR1 desempeñan un papel crítico en la transición epitelio mesénquima (TEM) ¹²⁷, un proceso involucrado en la adquisición de propiedades troncales ¹²⁸. El término TEM se refiere a un programa celular y molecular mediante el cual las células epiteliales pierden ciertas características epiteliales como la adhesión célula-célula

y la polaridad apico-basal y adquieren otras características mesenquimales como movilidad, capacidad de invasión y resistencia a apoptosis ¹²⁹. En mama, se ha descrito que las células troncales con un fenotipo de TEM tienen altos niveles de miR-21. En estas células, el uso de un antagonista del miRNA revierte parcialmente el fenotipo TEM a través de la inactivación de las vías Akt y ERK1/2¹²⁷. De tal forma que la vía de ERK puede contribuir a la adquisición de propiedades troncales a través de la regulación de genes inductores de la TEM. EGR1 controla la proliferación de las células troncales ¹³⁰, la migración y el crecimiento tumoral ^{131,132}. EGR1 es regulado principalmente por las vías ERK1/2 y NF-κB ¹³³. De manera interesante, EGR1 participa en la TEM mediante la inhibición de E-cadherina a través de SNAIL ¹³⁴. El análisis de los microarreglos de expresión reveló que los genes blanco de EGR1 tales como GDF15 también están sobreexpresados en células con sobreexpresión de NIK. Estos resultados sugieren que NIK regula el fenotipo troncal a través de la inducción de genes involucrados en la TEM.

Debido a que NIK contribuye al potencial tumorigénico de CTC, su inhibición podría ser una manera eficaz para eliminar la población troncal y reducir la progresión tumoral. NIK no es una cinasa esencial para la activación canónica de NF-κB en condiciones basales, debido a esto, los inhibidores de NIK podría ser una estrategia más segura para bloquear la vía de NF-κB en cáncer de mama.

11. CONCLUSIONES

Los datos presentados en este trabajo, presentan pruebas contundentes de la participación de NIK en la regulación del fenotipo troncal. NIK regula la expresión de marcadores de células troncales y promueve la auto-renovación de las células.

Los resultados obtenidos muestran que las células troncales expresan componentes de la vía no canónica de NF- κ B como NIK, p52 y Relb; sugiriendo que la vía no canónica de NF- κ B a través de NIK regulan el fenotipo troncal. De manera interesante, la expresión de NIK impacta en el potencial clonogénico y tumorigénico de las líneas celulares de cáncer de mama.

El análisis de expresión génica demostró que NIK puede regular genes blanco implicados en el fenotipo troncal a través de la vía de señalización de ERK1/2. Sorprendentemente, la inhibición de ERK1/2 abate los efectos de NIK en la regulación del fenotipo troncal.

En muestras de pacientes con cáncer de mama, NIK se expresó en mayor medida en tumores de grado 3 y está asociado con el subtipo HER2. De manera interesante NIK se expresa generalmente en muestras de paciente positivas para ALDH.

Los datos obtenidos en este estudio, sugieren que la cinasa NIK es un atractivo marcador de células troncales en ambos tipos de tumores luminales, basales y HER2, y posiblemente, podría ser una importante diana terapéutica.

12.- REFERENCIAS

1. Bertram, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.* **21**, 167–223 (2000).
2. Stratton, M., Campbell, P. & Futreal, A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
3. Weinberg, R. A. The Nature in Cancer in *The Biology of Cancer* 31–69 (2014).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
6. Kang, R., Zhang, Q., Iii, H. J. Z., Lotze, M. T. & Tang, D. HMGB1 in Cancer: Good, Bad, or Both? *Clin. cancer Res.* **19**, 4046–4058 (2013).
7. WHO. Globocan 2012 - Home. *Globocan 2012* (2012). Available at: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
8. Knaul, F. M. *et al.* Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod. Health Matters* **16**, 113–123 (2008).
9. Aura, D. & Valle, E. *Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario.* (2017).
10. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* **66**, 7–30 (2016).
11. Arce, C. *et al.* Cáncer de Mama. *Cancerología* **6**, 77–86 (2011).
12. María, L., Asunción, D., González-lizarraga, M. & Ornelas-Aguirre, J. M. Recurrencia de cáncer de mama en mujeres del Noroeste de México. *Cir Ciruj* **77**, 179–185 (2009).
13. Richie, R. C. & Swanson, J. O. Breast cancer: a review of the literature. *J. Insur. Med.* **35**, 85–101 (2003).
14. Blog. (2014). Available at: http://www.caperay.com/blog/wp-content/uploads/2014/03/Science_DCIS.jpg.
15. Weigelt, B., Geyer, F. C. & Reis-Filho, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol. Oncol.* **4**, 192–208 (2010).

16. Hu, Z. *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* **7**, 96 (2006).
17. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
18. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R68 (2010).
19. Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J. & Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews* **38**, 698–707 (2012).
20. Creighton, C. J. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy* **6**, 289–297 (2012).
21. Onitilo, A. A., Engel, J. M., Greenlee, R. T. & Mukesh, B. N. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: Comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin. Med. Res.* **7**, 4–13 (2009).
22. Thike, A. A. *et al.* Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod. Pathol.* **23**, 123–33 (2010).
23. Rakha, E. a, Reis-Filho, J. S. & Ellis, I. O. Basal-like breast cancer: a critical review. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2568–81 (2008).
24. Winer, E. P. Breast Cancer. *Asco Abstract* (2015). doi:10.1093/med/9780199363315.003.0020
25. Pardal, R., Clarke, M. F. & Morrison, S. J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 895–902 (2003).
26. Yoo, Y. D. & Kwon, Y. T. Molecular mechanisms controlling asymmetric and symmetric self-renewal of cancer stem cells. *J. Anal. Sci. Technol.* **6**, 28 (2015).
27. Dalerba, P., Cho, R. W. & Clarke, M. F. Cancer Stem Cells: Models and Concepts. (2007). doi:10.1146/annurev.med.58.062105.204854
28. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–111 (2001).
29. Visvader, J. E. Cells of origin in cancer. *Nature* **469**, 314–22 (2011).
30. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–648 (1994).

31. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).
32. Ailles, L. E. & Weissman, I. L. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 460–466 (2007).
33. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3983–8 (2003).
34. Pece, S. *et al.* Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* **140**, 62–73 (2010).
35. Park, S. Y. *et al.* Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1–22 (2011).
36. Charafe-Jauffret, E. *et al.* Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.* **69**, 1302–13 (2009).
37. Park, S. Y. *et al.* Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 876–87 (2010).
38. Finetti, P., Cervera, N., Charafe-jauffret, E. & Buttarelli, M. How different are luminal A and basal breast cancers? *Int. J. Cancer* **124**, 1338–1348 (2009).
39. Al-Hajj, M. & Clarke, M. F. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* **23**, 7274–82 (2004).
40. Ricardo, S. *et al.* Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J. Clin. Pathol.* **64**, 937–46 (2011).
41. Ginestier, C. *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555–67 (2007).
42. Hadjimichael, C. *et al.* Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J. Stem Cells* **7**, 1150–84 (2015).
43. Sheridan, C. *et al.* CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* **8**, R59 (2006).

44. Cioce, M. *et al.* Mammosphere-forming cells from breast cancer cell lines as a tool for the identification of CSC-like and early progenitor-targeting drugs. *Cell Cycle* **9**, 2878–2887 (2010).
45. Abdullah, L. N. & Chow, E. K.-H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin. Transl. Med.* **2**, 3 (2013).
46. Thiagarajan, P. S. *et al.* Development of a fluorescent reporter system to delineate cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Stem Cells* **33**, 2114–2125 (2015).
47. Ma, I. & Allan, A. L. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev* **7**, 292–306 (2011).
48. Liu, S. & Zheng, P. High aldehyde dehydrogenase activity identifies cancer stem cells in human cervical cancer. *Oncotarget* **4**, 2462–2475 (2013).
49. Patrawala, L. *et al.* Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res.* **65**, 6207–6219 (2005).
50. Britton, K. M., Kirby, J. A., Lennard, T. W. J. & Meeson, A. P. Cancer stem cells and side population cells in breast cancer and metastasis. *Cancers* **3**, 2106–2130 (2011).
51. Qureshi-Baig, K., Ullmann, P., Haan, S. & Letellier, E. Tumor-Initiating Cells: a criTICal review of isolation approaches and new challenges in targeting strategies. *Mol. Cancer* **16**, 40 (2017).
52. Shaw, F. L. *et al.* A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **17**, 111–117 (2012).
53. Ma, L., Lai, D., Liu, T., Cheng, W. & Guo, L. Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **42**, 593–602 (2010).
54. Weiswald, L. B., Bellet, D. & Dangles-Marie, V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **17**, 1–15 (2015).
55. Hashimoto, N. *et al.* Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs. *BMC Cancer* **14**, 722 (2014).
56. Dreesen, O. & Brivanlou, A. H. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* **3**, 7–17 (2007).

57. Shostak, K. & Chariot, A. NF- κ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res.* **13**, 214 (2011).
58. Sen, R. & Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705–716 (1986).
59. Naugler, W. E. & Karin, M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 19–26 (2008).
60. Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, (2009).
61. Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 49–62 (2007).
62. Christian, F., Smith, E. & Carmody, R. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells* **5**, 12 (2016).
63. Smale, S. T. Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation. *Nat. Immunol.* **12**, 689–94 (2011).
64. Perkins, N. D. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 121–32 (2012).
65. Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**, 6706–16 (2006).
66. Lin, A. & Karin, M. NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 107–14 (2003).
67. Sun, S.-C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* **21**, 71–85 (2011).
68. Shih, V. F.-S., Tsui, R., Caldwell, A. & Hoffmann, A. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* **21**, 86–102 (2011).
69. Jost, P. J. & Ruland, J. Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: Mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* **109**, 2700–2707 (2007).
70. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**, 2195–224 (2004).
71. Qing, G., Qu, Z. & Xiao, G. Stabilization of basally translated NF-kappaB-inducing kinase (NIK) protein functions as a molecular switch of processing of NF-kappaB2 p100. *J. Biol. Chem.* **280**, 40578–82 (2005).
72. Aronsson, F. C. *et al.* The NIK protein kinase and C17orf1 genes:

Chromosomal mapping, gene structures and mutational screening in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Hum. Genet.* **103**, 340–345 (1998).

73. Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V & Wallach, D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* **385**, 540–4 (1997).
74. Zarnegar, B. J. *et al.* Noncanonical NF-jB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1 , cIAP2 , TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. **9**, 1371–1378 (2008).
75. Thu, Y. M. & Richmond, A. NF-kB inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 213–26 (2010).
76. Thu, Y. M. *et al.* NF-kB inducing kinase (NIK) modulates melanoma tumorigenesis by regulating expression of pro-survival factors through the β -catenin pathway. *Oncogene* **31**, 2580–92 (2012).
77. Yang, C. *et al.* Opposing putative roles for canonical and noncanonical NFkB signaling on the survival, proliferation, and differentiation potential of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **28**, 1970–80 (2010).
78. Cao, Y. *et al.* IKK alpha Provides an Essential Link between RANK Signaling and Cyclin D1 Expression during Mammary Gland Development. *Cell* **107**, 763–775 (2001).
79. Fata, J. E. *et al.* The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. **103**, 41–50 (2000).
80. Gonzalez-Suarez, E. *et al.* RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* **468**, 103–7 (2010).
81. Zhang, X. *et al.* Expression of NF-kB-inducing kinase in breast carcinoma tissue and its clinical significance. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 14824–9 (2015).
82. Yamaguchi, N. *et al.* Constitutive activation of nuclear factor-kappaB is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci.* **100**, 1668–74 (2009).
83. Yamamoto, M. *et al.* Epigenetic alteration of the NF-kB-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. *Cancer Sci.* **101**, 2391–7 (2010).
84. Vazquez-Santillan, K., Melendez-Zajgla, J., Jimenez-Hernandez, L., Martínez-

- Ruiz, G. & Maldonado, V. NF- κ B signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target? *Cell. Oncol. (Dordr)*. **38**, 327–39 (2015).
85. Murohashi, M. *et al.* Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br. J. Cancer* **102**, 206–12 (2010).
 86. Shipitsin, M. *et al.* Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* **11**, 259–73 (2007).
 87. Zhou, J. *et al.* NF-kappaB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **111**, 419–27 (2008).
 88. Ju, J. *et al.* CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF- κ B signaling in CD44-expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis* **32**, 1474–83 (2011).
 89. Liu, M. *et al.* The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res.* **70**, 10464–73 (2010).
 90. Cao, Y., Luo, J. -I. & Karin, M. I κ B kinase alpha kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 15852–15857 (2007).
 91. Schramek, D. *et al.* Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. *Nature* **468**, 98–102 (2011).
 92. Zhang, W. *et al.* A NIK-IKK α Module Expands ErbB2-Induced Tumor-Initiating Cells by Stimulating Nuclear Export of p27/Kip1. *Cancer Cell* 1–13 (2013). doi:10.1016/j.ccr.2013.03.012
 93. Palafox, M., Ferrer, I. & Pellegrini, P. RANK Induces Epithelial – Mesenchymal Transition and Stemness in Human Mammary Epithelial Cells and Promotes Tumorigenesis and Metastasis. *Cancer Res.* **72**, 2879–2888 (2012).
 94. Yamamoto, M. *et al.* NF- κ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat. Commun.* **4**, 2299 (2013).
 95. Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P. & Pospisek, M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal. Biochem.* **336**, 46–50 (2005).
 96. Thornton, B. & Basu, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **39**, 145–154 (2011).

97. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
98. Arziman, Z., Horn, T. & Boutros, M. E-RNAi: A web application to design optimized RNAi constructs. *Nucleic Acids Res.* **33**, (2005).
99. Hu, Y. & Smyth, G. K. ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J. Immunol. Methods* **347**, 70–78 (2009).
100. Honeth, G. *et al.* The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* **10**, R53 (2008).
101. Natarajan, T. G. & FitzGerald, K. T. Markers in normal and cancer stem cells. *Cancer Biomark.* **3**, 211–31 (2007).
102. Ling, L., Cao, Z. & Goeddel, D. V. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3792–7 (1998).
103. Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. & Goeddel, D. V. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* **278**, 866–9 (1997).
104. Thomas Brabletz, Andreas Jung, Simone Spaderna, F. H. & T. K. Migrating cancer stem cells — an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 744–749 (2005).
105. Liu, H. *et al.* Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18115–20 (2010).
106. Campbell, L. L. & Polyak, K. Breast Tumor Heterogeneity. **6**, 2332–2338 (2007).
107. Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–10874 (2001).
108. Yeo, S. K., Wen, J., Chen, S. & Guan, J. L. Autophagy differentially regulates distinct breast cancer stem-like cells in murine models via EGFR/Stat3 and Tgf??/Smad signaling. *Cancer Res.* **76**, 3397–3410 (2016).
109. Liu, S. *et al.* Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports* **2**, 78–91 (2014).

110. Biswas, D. K. *et al.* NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10137–42 (2004).
111. Yeo, S. K., French, R., Spada, F. & Clarkson, R. Opposing roles of Nfkb2 gene products p100 and p52 in the regulation of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **162**, 465–477 (2017).
112. Merkhofer, E. C., Cogswell, P. & Baldwin, A. S. Her2 activates NF-kappaB and induces invasion through the canonical pathway involving IKKalpha. *Oncogene* **29**, 1238–48 (2010).
113. Biswas, D. K., Cruz, A. P., Gansberger, E. & Pardee, A. B. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8542–8547 (2000).
114. Galang, C. K. *et al.* Oncogenic Neu/ErbB-2 increases Ets, AP-1, and NF-??B-dependent gene expression, and inhibiting Ets activation blocks Neu-mediated cellular transformation. *J. Biol. Chem.* **271**, 7992–7998 (1996).
115. Habib, a a *et al.* The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase to activate NF-kappa B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome. *J. Biol. Chem.* **276**, 8865–74 (2001).
116. Korkaya, H., Paulson, a, lovino, F. & Wicha, M. S. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* **27**, 6120–30 (2008).
117. Ithimakin, S. *et al.* HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: Implications for efficacy of adjuvant Trastuzumab. *Cancer Res.* **73**, 1635–1646 (2013).
118. Vesuna, F., Lisok, A., Kimble, B. & Raman, V. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia* **11**, 1318–28 (2009).
119. Ju, J. H. *et al.* CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF-??B signaling in CD44-expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis* **32**, 1474–1483 (2011).
120. Ramakrishnan, P., Wang, W. & Wallach, D. Receptor-Specific Signaling for Both the Alternative and the Canonical NF- B Activation Pathways by NF- B-Inducing Kinase. *Immunity* **21**, 477–489 (2004).
121. Mahony, A. O., Lin, X. I. N. & Geleziunas, R. Activation of the Heterodimeric I

- B Kinase γ (IKK γ)-IKK α Complex Is Directional : IKK γ Regulates IKK α under Both Basal and Stimulated Conditions. **20**, 1170–1178 (2000).
122. Kallifatidis, G. *et al.* Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signalling. *Gut* **58**, 949–63 (2009).
 123. Liu, M. *et al.* The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res.* **70**, 10464–73 (2010).
 124. Hinohara, K. *et al.* ErbB receptor tyrosine kinase / NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6584–6589 (2012).
 125. Cao, Y., Luo, J.-L. & Karin, M. IkappaB kinase alpha kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15852–7 (2007).
 126. Dhawan, P. & Richmond, A. A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 7920–7928 (2002).
 127. Han, M. *et al.* Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN. *PLoS One* **7**, (2012).
 128. Mani, S. a *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–15 (2008).
 129. Sarrió, D. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* **68**, 989–97 (2008).
 130. Min, I. M. *et al.* The Transcription Factor EGR1 Controls Both the Proliferation and Localization of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2**, 380–391 (2008).
 131. Mitchell, A., Dass, C. R., Sun, L. Q. & Khachigian, L. M. Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNazymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3065–3069 (2004).
 132. Tarcic, G. *et al.* EGR1 and the ERK-ERF axis drive mammary cell migration in response to EGF. *Faseb J* **26**, 1582–1592 (2012).
 133. Thyss, R. *et al.* NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *EMBO J.* **24**, 128–37 (2005).

134. Jeon, H. M., Lee, S. Y., Ju, M. K., Park, H. G. & Kang, H. S. Early Growth Response 1 Induces Epithelial-to-mesenchymal Transition via Snail. *J. Life Sci.* **23**, 970–977 (2013).

13.- ANEXOS

13.1.- Secuencia de Oligonucleótidos.

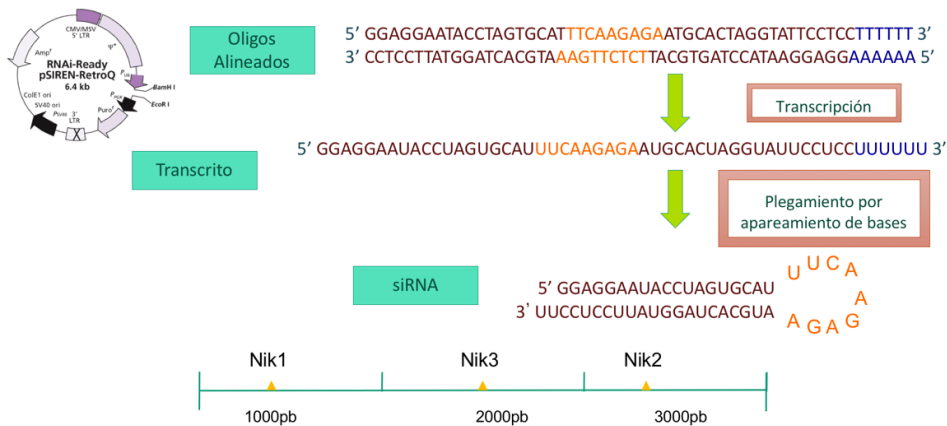
Oligonucleótidos utilizados para amplificar productos específicos mediante PCR en tiempo real. La tabla muestra la secuencia y la temperatura de fusión para cada par de oligos.

Nombre	Oligonucleótidos	Secuencia	TM
ALDH1A1	Forward	TGTTAGCTGATGCCGACTTG	56
	Reverse	TTCTTAGCCCGCTCAACT	
ALDH1A3	Forward	GCATACCGTGAAGGGCG	57
	Reverse	GCTCTCTGGGCTATTGATTCTGTC	
ALDH8A1	Forward	CAGGCTACTTTATGCTTCCCAC	55
	Reverse	GCTCTTTCAATCACCTCCTCT	
OCT4	Forward	ACATCAAAGCTCTGCAGAAAGAAC	56
	Reverse	CTGAATACCTTCCCAAATAGAACCC	
SOX2	Forward	AGGAGTTGTCAAGGCAGAG	56
	Reverse	CCGCCGATGATTGTTATT	
NANOG	Forward	AGGCAAACAACCCACTTCTG	57
	Reverse	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	
NIK	Forward	TTAGAAACACCCCGCAGTTC	56
	Reverse	TCCACACGTGGTTCAGACAT	
TBP	Forward	TGCCACACCCTGCAACTCAACA	60
	Reverse	CCCCTTCATTGACCTCAACT	
EGR1	Forward	AGAGCCGCACCCAGCAGCCT	60
	Reverse	GGGCAAGCGTAAGGGCGTTCGT	
DUSP6	Forward	GTGACAACAGGGTTCCAGCACAGCA	60
	Reverse	GGCCAGACACATTCCAGCAAGGAGG	
TCN1	Forward	TGGGAACTACTCAAC CGCCGA	60
	Reverse	GGTCAGAGCCAGGACAGCCA	
MAP2K6	Forward	TCTGACATTTGGAGTCTGGGCATCA	60
	Reverse	GTCTGCTGGGAGTTGTGGCG	
GDF15	Forward	TGAGACACCCGATTCTGCCCAA	60
	Reverse	CAGCCCCCGAGTCCCAAGA	
EGR1	Forward	AGAGCCGCACCCAGCAGCCT	60
	Reverse	GGGCAAGCGTAAGGGCGTTCGT	
CSPG4	Forward	GCCTTACCAACTTCTCCTCCTCT	60
	Reverse	TGACGTTCACTACGGCTGATGC	
ERK2	Forward	CTGTTCCCAAATGCTGACTCCAAA	60
	Reverse	GCCAGAGCCTGTTCTACTTCAATC	
ERK1	Forward	CATTCTGGGCATCCTGGGCTC	60
	Reverse	GGAGGGCAGAGACTGTAGGTAGTTT	

13.2.- Diseño y clonación de shRNAs para el gen NIK(MAP3K14).

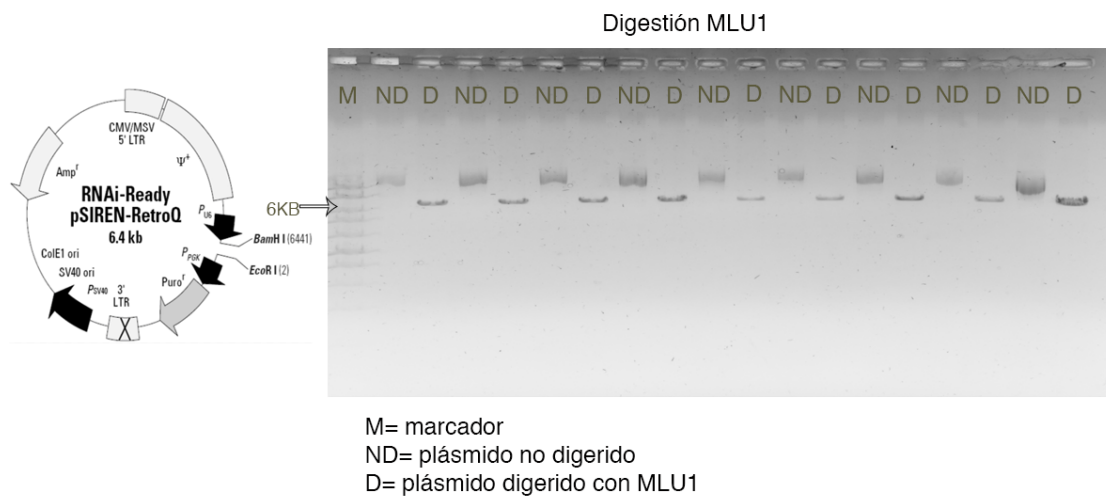
Los shRNAs se diseñaron con el programa RNAi designer de Clontech y la eficiencia de cada shRNA fue evaluada con el programa e-RNAi. Los shRNAs se diseñaron con un sitio de restricción a BAMH1 y EcoRI compatible con los sitios de restricción del vector pSIREN. Cada shRNA está compuesto por dos cadenas de oligonucleótidos complementarias. La cadena sentido contiene el sitio de restricción a BAMH1 y la cadena antisentido contiene el sitio de restricción a EcoRI. Además de estos sitios, cada cadena contiene la secuencia sentido, una secuencia lazo, la secuencia antisentido, una secuencia de termino y el sitio de restricción a la enzima Mlu1. Cada Oligo fue alineado y clonado en el vector pSIREN, el sitio de restricción de MLU1 sólo se encuentra en el shRNA y no en el vector, por lo tanto, este sitio es útil para determinar si el shRNA está presente. Cuando el oligo es transcrito por la maquinaria de la célula, la cadena forma la estructura clásica de tallo y lazo de los shRNAs.

Cadena	BamH1	R	Secuencia Blanco	Sentido	hairping	Secuencia antisentido	Termino	Mlu1	EcoR1	shRNA	
Sentido	5'	GATCC	GGCGAGAGTCTTGATCAGATTTC	CAAGAGAATCTGATCAAGACTCTCGG	TTTTTT	ACGGCG	G	-----	3'	NIK1	
Antisen	3'	-----	GGGCTCTCAGAACTAGTCTA	AAGTTCTCTTAGACTAGTTCTGAGAGCC	AAAAAA	TGGGG	CTTAA	-----	5'	NIK1	
Sentido	5'	GATCC	GGGTCAACATCTTCATGGATTCA	AGAGATCCATGAAGATGTTGACCC	TTTTTT	ACGGCG	G	-----	3'	NIK2	
Antisen	3'	-----	GCCAGTTGTAGAAGTACCTA	AAGTTCTCTAGGTA	CTTCAACTGGG	AAAAAA	TGGGG	CTTAA	-----	5'	NIK2
Sentido	5'	GATCC	GGAGGAATACCTAGTGCATTTCA	AGAGAAATGCACTAGGTATTCCTCC	TTTTTT	ACGGCG	G	-----	3'	NIK3	
Antisen	3'	-----	GCTCCTTATGGATCACGTA	AAGTTCTCTTACGTGATCCATAAGGAGG	AAAAAA	TGGGG	CTTAA	-----	5'	NIK3	



13.3.- Digestión del vector pSIREN para verificar la clonación del shRNA.

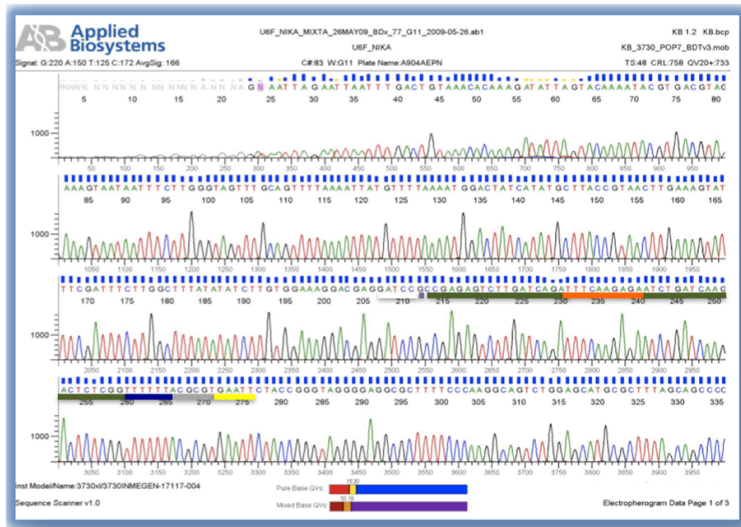
Cada shRNA contiene un sitio de restricción para la enzima MLU1, el cual está ausente en el vector pSIREN. De esta forma, la clonación de los shRNA fue verificada mediante la digestión con la enzima MLU1. La enzima MLU1 corta en el sitio de restricción provocando que el plásmido se linearice y migre de manera diferente al plásmido no digerido. En el gel de agarosa se observa que el plásmido linearizado es mayor a 6kb.



13.4.- Secuencia de los shRNA clonados en el vector pSIREN

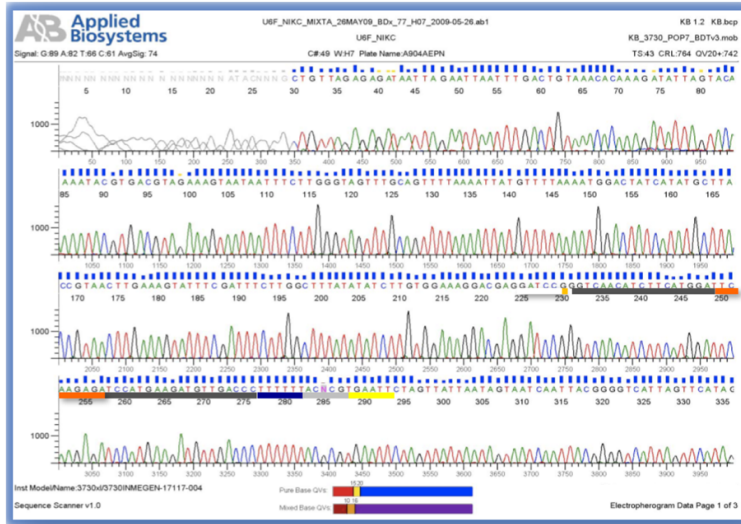
Los electroferogramas representan la secuencia del plásmido pSIREN conteniendo al shNIK1(A) y al shNIK2 (B). La imagen muestra la secuencia completa (64pB) de cada shRNA. El color verde representa la secuencia del shRNA y el color naranja representa la secuencia lazo.

A



← shNIK1

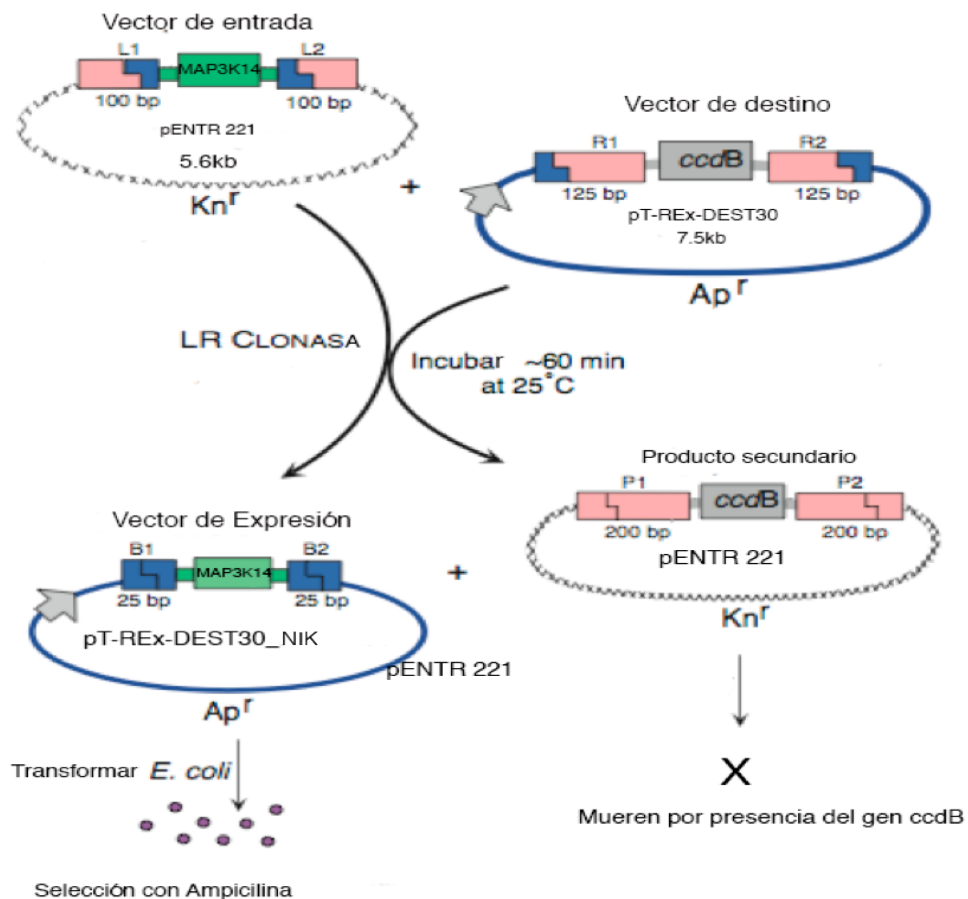
B



← shNIK2

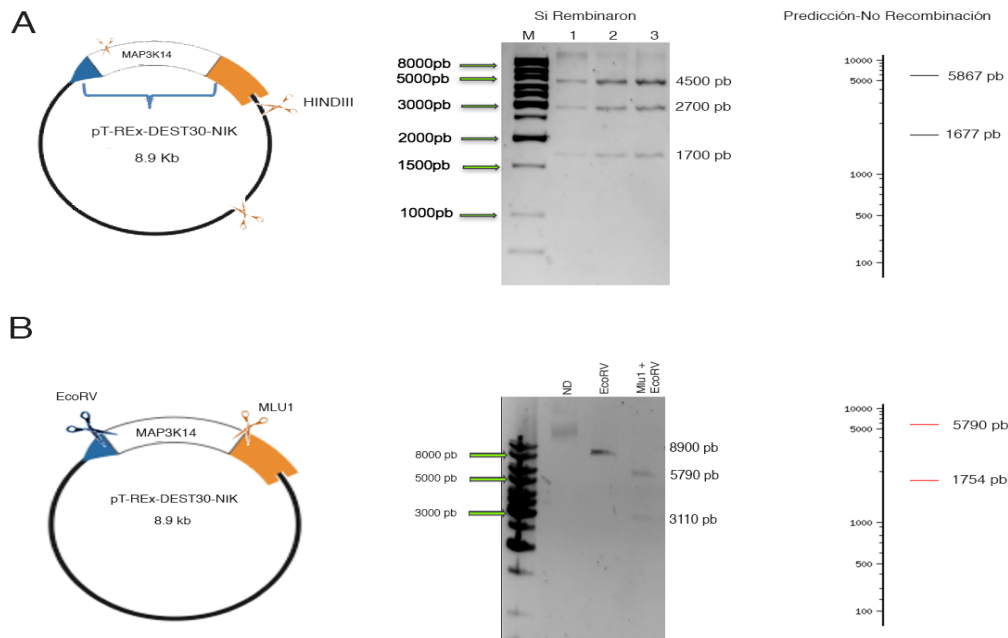
13.5. Estrategia para generar un vector de expresión con el ORF del gen MAP3K14.

El vector fue generado mediante recombinación de dos vectores con la enzima LR clonasa. El vector de entrada pENTR 221 contiene el ORF del gen MAP3K14 y tiene resistencia a kanamicina, el vector de destino pT-REX-DEST30 tiene resistencia a ampicilina y contiene el gen letal *ccdB*, el cual produce una toxina que impide el crecimiento bacteriano. La recombinación de los vectores da lugar a un vector de expresión pTREx-DEST30 resistente a ampicilina, el cual contiene el ORF del gen MAP3K14 y a un vector pENTR 221 que contiene el gen letal *ccdB*. De esta forma, las colonias bacterianas que crecen en medio con ampicilina serán únicamente las que tengan el plásmido recombinado.



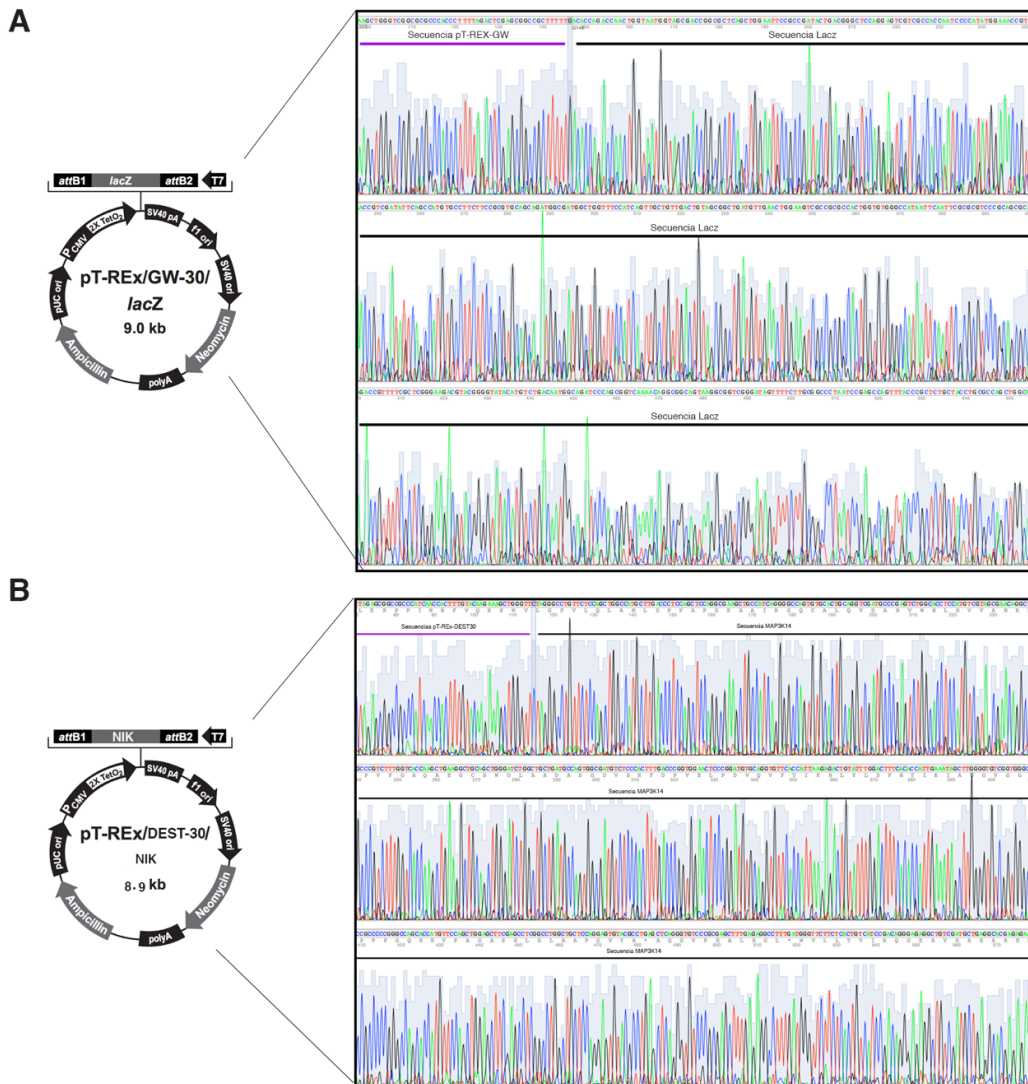
13.6. Digestión del vector pT-REx-DEST30 para verificar la recombinación.

El plásmido pT-REx-DEST30 (7.5kB) fue recombinado con un vector de entrada que contiene el ORF del gen MAP3K14. El producto de la recombinación fue un vector de expresión pT-REx-DEST30 con el ORF de MAP3K14, el cual es de 8.9kB. (A) Para corroborar la recombinación, el plásmido pT-REx-DEST30-NIK fue digerido con la enzima HindIII. La enzima reconoce el sitio de restricción AAGCTT, el cual está presente en dos sitios del vector y dentro de la secuencia del gen MAP3K14. De tal forma que, si el vector se recombinó adecuadamente, se observarán 3 bandas de 4500, 2700 y 1700 pb como se muestra en la figura A. Cuando no hay recombinación, la digestión con HINDIII únicamente cortará en los dos sitios de restricción del vector como se muestra en el panel derecho de la figura A. (B) El vector pT-REx-DEST30-NIK se digirió con las enzimas EcoRV y Mlu1 para liberar al fragmento correspondiente al gen MAP3K14. Estas enzimas reconocen un sitio de restricción aproximadamente al inicio y al final del gen recombinado, de tal forma que la digestión dará dos productos de 5790 y 3110 pb. Cabe destacar que la digestión con la enzima EcoRV indica que el tamaño del vector recombinado es de aproximadamente 8900pb. En el panel derecho de la figura B se observa que, en caso de no haber recombinación, la digestión con EcoRV y Mlu1 dará lugar a dos productos de 5790 y 1754 pb. El producto de 1754pb correspondería a la secuencia del gen CcdB y del gen de resistencia cloranfenicol y no a la secuencia de NIK.



13.7. Secuencia de los vectores de expresión

Los electroferogramas representan la secuencia del plásmido pT-REx/Gw-30/lacZ (A) o el plásmido pT-REx-DEST30-NIK (B). El vector pT-REx/Gw-30 contiene el ORF del gen LacZ, mientras que el vector pT-REx/DEST30-NIK contiene el ORF del gen MAP3K14.



13.8. Genes diferencialmente expresados en células MCF7 que sobreexpresan NIK.

Gen	Definición	Tasa cambio	Valor de p
ACRC	acidic repeat containing	-2.997798332	0.000253853
TSNAXIP1	translin-associated factor X interacting protein 1	-2.938635998	0.008106129
PDE5A	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	-2.763263867	0.025233844
FOXP2	forkhead box P2	-2.70920582	0.002484034
MUC4	mucin 4, cell surface associated	-2.592534762	0.005874116
SCG3	secretogranin III	-2.509534883	0.021167533
EFCAB5	EF-hand calcium binding domain 5	-2.324257643	0.000124181
C5orf60	chromosome 5 open reading frame 60	-2.298995008	0.019017708
CYP4F25P	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 25, pseudogene	-2.275026473	0.002286685
CCRL1	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	-2.270093416	0.004832252
INS	insulin	-2.190474369	0.016429673
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	-2.187303375	0.005396647
ADORA3	adenosine A3 receptor	-2.170413611	0.039321949
IGLV2-23	immunoglobulin lambda variable	-2.113254712	0.008531093
GRM6	glutamate receptor, metabotropic 6	-2.111819699	0.026817403
CDH18	cadherin 18, type 2	-2.082678284	0.007945737
GBGT1	globoside alpha-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1	-2.048682856	0.000232321
ITGA8	integrin, alpha 8	-2.044686982	0.00810342
PRH2	proline-rich protein HaeIII subfamily 2	-2.027146001	0.009538984
CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	-2.00904981	0.016221972
GPM6B	glycoprotein M6B	-2.00784792	0.03724353
KIAA1045	KIAA1045	-1.976146632	0.007334539
RN7SL472P	RNA, 7SL, cytoplasmic 472, pseudogene	-1.973108102	0.00014591
LEPREL1	leprecan-like 1	-1.964104468	0.025005985
TPD52L3	tumor protein D52-like 3	-1.952401818	0.012042181
GLB1L3	galactosidase, beta 1-like 3	-1.926179592	0.004089145
SERPINB3	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	-1.924099403	0.051862256
NEFL	neurofilament, light polypeptide	-1.904413375	0.000149016
ALK	anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase	-1.890074804	0.03084883
TEX12	testis expressed 12	-1.885481942	0.003118034
CCL26	chemokine (C-C motif) ligand 26	-1.86276197	0.03401562
PTPRN	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	-1.853929864	0.050321571
PLCL2	phospholipase C-like 2	-1.834573874	0.009271919
snoU13	Small nucleolar RNA U13	-1.83028714	7.96E-05

SULT1C3	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 3	-1.829610647	0.000149746
CATSPERB	catsper channel auxiliary subunit beta	-1.808865326	0.017453792
PDE6B	phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta	-1.806169556	0.023858459
GDF15	growth differentiation factor 15	1.523377332	0.000567534
BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	1.50941989	0.003332765
DEPDC4	DEP domain containing 4	1.800686047	0.002331078
ZNF595	zinc finger protein 595	1.805241271	0.000168266
AICDA	activation-induced cytidine deaminase	1.834843056	0.002187369
ENKUR	enkurin, TRPC channel interacting protein	1.847396235	0.014241283
UGT1A6	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6	1.856561792	0.026398801
BTBD8	BTB (POZ) domain containing 8	1.862180174	0.011850701
TLDC1	TBC/LysM-associated domain containing 1	1.864019131	0.008675778
PYHIN1	pyrin and HIN domain family, member 1	1.880709035	0.03904283
FAM98B	family with sequence similarity 98, member B	1.90663894	0.019620982
U6	U6 spliceosomal RNA	1.90878772	0.008523232
CEP170P1	centrosomal protein 170kDa pseudogene 1	1.924512889	0.001725804
MAP3K14-AS1	MAP3K14 antisense RNA 1	1.944119185	5.66E-05
ATP8B5P	ATPase, class I, type 8B, member 5, pseudogene	1.94815257	0.015025654
MRPL30	mitochondrial ribosomal protein L30	1.953222993	0.011717307
CTSE	cathepsin E	1.958464983	0.005720327
Y_RNA	Y RNA	1.959383776	0.000963941
SKAP1	src kinase associated phosphoprotein	1.965296066	0.004595609
SH3BP2	SH3-domain binding protein 2	1.978252618	0.00273059
ELMOD3	ELMO/CED-12 domain containing 3	1.989620577	0.002571864
ZKSCAN3	zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	1.991713312	0.006112225
ADPRM	ADP-ribose/CDP-alcohol diphosphatase, manganese-dependent	1.993306183	0.009358243
NCF1	neutrophil cytosolic factor 1	1.99735393	0.002575318
ANKRD18B	ankyrin repeat domain 18B	2.000429797	0.010149451
MIR21	microRNA 21	2.010043421	0.001670391
EML2	echinoderm microtubule associated protein like 2	2.051818806	0.037724416
TTC18	tetratricopeptide repeat domain 18	2.11207344	0.00159627
SLC12A6	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 6	2.144839955	0.011965818
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	2.156315579	0.000486362
IFNA7	interferon, alpha 7	2.185242419	0.014898222
SSBP1	single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial	2.197642425	0.007923309
SSUH2	ssu-2 homolog (C. elegans)	2.243788458	0.005073442
CCDC158	coiled-coil domain containing 158	2.271969289	0.017940798

TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	2.294436691	0.000296253
IGLV2-11	immunoglobulin lambda variable 2-11	2.350845945	0.007979251
CGRRF1	cell growth regulator with ring finger domain 1	2.423042987	0.036436367
TCP11L1	t-complex 11, testis-specific-like 1	2.448389919	3.08E-05
COL5A2	collagen, type V, alpha 2	2.499783814	0.001452101
EGR1	early growth response 1	2.527017812	1.72E-05
TRAJ17	T cell receptor alpha joining 17	2.550658935	0.014304261
CCPG1	cell cycle progression 1	2.874783545	0.048506819
MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	10.76089871	2.27E-07

13.9. Genes diferencialmente expresados en células deficientes en NIK.

Gen	Definición	Tasa de cambio	Valor de P
PRKG1	protein kinase, cGMP-dependent, type I	-2.520092461	1.55E-05
OC90	Otoconin-90	-2.487747391	0.002698203
IGLV4-3	immunoglobulin lambda variable 4-3	-2.444794721	0.000335441
ALLC	allantoicase	-2.258502744	0.005631608
NEFL	neurofilament, light polypeptide	-2.248994293	0.006125414
CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4	-2.220477573	0.008242372
MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	-2.148614509	0.00686966
DENND3	DENN/MADD domain containing 3	-2.102122387	0.014025744
LEPREL1	leprecan-like 1	-2.067513381	0.005735957
CPLX1	complexin 1	-2.001511632	0.015089237
GLB1L3	galactosidase, beta 1-like 3	-1.986285953	0.000152846
NXF3	nuclear RNA export factor 3	-1.931346028	0.002604077
TEX12	testis expressed 12	-1.914516375	0.000801005
CCDC150	coiled-coil domain containing 150	-1.902755249	0.015637514
CCRL1	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	-1.881517446	0.000412245
C6	complement component 6	-1.877027777	0.001394614
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	-1.876030565	0.000512159
TPD52L3	tumor protein D52-like 3	-1.873855882	0.010192919
CHRNA7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal)	-1.844338332	0.000130025
AC013269.5	Uncharacterized protein	-1.827686126	0.006476783
AC140481.2	Uncharacterized protein	-1.827686126	0.006476783
RYBP	RING1 and YY1 binding protein	1.825957686	0.000483636
SUMF1	sulfatase modifying factor 1	1.829762837	0.005893955
SSBP1	single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial	1.83046899	0.007488112
OLFM3	olfactomedin 3	1.863717679	0.014594876
MT-TT	mitochondrially encoded tRNA threonine	1.87272189	0.000123071
TCP11L1	t-complex 11, testis-specific-like 1	1.881287057	0.002615535
U6	U6 spliceosomal RNA	1.885316407	0.001065489
PRG4	proteoglycan 4	1.913008565	0.003799423
DNAH14	dynein, axonemal, heavy chain 14	1.913888345	0.005696986
U6	U6 spliceosomal RNA	1.923352684	0.000749655
SLC4A5	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 5	1.945727939	0.001113093
CCDC129	coiled-coil domain containing 129	1.946438372	0.004677811
WDR19	WD repeat domain 19	1.953362898	0.002967937
SSUH2	ssu-2 homolog	1.978769179	0.014936233
U6	U6 spliceosomal RNA	1.996338917	0.012040764
RNY1P5	RNA, Ro-associated Y1 pseudogene 5	2.006183169	0.012311836

TRDN	triadin	2.006973638	0.001042032
CDC14B	cell division cycle 14B	2.041370902	0.000104669
CYP2D6	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6	2.047996619	0.00296561
UBAC2	UBA domain containing 2	2.052122233	0.000566799
BTBD9	BTB (POZ) domain containing 9	2.065412582	0.003121109
IL7	interleukin 7	2.069506338	1.12E-05
ANGPTL1	angiopoietin-like 1	2.094167249	0.012606112
ACTR3B	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)	2.135839641	0.000273097
ATP8B5P	ATPase, class I, type 8B, member 5, pseudogene	2.14827696	0.001855622
SOCS6	suppressor of cytokine signaling 6	2.212969141	0.003464457
GBA3	glucosidase, beta, acid 3 (cytosolic)	2.259363919	0.012010093
NDUFA5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa	2.438972233	0.005192536
STON1-GTF2A1L	STON1-GTF2A1L readthrough	2.441644791	7.44E-05
GNAI1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	2.567207661	0.000516532
BOC	BOC cell adhesion associated, oncogene regulated	2.707872854	0.000342732
TRAV1-2	T cell receptor alpha variable 1-2	2.830257532	0.005508257

14.- ARTÍCULOS

1.- **Vazquez-Santillan, K.** *et al.* NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. *Sci Rep.* **6**, 37340 (2016).

2.- **Vazquez-Santillan, K.**, Melendez-Zajgla, J., Jimenez-Hernandez, L., Martínez-Ruiz, G. & Maldonado, V. NF-κB signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target? *Cell. Oncol. (Dordr).* **38**, 327–39 (2015).

3.- Pruefer F, **Vazquez-Santillan K**, Muñoz-Galindo L, Cruz-Colin JL, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. TIMP4 modulates ER-α signalling in MCF7 breast cancer cells. *Folia Biol (Czech Republic).* 62(2):75–81 (2016).

4.- Lizarraga F, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, **Vazquez-Santillan K**, Bahena-Ocampo I, Schwarz-Cruz y Celis A, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) regulates stemness in cervical cancer cells. *Mol Carcinog.* 55(12):1952–61 (2016).

5.- Victoria-Acosta G, **Vazquez-Santillan K**, Jimenez-Hernandez L, Muñoz-Galindo L, Maldonado V, Martinez-Ruiz GU, et al. Epigenetic silencing of the XAF1 gene is mediated by the loss of CTCF binding. *Sci Rep.* 5:14838 (2015).

6.- Lizarraga F, Ceballos-Cancino G, Espinosa M, **Vazquez-Santillan K**, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 triggers apoptosis in cervical cancer cells. *PLoS One.* 10(8):1–10 (2015).

7.- Martinez-ruiz GU, **Vazquez-Santillan KI**, Victoria-acosta G. 4. Cervical cancer and apoptosis. In: *Cervical Cancer: From Public Health to Molecular Pathogenesis.* p. 69–87 (2015).

8.- Martinez-Ruiz GU, Victoria-Acosta G, **Vazquez-Santillan KI**, Jimenez-Hernandez L, Muñoz-Galindo L, Ceballos-Cancino G, et al. Ectopic expression of new alternative splice variant of Smac / DIABLO increases mammospheres formation. *Int J Clin Exp Pathol.* 7(9):5515–26 (2014).

9.- Ávila-Moreno F, Armas-López L, Álvarez-Moran AM, López-Bujanda Z, Ortiz-Quintero B, Hidalgo-Miranda A, Urrea-Ramírez F, Vázquez-Manríquez E, Peña-Mirabal E, Morales-Gómez J, Vázquez-Minero JC, Téllez-Becerra JL, Ramírez-Mandoza R, Ávalos-Bracho A, de Alba EG, **Vazquez-Santillan K**, Maldonado-Lagunas V, Santillán-Doherty P, Piña-Sánchez P, Zúñiga-Ramos J. Overexpression of MEOX2 and TWIST1 is associated with H3K27me3 levels and determines lung cancer chemoresistance and prognosis. *PLoS One.* 9(12) (2014).

10.- Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Pedamallu Cs, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, Cherniack AD, Ambrogio L, Cibulskis K, Bertelsen B, Romero-Cordoba S, Treviño V, **Vazquez-Santillan K**, Guadarrama AS, Wright AA, Rosenberg MW, Duke F, Kaplan B, Nickerson E, Walline HM, Lawrence MS, Stewart C, Carter SL, McKenna A, Rodríguez-Sanchez IP, Espinosa-Castilla M, Woie K, Bjorge L, Wik E, Halle MK, Hoivik EA, Krakstad C, Gabiño NB, Gómez-Macías Gs, Valdez-Chapa LD, Garza Rodríguez ML, Maytorena G, Vazquez J, Rodea C, Cravioto A, Cortes ML, Greulich H, Crum CP, Neuberg DS, Hidalgo-Miranda A, Escareno CR, Akslen LA, Carey TE, Vintermyr OK, Gabriel SB, Barrera-Saldaña HA, Melendez-Zajgla J, Getz G, Salvesen HB, Meyerson M. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 506(7488):371–5. (2014).

11.- López-Romero R, Iglesias-Chiesa C, Alatorre B, **Vázquez K**, Piña-Sánchez P, Alvarado I, et al. HPV frequency in penile carcinoma of Mexican patients: Important contribution of HPV16 european variant. *Int J Clin Exp Pathol*. 6(7):1409–15. (2013).

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer

Karla Vazquez-Santillan¹, Jorge Melendez-Zajgla¹, Luis Enrique Jimenez-Hernandez¹, Javier Gaytan-Cervantes¹, Laura Muñoz-Galindo¹, Patricia Piña-Sanchez², Gustavo Martinez-Ruiz¹, Javier Torres³, Patricia Garcia-Lopez⁴, Carolina Gonzalez-Torres¹, Victor Ruiz⁵, Federico Avila-Moreno⁶, Marco Velasco-Velazquez⁷, Mayra Perez-Tapia⁸ & Vilma Maldonado¹

Received: 15 February 2016

Accepted: 18 October 2016

Published: 23 November 2016

Breast cancer stem cells (BCSCs) overexpress components of the Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling cascade and consequently display high NF- κ B activity levels. Breast cancer cell lines with high proportion of CSCs exhibit high NF- κ B-inducing kinase (NIK) expression. The role of NIK in the phenotype of cancer stem cell regulation is poorly understood. Expression of NIK was analyzed by quantitative RT-PCR in BCSCs. NIK levels were manipulated through transfection of specific shRNAs or an expression vector. The effect of NIK in the cancer stem cell properties was assessed by mammosphere formation, mice xenografts and stem markers expression. BCSCs expressed higher levels of NIK and its inhibition through small hairpin (shRNA), reduced the expression of CSC markers and impaired clonogenicity and tumorigenesis. Genome-wide expression analyses suggested that NIK acts on ERK1/2 pathway to exert its activity. In addition, forced expression of NIK increased the BCSC population and enhanced breast cancer cell tumorigenicity. The *in vivo* relevance of these results is further supported by a tissue microarray of breast cancer samples in which we observed correlated expression of Aldehyde dehydrogenase (ALDH) and NIK protein. Our results support the essential involvement of NIK in BCSC phenotypic regulation via ERK1/2 and NF- κ B.

Several reports have shown that tumors contain subpopulations of Cancer Stem Cells (CSCs) that can initiate and sustain tumor growth¹. CSCs self-renew by generating unlimited copies and also give rise to mature non-stem cell progeny through differentiation, thus producing phenotypically different cells^{1,2}. Breast cancer stem cells are classically defined by CD44 (Cluster of Differentiation antigen-44) positive and low or absent levels of CD24 (Cluster of Differentiation antigen-24) expression (CD44⁺/CD24^{-/low}). Xenotransplant assays have revealed that as few as 100 cells with the CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype can form tumors in immunodeficient mice³. Breast Cancer Stem Cells (BCSCs) also exhibit high levels of Wnt, Notch, Hedgehog, JAK/STAT and Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activity; these pathways regulate self-renewal and differentiation processes⁴⁻⁶.

NF- κ B refers to a family of transcription factors that control the expression of many genes related to immune responses, survival, proliferation, angiogenesis, and metastasis⁷. The NF- κ B family consists of the following five transcription factors: RelA (p65), RelB, c-Rel, p100/p52, and p105/p50; these factors can homo or heterodimerize to allow DNA binding and activate transcription. Two main signaling pathways, the canonical, and non-canonical NF- κ B pathways activate NF- κ B; both pathways rely on signals that induce the phosphorylation and subsequent degradation of NF- κ B inhibitors (I κ B proteins). After degradation of NF- κ B inhibitors, the NF- κ B pathway is activated by translocation of NF- κ B dimers. Canonical NF- κ B pathway mainly induces the translocation of the p50:p65 dimer, while the non-canonical NF- κ B pathway primarily triggers p52:RelB dimer translocation through NF- κ B-inducing kinase (NIK)^{8,9}.

¹Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), México, 14610, México. ²Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO), Hospital de Oncología IMSS, México. ³Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UMAIE), Hospital de Pediatría, IMSS, México. ⁴Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), México. ⁵Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER), México. ⁶Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México. ⁷Facultad de Medicina UNAM, México. ⁸Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI) y Departamento de Inmunología, IPN, México. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.M. (email: vilmaml@gmail.com)

NIK, a MAP kinase kinase kinase (MAP3K14) protein, is essential for the activation of the non-canonical NF- κ B pathway because it phosphorylates I κ B Kinase- α (IKK α) and participates in the processing of p100¹⁰. NIK also phosphorylates I κ B Kinase- β (IKK β) and activates canonical NF- κ B pathway¹¹. NIK is involved in processes such as cell differentiation, development, and embryogenesis; in the latter, NIK appears to play a role in pluripotent embryonic stem cell maintenance¹². These activities of NIK support a potential role in the regulation of stem cell behavior^{12–15}. In this regard, mutant mice with defects in the non-canonical NF- κ B pathway, including NIK, display abnormalities in mammary gland development^{16–18}.

NIK is frequently overexpressed in basal and claudin-low breast cancer cell lines, and its overexpression leads to constitutive NF- κ B activation and proliferation in these tumor^{19–21}. Basal and claudin-low carcinomas are mainly estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negative (triple negative). Triple negative tumors are more aggressive, have a poor prognosis, and contain higher proportions of BCSCs (CD44⁺/CD24^{-low}) than other tumor subtypes^{22,23}. Recently, Zhang *et al.* observed that NIK-IKK α regulates HER2-induced mammary tumorigenesis by promoting the nuclear exclusion of p27/Kip1, thereby supporting the proliferation and expansion of BCSCs in a mouse tumorigenesis model²⁴. In contrast to its role in breast cancer tumorigenesis, information about the role of NIK in CSC is limited. The aim of this project was to determine the role of NIK in the phenotype of BCSCs.

Here, we demonstrate that NIK is overexpressed in BCSCs isolated from MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. By disrupting NIK expression, we show that NIK inhibition affects the number of BCSCs and concomitantly reduces the expression levels of Aldehyde Dehydrogenase-1A1 (ALDH1A1), NANOG, SOX2 (SRY-BOX2), and Octamer-Binding Transcription Factor (OCT4). In addition, we found that Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) is co-expressed with NIK in tumor cells from patients with breast cancer. NIK inhibition impaired the ability of cells to grow tumors in immunodeficient mice. In support of these results, we also observed that NIK overexpression increased the proportion of CD44⁺/CD24^{-low} cells and stem cell markers in MCF7 cells. Interestingly, microarray data revealed that NIK regulated stem cell-related genes through the Extracellular Signal-Regulates Kinases (ERK) pathway.

Results

Isolation of BCSCs Derived from Breast Cancer Cell Lines. To isolate BCSCs, we used specific antibodies against surface markers (CD44, CD24 or Epithelial Cell Adhesion Molecule (ESA) in a luminal (MCF7) and a triple negative (MDA-MB-231) breast cancer cell line. BCSCs content varies greatly among breast cancer cell lines and breast carcinomas^{25–27}. Triple negative tumors contain large numbers of CSCs while luminal breast tumors have lower stem cell contents^{22,23}. Here, we demonstrated that MCF7 cell line has a low percentage of BCSCs (CD44⁺/CD24^{-low} cells; 0.7–1.4%; Fig. 1A). Since MDA-MB-231 cell line exhibits low or null CD24 expression (data not shown), we used CD44 and ESA to detect the stem cell population (Fig. 1B). Thus, we determined that 34% of MDA-MB-231 cells were CD44⁺/ESA⁺ cells. In addition, we isolated a high ALDH activity subpopulation, since it was shown previously that this population presents phenotypic and functional characteristics of BCSC²⁸. Thus, we determined that only 16% of MDA-MB-231 cells exhibit ALDH activity (Supplementary Fig. S1A,B).

BCSCs can initiate tumors and drive neoplastic proliferation. To verify the tumorigenic potential of BCSCs, we injected BCSCs and non-BCSCs into immunodeficient *nu/nu* mice. MCF7 cells with the CD44⁺/CD24^{low/-} phenotype were compared with CD44⁻/CD24⁺ cells. After 120 days, all mice inoculated with CD44⁺/CD24^{low/-} MCF7 cells grew visible tumors, unlike CD44⁻/CD24⁺ cells (Supplementary Table S1). Sorted ESA⁺ MDA-MB-231 cells were able to form tumors within 90 days while the majority of mice inoculated with ESA⁻ did not form tumors (Supplementary Table S1).

To verify their clonogenic potential, isolated MCF7 BCSCs and non-BCSCs were seeded on soft agar plates. The number of colonies formed by CD44⁺/CD24^{low/-} cells was significantly higher than those formed by CD44⁻/CD24⁺ (818 vs. 236 colonies) (Fig. 1C). In addition, the clonogenic potential of sorted MDA-MB-231 BCSCs was evaluated in limited dilution assays, which revealed that the CD44⁺/ESA⁻ cells were more clonogenic than the CD44⁻/ESA⁻ cells (6 colonies vs. 2 colonies at low-density cell dilution) (Fig. 1D).

BCSCs Express Higher Levels of NIK. CSCs express high levels of stem cell markers, which contribute to their self-renewal properties^{28,29}. We found that isolated MCF7 CD44⁺/CD24^{low/-} cells exhibited higher expression levels of OCT4, NANOG, ALDH1A3, ALDH1A3 and ALDH8A1 compared to the CD44⁻/CD24⁺ subpopulation (Fig. 1E). BCSCs (CD44⁺/ESA⁺) derived from the MDA-MB-231 cell line, also expressed higher levels of some stem cell markers, including SOX2, OCT4, NANOG and ALDH8A1 compared to CD44⁻/ESA⁻ cells (Fig. 1F).

NIK (also known as MAP3K14), a NF- κ B activator, is upregulated in basal breast cancer cell lines^{19,20}, which are enriched in CSCs²². For this reason, we examined the levels of this kinase in MDA-MB-231 (claudin low), SKBR3 (HER2+) and MCF7 (luminal) breast cancer cell lines and found that as expected, NIK is highly expressed in MDA-MB-231 cells and barely detectable in MCF7 cells (Supplementary Fig. S2). To determine if NIK expression in BCSCs was up-regulated, we examined its mRNA levels in a two cell lines. Figure 2A shows that MCF7 BCSCs expressed higher levels of NIK than the non-stem cell population (CD44⁻/CD24⁺). In addition, MDA-MB-231 BCSCs also exhibited higher levels of NIK when compared to CD44⁻/ESA⁻ cells (Fig. 2B); furthermore NIK is highly expressed in MDA-MB-231 cells with ALDH activity (Supplementary Fig. S1B). These results prompted us to investigate the role of NIK in the stem phenotype of breast cancer.

NIK Inhibition Reduces the BCSC Population and Affects CSC Marker Expression. We next investigated the effect of NIK inhibition on the CSC phenotype. We generated stable MCF7 (MCF7-shNIK), MDA-MB-231 (MDA231-shNIK) and SKBR3 (SKBR3-shNIK) cell lines with two different small hairpin RNAs

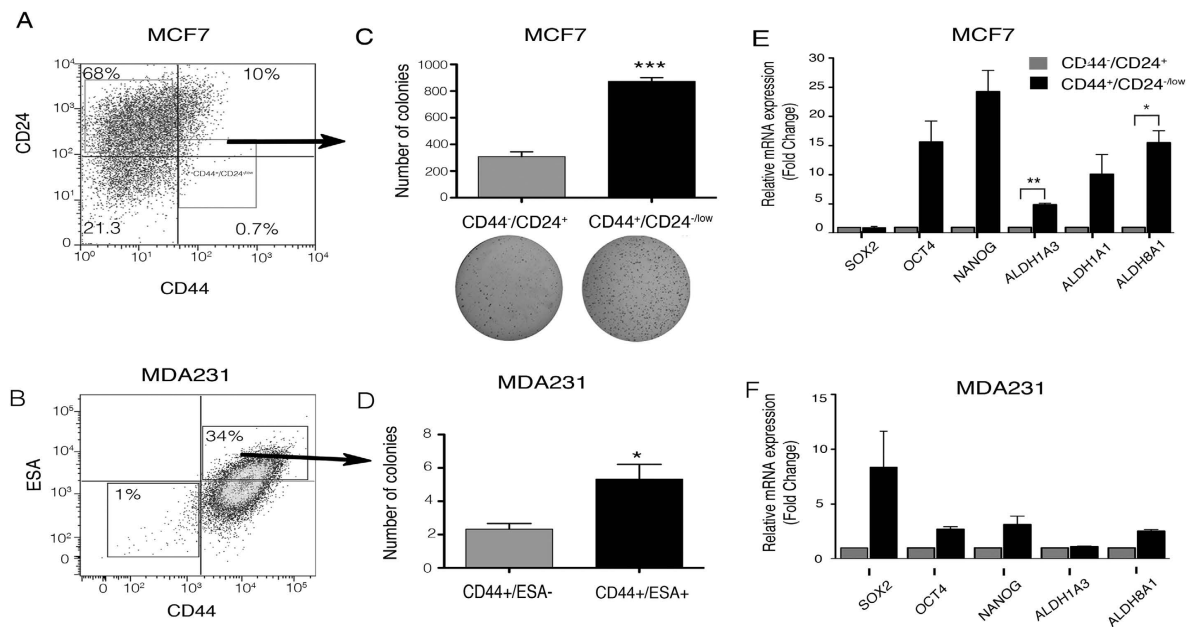


Figure 1. Characterization of Breast Cancer Stem Cell (BCSC) populations in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines. (A) Fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis of cell surface proteins showing proportions of Cancer stem cells (CD44⁺/CD24^{low/-}) in breast cancer cell lines. (B) FACS analysis of CD44 and ESA showing proportions of CSCs in the MDA-MB-231 (triple negative) cell line. Three biological experiments were done for each cell line. (C) BCSCs (CD44⁺/CD24^{low/-}) and non-BCSCs (CD44⁻/CD24⁺) populations isolated from MCF7 were tested for their clonogenic potential in soft agar assays (4,000 seeded cells). BCSCs showed increased clonogenic ability (n = 3, error bars are \pm s.e.m, *p < 0.05). (D) To confirm the clonogenic potential of MDA-MB-231 BCSCs (ESA⁺), limited dilution assays were performed. CD44⁺/ESA⁺ or CD44⁻/ESA⁻ cells colony numbers grown at low cell density. (n = 3, error bars are \pm s.e.m, *p < 0.05). (E) Cancer stem cell markers (NANOG, OCT4, SOX2, ALDH1A1, ALDH8A1, and ALDH1A3) expression was analyzed by Real time PCR (RT-qPCR) in MCF7 BCSC and non-BCSC populations. MCF7 BCSCs showed higher expression levels of CSC markers. (n = 3, error bars are \pm s.e.m, *p < 0.05). (F) Real Time-PCR analysis of CSC markers showed that CD44⁺/ESA⁺ cells expressed higher levels of SOX2, OCT4, NANOG and ALDH181. (n = 2, error bars are \pm s.e.m).

(shRNAs). RT-qPCR analysis showed that the two shRNAs efficiently reduced NIK expression in MCF7 (Fig. 2C), MDA-MB-231 (Fig. 2D) and SKBR3 cells (Supplementary Fig. S3A) in comparison with MCF7, MDA-MB-231 and SKBR3 control cells, respectively.

In MCF7, NIK deficiency reduced the expression of SOX2, OCT4, NANOG, ALDH1A3 and ALDH8A1. Similar results were obtained employing the second shRNA against NIK (Fig. 2E). In further support of these findings, NIK inhibition in MDA-MB-231 cells also reduced the expression of SOX2, OCT4, ALDH1A3 and ALDH8A1 (Fig. 2F). In addition, NIK deficiency also reduced the expression of SOX2, OCT4 and ALDH1A3 in SKBR3 cells (Supplementary Fig. S3B).

BCSCs fraction was also reduced due to NIK inhibition in MCF7 and MDA-MB-231 cell lines. As shown in Fig. 3A,B, we found that there was a dramatic reduction in the BCSC population (CD44⁺/CD24⁻) in MCF7-shNIK1 and shNIK2. Expression of cell surface proteins was modified due to NIK inhibition (Fig. 3C–F). In MCF7 cell line, NIK inhibition provoked a slightly reduction in CD44 levels in comparison to control cells (Fig. 3C). On the contrary, NIK inhibition caused a 10% increase of cells expressing CD24, compared with the control cell line (Fig. 3D). To further support these results, we found that NIK inhibition also decreased the CD44 and ESA positive subpopulation in MDA-MB-231 cell line (Fig. 3E,F).

NIK Depletion Impacts the Clonogenic and Tumorigenic Potential of Breast Cancer Cell Lines. Because our results show that NIK expression is associated with stem cell marker expression, we sought to determine its relevance in the cancer stem cell phenotype. Figure 3G shows that MCF7 deficient NIK cells formed significantly fewer colonies than MCF7-shLuc cells. The clonogenic potential of MDA-MB-231-shNIK cells was analyzed in limited dilution assays. MDA-MB-231-siNIK cells demonstrated reduced clonogenicity compared with MDA-MB-231-siLuc cells (Fig. 3H). Similar results were obtained with another shRNA against NIK. In addition, MCF7 depleted NIK cells formed lower numbers of mammospheres (Fig. 3I). Those results indicate that NIK depletion impairs the clonogenic potential of breast cancer cells.

To evaluate the tumorigenicity of NIK-depleted cells, we inoculated MDA231-shNIK cells carrying a luciferase reporter in nu/nu mice and analyzed the tumor burden six weeks later. The results showed that NIK inhibition reduced the tumor burden in most of the mice analyzed. Figure 3J show an ELDA analysis of inoculated mice

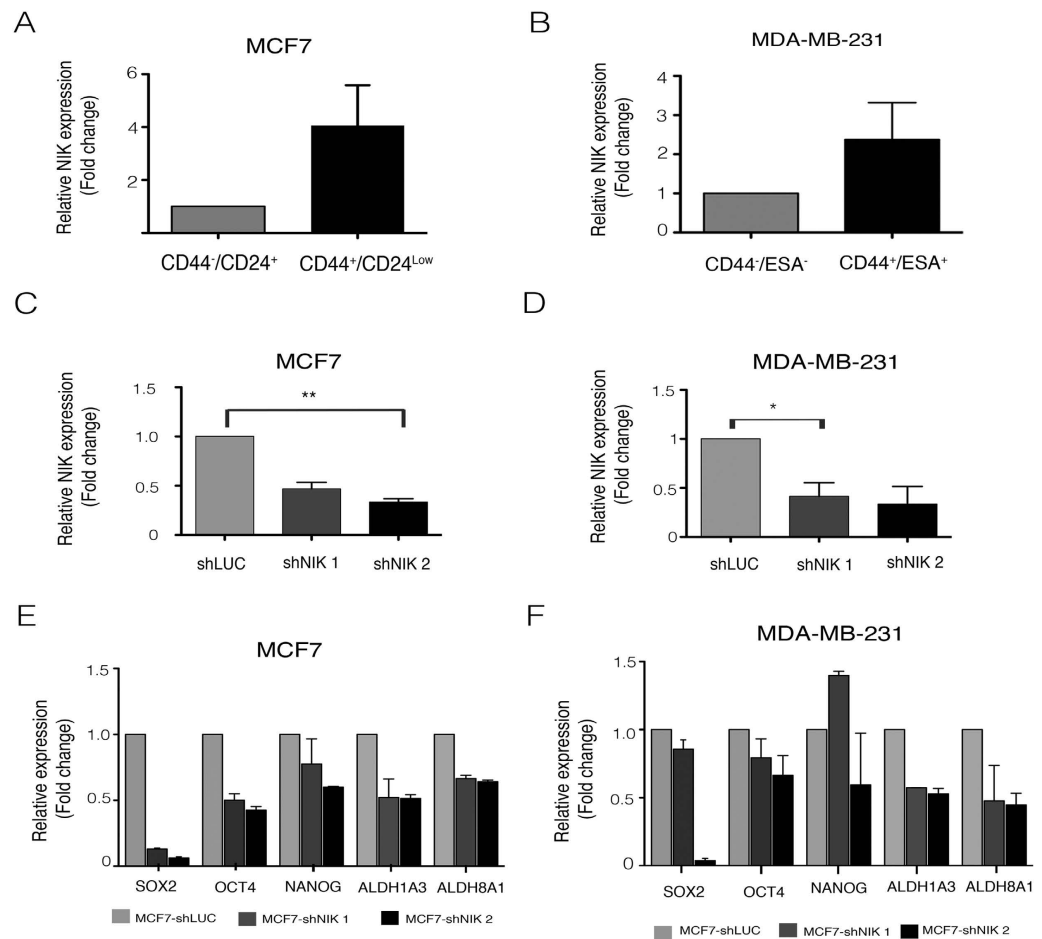


Figure 2. Nuclear factor-kappa B-inducing kinase (NIK) role in the regulation of Cancer stem cell (CSC) population of MCF7 and MDA-MB-231. (A,B) Breast cancer stem cell (BCSC) populations derived from MCF7 and MDA-MB-231 are enriched in NIK. RT-qPCR analysis demonstrated that NIK is mainly expressed in the BCSC population of MCF7 (A) ($n = 3$, error bars are \pm s.e.m) and MDAMB231 (B) ($n = 2$, error bars are \pm s.e.m) cell lines. To knockdown NIK, two short hairpin RNA (shRNA) were used in MCF7 (C) and MDA-MB231 (D) cell lines. ($n = 3$, error bars are \pm s.e.m, * $P < 0.05$). (E) The impact of NIK expression over CSC markers levels was evaluated after stable inhibition of NIK in two independent MCF7 replicates. Real Time PCR analysis shows that NIK depletion affects the expression of CSC markers (SOX2, OCT4, ALDH1A3, ALDH8A1). ($n = 2$, error bars are \pm s.e.m). (F) Effect of NIK inhibition in two independent MDA-MB-231 stable transfected cells lines with shNIK1 or shNIK2. RT-qPCR analysis of markers expression after stable NIK inhibition in MDA-MB-231 cells. All Real Time PCR were normalized to TBP. The level of CSC markers or NIK was designated to 1 for MCF7 or MDA-MB-231 control cells (shLuc). ($n = 2$, error bars are \pm s.e.m).

which indicates that the CSC frequency is lower in MDA231-shNIK cells. These findings support the idea that NIK could be essential for tumorigenic abilities of BCSCs.

Forced NIK Expression Increases CSC Marker Expression and BCSC Numbers. To investigate the effects of NIK overexpression on the stem cell phenotype, we developed stable cell lines that overexpressed NIK (MCF7-NIK+) and (SKBR3-NIK+). qPCR analysis showed that MCF7-NIK+ and SKBR3+ cells expressed 60 fold (Fig. 4A) and 4 fold (Supplementary Fig. 3A) higher levels of NIK compared with MCF7-Mock and SKBR-Mock cells respectively. Our results showed that NIK overexpression increased the expression of some stem cell markers. In MCF7-NIK+ cells the most dramatic changes were the increase in ALDH1A3, ALDH8A1, and SOX2 (Fig. 4B). Overexpression of NIK in SKBR3 also increased the level of SOX2 and ALDH8A1 (Supplementary Fig. 3B).

Forced expression of NIK provokes an increment of CSC fraction in MCF7 cells (Fig. 4C). NIK overexpression slightly increases the expression of CD44 (Fig. 4D) and reduced CD24 expression levels (Fig. 4E), leading to an increase in the BCSC population (CD44⁺/CD24^{low/-}).

To further investigate the clonogenic potential of MCF7-NIK+ cells, we performed soft-agar clonogenicity assays. Figure 4F shows that NIK overexpression increased the size and number of colonies formed by MCF7-NIK+ cells, when compared with MCF7-Mock+ cells. We also found that NIK-overexpressing MCF7

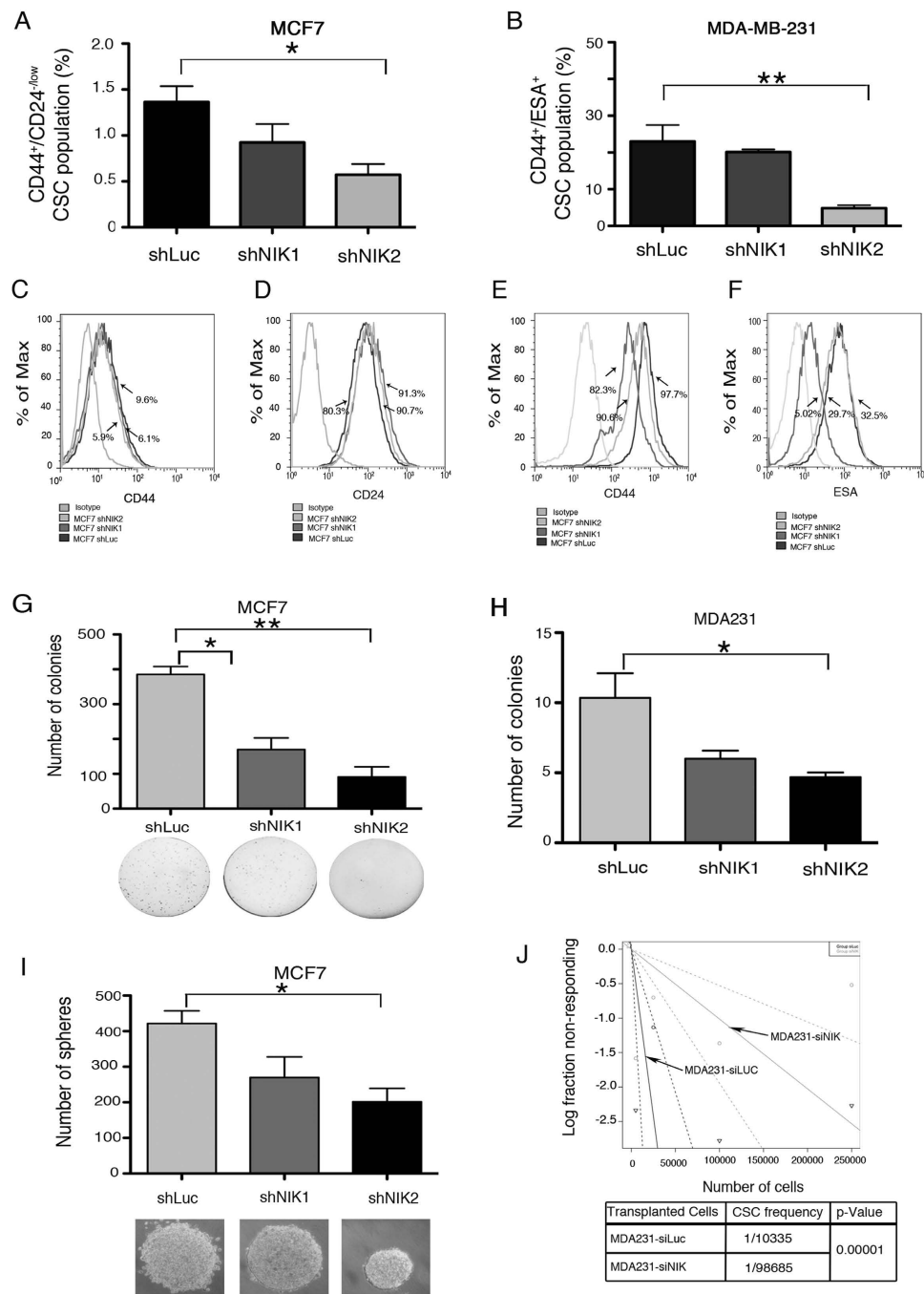


Figure 3. Nuclear factor-kappa-inducing kinase (NIK) deficiency impaired tumorigenic and clonogenic potential. (A,B) Frequency of CSCs in MCF7 (A) and MDA-MB-231 (B) depleted NIK cells compared to shLuc cells. (n = 3, error bars are s.e.m., *p < 0.05). (C,D) Flow cytometry analysis of CD44 (C) and CD24 (D) cell surface markers in NIK-deficient stable MCF7 cells. (E,F) Flow cytometry analysis of CD44 (E) and ESA (F) cell surface markers in NIK-deficient stable MDA-MB-231 cells and control cells respectively. Images represent an example of three independent experiments. (G) Soft agar clonogenic assays (4,000 seeded cells) reveals that stable NIK-deficient cells exhibit a reduced clonogenic ability of MCF7 cells. (n = 3, error bars are s.e.m., *p < 0.05). (H) Limited dilution assays showing colonies from three NIK depleted MDA-MB-231 cell lines grown at low cell density. (n = 3, error bars are s.e.m., *p < 0.05). (I) Number of spheres formed by three stable NIK-deficient MCF7 cell lines. (n = 3, error bars are s.e.m., *p < 0.05) (J) ELDA analysis showing cancer stem cell frequency in MDA-MB-231 deficient-NIK cells and MDA-MB-231 control cells xenotransplanted in nude mice. A total of 24 mice were xenotransplanted with 5000 (n = 5), 25000 (n = 6), 100000 (n = 8) or 250000 (n = 5) cells. MDA-MB-231 stable deficient-NIK cells were inoculated into the right flanks and MDA-MB-231 control cells in the left flank. Tumors were monitored by bioluminescence. The frequency of cancer stem cells was calculated using ELDA software.

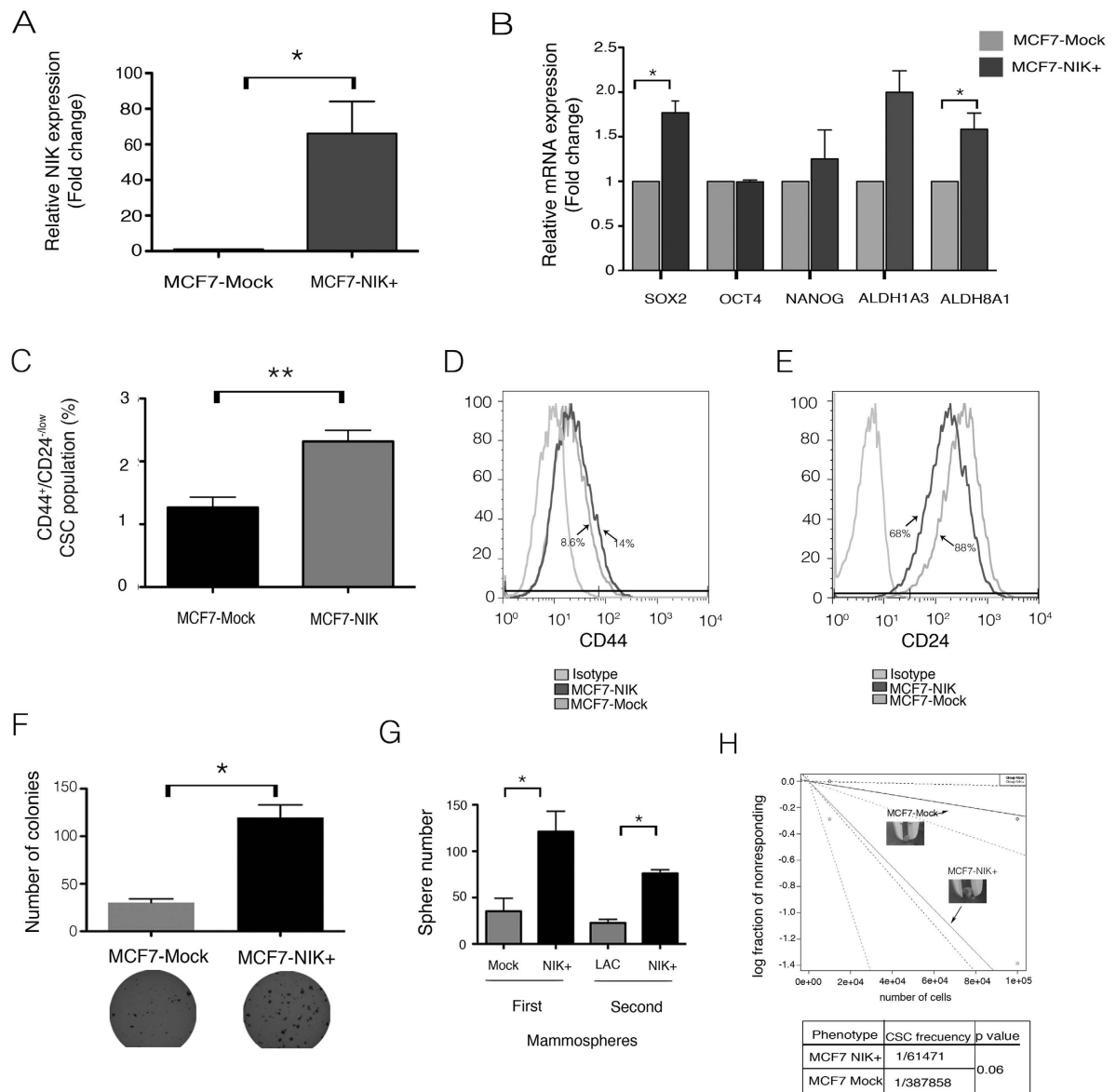


Figure 4. Forced expression of Nuclear factor-kappa B-inducing kinase (NIK) increases the Cancer stem cell fraction and increases tumorigenic and clonogenic potential. (A) RT-qPCR analysis showing increased NIK expression in relation to MCF7 control cells. (n = 3, error bars are s.e.m., *p < 0.05). (B) Expression of CSC markers in three stable NIK-overexpressing MCF7 cells. Levels of CSC markers were assessed by RT-qPCR assays and normalized to TBP. (n = 3, error bars are s.e.m., *p < 0.05). (C) Frequency of CSCs in MCF7 control and MCF7 over-expressing cells (n = 3, error bars are s.e.m., *p < 0.05). Results showed that forced expression of NIK increases the CSC fraction. (D,E) Flow cytometry analysis of CD44 (D) or CD24 (E) in MCF7 overexpressing NIK and MCF7 control cells. Images represent an example of three independent experiments. (F) Clonogenic assays showed that forced expression of NIK increase clonogenic ability. Experiments were performed in three independent stable cell clones. (n = 3, error bars are s.e.m., *p < 0.05). (G) Quantification of mammosphere number derived from MCF7 mock cells (MCF7-Mock) and NIK-overexpressing MCF7 cells (MCF7-NIK+) in both first and second passages. For mammosphere assay, 2.5×10^5 cells/ml of each cell line were seeded. (n = 3, error bars are s.e.m., *p < 0.05). (H) A total of 8 mice were xenotransplanted with 100000 (n = 4) and 10000 (n = 4) MCF7 overexpressing cells or MCF7 control cells. MCF7 stable overexpressing-NIK cells were inoculated into the right flanks and MCF7 control cells in the left flank. Tumors were monitored each week during 120 days. The frequency of cancer stem cells was calculated using ELDA software.

cancer cells developed a higher number of mammospheres and the sphere-forming potential is sustained even after a second passage (Fig. 4G). To further support these results, we evaluated the ability of SKBR3-NIK+ cells to form mammospheres, Supplementary Fig. 3C shows that NIK-overexpressing cells form a higher number of mammospheres than control cells.

To determine whether forced NIK expression promotes tumor growth, we inoculated *nu/nu* mice with MCF7-NIK+ or MCF7-Mock cells. NIK overexpression increased the number of tumors formed by MCF7 cells. ELDA analysis of inoculated mice showed that MCF7-NIK+ cells have a higher CSC frequency than MCF7-Mock cells (Fig. 4H). In addition, forced expression of NIK in SKBR3 cells also favored tumor formation and a higher CSC frequency (Supplementary Fig. S3D).

NIK Expression Regulates NF- κ B Molecules. NIK is an essential kinase that induces principally non-canonical NF- κ B activation by phosphorylating p100 and IKK α ¹⁰. Some reports have shown that NIK can also phosphorylate IKK β and activate the canonical NF- κ B pathway^{11,30}. To verify NF- κ B activation, we performed a reporter gene analysis in MCF7 cells. We observed that NIK overexpression dramatically increased NF- κ B activation while NIK deficiency impaired NF- κ B activation when compared to control cells (Fig. 5A,B).

It has been reported that NIK mediates the processing of p100 to p52 and promotes the nuclear translocation of p52:RelB dimer. In agreement with this, we found that NIK regulation resulted in modulation of nuclear p52. Supplementary Fig. S4A,B shows that MCF7-NIK+ cells presented a strong nuclear accumulation of p52, as opposed to MDA231-shNIK cells, in which, NIK inhibition resulted in a reduction of nuclear p52 (Supplementary Fig. S4C,D).

To determine which NF- κ B molecules are involved in NIK-mediated regulation of CSC marker expression, we performed Western blotting and immunofluorescence analysis of key NF- κ B proteins. Western blotting assays revealed that NIK increased mainly the expression of p52, RelB and RelA/p65 (Fig. 5C,D). Immunofluorescence analyses showed that NIK overexpression also increased the expression of p52 (Fig. 5E), RelB (Fig. 5F) and p65 (Fig. 5H). In addition, NIK overexpression also increased the phosphorylation of p100/p52 (Fig. 5I) and p65 (Fig. 5J). Interestingly, p50 levels were lower in MCF7-NIK+ cells (Fig. 5G).

NIK Expression in Patients with Breast Cancer. Finally, we determined NIK levels in 191 breast cancer tissue samples of which 60.7% were Luminal, 13.6% were triple negative and 9.4% were HER2 breast cancer subtype (Fig. 6A). To determine whether NIK expression is related to a particular breast cancer subtype, we examine NIK expression by immunohistochemistry, and we found that NIK expression was significantly higher in HER2+ breast carcinomas (Fig. 6B), and the expression of NIK positively correlated with HER2 expression levels (Fig. 6C). We also found that Triple Negative carcinomas exhibited the lowest expression of NIK, contrary to previous reports of breast cancer cell lines (Fig. 6B). Tumor Samples were also classified as grade 1, 2 and 3 (Fig. 6D). Interestingly, we observed a clear positive association between NIK and tumor grade (Fig. 6E).

Immunohistochemistry analysis revealed that NIK was expressed in 79.5% (152) breast cancer tissues (Fig. 7A). To support our previous result showing that NIK and ALDH expression are correlated, we analyzed the co-localization of both proteins in these samples. ALDH was expressed in 56% of the studied cases (Fig. 7B), of which 97% also expressed NIK (Fig. 7C). Surprisingly, 89.4% of those tumors presented a cellular co-localization of both proteins as shown in Fig. 7D. Figure 7E represents tumors that express NIK and ALDH in different cells. Figure 7F–H represents tumors lacking either NIK or ALDH.

NIK altered expression affects stem cell related genes. To elucidate the possible mechanism by which NIK affects the stem cell phenotype, we performed whole-genome microarray expression analysis of NIK-overexpressing, NIK-deficient, and MCF7 control cells. As expected, the principal component analysis divided the samples into three groups; high NIK expression (NIK+), low NIK expression (NIK-) and the control cells (Fig. 8A). We found significant gene expression differences in 79 genes in MCF7 overexpressing-NIK cells and 53 differential expressed genes in MCF7 deficient NIK cells (Supplementary Table S2 and S3 and Fig. 8B). Supporting the role of NIK in CSCs regulation, we found that most of the top regulated genes were involved in stem cell or EMT processes (Fig. 8C,D).

In order to validate the microarray data, seven genes were analyzed by real time RT-PCR. We based this selection on the fold change found or on their role in stem cell biology. All analyzed genes correlated well with the results obtained from microarrays (Fig. 8E). As expected, we observed that upregulated genes (EGR1, TCN1, DUSP6, GDF15) in the samples with high NIK expression were also downregulated in MCF7 depleted-NIK cells (Fig. 8E).

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of MCF7 cells overexpressing NIK showed concordant enriched signaling networks, including cellular growth and proliferation, cell death and survival, cellular movement and hematological system development. These results indicate that NIK disruption could impair the proliferation, survival, and migration of cancer stem cells. Our microarray results suggest that NIK could activate ERK1/2 pathway to regulate several molecules involved in stem cell modulation such as EGR1, NCF1, COL5A2 and GDF15 (Fig. 8F). In addition, our results showed that NIK deficiency down-regulated the expression of stem cell-associated genes such as MAP2K6, CSPG4, and TAL1, probably by the MAPK and ERK1/2 pathway (Fig. 8G). Data analysis of deregulated genes in MCF7 cells with high NIK expression revealed that ERK could be one of the key pathways that contribute to regulate the stem cell phenotype.

NIK regulates stemness through ERK activation. The ERK pathway is involved in the activation of many transcription factors, which promote cancer cell growth and tumorigenesis. Interestingly, our results showed that NIK could be regulating the ERK pathway to modulated target genes involved in stemness or epithelial to mesenchymal transition (EMT), a process that gives rise to cancer stem-like cells. To determine the role of NIK in ERK activation, we analyzed the phosphorylation status of ERK in NIK-deficient and NIK-over-expressing cells. Forced expression of NIK promoted ERK phosphorylation, while NIK depletion reduced the expression of phospho-ERK (Fig. 9A). These results suggest that NIK modulates ERK phosphorylation in BCSC.

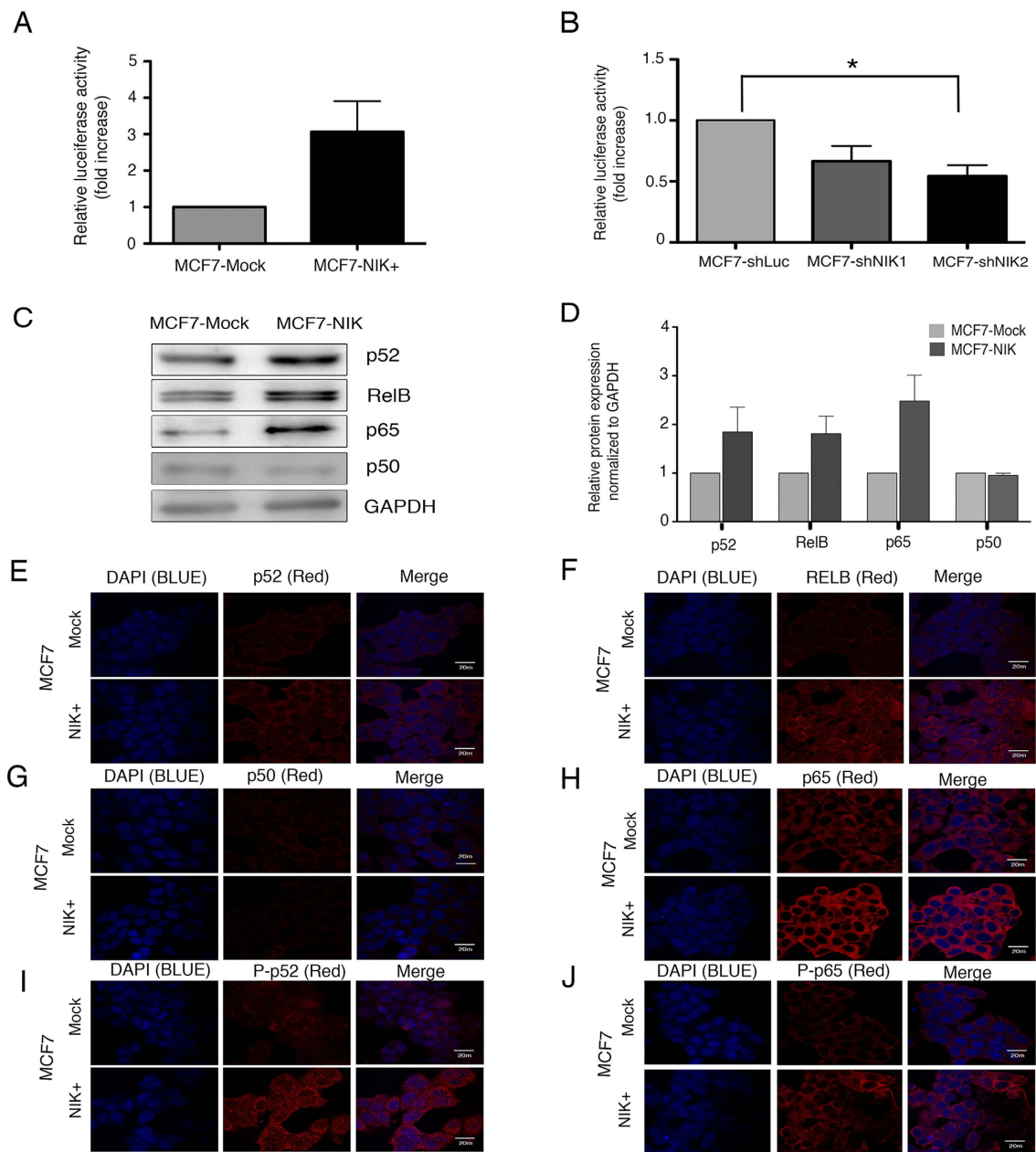


Figure 5. Nuclear factor-kappa B-inducing kinase (NIK) overexpression induces activation of canonical and non-canonical molecules. (A) Reporter gene assay showing the effects of NIK overexpression over NF- κ B activity under basal conditions. Assays were performed in MCF7 cells transiently transfected with control or NIK expression vector. ($n = 3$, error bars are s.e.m.). (B) Reporter gene assay showing the effects of NIK depletion on NF- κ B activity. Assays were performed in an MCF7 stable cell line bearing an NF- κ B reporter vector. Stable cells were transiently transfected to inhibit NIK. NF- κ B activity was calculated as fold difference between control and NIK-silenced cells. ($n = 4$, error bars are \pm s.e.m. * $p < 0.05$). (C) Western blot of NF- κ B molecules in MCF7 enriched NIK and in MCF7 control cells. GAPDH was used as a loading control. (D) Densitometric scans from three independent assays were quantified, normalized to GAPDH and calculated as fold difference. (E–J) Immunofluorescence analysis of p52 (E), RelB (F), p50 (G), p65 (H), phospho-P52 (I) and phospho-P65 (J) in MCF7 cells transiently overexpressing NIK and MCF7 control cells. Nuclear factor kappa B (NF- κ B) proteins were stained with Cy3-conjugated secondary antibody and nuclei were stained with 4'-6-Diamidino-2-phenolindole (DAPI). Photographs are representative of three independent experiments. Images for immunofluorescence staining were taken using an x 63 oil lens.

To further support the role of ERK in the NIK-mediated stem phenotype, we used a chemical inhibitor of this kinase. As expected, ERK inhibition with FR180204 resulted in a reduced expression of the upregulated

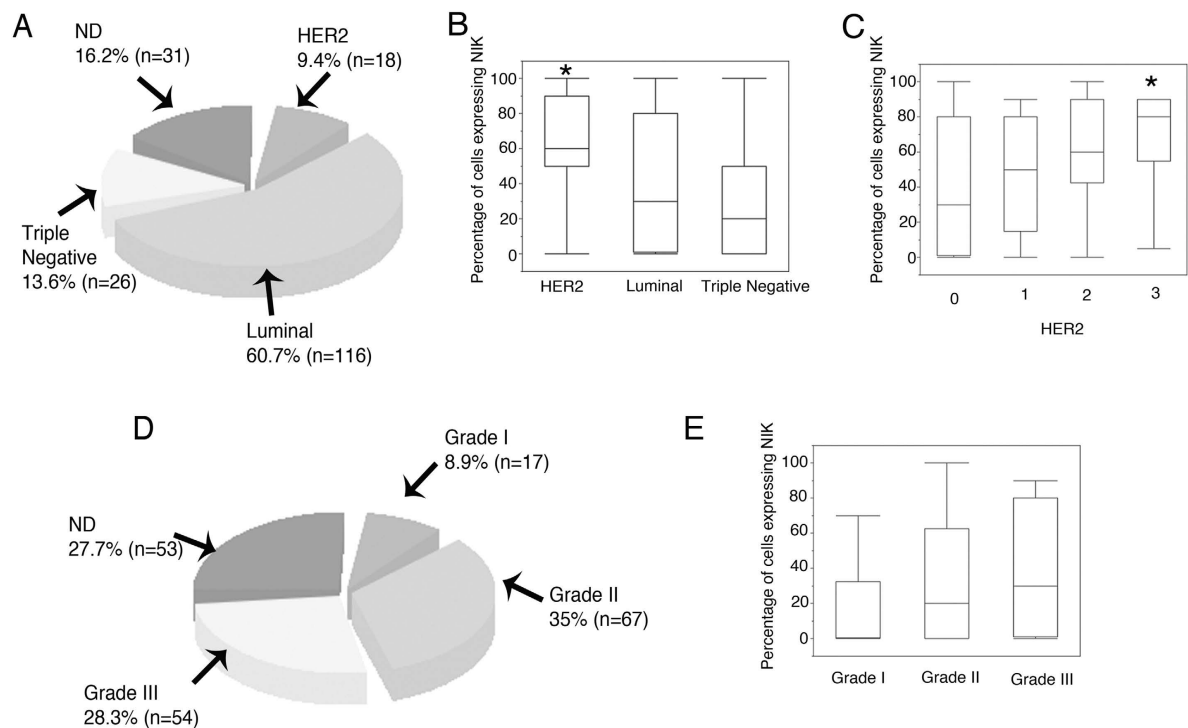


Figure 6. NIK is expressed mainly in the Human epithelial growth factor receptor (HER2) subtype.

(A) Pie chart showing the percentage of HER2, Luminal, and Triple Negative breast cancer samples ($n = 191$). (B) Percentage of cells expressing NIK in HER2, Luminal, and Triple Negative breast tumors. NIK expression is higher in HER2 breast tumors ($p = 0.01$). (C) Percentage of cells expressing NIK in tumors with different expression levels of HER2 (0 = absent; 1 = weak; 2 = moderate; 3 = strong). NIK expression is higher in tumors with strong expression of HER2 ($p = 0.005$). (D) Pie chart showing the percentage of Grades I, II, and III breast cancer tissues ($n = 191$). (E) Percentage of cells expressing NIK in Grade I, II and III tumors. NIK expression levels increase in Grade III tumor ($p = 0.07$).

genes found in the microarray data (Early Growth Response 1, EGR1; Growth Differentiation Factor 15, GDF15; Transcobalamin 1, TCN1 and Dual specificity phosphatase 6, DUSP6) (Fig. 9B).

To verify the role of ERK in the regulation of these target genes, we used specific shRNAs directed against ERK1 and ERK2 (Supplementary Fig. S5A). Our results showed that ERK inhibition also reduced the expression of EGR1 and GDF15, but failed to reduce DUSP6 expression (Supplementary Fig. S5B). Interestingly, NIK-overexpressing MCF7 cells exposed to FR180204 fail to up-regulate target genes (Fig. 9C). Since NIK leads to an increase in ERK activation, we analyzed whether the inhibition of ERK signaling decreases the ability of NIK to enhance CSC fraction. Administration of FR180204 to NIK-overexpressing cells dramatically reduced the CSC fraction to numbers close to those found in MCF7 control cells (Fig. 9D).

Discussion

It has been proposed that a subpopulation of cancer stem cells are able to initiate and sustain the growth of a tumor¹, enabling the propagation and formation of metastatic foci at distant sites^{26,31,32}. According to this hypothesis, only CSCs can self-renew indefinitely and differentiate into all tumor cell types³³. The identification of new CSC targets could be very useful, particularly for neoplasms with high mortality and early relapse rates.

Gene expression profiles have defined the following five breast cancer subtypes: luminal-like, basal-like, HER2 enriched, claudin-low, and normal breast-like^{34,35}. In breast cancer cell lines, NF- κ B activity is differentially represented in luminal and basal breast tumor subtype. Basal breast cancer cell lines possess increased NF- κ B activation state and high NIK expression^{20,21}. NIK expression in breast cancer tissues has not been analyzed; here we show that HER2 breast tumors expressed higher levels of NIK than Triple Negative tumors. Supporting this result, it has been showed that active NF- κ B is detected mainly in the HER2+/ER-negative subtype in breast tumor specimens³⁶. In addition, it is well known that HER2 overexpression induces NF- κ B activation^{37–39}. Furthermore, it was reported that HER2 is an important regulator of BCSCs in HER2-positive tumors⁴⁰. HER2 appears to regulate self-renewal in breast tumors lacking HER2 amplification through the receptor activator of NF- κ B (RANK)-ligand⁴¹.

Baldwin AS in 2010 using Her2+/ER- breast cancer cells, showed that HER2 activates NF-kappa B via IKK α and hypothesized that NIK might be activating IKK α since NIK has been associated to the ErbB2 family member EGFR³⁷. Nevertheless, the mechanism of how HER2 regulates NIK is not currently known.

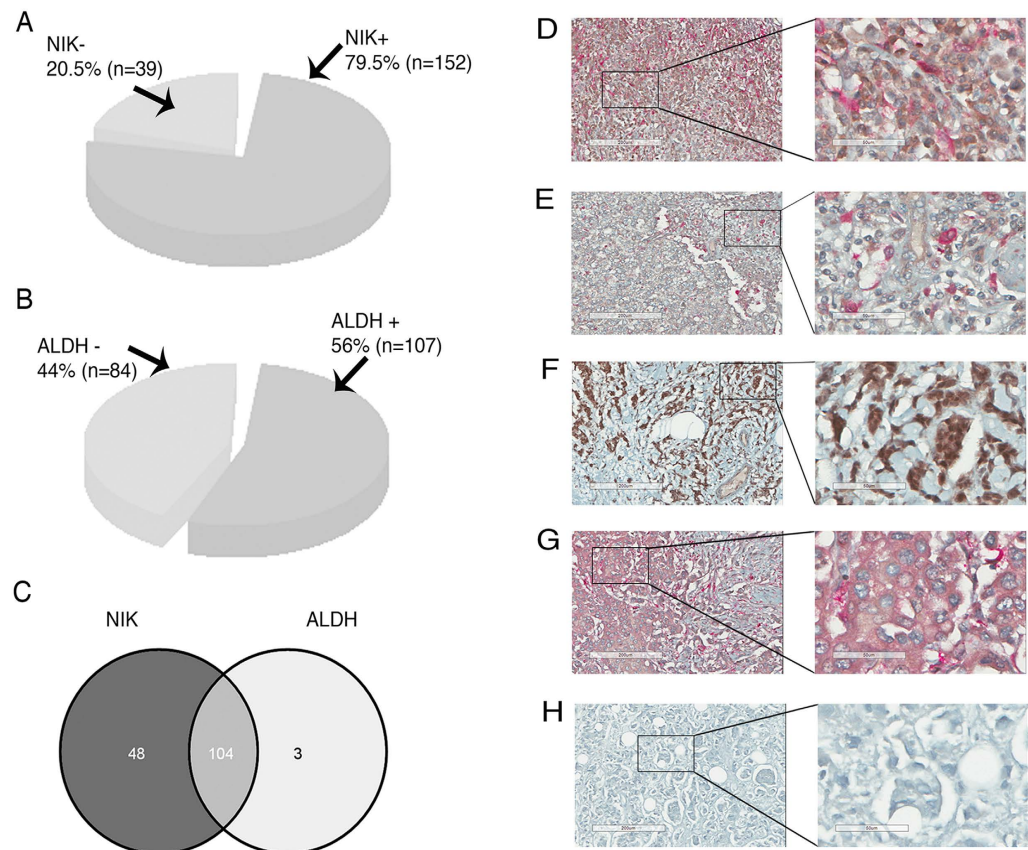


Figure 7. Immunohistochemistry analysis of NIK and Aldehyde dehydrogenase (ALDH) expression in breast carcinomas ($n = 191$). (A) Percentage of Nuclear factor-kappa B-inducing kinase (NIK)-positive breast tissues. (B) Percentage of ALDH positive breast tissues. (C) Venn diagram showing breast cancer tissues expressing both NIK and ALDH protein. (D–H) Immunohistochemistry of NIK and Aldehyde dehydrogenase (ALDH) expression. NIK-positive cells are brown based on DAB chromogen, and ALDH-positive cells are pink based on Fast Red chromogen. Nuclei are stained with hematoxylin (blue). The second column represents an enlargement of the area denoted by box in the adjacent left panel showing fine cellular details of immunohistochemistry. (D) Graph showing percentage of tissues having cellular colocalization in Breast Cancer samples expressing both NIK and ALDH. (E) Representation of breast tumors ($n = 93$) expressing ALDH and NIK in the same cells. (F) Immunohistochemistry of breast tumors showing NIK and ALDH expression in different cells ($n = 10$).

In this study, we established a strong association between NIK and the CSC phenotype. We observed that the majority of the stem cell markers analyzed were co-regulated by NIK. Our data showed that NIK expression was higher in BCSCs derived from both luminal and triple negative breast cancer cell lines. NIK depletion reduced the BCSC subpopulation and dramatically impaired malignant characteristics such as tumorigenicity and clonogenicity in both cell lines. Interestingly, even when MCF7 cells expressed low levels of NIK, inhibition of NIK was sufficient to reduce the BCSC population and to impact clonogenic abilities. These results support the strong contribution of this kinase to the stem cell-like phenotype in breast cancer.

Our results showed that NIK expression regulates CSC markers expression, interestingly, ALDH1A1, ALDH1A3 have promoters with putative NF- κ B-responsive elements. Analysis of breast cancer tissues revealed that ALDH-expressing cells also express NIK protein in the majority of the tumor analyzed. These results suggest that a NIK-ALDH-dependent regulation of the BCSC population likely operates *in vivo*.

Our data showed that NIK expression negatively regulates CD24. Vesuna *et al.*, found that Twist, an EMT inducer regulated by NF- κ B, is able to repress the transcription of CD24⁴². Interestingly, our group has shown that modulation of NIK expression affects Twist levels (data not shown, manuscript in preparation). CD24 has been reported to suppress NF- κ B signaling and to potentiate DNA damage-induced apoptosis⁴³. Thus, CD24 and NF- κ B could be participating in a negative feedback that ultimately determines the final CSC fraction of a tumor.

NIK can activate both canonical and non-canonical NF- κ B pathways⁴⁴. NIK preferentially phosphorylates IKK α , although it can also phosphorylate IKK β in an IKK α -dependent manner⁴⁵. In this article, we demonstrated that NIK overexpression induces NF- κ B activation and enhances the expression of p52, p65, and RelB, suggesting that components of non-canonical and canonical NF- κ B pathways are involved in NIK-mediated stem

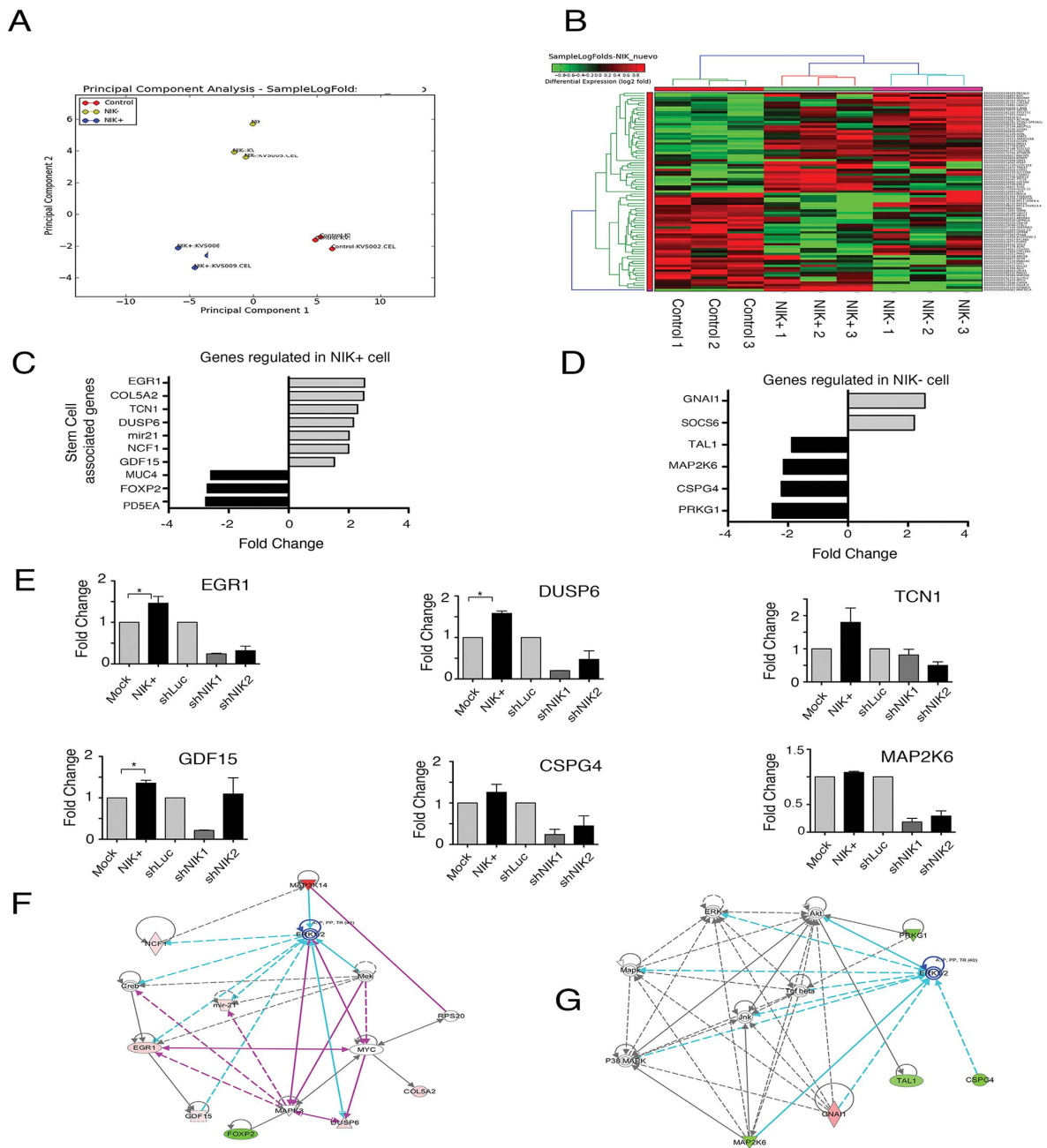


Figure 8. (A) Principal component analysis of gene expression profiles for high NIK-expressing MCF7 cells, low NIK-expressing MCF7 cells and MCF7 control cells. (B) Clustering diagram of samples and differentially expressed genes in MCF7 cells overexpressing NIK and NIK-deficient MCF7 cells. Log-Fold Changes of differentially expressed genes are depicted in a heat map, scaling from low (green) to high (red). Experiments were performed in three independent transiently-transfected MCF7 cell lines (C). Graph showing the fold change of stem cells-associated genes in high NIK-expressing cells and (D) low NIK-expressing cells. (E) RT-qPCR analysis of EGR1, TCN1, DUSP6, GDF15, CSPG4 and MAP2K6 in MCF7 overexpressing-NIK cells, MCF7 control cells, NIK-deficient MCF7 cells (shNIK1 and shNIK2) and MCF7 control cells (shLuc). All RT-qPCR were normalized to TBP. (n = 3, error bars are +/- s.d, p < 0.05). (G) IPA network of top gene networks from NIK-overexpressing cells. (H) IPA network of top gene networks from NIK-depleted cells. Note that ERK1/2 is a central node in both networks. Red color indicates induced genes and green color represents suppressed genes.

cell phenotype modulation. Regulation of NANOG and SOX2 by canonical NF-κB pathway has been described previously⁴⁶, however, this is the first report of regulation of ALDH genes by this pathway.

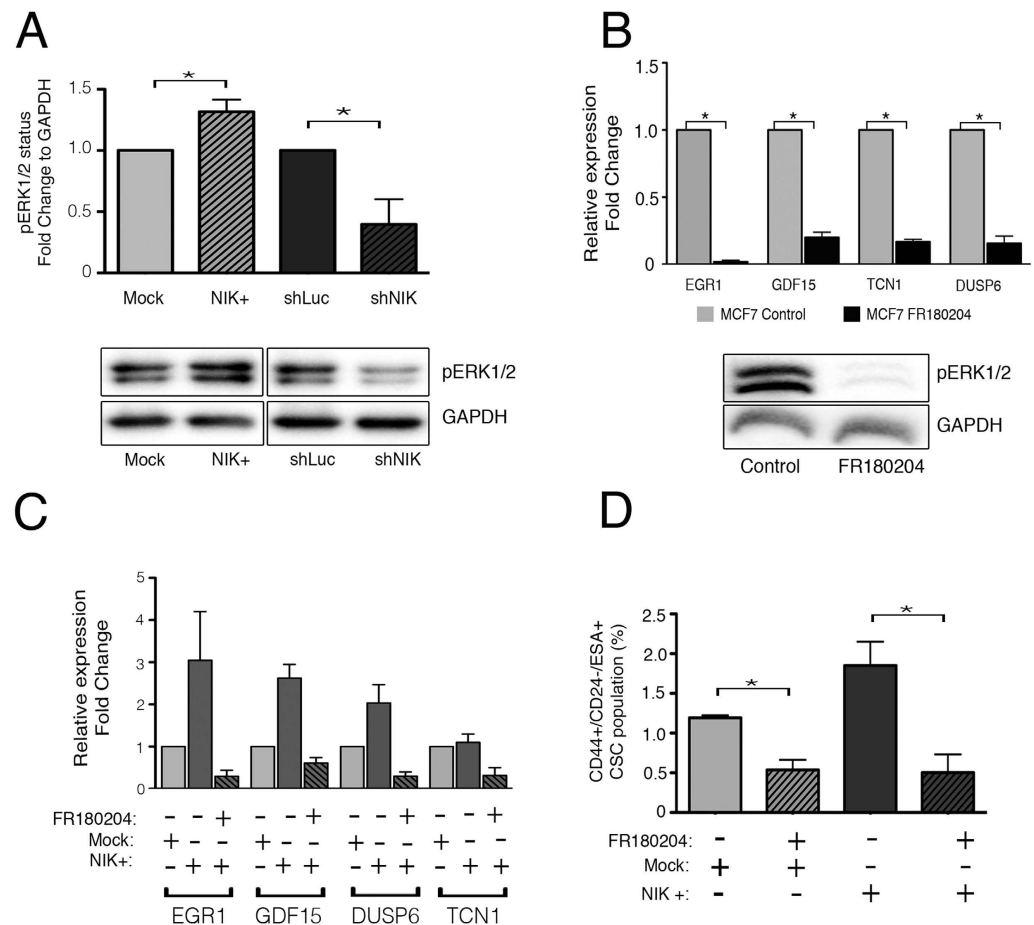


Figure 9. NIK regulates target genes through ERK pathway. (A) Western Blot analysis of phospho-ERK1/2 in MCF7 transiently expressing NIK, control vector or NIK knock-down cells. (n = 3, error bars are s.d., $p^* < 0.03$). (B) Relative expression of target genes in MCF7 cells treated with 30 μ M FR180204 or an equivalent amount of DMSO during 24 hrs. The lower image represents the effect of FR180204 on ERK1/2 inhibition. (n = 3, error bars are s.d., $*p < 0.05$) (C) Relative expression of target genes in MCF7 transiently overexpressing NIK cells cultured with 30 μ M FR180204 or DMSO for 24 hrs. (n = 2, error bars are s.e.m) (D) Frequency of CSCs in MCF7 control and MCF7 over-expressing cells cultured with 30 μ M FR180204 or DMSO during 24 hr. (n = 3, error bars are s.d., $*p < 0.04$).

The role of NF- κ B pathways in BCSCs has not been completely elucidated; however, it is clear that NF- κ B is involved in BCSCs regulation. In this study, we demonstrated that BCSCs express higher levels of NIK, suggesting that NF- κ B performs an important role in BCSCs. Interestingly; NF- κ B inhibitors preferentially reduced breast cancer stem-like cell proliferation, with fewer effects on bulk population⁴⁷. Thus, NF- κ B disruption could be used as a therapeutic approach to target BCSCs. Still, more work needs to be done to clarify the role of non-canonical and canonical NF- κ B pathways in BCSCs. However, there is enough evidence showing that both pathways regulate BCSCs. It is well known that IKK β -mediated suppression of the canonical NF- κ B pathway in the mammary gland significantly reduces CSC populations, impairs mammosphere-forming abilities, and reduces tumorigenicity^{46,48}. Similarly, IKK α also contributes to BCSC self-renewal, because IKK $\alpha^{AA/AA}$ knock-in mice exhibit delays in the development of breast tumors from cells that cannot develop secondary mammospheres⁴⁹.

In support of our results, a recent study showed that NIK/IKK α promotes breast basal cell expansion and mammosphere-forming ability in a mouse model. The NIK-IKK α cascade acts as an important regulator of the cyclin-dependent kinase inhibitor that enters the nucleus and phosphorylates p27 to stimulate its nuclear export²⁴. In addition, it was recently shown that the induction of the non-canonical NF- κ B pathway through NIK activation regulates Jagged1 (JAG1) expression and expands the stem cell population in the basal-like breast cancer subtype²¹.

The mechanism by which NIK mediates regulation of the CSC phenotype is poorly understood. Our results showed that NIK regulates the expression of stem cells-related genes through activation of both NF- κ B and ERK1/2 pathway. We found that phosphorylation of ERK1/2 is regulated upstream by NIK, and that both NIK and ERK1/2 are required to regulate stemness in breast cancer cells. Supporting our results, Richmond Ann and Dhawan Punita, showed that NIK activates ERK1/2 via MEK1/2 in melanoma cell lines, which have high NIK

basal expression. In addition, Gingery in 2008 demonstrated that in osteoclasts, MEK1/2 activates AKT, which in turn phosphorylates NIK^{50,51}. Among the molecules regulated by ERK1, we found several genes previously described to be highly expressed in various types of CSCs, such as miR-21, EGR1 and GDF15.

Recently, it has been shown that EGR1 plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition (EMT)⁵², a process involved in the acquisition of cancer stem cells properties⁵³. EGR1 controls stem cell proliferation⁵⁴, migration and tumor growth^{55,56}. EGR1 is mainly regulated by the ERK1/2 and NF- κ B pathways⁵⁷. Interestingly, EGR1 participates in the EMT by down-regulating E-cadherin through SNAIL⁵⁸. Microarray expression analysis revealed that EGR1 target genes such as GDF15 are also highly expressed in NIK-overexpressing cells. These results suggest that NIK also mediates stem cell phenotype through the induction of genes involved in the EMT process.

Because NIK contributes to the tumorigenic potential of BCSCs, its inhibition could be an effective way to target BCSC and to reduce tumor progression. Due to that NIK is not an essential kinase for canonical NF- κ B pathway activation under normal physiological conditions, NIK inhibitors could be safer than more general strategies; however, further studies are required.

Conclusions

In the present report, we present strong evidence that NIK is a critical kinase for the BCSC phenotype because it modulates stem cell markers, as well as the clonogenic potential and tumorigenicity of these cells. This kinase is an attractive stem cell marker in both luminal and basal tumor types and could possibly be an important therapeutic target.

Methods

Cell culture and reagents. MCF7, MDA-MB-231 and SKBR3 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA; www.atcc.org). MCF7 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), MDA-MB-231 cells were maintained in DMEM supplemented with 5% FBS and SKBR3 were cultured in McCoy's 5A supplemented with 10% FBS. All cell lines were cultured in a humidified atmosphere at 37 °C with 5% CO₂.

Flow cytometry analysis. Cells were detached with Accutase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and washed with Phosphate buffered saline (PBS) 1% and resuspended in the stain buffer (PBS with FBS 1%). A total of 1×10^6 cells were incubated with the FITC-CD44 (555478, BD Biosciences) and PE-CD24 (555428, BD Biosciences) for 30 min on ice. MDA-MB-231 cells were also labeled with APC-ESA (347200, BD Biosciences) for 30 min. FITC-IgG1 (130-092-213, Miltenyi Biotec), PE-IgG1 (130-092-212, Miltenyi Biotec) and APC-IgG1 (130-092-214, Miltenyi Biotec) antibody isotype were used as controls. For cell sorting, 1×10^8 MCF7 cells were sorted into CD44⁺/CD24^{-/low} and CD44⁺/CD24⁺ subsets. MDA-MB-231 cells were sorted into ESA⁺ and ESA⁻ subsets. Cells were sorted on a FACSAria (fluorescence-activated cell sorter, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and then were harvested and grown under standard culture conditions for 24 h prior to any further procedures.

ALDH⁺ population was separated by FACS. ALDH1 activity was determined using the Aldefluor assay (Stem Cell Technologies) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^6 cells were suspended in Aldefluor assay and incubated with 5 μ l of activated Aldefluor reagent during 30 minutes. Control cells were incubated with Aldefluor reagent along with 5 μ l of DEAB solution. The brightly fluorescent ALDH1-expressing cells were detected in the FITC channel on a FACSAria cell sorter. Cells were harvested and grown under standard culture condition for 24 h prior to RNA isolation.

RT-PCR and quantitative real-time PCR. Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Then, 2 μ g of RNA was reverse transcribed with a Maxima First strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). RT-qPCR was performed by the 7900HT (Applied Biosystems) or the QuantStudio 7. PCR was performed with the SYBR-select Master Kit (Applied Biosystems). Primers listed in Supplementary Table S4 were used for qRT-PCR.

Protein preparation and Western Blotting. Total proteins were extracted with RIPA buffer (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, New York, USA) supplied with protease and phosphatase inhibitors. Subcellular fraction was carried out with the Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Scientific, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Proteins were resolved in 10% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBST) for 2 h, then were incubated overnight with the corresponding antibodies at 4 °C, followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (W402B, Promega, Madison, WI, USA) or goat anti-rabbit IgG (W401B, Promega), or rabbit anti-Goat IgG (Zymax, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as appropriate, for 1 h at RT in TBST. Antibody binding was detected with the Immobilon Western kit (Millipore), and images were visualized with the VersaDoc Imaging System (BioRad, Hercules, CA, USA). The antibodies used were, anti-p65 (1:1000, sc372, Santa Cruz Biotechnology CA, USA), anti-RelB (1:1000, sc28689, Santa Cruz Biotechnology), anti-p50 (1:1000, sc1190, Santa Cruz Biotechnology), anti-p52 (1:1000, 05-361, Millipore), anti-p-ERK1/2 (1:10000, Cell Signaling), anti- α tubulin (1:2000, sc53646, Santa Cruz Biotechnology), anti-GAPDH (1:5000, sc25778, Santa Cruz) and anti-Laminin A/C (1:1000, 4777, Cell Signaling).

shRNA experiments. To decrease NIK expression, two shRNAs (1: CCGAGAGTCTTGATCAGAT, 2: GGTCAACATCTTCATGGA, and 3: GAGGAATACCTAGTGCAT) were designed with the RNAi Target Sequence Selector (Clontech). To decrease ERK1 and ERK2 expression, we designed two shRNAs for each gene (1: GGATCAGCTCAACCACATT, 2: CCTCCAACCTGCTCATCAA, 3: CACCAACCATCGAGCAAAT,

4: CAGCCAGGATACAGATCTT). All shRNAs were cloned into the pSIREN RQ-vector (Clontech). shRNA against luciferase was used as a control. MCF7, MDA-MB-231 and SKBR3 cells were transfected and then selected with 0.5- $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin or 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 3 weeks respectively.

ERK pathway inhibition. A selective ERK inhibitor FR180204 (Tocris, Biosciences) was employed in MCF7 cells to explore the role of ER in stemness. Briefly MCF7 control or overexpressing NIK cells were treated with 30 μM for 24 h. As a control, cells were treated with an equivalent volume of DMSO. ERK inhibition was verified in a western blot assay.

NIK overexpression experiments. To overexpress NIK, we generated an expression vector by recombining a pENTR221 vector (Life Technologies) containing the ORF of NIK with the pTRES-DEST30 vector (Life Technologies). MCF7 and SKBR3 cells were transfected with 4 μg of (pT-Rex-NIK), in the presence of LTX-Lipofectamine for 24 h. Stable MCF7 and SKBR3 clones were selected with 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of G418 (GIBCO) respectively for 3 weeks. As a control, MCF7 and SKBR3 cells were transfected with 4- μg pTRES-Lacz.

NF- κ B reporter assays. NF- κ B reporter assays were performed by generating a stable MCF7 cell line bearing an NF- κ B reporter vector. These cells were co-transfected with 4 μg of pT-Rex-NIK, pT-Rex-Lac, shNIK1, shNIK2 and 1 μg of pCMV-Sport-Gal (Life Technologies) using LTX-Lipofectamine. The enzymatic activities of both the firefly luciferase and the beta-galactosidase reporter genes were determined 48 h after transfection with a Dual-luciferase Reporter Assay kit (Promega) and a Luminescent Beta-galactosidase Detection Kit (Clontech), respectively.

Immunofluorescence. Immunofluorescence analysis was performed with the following primary antibodies: p52 (1:500, sc848, Santa Cruz); p65 (1:500, sc372, Santa Cruz Biotechnologies); RelB (1:500, sc28689, Santa Cruz Biotechnology); P50 (1:250, sc1190, Santa Cruz Biotechnologies), NIK (1:1000, 4994, Cell Signaling), phospho-p52 (1:500, Cell Signaling), phospho-p65 (1:500, 3036, Cell Signaling). Briefly, 5×10^5 cells were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 20 min, and permeabilized in 0.1% of Triton 100 \times (Sigma-Aldrich) for 30 min. Cells were washed and blocked with 5% Bovine serum albumin (BSA) for 1 h and subsequently incubated with primary antibodies for 2 h at RT, followed by incubation with the secondary Cy3-goat anti-mouse antibody (Millipore) or Cy3-goat anti-rabbit antibody (Millipore) or Cy3-rabbit-anti-goat (811615, Zymed) for 1 h. Cells were then washed and slides were mounted in Everbrite mounting medium with 6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Biotium, Inc., Hayward, CA, USA). Fluorescence analysis was performed on a confocal microscope (Zeiss LSM 510).

In vivo tumorigenic assays. Several cell dilutions of MCF7, MDA-MB-231 or SKBR3 cells were suspended in 100 ml of PBS with 50% growth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) and were subcutaneously injected into *nu/nu* female mice aged 4–6 weeks. Female athymic Balb-c *nu/nu* mice, between 6–8 weeks, were supplied by the Autonomous Metropolitan University, Mexico City, México. The animals were kept in a pathogen-free environmental and fed ad libitum. All animal procedures reported in the present paper were performed according to the NIH Animal Use and Care Guidelines (USA). The local institutional committee: Comité Interno de Cuidados de Animales of the Instituto Nacional de Cancerología (CICUAL-INCan) approved the procedures according to all applicable National institutional and governmental regulations concerning the ethical use of experimental animals. MCF7 transplants were allowed to grow for 150 days; SKBR3 and MDA-MB-231 were allowed to grow for 60 days. After this interval or when the tumors reached a maximum volume of 700 mm^3 , animals were sacrificed by cervical dislocation trying to minimize suffering.

Viral cell transduction and bioluminescence imaging. MDA-MB-231 shLuc or shNIK cells expressing Luciferase2-eGFP were generated as described previously⁵⁹. Stable cells were selected with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Zeocin (Life Technologies) for 4 weeks. Mice were given an intraperitoneal (i.p.) injection with 200 μl of D-luciferin (30 mg/mL). Mice were anesthetized with isoflurane (2% in 1 L/min oxygen), and bioluminescence images were acquired 10–15 min after D-luciferin injection using the IVIS XR system (Caliper Life Sciences, Hopkinton MA).

Colony-forming assays. Briefly, 1,000 or 4000 MCF7 single cells were seeded in DMEM medium containing 0.3% low-melting-point agarose and 5% FBS, and the cells were plated on 12 or 6-well plates coated with 0.5% low-melting-point agarose. After 40 days in culture, colonies were stained with 0.1% crystal violet and counted using ImageJ software. For clonogenic assays of the MDA-MB-231 cell line, cells were seeded in 96 well plates as described in results. After two weeks in culture, cells were stained with 0.1% crystal violet.

Sphere formation assays. Briefly, $2.5 \times 10^4/\text{ml}$ single cells were seeded over non-adherent suspension culture flasks. Cells were cultured in Mammocult (StemCell technologies) supplemented with 0.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone and 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin. After 7 days, the spheres were counted and were disaggregated with trypsin until single cells were obtained. Single cells were again seeded and spheres were counted after seven days. The same number of cells was seeded for each cell line.

Tissue microarray construction. Tumor tissues from 191 patients were embedded in paraffin, and 4-mm sections were stained with H&E to select morphologically representative areas. Tissues selected were punched with a 1-mm needle and transferred onto a recipient paraffin block using a Tissue Microarray ATA 100 Chemicon (Chemicon, Temecula, CA, USA). Then, 4-mm sections of these tissue arrays were sectioned and placed onto positively charged slides (VWR Superfrost Plus).

Immunohistochemical analysis of breast cancer tissues. Tissue sections were stained with Estrogen Receptor (SP1, CONFIRM), Progesterone Receptor (IE2, CONFIRM), and HER2 (4B5, PATHWAY). Immunohistochemistry was performed using the UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana). The immunohistochemistry of NIK (1:500, ab220442) and ALDH (1:500, 611195, BD) was performed using a Ventana Ultraview DAB detection kit (Ventana) and UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Ventana), respectively. Diaminobenzidine or Fast Red was employed as the chromogen, and hematoxylin as the nuclear counterstain. All slides were processed in a Ventana BenchMark XT processor (Ventana, Tucson, AZ, USA). Slides were scanned in ScanScope CS2 (Aperio) and image analysis was conducted in ImageJ. This study has used paraffin embedded breast cancer tissue obtained from the Oncology Hospital in the XXI Century National Medical Center. All used tissues were part of residual material and they did not endanger patients diagnostic.

Genome-Wide Microarray analysis. Total RNA from MCF7 cells transfected with shNIK, shLUC or pt-REX-DEST-NIK was obtained 48 hrs after transfection. All samples were treated with DNase 1 (Ambion). RNA integrity was evaluated with a Bioanalyzer 2100 (Agilent) and only samples with an RNA Integrity Number (RIN) greater than 9 were used. Three independent biological replicates were used and hybridized into Affymetrix Gene ST 2.0 Arrays at the INMEGEN microarray core unit. Data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO submission GSE63382)

Statistical analysis. Flow cytometry data were analyzed with the Flowjo software package (Treestar, Ashland, OR, USA). Densitometric analysis was performed using ImageJ software. Statistical analysis was carried out using GraphPad, and a 5% level was considered significant. Analysis of NIK and ALDH expression in breast cancer patients were conducted using JMP and One-way Analysis of variance (ANOVA) was employed to determine significant differences. Microarray data analysis was performed using bioconductor packages. Data were normalized with the Robust Multi-array Average method (RMA) contained in the oligo package.

The Limma R package was used to detect differentially expressed⁶⁰. Genes with a >1.8 fold change and a crude $p < 0.05$ were considered for further analysis. Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, USA) software was used to identify enriched networks.

References

- Al-Hajj, M. & Clarke, M. F. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* **23**, 7274–7282 (2004).
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–111 (2001).
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 3983–3988 (2003).
- Hinohara, K. & Gotoh, N. Inflammatory signaling pathways in self-renewing breast cancer stem cells. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 650–654 (2010).
- Korkaya, H. *et al.* Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol* **7**, e1000121 (2009).
- Liu, S. *et al.* Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* **66**, 6063–6071 (2006).
- Staudt, L. M. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000109 (2010).
- Sun, S. C. Controlling the fate of NIK: a central stage in noncanonical NF-kappaB signaling. *Sci Signal* **3**, pe18 (2010).
- Hacker, H. & Karin, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**, re13 (2006).
- Ling, L., Cao, Z. & Goeddel, D. V. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3792–3797 (1998).
- Thu, Y. M. & Richmond, A. NF-kappaB inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 213–226 (2010).
- Yang, C. *et al.* Opposing putative roles for canonical and noncanonical NFkappaB signaling on the survival, proliferation, and differentiation potential of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **28**, 1970–1980 (2010).
- Novack, D. V. *et al.* The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med* **198**, 771–781 (2003).
- Takada, I., Suzawa, M., Matsumoto, K. & Kato, S. Suppression of PPAR transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* **1116**, 182–195 (2007).
- Vaira, S. *et al.* RelB is the NF-kappaB subunit downstream of NIK responsible for osteoclast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 3897–3902 (2008).
- Cao, Y. *et al.* IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* **107**, 763–775 (2001).
- Fata, J. E. *et al.* The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* **103**, 41–50 (2000).
- Gonzalez-Suarez, E. *et al.* RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* **468**, 103–107 (2010).
- Yamamoto, M. *et al.* Epigenetic alteration of the NF-kappaB-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. *Cancer Sci* **101**, 2391–2397 (2010).
- Yamaguchi, N. *et al.* Constitutive activation of nuclear factor-kappaB is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci* **100**, 1668–1674 (2009).
- Yamamoto, M., Taguchi, Y., Ito-Kureha, T., Semba, K., Yamaguchi, N. & Inoue, J. NF-kappaB non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat Commun* **4**, 2299 (2013).
- Honeth, G. *et al.* The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res* **10**, R53 (2008).
- Park, S. Y., Lee, H. E., Li, H., Shipitsin, M., Gelman, R. & Polyak, K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 876–887 (2010).
- Zhang, W. *et al.* A NIK-IKKalpha module expands ErbB2-induced tumor-initiating cells by stimulating nuclear export of p27/Kip1. *Cancer Cell* **23**, 647–659 (2013).
- Pece, S. *et al.* Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* **140**, 62–73 (2010).
- Charafe-Jauffret, E. *et al.* Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* **69**, 1302–1313 (2009).

27. Martowicz, A., Spizzo, G., Gastl, G. & Untergasser, G. Phenotype-dependent effects of EpCAM expression on growth and invasion of human breast cancer cell lines. *BMC Cancer* **12**, 501 (2012).
28. Ginestier, C. *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555–567 (2007).
29. Natarajan, T. G. & FitzGerald, K. T. Markers in normal and cancer stem cells. *Cancer Biomark* **3**, 211–231 (2007).
30. Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. & Goeddel, D. V. IκappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IκappaB kinase-alpha and NIK. *Science* **278**, 866–869 (1997).
31. Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F. & Kirchner, T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* **5**, 744–749 (2005).
32. Liu, H. *et al.* Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 18115–18120 (2010).
33. Campbell, L. L. & Polyak, K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* **6**, 2332–2338 (2007).
34. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 8418–8423 (2003).
35. Herschkowitz, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* **8**, R76 (2007).
36. Biswas, D. K. *et al.* NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 10137–10142 (2004).
37. Merkhofer, E. C., Cogswell, P. & Baldwin, A. S. Her2 activates NF-kappaB and induces invasion through the canonical pathway involving IKKalpha. *Oncogene* **29**, 1238–1248 (2010).
38. Biswas, D. K., Cruz, A. P., Gansberger, E. & Pardee, A. B. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8542–8547 (2000).
39. Galang, C. K. *et al.* Oncogenic Neu/ErbB-2 increases ets, AP-1, and NF-kappaB-dependent gene expression, and inhibiting ets activation blocks Neu-mediated cellular transformation. *J Biol Chem* **271**, 7992–7998 (1996).
40. Korkaya, H., Paulson, A., Iovino, F. & Wicha, M. S. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* **27**, 6120–6130 (2008).
41. Ithimakin, S. *et al.* HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. *Cancer Res* **73**, 1635–1646 (2013).
42. Vesuna, F., Lisok, A., Kimble, B. & Raman, V. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia* **11**, 1318–1328 (2009).
43. Ju, J. H. *et al.* CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF-kappaB signaling in CD44-expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis* **32**, 1474–1483 (2011).
44. Ramakrishnan, P., Wang, W. & Wallach, D. Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity* **21**, 477–489 (2004).
45. O'Mahony, A., Lin, X., Gelezianus, R. & Greene, W. C. Activation of the heterodimeric IκappaB kinase alpha (IKKalpha)-IKKbeta complex is directional: IKKalpha regulates IKKbeta under both basal and stimulated conditions. *Mol Cell Biol* **20**, 1170–1178 (2000).
46. Liu, M. *et al.* The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res* **70**, 10464–10473 (2010).
47. Zhou, J., Zhang, H., Gu, P., Bai, J., Margolick, J. B. & Zhang, Y. NF-kappaB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells. *Breast Cancer Res Treat* **111**, 419–427 (2008).
48. Hinohara, K. *et al.* ErbB receptor tyrosine kinase/NF-kappaB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 6584–6589 (2012).
49. Cao, Y., Luo, J. L. & Karin, M. IκappaB kinase alpha kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 15852–15857 (2007).
50. Dhawan, P. & Richmond, A. A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *J Biol Chem* **277**, 7920–7928 (2002).
51. Gingery, A., Bradley, E. W., Pederson, L., Ruan, M., Horwood, N. J. & Oursler, M. J. TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFκB and SMAD pathways to promote osteoclast survival. *Exp Cell Res* **314**, 2725–2738 (2008).
52. Han, M. *et al.* Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN. *PLoS One* **7**, e39520 (2012).
53. Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
54. Min, I. M., Pietramaggiore, G., Kim, F. S., Passegue, E., Stevenson, K. E. & Wagers, A. J. The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **2**, 380–391 (2008).
55. Mitchell, A., Dass, C. R., Sun, L. Q. & Khachigian, L. M. Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNazymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Res* **32**, 3065–3069 (2004).
56. Tarcic, G. *et al.* EGR1 and the ERK-ERF axis drive mammary cell migration in response to EGF. *FASEB J* **26**, 1582–1592 (2012).
57. Thyss, R., Virolle, V., Imbert, V., Peyron, J. F., Aberdam, D. & Virolle, T. NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *EMBO J* **24**, 128–137 (2005).
58. Jeon, H. M., Lee, S. Y., Ju, M. K., Park, H. G. & Khang, H. S. Early Growth Response 1 Induces Epithelial-to-mesenchymal Transition via Snail. *Journal of life science* **23**, 970–977 (2013).
59. Velasco-Velazquez, M. *et al.* CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells. *Cancer Res* **72**, 3839–3850 (2012).
60. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3 (2004).

Acknowledgements

Karla Itzel Vazquez Santillan was supported by a fellowship from CONACYT (165306), and this study is part of her doctoral thesis from the Biomedical Sciences Doctorate Program, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autonoma de Mexico. This project was partially supported by CONACYT grant CB-2009-01-132931.

Author Contributions

K.V.S. carried out the experiments, analyzed data and manuscript writing. J.M.Z. Data analysis and interpretation and manuscript writing. L.M.G., L.J.H., G.M.R., J.G.C. and C.G.T. collection and assembly of data. P.P.S., J.T., V.R. and F.A.M. Provision of study material or patients and collection of data. M.V.V., P.G.L., M.P.T. Provision of study material, V.M.L. Conception and design, financial support, final approval of manuscript, data analysis and interpretation.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

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

How to cite this article: Vazquez-Santillan, K. *et al.* NF-kappaB-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. *Sci. Rep.* **6**, 37340; doi: 10.1038/srep37340 (2016).

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



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

© The Author(s) 2016

NF- κ B signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target?

K. Vazquez-Santillan¹ · J. Melendez-Zajgla² · L. Jimenez-Hernandez¹ ·
G. Martínez-Ruiz² · V. Maldonado¹ 

Accepted: 21 July 2015
© International Society for Cellular Oncology 2015

Abstract

Background Cancer stem cells (CSCs) are regulated by several signaling pathways that ultimately control their maintenance and expansion. NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) forms a protein complex that controls DNA transcription and, as such, plays an important role in proliferation, inflammation, angiogenesis, invasion and metastasis. The NF- κ B signaling pathway, which has been found to be constitutively activated in CSCs from a variety of cancers, participates in the maintenance, expansion, proliferation and survival of CSCs. Targeted disruption of this pathway may profoundly impair the adverse phenotype of CSCs and may provide a therapeutic opportunity to remove the CSC fraction. In particular, it may be attractive to use specific NF- κ B inhibitors in chronic therapeutic schemes to reduce disease progression. Exceptional low toxicity profiles of these inhibitors are a prerequisite for use in combined treatment regimens and to avoid resistance.

Conclusion Although still preliminary, recent evidence shows that such targeted strategies may be useful in adjuvant chemopreventive settings.

Keywords NF- κ B signaling · Cancer stem cells

✉ V. Maldonado
vmaldonado@inmegen.gob.mx

¹ Epigenetics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Periferico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, Mexico City 14610, Mexico

² Functional Cancer Genomics laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Periferico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, Mexico, Mexico City 14610, Mexico

1 Introduction

Cancer stem cells (CSCs) are thought to initiate and sustain tumor growth, including the formation and propagation of metastatic foci at distant sites [1–3]. According to this paradigm, only CSCs are able to self-renew indefinitely and to differentiate into various cell types, whereas other cells within a tumor cannot [4]. CSCs have three main properties: 1) the capacity to initiate tumors and to drive neoplastic proliferation, 2) the ability to produce unlimited copies of themselves through self-renewal and 3) the potential to give rise to more differentiated progeny. CSCs can evolve from normal stem cells (NSCs), since these cells are prone to accumulate mutations due to their long lifespan. CSCs can also arise from restricted progenitor or differentiated cells by genetic or epigenetic alterations that activate self-renewal mechanisms and allow them to acquire a CSC phenotype [5]. In this review, after briefly summarizing the basic knowledge of NF- κ B signaling and its role in cancer, we will describe the most relevant recent findings of this signaling cascade in the regulation of the CSC phenotype, and possible ways to harness this knowledge for therapeutic purposes.

2 The NF- κ B signaling pathway

NF- κ B refers to a family of transcription factors that controls the expression of a large number of genes related to immune responses, development, survival, proliferation, angiogenesis, invasion and metastasis [6]. This family comprises five transcription factors, i.e., RelA (p65), RelB, c-Rel, NF κ B1 (p50/p105) and NF κ B2 (p52/p100). RelA (p65), RelB and c-Rel are synthesized as mature proteins. Rel proteins contain a N-terminal Rel homology domain (RHD) essential for dimerization and DNA binding, and a C-terminal transcriptional

activation domain (TAD). NF- κ B1 and NF- κ B2 are synthesized as long precursors denoted p105 and p100, respectively. p105 and p100 contain a N-terminal RHD and a C-terminal ankyrin repeat domain, which is processed by the proteasome. After proteolysis, p105 and p100 give rise to p50 and p52. Both p50 and p52 contain a RHD, but lack a TAD [6, 7]. NF- κ B transcription factors homo- or hetero-dimerize to activate transcription. p65:p50, c-Rel:p50 and RelB:p52 are the most important dimers, since they regulate many cellular and physiological processes. Homo-dimers or hetero-dimers of p50 or p52 can still bind to DNA, but they are unable to activate gene transcription. They act, instead, as transcriptional repressors by blocking the consensus sites of NF- κ B [6].

In un-induced cells, specific inhibitors (inhibitors of κ B, i.e., I κ B) retain NF- κ B subunits in the cytoplasmic compartment. p100 and p105 can also act as NF- κ B inhibitors, since they contain five to seven ankyrin repeat modules and perform the same cytosolic-retaining function as I κ B proteins. I κ B interaction masks the nuclear localization sequence in the NF- κ B proteins, thus preventing nuclear translocation and activation [6, 7]. NF- κ B signaling can be activated in response to a variety of stimuli, including viral or bacterial infection, exposure to pro-inflammatory cytokines, mitogens and growth factors, and to oxidative stress conditions.

There are two main signaling pathways that activate the NF- κ B transcriptional activity. The canonical NF- κ B pathway mediates rapid and reversible inflammatory and immune responses, whereas the non-canonical NF- κ B pathway mediates slow responses during e.g. development [7, 8]. The canonical NF- κ B pathway can be activated by many pro-inflammatory factors such as cytokines (IL1 β , TNF α), pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and some danger-associated molecular patterns (DAMPs). Upon binding of these factors to their receptors, the I κ B kinase (IKK) complex (IKK α , IKK β and IKK γ) is activated through recruitment of several proteins involved in ubiquitin chain formation. These proteins allow the activation of kinases such as TAK1, which can phosphorylate IKK β at serine (Ser) 177 and Ser 181, thereby activating it [8]. Once the IKK complex is activated, it phosphorylates I κ B proteins (I κ B α , I κ B β and I κ B ϵ) and triggers their poly-ubiquitination and subsequent degradation by the 26S proteasome. After I κ B degradation, NF- κ B is released into the nucleus to allow transcriptional activation. RelA and cRel form either homo- or hetero-dimers with p50 to activate the canonical pathway. RelA:RelA, RelA:p50, c-Rel:c-Rel and c-Rel:p50 are the main canonical pathway members [4, 5]. The non-canonical NF- κ B pathway is activated by lymphotoxin β (LT β), CD40 ligand (CD40L), B cell activating factor (BAFF) and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). Activation of the non-canonical pathway requires de novo protein synthesis and stabilization of NIK (NF- κ B-interacting kinase), also called MAP3K14. NIK phosphorylates and activates IKK complexes formed by two subunits of

IKK α [9]. IKK α and NIK phosphorylate p100, thereby inducing its partial proteolysis, and allow the release of p52/RelB or p52/p65 complexes [10].

3 NF- κ B signaling and cancer

The NF- κ B signaling pathway plays a major role in tumor biology, since it regulates key processes during the initiation and progression of various types of cancer [11, 12]. Based on the broad range of target genes and tissues involved, NF- κ B may be one of the most common regulators of cancer. Direct and indirect effects of this transcription factor complex in tumor initiation and progression have been found using several animal models of e.g. hepatocellular carcinoma, gastric cancer and lung cancer [13, 14]. In most tumors, NF- κ B signaling is constitutively active, promoting processes such as proliferation, angiogenesis, invasion, metastasis, chemoresistance and radio-resistance. This signaling pathway can promote cell growth by inducing the expression of many genes that regulate proliferation, including cyclin D1, D2, D3, cyclin E, CDK2 and c-Myc. Alternatively, NF- κ B can promote growth signals through GM-CSF and IL6 [15]. It is also known that inhibition of this pathway impedes the growth of tumor cells and directs them to apoptotic cell death [11, 16]. Additionally, NF- κ B can activate the transcription of several genes involved in the suppression of extrinsic and intrinsic apoptosis, such as the inhibitory protein FLIP, BCL2, BclxL and several IAPs [17–19]. Inhibition of apoptosis enables the accumulation of mutated premalignant and malignant cells, allowing the development and progression of cancer. However, it has also been shown that under certain circumstances NF- κ B can induce apoptosis and positively regulate pro-apoptotic genes. Thus, NF- κ B may have contrasting roles in different tissues, depending on the microenvironment context [15, 16].

NF- κ B has also been found to play an important role in the formation of new blood vessels in tumors (angiogenesis) through the production of cytokines such as TNF, IL1, and IL6. These cytokines stimulate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is the primary regulator of angiogenesis. NF- κ B can also induce the expression of additional angiogenic regulators such as CXCL1, CXCL8 and IL8. In addition, NF- κ B can promote the expression of adhesion molecules such as ICAM-1 and E-selectin and proteins involved in the invasion of tumor cells (metalloproteinases, MMPs) [16, 17, 20]. Additionally, it has been found that NF- κ B can promote epithelial-mesenchymal transition (EMT), an event strongly related with invasion and formation of metastatic foci in many types of tumors [21, 22]. Finally, an inflammatory microenvironment, which is largely produced by activation of NF- κ B, also contributes to carcinogenesis

through cytokine production and the processing of signals that promote tumor growth [23].

4 Activation of NF- κ B signaling in cancer stem cells

There is ample evidence showing that constitutive activation of NF- κ B signaling participates in the initiation and progression of cancer [24]. More recently, it has been shown that the NF- κ B pathway is activated preferentially in the cancer stem cells (CSC) of diverse malignancies, including leukemia, glioblastoma, prostate, ovary, breast, pancreatic and colon cancer [25–31].

5 NF- κ B signaling in leukemia

In acute myelogenous leukemia (AML), a subpopulation of leukemic stem cells (LSCs) exhibits constitutive NF- κ B activity. Interestingly, normal hematopoietic stem cells (HSCs) and non-LSC lack this activity [25]. In these cells, NF- κ B is activated through the canonical pathway, probably by p50 and p65 dimers [25]. p65 is located in the nuclear fraction of LSCs, while it is retained mostly in the cytoplasm in the HSCs [32]. LSCs exhibit increased expression levels of NF- κ B-regulated genes (i.e., Tnf, Ncf2, I115ra, Litaf) compared to HSCs and non-LSC. Differences in the NF- κ B status in LSCs versus other cells are mainly due to the high proteasomal activity in these cells, which increases the degradation of the I κ B α protein and promotes subsequent NF- κ B activation. This phenomenon is consistently observed in different types of AML and it is thought to be maintained by autocrine TNF- α signaling [32]. Since the canonical NF- κ B pathway plays an important role in the survival of LSCs [25, 33–35], it represents a potential target for therapeutic intervention to eradicate LSCs while sparing normal HSCs.

6 NF- κ B signaling in glioblastoma

Glioblastoma cancer stem cells (GCSs) exhibit constitutive activation of the NF- κ B pathway, mainly due to p65 over-expression. STAT3 and p65 bind to adjacent sites in the Notch1 promoter and induce the activation of Notch signaling. STAT3/NF- κ B signaling up-regulates the expression of Notch1, Hes5, Jag1, Numb, DTx3 and DVI3, and down-regulates the expression of RBPJ, a negative modulator of Notch signaling [31]. Interactions between the Notch and NF- κ B signaling pathways have been observed in several other tissues as well, where increased Notch activation has been found to lead to NF- κ B induction and inhibition or down-regulation of Notch1 has been found to lead to decreased NF- κ B activity [36]. STAT3/NF- κ B/Notch signaling is key

to the regulation of self-renewal and survival of GSCs. Interestingly, GSCs harbor a higher number of NFKBIA deletions compared to non-stem cells. NFKBIA deletion decreases intracellular levels of the NF- κ B inhibitor (I κ B α), thereby inducing p65 and activating the NF- κ B pathway [37]. In GSCs, activation of the canonical pathway results in an increased expression of NF- κ B target genes such as IL8, CXCL11, BCL-2, BCL-X and TRAIL [31]. The expression of pro-inflammatory genes, in turn, activates the canonical NF- κ B pathway allowing stem cells to survive and self-renew [38].

The exact role of canonical NF- κ B signaling in GSCs remains to be established. NF- κ B activation has been reported to promote the acquisition of a pro-inflammatory phenotype [38] and the survival and tumorigenicity of GSCs [39]. However, alternative evidence suggests that the NF- κ B pathway is mainly activated during differentiation of GSCs, i.e., NF- κ B inhibition has been found to preclude the differentiation of GSC, causing growth arrest and senescence due to the reduction of cyclin D1 levels. [40]. The role of the NF- κ B pathway in the differentiation of GSCs needs to be addressed in further detail in order to clarify its function during differentiation.

RelB controls the expression of stem cell-related genes such as Olig2 through activation of the non-canonical NF- κ B pathway in GSCs. Both neural progenitor cells and GSCs are known to express Olig2 [41]. It is well-established that activation of the non-canonical pathway promotes survival, motility and invasion of glioblastomas, but the exact role of this pathway in GSCs remains to be elucidated.

7 NF- κ B signaling in prostate cancer

Prostate cancer stem cells (PCSCs) over-express genes associated with inflammation, cell adhesion and metastasis, including NF- κ B [26] and IL6 [27]. IL6 is a NF- κ B target that also activates NF- κ B, creating a positive feedback loop that allows constitutive activation of the pathway [26]. Interestingly, IL6 induces the conversion of prostate cancer cells into CSCs in a dose-dependent manner [42]. NF- κ B associated proteins are over-expressed in the PCSC fraction [27], and these cells exhibit highly activated PKC and NF- κ B pathways, suggesting that PKC α may constitutively activate the NF- κ B pathway through phosphorylation of IKK β [26]. Unlike non-cancer stem cells, PCSCs express low levels of I κ B α and show increases in the accumulation of p65 and its acetylated form, p65 (acetyl-K310). Furthermore, p65 is constitutively localized in the nuclei of PCSCs, suggesting that sustained activation of the canonical NF- κ B pathway may have functional implications in these cells.

8 NF- κ B signaling in ovarian cancer

Ovarian cancer stem cells (OCSC) exhibit a constitutively active NF- κ B signaling pathway and a concomitant production of pro-inflammatory cytokines and growth factors such as IL1B, IL6, IL8, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, GRO α , GM-CSF and G-CSF, which are regulated by the NF- κ B pathway. These data suggest that OCSCs can create an inflammatory microenvironment through the NF- κ B pathway [28, 43]. This pro-inflammatory microenvironment is essential for the support of tumor growth and CSC self-renewal. In line with this, it has been shown that NF- κ B inhibition can prevent both tumor growth and enrichment of the stem cell population [43]. Interestingly, OCSCs are able to proliferate even in the presence of effective concentrations of anti-cancer drugs, i.e., administration of paclitaxel and carboplatin to OCSCs induces the activation of NF- κ B and enables the proliferation of CD44+ cells, whereas the same treatment in non-stem cells induces an apoptotic response. These results show that OCSCs are resistant to anti-cancer drugs, and that this resistance is partly regulated through NF- κ B activation [28]. OCSCs display a stronger metastatic capacity than non-CSCs. These cells express higher levels of chemokines and chemokine receptors such as CCL5, CCR1, CCR3 and CCR5. Noteworthy, CCL5 signaling promotes migration and invasion of OCSCs in an autocrine way through the up-regulation of MMP9 in a NF- κ B-dependent manner. CCL5 induces p65 translocation and activation of the NF- κ B pathway, thus regulating the metastatic potential of OCSCs [44]. In spite of the important role of the NF- κ B pathway in the survival, migration and invasion of OCSCs, little is known about the NF- κ B associated factors involved in this regulation. Some evidence indicates that OCSCs express very low levels of miR-199A, a known regulator of IKK β and the canonical NF- κ B pathway and, thus, it seems that the canonical NF- κ B pathway is involved in OCSC regulation [28, 45].

OCSCs with a CD44+/VE-cadherin-/CD34- phenotype participate in tumor vascularization through an IKK β -dependent and VEGF-independent mechanism. These cells have the capacity to differentiate into CD44+/VE-cadherin+/CD34+ endothelial cells. This capacity is unique to the OCSC fraction and, as such, OCSCs can act as vascular progenitors after NF- κ B pathway activation [46]. Interestingly, the IKK β inhibitor bay11-7082 prevents angiogenesis, but has no effect on blood vessel development through normal endothelial cells. These results show that the canonical NF- κ B pathway cannot only induce the secretion of pro-angiogenic factors such as IL6, IL8 and VEGF, but can also influence the ability of OCSCs to differentiate and produce endothelial cells, which may contribute to the vascularization of ovarian tumors.

9 NF- κ B signaling in breast cancer

The role of NF- κ B in CSCs has been studied relatively thoroughly in breast cancer. In these tumors, the CSC population can be identified by the expression of CD44, EpCAM and a low or absent expression of CD24. Several studies have shown that breast CSCs (BCSCs) exhibit a significantly higher NF- κ B activity than cells without this phenotype (i.e., CD44-/CD24+) [29, 47]. The NF- κ B activity in BCSCs seems to be proportional to the absence of the CD24 protein. It has e.g. been found that exogenous expression of CD24 in CD44+/CD24- BCSCs can inhibit NF- κ B signaling, thereby affecting BCSC proliferation. Moreover, it has been found that the expression of CD24 can sensitize BCSCs to apoptosis induction by DNA-damaging anti-cancer drugs [48]. These results suggest that the NF- κ B pathway is active in the BCSC fraction and that its activation may confer certain advantages to the CSC population.

In order to elucidate the role of the NF- κ B pathway in the biology of BCSCs, Liu et al. employed an I κ B super-repressor protein (I κ B-SR) that lacks phosphorylation sites for IKK β and, thereby, prevents NF- κ B activation. It was found that I κ B-SR over-expression induced a decrease in the proportion of BCSCs in HER2-dependent murine tumors. Likewise, inhibition of NF- κ B reduced the formation of mammospheres in non-adherent conditions. This effect was found to be largely due to a reduction in the expression levels of stem cell factors such as Sox2 and Nanog, factors that regulate stem cell populations in many tissues. These results suggest that the NF- κ B pathway regulates the expansion of BCSCs in an IKK β -dependent fashion [49]. Signaling through IKK β is, however, not the only way to expand BCSCs. In fact, it has been found that mice harboring inactivating IKK α mutations exhibit a delay in tumor development in a HER2-dependent model. Furthermore, cancer cells derived from these tumors showed a significant reduction in the formation of secondary mammospheres, suggesting that also IKK α is a key kinase governing the self-renewal capacity of BCSCs [50]. Recently, it has been shown that IKK α and its activator (NIK) are required for the expansion of CSCs in HER2-induced tumors. The NIK-IKK α cascade acts by phosphorylating and reducing the amount of nuclear p27, a well-known negative regulator of the G1-S cell cycle transition checkpoint, thus restoring CSCs self-renewal capacity in IKK α -deficient mice [51]. Recently, our group has shown that NIK mediates stemness in breast cancer cell lines. We found that shRNA-mediated inhibition of NIK reduced the expression of CSC markers and impaired the clonogenicity and tumorigenesis of these cell lines both *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, we observed a physical co-localization of aldehyde dehydrogenase (ALDH), a well-known stem cell marker, and the NIK protein in primary breast cancer samples, supporting the relevance of this protein in human breast cancer (unpublished data). Recently,

Schramek et al. showed that deletion of IKK α in mammary epithelial cells can affect tumor formation in a murine model induced by a progesterone derivative (MPA). IKK α can be activated by RANKL, thus inducing cell proliferation and expansion of luminal progenitor cells. Interestingly, tumor cells obtained from mice deficient in RANK are unable to form secondary mammospheres. These results indicate that loss of RANK expression affects the ability of CSCs to self-renew [52]. In line with this, exogenous expression of RANK was found to increase the population of (CD44⁺/CD24^{low}) stem cells and to induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) [53]. Recently, it has been shown that inflammation induced by NF- κ B activation plays an important role in the maintenance of the BCSC population through an epigenetic mechanism. This mechanism involves the regulation of Lin28B, an inhibitor of microRNA (miRNA) biogenesis, that decreases let-7a miRNA expression which, in turn, regulates IL6 expression. IL6 activates NF- κ B, thus forming a positive regulatory circuit. BCSCs express higher levels of Lin28B and lower levels of let-7a compared to non-stem cancer cells [54]. Interestingly, IL6 can also transform non-stem cells into BCSCs [42]. Moreover, it has been found that disruption of IL6 results in a reduction of the CSC population and inhibits tumor growth and metastasis. IL6 is, at least partially, responsible for trastuzumab resistance in breast cancer [55]. Several reports have shown that BCSCs secrete chemokines and cytokines that regulate their maintenance in an autocrine manner. Yamamoto et al. showed that non-stem cells, such as tumor-associated macrophages, tumor-associated fibroblasts [56], and other differentiated cancer cells provide a permissive microenvironment to support the CSC population [57]. Non-stem cells secrete Jagged1 (JAG1), a known ligand of Notch signaling, through NIK-dependent NF- κ B activation. Induction of JAG1 was found to result in stimulation of Notch signaling and CSC expansion. Interestingly, the NIK-NF κ B-JAG1-Notch1 axis regulates CSC populations only in basal-like breast tumors. NF- κ B/TNF α signaling also regulates a stem cell-like phenotype through up-regulation of EMT mediators such as Slug [58] and Twist [22] in breast cancer. Slug and Twist are regulated through canonical NF- κ B activation and their expression results in the acquisition of a mesenchymal phenotype. It has been found that induction of EMT in breast cancer cells leads to the acquisition of a stem cell phenotype [59]. NF- κ B signaling participates in the induction of EMT, thus promoting mammosphere formation and increasing the invasive capacity of breast cancer cells [21, 22, 58].

Together, these results indicate that the canonical and non-canonical NF- κ B pathways cooperate to activate different downstream targets, leading to a high self-renewal ability, a sustained proliferation and survival and tumorigenesis of BCSCs.

10 NF- κ B signaling in pancreatic cancer

Pancreatic CSCs are characterized by an over-expression of NF- κ B and other stem cell regulators [60], and it has been shown that pancreatic CSCs exhibit high NF- κ B activity [61, 62]. The NF- κ B pathway regulates the migration and invasion of pancreatic CSCs, and NF- κ B activation is required for maintenance of their stemness phenotype. In addition, pancreatic CSCs also depend on SOX9 expression for their invasive properties. p65 directly binds to the SOX9 promoter and positively regulates its expression. NF- κ B and SOX9 regulate the CSC population. It is worth noting that the expression of p65 and SOX9 overlap with the previously identified CSC population, underscoring that canonical NF- κ B signaling is important in CSC regulation [62]. Additional data suggest that NF- κ B activity in pancreatic CSCs is mediated by p50/RelA, p52/RelA and c-Rel homodimers. In contrast, non-stem cancer cells only express p50/p50 homodimers, which lack transactivating activity. It has also been found that in pancreatic CSCs NF- κ B can promote apoptosis resistance to anti-cancer drugs by up-regulating anti-apoptotic proteins such as XIAP, cIAP and FLIP [61].

11 NF- κ B signaling in colon cancer

The canonical NF- κ B pathway induces the expression of genes encoding stem cell-associated factors and, in addition, regulates the intestinal stem cell compartment through IKK β [63]. Over-expression of IKK β has been found to result in activation of β -catenin/WNT signaling, thereby inducing proliferation and the formation of tumors. These results indicate that both NF- κ B and WNT signaling can drive intestinal tumorigenesis [63]. p65 binds to β -catenin/Tcf via CBP, thereby enhancing WNT signaling and inducing de-differentiation of intestinal non-stem cells and, by doing so, providing tumor stem cell properties to them. NF- κ B activity depends on TNF α and K-Ras, which enhance the interaction between β -catenin and CBP [64]. The canonical NF- κ B pathway is an important mediator of intestinal stem cell proliferation and tumor initiation. During colorectal carcinogenesis after APC loss, p65 binds to the promoter regions of the stem cell marker genes Lgr5, Olfm4 and Rgmb in a process that depends on RAC1 expression [65]. In addition, there is increasing evidence that inflammation is involved in the development of diverse epithelial tumors. In the colon, this is exemplified by an interplay between microflora-induced innate immunity responses in intestinal stem cells within their niche. This process is extensively regulated by NF- κ B [66]. Since NF- κ B is anomalously activated early in carcinogenesis, there are ample opportunities to take advantage of this activation for the design of preventive and therapeutic tools (see below).

Together, these results show that the NF- κ B pathway is constitutively active in CSCs derived from many types of tumors and that activation of this pathway has functional implications for self-renewal and maintenance of the CSC population. Activation of NF- κ B in these cells affects the expression of apoptotic genes, inflammatory cytokines, adhesion molecules and cell cycle regulators that stimulate cell proliferation and influence tumor growth by regulating CSC maintenance. Expression of NF- κ B target genes sustains the undifferentiated state and allows CSCs to self-renew, even in the presence of common chemotherapeutic drugs (Fig. 1). This is an indication that this signaling pathway may serve as a diagnostic, prognostic and therapeutic target for a large number of tumors.

12 Drugs that inhibit NF- κ B target CSCs

Since NF- κ B activation plays a crucial role in the maintenance and expansion of CSCs in many tumors, it has been suggested that NF- κ B inhibitors might be used to specifically eliminate

the CSC population. Conventional chemotherapeutic agents do not target the CSC population. In fact, several drugs (i.e., taxanes, vinca alkaloids, nucleoside analogues and topoisomerase inhibitors) activate the NF- κ B pathway [67], which conceivably could promote the expansion of CSCs and, thus, disease recurrence. Although not extensively studied, NF- κ B-mediated CSC expansion could be one of the main mechanisms for intrinsic resistance to chemotherapy. So, the use of NF- κ B inhibitors could offer a therapeutic opportunity for many tumors. In fact, the potential of these NF- κ B inhibitors to kill CSCs has recently been assessed, and a large number of molecules has been reported to be able to inhibit the NF- κ B pathway through different mechanisms. Some molecules were found to compromise the binding of NF- κ B to DNA, prevent the phosphorylation and degradation of some of its regulatory components and/or prevent the formation of IKK complexes [68]. Finally, all inhibitors were found to prevent the transcription of NF- κ B target genes. In Table 1 some of the most widely studied molecules are listed.

SN50, a cell permeable peptide with a nuclear localization sequence for p50, inhibits NF- κ B by interfering with its

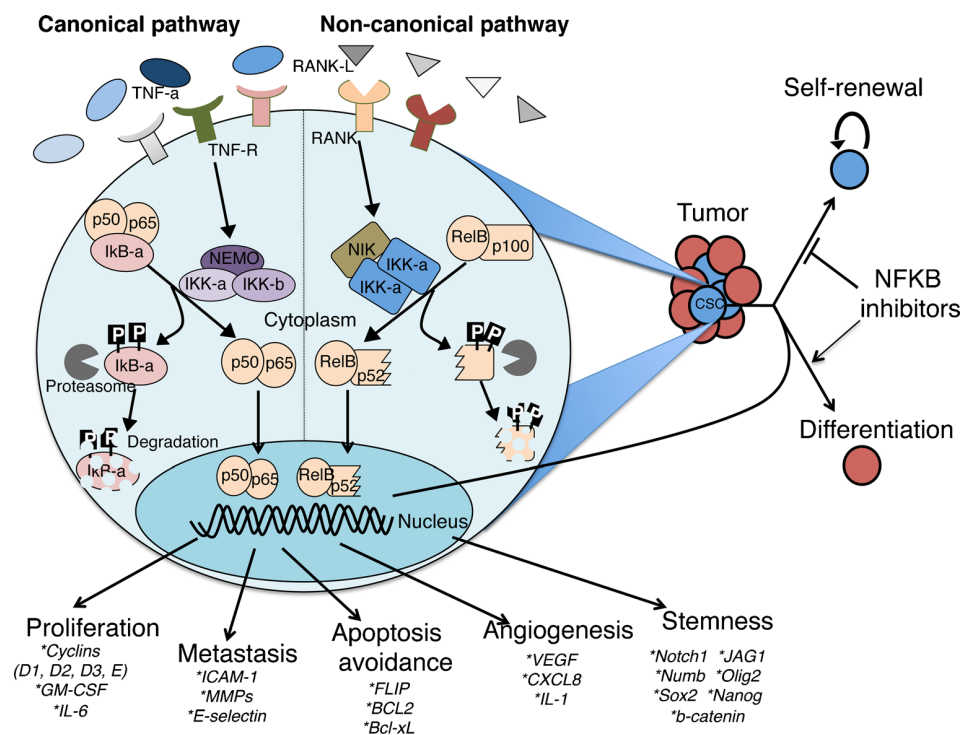


Fig. 1 NF- κ B regulates the cancer stem cell (CSC) phenotype. Activation of both canonical and non-canonical NF- κ B pathways has been observed in CSCs. The pro-inflammatory cytokine TNF α induces activation of the canonical NF- κ B pathway through its cognate receptor and thereby induces IKK complex formation, which leads to I κ B phosphorylation. I κ B acts as a NF- κ B repressor in un-stimulated conditions by blocking nuclear translocation of NF- κ B dimers. Once I κ B is phosphorylated, it is degraded by the proteasome, allowing NF- κ B activation. Non-canonical NF- κ B activation has also been observed in CSCs. RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) induces activation of the

kinase NIK through its receptor. NIK activates IKK α , allowing phosphorylation of p100. Phosphorylated p100 is processed by the proteasome, allowing NF- κ B nuclear translocation. Over-expression of NF- κ B responsive genes has been observed in CSCs. These genes are involved in diverse oncogenic responses such as proliferation, metastasis, apoptosis avoidance, angiogenesis and maintenance of the stemness phenotype. Inhibition of the NF- κ B pathway in CSCs by diverse approaches (see Table 1) can compromise their self-renewal, and thus tumorigenic, abilities

Table 1 Inhibitors of the NF-κB pathway used for CSC elimination

Drug class	Target	Tumor	Effect	Reference
SN50	Interferes with translocation of NF-κB.	Glioblastoma and liver cancer	Induces differentiation of glioblastoma stem cells. Reduces colony and sphere formation of glioblastoma and liver CSCs. Minimizes the ability to invade and grow in vivo. Increases the sensitivity of CSCs to chemotherapeutic agents and to radiation treatment.	64, 65
Celastrol	Inhibits IKK activation.	Leukemic and prostate cancer stem cells	Ablates the ability to initiate tumors and secondary spheres	22, 70, 69
Tan-11A	Prevents p65 nuclear translocation.	Breast cancer	Inhibits the growth of breast CSCs both in vitro and in vivo	71
Tanshinone IIA	Blocks degradation of IκB.	Acute myeloid leukemia and prostate cancer	Induces a strong apoptotic response preferentially in the leukemic stem cell population. Eliminates the ability of pancreatic CSCs to form secondary spheres.	82, 29, 21, 22
BAY11-7082	Inhibits phosphorylation of IκBα.	Breast cancer	Reduces mammosphere formation and suppresses the secretion of pro-inflammatory cytokines involved in CSC regulation.	79, 53, 51
BAY11-7085	Inhibits activity of the IKK complex.	Myeloid and lymphoid leukemias	Eradicates the cancer stem cell population in vivo and in vitro. Induces apoptosis in CSCs without affecting normal hematopoietic stem cells.	31
Damp1 (Dimethyl amino parthenolide)	Inhibits activity of NF-κB.	Breast cancer	Inhibits proliferation and affects the ability of cancer stem cells to form colonies.	68
Combination of parthenolide, pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) and diethylthiocarbamate analogue (DETC)	Inhibits activity of NF-κB.	Prostate cancer	Inhibits the formation of secondary spheres and tumors in vivo.	22
Alone or combination of parthenolide with 481407 and celastrol	Inhibits nuclear translocation of NF-κB dimers.	Breast cancer	Induces apoptosis in CSCs.	80, 25, 81
DHMEQ	Inhibits binding of NF-κB, blocks IκBα phosphorylation and p65 translocation.	Acute myeloid leukemia	Reduces tumorigenic potential of CSCs and decreases the formation of secondary mammospheres.	83
Niclosamide	Prevents degradation of IκBα. Inhibits cytokine production and reduces the levels of XIAP. Inhibits NF-κB signaling.	Ovarian cancer	Eliminates the CSC fraction, increases levels of ROS causing an apoptotic response.	74
EriB (Eriocalyxin B)	Inhibits proteasomal activity.	Intestinal and breast cancer	Sensitizes CSCs to be killed by FAS/TNF mediated apoptosis.	72, 89
Sulindac	Prevents active NF-κB dimers from binding to κB sites of its targets.	Acute myeloid leukemia	Eliminates intestinal cancer stem cells through induction of apoptosis.	91, 92
Bortezomib	Inhibits proteasomal activity.	Pancreatic cancer	Reduces the tumorigenic ability of breast cancer stem cells. Potential target for CSCs.	56, 76
Sulforaphane	Prevents active NF-κB dimers from binding to κB sites of its targets.	Breast cancer	Reduces colony and spheroid formation, disrupts ALDH activity and induces apoptosis of CSCs and affects their clonogenic capacity.	78
IMD-0354	Inhibits IKKβ and blocks IκBα phosphorylation.	Breast cancer	Decreases the CSC fraction and reduces stem cell marker expression.	96, 65
Curcumin	Avoids p65 phosphorylation and interaction with STAT3.	Breast cancer Colon Cancer Liver Cancer	Minimizes the growth and reduces stem cell marker expression.	

Effect of drugs targeting NF-κB in the biology of cancer stem cells

translocation. Recently, it has been shown that SN50 can induce the differentiation of glioblastoma cancer stem cells (GCSC) through down-regulation of the stem cell markers CD133, SOX2 and NAC1, and up-regulation of the differentiation markers MAP-2 and GFAP. As a result, GCSCs fail to form neurospheres and are reduced in their abilities to invade and generate tumors in vivo. Furthermore, SN50 was found to increase the sensitivity of CSCs to the chemotherapeutic agent temozolomide and to radiation treatment [69]. SN50 can also suppresses the colony and sphere forming abilities of liver cancer cell lines, which correlates with the extent of NF- κ B inhibition [70].

Parthenolide, a sesquiterpene lactone derived from the medicinal herb Feverfew (*Tanacetum parthenium*), binds to and inhibits IKK β , thereby blocking activation of the canonical NF- κ B pathway [71]. Parthenolide impairs cell self-renewal and reduces the CSC populations in leukemias, nasopharyngeal carcinomas, prostate and breast cancers [26, 34, 35, 72, 73]. The parthenolide inhibitory action on self-renewal, sphere-forming activity and in vivo tumor-initiation ability are dose-dependent [26, 34, 72, 73]. Additionally, inhibition of NF- κ B through parthenolide reduces BCSC proliferation [73] and induces apoptosis in prostate and leukemic CSCs, indicating that NF- κ B is also imperative for the survival of these cells [26]. Noteworthy, it has been found that parthenolide almost exclusively targets CSCs and has minimal effects on non-stem breast cancer cells [73].

Celastrol, a tripterine extracted from the Chinese medicine herb *Celastrus orbiculatus*, has been found to inhibit IKK activation and to suppress NF- κ B activation [74]. Celastrol diminishes the nuclear localization of p65 and ablates leukemic and progenitor stem cells [75]. In prostate cancer cell lines, celastrol has been found to eradicate the ability of CSCs to initiate tumors in vivo and to dramatically impact their ability to generate secondary spheres [26].

Tanshinone IIA, a lipophilic diterpene isolated from *Salvia miltiorrhiza*, has been found to prevent p65 nuclear translocation in breast CSCs. This compound was found to inhibit the growth of breast CSCs both in vitro and in vivo by blocking IL6/STAT3/NF- κ B signaling [76].

Eriocalyxin B (EriB), an ent-kauranoid diterpenoid isolated from *Isodon eriocalyx*, has been found to inhibit NF- κ B transcriptional activity by interfering with the binding of p65 and p50 to their respective response elements [77]. EriB was found to exhibit an anti-tumor effect in leukemia and various cancer cell lines [78]. In ovarian CSCs, EriB prevented the degradation of I κ B α and, thereby, decreased the levels of p65 in their nuclei [79]. EriB treatment also inhibited cytokine production and reduced the levels of XIAP (apoptosis inhibitory protein). Ovarian CSCs are resistant to apoptosis mediated through TNF and FasL. EriB treatment, however, was found to sensitize OCSCs to be killed through FAS/TNF α -mediated apoptosis [79].

Sulforaphane, an isothiocyanate derived from broccoli, prevents active NF- κ B dimers from binding to the κ B sites of its targets, thereby preventing the expression of apoptosis inhibitor proteins in the CSC population [61]. Sulforaphane was also found to block the nuclear translocation of NF- κ B, leading to a low expression of its targets in prostate and colon cancer cells [80]. Sulforaphane induces apoptosis of CSCs and profoundly affects their clonogenic capacity in a NF- κ B-dependent manner [61]. In pancreatic CSCs, sulforaphane blocks NF- κ B binding [81] and eliminates the resistance of CSCs to TRAIL by interfering with NF- κ B signaling [61]. Sulforaphane treatment reduces colony and spheroid formation, disrupts ALDH activity and increases cell death in pancreatic CSCs [81]. It has been shown that sulforaphane exhibits an important synergy when administered in combination with other drugs. Sulforaphane in combination with e.g. sorafenib (a multi-kinase inhibitor) was found to significantly reduce tumor growth in nu/nu mice without having toxic side-effects, which correlated with a diminished CSC population [81]. Sulforaphane and gemcitabine were found to increase the inhibition of stem cell characteristics and to abolish the growth of pancreatic and prostate CSC xenografts without inducing any additional toxicity in mice. Sulforaphane acts through down-regulating c-Rel expression and, consequently, NF- κ B activity. In addition, sulforaphane down-regulates Notch1, which may also be involved in the inhibition of NF- κ B signaling [82].

A recently described compound, IMD-0354, inhibits IKK β and blocks I κ B α phosphorylation, thus preventing p65 translocation. IMD-0354 treatment decreases the CSC fraction in a dose-dependent manner and reduces the expression of stem cell factors. IMD-0354 alone or in combination with doxorubicin enhances tumor cytotoxicity and prevents multidrug resistance (MDR) [83].

Bay11-7082 and Bay11-7085 act by inhibiting I κ B α phosphorylation, thus blocking I κ B degradation and maintaining NF- κ B in an inactive state [84]. Bay11-708 treatment dramatically reduces mammosphere formation in BCSCs [58]. Furthermore, Bay11-708 completely suppresses the secretion of pro-inflammatory cytokines involved in CSC regulation [55]. Additional drugs such dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) inhibit the nuclear translocation of NF- κ B dimers [85]. It has been found that DHMEQ dramatically reduces the tumorigenic potential of CD44+/CD24- BCSC [29] and that this compound decreases the frequency of mammosphere formation in a dose-dependent manner. In addition, cells treated with this inhibitor failed to generate secondary mammospheres [86]. Dimethyl amino parthenolide (Damppt), a synthetic analogue of parthenolide, has been found to eradicate the CSC population in myeloid and lymphoid leukemias, both in vivo and in vitro. Furthermore, Damppt was found to induce apoptosis in leukemia progenitor cells while sparing normal hemopoietic stem cells (HSCs) [35]. Similarly, other NF- κ B inhibitors such as pyrrolidinedithiocarbamate

(PDTC) and its analogue diethyldithiocarbamate (DETC) preferentially inhibited sphere formation in breast cancer [73] and in vivo studies have shown that PDTC treatment can inhibit tumor growth and synergize with paclitaxel [73]. These results indicate that BCSCs may be selectively removed through inhibition of the NF- κ B pathway. 481407 compound, a cell-permeable potent site-binding inhibitor of IKK β , induces apoptosis in prostate CSCs, indicating that NF- κ B is important for the survival of these cells as well [26]. In addition, 481407 was found to reduce the ability of CSCs to generate secondary spheres and to eliminate the tumorigenic potential of prostate CSCs [26]. MG-132 blocks the degradation of I κ B through inhibition of the 26S proteasome, allowing the retention of NF- κ B in the cytoplasm and preventing its nuclear translocation [87]. In AML MG-132 induces a strong apoptotic response, preferentially in the leukemic stem cells (LSCs), while sparing normal HSCs [25, 33]. In prostate cancer, MG-132 eliminates the secondary sphere-forming ability of CSCs.

13 Clinical compounds

There are a few examples of compounds that, although not developed specifically to inhibit NF- κ B, modulate its pathway and that are currently in clinical use.

Nicosamide, a FDA-approved anti-helminthic drug, has been found to eliminate LSCs through NF- κ B inhibition and the production of reactive oxygen species, without affecting the normal population of hematopoietic progenitor cells [88].

Sulindac, a non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) drug, has been found to effectively prevent colon cancer in human and murine models [89]. In the murine models, this drug inhibited COX-2, WNT/ β -catenin and NF- κ B signaling [90–92]. The chemo-preventive effect of sulindac is partly based on the elimination of CSCs through induction of apoptosis. Sulindac is particularly active in stem cells harboring nuclear β -catenin and, thus, removes (intestinal) stem cells with aberrant activation of WNT signaling [72]. Indeed, sulindac and other NSAIDs such as celecoxib, can effectively reduce the number and size of adenomas in familial adenomatous polyposis (FAP) syndrome patients. These data suggest that sulindac can efficiently target CSCs. As yet, however, there are no data available from long-term surveys indicating that there is a reduction in cancer risk [89, 93]. In animal models of breast cancer, a derivative of sulindac (phosphosulindac) has been shown to target breast CSCs, thereby reducing their tumorigenic capacity [94].

Bortezomib (Velcade, Millenium) is a drug that has recently been approved for its use in myeloma and Hodgkin lymphoma. Bortezomib, a known proteasome inhibitor, is also a strong NF- κ B inhibitor. Recently, Cheresh et al. found that erlotinib, an effective inhibitor of EGFR kinase, induces the expression of CD61, a molecule that confers stem-cell characteristics and drug resistance [95]. CD61 signals through

KRAS/RalB to activate NF- κ B and, by doing so, promotes the stem-cell phenotype. Bortezomib is able to block this activation and synergizes with erlotinib to suppress therapy resistance. Clinical assays are now underway in patients to test if this combination is useful in lung cancer patients. Since the cytotoxic effect of bortezomib is independent of cell division, it has a potential advantage for the eradication of low cycling leukemia cells that depend on the NF- κ B pathway to self-renew. Recently, Attar et al. showed that a combination of bortezomib and lenalidomide could elicit a synergic cytotoxic effect in patients with AML and myelodysplastic syndrome [96]. Interestingly, it was found that bortezomib in combination with daunorubicin and cytarabine induced a complete remission in 61 % of the patients with AML [97]. Although not documented, part of the clinical effectiveness of bortezomib could be due to a direct effect on CSCs.

Finally, curcumin, a polyphenol derived from *Curcuma longa*, appears particularly promising [18]. This compound, which is a strong inhibitor of NF- κ B signaling, has been tested in phase I and II trials as adjuvant therapy in several cancer types [98] and as a chemo-preventive in colorectal cancer [99, 100]. Curcumin has also been found to be effective in minimizing the growth and invasiveness of breast CSCs. Curcumin and epigallocatechin-3-gallate can inhibit STAT3 phosphorylation and prevent STAT/NF- κ B (p65) interaction, thereby reducing the BCSC fraction [101]. Targeting NF- κ B signaling by curcumin also reduces cell viability and increases cell death in liver cancer cell lines. Its effects are directly related to the extent of NF- κ B inhibition [70]. In colon cancer, curcumin reduces the relative expression of stem cell markers. However, it promotes the autophagic survival of colon CSCs [70]. Since this compound can selectively kill CSCs as opposed to normal tissue stem cells [102], it represents an example of the potential utility of an NF- κ B inhibitor in the clinic. Nevertheless, low oral bioavailability and unexpected toxicity added to a paucity of randomized, placebo-controlled and double-blind studies has so far precluded its clinical use in cancer patients. Currently, new derivatives and conjugates with enhanced pharmacological properties and reduced toxicity are being developed to make this compound a success in the clinic [103–106].

14 Conclusions and perspectives

Activation of the canonical NF- κ B pathway is a common feature of CSCs from many types of tumors. There are ample indications supporting the participation of this signaling pathway in the self-renewal, proliferation, survival and differentiation of CSCs. The non-canonical NF- κ B pathway is also involved, although there is as yet insufficient information to fully define its role. Even when the relationship between NF- κ B and CSCs is settled, the key molecules involved in

the regulation of CSCs are still unknown. NF- κ B can promote the expression of many genes involved in self-renewal, proliferation, differentiation, survival, inflammation, invasion and metastasis, which could be involved in the regulation of CSCs. Recent evidence suggests that it is possible to eliminate or reduce the CSC population through drugs or other compounds that suppress NF- κ B activation. Such NF- κ B inhibitors provide a therapeutic opportunity to eliminate the CSC fraction, which is responsible for cancer growth and recurrence. In particular, the possibility of using these compounds in chronic schemes to reduce disease progression appears attractive. Studies in animal models aimed at testing the efficacy of NF- κ B inhibitors as chemo-sensitizers and chronic schemes aimed at reducing relapses are needed to close the gap to the clinic. Exceptional low toxicity profiles are required to be able to use combined regimens and to avoid resistance. New compounds, such as curcumin derivatives or conjugates, hold promise in this respect.

Acknowledgments The work at Jorge Melendez-Zajgla laboratory was funded by CONACyT grant 132931.

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interest.

References

1. T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke, I.L. Weissman, Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–111 (2001)
2. J. Di, T. Duiveman-de Boer, P.L. Zusterzeel, C.G. Figdor, L.F. Massuger, R. Torensma, The stem cell markers Oct4A, Nanog and c-Myc are expressed in ascites cells and tumor tissue of ovarian cancer patients. *Cell. Oncol.* **36**, 363–374 (2013)
3. A. Koren, H. Motaln, T. Cufer, Lung cancer stem cells: a biological and clinical perspective. *Cell. Oncol.* **36**, 265–275 (2013)
4. N.A. Lobo, Y. Shimono, D. Qian, M.F. Clarke, The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 675–699 (2007)
5. R. Bjerkvig, B.B. Tysnes, K.S. Aboody, J. Najbauer, A.J. Terzis, Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 899–904 (2005)
6. M.S. Hayden, S. Ghosh, Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**, 2195–2224 (2004)
7. M.S. Hayden, S. Ghosh, Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008)
8. V.F. Shih, R. Tsui, A. Caldwell, A. Hoffmann, A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* **21**, 86–102 (2011)
9. L. Ling, Z. Cao, D.V. Goeddel, NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3792–3797 (1998)
10. G. Qing, Z. Qu, G. Xiao, Stabilization of basally translated NF-kB-inducing kinase (NIK) protein functions as a molecular switch of processing of NF-kB2 p100. *J. Biol. Chem.* **280**, 40578–40582 (2005)
11. W.E. Naugler, M. Karin, NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 19–26 (2008)
12. D.K. Biswas, Q. Shi, S. Baily, I. Strickland, S. Ghosh, A.B. Pardee, J.D. Iglehart, NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10137–10142 (2004)
13. J. Bollrath, F.R. Greten, IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep.* **10**, 1314–1319 (2009)
14. F.R. Greten, L. Eckmann, T.F. Greten, J.M. Park, Z.W. Li, L.J. Egan, M.F. Kagnoff, M. Karin, IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**, 285–296 (2004)
15. H.L. Pahl, Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853–6866 (1999)
16. M. Karin, Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431–436 (2006)
17. E. Bandala, M. Espinosa, V. Maldonado, J. Melendez-Zajgla, Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 13–19 (2001)
18. K. Mohankumar, S. Pajaniradje, S. Sridharan, V.K. Singh, L. Ronsard, A.C. Banerjee, B.C. Selvanesan, M.S. Coumar, L. Periyasamy, R. Rajagopalan, Apoptosis induction by an analog of curcumin (BDMC-A) in human laryngeal carcinoma cells through intrinsic and extrinsic pathways. *Cell. Oncol.* **37**, 439–454 (2014)
19. V. Papanikolaou, N. Stefanou, S. Dubos, I. Papathanasiou, M. Palianopoulou, V. Valiakou, A. Tsezou, Synergy of leptin/STAT3 with HER2 receptor induces tamoxifen resistance in breast cancer cells through regulation of apoptosis-related genes. *Cell. Oncol.* **38**, 155–164 (2015)
20. X. Dolcet, D. Llobet, J. Pallares, X. Matias-Guiu, NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv : Int. J. Pathol.* **446**, 475–482 (2005)
21. M.A. Huber, N. Azoitei, B. Baumann, S. Grunert, A. Sommer, H. Pehamberger, N. Kraut, H. Beug, T. Wirth, NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* **114**, 569–581 (2004)
22. C.W. Li, W. Xia, L. Huo, S.O. Lim, Y. Wu, J.L. Hsu, C.H. Chao, H. Yamaguchi, N.K. Yang, Q. Ding, Y. Wang, Y.J. Lai, A.M. LaBaff, T.J. Wu, B.R. Lin, M.H. Yang, G.N. Hortobagyi, M.C. Hung, Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.* **72**, 1290–1300 (2012)
23. H. Korkaya, S. Liu, M.S. Wicha, Regulation of cancer stem cells by cytokine networks: attacking cancer's inflammatory roots. *Clin. Cancer Res.: Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 6125–6129 (2011)
24. M. Karin, NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol. Carcinog.* **45**, 355–361 (2006)
25. M.L. Guzman, S.J. Neering, D. Upchurch, B. Grimes, D.S. Howard, D.A. Rizzieri, S.M. Luger, C.T. Jordan, Nuclear factor-kappa B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **98**, 2301–2307 (2001)
26. V.K. Rajasekhar, L. Studer, W. Gerald, N.D. Succi, H.I. Scher, Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF-kappaB signalling. *Nat. Commun.* **2**, 162 (2011)
27. R. Birnie, S.D. Bryce, C. Roome, V. Dussupt, A. Droop, S.H. Lang, P.A. Berry, C.F. Hyde, J.L. Lewis, M.J. Stower, N.J. Maitland, A.T. Collins, Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome Biol.* **9**, R83 (2008)
28. A.B. Alvero, R. Chen, H.H. Fu, M. Montagna, P.E. Schwartz, T. Rutherford, D.A. Silasi, K.D. Steffensen, M. Waldstrom, I. Visintin, G. Mor, Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle* **8**, 158–166 (2009)

29. M. Murohashi, K. Hinohara, M. Kuroda, T. Isagawa, S. Tsuji, S. Kobayashi, K. Umezawa, A. Tojo, H. Aburatani, N. Gotoh, Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br. J. Cancer* **102**, 206–212 (2010)
30. R. Liu, X. Wang, G.Y. Chen, P. Dalerba, A. Gurney, T. Hoey, G. Sherlock, J. Lewicki, K. Shedden, M.F. Clarke, The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N. Engl. J. Med.* **356**, 217–226 (2007)
31. J.M. Garner, M. Fan, C.H. Yang, Z. Du, M. Sims, A.M. Davidoff, L.M. Pfeffer, Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and nuclear factor kappaB signaling in glioblastoma cancer stem cells regulates the Notch pathway. *J. Biol. Chem.* **288**, 26167–26176 (2013)
32. Y. Kagoya, A. Yoshimi, K. Kataoka, M. Nakagawa, K. Kumano, S. Arai, H. Kobayashi, T. Saito, Y. Iwakura, M. Kurokawa, Positive feedback between NF-kappaB and TNF-alpha promotes leukemia-initiating cell capacity. *J. Clin. Invest.* **124**, 528–542 (2014)
33. M.L. Guzman, C.F. Swiderski, D.S. Howard, B.A. Grimes, R.M. Rossi, S.J. Szilvassy, C.T. Jordan, Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16220–16225 (2002)
34. M.L. Guzman, R.M. Rossi, L. Karnischky, X. Li, D.R. Peterson, D.S. Howard, C.T. Jordan, The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood* **105**, 4163–4169 (2005)
35. M.L. Guzman, R.M. Rossi, S. Neelakantan, X. Li, C.A. Corbett, D.C. Hassane, M.W. Becker, J.M. Bennett, E. Sullivan, J.L. Lachowicz, A. Vaughan, C.J. Sweeney, W. Matthews, M. Carroll, J.L. Liesveld, P.A. Crooks, C.T. Jordan, An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood* **110**, 4427–4435 (2007)
36. H.L. Ang, V. Tergaonkar, Notch and NFkappaB signaling pathways: do they collaborate in normal vertebrate brain development and function? *BioEssays: News Rev. Mol. Cell Dev. Biol.* **29**, 1039–1047 (2007)
37. M. Patane, P. Poratti, E. Bottega, S. Morosini, G. Cantini, V. Girgenti, A. Rizzo, M. Eoli, B. Pollo, F.L. Sciacca, S. Pellegatta, G. Finocchiaro, Frequency of NFKBIA deletions is low in glioblastomas and skewed in glioblastoma neurospheres. *Mol. Cancer* **12**, 160 (2013)
38. M. Tafani, M. Di Vito, A. Frati, L. Pellegrini, E. De Santis, G. Sette, A. Eramo, P. Sale, E. Mari, A. Santoro, A. Raco, M. Salvati, R. De Maria, M.A. Russo, Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J. Neuroinflammation* **8**, 32 (2011)
39. A.B. Hjelmeland, Q. Wu, S. Wickman, C. Eyler, J. Heddleston, Q. Shi, J.D. Lathia, J. Macsworlds, J. Lee, R.E. McLendon, J.N. Rich, Targeting A20 decreases glioma stem cell survival and tumor growth. *PLoS Biol.* **8**, e1000319 (2010)
40. L. Nogueira, P. Ruiz-Ontanon, A. Vazquez-Barquero, M. Lafarga, M.T. Berciano, B. Aldaz, L. Grande, I. Casafont, V. Segura, E.F. Robles, D. Suarez, L.F. Garcia, J.A. Martinez-Climent, J.L. Fernandez-Luna, Blockade of the NFkappaB pathway drives differentiating glioblastoma-initiating cells into senescence both in vitro and in vivo. *Oncogene* **30**, 3537–3548 (2011)
41. D.W. Lee, D. Ramakrishnan, J. Valenta, I.F. Parney, K.J. Bayless, R. Sitcheran, The NF-kappaB RelB protein is an oncogenic driver of mesenchymal glioma. *PLoS One* **8**, e57489 (2013)
42. D. Iliopoulos, H.A. Hirsch, G. Wang, K. Struhl, Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1397–1402 (2011)
43. I. Chefetz, A.B. Alvero, J.C. Holmberg, N. Lebowitz, V. Craveiro, Y. Yang-Hartwich, G. Yin, L. Squillace, M. Gurra Soteras, P. Aldo, G. Mor, TLR2 enhances ovarian cancer stem cell self-renewal and promotes tumor repair and recurrence. *Cell Cycle* **12**, 511–521 (2013)
44. H. Long, R. Xie, T. Xiang, Z. Zhao, S. Lin, Z. Liang, Z. Chen, B. Zhu, Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133+ ovarian cancer stem-like cells via NF-kappaB-mediated MMP-9 upregulation. *Stem Cells* **30**, 2309–2319 (2012)
45. R. Chen, A.B. Alvero, D.A. Silasi, M.G. Kelly, S. Fest, I. Visintin, A. Leiser, P.E. Schwartz, T. Rutherford, G. Mor, Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene* **27**, 4712–4723 (2008)
46. A.B. Alvero, H.H. Fu, J. Holmberg, I. Visintin, L. Mor, C.C. Marquina, J. Oidman, D.A. Silasi, G. Mor, Stem-like ovarian cancer cells can serve as tumor vascular progenitors. *Stem Cells* **27**, 2405–2413 (2009)
47. M. Shipitsin, L.L. Campbell, P. Argani, S. Weremowicz, N. Bloushtain-Qimron, J. Yao, T. Nikolskaya, T. Serebryskaya, R. Beroukhi, M. Hu, M.K. Halushka, S. Sukumar, L.M. Parker, K.S. Anderson, L.N. Harris, J.E. Garber, A.L. Richardson, S.J. Schnitt, Y. Nikolsky, R.S. Gelman, K. Polyak, Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* **11**, 259–273 (2007)
48. J.H. Ju, K. Jang, K.M. Lee, M. Kim, J. Kim, J.Y. Yi, D.Y. Noh, I. Shin, CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF-kappaB signaling in CD44-expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis* **32**, 1474–1483 (2011)
49. M. Liu, T. Sakamaki, M.C. Casimiro, N.E. Willmarth, A.A. Quong, X. Ju, J. Ojeifo, X. Jiao, W.S. Yeow, S. Katiyar, L.A. Shirley, D. Joyce, M.P. Lisanti, C. Albanese, R.G. Pestell, The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res.* **70**, 10464–10473 (2010)
50. Y. Cao, J.L. Luo, M. Karin, IkappaB kinase alpha kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15852–15857 (2007)
51. W. Zhang, W. Tan, X. Wu, M. Poustovoitov, A. Strasner, W. Li, N. Borcherdig, M. Ghassemian, M. Karin, A NIK-IKKalpha module expands ErbB2-induced tumor-initiating cells by stimulating nuclear export of p27/Kip1. *Cancer Cell* **23**, 647–659 (2013)
52. D. Schramek, A. Leibbrandt, V. Sigl, L. Kenner, J.A. Pospisilik, H.J. Lee, R. Hanada, P.A. Joshi, A. Aliprantis, L. Glimcher, M. Pasparakis, R. Khokha, C.J. Ormandy, M. Widschwendter, G. Schett, J.M. Penninger, Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature* **468**, 98–102 (2010)
53. M. Palafox, I. Ferrer, P. Pellegrini, S. Vila, S. Hernandez-Ortega, A. Urruticoechea, F. Climent, M.T. Soler, P. Munoz, F. Vinals, M. Tometsko, D. Branstetter, W.C. Dougall, E. Gonzalez-Suarez, RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res.* **72**, 2879–2888 (2012)
54. D. Iliopoulos, H.A. Hirsch, K. Struhl, An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* **139**, 693–706 (2009)
55. H. Korkaya, G.I. Kim, A. Davis, F. Malik, N.L. Henry, S. Ithimakin, A.A. Quraishi, N. Tawakkol, R. D'Angelo, A.K. Paulson, S. Chung, T. Luther, H.J. Pahalok, S. Liu, K.A. Hassan, Q. Zen, S.G. Clouthier, M.S. Wicha, Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol. Cell* **47**, 570–584 (2012)
56. M.D. Hale, J.D. Hayden, H.I. Grabsch, Tumour-microenvironment interactions: role of tumour stroma and

- proteins produced by cancer-associated fibroblasts in chemotherapy response. *Cell. Oncol.* **36**, 95–112 (2013)
57. M. Yamamoto, Y. Taguchi, T. Ito-Kureha, K. Semba, N. Yamaguchi, J. Inoue, NF-kappaB non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. *Nat. Commun.* **4**, 2299 (2013)
 58. G. Storci, P. Sansone, S. Mari, G. D'Uva, S. Tavolari, T. Guamieri, M. Taffurelli, C. Ceccarelli, D. Santini, P. Chieco, K.B. Marcu, M. Bonafe, TNFalpha up-regulates SLUG via the NF-kappaB/HIF1alpha axis, which imparts breast cancer cells with a stem cell-like phenotype. *J. Cell. Physiol.* **225**, 682–691 (2010)
 59. S.A. Mani, W. Guo, M.J. Liao, E.N. Eaton, A. Ayyanan, A.Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C.C. Zhang, M. Shipitsin, L.L. Campbell, K. Polyak, C. Briskin, J. Yang, R.A. Weinberg, The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008)
 60. A. Van den Broeck, H. Vankelecom, W. Van Delm, L. Gremeaux, J. Wouters, J. Allemeersch, O. Govaere, T. Roskams, B. Topal, Human pancreatic cancer contains a side population expressing cancer stem cell-associated and prognostic genes. *PLoS One* **8**, e73968 (2013)
 61. G. Kallifatidis, V. Rausch, B. Baumann, A. Apel, B.M. Beckermann, A. Groth, J. Mattern, Z. Li, A. Kolb, G. Moldenhauer, P. Altevogt, T. Wirth, J. Werner, P. Schemmer, M.W. Buchler, A.V. Salnikov, I. Herr, Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signalling. *Gut* **58**, 949–963 (2009)
 62. L. Sun, L.A. Mathews, S.M. Cabarcas, X. Zhang, A. Yang, Y. Zhang, M.R. Young, K.D. Klarman, J.R. Keller, W.L. Farrar, Epigenetic regulation of SOX9 by the NF-kappaB signaling pathway in pancreatic cancer stem cells. *Stem Cells* **31**, 1454–1466 (2013)
 63. K. Vlantis, A. Wullaert, Y. Sasaki, M. Schmidt-Supprian, K. Rajewsky, T. Roskams, M. Pasparakis, Constitutive IKK2 activation in intestinal epithelial cells induces intestinal tumors in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2781–2793 (2011)
 64. S. Schwitalla, A.A. Fingerle, P. Cammareri, T. Nebelsiek, S.I. Goktuna, P.K. Ziegler, O. Canli, J. Heijmans, D.J. Huels, G. Moreaux, R.A. Rupec, M. Gerhard, R. Schmid, N. Barker, H. Clevers, R. Lang, J. Neumann, T. Kirchner, M.M. Taketo, G.R. van den Brink, O.J. Sansom, M.C. Arkan, F.R. Greten, Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* **152**, 25–38 (2013)
 65. K.B. Myant, P. Cammareri, E.J. McGhee, R.A. Ridgway, D.J. Huels, J.B. Cordero, S. Schwitalla, G. Kalna, E.L. Ogg, D. Athineos, P. Timpon, M. Vidal, G.I. Murray, F.R. Greten, K.I. Anderson, O.J. Sansom, ROS production and NF-kappaB activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell Stem Cell* **12**, 761–773 (2013)
 66. Y. Ben-Neriah, M. Karin, Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat. Immunol.* **12**, 715–723 (2011)
 67. V. Maldonado, J. Melendez-Zajgla, A. Ortega, Modulation of NF-kappa B, and Bcl-2 in apoptosis induced by cisplatin in HeLa cells. *Mutat. Res.* **381**, 67–75 (1997)
 68. C. Nakanishi, M. Toi, Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 297–309 (2005)
 69. L. Zhang, X. Ren, Y. Cheng, X. Liu, J.E. Allen, Y. Zhang, Y. Yuan, S.Y. Huang, W. Yang, A. Berg, B.S. Webb, J. Connor, C.G. Liu, Z. Lu, W.S. El-Deiry, J.M. Yang, The NFkappaB inhibitor, SN50, induces differentiation of glioma stem cells and suppresses their oncogenic phenotype. *Cancer Biol. Ther.* **15**, 602–611 (2014)
 70. J.U. Marquardt, L. Gomez-Quiroz, L.O. Arreguin Camacho, F. Pinna, Y.H. Lee, M. Kitade, M.P. Dominguez, D. Castven, K. Breuhahn, E.A. Conner, P.R. Galle, J.B. Andersen, V.M. Factor and S.S. Thorgeirsson, Curcumin effectively inhibits oncogenic NF-kB signaling and restrains stemness features in liver cancer. *J. Hepatol.* (2015)
 71. B.H. Kwok, B. Koh, M.I. Ndubuisi, M. Elofsson, C.M. Crews, The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkappaB kinase. *Chem. Biol.* **8**, 759–766 (2001)
 72. K. Liao, B. Xia, Q.Y. Zhuang, M.J. Hou, Y.J. Zhang, B. Luo, Y. Qiu, Y.F. Gao, X.J. Li, H.F. Chen, W.H. Ling, C.Y. He, Y.J. Huang, Y.C. Lin, Z.N. Lin, Parthenolide inhibits cancer stem-like side population of nasopharyngeal carcinoma cells via suppression of the NF-kappaB/COX-2 pathway. *Theranostics* **5**, 302–321 (2015)
 73. J. Zhou, H. Zhang, P. Gu, J. Bai, J.B. Margolick, Y. Zhang, NF-kappaB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **111**, 419–427 (2008)
 74. J.H. Lee, T.H. Koo, H. Yoon, H.S. Jung, H.Z. Jin, K. Lee, Y.S. Hong, J.J. Lee, Inhibition of NF-kappa B activation through targeting I kappa B kinase by celastrol, a quinone methide triterpenoid. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1311–1321 (2006)
 75. D.C. Hassane, M.L. Guzman, C. Corbett, X. Li, R. Abboud, F. Young, J.L. Liesveld, M. Carroll, C.T. Jordan, Discovery of agents that eradicate leukemia stem cells using an in silico screen of public gene expression data. *Blood* **111**, 5654–5662 (2008)
 76. C. Lin, L. Wang, H. Wang, L. Yang, H. Guo, X. Wang, Tanshinone IIA inhibits breast cancer stem cells growth in vitro and in vivo through attenuation of IL-6/STAT3/NF-kB signaling pathways. *J. Cell. Biochem.* **114**, 2061–2070 (2013)
 77. C.H. Leung, S.P. Grill, W. Lam, W. Gao, H.D. Sun, Y.C. Cheng, Eriocalyxin B inhibits nuclear factor-kappaB activation by interfering with the binding of both p65 and p50 to the response element in a noncompetitive manner. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1946–1955 (2006)
 78. L. Wang, W.L. Zhao, J.S. Yan, P. Liu, H.P. Sun, G.B. Zhou, Z.Y. Weng, W.L. Wu, X.Q. Weng, X.J. Sun, Z. Chen, H.D. Sun, S.J. Chen, Eriocalyxin B induces apoptosis of t(8;21) leukemia cells through NF-kappaB and MAPK signaling pathways and triggers degradation of AML1-ETO oncoprotein in a caspase-3-dependent manner. *Cell Death Differ.* **14**, 306–317 (2007)
 79. A.L. Leizer, A.B. Alvero, H.H. Fu, J.C. Holmberg, Y.C. Cheng, D.A. Silasi, T. Rutherford, G. Mor, Regulation of inflammation by the NF-kappaB pathway in ovarian cancer stem cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **65**, 438–447 (2011)
 80. Y. Li, T. Zhang, Targeting cancer stem cells with sulforaphane, a dietary component from broccoli and broccoli sprouts. *Future Oncol.* **9**, 1097–1103 (2013)
 81. V. Rausch, L. Liu, G. Kallifatidis, B. Baumann, J. Mattern, J. Gladkikh, T. Wirth, P. Schemmer, M.W. Buchler, M. Zoller, A.V. Salnikov, I. Herr, Synergistic activity of sorafenib and sulforaphane abolishes pancreatic cancer stem cell characteristics. *Cancer Res.* **70**, 5004–5013 (2010)
 82. G. Kallifatidis, S. Labsch, V. Rausch, J. Mattern, J. Gladkikh, G. Moldenhauer, M.W. Buchler, A.V. Salnikov, I. Herr, Sulforaphane increases drug-mediated cytotoxicity toward cancer stem-like cells of pancreas and prostate. *Mol. Ther.* **19**, 188–195 (2011)
 83. A. Gomez-Cabrero, W. Wrasidlo, R.A. Reisfeld, IMD-0354 targets breast cancer stem cells: a novel approach for an adjuvant to chemotherapy to prevent multidrug resistance in a murine model. *PLoS One* **8**, e73607 (2013)
 84. J.W. Pierce, R. Schoenleber, G. Jesmok, J. Best, S.A. Moore, T. Collins, M.E. Gerritsen, Novel inhibitors of cytokine-induced I kappa B alpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 21096–21103 (1997)
 85. A. Ariga, J. Namekawa, N. Matsumoto, J. Inoue, K. Umezawa, Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear translocation and activation of NF-kappa B by

- dehydroxymethylepoxyquinomicin. *J. Biol. Chem.* **277**, 24625–24630 (2002)
86. K. Hinohara, S. Kobayashi, H. Kanauchi, S. Shimizu, K. Nishioka, E. Tsuji, K. Tada, K. Umezawa, M. Mori, T. Ogawa, J. Inoue, A. Tojo, N. Gotoh, ErbB receptor tyrosine kinase/NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6584–6589 (2012)
 87. J. Adams, The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 349–360 (2004)
 88. Y. Jin, Z. Lu, K. Ding, J. Li, X. Du, C. Chen, X. Sun, Y. Wu, J. Zhou, J. Pan, Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF- κ B pathway and generation of reactive oxygen species. *Cancer Res.* **70**, 2516–2527 (2010)
 89. M.J. Thun, S.J. Henley, C. Patrono, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 252–266 (2002)
 90. W. Qiu, X. Wang, B. Leibowitz, H. Liu, N. Barker, H. Okada, N. Oue, W. Yasui, H. Clevers, R.E. Schoen, J. Yu, L. Zhang, Chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs eliminates oncogenic intestinal stem cells via SMAC-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 20027–20032 (2010)
 91. A.M. Seo, S.W. Hong, J.S. Shin, I.C. Park, N.J. Hong, D.J. Kim, W.K. Lee, W.J. Lee, D.H. Jin, M.S. Lee, Sulindac induces apoptotic cell death in susceptible human breast cancer cells through, at least in part, inhibition of IKK β . *Apoptosis: Int. J. Programmed Cell Death* **14**, 913–922 (2009)
 92. S.J. Shiff, B. Rigas, The role of cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs). *J. Exp. Med.* **190**, 445–450 (1999)
 93. C.V. Rao, B.S. Reddy, NSAIDs and chemoprevention. *Curr. Cancer Drug Targets* **4**, 29–42 (2004)
 94. C. Zhu, K.W. Cheng, N. Ouyang, L. Huang, Y. Sun, P. Constantinides, B. Rigas, Phosphosulindac (OXT-328) selectively targets breast cancer stem cells in vitro and in human breast cancer xenografts. *Stem Cells* **30**, 2065–2075 (2012)
 95. L. Seguin, S. Kato, A. Franovic, M.F. Camargo, J. Lesperance, K.C. Elliott, M. Yebra, A. Mielgo, A.M. Lowy, H. Husain, T. Cascone, L. Diao, J. Wang, I.I. Wistuba, J.V. Heymach, S.M. Lippman, J.S. Desgrosellier, S. Anand, S.M. Weis, D.A. Cheresh, An integrin β (3)-KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nat. Cell Biol.* **16**, 457–468 (2014)
 96. E.C. Attar, P.C. Amrein, J.W. Fraser, A.T. Fathi, S. McAfee, M. Wadleigh, D.J. Deangelo, D.P. Steensma, R.M. Stone, J. Foster, D. Neuberg, K.K. Ballen, Phase I dose escalation study of bortezomib in combination with lenalidomide in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). *Leuk. Res.* **37**, 1016–1020 (2013)
 97. E.C. Attar, D.J. De Angelo, J.G. Supko, F. D'Amato, D. Zahrieh, A. Sirulnik, M. Wadleigh, K.K. Ballen, S. McAfee, K.B. Miller, J. Levine, I. Galinsky, E.G. Trehu, D. Schenkein, D. Neuberg, R.M. Stone, P.C. Amrein, Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1446–1454 (2008)
 98. K.G. Troselj, R.N. Kujundzic, Curcumin in combined cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 6682–6696 (2014)
 99. R.E. Carroll, R.V. Benya, D.K. Turgeon, S. Vareed, M. Neuman, L. Rodriguez, M. Kakarala, P.M. Carpenter, C. McLaren, F.L. Meyskens Jr., D.E. Brenner, Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev. Res.* **4**, 354–364 (2011)
 100. L.M. Howells, J. Mahale, S. Sale, L. McVeigh, W.P. Steward, A. Thomas, K. Brown, Translating curcumin to the clinic for lung cancer prevention: evaluation of the preclinical evidence for its utility in primary, secondary, and tertiary prevention strategies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **350**, 483–494 (2014)
 101. S.S. Chung, J.V. Vadgama, Curcumin and epigallocatechin gallate inhibit the cancer stem cell phenotype via down-regulation of STAT3-NF κ B signaling. *Anticancer Res.* **35**, 39–46 (2015)
 102. P.P. Sordillo, L. Helson, Curcumin and cancer stem cells: curcumin has asymmetrical effects on cancer and normal stem cells. *Anticancer Res.* **35**, 599–614 (2015)
 103. A.M. Alizadeh, M. Sadeghizadeh, F. Najafi, S.K. Ardestani, V. Erfani-Moghadam, M. Khaniki, A. Rezaei, M. Zamani, S. Khodayari, H. Khodayari, M.A. Mohagheghi, Encapsulation of curcumin in diblock copolymer micelles for cancer therapy. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 824746 (2015)
 104. M.J. Dehghan Esmatabadi, B. Farhangi, Z. Safari, H. Kazerooni, H. Shirzad, F. Zolghadr, M. Sadeghizadeh, Dendrosomal curcumin inhibits metastatic potential of human SW480 colon cancer cells through down-regulation of claudin1, zeb1 and hefl-1 gene expression. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 2473–2481 (2015)
 105. J.C. Lien, C.M. Hung, Y.J. Lin, H.C. Lin, T.C. Ko, L.C. Tseng, S.C. Kuo, C.T. Ho, J.C. Lee and T. Way, Pculin02H, a curcumin derivative, inhibits proliferation and clinical drug resistance of HER2-overexpressing cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **235**, 17–26 (2015)
 106. V. Zeighamian, M. Darabi, A. Akbarzadeh, M. Rahmati-Yamchi, N. Zarghami, F. Badrzadeh, R. Salehi, F.S. Tabatabaei Mirakabad, M. Taheri-Anganeh, PNIPAAm-MAA nanoparticles as delivery vehicles for curcumin against MCF-7 breast cancer cells. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 1–8 (2015)