



Universitat de Barcelona  
Facultat de Farmàcia  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

# **Estudi de les funcions nuclears d'IKK $\alpha$ en el càncer colorectal**

Vanessa Fernández Majada

2009



Universitat de Barcelona  
Facultat de Farmàcia  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Doctorat en Biomedicina  
(2004-2006)

# **Estudi de les funcions nuclears d'IKK $\alpha$ en el càncer colorectal**

Memòria presentada per Vanessa Fernández Majada per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat codirigida pels doctors:

Anna Bigas Salvans, PhD

Lluís Espinosa Blay, PhD

Doctoranda Vanessa Fernández Majada

Tutora: Carme Caelles Franch, PhD

Vanessa Fernández Majada

2009

# Índex

Presentació.....	4
Agraïments.....	5
Abreviatures.....	6

## Capítol 1. Introducció general

---

### 1. NF $\kappa$ B

1.1 Membres de la família NF $\kappa$ B.....	10
1.1.1 Les proteïnes Rel.....	10
1.1.2 Les proteïnes inhibidores I $\kappa$ B.....	11
1.2 Mecanismes d'activació d'NF $\kappa$ B.....	14
1.2.1 Mecanismes d'activació d'NF $\kappa$ B que depenen de la fosforilació i degradació d'I $\kappa$ B.....	14
1.2.1.1 La via d'activació clàssica d'NF $\kappa$ B.....	15
1.2.1.2 La via d'activació alternativa d'NF $\kappa$ B.....	16
1.2.2 Altres mecanismes d'activació d'NF $\kappa$ B.....	17
1.2.3 Modificacions post-traduccional que afecten a l'activitat d'NF $\kappa$ B.....	17
1.3 Mecanismes d'inactivació de la via d'NF $\kappa$ B.....	19
1.4 Funcions biològiques de les proteïnes NF $\kappa$ B i I $\kappa$ B.....	21
1.5 El complex IKK.....	23
1.5.1 Descripció i components.....	23
1.5.2 Estequiometria del complex.....	24
1.5.3 Mecanismes d'activació del complex IKK.....	25
1.5.3.1 Activació del complex IKK a través de la família de receptors del TNF $\alpha$ (TNFR).....	26
1.5.3.1.1 La via clàssica d'NF $\kappa$ B: Activació del complex IKK per TNFR1.....	26
1.5.3.1.1.1 NF $\kappa$ B protegeix de la mort cel·lular induïda per TNF $\alpha$ .....	28
1.5.3.1.2 La via alternativa d'NF $\kappa$ B: Activació del complex IKK per BAFF-R i CD40.....	29
1.5.3.2 Activació del complex IKK a través de la família dels TLR i IL-1R.....	30
1.5.3.3 Activació del complex IKK per receptors d'antigen.....	31
1.5.3.4 Activació del complex IKK per transautofosforilació.....	32
1.5.4 Mecanismes d'inactivació del complex IKK.....	32
1.5.4.1 Inactivació del complex IKK per mecanismes d'autofosforilació a C-terminal.....	32
1.5.4.2 Inactivació del complex IKK per mecanismes de ubiquïtinació (K48) i deubiquïtinació (K63).....	34
1.5.5 Funcions biològiques de les proteïnes IKK.....	36

1.5.6	Altres proteïnes IKK .....	38
1.6	Funcions nuclears de les subunitats del complex IKK.....	39
1.6.1	Funcions Nuclears d'IKK $\alpha$ .....	39
1.6.1.1	Funcions Nuclears d'IKK $\alpha$ sobre l'expressió de gens dependents d'NF $\kappa$ B.....	39
1.6.1.2	Funcions Nuclears d'IKK $\alpha$ sobre l'expressió de gens independents d'NF $\kappa$ B....	42
1.6.2	Funcions Nuclears de NEMO/ IKK $\gamma$ .....	44
1.6.3	Funcions Nuclears d'IKK $\beta$ .....	45
1.7.	NF $\kappa$ B i càncer .....	46
1.7.1	NF $\kappa$ B i transformació cel·lular .....	46
1.7.2	NF $\kappa$ B i proliferació cel·lular .....	47
1.7.3	NF $\kappa$ B i apoptosi .....	47
1.7.4	NF $\kappa$ B i angiogènesi .....	48
1.7.5	NF $\kappa$ B i metàstasi .....	49
1.8	Inflamació i càncer .....	50
1.8.1	NF $\kappa$ B, el nexa d'unió .....	50
1.8.1.1	NF $\kappa$ B i inflamació en el càncer colorectal .....	52
1.8.1.2	NF $\kappa$ B i inflamació en el càncer hepàtic .....	53
1.8.1.3	NF $\kappa$ B i inflamació en limfomes .....	54
1.8.1.4	NF $\kappa$ B com agent anti-tumoral.....	54
<b>2. Notch</b>		
2.1	Membres de la via de senyalització de Notch .....	55
2.1.1	El receptors Notch .....	55
2.1.2	Els lligands Delta i Jagged .....	56
2.2	Activació de la via de Notch .....	57
2.3	Els gens diana de Notch .....	58
2.4	Notch regula la diferenciació cel·lular i el desenvolupament de teixits .....	59
2.5	Notch i càncer .....	60
2.5.1	Paper oncogènic de Notch en leucèmies .....	60
2.5.2	Paper oncogènic de Notch en tumors sòlids.....	61
<b>3. Interrelació entre les vies de senyalització de Notch i NF<math>\kappa</math>B.....</b>		<b>62</b>

## 4. El càncer de còlon

4.1 El tracte gastrointestinal.....	63
4.2 Anatomia i histologia del còlon.....	63
4.3 L'epiteli colònic .....	63
4.4 Bases moleculars del càncer colorectal .....	65
4.5 Paper de Notch/hes1 en el càncer colorectal .....	67

## Capítol 2. Objectius

---

Objectius.....	69
----------------	----

## Capítol 3. Resultats

---

3.1 L'activitat nuclear d'IKK $\alpha$ indueix la desregulació transcripcional de gens diana de Notch en el càncer colorectal.....	71
3.2 Localització anòmala de N-CoR al citoplasma cel·lular en el càncer colorectal.....	73
3.3 Les cèl·lules de càncer colorectal expressen una isoforma tumorigènica d'IKK $\alpha$ nuclear que fosforila específicament repressors nuclears.....	74

## Capítol 4. Conclusions

---

Conclusions.....	104
------------------	-----

## Capítol 5. Discussió General

---

Discussió General.....	106
------------------------	-----

## Referències

---

Referències.....	113
------------------	-----

## Presentació

El treball que es presenta en aquesta tesi es va iniciar l'any 2005, sota la co-direcció de la Dra. Anna Bigas i el Dr. Lluís Espinosa, al Departament d'Oncologia Molecular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL). Al gener del 2009 el nostre grup de recerca es va traslladar a l'Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM), per fundar el Grup de Recerca de Cèl·lules Mare i Càncer, on s'ha finalitzat el treball. La fundació IMIM ha contribuït a la finalització de la meua tesi doctoral a través de la concessió d'un ajut econòmic destinat a cobrir les despeses finals de reprografia i enquadernació.

Aquest estudi és la continuació de treballs previs del laboratori sobre la implicació de la via d'NF $\kappa$ B en el càncer colorectal. Específicament aquest projecte s'ha basat en l'estudi de les funcions nuclears de les proteïnes IKK en aquest tipus de càncer. Els nostres resultats han donat lloc a dues publicacions, que es presenten en el capítol de resultats, i en les que es demostra que en cèl·lules de càncer de còlon i tumors de còlon humans esporàdics, l'activitat aberrant de la quinasa d'NF $\kappa$ B, IKK $\alpha$ , participa en la tumorigènesi a través de l'activació transcripcional de gens diana de Notch com *hes1*, *hes5* i *herp2*, mitjançant un mecanisme que implica l'export al citoplasma de corepressors nuclears. En la última part d'aquesta tesi, ens hem centrat en investigar els mecanismes moleculars que indueixen l'activació de les funcions pro-tumorigèniques de la IKK $\alpha$  en aquest tipus de tumor.

La memòria d'aquest treball s'ha escrit segons el format de compilació d'articles i consta de les següents parts: una Introducció que és una revisió general de les vies de senyalització d'NF $\kappa$ B i Notch, així com de la seva implicació en el càncer; un apartat de Resultats que conté els dos articles publicats, més un article que recull els resultats obtinguts en aquest últim any, encara no publicats (cada article conté un apartat de Material i Mètodes propi); i una Discussió General sobre tots els resultats obtinguts.

## Agraïments

Gairebé sense adonar-te'n arribes al final, i penses en totes les persones que t'han ajudat durant tot aquest temps, i que han fet possible que ara puguis estar escrivint aquestes paraules, i no pots dir res més que **gràcies**.

En primer lloc vull donar les gràcies al Lluís i a l'Anna per haver confiat en mi des del principi i per haver-me donat la oportunitat de fer la tesi al seu *lab*. Gràcies per la vostra disponibilitat i inesgotable dedicació, gràcies per ensenyar-me a viure aquets feina com ho heu fet. I encara que sembli estrany, gràcies també per ser exigents, i per fer-me veure que cada vegada es pot donar una mica més. M'ha agradat molt començar amb vosaltres i m'agradaria poder comptar amb vosaltres en el futur.

Moltíssimes gràcies a tota la gent que ha format part del *lab* durant aquests anys. Gràcies Júlia per ajudar-me sempre que t'ho he demanat, i per la teva gran tasca al *lab*, indubtablement ets una peça clau del trencaclosques. Gràcies a la Cris per ensenyar-me moltes tècniques i a l'Àlex per fer-me de germà gran. Gràcies a la Cris (Queen) i a la Vero, per ser més que companyes de feina, molta sort en la recta final. Gràcies a tu també Mari, quina llàstima que no estiguessis al lab quan vaig arribar, m'ha encantat conèixe't. A totes tres us estimo molt.

Moltes gràcies a les noves adquisicions, a la Titi, al Jordi i al Pol, desitjo que disfruteu la vostra estada al *lab* com ho he fet jo, espero haver-vos estat d'ajuda. Moltes gràcies a la MELS i a la Jessy, les nostres tècnics. No em vull oblidar tampoc del LLuisri, l'Elena, la Teresa i el Tiago. Moltes gràcies Mònica, per tot el que m'has ajudat i no només a nivell professional si no també a nivell personal, vaig tenir molta sort de que abans d'anar al *lab* del BOSS volguessis fer una estada al nostre.

Gràcies a la gent del COM, especialment vull agrair a l'Antònia la seva entrega i la seva capacitat per solucionar tot allò que sembla no tenir remei, gràcies a l'Anna Marazuela per donar-me sempre un somriure, i també a la Olguita, la Mariangi, l'Eder i tots els altres.

També vull donar les gràcies a la gent de l'ICO, al Gabriel Capellà, l'Àlvaro, la Mireia, l'Agnès i molt especialment al Felip Vilardell, el nostre patòleg particular, i a l'Alberto Villanueva per la seva inestimable ajuda i implicació en els experiments amb ratolins.

Gràcies als meus amics més incondicionals, la Laia, la Moni, el Mon i el Ton, per escoltar-me ens els moments dolents i per celebrar amb mi els èxits. Gràcies Laia per viatjar amb mi a Colònia.

Y finalmente quiero dar las gracias a mi familia, sin lugar a duda sin vosotros no hubiera conseguido nada de todo esto. Gracias por confiar en mí, gracias por ofrecerme siempre la oportunidad de hacer lo que me gusta, gracias por aceptar y apoyar mis decisiones, muchas gracias por estar ahí.

## Abreviatures

**$\beta$ -TrCP:**  *$\beta$ -Transducing Repeat-Containing protein*  
**aa:** aminoàcid  
**ACF:** *Aberrant Crypt Focus*  
**ADAM:** *A Disintegrin And Metalloproteinase*  
**AIB1/SRC-3:** *Estrogen Receptor Coactivator*  
**AOM:** *Azoxymethane*  
**AP-1:** *Activator Protein 1*  
**APC:** *Adenomatous Polyposis Coli*  
**APC<sup>min</sup>:** *multiple intestinal neoplasia*  
**Aph-1:** *Anterior pharynx-defective 1*  
**ATM:** *Ataxia-Telangiectasia Mutated*  
**BAFF:** *B Cell Activating Factor*  
**BAFF-R:** *B Cell Activating Factor Receptor*  
**BCL-#:** *B Cell CLL/lymphoma #*  
**B-CLL:** *B Cell Lymphoblastic Leukemia*  
**BCR:** *B Cell Receptor*  
**bHLH:** *basic Helix-loop-Helix*  
**CAC:** *Colitis-Associated Cancer*  
**CARMA1:** *CARD-containing MAGUK protein*  
**CBM:** *CARMA1-BCL10-MALT1*  
**CBP:** *CREB Binding Protein*  
**CC:** *Coiled-Coil*  
**CCR:** *Càncer colorectal*  
**Cdk2:** *Cyclin dependent kinase-2*  
**c-Flip:** *cellular form of FLICE-inhibitory protein*  
**CIA:** *Constitutively and Immediately Accessible*  
**CK2:** *Casein Kinase II*  
**COX-2:** *ciclooxigenasa 2*  
**CRC:** *Colorectal Cancer*  
**CRC:** *Colorectal Cancer*  
**CRM1:** *Chromosome Region Maintenance 1*  
**CU:** *Colitis Ulcerosa*  
**CyLD:** *cyliindromatosis*  
**DCL:** *Delta, Serrate and Lag2*  
**Ddc:** *Deleted in Colorectal Cancer*  
**DEN:** *Diethylnitrosamine*  
**DMBA:** *7,12-Dimethylbenz(a)anthracene*  
**DNA:** *Deoxyribonucleic Acid*  
**Dnmt3a:** *DNA methyltransferase 3a*  
**Dpc4:** *Deleted in pancreatic cancer locus4*  
**dsRNA:** *double strain of RNA*  
**DSS:** *Dextra-Sulphate Sodium salt*  
**DUB:** *Deubiquitinators*  
**EBV:** *Epstein-Barr virus*  
**EDAD-ID:** *Anhidrotic Ectodermal Displasia- Immunodeficiency*  
**EGF:** *Epidermal Growth Factor*  
**EGF-R:** *Epidermal Growth Factor Receptor*  
**EMT:** *Epithelial-Mesenchymal Transition*  
**ER $\alpha$ :** *Estrogen Receptor*  
**FADD:** *Fas-Associated protein with Death Domain*  
**FHC:** *Ferritin Heavy Chain*  
**GADD45 $\beta$ :** *Growth Arrest and DNA Damage 45 $\beta$*   
**G-CSF:** *Granulocyte-Colony Stimulation Factor*  
**GDP:** *Guanadina Difosfat*  
**GM-CSF:** *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulation Factor*  
**GRR:** *Glicine Rich Region*



**GSK3 $\beta$** : *Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$*   
**GTP**: Guanadina Trifosfat  
**h**: hores  
**H3**: *Histone H3*  
**HAT**: *Histone Acetyl Transferase*  
**HBV**: *Hepatitis B virus*  
**HCC**: *HepatoCellular Carcinoma*  
**HCV**: *Hepatitis C virus*  
**HDAC**: *Histone Deacetilase*  
**Herp**: *Hairy related translocation factor*  
**Hes**: *Hairy/enhancer of split*  
**HIF-1 $\alpha$** : *Hypoxia Inducer 1 $\alpha$*   
**HIF-2 $\alpha$** : *Hypoxia Inducer Factor 2 $\alpha$*   
**HLH**: *Helix Loop Helix*  
**HSCs**: *Hematopoietic stem cells*  
**Hsp9**: *Heat shock protein 9*  
**HTLV-1**: *Human T lymphocytic Leukemia Virus*  
**I $\kappa$ B**: *Inhibitor of  $\kappa$ B*  
**I $\kappa$ B-SR**: *I $\kappa$ B- Super Repressor*  
**IAP**: *Inhibitor of Apoptosis*  
**IBD**: *Inflammatory Bowel Disease*  
**ICAM-1**: *Intercellular adhesion molecule 1*  
**IKAP**: *I $\kappa$ B Inducing Protein*  
**IKK**: *I $\kappa$ B Kinase*  
**IKK-K**: *I $\kappa$ B Kinase-Kinase*  
**IL-1**: *Interleukin-1*  
**IL-1**: *Interleuquin-1*  
**IL-1R**: *Interleukin-1 Receptor*  
**IL-6**: *Interleukin-6*  
**IL-8**: *Interleukin 8*  
**iNOS**: *inducible Nitric Oxid Synthase*  
**IP**: *Incontinentia Pigmenti*  
**IRAK**: *IL-1R Associated Kinase*  
**IRF**: *Interferon Regulatory Factor*  
**iRNA**: *interference RNA*  
**JNK**: *Jun N-terminal Kinase*  
**K**: lisina  
**KCs**: *Kupffer Cells*  
**kD**: *Kilo Dalton*  
**KD**: *Kinase Domain*  
**KSHV**: *Kaposi's sarcoma-Associated Herpes Virus*  
**LCK**: *Leukocyte-specific protein tyrosine kinase*  
**LMP-1**: *Latent Membrane Protein*  
**LNR**: *Lin/Notch Repeats*  
**LPS**: *Lipopolysaccharide*  
**LT $\beta$** : *Lymphotoxin beta*  
**LT $\beta$ R**: *Lymphotoxin beta-Receptor*  
**LZ**: *Leuzin Zipper*  
**MALT**: *Mucosal Associated Lymphoid Tissue*  
**MAML**: *Mastermind*  
**MAPK**: *Mitogen-Activated Protein Kinase*  
**MATL1**: *Mucosa Associated lymphoid tissue Lymphoma Translocation gene 1*  
**MCP-1**: *Monocyte chemoattractant protein-1*  
**MEFs**: *Mouse Embryonic Fibroblasts*  
**MMP**: *Metalloprotease*  
**MMR**: *Mismatch Repair*  
**MSK1/2**: *Mitogen and Stress Activated Protein Kinase 1/2*  
**MUC1**: *Mucin 1*  
**MyD88**: *Myeloid Differentation Primary Response 88*  
**NAK**: *NFkappaB-activating kinase*

**NBD:** *NEMO Binding Domain*  
**N-CoR:** *Nuclear Corepressor*  
**NCoRs:** *Nuclear Corepressors*  
**NEMO:** *NF- $\kappa$ B essential Modulator*  
**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear Factor  $\kappa$ B*  
**NIK:** *NF- $\kappa$ B Inducer Kinase*  
**NLS:** *Nuclear Localisation Signal*  
**Notch IC:** *Intracellular Notch*  
**NPC:** *Nasopharyngeal Carcinoma*  
**OTU:** *Ovarian Tumour Type*  
**PAMPs:** *Pathogen-associated molecular patterns*  
**PHDs:** *Prolyl Hidrolases*  
**PI3K:** *Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*  
**PKA:** *Protein Kinase A*  
**PKC $\theta$ :** *Protein Kinase C theta*  
**PKC $\zeta$ :** *Protein Kinase etha*  
**PLC $\gamma$ :** *Protein Kinase C gamma*  
**Pol II:** *RNA Polymerase*  
**PTEN:** *Phosphatase and Tensin homolog*  
**RANK:** *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B*  
**RANKL:** *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand*  
**RBPjk:** *Recombinant Binding Protein J-Kappa*  
**RHD:** *Rel Homology Domain*  
**RIP:** *Receptor Interacting Protein*  
**RLA:** *Related and Late Accessible*  
**RNA:** *Ribonucleic Acid*  
**ROS:** *Reactive oxygen species*  
**SCC:** *Squamous Cell Carcinoma*  
**SMRT:** *Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor)*  
**SOD2:** *SuperOxid Dismitase 2*  
**SRR:** *Serine Rich Region*  
**Su[H]:** *Suppressor of Hairless*  
**Suv39h1:** *Sirtuin 1 (SIRT1) and suppressor of variegation 3–9 homologue 1*  
**T2K:** *TANK binding kinase*  
**TAB:** *TAK 1 binding protein*  
**TACE:** *TNF $\alpha$  Converting Enzyme*  
**TAD:** *Transcription Activation Domain*  
**TAK1:** *MAPKKK: mitogen-activated protein kinase kinase kinase*  
**T-ALL:** *T-lineage acute lymphoblastic leukemia*  
**TBK1:** *TANK-binding kinase 1*  
**TCR:** *T Cell Receptor*  
**TGF $\beta$ :** *Tumor Growth Factor beta*  
**TIR:** *TLR and IL-1R Homology Domain*  
**TLL:** *Toll-Like Ligand*  
**TLR:** *Toll-Like Receptor*  
**TNF $\alpha$ :** *Tumour Necrosis Factor  $\alpha$*   
**TNFR:** *Tumour Necrosis Factor Receptor*  
**tp53:** *Tumour Protein 53*  
**TPA:** *12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*  
**TRADD:** *TNFR Associated Death Domain*  
**TRAF:** *TNFR-associated factor*  
**TRAMP:** *Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate*  
**UCH:** *Ubiquitin-Carboxy terminal-Hydrolase*  
**UV:** *Ultraviolet light*  
**VCAM-1:** *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*  
**VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*  
**XIAP:** *X-Chromosome-Linker Inhibitor of Apoptosis*

## ***Capítol 1:***

### ***Introducció general***

# 1. NF $\kappa$ B

---

L'any 1986 Sen & Baltimore (Sen and Baltimore, 1986) van descriure NF $\kappa$ B per primera vegada en cèl·lules B, com un factor regulador de l'*enhancer* Kappa de les immunoglobulines. ... mateix any, aquests investigadors van demostrar que existia activitat NF $\kappa$ B dependent d'estímul en molts altres tipus cel·lulars i que aquesta activació era independent de síntesi proteica. Anys més tard s'ha demostrat que NF $\kappa$ B és un factor que regula l'expressió de centenars de gens implicats en la immunitat innata i adaptativa (Bonizzi and Karin, 2004), en la proliferació i en la supervivència cel·lular així com en el desenvolupament d'òrgans (Hayden and Ghosh, 2004). NF $\kappa$ B s'activa principalment en resposta a citoquines pro-inflamatòries i a patrons moleculars associats a patògens (PAMPs), en situacions d'infecció, inflamació o altres situacions d'estrès que requereixin una ràpida reprogramació de l'expressió gènica.

## 1.1 Membres de la família NF $\kappa$ B

### 1.1.1 Les proteïnes Rel

En mamífers existeixen cinc membres dins de la família d'NF $\kappa$ B/Rel. Aquest són: NF $\kappa$ B1 (p50/p105), NF $\kappa$ B2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel i RelB, codificats pels gens *Nfkb1*, *Nfkb2*, *RelA*, *Rel* i *RelB* respectivament (Ghosh et al., 1998; Siebenlist et al., 1994) (Fig.1). A diferència de c-Rel, RelA i RelB que es sintetitzen en la seva forma activa, NF $\kappa$ B1 i NF $\kappa$ B2 es sintetitzen en forma de precursors, p105 i p100, que s'han de processar a nivell post-traducciona per generar les subunitats amb capacitat d'unió al DNA, p50 i p52 respectivament. Mentre que el processament de la p105 és bàsicament constitutiu el de p100 està regulat (Xiao et al., 2001).

Els membres de la família d'NF $\kappa$ B es caracteritzen per la presència d'una regió d'homologia, d'uns 300 aminoàcids, altament conservada al llarg de l'evolució que es coneix amb el nom de *Rel homology domain* (RHD). La regió RHD consisteix en dos dominis (*Ig-like*), i és la responsable de la dimerització entre diferents proteïnes Rel, de la unió al DNA i de la interacció amb les proteïnes inhibidores I $\kappa$ B (Ghosh et al., 1998) (Veure Fig.1).

La forma activa d'NF $\kappa$ B és un dímer. Les diferents proteïnes Rel poden homodimeritzar o heterodimeritzar donant lloc a diferents dímers d'NF $\kappa$ B, dels quals el més comú és el format per les proteïnes p65-p50. Els dímers d'NF $\kappa$ B s'uneixen als llocs  $\kappa$ B dels promotors o dels *enhancers* de determinats gens i regulen la transcripció mitjançant el reclutament de coactivadors o corepressors transcripcionals. Els diferents dímers d'NF $\kappa$ B mostren diferent afinitat per llocs  $\kappa$ B específics (Natoli et al., 2005), sent el consens general d'unió GGRNNYYCC, on R és una purina, Y és una pirimidina i N és qualsevol base (revisat a Miyamoto and Verma, 1995). Per que un factor activi la transcripció gènica ha de tenir un domini TAD, de l'anglès, *transcription activation domain*. De totes les proteïnes Rel només RelA (p65), c-Rel i RelB tenen domini TAD, de manera que

només els dímers que contenen alguna d'aquestes proteïnes poden activar la transcripció. Pel contrari, els homodímers p50-p50 i p52-p52 actuen com a repressors transcripcionals dels seus gens diana.

### **1.1.2 Les proteïnes inhibidores I $\kappa$ B**

Els inhibidors d'NF $\kappa$ B s'inclouen dins de la família de les proteïnes I $\kappa$ B, a la que pertanyen: I $\kappa$ B $\alpha$  (*Nfkb1A*), I $\kappa$ B $\beta$  (*Nfkb1B*), I $\kappa$ B $\epsilon$  (*Nfkb1E*), I $\kappa$ B $\zeta$  (*NfkbZ*), Bcl-3 (*Bcl3*), I $\kappa$ BNS el precursor d'NF $\kappa$ B1 (p105) (*Nfkb1*), el d'NF $\kappa$ B2 (p100) (*Nfkb2*) i I $\kappa$ B $\gamma$  (Whiteside and Israel, 1997) (Fig.1).

I $\kappa$ B $\alpha$  és la proteïna millor caracteritzada d'aquesta família. A nivell estructural està formada per tres dominis (Veure Fig.1):

- una regió N-terminal que conté les dues serines conservades (32,36) que es fosforilen pel complex IKK en resposta a estímuls activadors de la via d'NF $\kappa$ B i que regulen la seva degradació pel proteasoma.
- una estructura central formada per repeticions d'anquirina que és l'encarregada de la unió a NF $\kappa$ B. Tots els I $\kappa$ Bs tenen en comú la presència de cinc a set repeticions de tipus anquirina, que conformen un domini d'interacció proteïna-proteïna.
- una regió C-terminal que conté un domini de tipus PEST, que també es pot fosforilar, i que regula l'estabilitat de la proteïna en absència d'estímuls activadors d' NF $\kappa$ B.

Els dímers d'NF $\kappa$ B, en el seu estat inactiu, s'associen a un dels I $\kappa$ Bs típics: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p100 o p105. La unió d'aquests I $\kappa$ Bs a NF $\kappa$ B assegura que el factor sigui transcripcionalment inactiu fins que les cèl·lules rebien els estímuls adequats. És a dir, les proteïnes I $\kappa$ Bs són elements clau en l'activació d'NF $\kappa$ B en resposta a estímul.

El principal efector de l'activitat transcripcional d'NF $\kappa$ B, en la via canònica, és el dímer RelA-p50. Aquesta via pot estar regulada negativament per qualsevol dels tres I $\kappa$ Bs canònics: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  i I $\kappa$ B $\epsilon$ , ja que tots tres tenen la capacitat d'unir-se als dímers d'NF $\kappa$ B i emascarar la seva NLS (*nuclear localization signal*), impedit així la seva translocació al nucli i la seva unió al DNA (Beg and Baldwin, 1993). L'activació de la via canònica d'NF $\kappa$ B en resposta a un estímul, es basa en l'activació del complex IKK, aquest fosforila I $\kappa$ B i indueix la seva degradació depenent d'ubiquitinació pel proteosoma (veure més endavant). Encara que s'han descrit altres proteïnes I $\kappa$ B com a possibles moduladors de l'activitat NF $\kappa$ B sobre determinats gens (Tergaonkar et al., 2005), durant la senyalització inflamatòria són els tres I $\kappa$ Bs típics (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  i I $\kappa$ B $\epsilon$ ) els responsables del control de la localització subcel·lular dels dímers d'NF $\kappa$ B (Hoffmann et al., 2002).

En la via alternativa, el principal mediador de l'activitat NF $\kappa$ B és el dímer p52-RelB. En situació basal el dímer resta inactiu per acció del precursor p100, que actua com a inhibidor retenint-lo a citoplasma. Després de l'estímul es produeix la fosforilació i processament parcial de

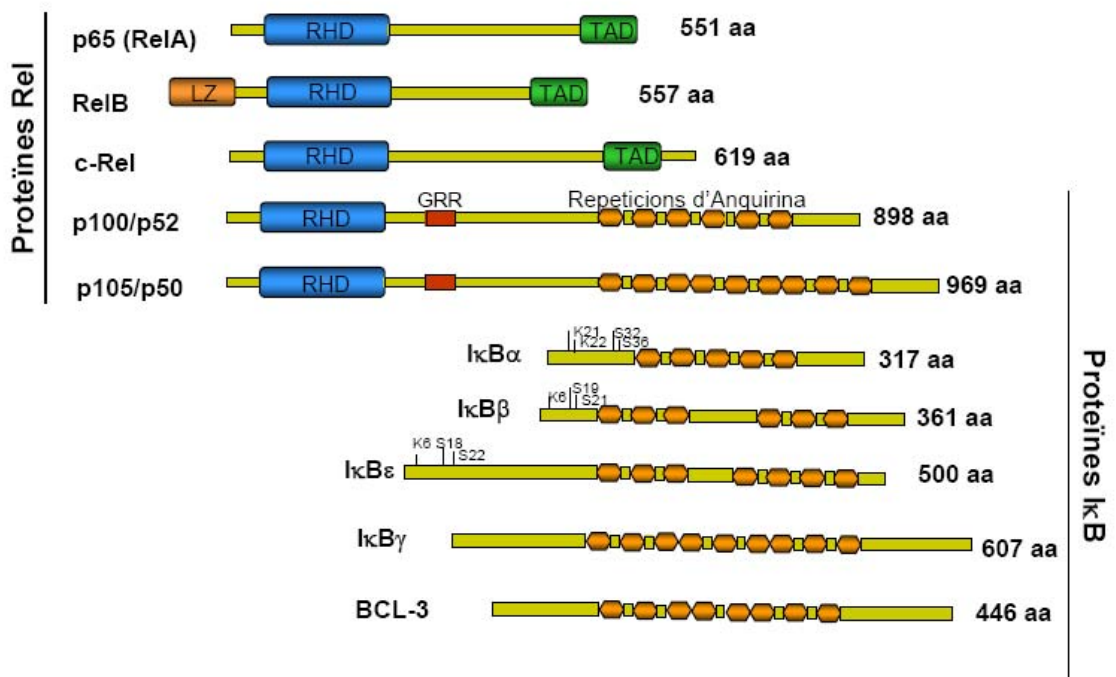
p100 a p52, i l'alliberament del dímer p52-Rel que es transloca a nucli per activar la transcripció dels seus gens diana.

Recentment s'ha demostrat que de forma anàloga als I $\kappa$ Bs canònics, p100 pot actuar com a inhibidor de l'activació de la via clàssica d'NF $\kappa$ B, mitjançant el segrest citoplasmàtic dels dímers RelA-p50, per això s'ha anomenat a p100 el quart I $\kappa$ B. El quart I $\kappa$ B indueix l'activació dels dímers RelA-p50 en resposta a estímuls no clàssics de la via d'NF $\kappa$ B. El mecanisme d'acció del quart I $\kappa$ B es basa en la presència d'un dímer de p100, el domini anquirina d'un dels quals s'uneix a un dímer clàssic RelA-p50. En resposta a un estímul de la via alternativa, com per exemple linfoxina beta (LT $\beta$ ), aquesta p100 es degrada induint la translocació a nucli del dímer canònic RelA/p50 (Basak et al., 2007).

I $\kappa$ B $\zeta$  i Bcl-3 es coneixen com a proteïnes *I $\kappa$ B-like* o proteïnes I $\kappa$ B nuclears, s'ha vist que aquestes proteïnes interaccionen amb p50 i p52 al nucli regulant així l'expressió gènica. Els estudis *in vivo*, utilitzant animals deficients per aquestes proteïnes, demostren que les proteïnes I $\kappa$ B nuclears poden funcionar tant com a activadors o inhibidors de la transcripció depenent d'NF $\kappa$ B, segons el context i l'estímul que les indueix (Wessells et al., 2004; Yamamoto et al., 2004).

I $\kappa$ BNS, és un altre I $\kappa$ B nuclear (Fiorini et al., 2002), que actua com a inhibidor d'NF $\kappa$ B. En macròfags de la làmina pròpia del còlon, s'ha demostrat que en resposta a LPS, I $\kappa$ BNS, juntament amb p50, es recluta de forma específica al promotor de la IL-6, inhibint la seva transcripció (Hirotsu et al., 2005).

I $\kappa$ B $\gamma$  és el resultat d'un *splicing* alternatiu del transcrit del gen que codifica per p105 (*Nfkb1*), que inclou la regió de les repeticions d'anquirina. La funció biològica d'aquest I $\kappa$ B encara no es coneix (Grumont and Gerondakis, 1994).



**Fig 1. Representació esquemàtica dels membres de la família de proteïnes d'NFκB i IκB.** S'indiquen els principal dominis funcionals i els residus (serines i lisines) implicats en la degradació dels diferents IκBs. També es mostren el número d'aminoàcids de cada una de les proteïnes representades. **LZ:** *leucin zipper*, **RHD:** *Rel Homology domain*, **TAD:** *Transactivation domain*, **GRR:** regió rica en glicines (Revisat a Rothwarf and Karin, 1999).

## **1.2 Mecanismes d'activació d'NF $\kappa$ B**

### **1.2.1 Mecanismes d'activació d'NF $\kappa$ B que depenen de la fosforilació i degradació d'I $\kappa$ B**

L'activació d'NF $\kappa$ B s'indueix per diferents estímuls que activen el complex de les IKKs i provoquen la fosforilació i degradació d'alguns dels inhibidors d'NF $\kappa$ B.

Fins al moment s'han descrit dues vies de senyalització principals per a l'activació NF $\kappa$ B:

- la via clàssica d'NF $\kappa$ B
- la via alternativa d'NF $\kappa$ B



### **1.2.1.1 La via d'activació clàssica d'NFκB**

La via clàssica d'NFκB s'activa en resposta a una gran varietat de senyals extracel·lulars que inclouen citoquines pro-inflamatòries i patrons moleculars associats a patogen (PAMPs). Aquests estímuls indueixen la senyal a través de la unió a diferents receptors, que pertanyen a les superfamílies de receptors del TNFα, IL-1 i dels TLL. En tots els casos la unió de l'estímul al receptor dóna lloc a l'activació del complex de les IKKs. La composició més comú d'aquest complex, encara que no la única, consisteix en dues subunitats catalítiques, IKKα i IKKβ, i una subunitat reguladora, IKKγ, també anomenada NEMO (de l'anglès *NFκB essential modulator*) (Miller and Zandi, 2001).

La via clàssica d'NFκB depèn de l'activitat quinasa de la subunitat IKKβ. Després de l'activació, el trimer inactiu p65-p50-IκB es recluta al complex IKK, on IKKβ fosforila IκBα en les serines 32 i 36. Aquesta fosforilació crea un lloc d'unió per al complex F-box/WD40 E3RSE3<sup>IκB</sup>/β-TRCP que possibilita la ubiquitinació de la proteïna a les lisines 21 i 22 pel complex SKp1-Cullin-F-box(SCF)-E3. Aquesta modificació marca a IκB per a la seva ràpida degradació pel complex 26S del proteosoma. D'aquesta manera s'alliberen els dímers NFκB, principalment p65-p50, que entren al nucli per unir-se al DNA i activar la transcripció dels seus gens diana (Fig.3). El paper de la IKKα en l'activació de la via clàssica d'NFκB no està clar. Les cèl·lules deficientes en IKKα no tenen cap defecte en la degradació d'IκBα ni en la translocació al nucli de p65-p50 (Hu et al., 1999; Takeda et al., 1999), suggerint que la seva funció en l'activació de la via clàssica és dispensable. No obstant, la IKKα participa en la regulació de la via clàssica a través de la fosforilació de la H3 (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003) (Veure més endavant).

La via de senyalització clàssica d'NFκB regula principalment la immunitat innata. Així, la translocació al nucli dels dímers p65-p50 s'associa a l'activació transcripcional de gens que codifiquen per quimioquines, citoquines, molècules d'adhesió, enzims que produeixen mediadors inflamatoris secundaris, i inhibidors de l'apoptosi ( revisat a Ghosh et al., 1998). Molts d'aquests factors són importants per al reclutament de cèl·lules inflamatòries i fagocítiques als llocs d'infecció o dany, i per a la seva posterior activació un cop allà. Per aquest motiu, la manca d'expressió de p65 o IKKβ es tradueix en un increment de la susceptibilitat a patir infeccions, tal i com demostren els treballs realitzats amb animals deficientes per aquestes proteïnes (Veure més endavant). Moltes de les funcions relacionades amb la immunitat innata que regula NFκB van més enllà del compartiment hematopoètic. En els teixits de cèl·lules epitelials tals com els pulmó, el fetge o la mucosa intestinal, on el contacte amb patògens és molt directe, la via d'NFκB també juga un paper molt important.

### **1.2.1.2 La via d'activació alternativa d'NFκB**

Fins l'any 2001, la única manera que es coneixia d'activar NFκB era a través de la fosforilació d'IκB dependent d'IKKβ (via clàssica). El descobriment de la via alternativa basada en el processament del precursor *Nfkb2/p100*, va demostrar l'existència d'altres mecanismes reguladors de l'activació d'NFκB.

Molècules com la limfotoxinaβ, BAFF i CD40 activen la via alternativa d'NFκB mitjançant la seva unió a receptors específics (Claudio et al., 2002; Dejardin et al., 2002). A diferència de la via clàssica, l'activació de la via alternativa no requereix l'activitat d'IKKβ i de NEMO, si no que depèn exclusivament de l'activitat d'IKKα. La unió lligand-receptor indueix l'acumulació de la proteïna NIK (de l'anglès *NFκB Inducer Kinase*) (Veure més endavant). El mecanisme molecular que indueix l'activació de NIK no es coneix, però se sap que després de l'estímul NIK esdevé activa i fosforila les serines 866 i 870 de p100 (Liang et al., 2006), i la serina 176 d'IKKα (Ling et al., 1998). La fosforilació de p100 per NIK facilita la seva unió a IKKα que la fosforila al domini C-terminal (serina 872) (Senftleben et al., 2001). De manera similar a IκBα, p100 fosforilada recluta el complex E3 ubiquitin ligasa SCF<sup>β-TrCP</sup>, que la poliubiquitina a la lisina 855 i la marca per a la seva parcial degradació pel complex 26S del proteosoma. El domini GRR de p100, ric en glicines (veure Fig.1), és important en processament parcial de la proteïna (Heusch et al., 1999). La degradació de l'extrem C-terminal de la p100, on es troben les repeticions tipus anquirina, allibera l'extrem N-terminal de la proteïna que conté el RHD, generant el polipèptid p52. Degut a que normalment el domini RHD de p100 s'associa amb RelB, l'activació de la via alternativa d'NFκB es tradueix en la translocació nuclear de dímers p52-RelB (Fig.5). El processament de p100, és un fenomen finament regulat que només es produeix en resposta a estímul, mentre que en cèl·lules no estimulades el processament de p100 es mínim.

La via de senyalització alternativa d'NFκB regula la transcripció de gens relacionats amb la immunitat innata així com de gens involucrats en el desenvolupament i manteniment d'òrgans limfoides secundaris (Caamano et al., 1998; Weih et al., 2001).

### **1.2.2 Altres mecanismes d'activació d'NFκB**

Els mecanismes d'activació d'NFκB que s'acaben d'explicar són aplicables a tots els activadors potents de la via. No obstant, s'han descrit dues vies més d'activació d'NFκB. La primera es dona en resposta a situacions d'hipòxia i té lloc mitjançant la fosforilació d'IκBα en la tirosina 42. Degut a que la tirosina 42 no està conservada en altres IκB es creu que aquesta via d'activació és exclusiva d'IκBα. La segona via d'activació atípica d'NF-κB s'observa en cèl·lules exposades a radiació UV, on IκBα es degrada pel complex 26S del proteasoma, independentment de la fosforilació prèvia de les serines 32 i 36 o la tirosina 42, per un mecanisme que encara no es coneix (Bender et al., 1998; Li and Karin, 1998). L'activitat NFκB que s'indueix mitjançant aquestes dues vies és considerablement menor a la induïda per els activadors prototípics d'NFκB com són; TNFα, IL-1 o LPS.

### **1.2.3 Modificacions post-traduccionals que afecten a l'activitat NFκB**

Encara que la degradació de les proteïnes IκB és el principal mecanisme que regula la translocació dels dímers Rel al nucli, existeixen modificacions addicionals que afecten a l'activitat transcripcional d'NFκB. Aquestes modificacions poden ser induïdes tant pels propis membres de la família d'NFκB com per altres proteïnes, sent en aquest cas nexes d'unió entre diferents vies. Les modificacions post-traduccionals de p65 afecten a la seva interacció amb coactivadors i corepressors transcripcionals, a la seva afinitat per unir-se a llocs κB de promotors, o a la pròpia estabilitat de la proteïna.

Les modificacions post-traduccionals de p65 més estudiades són les fosforilacions. Per exemple, en resposta al tractament amb LPS s'indueix la fosforilació de p65 per PKA a la serina 276 (Zhong et al., 1998). Les quinases MSK1/2 en resposta a TNFα també fosforilen p65 en aquest mateix residu (Vermeulen et al., 2003). Per altre banda, les quinases IKKα i IKKβ s'han associat directament a la fosforilació de la serina 536 de p65. Les fosforilacions de les serines 276 i 536 incrementen l'activitat transcripcional de p65 ja que faciliten la seva interacció amb el coactivador transcripcional CBP/p300, que acetila la lisina 310 de p65. La reconstitució de MEFs deficientes en p65, amb els mutants p65 S276A o p65 S536A, inhibeix l'acetilació de la lisina 310 de la p65 i l'expressió dependent d'NFκB (Chen et al., 2005). En canvi, en macròfags s'ha descrit que la fosforilació de la serina 536 de p65 per la IKKα induïx la seva degradació pel proteasoma, regulant així la durada de la resposta inflamatòria (Lawrence et al., 2005) (Veure més endavant). La serina 529 de p65 també pot ser fosforilada per la quinasa CK2 en resposta a IL-1 o TNFα, encara que no està clar com aquesta fosforilació afecta a la transcripció (Wang et al., 2000). En MEFs el tractament amb TNFα induïx la fosforilació de la serina 311 de p65 per la PKCζ, i la seva activació (Duran et al., 2003). El canvi d'aquest residu per una alanina afecta a l'activitat transcripcional de p65 en resposta a TNFα, ja que inhibeix la seva unió al co-activador CBP/p300

així com al seu reclutament, i el de la RNA polimerasa II, al promotor de la IL-6. Cèl·lules deficientes en PKC $\zeta$  presenten aquests mateixos defectes (Duran et al., 2003).

Altres quinases com TBK1 i GSK3 $\beta$  poden estar també involucrades en la regulació d'NF $\kappa$ B. Els ratolins deficientes en aquestes proteïnes moren en estat embrionari aproximadament a dia 15 de desenvolupament (E15), degut a una apoptosi massiva al fetge, fenotip molt similar als mutants de falta de funció d'NF $\kappa$ B (Veure més endavant). A més, l'anàlisi bioquímic de fibroblasts embrionaris d'aquest ratolins mostra una reducció en l'activació transcripcional dependent d'NF $\kappa$ B, en resposta a estímul, malgrat la correcta degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$  i translocació a nucli d' NF $\kappa$ B. Suggestint que la regulació d'NF $\kappa$ B per aquestes quinases és a nivell del complex de transcripció (Bonnard et al., 2000; Hoeflich et al., 2000). S'ha proposat que TBK1 indueix l'activació transcripcional d'NF $\kappa$ B a través de la fosforilació de RelA (Fujita et al., 2003).

Un altre tipus de modificació post-translacional de p65 que afecta a la seva capacitat transactivadora és l'acetilació. p300/CBP és l'acetil-transferasa de p65 més ben descrita (Chen et al., 2002). L'acetilació de p65 es produeix al nucli i s'associa a l'increment de l'activació transcripcional, i la seva deacetilació a la inhibició (Chen et al., 2002; Yeung et al., 2004). Depenent del residu de la p65 que s'acetila, l'activació de la transcripció es produeix per un mecanisme o un altre. Per exemple, l'acetilació de la lisina 221 incrementa la unió de p65 als llocs  $\kappa$ B, i junt amb l'acetilació de la lisina 218 afecten a la unió de p65 per l'I $\kappa$ B de nova síntesi, impedit l'acabament de la senyal. En canvi, l'acetilació de la lisina 310 indueix l'activitat transcripcional de p65 sense modificar la seva unió ni a I $\kappa$ B ni al DNA (Chen et al., 2005). L'acetilació de p65 requereix la prèvia fosforilació de la p65 a la serina 276 i a la serina 536, ja que aquests residus fosforilats són necessàries per al reclutament de CBP/p300 (Chen et al., 2005). A més, s'ha demostrat que la fosforilació de la serina 536 de p65, per IKK $\alpha$ , redueix la interacció de p65 amb el corepressor SMRT i la deacetilasa d'histones HDAC3, i incrementa la unió a CBP/p300 (Hoberg et al., 2006).

Les modificacions de la cromatina han sorgit recentment com un altre mecanisme de regulació de la via de senyalització d'NF $\kappa$ B. En aquest sentit, s'han definit dos grups de gens diana d'NF $\kappa$ B, depenent de si requereixen o no aquest tipus de modificacions per a ser expressats (Natoli et al., 2005). Aquests grups els constitueixen; els gens CIA (*Constitutively and Immediately Accessible*), i els gens RLA (*Regulated and Late Accessibility*). Els promotors CIA no requereixen modificacions a nivells de cromatina ja que tenen una conformació oberta que facilita l'accessibilitat de la maquinaria de transcripció i la ràpida expressió del gen. Pel contrari els gens RLA tenen una conformació tancada i necessiten modificacions de la cromatina, induïdes per l'estímul, per poder ser activats (Sacconi et al., 2001). Es creu que en la resposta inflamatòria els gens que s'han d'expressar de manera molt ràpida pertanyen al grup dels gens CIA mentre que els gens que es necessiten més tard són gens RLA.

### **1.3 Mecanismes d'inactivació de la via d'NFκB**

El factor de transcripció NFκB és un regulador central de la resposta immune i inflamatòria de l'hoste. Una excessiva o prolongada activació d'NFκB pot danyar els teixits de l'organisme, i causar malalties inflamatòries cròniques com poden ser l'asma i l'artritis (Tak and Firestein, 2001; Yamamoto and Gaynor, 2001), o fins i tot poden arribar a matar a l'individu. Així doncs, és imprescindible que existeixin mecanismes de regulació negativa de l'activació d'NFκB, que atenuïn o apaguin la senyal quan sigui necessari.

Un dels mecanismes millor descrit per la regulació negativa de la via és l'export a citoplasma dels dímers d'NFκB per les proteïnes IκB (Arenzana-Seisdedos et al., 1995). Com a conseqüència de l'activació de la via d'NFκB, s'indueix la transcripció d'IκBα i IκBε, aquestes proteïnes IκB de nova síntesi actuen alliberant els dímers d'NFκB de la cromatina i transportant-los al citoplasma, acabant així la senyal. IκBα és el principal responsable de l'export actiu de dímers d'NFκB, tot i que en treballs previs del nostre laboratori hem demostrat que les proteïnes 14-3-3 juguen un paper essencial en l'export a citoplasma dels complexos NFκB-IκBα (Aguilera et al., 2006). La sortida del nucli d'IκBα té lloc gràcies a un senyal d'export nuclear dependent de CRM1 que s'ha identificat en el domini N-terminal d'IκBα (aminoàcids 45-55), però no en altres IκBs (Tam et al., 2000). Mitjançant la cristal·lització de l'IκBα unit al dímer p65-p50 s'ha demostrat que la proteïna IκBα només emmascara la seqüència de localització nuclear (NLS) de p65 deixant exposat el NLS de p50. Aquest fet permet que els trímers NFκB-IκBα estiguin contínuament entrant i sortint del nucli, tot i que la seva distribució subcel·lular en estat de repòs és majoritàriament citoplasmàtica (Ghosh and Karin, 2002). Que IκBα tingui un paper essencial en la terminació de la senyal d'NFκB, junt amb el fet que IκBα és un dels principals i primers gens diana de la via, fa que l'activitat d'NFκB després de l'estimulació tingui una resposta oscil·latòria. Aquestes oscil·lacions, degudes principalment a IκBα, queden atenuades per la presència dels altres IκBs, els quals tenen diferents cinètiques d'activació i degradació (Barken et al., 2005; Hoffmann et al., 2002). En concret IκBε, que també participa en la finalització de l'activació de la via mitjançant l'export citoplasmàtic de dímers d'NFκB, té una degradació i resíntesi més retardada en el temps que la de IκBα (Kearns et al., 2006).

Pel que fa a IκBβ, actua com a segrestador de p65 i c-Rel en el citoplasma cel·lular inhibint el seu import al nucli, però encara que part de l'IκBβ de nova síntesi s'ha localitzat al nucli (Suyang et al., 1996) no pot retornar les proteïnes Rel al citoplasma amb l'eficiència amb que ho fa IκBα. De fet es creu que l'IκBβ de nova síntesi, no fosforilat, s'uneix a dímers d'NFκB que es troben en el llocs κB d'alguns promotors impedit físicament la unió a IκBα i l'export citoplasmàtic dels complexos, tenint un efecte activador (comunicat per S. Ghosh, EMBO Workshop, Capri 2008).

Les diferents característiques dels IκBs són també font de diversitat en el procés d'activació d'NFκB. Per exemple, el fet que la degradació d'IκBα en front a estímuls activadors d'NFκB és molt ràpida genera una resposta immediata i puntual de la via. Pel contrari estímuls que actuen a

través d'I $\kappa$ B $\beta$  i I $\kappa$ B $\epsilon$  generen una resposta més lenta i persistent degut a la seva lenta degradació i resíntesi (Thompson et al., 1995). Malgrat que les proteïnes I $\kappa$ B juguen un paper clau en la inhibició de la via d' NF $\kappa$ B s'ha vist que en cèl·lules de ratolins deficients per I $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\epsilon$ , p65 segueix estant majoritàriament al citoplasma (Tergaonkar et al., 2005), suggerint que altres proteïnes també regulen aquest procés.

Un altre manera d'apagar la senyal d'NF $\kappa$ B, independent dels I $\kappa$ Bs, és la pròpia degradació, depenent d'ubiquitinació, de la p65 activada pel proteosoma (Ryo et al., 2003; Saccani et al., 2004) o d'altres elements de la via com RIP o TRAF (Veure apartat 1.5.4.2).

## **1.4 Funcions biològiques de les proteïnes NFκB i IκB**

Molt del coneixement sobre les funcions biològiques de les proteïnes s'extreu de l'estudi dels animals *knockout* o deficients per a elles. En el cas de la família d'NFκB, s'han generat animals *knockout* de molts dels membres de la família, i així s'han pogut identificar les diferents funcions que queden alterades en cadascun d'ells.

Els ratolins p65<sup>-/-</sup> moren a dia 15 o 16 de desenvolupament, a causa de la degeneració massiva del fetge (Beg and Baltimore, 1996; Beg et al., 1995). L'estímul que desencadena aquest dany és el TNFα, tal i com demostren els treballs de Alcamo i Doi ens els que el creuament de ratolins p65<sup>-/-</sup> amb ratolins TNFR<sup>-/-</sup> o TNFα<sup>-/-</sup> rescata el fenotip apoptòtic del fetge. A més dels hepatòcits, NFκB protegeix de l'apoptosi induïda per TNFα a altres tipus cel·lulars entre els que s'inclouen: macròfags (Beg and Baltimore, 1996), cèl·lules B (Prendes et al., 2003) i cèl·lules T (Senftleben et al., 2001). De fet, l'efecte antiapoptòtic d'NFκB no es restringeix a l'exposició a TNFα sinó que també actua en resposta a altres inductors de l'apoptosi com per exemple l'RNA de doble cadena, a través de la transcripció de gens antiapoptòtics (Dutta et al., 2006). També s'ha observat que els ratolins deficients per la proteïna p65 presenten defectes en el desenvolupament d'òrgans limfoides secundaris així com en el reclutament de leucòcits i en la resposta depenent de cèl·lules T (Alcamo et al., 2002; Alcamo et al., 2001), posant de manifest el paper de p65 i la via clàssica d'NFκB en la immunitat adaptativa. P65 també és necessari pel normal desenvolupament dels sistema nerviós i la pell (Meffert et al., 2003).

Malgrat l'expressió ubíqua de p105, l'absència d'aquesta proteïna no afecta el desenvolupament embrionari. La principal característica dels animals *Nfkb1*<sup>-/-</sup> és la disminució en la producció d'immunoglobulines i el defecte en la resposta immunitària humoral, mentre que p50 és redundant en la funció antiapoptòtica de la via.

L'absència de p100/p52 també és compatible amb el desenvolupament embrionari i amb la viabilitat de l'adult. No obstant, el ratolí *Nfkb2*<sup>-/-</sup> presenta diferents defectes immunològics entre els quals trobem: defectes en el desenvolupament d'estructures limfoides secundàries, maduració anòmala dels limfòcits B i una funció aberrant de les cèl·lules T (Beinke and Ley, 2004), també mostren defectes en l'arquitectura de la melsa i en el desenvolupament de les plaques de Peyer (Caamano et al., 1998; Franzoso et al., 1998; Paxian et al., 2002). Aquests defectes estan en concordança amb el paper principal que té la LTβ en el desenvolupament dels òrgans limfoides secundaris (Bonizzi and Karin, 2004). No obstant, la via alternativa d'NFκB també participa en el desenvolupament d'altres estructures, com la mama. Els ratolins transgènics que sobreexpressen p100/p52 en aquest òrgan, presenten defectes en el desenvolupament dels conductes de la glàndula mamària durant l'embaràs que s'associen amb un increment en l'expressió de Ciclina D1, MMP-2/9 i COX-2. A més en els tumors de mama induïts per l'expressió de l'oncoproteïna PyVT, els nivells de p100/p52 estan incrementats, suggerint que la via alternativa d'NFκB també participa en la carcinogènesi d'aquest òrgan (Connelly et al., 2007; Demicco et al., 2005).

c-Rel és dispensable per al procés de diferenciació dels progenitors hematopoètics, però és essencial per al correcte funcionament de les cèl·lules B i T. En el llinatge de cèl·lules B, c-Rel, coordina la progressió del cycle cel·lular i la supervivència de cèl·lules B madures en resposta a diferents senyals mitogènics (Grumont et al., 1998). Per altre banda c-Rel s'expressa en diferents estadis del desenvolupament de timòcits, i és indispensable en el procés de selecció positiva i negativa de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> (Strasser et al., 1999).

Els ratolins deficients per la proteïna RelB presenten un fenotip inflamatori molt complex i defectes a nivell hematopoètic (Burkly et al., 1995). Les patologies dels animals RelB<sup>-/-</sup> inclouen: infiltrats inflamatoris en múltiples òrgans, hiperplàsia mieloide, esplenomegàlia i dermatitis inflamatòria. Les bases moleculars d'aquest fenotip inflamatori estan per determinar.

No és només la deficiència en els elements activadors d'NFκB la que provoca una gran varietat de defectes fisiològics, sinó que la manca d'altres elements associats a la via, com són els inhibidors, també genera un fenotip anòmal. El cas que millor representa aquesta situació és el ratolí deficient en IκBα. Encara que el desenvolupament embrionari d'aquest és relativament normal, l'animal mor després de 7-10 dies de vida. Un dels principal defectes d'aquest ratolins és una dermatitis d'origen inflamatori, a més d'una mielodisplàsia al fetge que es correlaciona amb un increment de l'expressió de Jagged1 (Beg et al., 1995; Klement et al., 1996; Rupec et al., 2005). D'acord amb l'important paper d'IκBα regulant l'expressió de mediadors inflamatoris depenent d'NFκB, la dermatitis dels ratolins IκBα<sup>-/-</sup> està associada amb un increment en l'expressió de TNFα, G-CSF i MIP-2 (Klement et al., 1996).

El paper d'altres membres de la família d'IκB està menys estudiat. Els ratolins deficient en IκBβ no presenten un fenotip evident i per això la seva caracterització no ha estat publicada. No obstant, recentment s'ha vist que si aquests ratolins IκBβ<sup>-/-</sup> es sotmeten a un tractament sostingut amb LPS no produeixen TNFα, demostrant que IκBβ té una funció en l'activació de la transcripció d'aquest gen en resposta a estímul. De fet es creu que l'IκBβ de nova síntesi, no fosforilat, s'uneix a dímers d' NFκB que es troben en el llocs κB del promotor de *Tnfα*, impeding físicament la unió a IκBα i l'export citoplasmàtic d'NFκB (comunicat per S. Ghosh, EMBO Workshop, Capri 2008).

El paper de BCL-3 és controvertit. Hi ha un grup de treballs que suggereixen que BCL-3 interacciona amb els dímers p50-p52 i els allibera dels llocs κB (Hatada et al., 1992; Wulczyn et al., 1992), mentre que altres diuen que BCL-3 forma un complex transcripcionalment actiu amb l'homodímer p50-p52 (Bours et al., 1993; Fujita et al., 1993). El *knockout* de BCL-3 és viable, però és incapaç de generar una apropiada resposta immune humoral en front de múltiples patògens, li manquen centres germinals i falla en la resposta específica d'antigen (Schwarz et al., 1997). Aquest fenotip s'assembla parcialment al que mostren els ratolins p52<sup>-/-</sup>, donant suport a la idea de que BCL-3 forma, junt a p52, un complex transcripcionalment actiu.



## 1.5 El complex IKK

### 1.5.1 Descripció i components

Després de saber que la fosforilació d'I $\kappa$ B era un pas imprescindible per a l'activació d'NF $\kappa$ B, els esforços es van centrar en descobrir quina era la quinasa o quinases responsables d'aquesta fosforilació. Al 1997 es va identificar un complex proteic amb activitat quinasa, que s'indueïa en resposta a citoquines, i que fosforilava les serines reguladores de les proteïnes I $\kappa$ B. A aquest complex se'l va anomenar complex *IkappaB-Kinase (IKK)* (DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997; Zandi et al., 1997).

Els components del complex IKK es van identificar mitjançant purificació, microseqüenciació i clonació. Així es va determinar que el complex IKK estava format per IKK $\alpha$ /IKK1, IKK $\beta$ /IKK2 i IKK $\gamma$ /NEMO, codificades pels genes *Chuch*, *Ikkb $\beta$* , *Ikkb $\gamma$* . La IKK $\alpha$  i la IKK $\beta$  són les subunitats catalítiques del complex, són proteïnes molt similars, amb un 50% d'identitat en la seqüència i un 70% de similitud en l'estructura. Tenen un pes molecular de 85 i 87kD respectivament, i la seva estructura està formada per un domini quinasa (KD) a l'extrem N-terminal, un domini *Leucin Zipper* (LZ) i una regió *Hèlix-loop-hèlix* (HLH) a C-terminal (Fig.2). El tercer component del complex IKK és IKK $\gamma$ /NEMO, té un pes de 48kD, i és la subunitat reguladora. L'estructura de NEMO és bàsicament de tipus hèlix amb regions *super-coil* intercalades i un domini *Leucin Zipper* (LZ) a prop de l'extrem C-terminal. Els 50 primers i últims residus de la proteïna no tenen estructura (Fig.2).

Tot i que aquestes tres proteïnes són els components principals del complex IKK, la majoria de l'activitat IKK elueix en un complex de 700 a 900 kD, suggerint que aquest complex està format per altres proteïnes, o que és polimèric, és a dir, format per més d'una subunitat IKK de cada tipus

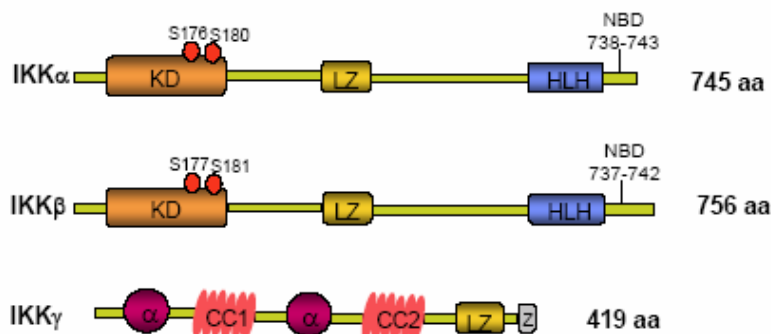


Fig 2. Esquema on es mostren els motius estructural i funcionals de les diferents subunitats del complex IKK. KD: Kinase Domain,

LZ:leucin zipper, HLH:helix-loop-helix, CC:coiled-coil, Z: zing finger, NBD: NEMO-binding domain. S'indiquen les serines implicades en l'activació de la funció quinasa, i el número d'aminoàcids de cada una de les proteïnes representades.

### **1.5.2 Estequiometria del complex**

S'han suggerit diferents proteïnes com a possibles components del complex de 700-900 kD d'IKK, alguns exemples són: NIK (de l'anglès *NFκB inducing kinase*), IKAP (de l'anglès *IκB inducing protein*), Hsp9, i ELKS, entre d'altres. Però en cap dels casos s'ha pogut demostrar l'associació directe d'aquestes proteïnes al complex, ni la seva participació en la inducció de l'activitat IKK. Recentment s'ha descrit que la mucina MUC1 interacciona amb el complex IKK, induint la seva activació fisiològica en cèl·lules epitelials, i que la sobreexpressió de MUC1 d'alguns carcinomes humans causa la senyalització persistent de la via d'NFκB (Ahmad et al., 2007).

IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  formen dímers a través del seu domini LZ, i aquests dímers es poden associar entre ells, mitjançant IKK $\gamma$ /NEMO, a través d'un decapeptid localitzat al domini N-Terminal d'aquestes quinases, anomenat NBD (*NEMO binding domain*) (Yamaoka et al., 1998). A més NEMO pot formar multímers amb ell mateix mitjançant la interacció dels dominis CC (*coiled-coil*) i LZ (*leuzin zipper*) (Tegethoff et al., 2003). Aquestes dades, suggereixen que el complex IKK de 700-900 kD podria estar format per dos dímers IKK $\alpha$ -IKK $\beta$  i un tetràmer d'IKK $\gamma$ . Experiments realitzats amb mutants del domini NBD de IKK $\alpha/\beta$ , o amb pèptids bloquejants demostren que la unió de NEMO a les IKK $\alpha/\beta$  és absolutament necessària perquè el complex s'activi (May et al., 2000).

### **1.5.3 Mecanismes d'activació del complex IKK**

L'activació del complex IKK requereix la fosforilació com a mínim d'una de les seves subunitats catalítiques. La IKK $\alpha$  i la IKK $\beta$ , com altres quinases, contenen en el seu *loop* d'activació dues serines susceptibles de ser fosforilades en resposta a estímuls. La fosforilació d'aquest residus provoca un canvi conformacional de la proteïna que possibilita la seva activació. En el cas de la IKK $\alpha$  aquest residus corresponen a les serines 176 i 180, i en el de la IKK $\beta$  a les serines 177 i 181. El canvi d'aquestes serines per alanines (IKK $_{AA}$ ) impedeix l'activació de les quinases, mentre que el canvi per glutamats (IKK $_{EE}$ ) indueix l'activitat quinasa de forma constitutiva ( revisat a Karin, 1999). El domini quinasa de la IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ , és similar al d'altres serina/treonina quinases, on el lloc d'unió per a l'ATP està altament conservat al llarg de l'evolució. S'ha descrit que la mutació de la lisina 44 d'aquesta regió dona lloc a una forma d'IKK inactiva (revisat a Karin and Ben-Neriah, 2000).

La fosforilació de les proteïnes IKK, es pot produir per la multimerització d'unitats IKKs seguida de transautofosforilació, o bé per acció d'una quinasa *upstream* (IKK-K). Un esdeveniment comú en les diferents vies de senyalització que activen les IKK és la formació, a nivell del receptor, d'un complex multiproteic anomenat signalosoma, els components del qual són específics per cada cas. La formació d'aquest signalosoma serveix per posicionar les IKKs a prop d'una IKK-K i/o facilitar el mecanisme de transautofosforilació, mitjançant l'aproximació dels dímers d'IKK.

A continuació es descriu l'activació de les IKK a partir de la senyalització d'NF $\kappa$ B a través de diferents famílies de receptors.

### **1.5.3.1 Activació del complex IKK a través de la família de receptors del TNF $\alpha$ (TNFR)**

La família de receptors del TNF (TNFR) inclou 29 receptors i 19 lligands, que mostren una distribució específica de teixit. La unió lligand-receptor indueix diferents respostes biològiques a través de l'activació de diferents vies de senyalització entre les que trobem la d'NF $\kappa$ B i la de JNK, a més de l'activació de la mort cel·lular induïda per caspases. Dins de la família de receptors del TNF, hi ha alguns que només activen la via clàssica i altres que poden activar tant la clàssica com l'alternativa.

#### **1.5.3.1.1 La via clàssica d'NF $\kappa$ B: Activació del complex IKK per TNFR1**

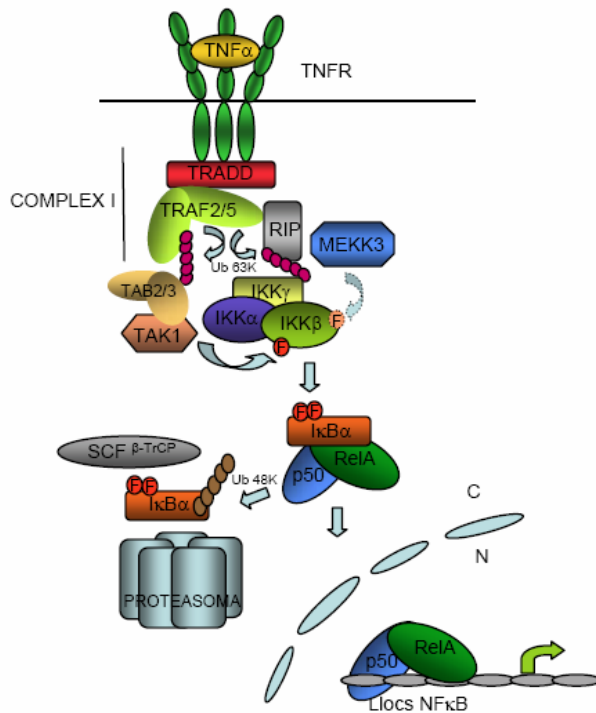
Molt del coneixement que es té sobre l'activació de la via clàssica d'NF $\kappa$ B prové de l'estudi del receptor del TNF $\alpha$  (TNFR1). Per aquest motiu s'ha escollit aquest receptor, com a model, per explicar la senyalització a través de la família dels TNFR.

Els membres de la família TNFR no tenen activitat enzimàtica per si mateixos, així que recluten adaptadors intracel·lulars i molècules senyalitzadores per tal d'iniciar la transducció de la senyal. Les proteïnes TRAFs de l'anglès *TNFR-associated factors*, són mediadors crítics de la senyal induïda per TNFR. En alguns casos les proteïnes TRAFs interaccionen directament amb el receptors, com és el cas de la senyalització per CD40, però en altres ocasions com en el cas particular de la senyalització per TNFR1, calen unes proteïnes adaptadores anomenades TRADD, que possibiliten la interacció TRAF-Receptor. En el cas del TNFR1, les proteïnes TRADD a més de reclutar proteïnes TRAFs (específicament TRAF2 i TRAF5), també recluten una altre proteïna anomenada RIP1 (*Receptor Interacting Protein*). Totes aquestes proteïnes formen l'anomenat complex I. TRAF2 pot induir el reclutament de les IKK al complex I a través de la interacció amb les seves subunitats catalítiques (Devin et al., 2001). Seguidament TRAF2, que com totes les proteïnes TRAF, conté un *RING-finger domain* implicat en la síntesi de cadenes de poliubiquïtines unides per la K63, ubiquïtina RIP i també s'ubiquïtina a ell mateix. IKK $\gamma$ , que és un sensor de cadenes de poliubiquïtina (K63), reconeix RIP ubiquïtinat i s'hi uneix, induint el reclutament del complex IKK al complex I, independentment de TRAF2 (Ea et al., 2006; Zhang et al., 2000). De fet, el reclutament del complex IKK al TNFR1 en absència de RIP, segurament per TRAF2, no és suficient per activar les IKKs (Devin et al., 2001), demostrant que RIP juga un paper molt important en el reclutament del complex IKK al complex I, així com en la seva activació. Encara que el reclutament de les subunitats catalítiques d'IKK a aquest complex senyalitzador per si mateix podria explicar l'activació del complex IKK per mecanismes d'autofosforilació (Delhase et al., 1999), existeixen dues quinases més, MKK3 i TAK1, que estan implicades en aquest procés. La sobreexpressió d'aquestes quinases indueix l'activitat NF $\kappa$ B (Wang et al., 2001; Zhao and Lee, 1999).

MEKK3 es recluta al complex senyalitzador a través de la interacció amb la proteïna RIP i s'ha vist que la seva activitat catalítica participa en l'activació de les IKKs. No obstant no s'ha demostrat

que MEKK3 fosforili directament IKK $\alpha/\beta$ , així que no es pot considerar MEKK3 com una veritable IKK-K (Blonska et al., 2004).

TAK1 va ser identificada com una quinasa involucrada en la senyalització per TGF $\beta$ , però no es va trigar a descobrir que també s'activa en resposta a TNF $\alpha$  i a IL-1. S'ha proposat que TAK1 podria estar formant part dels complex actiu de les IKK (Wang et al., 2001). A diferència de MEKK3, TAK1 no activa NF $\kappa$ B per ella sola sinó que necessita la coexpressió de les proteïnes TAB. En resposta a TNF $\alpha$ , TAB2 i TAB3 promouen l'associació de TAK1 a TRAF2/5 ubiquitinats (Ishitani et al., 2003), la qual cosa la posiciona a prop del complex IKK on fosforila IKK $\beta$  directament en el seu *loop* d'activació.



**Fig 3. Esquema que representa l'activació de la via clàssica d'NF $\kappa$ B, mitjançant la formació del complex I en resposta a l'activació de TNFR1.**

### 1.5.3.1.1 NFκB protegeix de la mort cel·lular induïda per TNFα

El TNFα és un citoquina amb un efecte dual. Per una banda TNFα indueix la supervivència cel·lular mitjançant l'activació de la via de senyalització NFκB i per una altra, la senyalització per TNFα pot causar la mort cel·lular mitjançant l'activació de la via de JNK i de les caspases. La via de senyalització d'NFκB es defineix com una via de supervivència cel·lular ja que regula la transcripció de gens antiapoptòtics. En canvi, s'ha demostrat que una activació prolongada de la via de senyalització de JNK indueix l'apoptosi (Tang et al., 2001). L'efecte fisiològic final de la senyalització per TNFα és el resultat del balanç de l'activació d'aquestes dues vies.

L'activació d'NFκB indueix la producció de certs efectors que inhibeixen la via de JNK a diferents nivells, de manera que si l'activació d'NFκB, i per tant de les vies de supervivència, està inhibida, el TNFα es converteix en un potent inductor de l'apoptosis. Per exemple, NFκB indueix l'activació de gens que codifiquen per antioxidants com la superòxid dismutasa (SOD2) i la ferritina de cadena pesada (FHC) que eviten l'acumulació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), i bloquegen l'activació de la via de JNK. Altres efectors d'NFκB són les proteïnes XIAP, que a més de bloquejar l'efecte de moltes caspases impedeix l'activació de JNK a nivells de les MAPKKKs, i GADD45β, que inhibeix la senyalització per JNK bloquejant la quinasa MMK7. Un altre gen activat per NFκB, molt important en la regulació de la supervivència cel·lular és *c-flip*, que codifica per un pèptid mimètic de la caspasa 8, que bloqueja l'efecte apoptòtic del complex II del receptor del TNF. Aquest complex pro-apoptòtic inclou les proteïnes FADD (*Fas-associated death domain protein*), TRADD, RIP i TRAF2/5, i és el resultat de la dissociació de la membrana del complex I que es forma a nivell del TNFR en resposta a l'estímul de TNFα. La proteïna FADD recluta i activa la caspasa 8, però això no passa si els nivells de c-FLIP són elevats. Els defectes en l'activació d'NFκB prevenen la síntesi de c-FLIP, dels reguladors negatius de la via de JNK i possibilita l'acumulació de ROS. Per altre banda JNK és responsable de l'activació de la ubiquitin ligasa Itch, la qual indueix la degradació de c-FLIP, permetent l'activació de la caspasa 8. L'activitat caspasa sobre Bid indueix l'alliberament de citocrom C pel mitocondri i la mort cel·lular (Fig.4).

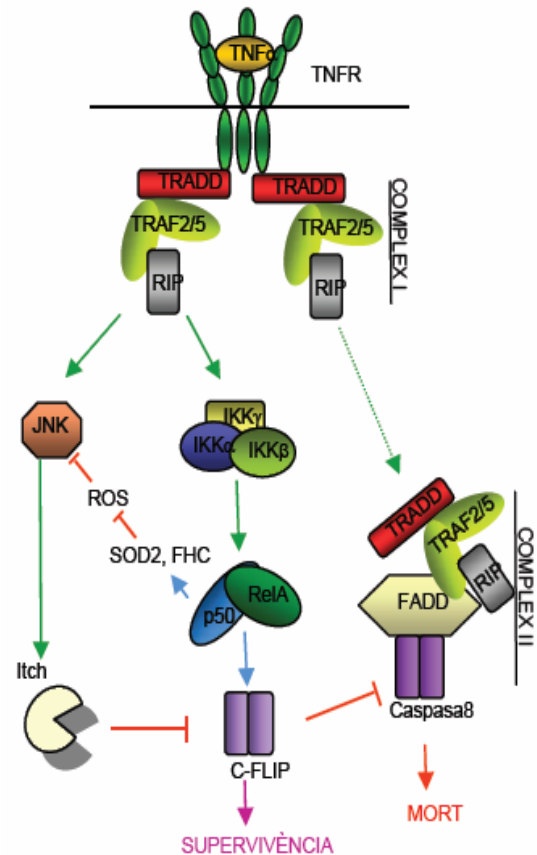


Fig 4. Esquema de la senyalització per TNFα

- ▶ Regulació a nivell transcripció
- ▶ Activació per interacció proteïna-proteïna
- ⊥ Inhibició per interacció proteïna-proteïna

### 1.5.3.1.2 La via alternativa d'NFκB: Activació del complex IKK per BAFF-R i CD40

La via alternativa d'NFκB s'activa en resposta a diferents membres de la família del TNFR. Aquest són: BAFF-R (*B-cell activating factor receptor*) i CD40, en cèl·lules B; RANK, en osteoclasts i LTβR, en cèl·lules limfoides. L'activació de la via alternativa, com ja s'ha explicat en a l'apartat 1.2.1.2, és basa en el processament induït de p100 i en la consegüent alliberació del factor de transcripció RelB-p52. La via alternativa es va descobrir al veure que cèl·lules B deficientes en IKKα no podien processar p100, indicant que en aquestes cèl·lules hi havia algun lligand fisiològic que induïa el processament de p100 dependent d'IKKα. Així es van identificar el receptor BAFF-R i el lligand BAFF.

Existeixen dues quinases implicades en l'activació de la via alternativa d'NFκB, aquestes són NIK i IKKα (Senftleben et al., 2001; Xiao et al., 2001), mentre que IKKβ i NEMO són dispensables en aquesta via (Dejardin et al., 2002). La sobreexpressió de NIK indueix el processament de p100 i l'activació transcripcional de gens diana de p52-RelB. No obstant l'efecte de NIK sobre l'activació d'NFκB no és directe sinó que actua a través de IKKα, que és la veritable quinasa de p100.

L'activació de la via alternativa ve precedida per la degradació de TRAF3 i l'estabilització de NIK (Liao et al., 2004). En estat basal, NIK forma part d'un complex amb TRAF2/3 i cIAP1/2, que indueix la seva degradació dependent d'ubiquitinació. Després de l'activació de CD40 o BAFFR, cIAP1 i cIAP2 s'activen per TRAF2 i indueixen la degradació dependent d'ubiquitinació (K48) de TRAF3 (Vallabhapurapu et al., 2008), d'aquesta manera NIK s'allibera del complex i s'acumula en el citoplasma cel·lular on activa als dímers d'IKKα. Aquests fosforilen p100 induint la seva degradació parcial a p52.

D'acord amb el paper de TRAF3 en l'activació de la via alternativa, la disminució de la proteïna TRAF3 en la cèl·lula causa el processament constitutiu de p100. (Liao et al., 2004; Vallabhapurapu et al., 2008) (Fig.5)

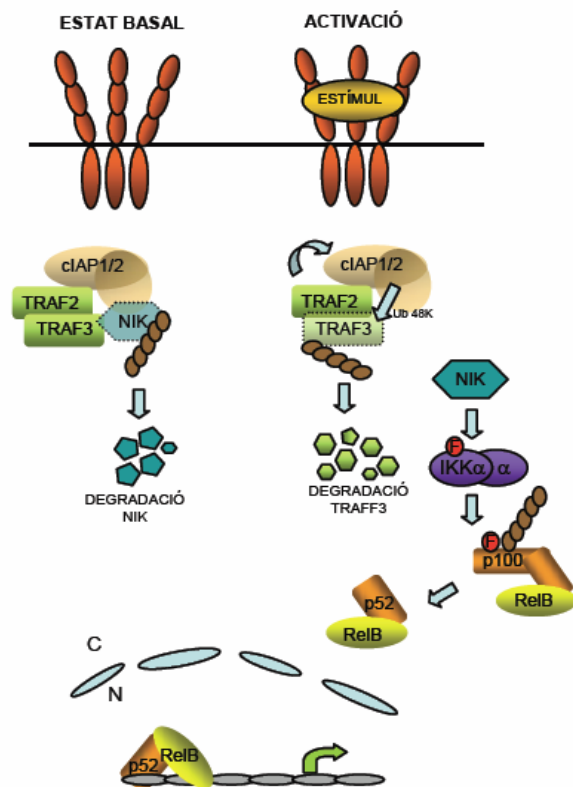


Fig 5. Esquema que representa l'activació de la via alternativa d'NFκB.

### 1.5.3.2 Activació del complex IKK a través de la família TLR i IL-1R

La senyalització per NF $\kappa$ B controla molts aspectes de la immunitat innata i adaptativa. NF $\kappa$ B regula la resposta immune innata mitjançant la senyalització induïda pels Toll-like receptors (TLR). Els TLRs reconeixen patrons microbians associats a patògens (PAMPs), entre els que s'inclouen els LPS, el dsRNA i el DNA no metilat, entre d'altres.

El domini intracel·lular dels TLRs és homòleg al domini intracel·lular dels receptors de les interleuquines (IL-1R), i per això se l'anomena domini TIR (*TLR and IL-1R homology domain*). De la mateixa manera que els TNFRs, els receptors amb domini TIR no tenen activitat catalítica, així que transduïxen la senyal mitjançant el reclutament i la dimerització de molècules adaptadores anomenades MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response 88*). Els dímers de MyD88 recluten les proteïnes IRAK (*IL-1R associated kinase*), específicament IRAK1 i IRAK4, les quals són necessàries pel reclutament de TRAF6 als dímers de MyD88, possiblement amb la col·laboració d'altres molècules. A nivell estructural i funcional TRAF6 és similar a altres membres de la família TRAF especialment a TRAF2 i TRAF5. En la senyalització per receptors TIR, la oligomerització de TRAF6 i possiblement la seva autoubiquitinació, induïx el reclutament de les proteïnes adaptadores TAB2 i TAB3 les quals estan unides a TAK1. En aquest complex proteic TAK1 s'activa i fosforila directament a IKK $\beta$  en el seu *loop* d'activació per activar el complex IKK (Adhikari et al., 2007) (Fig.6).

La senyalització per TLR/IL-1R dóna lloc a l'activació de diferents factors reguladors de la transcripció, incloent NF $\kappa$ B, AP-1 i IRFs (*Interferon Regulatory Factors*) (Yamamoto and Akira, 2005), tots ells implicats en la inducció de la resposta immune de l'hoste.

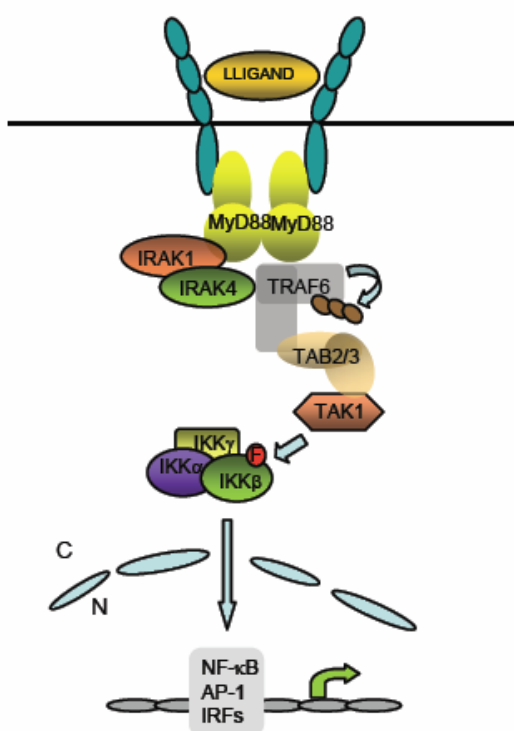


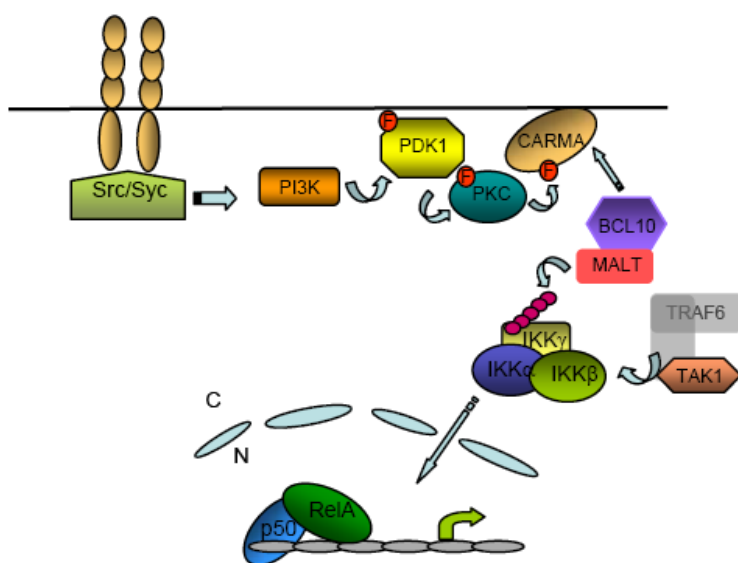
Fig 6. Activació de la via de transducció de la senyal d'NF $\kappa$ B en resposta a l'activació de receptors amb domini TIR.



### 1.5.3.3 Activació del complex IKK per receptors d'antigen

La senyalització induïda per receptors de cèl·lules T (TCR), i per receptors de cèl·lules B (BCR), és crítica en la resposta immune adaptativa. L'activació d'NFκB per BCR i TCR permet la proliferació dependent d'antigen i la maduració dels limfòcits en cèl·lules efectores. Des del punt de vista clínic, és molt important entendre com funcionen aquestes vies de senyalització, ja que això pot aportar noves dianes terapèutiques en el tractament de malalties autoimmunes, inflamatòries o en el rebuig de trasplants.

A diferència d'altres receptors, els TCRs i els BCRs, en resposta a la unió dels seus lligands s'associen directament a proteïnes quinases citoplasmàtiques activant així la transducció de la senyal. L'activació d'aquets receptors promou el reclutament i l'activació de tirosin quinases de les famílies de Src i Syk, que activen la fosfolipasa C, i la PI3K. La PI3K facilita el reclutament a la membrana i l'activació de la PDK1, que activa directament la PKC. La fosforilació de PKC indueix la fosforilació i el reclutament de CARMA a la membrana, la qual cosa possibilita el reclutament de BCL10 i MALT1 al complex de senyalització que s'està formant (Thome, 2004). El complex CARMA1-BCL10- MALT1 (CBM) activa el complex IKK (Lucas et al., 2001), a través de la ubiquitinació de NEMO mitjançant la unió de cadenes d'ubiquitina unides per la K63. S'ha proposat que l'activitat paracaspasa de MALT1 és essencial per aquesta ubiquitinació (Zhou et al., 2004). Un altre proteïna implicada en l'activació del complex IKK en resposta a l'activació de TCRs és TRAF6, que en resposta a l'estímul s'uneix al complex CBM, i ubiquitina a NEMO (Sun et al., 2004), facilitant així el reclutament i activació de TAK1 (Sato et al., 2005) (Fig.7). Recentment s'ha demostrat que BCL10 i MALT1 es poliubiquitinaven, mitjançant cadenes unides per la K63, i que això indueix el reclutament de NEMO i el complex IKK (Oeckinghaus et al., 2007; Wu and Ashwell, 2008).



**Fig 7.** Esquema que representa l'activació d'NFκB per receptors de cèl·lules B i T que s'activen en presència d'antígens.

#### **1.5.3.4 Activació del complex IKK per transautofosforilació.**

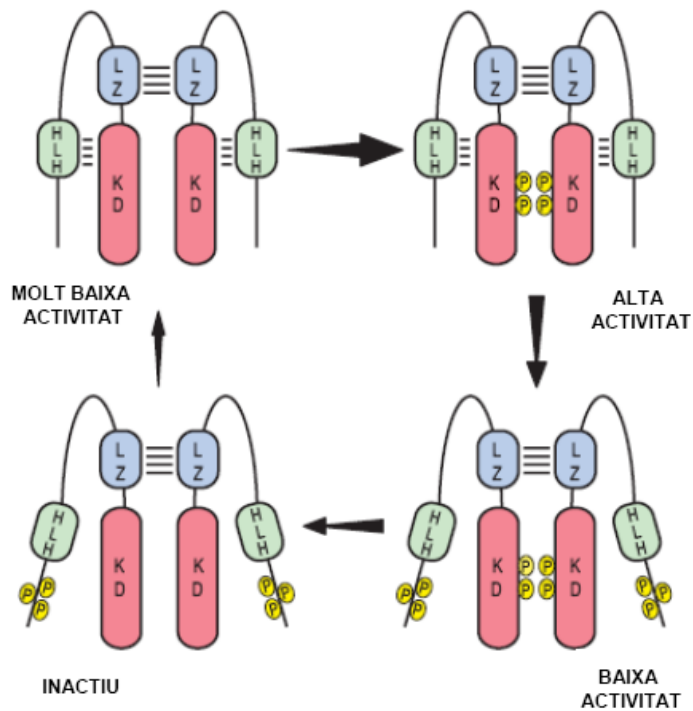
Part de la regulació de l'activitat IKK pot tenir lloc a través de mecanismes d'autofosforilació. Les subunitats catalítiques del complex IKK dimeritzen entre elles a través del seu domini LZ, alhora que el domini HLH interacciona amb el domini quinasa KD. Aquesta interacció es necessita per a l'activació del complex ja que mutacions en el domini HLH provoquen una disminució de l'activitat quinasa (Zandi et al., 1997). L'establiment d'aquestes interaccions, en resposta a un estímul activador, fa que les dos serines del *loop* d'activació es fosforilïn i així s'indueixi l'activació del complex quinasa (Fig.8).

#### **1.5.4 Mecanismes d'inactivació del complex IKK**

##### **1.5.4.1 Inactivació del complex IKK per mecanismes d'autofosforilació a C-terminal**

L'activació del complex IKK és un esdeveniment transitori, encara que no es coneixen exactament quins són els mecanismes d'inactivació. El caràcter transient de l'activitat IKK és molt important a nivell fisiològic, ja que com s'ha dit anteriorment, l'activació persistent d'NF $\kappa$ B té efectes perjudicials per a l'individu com són, la inflamació o la transformació tumoral.

La regulació negativa de l'activitat IKK en resposta a l'estímul de TNF $\alpha$ , es deu inicialment a mecanismes d'autofosforilació dels extrems C-terminal, com a resultat de la pròpia activitat quinasa d'IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  (Delhase et al., 1999). Això indueix un canvi conformacional en aquesta regió, que trenca la unió del HLH al KD, i disminueix l'activitat quinasa. La substitució de 10 d'aquests residus per alanines, allarga l'activació d'IKK $\beta$  en resposta a TNF $\alpha$  (Tegethoff et al., 2003). En el moment de l'activació no hi ha fosforilació en l'extrem C-terminal de la proteïna, una vegada les IKKs s'han activat, a més de fosforilar als seus substrats també s'autofosforilen en l'extrem C-terminal (Fig.8). En aquest estat les IKKs són més susceptible a l'acció de fosfatases que les defosforilen, en els residus d'activació, i les inactiven de forma definitiva. El tractament amb àcid okadaic, que és un inhibidor de l'activitat fosfatasa, indueix l'activació del complex IKK (DiDonato et al., 1997).



**Fig 8. Model de la regulació de l'activitat quinasa per mecanismes d'autofosforilació.** En l'esquema es mostren les subunitats catalítiques del complex IKK i els seus principals motius estructurals i funcionals. **LZ**: *leucine zipper*, **HLH**: *helix-loop-helix*, **CC**: *coiled coil*, **ZF**: *zing finger*, **NBD**: *NEMO-binding protein*. Les dos subunitats catalítiques (IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ ) dimeritzen a través del LZ. El domini C-terminal i el HLH interaccionen amb el KD. La fosforilació de les dos serines del *loop* d'activació dona lloc a l'activació del complex IKK. Un cop activades, les IKKs a més de fosforilar als seus substrats, com per exemple les proteïnes I $\kappa$ Bs, també s'autofosforien a l'extrem C-terminal. Quan les serines de C-terminal es fosforilen, la interacció entre l'extrem C-terminal (HLH) de la proteïna, que funciona com un activador intrínsec de la quinasa, es separa del KD i això indueix la disminució de l'activitat quinasa del complex. En aquest estat les IKKs són més susceptibles per l'acció d'una fosfatasa ( Adaptat de Karin and Ben-Neriah, 2000).

#### 1.5.4.2 Inactivació del complex IKK per mecanismes de ubiquïtinació (K48) i deubiquïtinació (K63)

La ubiquïtinació mitjançant la unió de cadenes de ubiquïtina unides per la K63 a diferents proteïnes de la via d'NF $\kappa$ B, és un mecanisme clau en l'activació del complex IKK. Pel contrari, la deubiquïtinació d'aquestes proteïnes permet tornar al complex IKK al seu estat basal d'activació.

CYLD i A20 són dos dels enzims deubiquïtinadors (DUB) més importants en la regulació negativa de l'activitat IKK. Mutacions en CYLD s'associen al desenvolupament de tumors a la pell en humans. Aquestes mutacions es localitzen a la regió C-terminal de la proteïna, específicament al domini UCH (*ubiquitin-carboxy-terminal-hydrolase*). Aquest domini, hidrolitza les cadenes d'ubiquïtina d'algunes proteïnes com TRAF2, TRAF6 i NEMO, i així inhibeix l'activitat NF $\kappa$ B. La pèrdua de funció de CYLD indueix una activació persistent d'IKK i NF $\kappa$ B en les cèl·lules tumorals (Brummelkamp et al., 2003; Kovalenko et al., 2003; Trompouki et al., 2003). Tres laboratoris independent han generat ratolins deficientes per CYLD, els fenotips dels quals no són idèntics (Massoumi et al., 2006; Reiley et al., 2006; Zhang et al., 2006). Els ratolins generats al laboratori del Dr. R.Massoumi, són propensos a desenvolupar càncer de pell en resposta a carcinògens químics, degut en part, a l'increment en la ubiquïtinació de BCL-3. La ubiquïtinació de BCL-3 indueix la seva acumulació nuclear, la unió a dímers d'NF $\kappa$ B que contenen p50 o p52 i l'activació dels seus gens diana, entre els qual s'inclou la *ciclina D1*. Els ratolins deficientes en CYLD del laboratori del Dr. J.Zhang, són més susceptibles a patir inflamació crònica, i a generar càncers de còlon associats a colitis. Les cèl·lules derivades d'aquests ratolins presenten un increment en la ubiquïtinació de TRAF2 i NEMO, així com un increment en la l'activitat IKK i JNK en resposta a TNF $\alpha$ . Finalment, els ratolins generats al laboratori del Dr. W.Reiley, mostren un defecte en el desenvolupament de cèl·lules T, associat a un increment en la poliubiquïtinació i degradació de LCK, una tirosina quinasa imprescindible en l'activació de cèl·lules T. Les diferències fenotípiques observades en aquesta, i altres soques de ratolins, generades per diferents laboratoris, revelen les limitacions dels estudis amb models animals, ja que demostren que es pot arribar a conclusions diferents, en funció de l'estratègia utilitzada per generar la variant genètica i el *background* de la soca utilitzada.

La proteïna A20 també és un potent inhibidor de l'activitat IKK, a més de ser un gen diana d'NF $\kappa$ B (Jono et al., 2004; Krikos et al., 1992), de manera que la seva activació transcripcional proporciona un bucle de retroalimentació negativa per NF $\kappa$ B. Els ratolins deficientes per A20, moren degut a la inflamació de diferents òrgans, com a resultat de l'activació sostinguda d'IKK i NF $\kappa$ B. A20 conté un domini tipus OTU (*ovarian tumour type*) en el seu extrem N-terminal, i una regió de set domini tipus *zing-finger* al seu extrem C-terminal. El domini OTU de A20 s'encarrega d'hidrolitzar les cadenes de ubiquïtines unides per la K63, entre els substrats d'A20 s'inclouen proteïnes tant importants com TRAF6 i RIP1 (Boone et al., 2004; Wertz et al., 2004). Una vegada retirada la cadena d'ubiquïtina (K63) "activadora", el domini *zing-finger* catalitza la unió de cadenes de ubiquïtines unides per la K48 (Wertz et al., 2004), la qual cosa indueix la degradació pel proteosoma de la proteïna marcada. Així doncs A20 bloqueja l'activitat IKK mitjançant dos

mecanismes, primer eliminant cadenes de ubiquïtines unides per la K63 de TRAF6 i RIP i després induint la seva degradació pel proteosoma.

No obstant, CYLD i A20 no son dues proteïnes redundants, com ho demostra el fet que la manca d'una d'elles no es complementada per l'altre. Una de les possibles explicacions és que en resposta a l'activació d' $\text{NF}\kappa\text{B}$ , el complex IKK fosforila a CYLD, inhibint la seva activitat DUB. Així doncs CYLD és una DUB que funciona en condicions basals per a prevenir la l'activació espontània d' $\text{NF}\kappa\text{B}$ . En canvi, A20 s'activa en resposta a  $\text{NF}\kappa\text{B}$  tant a nivell transcripcional, al ser un gen diana d' $\text{NF}\kappa\text{B}$ , com a través de la seva fosforilació (comunicat per S C. Sun,  $\text{NF}\kappa\text{B}$  Keystone Symposia, Canada 2008).

clAP1/2 , també són proteïnes regulades a nivell transcripcional per  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , que catalitzen la unió de cadenes de poliubiquïtina unides per la K48 de proteïnes com TRAF2 i TRAF3 induint així la seva degradació i la inhibició de l'activitat IKK i  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (Li et al., 2002; Vallabhapurapu et al., 2008). En el cas de l'activació d' $\text{NF}\kappa\text{B}$  per TCR, s'ha descrit que Itch promou la ubiquïtinació i degradació de  $\text{PLC}\gamma 1$ (PLC1) i de PKC $\theta$ . Ambdues quinases són necessàries per a l'activació d' $\text{NF}\kappa\text{B}$  en les cèl·lules T, així que la seva degradació implica l'apagament de la senyal.

### **1.5.5 Funcions biològiques de les proteïnes IKK**

Tal i com hem vist amb les proteïnes Rel i I $\kappa$ B, la generació d'animals deficients per a les diferents quinases d'I $\kappa$ B ha proporcionat molta informació sobre les seves funcions.

El ratolí *knockout* per a IKK $\beta$  (IKK $\beta^{-/-}$ ), és letal embrionari a dia 14.5 de gestació. Aquets ratolins tenen un fenotip molt similar al dels animals p65 $^{-/-}$ , caracteritzat per una apoptosi massiva dels hepatòcits que causa una greu afectació del fetge incompatible amb la vida. La letalitat dels ratolins IKK $\beta^{-/-}$ , igual que la dels p65 $^{-/-}$ , es rescata creuant-los amb animals deficients pel receptor del TNF $\alpha$ , demostrant que la via clàssica d'NF $\kappa$ B és crucial per a protegir el fetge embrionari de la mort induïda per TNF $\alpha$  (Li et al., 1999; Li et al., 1999; Tanaka et al., 1999) (Veure Fig.4). En general, la mort de qualsevol mutant en estadi embrionari impedeix estudiar la funció de la proteïna d'interès en l'organisme adult o en teixits concrets. Això ha forçat als investigadors a treballar amb *knockouts* condicionals. D'aquesta manera s'ha descobert que la IKK $\beta$ , regula l'apoptosis, depenent d'estímul, en diferents teixits. Per exemple, IKK $\beta$  protegeix de l'apoptosi induïda per l'activació dels TLRs en macròfags (Park et al., 2005), osteoclasts (Ruocco et al., 2005) i en l'epiteli de l'intestí (Chen et al., 2003), mentre que és necessària en la mort neuronal induïda per isquemia (Herrmann et al., 2005). La IKK $\beta$  també juga un paper molt important regulant la resposta inflamatòria, a través de la producció d'algunes citoquines per part dels macròfags, així com de mediadors inflamatoris per part de les cèl·lules mieloides (Egberts et al., 2008). La deleció condicional d'IKK $\beta$  en cèl·lules limfoides confirma la importància d'NF $\kappa$ B en el la maduració de cèl·lules B i cèl·lules T (Pasparakis et al., 2002; Schmidt-Suppran et al., 2004).

Els animals deficients en IKK $\gamma$  (IKK $\gamma^{-/-}$ ), igual que els IKK $\beta^{-/-}$ , moren en estat embrionari, degut a una apoptosi massiva al fetge induïda per TNF $\alpha$ . No obstant, els animals IKK $\gamma^{-/-}$ , moren 12h abans que els IKK $\beta^{-/-}$ . En fibroblasts derivats de ratolins IKK $\gamma^{-/-}$ , la fosforilació d'I $\kappa$ B $\alpha$  i la unió d'NF $\kappa$ B al DNA, en resposta a citoquines, està completament inhibida, a diferencia dels fibroblasts IKK $\beta^{-/-}$ , en els que només es troben disminuïdes (Rudolph et al., 2000).

En humans, el gen que codifica per NEMO es troba al cromosoma X. S'han descrit diferents mutacions en heterozigosi d'aquest gen associades a dues malalties: la *Incontinentia Pigmenti* (IP) i les immunodeficiències associades o no a la *anhidrotic ectormal displasia* (ID o EDA). El fenotip dels pacients amb IP, es caracteritza per defectes a la pell que sovint van acompanyats de problemes oftalmològics, odontològics i neurològics. En la majoria dels casos la IP es causada per reordenaments anòmals del locus de la IKK $\gamma$ , que generen un proteïna més petita que la normal. Els fibroblasts derivats de pacients amb IP no presenten activitat NF $\kappa$ B, degut a la impossibilitat de degradar I $\kappa$ B, i són sensibles a l'apoptosis induïda per TNF $\alpha$  (Smahi et al., 2000). En els pacients amb IP, s'ha observat una selecció negativa de les cèl·lules que expressen la còpia mutada en vers les que expressen la còpia salvatge. Aquesta podria ser l'explicació de que aquests pacients no mostren els defectes immunològics i el dany al fetge que s'observa als ratolins. Malauradament aquesta selecció negativa no és tant eficient a la pell, de manera que els pacients presenten un mosaic de cèl·lules que expressen la còpia mutada i cèl·lules que expressen la còpia salvatge. Els

models animals per a la IP demostren que les cèl·lules amb la còpia salvatge produeixen citokines pro-inflamatòries que indueixen la secreció de TNF $\alpha$  soluble que indueix l'apoptosi de les cèl·lules que expressen la IKK $\gamma$  mutada.

Els pacients amb EDAD-ID mostren una elevada sensibilitat a infeccions i un desenvolupament anormal de la pell. Les mutacions del gen de la IKK $\gamma$  associades a aquesta malaltia són mutacions al marc de lectura (*frameshift mutations*), així com delecions que afecten al domini *zing finger* de la proteïna. Aquestes mutacions redueixen, però no inhibeixen l'activació NF $\kappa$ B, essent això suficient per explicar els defectes immunològics que se l'hi associen (Doffinger et al., 2001).

El fenotip dels animals deficientes per la IKK $\alpha$  (IKK $\alpha^{-/-}$ ) és completament diferent a l'observat en els *knockouts* dels altres dos membres del complex. Els ratolins IKK $\alpha^{-/-}$  moren a les poques hores d'haver nascut, degut a defectes en la formació de les extremitats, de l'esquelet, i del crani, també presenten defectes en el desenvolupament dels òrgans limfoides, i en la diferenciació dels queratinòcits. Malgrat que en fibroblasts embrionaris dels ratolins IKK $\alpha^{-/-}$ , la fosforilació i degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$  no està afectada, existeixen resultats contradictoris sobre la capacitat d'aquestes cèl·lules per a activar la transcripció gènica depenent d'NF $\kappa$ B (Hu et al., 1999; Li et al., 1999; Takeda et al., 1999)

La IKK $\alpha$  té funcions dependents i independents de la seva activitat quinasa. L'activitat quinasa de la IKK $\alpha$  es necessita per la formació dels òrgans limfoides i el desenvolupament de les glàndules mamàries (Cao et al., 2001; Senftleben et al., 2001). En canvi, no és necessària per a la diferenciació dels queratinòcits, ja que la reconstitució de ratolins IKK $\alpha^{-/-}$  amb una forma no activa de la proteïna IKK $\alpha$  (IKK $\alpha_{AA}$ ) rescata el fenotip aberrant de la pell. La IKK $\alpha$  regula la diferenciació dels queratinòcits mitjançant diferents mecanismes, per una banda permet l'expressió de 14-3-3 sigma, un regulador negatiu del cicle cel·lular, i per una altra coopera amb Smad2/3 en l'activació transcripcional de Mad1 i Ovol1, que regulen negativament l'expressió de c-myc, un inhibidor de la diferenciació terminal dels queratinòcits (Descargues et al., 2008) (Veure apartat 1.6.1.2). Per altre banda, experiments de transplantament ectòpic, van demostrar que la dermis dels animals salvatges rescata parcialment el fenotip epidèrmic dels IKK $\alpha^{-/-}$ , suggerint l'existència d'algun factor soluble, regulat per IKK $\alpha$ , que controla la diferenciació dels queratinòcits (Hu et al., 2001).

### **1.5.6 Altres proteïnes IKK**

S'han identificat dues proteïnes *IKK-like*, la  $IKK\epsilon$  també anomenada IKK-i, i la TBK1 també anomenada NAK o T2K. Aquestes proteïnes IKK presenten una seqüència i una estructura molt similar a  $IKK\alpha$  i  $IKK\beta$ , encara que el seu patró d'expressió és més restringit. Malgrat la similitud estructural amb  $IKK\alpha$  i  $IKK\beta$ ,  $IKK\epsilon$  i TBK1 no formen part del complex IKK. Tot i això, la sobreexpressió de  $IKK\epsilon$  i TBK1 en HEK-293T activa  $NF\kappa B$ , a través de la fosforilació i degradació d' $I\kappa B\alpha$ . L'activació d' $NF\kappa B$  induïda per TBK1 en cèl·lules deficientes per  $IKK\beta$  està però reduïda, suggerint que TBK1 pot ser una quinasa *upstream* d' $IKK\beta$  (Tojima et al., 2000). També s'ha proposat que TBK1 indueix l'activació transcripcional d' $NF\kappa B$  a través de la fosforilació de RelA (Fujita et al., 2003). El fenotip de ratolins deficientes per TBK1 és molt similar al d'altres membres de la via d' $NF\kappa B$  com NEMO,  $IKK\beta$  i RelA. Els ratolins  $TBK1^{-/-}$  moren a dia 14.5 de gestació degut a una apoptosi massiva del fetge. A més, el fenotip letal d'aquest animals es rescata creuant-los amb ratolins  $TNFR^{-/-}$ . Aquestes observacions donen suport a la idea de que TBK1 està involucrat en l'activació d' $NF\kappa B$  a través de la senyalització per  $TNFR1$ , i que TBK1 es necessita en l'activació d' $NF\kappa B$  que protegeix de l'apoptosi induïda per  $TNF\alpha$  (Bonnard et al., 2000). No obstant, en treballs posteriors, utilitzant, MEFs *knockouts* simples i dobles de TBK1 i  $IKK\epsilon$ , no s'han confirmat els defectes en la transcripció dependent d' $NF\kappa B$  (Hemmi et al., 2004; McWhirter et al., 2004). Per tant el paper de TBK1 i  $IKK\epsilon$  en l'activació d'  $NF\kappa B$  encara no està ben definit.



## **1.6 Funcions nuclears de les subunitats del complex IKK**

Fins no fa gaires anys les funcions descrites per a les proteïnes IKK quedaven restringides al citoplasma cel·lular i consistien bàsicament en induir l'activació transcripcional dependent d'NFκB. En els últims anys diferents investigadors han demostrat que les subunitats del complex IKK poden entrar al nucli i regular, a diferents nivells, l'expressió gènica tant dependent com independent d'NFκB. En aquesta secció es resumeixen alguns dels resultats.

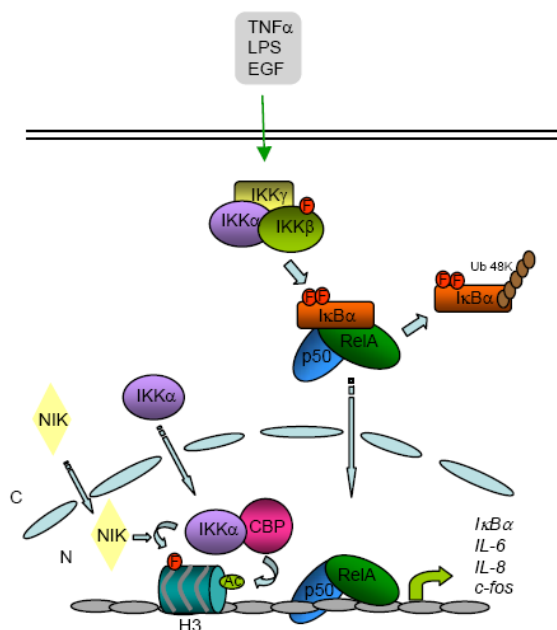
### **1.6.1 Funcions Nuclears d'IKKα**

La IKKα és la subunitat del complex IKK més estudiada pel que fa a les seves funcions nuclears. Aquesta quinasa funciona, a diferents nivells, regulant la transcripció de gens tant dependents com independents d' NFκB.

#### **1.6.1.1 Funcions Nuclears d'IKKα sobre l'expressió de gens dependents d'NFκB**

S'ha demostrat que la funció nuclear d'IKKα participa en diferents etapes de la transcripció dependent d'NFκB.

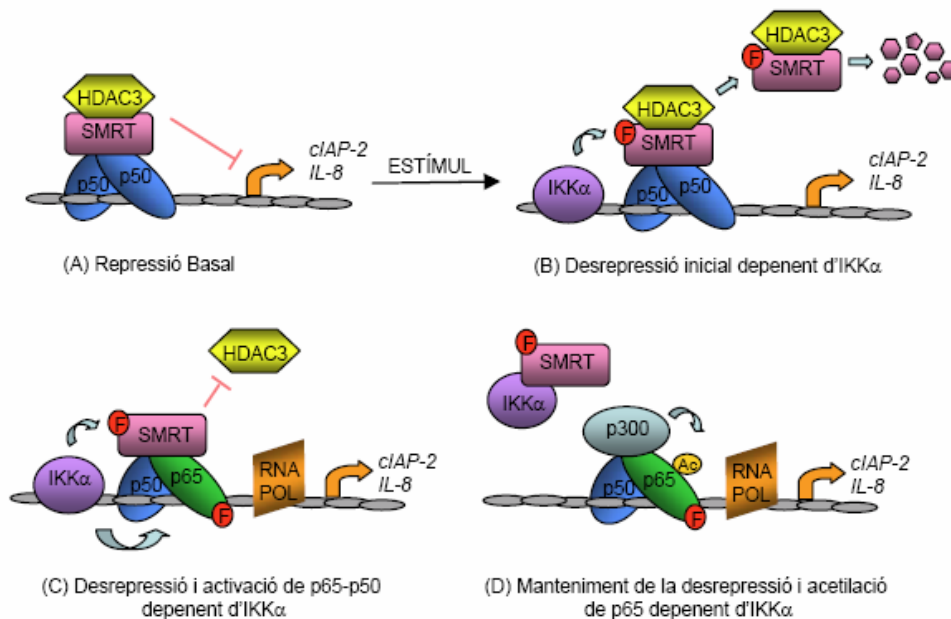
En fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) estimulats amb TNFα, Anest et al. i Yamamoto et al., van demostrar per primera vegada que la IKKα es recluta, juntament amb p65 i CBP, a promotors de gens diana d'NFκB (específicament a *ikba*, *il-6* i *il-8*), on fosforila la serina 10 de la H3, possibilitant la subseqüent acetilació de la lisina 14 de la H3, per acció de CBP. Aquestes modificacions permeten l'accessibilitat de la maquinària de transcripció als promotors d'aquests gens i la seva activació (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003) (Fig.9). Aquest mateix mecanisme es dona en macròfags tractats amb LPS, on la IKKα es recluta a múltiples promotors de gens pro-inflamatoris dependents d'NFκB. S'ha proposat que la quinasa NIK podria ser responsable de l'activació de IKKα en aquest sistema. A favor d'aquesta hipòtesi, s'ha demostrat que NIK, es transloca a nucli en resposta a LPS i augmenta la fosforilació de la serina 10 de la H3 per IKKα (Park et al., 2006).



**Fig 9. Esquema on es representa la funció quinasa de la IKKα sobre la H3, en resposta a TNFα i LPS**  
( Adaptat de Gloire et al., 2006).

El reclutament d'IKK $\alpha$  a la cromatina per fosforilar la serina 10 de la H3, s'ha descrit també en gens independents d'NF $\kappa$ B, com *c-fos*, en resposta a EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Anest et al., 2004).

En un model de cèl·lules de càncer de pròstata s'ha demostrat que, en resposta a la unió a lamínia, la IKK $\alpha$  fosforila el repressor transcripcional SMRT, i indueix l'activació transcripcional dels gens *ciap-2* i *il-8* (Hoberg et al., 2004). En cèl·lules no estimulades, els llocs d'unió d'NF $\kappa$ B dels promotors d'aquests gens estan ocupats per homodímers transcripcionalment inactius, formats per p50 o p52, units a complexos repressors. La fosforilació de la serina 2410 d'SMRT per IKK $\alpha$  indueix l'export nuclear d'aquest repressor, junt amb HDAC3, mitjançant les proteïnes adaptadores 14-3-3. L'export d'SMRT i la seva degradació pel proteosoma, permet substituir els dímers p50 o p52 per dímers p50-p65 transcripcionalment actius. En una segona fase d'aquest procés, la IKK $\alpha$  fosforila la serina 536 de la p65 unida a la cromatina, implicant el reclutament de la HDAC3 i facilitant l'acetilació de la lisina 310 de p65 per acció de CBP/P300, requisit imprescindible per a la completa activació de la transcripció dependent d'NF $\kappa$ B (Hoberg et al., 2006) (Veure model a la Fig.10).



**Fig 10. Esquema de la desrepressió dels gens *ciap2* i *il-8* per acció de la IKK $\alpha$ .** Es representen els diferents passos del procés proposat en els treballs del laboratori d'eIDr. MW. Mayo (Adaptat de Gloire et al., 2006)

D'una forma que podria semblar oposada a la que s'acaba d'explicar, la IKK $\alpha$  està implicada en l'atenuació de la resposta inflamatòria dels macròfags induïda per la infecció de bacteris Gram-negatives (Lawrence et al., 2005). La IKK $\alpha$  realitza aquesta funció mitjançant la fosforilació de la serina 536 de la p65, fet que indueix la degradació de p65 pel proteosoma. La degradació de p65 limita la durada de la resposta inflamatòria i indueix la terminació de la senyal. D'acord amb això, els macròfags de ratolins IKK $\alpha^{AA/AA}$  presenten un augment en la producció de diferents citoquines i quimioquines, així com un increment en l'expressió de gens antiapoptòtics després de l'estimulació amb bacteris.

Recentment s'ha publicat que la IKK $\alpha$  és capaç de fosforilar CBP, en resposta a TNF $\alpha$ . Aquesta fosforilació afavoreix la unió de p65 a CBP en detriment a la unió de CBP a p53, i causa un increment de la proliferació cel·lular (Huang et al., 2007). Aquest mecanisme podria estar regulant molts altres factors que necessiten unir-se a CBP per activar la transcripció.

En resum aquets resultats indiquen que l'activitat quinasa d'IKK $\alpha$  és clau pel que fa al paper d'aquesta proteïna en la regulació transcripcional depenent d'NF $\kappa$ B. La pregunta que es planteja, doncs, és per què moltes de les deficiències dels ratolins IKK $\alpha^{-/-}$  es rescaten per la forma d'IKK $\alpha$  que no té activitat quinasa?.

### **1.6.1.2 Funcions Nuclears d'IKK $\alpha$ sobre l'expressió de gens independents d'NF $\kappa$ B**

A més de la seva funció com a proteïna reguladora de la senyalització d'NF $\kappa$ B, la IKK $\alpha$  participa també en la regulació transcripcional independent d'NF $\kappa$ B.

Diferents treballs publicats pel grup del Dr. RB.Gaynor demostren que la IKK $\alpha$  és important en la regulació de la progressió del cicle cel·lular. Per exemple, en cèl·lules de càncer de mama tractades amb estrogen, s'indueix la formació d'un complex transcripcionalment actiu format per IKK $\alpha$ , el receptor d'estrogen (ER $\alpha$ ) i el coactivador AIB1/SRC-3. Aquest complex activa l'expressió de gens independents d'NF $\kappa$ B, com *cyclinD1* i *c-myc*, la qual cosa es tradueix en un increment de la proliferació (Park et al., 2005). En aquest sistema, la IKK $\alpha$  és imprescindible tant per la formació del complex com per l'activació d'aquests gens. Així mateix, en resposta a estrògens la IKK $\alpha$  s'associa al factor E2F1, afavorint la seva interacció amb CBP/p300, i l'activació transcripcional dels seus gens diana, sent aquest un altre mecanisme de regulació de la proliferació (Tu et al., 2006). Un altre paper important de la IKK $\alpha$  és com a regulador de la fase M del cicle cel·lular. S'ha demostrat que IKK $\alpha$  s'associa i fosforila la treonina 288 d'Aurora A per activar-la (Prajapati et al., 2006). Aurora A és una quinasa molt important durant la divisió cel·lular ja que es necessita per a la maduració dels centrosomes, la formació del fus mitòtic i la correcta segregació dels cromosomes entre les dues cèl·lules filles (Meraldi et al., 2004). Així doncs, l'activació d'Aurora A per IKK $\alpha$  indueix la progressió del cicle cel·lular. D'altra banda, la pròpia activitat IKK $\alpha$  està regulada durant el cicle cel·lular per interacció amb les quinases Akt i Chk1. Mentre que Akt indueix l'activitat IKK $\alpha$ , Chk1 la inhibeix (Barre and Perkins, 2007).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la proteïna IKK $\alpha$  és necessària pel correcte desenvolupament de la pell del ratolí (veure apartat 1.5.5). Els ratolins deficients en aquesta proteïna mostren una marcada hiperplàsia de l'epidermis i defectes en la diferenciació dels queratinòcits. En els últims anys, diferents grups han demostrat la importància del paper de la IKK $\alpha$  en el manteniment de la homeòstasi de la pell i en la prevenció del desenvolupament de tumors en aquest òrgan. En carcinomes escamosos de pell humans s'ha vist una correlació positiva entre la disminució dels nivells d'IKK $\alpha$  i carcinomes de pell molt indiferenciats, i s'han identificat mutacions en el gen de la IKK $\alpha$  que afecten als seus dominis funcionals (Liu et al., 2006; Liu et al., 2008; Marinari et al., 2008). Inicialment, treballs del laboratori del Dr. M.Karin van demostrar que la funció que la IKK $\alpha$  realitza sobre la diferenciació dels queratinòcits és a nivell nuclear i independent de la seva activitat quinasa (Sil et al., 2004). En aquests treballs demostren que l'expressió d'un mutant inactiu de l'activitat quinasa (IKK $\alpha_{AA}$ ) en els queratinòcits és suficient per rescatar els defectes morfogènics dels animals IKK $\alpha^{-/-}$ . A més van identificar una seqüència de localització nuclear (NLS) al domini quinasa de la IKK $\alpha$ , i van demostrar que les cèl·lules deficients en IKK $\alpha$  reconstituïdes amb un mutant d'aquest domini, que no pot translocar-se a nucli, no podien diferenciar-se a queratinòcits. Aquests resultats indiquen que la funció d'IKK $\alpha$  en la diferenciació dels queratinòcits basals de l'epidermis és nuclear i independent de la seva activitat quinasa.

En treballs posteriors, utilitzant diferents models animals i mostres de pacients amb SCC, s'han identificat diferents mecanismes pels qual la IKK $\alpha$  realitza la seva funció reguladora a la pell. En primer lloc, s'ha demostrat que la sobreexpressió d'IKK $\alpha$  en la capa suprabasal de l'epidermis indueix la diferenciació dels queratinòcits i inhibeix l'activitat mitogènica i angiogènica causada pel tractament amb els carcinògens (DMBA/TPA) (Liu et al., 2006). En resposta a l'activació per TGF $\beta$ , aquesta funció antimitogènica de la IKK $\alpha$  està relacionada amb la inducció transcripcional de *Mad1*, i *Ovol1*, gens que codifiquen per reguladors negatius de c-Myc, essent aquest un inductor de la proliferació i un inhibidor de la diferenciació terminal dels queratinòcits. La IKK $\alpha$  realitza aquesta funció unint-se directament als promotor de *Mad1* i *Ovol1* juntament amb Smad2/3. Així doncs es proposa que l'activitat antiproliferativa i de supressor tumoral de la IKK $\alpha$  a la pell es dona per l'activació de gens antagonistes de *Myc* (Descargues et al., 2008; Marinari et al., 2008).

D'altre banda la IKK $\alpha$  regula l'expressió transcripcional de 14-3-3 $\sigma$ , una proteïna reguladora del cicle cel·lular, que impedeix el pas de G2 a M, en resposta a dany al DNA. En queratinòcits murins la IKK $\alpha$  s'uneix directament a la H3, al locus de la 14-3-3 $\sigma$ , impeding el reclutament de la histona metil transferasa (Suv39h1) i prevenint la trimetilació de la H3 a la lisina 9. Aquesta modificació és un prerequisit per l'establiment de patrons de metilació del DNA, per la Dnmt3a, que s'associen a la repressió transcripcional (Fischle et al., 2003). En absència d'IKK $\alpha$ , la Suv39h1 i la Dnmt3a és recluten de forma aberrant al locus de la 14-3-3 $\sigma$ , induint el seu silenciament, i la progressió del cicle cel·lular. Mutants de la IKK $\alpha$  clonats de SCCs humans (Liu et al., 2006) o construccions, que mimetitzen aquestes mutacions, a les que li manquen els dominis LZ i HLH de la IKK $\alpha$ , no poden unir-se a la H3, ni impedir el reclutament de la Suv39h1 i la Dnmt3a al locus de la 14-3-3 $\sigma$ , mentre que mutants del domini quinasa són funcionalment comparables a proteïna salvatge (Zhu et al., 2007).

Un altre mecanisme pel qual la IKK $\alpha$  realitza una funció antiproliferativa a la pell, és reclutant-se a promotors de gens que codifiquen per lligands d'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) i inhibint la seva activació transcripcional, mitjançant un mecanisme encara no descrit. Els lligands d'EGFR indueixen l'activació de vies de senyalització mitogèniques, com la de Ras i les ERKs, les quals són molt importants induint la proliferació i inhibint la diferenciació dels queratinòcits. Mutants de la IKK $\alpha$  clonats de SCCs humans (Liu et al., 2006) o construccions de la IKK $\alpha$  que li manquen els dominis LZ i HLH fracassen en la repressió d'aquests gens mentre que els mutants enzimàticament inactius es comporten com la proteïna salvatge (Liu et al., 2008).

En resum, existeixen dades molt consistents de que la IKK $\alpha$  a la pell, a diferència d'altres òrgans, realitza un funció antitumorigènica, independent de la seva activitat quinasa, regulant la proliferació i diferenciació dels queratinòcits.

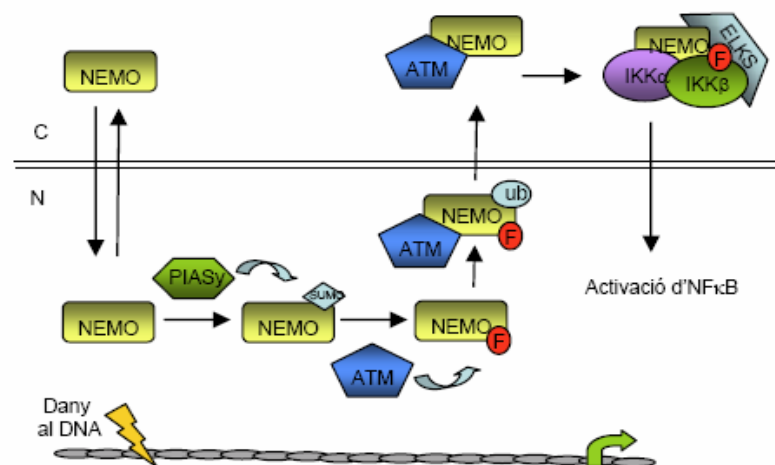
Els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren que al càncer colorectal la IKK $\alpha$  fosforila els repressors transcripcionals N-CoR i SMRT induint el seu export a citoplasma i l'activació transcripcional de gens de la família de Notch (Fernandez-Majada et al., 2007; Fernandez-Majada et al., 2007b) (Veure capítol 3).

Finalment, la IKK $\alpha$  també té una funció nuclear regulant el procés metastàtic en càncer de pròstata. En aquestes cèl·lules tumorals la IKK $\alpha$  es transloca al nucli on reprimeix l'expressió del gen *Maspin*, que és un regulador clau de la metastàsis en diferents tipus de càncer. El mecanisme pel qual la IKK $\alpha$  realitza aquesta funció repressora no està clar, encara que s'han proposat mecanismes epigenètics com a responsables d'aquest silenciament. S'ha demostrat que l'activació de la IKK $\alpha$  correlaciona amb l'expressió del lligand de RANK per part de les cèl·lules T que infiltren el tumor, i està relacionada amb la progressió de l'estadi del carcinoma (Luo et al., 2007). En aquest sistema, la funció de la IKK $\alpha$  és clarament diferent de la que té als queratinòcits, ja que per una banda, funciona com a repressor transcripcional i per l'altre, és dependent de la seva activitat quinasa, ja que els mutants inactius no poden modular l'expressió de *Maspin*.

### **1.6.2 Funcions Nuclears de NEMO/IKK $\gamma$**

Una gran part de la proteïna NEMO que conté la cèl·lula es troba formant part del complex IKK, i és un element clau en la regulació d'NF $\kappa$ B. Existeix una fracció lliure que viatja contínuament entre el citoplasma i el nucli. Aquesta fracció de NEMO és la responsable de sensar el dany al DNA i transmetre senyals activadors de la via d'NF $\kappa$ B, del nucli al citoplasma, per tal d'activar la transcripció de gens de supervivència (Hay, 2004; Huang et al., 2003).

En resposta a dany al DNA, NEMO és sumoïlat a les lisines 277 i 309, aquesta modificació facilita la seva retenció al nucli. Al nucli, la quinasa ATM, que s'activa en resposta a estrès genotògic, fosforila la serina 85 de NEMO. Aquesta fosforilació indueix l'intercanvi de la proteïna SUMO per una ubiquitina, la qual cosa indueix l'export nuclear de NEMO juntament amb ATM. Un cop a citoplasma, el complex NEMO/ATM, probablement a través de les proteïnes ELKS, activen el complex IKK (Wu et al., 2006). L'enzim responsable de sumoïlar NEMO, en resposta a estrès genotòxic, és PIASy (Mabb et al., 2006) (Veure model a la Fig.11).



**Fig 11. Esquema del procés d'activació del complex IKK dependent de NEMO en resposta a dany al DNA** (Adaptat de Gloire et al., 2006).

### **1.6.3 Funcions Nuclears d'IKK $\beta$**

En general IKK $\beta$  es considera una proteïna essencialment citoplasmàtica, amb funcions molt importants en l'activació de la via d'NF $\kappa$ B a nivell de citoplasma, mentre que el paper de la IKK $\beta$  a nivell nuclear és menys rellevant.

Tot i així, s'ha publicat que IKK $\beta$  és pot reclutar en alguns promotors dependents d'NF $\kappa$ B (Anest et al., 2003), encara que aquets resultats no han estat confirmats per Yamamoto, et al (Yamamoto et al., 2003).

Treballs del nostre laboratori han demostrat que IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  es recluten al promotor de *hes1* i *herp2* en resposta a l'activació per TNF $\alpha$ , coincidint amb l'alliberament de complexos repressors formats per I $\kappa$ B $\alpha$  y deacetilasesde histones (HDACs), i l'activació transcripcional d'aquests gens (Aguilera et al., 2004).

## **1.7 NFκB i càncer**

L'associació entre NFκB i càncer ja es va establir fa gairebé deu anys, al identificar l'oncoproteïna viral v-Rel com l'agent causant d'una leucèmia aguda d'aus (Gilmore, 1999).

Anys més tard es va demostrar que NFκB estava involucrat en processos oncogènics en mamífers. Per exemple, es va descobrir que diferents membres de la família d'NFκB com p52/p100, RelA i BCL3, entre d'altres, es trobaven sobreexpressats en limfomes i leucèmies humanes. També es va observar que la sobreexpressió de proteïnes Rel en l'epiteli de la mama induïx la formació de tumors (Romieu-Mourez et al., 2003). Per altre banda, es van identificar mutacions inactivadores del gen d'*ikba* en limfomes de Hodgkin (HL) (Karin et al., 2002; Orłowski and Baldwin, 2002). I també es va veure que algunes oncoproteïnes com Tax del HTLV-1 (*human T-cell leukemia virus I*) induïxen l'activació d'NFκB.

Més recentment, s'ha detectat l'activació d'NFκB en una gran varietat de càncers, com al de mama (Chua et al., 2007), melanomes (Yang et al., 2006), càncer de pulmó (Tew et al., 2008), càncer de colon (Scartozzi et al., 2007), càncer de pàncrees (Weichert et al., 2007), adenocarcinoma d'esòfag (Izzo et al., 2007), a més de diferents tipus de leucèmies (Vilimas et al., 2007) i limfomes (Zhang et al., 2007; Zou et al., 2007). També s'ha relacionat una elevada activitat NFκB amb la resistència a teràpies antitumorals (revisat a Greten and Karin, 2004).

Per que una cèl·lula normal esdevingui tumoral, ha d'adquirir una sèrie de característiques fenotípiques entre les quals es troben: la insensibilitat a senyals inhibidors del creixement, l'autosuficiència regulant el creixement, l'evasió de l'apoptosi, la immortalització, la capacitat de promoure angiogènesi i l'habilitat per envair teixits i fer metàstasi (Hanahan and Weinberg, 2000). NFκB està involucrat en molts d'aquests processos i això fa que aquest factor sigui molt important per al procés global de transformació tumoral.

### **1.7.1 NFκB i transformació cel·lular**

Els oncogens *Ras* i *c-Myc* són clau en el desenvolupament de diferents tumors. En càncer de pròstata s'ha descrit que *Ras* realitza la seva funció pro-oncogènica mitjançant l'activació d'NFκB (Kim et al., 2002; Mayo et al., 2001), i en cèl·lules de l'epiteli mamari NFκB transactiva el promotor de *c-Myc* (Kim et al., 2000).

La regulació transcripcional de la quinasa oncogènica Pim-2, que induïx supervivència cel·lular, també està mediada per NFκB (Fox et al., 2003), i algunes oncoproteïnes víriques com KSHV (*Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*), HTLV-1 (*human T lymphocytic leukemia virus*) i LMP-1 (*latent membrane protein*) del EBV, que induïxen tumorigènesi, senyalitzen a través de l'activació d'NFκB. No obstant, l'aportació més clara d'NFκB a la tumorigènesi és a través de la seva funció com a regulador transcripcional.



### **1.7.2 NFκB i proliferació cel·lular**

El creixement cel·lular descontrolat és un tret comú de la majoria de càncers. Hi ha diferents mecanismes pels quals una cèl·lula pot adquirir aquesta característica, essent els principals: la desregulació de la proliferació cel·lular, la presència de senyals inductors del creixement cel·lular a l'entorn de la cèl·lula maligna i el desequilibri entre proliferació i mort cel·lular.

Moltes de les citoquines regulades a nivell transcripcional per NFκB, com per exemple IL-6, GM-CSF, CD40L i TNFα actuen com a factors de creixement solubles que estimulen la proliferació de les cèl·lules tumorals. Aquests factors són alhora estímuls activadors de la pròpia via, així que la seva síntesi desencadena un mecanisme de retroalimentació positiva de la via, responsable de l'estimulació crònica de la proliferació cel·lular (Pahl, 1999). En l'apartat d'Inflamació i Càncer (1.8), s'explica la participació d'aquests factors en la promoció del càncer.

A més la via de senyalització d'NFκB també regula la transcripció de molts gens implicats en la regulació del cicle cel·lular com per exemple: *ciclina D1*, *ciclina E*, *cdk2* i *c-myc*.

En l'epiteli mamari, l'activació d'NFκB a través d'IKKα en resposta al lligand RANKL, és imprescindible per la proliferació cel·lular durant l'embaràs, ja que indueix l'activació transcripcional de la ciclina D1 (Cao et al., 2001). La introducció genètica d'una forma inactiva de la IKKα al model de ratolí transgènic Neu/ErbB2, que desenvolupa tumors de mama espontanis, retarda el desenvolupament d'aquest tumors i redueix la seva capacitat metastàtica (Cao et al., 2007).

### **1.7.3 NFκB i apoptosi**

La inhibició de l'apoptosi és el principal mecanisme pel qual NFκB contribueix a la tumorigènesi. Molts dels gens diana NFκB són gens anti-apoptòtics, que actuen inhibint la mort de les cèl·lules pre-malignes o malignes. Dins d'aquest grup de gens s'inclouen membres de la família *Bcl2* com *BCL-xL*, *IAPs*, *c-FLIP* i *FADD* (Karin, 2006).

NFκB de manera indirecte també prevé l'apoptosi induïda pel mitocondri mitjançant la neutralització de ROS a través de la inducció de la superòxid dismutasa o de la ferritina de cadena pesada (Veure Fig.4).

Molts investigadors han observat que la resistència a l'apoptosi que mostren diferents línies cel·lulars tumorals es deu a la sobreactivació d'NFκB, ja que quan s'inhibeix aquesta activitat s'indueix l'apoptosi (Bernal-Mizrachi et al., 2006; Chauhan et al., 2005; Chen et al., 2006; Tapia et al., 2007). La resistència a l'apoptosi induïda per NFκB pot estar en la base del fracàs de moltes de les teràpies contra el càncer.

#### **1.7.4 NFκB i angiogènesi**

La formació de nous vasos sanguinis és essencial per a la progressió tumoral. Molt dels senyals que dirigeixen l'angiogènesi en un tumor són promoguts pels macròfags associats al tumor (TAMs), i depenen directament de l'activació d'NFκB. Alguns d'aquests senyals inductors de l'angiogènesi són les quimioquines MCP-1 i IL-8 i els factors de creixement TNF i VEGF. La relació entre NFκB i angiogènesi és difícil d'avaluar a nivell experimental degut a que la inhibició de l'activitat NFκB provoca una forta disminució del creixement cel·lular que emmascara el possible efecte sobre l'angiogènesi. Tot i així existeixen evidències que relacionen aquests dos processos. JunB, una subunitat del factor de transcripció AP-1, juga un paper molt important durant el desenvolupament de vasos sanguinis i en l'angiogènesi tumoral. Aquest factor s'activa a través d'NFκB en situacions d'hipòxia i indueix l'expressió de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), que és un dels reguladors més importants del procés angiogènic (Schmidt et al., 2007). Teratocarcinomes JunB<sup>-/-</sup> mostren una disminució de l'expressió de VEGF i una afectació del procés angiogènic del tumor (Schmidt et al., 2007).

La resposta cel·lular a una situació d'hipòxia està bàsicament mediada per HIF-1 (*hypoxia induced factor-1*) que indueix la transcripció de VEGF, entre d'altres factors. Recentment utilitzant animals IKKβ<sup>-/-</sup> s'ha demostrat, que NFκB és un factor crític per la inducció de HIF-1 (Rius et al., 2008). També s'ha vist que IKKβ conté un consens, conservat al llarg de l'evolució, per a la hidroxilació mitjançant *prolyl hidroxilases* (PHDs), el tractament de cèl·lules amb un inhibidor de l'activitat hidroxilasa, simulant una situació d'hipòxia, indueix l'activació de IKKβ, mentre que la sobreexpressió de PHD-1 disminueix l'activitat NFκB. Es creu que la hipòxia activa NFκB mitjançant la disminució de la hidroxilació de IKKβ (Cummins et al., 2006).

### **1.7.5 NFκB i metàstasi**

La metàstasi és el procés pel qual una cèl·lula tumoral abandona el tumor primari i colonitza un altre teixit on genera un tumor secundari. Entre els múltiples mecanismes moleculars que regulen aquest procés es troba la via de senyalització d'NFκB.

En un model de carcinogènesi de mama dependent de l'oncoproteïna H-Ras i TGF-β, la via de senyalització canònica d'NFκB està implicada en el procés de transició epiteli-mesènquima (EMT). En aquest sistema, el bloqueig de l'activitat NFκB inhibeix la capacitat metastàtica de les cèl·lules epitelials de mama transformades (Huber et al., 2004).

Algunes de les molècules implicades en el procés metastàtic com les molècules d'adhesió VCAM-1, ICAM-1, les metaloproteases MMP2/9 i *inducible nitric oxid synthase* (iNOS), estan regulades a nivell transcripcional per NFκB. La inhibició de l'expressió de la E-cadherina, una proteïna essencial per al manteniment de les unions adherents en els epitelis, és un pas clau en la iniciació del procés de transició epiteli mesenquima (EMT) (Thiery, 2003). Recentment s'ha demostrat, que en el epiteli de mama NFκB reprimeix l'expressió d'E-cadherina, i induïx l'expressió de proteïnes mesenquimals com la vimentina. S'ha proposat que en els càncers de mama amb una elevada activitat NFκB, l'EMT podria ser deguda, en part, a la inhibició de l'expressió de la E-cadherina (Chua et al., 2007).

D'altre banda, en carcinomes nasofaríngis, un tipus de càncer causat per la infecció de Epstein-Barr virus (EBV), s'ha demostrat que una proteïna d'aquest virus LMP1 activa l'expressió de Twist a través d'NFκB (Horikawa et al., 2007). Twist és un regulador transcripcional molt important durant l'embriogènesi, que recentment s'ha vist implicat en el procés de transició epiteli-mesènquima (Yang et al., 2004), i en la inducció de metàstasi en diferents tipus de tumors (Lee et al., 2006).

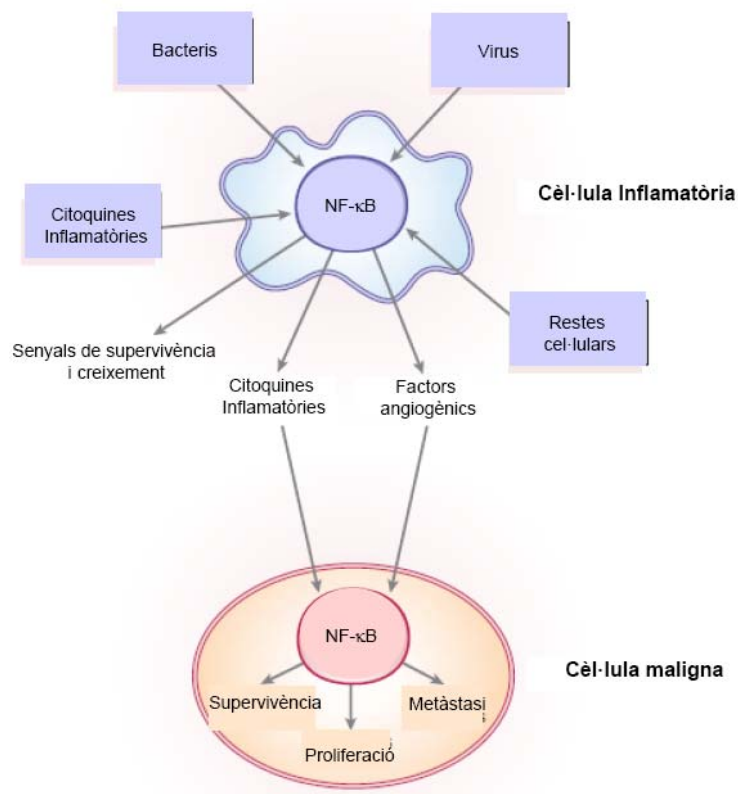
No obstant, la relació més directe que s'ha trobat fins al moment entre la via d'NFκB i el procés metastàtic prové dels estudis realitzats en el model de ratolí TRAMP, que generen de forma espontània tumors de pròstata amb capacitat metastàtica. El creuament de ratolins TRAMP amb ratolins deficients per l'activitat quinasa de la IKKα redueix significativament la capacitat metastàtica dels tumors, ja que IKKα controla els nivells d'expressió del gen antimetastàtic *Maspin* (veure apartat 1.6.1.2) (Luo et al., 2007).

## **1.8 Inflamació i càncer**

### **1.8.1 NF $\kappa$ B el nexa d'unió**

Múltiples estudis epidemiològics correlacionen infeccions i malalties inflamatòries cròniques amb un increment en el risc de patir càncer. Per exemple infeccions amb el virus de l'hepatitis B o C (HBV, HCV) o l'alcoholisme, augmenten el risc de patir carcinomes hepatocel·lulars (HCC). Així mateix les infeccions cròniques del budell, com pot ser la colitis ulcerosa (CU), incrementen el risc de patir càncer de còlon. També existeix una correlació positiva entre la inflamació del tracte respiratori degut a la presència de partícules irritants a l'ambient, especialment les degudes al fum del tabac, amb la susceptibilitat a patir càncer de pulmó. En general, es creu que aproximadament un 20% de les morts per càncer registrades estan relacionades amb processos inflamatoris previs. No obstant, els estudis epidemiològics, tot i ser molt útils, no determinen els mecanismes bioquímics i moleculars subjacents que hi ha darrera d'aquesta correlació. En aquest cas queda per descobrir quins són els mecanismes moleculars que relacionen inflamació crònica i càncer.

En una infecció, tant les citoquines inflamatòries com els productes cel·lulars que resulten de la mort dels teixits indueixen l'activació de les cèl·lules del sistema immune de l'hoste, a través de la unió a diferents receptors. Això fa que s'indueixin diferents vies de senyalització que governen l'activació de factors de transcripció responsables de regular la resposta immunitària i inflamatòria. Una de les principals vies implicades en aquest procés és NF $\kappa$ B. En les cèl·lules inflamatòries NF $\kappa$ B indueix la secreció de citoquines, quimioquines i factors que indueixen el creixement i la supervivència de cèl·lules pre-malignes afavorint així, tal i com s'ha explicat en l'apartat 1.7, la transformació tumoral d'aquestes (Fig.12). Així doncs, NF $\kappa$ B pot ser un factor clau en la relació que existeix entre processos inflamatoris i infecciosos i el càncer. Recentment s'han publicat treballs genètics i bioquímics molt sòlids que demostren la implicació de NF $\kappa$ B en aquest procés, a continuació es detallen els més rellevants



**Fig 12. L'activació d'NFκB i la interacció entre cèl·lules inflamatòries i cèl·lules malignes promou la conversió i progressió tumoral.** L'activació d'NFκB en cèl·lules inflamatòries en resposta a agents infecciosos, citokines inflamatòries i productes secretats per les cèl·lules necròtiques, indueixen la producció i secreció de factors que incrementen el creixement, la supervivència i la vascularització de les cèl·lules pre-malignes. L'activació d'NFκB es tradueix en una elevada expressió de gens involucrats en la progressió del cicle cel·lular (ciclina D1), inhibidors de l'apoptosi (BCL-X<sub>L</sub>) i proteases que promouen un fenotip invasiu (MMP9) (Adaptat de Karin, 2006).

### **1.8.1.1 NFκB i inflamació en el càncer colorectal**

L'epiteli de l'intestí és la principal barrera física que existeix entre els bacteris de la llum intestinal i les cèl·lules immunològiques de l'intestí. NFκB és un regulador fonamental de la resposta inflamatòria en les cèl·lules epitelials, ja que controla la integritat de l'epiteli de l'intestí i la interacció entre el sistema immune i la microflora intestinal. La desregulació de la resposta immunològica intestinal juga un paper important en el desenvolupament de malalties inflamatòries de l'intestí. Així doncs, la inhibició específica de la senyalització d'NFκB en les cèl·lules epitelials de l'intestí a través de la deleció de NEMO o IKKα i IKKβ induïx l'aparició d'un quadre d'inflamació crònica (Nenci et al., 2007; Zaph et al., 2007). La deficiència d'NFκB induïx l'apoptosi de les cèl·lules epitelials intestinals, una expressió anòmala de pèptids antimicrobians i l'entrada de bacteris a la mucosa intestinal. Essent aquests defectes els desencadenants de la resposta inflamatòria que s'observa en aquests models. La deficiència del gen que codifica per la proteïna adaptadora MyD88 prevé el desenvolupament d'aquesta inflamació intestinal, demostrant que l'activació dels TLRs pels bacteris intestinals és imprescindible per induir la patogènesi en aquest model de ratolí (Nenci et al., 2007). Encara més, la falta de NEMO sensibilitza les cèl·lules epitelials a l'apoptosi induïda per TNFα, mentre que la inhibició del TNFR1 bloqueja la inflamació intestinal demostrant que la senyalització per aquest receptor és crucial per a la inducció de la malaltia. En resum, aquests treballs demostren que l'activitat NFκB és imprescindible en l'epiteli intestinal per regular la integritat de l'epiteli i la homeòstasi immunològica.

El CAC (*colitis-associated cancer*) és un tipus de càncer de colon que apareix en pacients amb malalties inflamatòries del budell (IBD). El model de ratolí per aquesta malaltia s'aconsegueix injectant al ratolí un procarcinògen (AOM), que per si sol provoca càncer amb molt baixa incidència, seguit de tres rondes d'exposició a DSS (*dextra-sulphate sodium salt*), un irritant que causa inflamació. L'exposició a DSS fa que es perdi la integritat de la mucosa epitelial de l'intestí, i permet que els macròfags de la lamina pròpia entrin en contacte amb els bacteris de la flora intestinal, de manera que aquests macròfags s'activen i desencadenen el procés inflamatori (Greten et al., 2004). Experiments d'inactivació específica del gen *Ikkb* en diferents tipus cel·lulars de l'intestí, indiquen que NFκB contribueix a la promoció del càncer de colon, en aquest model, a dos nivells diferents. Per una banda NFκB promou l'expressió de gens anti-apoptòtics que bloquegen l'apoptosis dels enteròcits pre-neoplàsics, i per l'altre en els macròfags on NFκB promou la producció de citoquines que funcionen com a factors de creixement per a les cèl·lules pre-malignes. S'ha demostrat que un dels principals factors de creixement implicat en aquest procés és la IL-6 ja que la inhibició de la senyalització induïda per aquesta citoquina, mitjançant l'ús de receptors que bloquegen la senyal, inhibeix el creixent tumoral en aquest model (Becker et al., 2004).

En el model de ratolí  $APC^{\text{min}}$ , que desenvolupa tumors intestinals esporàdics degut a la deleció del gen APC, s'ha demostrat que la via de senyalització NFκB juga un paper important en el desenvolupament dels tumors intestinals. La deleció de MyD88, una proteïna adaptadora utilitzada en la senyalització de diferents TLRs tals com IL-1R, redueix significativament el nombre de

tumors d'aquest model. Un dels factors de transcripció a través del qual senyalitza MyD88 és NF $\kappa$ B, i per tant l'expressió d'alguns gens diana d'NF $\kappa$ B, com *cox-2* i *il-6* es troba disminuïda en els ratolins deficients per MyD88 (Fukata et al., 2006). D'acord amb això, els ratolins APC<sup>min</sup> nascuts i crescuts en condicions estèrils no desenvolupen tumors (comunicat per M. Pasparakis, EMBO Workshop, Capri 2008).

### **1.8.1.2 NF $\kappa$ B i inflamació en el càncer hepàtic**

Un model interessant de càncer hepàtic induït per inflamació és el ratolí *Mdr2*<sup>-/-</sup>, que és deficient en el transportador MDR2. La falta d'aquest transportador causa l'acumulació d'àcids biliars i fosfolípids als hepatòcits, que provoquen un procés inflamatori al fetge que progressa fins a l'aparició de tumors (revisat a Silverman and Thorgeirsson, 1995). La inhibició d'NF $\kappa$ B als hepatòcits mitjançant l'expressió d'un *I $\kappa$ B super repressor* (I $\kappa$ B-SR), bloqueja el desenvolupament d'aquests tumors (Pikarsky et al., 2004), demostrant la importància d'NF $\kappa$ B en la tumorigènesi d'aquest model. El mecanisme pel qual s'activa NF $\kappa$ B en aquest model no es coneix, però sembla que depèn de la producció de TNF $\alpha$  pels macròfags del fetge o cèl·lules de *Kupffer* (KCs), ja que la inhibició de la senyalització per TNF $\alpha$  mitjançant el tractament dels animals *Mdr2*<sup>-/-</sup> amb anticossos anti-TNF $\alpha$  prevé l'activació d'NF $\kappa$ B als hepatòcits i redueix l'aparició de tumors. Així mateix la inhibició de l'activitat NF $\kappa$ B en els propis hepatòcits mitjançant l'expressió condicional d'un I $\kappa$ B $\alpha$ SR incrementa l'apoptosi d'aquests i redueix la multiplicitat dels tumors. Per tant en aquest model, igual que en el cas del CAC (de l'anglès *colitis-associated cancer*), NF $\kappa$ B contribueix a la tumorigènesi mitjançant la inhibició de l'apoptosi de cèl·lules pre-malignes, i induint la producció de TNF $\alpha$  o altres citoquines, per part de les cèl·lules inflamatòries, que faciliten el creixement del tumor.

Un altre exemple de la important contribució de les cèl·lules inflamatòries en el desenvolupament de tumors la trobem en la secreció de IL-6, per part de les cèl·lules de *Kupffer*, en un model de carcinogènesi hepàtica en ratolí, induïda pel pro-carcinògen químic DEN. La producció d'aquesta citoquina, que depèn de la de la proteïna adaptadora MyD88, és més elevada en mascles que en femelles. Els estrògens inhibeixen la producció de IL-6 per les KCs, protegint les femelles de la tumorigènesi hepàtica induïda per DEN. Aquest descobriment obre la possibilitat de tractar amb estrògens els càncers hepàtics humans que majoritàriament es donen en homes (Naugler et al., 2007).

### **1.8.1.3 NFκB i inflamació en limfomes**

Infeccions microbianes cròniques com la gastritis que provoca el patògen *Helicobacter pylori*, causen una proliferació descontrolada dels limfòcits que indueix l'aparició d'un tipus de limfoma anomenat MALT. Aquest limfoma s'associa a una elevada expressió de proteïnes involucrades en l'activació d'NFκB com Bcl10 i MALT. El limfoma de MALT s'inicia per la repetida estimulació de cèl·lules B en resposta a antigen, que fins a cert punt es pot revertir amb tractaments d'antibiòtic. Quan la malaltia progressa es produeixen translocacions cromosòmiques, molt comuns en cèl·lules B activades, que col·loquen els gens de *Bcl10* i *MALT* sota el control de promotors heteròlegs causant la seva sobre-expressió, normalment com a proteïnes de fusió (p.ex: IAP2-MALT1). Això provoca una activació persistent i irreversible de la via d'NFκB en les cèl·lules B afectades, que causa la inhibició de l'apoptosis i contribueix a la proliferació descontrolada d'aquestes. Arribats a aquest punt el procés tumorigènic ja no es pot controlar, encara que s'elimini l'estímul antigènic (Lucas et al., 2001).

### **1.8.1.4 NFκB com agent anti-tumoral**

Encara que, tal i com acabem d'explicar, NFκB és un element promotor en molts tipus de càncer associats a inflamació, sembla ser que té una funció totalment oposada en càncers de pell, així com en sistemes on tenen lloc mecanismes de proliferació compensatòria.

Per exemple, la inhibició d'NFκB per expressió de IκBα-SR en queratinòcits indueix el desenvolupament espontani de SCC (*squamous cell carcinoma*) (van Hogerlinden et al., 1999). Per altre banda, en el model de ratolí de carcinoma hepàtic cel·lular (HCC) induït pel procarcinogen químic *diethylnitrosamine* (DEN), la deleció d'IKKβ als hepatòcits incrementa la multiplicat i la mida dels tumors (Maeda et al., 2005), i s'associa amb un augment de la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS). L'acumulació de ROS activa la via de JNK que causa la mort dels hepatòcits. Com a conseqüència es produeix una proliferació compensatòria dels hepatòcits que sobreviuen, que a la llarga facilita la formació de tumors. L'administració oral d'un antioxidant bloqueja l'activació de la via de senyalització de JNK i la proliferació compensatòria, prevenint la carcinogènesi induïda per DEN en aquest model de ratolí (Maeda et al., 2005) (Veure Fig.4). Al mateix temps, les restes cel·lulars alliberades per les cèl·lules apoptòtiques indueixen la secreció de citokines per part de les cèl·lules inflammatòries, les qual promouen el creixement tumoral. Per aquest motiu, la inhibició d'NFκB en les cèl·lules de *Kupffer* del fetge, causa la disminució del nombre i la mida dels tumors d'aquest model de HCC, tal i com s'ha explicat en l'apartat anterior.



## 2. Notch

---

Al llarg de l'evolució els organismes multicel·lulars han desenvolupat una sèrie de mecanismes reguladors que assegurin el correcte desenvolupament i homeòstasi d'òrgans i teixits. Les interaccions que es donen entre cèl·lules veïnes són essencials en aquest tipus de processos, i moltes d'elles depenen de receptors de membrana. Els receptors de membrana de la família de Notch, així com les vies de senyalització que activen són elements claus en la regulació que es duu a terme per contactes cèl·lula-cèl·lula.

### **2.1 Membres de la via de senyalització de Notch**

Els elements claus de la via de senyalització de Notch són, els receptors Notch, els lligands Delta/Jagged i el factor de transcripció CSL, també anomenat CBF1 o RBPjk (*Recombinant Binding Protein J-kappa*).

#### **2.1.1 Els Receptors Notch**

La família dels receptors Notch inclou 4 membres (Notch1-4). Els receptors Notch són proteïnes de transmembrana involucrades en la transducció de senyals específiques de la membrana al nucli, en resposta a la unió dels seus lligands. La part extracel·lular d'aquests receptors conté múltiples repeticions d'EGF i repeticions Lin/Notch (LNR) involucrades en la interacció receptor-lligand. La part intracel·lular de Notch (Notch IC) conté diferents dominis funcionals: el domini RAM i un domini ric en repeticions d'anquirina (ANK), necessaris per la interacció amb els efectors, una seqüència de localització nuclear (NLS), un domini de transactivació i un domini PEST a C-terminal que regula l'estabilitat de la proteïna (Egan et al., 1998) (Fig.13). Notch es tradueix a partir d'un únic transcrit d'mRNA en una proteïna precursora que es processa en l'aparell de Golgi per tal de formar el receptor heterodimèrric funcional.

### 2.1.2 Els lligands Delta i Jagged

La senyalització a través dels receptors Notch s'indueix per la unió amb un dels seus lligands. En *Drosophila* s'han identificat dos lligands de Notch (Delta and Serrate), mentre que en vertebrats se n'han identificat 5 (Jagged1, Jagged2, Delta1, Delta3 i Delta4). Els lligands de Notch són també proteïnes transmembrana, que en la part extracel·lular contenen múltiples repeticions EGF-like a més d'un domini característic anomenat DSL (de Delta, Serrate i Lag2). Ambdós dominis estan involucrats en la interacció amb el receptor Notch. El domini intracel·lular dels lligands Jagged i Delta estan format per uns pocs aminoàcids, i no se sap si té alguna funció (Fig.13).

La glicosilació dels receptors Notch per les glicosiltransferases (*Radical*, *Lunatic* i *Maniac Fringe*) modula l'especificitat de Notch per diferents lligands. Així, les proteïnes *Fringe* regulen l'activació de Notch enfront d'un determinat lligand, contribuint a la generació de diversitat cel·lular (Irvine, 1999). Per altre banda, la ubiquitinació dels lligands regula la seva internalització, la qual és imprescindible per a l'activació dels receptors (Le Borgne et al., 2005). Mutacions en *Neuralized* i *Mimic bomb*, les E3 ubiquitin lligases que ubiquitin Delta, generen fenotips de pèrdua de funció de Notch (Itoh et al., 2003; Lai et al., 2001).

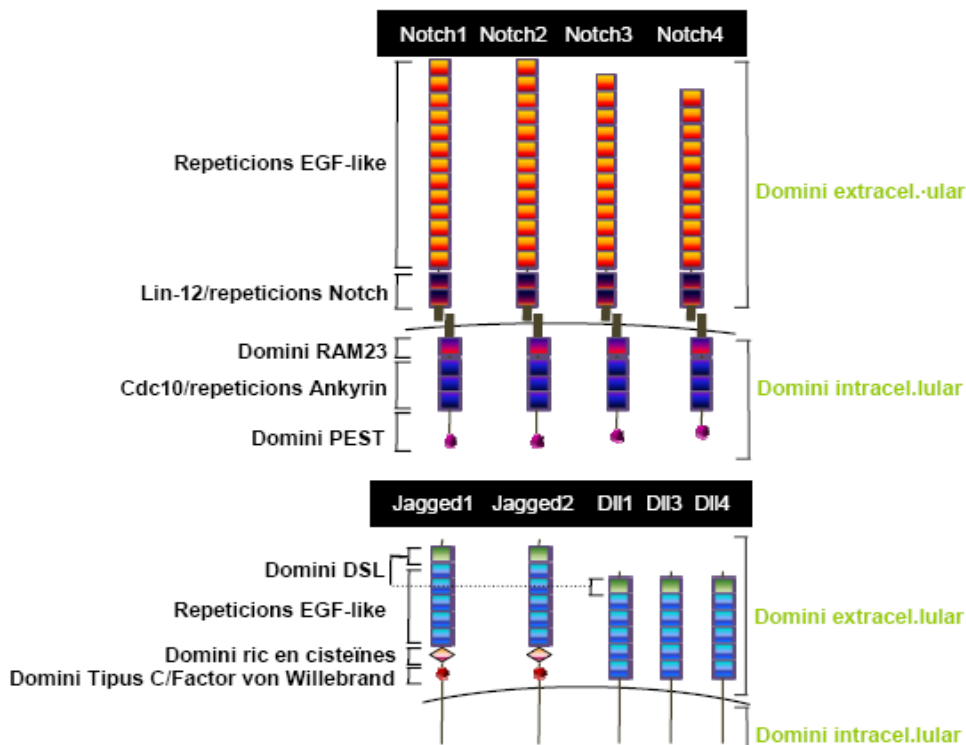


Fig 13. Esquema dels receptors i lligands de Notch (Adaptat de Leong and Karsan, 2006)

## 2.2 Activació de la via de Notch

La interacció de Notch amb els seus lligands desencadena una sèrie de processaments proteolítics del receptor que són necessaris per a l'activació de la via. El primer trencament es dona a la regió extracel·lular del receptor i està produït per una proteasa de la família ADAM anomenada TACE (*TNF $\alpha$  converting enzyme*) en vertebrats o *Kuzbanian* en *Drosophila*. Aquest trencament induïx un canvi conformacional de la molècula que exposa una regió del domini transmembrana sensible a la proteòlisi per un complex amb activitat  $\gamma$ -secretasa, format per les proteïnes: presenilina 1 i 2, Nicastrina, Pen-2 i Aph1. L'activitat  $\gamma$ -secretasa talla la proteïna Notch alliberant un fragment intracel·lular (NotchIC) que es transloca al nucli, on s'uneix al seu efector, el factor de transcripció RBP $\kappa$ , per activar la transcripció dels seus gens diana. El bloqueig de l'activitat  $\gamma$ -secretasa mitjançant l'ús d'inhibidors, o per inactivació genètica d'alguns de membres del complex, prevé l'activació de Notch, encara que no de manera específica (Zhang et al., 2000). En absència de l'activació de Notch, RBP $\kappa$  es troba unit als promotors dels gens diana de Notch a través de la seqüència (C/T)GTGGGAA, on recluta repressors transcripcionals (SMRT i N-CoRs) i histona deacetilases (HDACs), per inhibir-ne la transcripció (Leong and Karsan, 2006). La unió de NotchIC a RBP $\kappa$  desplaça els repressors transcripcionals i recluta coactivadors com l'acetil transferasa p300, i el coactivador específic de Notch Mastermind (MAML), induint així l'activació transcripcional d'aquests gens (Fig.14).

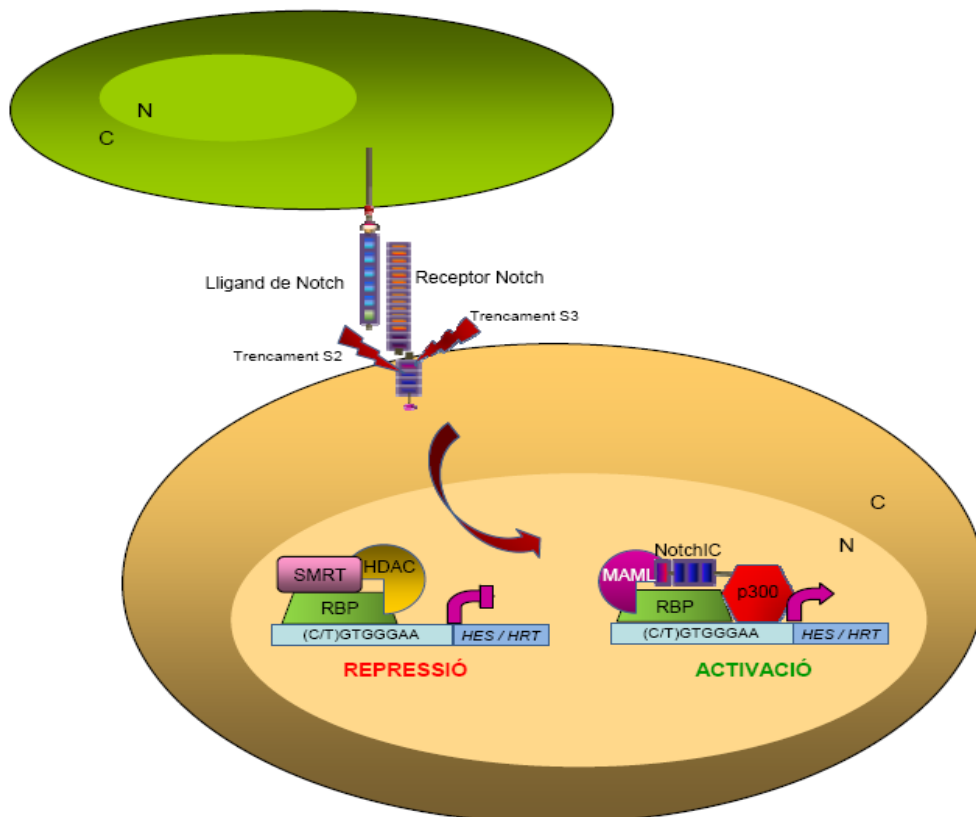


Fig 14. Esquema de l'activació de la via senyalització de Notch per la unió a lligand.

### **2.3 Els gens diana de Notch**

Tot i el gran nombre de processos regulats per Notch durant l'embriogènesi i l'homeòstasi dels teixits en l'adult, els gens diana de Notch identificats fins al moment són molt pocs. D'aquests els més ben caracteritzats són els gens de la família de *hairy/enhancer-of-split (hes)*, que inclouen *hes1*, *5* i *7* i *hairy related transcription factor (hrt)*, on s'inclouen *hrt1/herp2* i *hrt2/herp1* (Iso et al., 2003). Altres gens identificats com a dianes de Notch són GATA2 en l'aorta embrionària (Robert-Moreno et al., 2005), EphrinB2 en el desenvolupament del cor (Grego-Bessa et al., 2007) i c-myc en cèl·lules de limfoma T (Weng et al., 2006).

Les proteïnes Hes i Hrt són factors de transcripció que pertanyen a la família bHLH (*basic helix-loop-helix*), nom que defineix la seva estructura. El domini bàsic els serveix d'ancoratge al DNA, mentre que les estructures en hèlix alfa els hi donen la capacitat de dimeritzar amb altres proteïnes tipus HLH. En general, aquestes proteïnes funcionen com a repressors transcripcionals, bé per unió directe al DNA a través de la caixa N (que respon al consens TTCCGG), o bé dimeritzant i reprimint altres HLH, i són les responsables de molts dels efectes de Notch en la diferenciació cel·lular (Ohishi et al., 2003).

## **2.4 Notch regula la diferenciació cel·lular i el desenvolupament de teixits**

La via de senyalització de Notch regula l'adquisició de destins cel·lulars en múltiples organismes i sistemes, tant en l'embrió com en l'individu adult. En mamífers s'ha estudiat en detall el paper de Notch en diferents llinatges cel·lulars, i en general s'ha vist que la seva funció consisteix en inhibir un destí cel·lular per permetre la diferenciació cap a un altre. Per exemple, en els precursors neurogènics, l'activació de Notch inhibeix el destí neuronal en front de la diferenciació glial (Morrison et al., 2000). Durant l'angiogènesi, Notch es necessita per a la formació de venes i artèries (Lawson et al., 2001). Al llinatge limfoide, on més bé s'ha estudiat el paper de Notch, es pot generalitzar que Notch1 bloqueja la diferenciació de cèl·lules B per permetre la formació de cèl·lules T (revisat a Milner and Bigas, 1999). Encara que la funció de Notch al llinatge mieloide sembla ser menys determinant, utilitzant el model de la línia cel·lular 32D s'ha demostrat que Notch1 i Notch2 regulen la diferenciació mieloide de forma específica depenent del context cel·lular (p.ex. en resposta a diferents citoquines) (Bigas et al., 1998). L'activació de la via de senyalització de Notch és necessària pel manteniment del compartiment de cèl·lules mare hematopoètiques (HSCs), i la seva activitat disminueix durant la diferenciació d'aquestes (Duncan et al., 2005).

Per altre banda, Notch no només juga un paper important en l'autorenovació de cèl·lules indiferenciades en organismes adults sinó també en la regulació de la hematopoesi embrionària (Kumano et al., 2003). Treballs del nostre laboratori, utilitzant ratolins deficients per l'efector transcripcional de Notch, RBP-jk, o pel lligand Jagged1, demostren que la via de senyalització de Notch, a través de l'activació transcripcional de Gata2, és important per a la formació de cèl·lules hematopoètiques en l'embrió (Robert-Moreno et al., 2005) (Robert-Moreno et al., 2008). En el desenvolupament de l'intestí, Notch inhibeix la diferenciació de les cèl·lules secretores incrementant el compartiment dels progenitors més immadurs (Fre et al., 2005; van Es et al., 2005) (Veure més endavant).

Malgrat que en general Notch actua inhibint la diferenciació cel·lular, s'ha vist que també pot funcionar com un potent inductor de la diferenciació dels queratinòcits (Rangarajan et al., 2001) i de la diferenciació durant la gliogènesi (Wang et al., 1998). Així doncs, l'activació de la via de senyalització de Notch pot bloquejar o promoure la diferenciació segons el llinatge cel·lular.

## **2.5 Notch i càncer**

### **2.5.1 Paper oncogènic de Notch en leucèmies**

En concordança amb el paper preferent de Notch en la regulació de la diferenciació de cèl·lules T, l'activació aberrant de Notch es troba associada freqüentment amb l'aparició de leucèmies en aquest tipus cel·lular. De fet, el gen *Notch1* humà es va clonar a partir d'una leucèmia limfoblàstica T (T-ALL), en la que Notch es trobava fusionat amb el receptor de cèl·lules T (TCR), donant lloc a l'activació constitutiva de Notch1 (Ellisen et al., 1991). Actualment se sap que aquest reordenament cromosòmic no és un fenomen molt comú en les leucèmies de cèl·lules T. No obstant, en un 50% de les T-ALL humanes, s'han identificat mutacions puntuals del receptor de Notch que indueixen la seva activació mitjançant dos mecanismes diferents. Per una banda les mutacions en el domini d'heteromerització de Notch faciliten el seu processament independent de lligand, i per l'altre mutacions en el domini PEST incrementen l'estabilitat de Notch IC (Weng et al., 2004). Recolzant la importància que té l'activació de Notch en les leucèmies de cèl·lules T, s'ha vist que en molt dels casos en els que no s'ha identificat mutacions en la molècula de Notch, hi ha mutacions en *Fbw7*, la ubiquitin lligasa implicada en la degradació de Notch IC (O'Neil et al., 2007). Un altre tret comú en moltes leucèmies de cèl·lules T és la pèrdua d'expressió del supressor tumoral *PTEN*. S'ha proposat que Notch1 indueix l'activació de la via PI3K-Akt mitjançant la regulació negativa de *PTEN* per *Hes1* (Palomero et al., 2008). També s'ha suggerit que c-Myc i NFκB poden funcionar com a factors que cooperen amb Notch en la tumorigènesi de cèl·lules T (Palomero et al., 2006; Vilimas et al., 2007) (Veure més endavant).

El paper de la via de senyalització de Notch en el desenvolupament de leucèmies de cèl·lules B, no és tant clar com en el cas de les cèl·lules T. No obstant, cèl·lules B derivades de Limfomes de Hodgking presenten una sobreexpressió de Notch1 i Jagged1 (Jundt et al., 2002), mentre que Notch2 està sobreexpressat en algunes leucèmies cròniques limfocítiques B (B-CLL) (Hubmann et al., 2002). A més s'ha proposat que algunes proteïnes víriques amb caràcter oncogènic podrien utilitzar la via de senyalització de Notch per immortalitzar cèl·lules B (He and Pear, 2003).

També s'han trobat alteracions en l'expressió de diferents membres de la família Notch en algunes leucèmies mieloides (Houde et al., 2004; Jundt et al., 2004).

### **2.5.2 Paper oncogènic de Notch en tumors sòlids**

Tot i que no s'han identificat mutacions en la seqüència Notch en tumors sòlids, si que s'han descrit alteracions en l'expressió de receptors, lligands i efectors de la via de Notch. En aquest sentit, l'expressió del lligand Jagged1 està augmentada en cèl·lules de càncer de pàncrees, pròstata, cèrvix i cervell, Jagged2 s'ha trobat sobreexpressat en càncers de cèrvix i pàncrees, i s'han detectat nivells elevats de Delta1 en càncer de cèrvix i cervell (Cuevas et al., 2005; Gray et al., 1999; Miyamoto et al., 2003; Santagata et al., 2004). Pel que fa al receptor de Notch, s'han detectat nivells elevats de la proteïna Notch1 i Notch2 en càncers humans de cèrvix, pàncrees, pell i cervell, mentre que Notch3 i Notch4 estan sobreexpressats en melanomes malignes i en càncer de pàncrees humans (Cuevas et al., 2005; Gray et al., 1999; Miyamoto et al., 2003; Nickoloff et al., 2003; Zagouras et al., 1995). Així mateix alts nivells d'expressió de Notch1 i Jagged1 s'associa a un mal pronòstic en càncer de mama i amb metàstasi en càncer de pròstata. Recentment s'ha identificat una sobreexpressió de Notch4 en càncer de mama humà (Callahan and Egan, 2004). L'activitat de Notch també està involucrada en la tumorigènesi intestinal, tal i com s'explicarà més endavant (Veure apartat 4.5).

D'altra banda, diferents treballs suggereixen que Notch pot col·laborar amb l'oncogen Ras, el qual es troba mutat en més del 30% dels càncers humans. Ras augmenta els nivells de la forma intracel·lular de Notch (NotchIC), i indueix l'expressió del lligand Delta1 i de la presenilina-1. A més l'activació de Notch 1 coopera en el manteniment del fenotip neoplàsic de cèl·lules neoplàsiques transformades per Ras *in vitro* i *in vivo* (Weijzen et al., 2002).

En càncer de mama l'activació de la via de Notch, a través del lligand Jagged1, indueix l'expressió de *Slug*, que disminueix l'expressió d'E-cadherina i promou la transició epitelial-mesenquima que s'associa al procés metastàtic (Leong et al., 2007).

Una excepció del paper pro-tumorigènic de Notch el trobem en la pell, on inhibeix el creixement i indueix la diferenciació de queratinòcits tant *in vitro* com *in vivo* (Nickoloff et al., 2002; Rangarajan et al., 2001). La delecció específica de Notch1 en l'epidermis del ratolí causa hiperplàsia, proliferació de l'estrat corni i l'aparició eventual de tumors en la capa basal de l'epidermis, i també afavoreix la carcinogènesi induïda químicament (Nicolas et al., 2003). Un dels possibles mecanismes que expliquen el paper antitumoral de Notch en la pell és a través de la regulació de p21 (Devgan et al., 2005).

### 3. Interrelació entre les vies de senyalització de Notch i NF $\kappa$ B

El càncer és la conseqüència de l'acumulació progressiva de mutacions en proto-oncogens o gens supressors tumorals que provoquen defectes en el creixement, la diferenciació i la supervivència cel·lular. Donat el paper de les vies de Notch i d'NF $\kappa$ B en la gènesi i progressió tumoral, l'estudi de possibles interaccions entre elles pot ser rellevant a l'hora de dissenyar estratègies terapèutiques.

Inicialment, Guan et al. van demostrar que en cèl·lules T, la fracció intracel·lular de Notch1 interacciona amb la subunitat p50 d'NF $\kappa$ B inhibint l'activació dels seus gens diana al impedir la unió del factor de transcripció als seus promotors (Guan et al., 1996). Més recentment, també en cèl·lules T, s'ha descrit que Notch1IC competeix amb I $\kappa$ B $\alpha$  per la unió als dímers d'NF $\kappa$ B, afavorint així la seva translocació al nucli (Shin et al., 2006). A més, Notch1 regula l'expressió basal d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Oakley et al., 2003).

Més recentment, en cèl·lules derivades de leucèmies limfoblàstiques agudes de cèl·lules T (T-ALL) amb mutacions activadores de Notch, s'ha demostrat que Notch1IC indueix l'activació de la via de senyalització d'NF $\kappa$ B mitjançant dos mecanismes, per una banda, Notch1IC indueix l'activació transcripcional de *Relb* i *Nfkb2*, i per altre banda Notch1IC interacciona amb el complex de les IKKs facilitant l'activació transcripcional de gens diana d'NF $\kappa$ B. A més, la inhibició simultània de les vies de NF $\kappa$ B i Notch té un efecte sinèrgic en la inhibició del creixement tumoral en aquestes cèl·lules (Vilimas et al., 2007). D'altre banda, en resposta a l'activació de TCR, Notch3, mitjançant l'activació transcripcional de PKC $\theta$ , indueix l'activació del complex IKK, la degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$  i l'acumulació de dímers ReA-p50 al nucli, a més de facilitar l'associació d'IKK $\alpha$  a NIK afavorint la fosforilació dels homodímers d'IKK $\alpha$ , el processament de p100, i la conseqüent activació del dímers RelB/p52 (Vacca et al., 2006).

Recentment s'ha demostrat que en les cèl·lules de càncer de cèrvix, Notch1 i IKK $\alpha$  es recluten als promotors dels gens diana d'IKK $\alpha$ , *ikb $\alpha$*  i *ciap-2*, depenent de l'activació per TNF $\alpha$  (Song et al., 2008).

Treballs previs del nostre laboratori demostren que en resposta a TNF $\alpha$ , IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  es recluten al promotor del gens *hes1* i *herp2*, donant lloc a la seva activació transcripcional (Aguilera et al., 2004) i coincidint amb l'alliberament de complexos repressors formats per I $\kappa$ B $\alpha$  y deacetilases de histones (HDACs) (Espinosa et al., 2003; Espinosa et al., 2002)



## **4. El càncer de colon**

---

### **4.1 El tracte gastrointestinal**

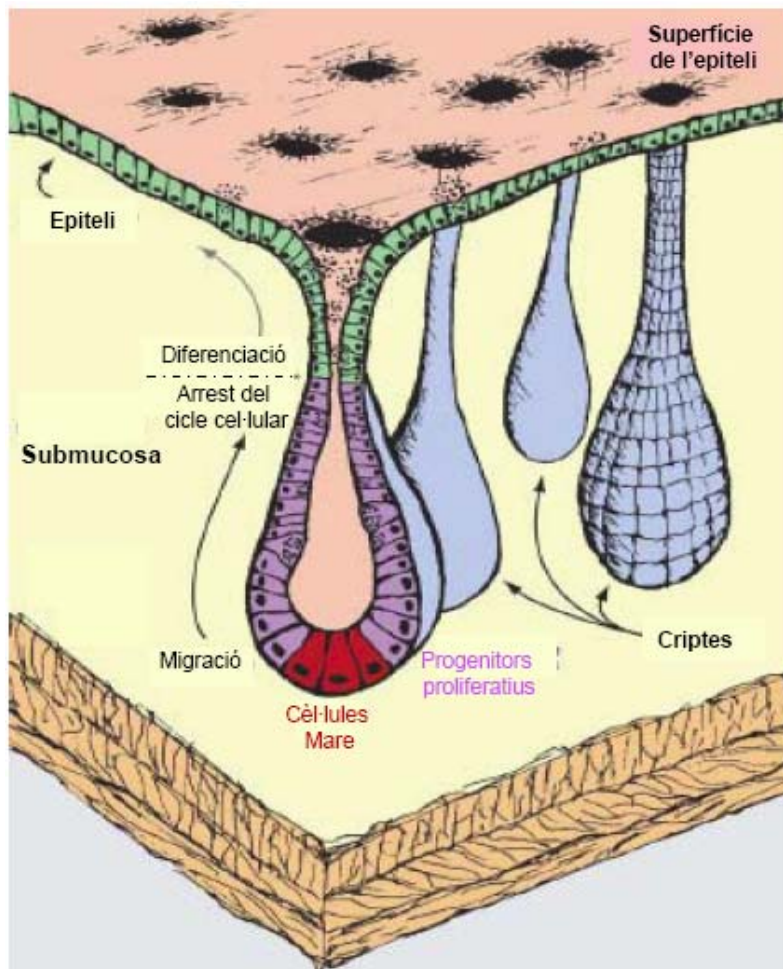
El tracte gastrointestinal, també anomenat tub digestiu, és el sistema d'òrgans en els animals multicel·lulars que consumeixen aliments, encarregat de digerir aquest aliments per extreure'n energia i nutrients i expulsar els residus que queden. Es divideix en tracte gastrointestinal superior, format per la boca, faringe, esòfag i estomac; i tracte inferior que compren l'intestí i l'anus.

### **4.2 Anatomia i histologia del còlon**

L'intestí gros es divideix en tres trams: el cec, el còlon i el tros final anomenat recte. Anatòmicament, el còlon es subdivideix en quatre trams: ascendent, transvers, descendent i sigmoide. A nivell histològic l'intestí gros està format per diferents capes que són, de la llum intestinal a l'exterior: la mucosa, formada per cèl·lules epitelials; la membrana basal; la làmina pròpia i la *muscularis mucosa*.

### **4.3 L'epiteli colònic**

La mucosa intestinal és una monocapa de cèl·lules epitelials que es distribueix formant unes invaginacions anomenades criptes de Lieberkühn. En el fons d'aquestes criptes es localitzen les cèl·lules mare intestinals. Aquestes cèl·lules generen precursors que ocupen la tercera part més basal de la cripta, on es divideixen aproximadament cada 12-16h. generant unes 200 cèl·lules noves per cripta cada dia (van de Wetering et al., 2002). A la regió mitja de la cripta les cèl·lules es comencen a diferenciar en un dels tres tipus cel·lulars del colon: enteròcits, cèl·lules caliciformes o mucosecretors, i cèl·lules endocrines. Quan arriben a la llum de l'intestí les cèl·lules ja diferenciades pateixen un procés d'apoptosis i extrusió, gràcies al qual el nombre total de cèl·lules es manté constant (Potten and Loeffler, 1990) (Fig.15).

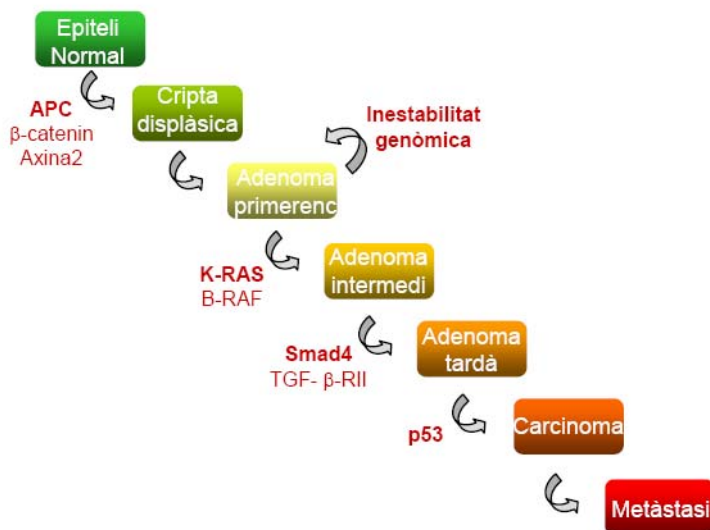


**Fig 15. Estructura de l'intestí gros.** En el dibuix es representen unes criptes de Lieberkühn, i s'indica el procés de renovació cel·lular que es produeix en aquest òrgan (Adaptat de Sancho et al., 2004).

## 4.4 Bases moleculars del càncer colorectal

Les primeres lesions que apareixen en la progressió del càncer colorectal (CCR) són focus de criptes aberrants o hiperplàsiques (ACF, de l'anglès *aberrant crypt focus*). Després, algunes d'aquestes lesions es transformen en adenomes primerencs que, si la malaltia avança, van creixent i es transformen en adenomes intermedis, i més endavant en adenomes tardans que poden evolucionar cap a carcinomes *in situ* o invasius.

A la dècada dels 90, Fearon i Vogelstein van proposar un model que, a partir de les dades moleculars existents, explicava la progressió dels diferents estadis del CCR. En aquest model, el desenvolupament del CCR és el resultat de l'acumulació seqüencial d'alteracions genètiques que inclouen l'activació d'oncogens com *Kras* i la inactivació de diferents gens supressors tumorals com *Apc*, *Ddc*, *Dpca/Smad4* i *Tp53* (Fearon and Vogelstein, 1990) (Veure la Fig.16).



**Fig.16:** Correlació entre la progressió de càncer de colon i l'acumulació d'alteracions genètiques segons Fearon and Vogelstein.

El gen supressor tumoral *Apc* (*Adenomatous Polyposis Coli*), que regula els nivells de β-catenina, juga un paper clau en la gènesi del càncer intestinal en models animals (Su et al., 1992). *Apc* es troba mutat en més d'un 80% dels càncers colorectals humans. La manca de funció d'APC, originada per mutació o pèrdua dels dos al·lels del gen, és responsable d'activar un programa transcripcional dependent de β-catenina que confereix el fenotip de cèl·lula soca característic de les cèl·lules dels adenomes (van de Wetering et al., 2002).

Les mutacions en *kras* tenen també una alta prevalença en el càncer colorectal (entre un 40-60% segons les sèries). El gen *kras* codifica per la proteïna p21<sup>ras</sup>, la qual actua com a transmissor de senyals extracel·lulars de creixement cap al nucli cel·lular mitjançant l'activació de les MAP quinases. Les mutacions en el gen *kras* són majoritàriament canvis d'aminoàcid en el codon 12 i en alguns casos en els codons 13 i 61 (Grady and Markowitz, 2002).

Altres alteracions associades a la progressió del CCR són les pèrdues al·lèliques en la regió 18q21 (Fearon and Vogelstein, 1990), on es troben els gens *Ddc* (*Deleted in Colorectal Cancer*) un homòleg de les molècules d'adhesió N-CAM, i *Smad4/Dpc4* (*Deleted in Pancreatic Cancer locus 4*) que participa en la via de transducció de senyals iniciada per TGF- $\beta$  (Takaku et al., 1998).

Finalment, la inactivació del regulador del cicle cel·lular *p53* es considera la base de la transició d'adenoma a carcinoma (Baker et al., 1989). La proteïna *p53* és responsable d'induir l'aturada del cicle quan es produeix un dany al DNA, donant temps a la cèl·lula per reparar els errors genètics. La pèrdua de la funció de *p53* dona lloc a l'acumulació de mutacions que faciliten la progressió del procés neoplàsic (Hollstein et al., 1991).

Tot i que el model proposat per Fearon i Vogelstein segueix vigent, cal tenir present que altres vies de senyalització juguen papers importants en diferents aspectes del desenvolupament del CCR. Un exemple és el treball que es presenta en aquesta tesi, en el que es mostra que les vies d' NF $\kappa$ B i Notch així com la seva interrelació són importants durant la tumorigènesi colorectal.

## **4.5 Paper de Notch /hes1 en el CCR**

Una de les principals funcions biològiques de Notch és regular l'adquisició dels destins cel·lular dels precursors en diferents teixits. En el cas de l'intestí, la manca de Hes1, diana transcripcional de Notch, provoca un increment en el nombre de cèl·lules mucosecretors i endocrines en detriment de les absortives (Jensen et al., 2000). S'ha demostrat que aquesta funció de Hes1 es produeix per la repressió de Math1, que és un inductor de la diferenciació mucosecretora en aquest teixit. Per això, l'intestí dels ratolins Math1<sup>-/-</sup> està format bàsicament per enteròcits (Yang et al., 2001).

Una prova més de la participació de Notch en la regulació de l'homeostasi intestinal és que tant la inactivació genètica de la via de Notch (mitjançant delecció de RBPjk en l'intestí) com la inhibició farmacològica d'aquesta (mitjançant inhibidors de la  $\gamma$ -secretasa) elimina el compartiment proliferatiu, que queda totalment substituït per cèl·lules mucosecretors amb alts nivells de Math1 i baixos nivells de Hes1 (van Es et al., 2005). Pel contrari, l'activació de la via de Notch a l'intestí provoca una expansió dels progenitors immadurs i un bloqueig de la diferenciació mucosecretora (Fre et al., 2005). D'acord amb aquests resultats, l'expressió de Hes1 en intestins normals es troba restringit a la part més basal de la cripta, coincidint amb el compartiment proliferatiu (van Es et al., 2005). A més la inhibició de Notch no només afecta a les cèl·lules normals sinó que indueix la diferenciació parcial adenomes generats en ratolins mutants per el gen APC cap al llinatge mucosecretor (van Es et al., 2005), demostrant la participació d'aquesta via en el desenvolupament del CCR.

El treball d'aquesta tesi demostra que en cèl·lules de CCR i tumors de còlon humans esporàdics, l'activitat aberrant de la quinasa d'NF $\kappa$ B, IKK $\alpha$ , participa en la tumorigènesi colorectal, a través de l'activació transcripcional dels gens diana de Notch, *hes1*, *hes5* i *herp2* mitjançant un mecanisme que implica l'export al citoplasma de corepressors nuclears (Fernandez-Majada et al., 2007; Fernandez-Majada et al., 2007b) (Fernandez-Majada, no publicat).

***Capítol 2:***

***Objectius***

L'objectiu inicial d'aquesta tesi era estudiar el paper de la via de senyalització d'NF $\kappa$ B en la carcinogènesi colorectal. Els resultats que hem anat obtenint durant la progressió d'aquest treball ens han dut a centrar el nostre interès en els següents punts:

- 1-** Estudi de les funcions nuclears de les quinases d'*IkappaB* (IKK) en el càncer colorectal.
- 2-** Mecanismes que regulen les funcions pro-tumorigèniques de la IKK $\alpha$  en aquest tipus de tumor.

## ***Capítol 3:***

## ***Resultats***



### 3.1 L'activitat nuclear d'IKK $\alpha$ indueix la desregulació transcripcional de gens diana de Notch en el càncer colorectal

Aquest article està publicat a PNAS, Gener 2007

Factor d'impacte: 9,598 (2007)

Categoria: *Multidisciplinary Sciences*, posició 3 de 50

Les cèl·lules de càncer colorectal (CCR) adquireixen el fenotip tumoral mitjançant l'acumulació de mutacions en gens específics, donant lloc a l'activitat descontrolada de diferents vies de senyalització. Les mutacions més prevalents en el càncer colorectal són les que es produeixen en el gen APC (de l'anglès *adenomatous polyposis coli*), que indueixen l'acumulació de  $\beta$ -catenina nuclear (Su et al., 1992). Tot i ser molt important, aquesta no és la única via implicada en el CCR. Darrerament s'ha demostrat que la via de Notch també té un paper rellevant en la tumorigènesi intestinal, probablement a través del gen *hes1* (Fre et al., 2005; van Es et al., 2005).

En els últims anys, s'han publicat diferents treballs on es demostra que la IKK $\alpha$  regula la transcripció de determinats gens, tant dependents com independents d'NF $\kappa$ B, a través de la fosforilació d'algunes proteïnes nuclears com la Histona3, el receptor d'estrògens (ER), i el repressor transcripcional SMRT (Anest et al., 2003; Hoberg et al., 2004; Park et al., 2005; Yamamoto et al., 2003). Treballs previs del nostre laboratori demostren que, en resposta a TNF $\alpha$ , les IKKs es recluten als promotors de diferents gens diana de Notch per induir la seva transcripció (Aguilera et al., 2004).

El treball que es presenta a continuació demostra que les cèl·lules de càncer de còlon presenten una activitat aberrant de la IKK $\alpha$ , que es localitza a nucli, i que és independent de l'activació d'NF $\kappa$ B. Més interessant és el fet que aquesta activitat IKK es present en tumors primaris humans de CCR i correlaciona amb la fosforilació d'SMRT i amb la distribució citoplasmàtica d'aquest repressor. La IKK $\alpha$  immunoprecipitada dels nuclis de les cèl·lules tumorals fosforila, *in vitro*, la serina 2410 del repressor SMRT, estant aquesta fosforilació implicada en el reconeixement per les proteïnes exportadores 14-3-3 (Hoberg et al., 2004).

A nivell de la cromatina, la IKK $\alpha$  es recluta a promotors de gens diana de Notch com *hes1*, *hes5*, *herp2*, on indueix l'alliberament del repressor SMRT, fet que determina l'activació transcripcional d'aquests gens. D'acord amb aquests resultats hem detectat una elevada expressió de la proteïna Hes1 en tumors de còlon humans, mentre que la seva expressió es restringeix a unes poques cèl·lules de la base de les criptes colòniques normals.

La inhibició de l'activitat IKK $\alpha$  en cèl·lules tumorals, ja sigui mitjançant un dominant negatiu, (IKK $\alpha_{AA}$ ) o el tractament amb un inhibidor de l'activitat IKK (BAY11-7082) restableix la unió d'SMRT als promotors analitzats inhibint la seva transcripció. Finalment, el tractament amb

BAY11-7082 redueix el creixement del tumors humans implantats subcutàneament en ratolins immunosuprimits.

En resum, aquest treball demostra que  $IKK\alpha$  realitza una funció nuclear pro-tumorigènica en les cèl·lules de càncer colorectal, a través de la desrepressió de gens diana de Notch.

## 3.2 Localització anòmala d'N-CoR al citoplasma cel·lular en el càncer colorectal

Aquest article està publicat a *Cell Cycle*, Juliol 2007

Factor d'impacte: 3,314 (2007)

Categoria: *Cell Biology*, posició 68 de 150

Els corepressors nuclears NCoR i SMRT són elements clau de la regulació transcripcional, que realitzen la seva funció a través de l'associació a factors de transcripció i a altres elements repressors com les deacetilases d'histones. Tot i la seva gran homologia estructural, la funció fisiològica d'N-CoR no pot ser substituïda per SMRT, com ho demostra el fenotip letal del ratolí mutant per N-CoR (Jepsen et al., 2000).

Un dels mecanismes que regulen la funció dels complexos repressors és l'export citoplasmàtic mediat per les proteïnes 14-3-3 d'alguns dels seus components (Aguilera et al., 2006; Hoberg et al., 2004; McKinsey et al., 2000; McKinsey et al., 2001).

Les proteïnes 14-3-3 s'uneixen als seus substrats a través de la seqüència RK<sub>p</sub>SKSP, on p<sub>S</sub> representa una serina fosforilada. Resultats previs del nostre laboratori demostren que la IKK $\alpha$  de cèl·lules de càncer colorectal fosforila SMRT creant un lloc de reconeixement per les 14-3-3 (Fernandez-Majada et al., 2007).

En el treball que es presenta a continuació, demostrem que l'activitat IKK $\alpha$  nuclear de cèl·lules de càncer de còlon fosforila les serines 2345 i 2348 del corepressor N-CoR, creant un lloc d'unió funcional per a les proteïnes 14-3-3 (R<sub>p</sub>S<sub>2348</sub>KSP). Pel contrari, la inhibició de l'activitat IKK en aquestes cèl·lules, mitjançant l'ús de l'inhibidor BAY11-7082, impedeix aquesta unió.

L'anàlisi immunohistoquímic de mostres de tumors primaris de còlon demostra que el repressor N-CoR es troba exclòs del nucli en el 98% dels cassos estudiats (42 de 43), mentre que la seva distribució és nuclear en totes les mucoses normals de còlon analitzades (30 de 31).

Aquests resultats demostren que l'activitat IKK és la responsable d'induir la localització citoplasmàtica de repressors transcripcionals en els tumors colorectals, fet que es dona en pràcticament totes les mostres analitzades. Això suggereix que la inhibició específica d'aquesta activitat IKK pot tenir importants implicacions terapèutiques.

### 3.3 Les cèl·lules de càncer colorectal expressen una isoforma tumorigènica d'IKK $\alpha$ nuclear que fosforila específicament repressors nuclears

Aquest article no està publicat

En els treballs que s'acaben d'explicar es demostra que en el càncer colorectal existeix una activació aberrant de la IKK $\alpha$  a nivell nuclear, que fosforila als co-repressors SMRT i N-CoR. Aquesta fosforilació provoca l'exportació citoplasmàtica d'aquests co-repressors, i induïx la desrepressió transcripcional de diferents gens, entre els quals es troben gens diana de Notch. Els efectes funcionals d'aquesta desrepressió són un increment de la proliferació i una inhibició de l'apoptosi de les cèl·lules tumorals (Fernandez-Majada et al., 2007; Fernandez-Majada et al., 2007b).

La darrera part de la meua tesi, s'ha focalitzat en determinar els mecanismes moleculars que induïxen l'activació de les funcions pro-tumorigèniques de la IKK $\alpha$  en el càncer colorectal. Els resultats obtinguts fins al moment indiquen que les cèl·lules de càncer de còlon expressen una forma truncada d'IKK $\alpha$ , de 45kD (p45/IKK $\alpha$ ), a la qual li manquen els dominis reguladors de C-terminal, però conserva el domini quinasa intacte. Aquesta forma està fosforilada en el residu 176-180 i es localitza en el nucli, de fet representa la major part de la IKK $\alpha$  fosforilada que tenen les cèl·lules de càncer de còlon a nivell nuclear.

Els nostres resultats prèvis suggereixen que la forma truncada de la IKK $\alpha$  és el resultat de la degradació parcial pel proteosoma, dependent de la prèvia ubiquïtinació per  $\beta$ -TrCP, de la IKK $\alpha$  sencera. Les característiques bioquímiques de la p45/IKK $\alpha$  difereixen de les de la IKK $\alpha$  sencera, i això determina que les seves funcions biològiques siguin també diferents. En aquest sentit, pensem que mentre la IKK $\alpha$  sencera és la que forma part del complex de les quinases reguladores de la via NF $\kappa$ B, la p45/IKK $\alpha$  és la responsable de la fosforilació de repressors nuclears. Més important encara, la forma truncada d'IKK $\alpha$ , però no la IKK $\alpha$  sencera, coopera en la transformació de cèl·lules NIH-3T3 mediada per k-ras.

## **Colorectal Cancer Cells Contain a Tumorigenic Nuclear Form of IKK $\alpha$ that specifically phosphorylates nuclear corepressors**

Fernández-Majada V<sup>1</sup>, Margalef P<sup>1</sup>, Mulero M<sup>1</sup>, Capella G<sup>2</sup>, Mayo M.W<sup>3</sup>, Bigas A\*<sup>1§</sup>, Espinosa LI<sup>1\*§</sup>

<sup>1</sup>Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques, IMIM. Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Laboratori de Recerca Translacional, IDIBELL-Institut Català de Oncologia Gran Via km 2.7, Hospitalet, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and Molecular Genetics. The University of Virginia. Charlottesville, Virginia 22908

§ These authors contributed equally to this work

\* Corresponding authors

Mailing address: Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques.  
Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona. Dr Aiguader 88  
08003. Barcelona. Spain  
Phone: 932 607 404  
Fax: 932 607 426  
e-mail: [abigas@imim.es](mailto:abigas@imim.es)  
e-mail: [lespinosa@imim.es](mailto:lespinosa@imim.es)

## Abstract

Multiple NF $\kappa$ B-independent functions for nuclear IKK $\alpha$  kinase have been recently identified including phosphorylation of the histone H3 (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003) and the Nuclear Corepressors SMRT (Fernandez-Majada et al., 2007; Hoberg et al., 2004) and N-CoR (Fernandez-Majada et al., 2007b). However, what dictates the cytosolic or the different nuclear functions of IKK $\alpha$  protein remains to be elucidated.

Here we show the existence of a novel IKK $\alpha$  isoform with a predicted molecular weight of 45kD (p45/IKK $\alpha$ ) that contains a functional N-terminal kinase domain but lacks several regulatory domains at the C-terminal end. Processing of full length IKK $\alpha$  protein results in the 45kD isoform, which corresponds to the majority of the phosphorylated IKK $\alpha$  (in residues 176 and 180) found in the nucleus of tumor cells. At the functional level, p45/IKK $\alpha$  fails to bind specific IKK $\alpha$  partners such as IKK $\beta$  or histone H3, but interacts with full length non-phosphorylated IKK $\alpha$  and NEMO. In addition, it is unable to phosphorylate some of the full-length IKK $\alpha$  substrates including p100 or serine 536 of p65 whereas efficiently phosphorylates SMRT and N-CoR. In contrast to that observed with full length IKK $\alpha$ , ectopic expression of p45/IKK $\alpha$  cooperates with k-ras to transform NIH-3T3 cells supporting the idea that p45/IKK $\alpha$  plays a tumorigenic role in the intestine.

## Introduction

NF $\kappa$ B is a transcription factor that participates in the regulation of innate and acquired immune responses as well as in inflammation and cancer (Hayden and Ghosh, 2004; Hayden et al., 2006; Schulze-Luehrmann and Ghosh, 2006). In the absence of stimulation, NF $\kappa$ B dimers are retained in the cytoplasm bound to the inhibitors I $\kappa$ B (*Inhibitor of  $\kappa$ B*), that mask their NLS motifs. Induction of the classical NF $\kappa$ B pathway by specific stimuli such as TNF $\alpha$  or LPS induces the activation of the IKK (*I $\kappa$ B Kinase*) complex that phosphorylates I $\kappa$ B in two specific serine residues (serines 32 and 36 for I $\kappa$ B $\alpha$ ). Phosphorylation of I $\kappa$ B triggers its  $\beta$ -TrCP-dependent ubiquitination that leads to proteasomal degradation and NF $\kappa$ B release. In the absence of I $\kappa$ B-binding, NF $\kappa$ B dimers (mainly p65-p50) translocate to the nucleus to associate with- and activate specific target-genes. The IKK complex is composed by two catalytic subunits, called IKK $\alpha$ /IKK1 and IKK $\beta$ /IKK2, and the regulatory element IKK $\gamma$ /NEMO (for NF $\kappa$ B Essential Modifier). The molecular weight of IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  is 85 and 87kD respectively, and they share 50% of aminoacid identity and 70% of structural similarity. Both, IKK $\alpha$  and  $\beta$  contains a kinase domain in the amino-terminal half (KD) a Leuzine Zipper (LZ) region involved in protein dimerization and a Helix-Loop-Helix (HLH) in the C-terminus (DiDonato et al., 1997; Zandi et al., 1997). By using cells deficient for the different IKK homologues it has been demonstrated that IKK $\beta$  and NEMO are essential regulators of I $\kappa$ B degradation, and consequently of the classical NF $\kappa$ B activation, whereas IKK $\alpha$  is crucial for alternative NF $\kappa$ B activation that is mediated by p100 processing. Specific stimuli such as LT $\beta$ , CD40 or BAFF induces IKK $\alpha$ -dependent phosphorylation of p100 that results in its ubiquitination and partial proteasomal degradation to p52. This leads to the translocation of p52-RelB complexes into the nuclear compartment to activate specific NF $\kappa$ B target genes (Senftleben et al., 2001).

Recently, NF $\kappa$ B independent functions for specific elements of the pathway have been identified. For example, TNF $\alpha$ , LPS or EGF promote the association of IKK $\alpha$  to the chromatin of specific promoter regions where it phosphorylates serine10 of H3. This phosphorylation modifies chromatin condensation and facilitates transcriptional activation of both NF $\kappa$ B-dependent and NF $\kappa$ B-independent genes (Anest et al., 2004; Anest et al., 2003; Park et al., 2005; Yamamoto et al., 2003). In addition, IKK $\alpha$  regulates cell cycle progression by phosphorylating the Aurora A kinase (Prajapati et al., 2006) or by facilitating the expression of 14-3-3 $\sigma$  (Zhu et al., 2007). Recently, it has been shown that an important metastasis-related gene, *Maspin*, is also regulated by IKK $\alpha$  (Luo et al., 2007). In prostate cancer cells, IKK $\alpha$  activates *ciap2* and *il-8* transcription through phosphorylation of the nuclear corepressor SMRT (*Silencing Mediator of Retinic acid Thyroid Hormone receptor*) at serine 2410 thus inducing its release from the chromatin and its cytoplasmic export (Hoberg et al., 2004). Previous work from our group demonstrated that the same mechanism is operating in colorectal cancer cells (Fernandez-Majada et al., 2007). Specifically, we found that nuclear IKK $\alpha$  phosphorylates SMRT and N-CoR leading to the activation of Notch-target genes such as *hes1* and *herp2*. Moreover, inhibition of IKK activity was sufficient to

revert Notch-target gene expression to the normal levels and to prevent tumor growth in animal models (Fernandez-Majada et al., 2007; Fernandez-Majada et al., 2007b).

NF $\kappa$ B activation and cancer have been previously and extensively linked. First of all, NF $\kappa$ B is a key element in the regulation of inflammation, which is responsible for at least a 20% of the reported cancers. Moreover, NF $\kappa$ B regulates cell proliferation, angiogenesis, apoptosis and metastasis in several systems (Aggarwal, 2004). For these reasons, NF $\kappa$ B has been proposed as an important target for anticancer therapies. Multiple compounds possess the ability to inhibit NF $\kappa$ B including the glucocorticoids, antioxidants, proteasome inhibitors, soluble TNF $\alpha$  receptors and antibodies as well as specific IKK inhibitors (reviewed in Sun and Karin, 2008), and some of them are being used not only in animal models but also in clinical trials (Egberts et al., 2008; Lee and Hung, 2008; Madhusudan et al., 2004; Maisey, 2007). Nevertheless, IKK activity is required for multiple physiological functions including activation of the immune response or the maintenance of lymph node and skin differentiation (Liu et al., 2006; Marinari et al., 2008), and its inhibition or abrogation results in undesired side effects. For example, deletion of IKK $\beta$  in the murine hepatocytes increases the number and size of tumors induced by the procarcinogen diethylnitrosamine (DEN) (Maeda et al., 2005). In a model of inflammation induced by ischemia, specific deletion of IKK $\beta$  in the enterocytes prevents the normal systemic inflammatory response but induces a massive damage of the intestinal mucosa (Chen et al., 2003). Moreover, elimination of IKK $\beta$  activity either genetically or pharmacologically enhances the inflammatory response (instead of attenuate it), due to increased secretion of IL1 $\beta$  by macrophages and neutrophils (Greten et al., 2007). For these reasons it is critical to define the traits that distinguish the beneficial IKK functions from those that contribute to disease, including cancer, to selectively inhibit this pathway for therapeutical interventions.

We here show that CRC cells contain a truncated form of IKK $\alpha$  that when is activated preferentially localizes in the nucleus and differs from the full-length form in several biochemical and functional properties. This truncated IKK $\alpha$  does not participate in the activation of NF $\kappa$ B but displays specific activities that have been associated with cancer such as phosphorylation of the nuclear corepressors N-CoR and SMRT. Moreover, expression of p45/IKK $\alpha$ , but not of full-length IKK $\alpha$ , increases the transformation capacity of k-ras in NIH-3T3.



## Experimental Procedures

### Plasmids

Expression vector for HA-IKK $\alpha$ , HA-IKK $\alpha_{AA}$ , HA-IKK $\alpha_{EE}$ , and HA-IKK $\beta$  were a gift from Dr. M.Karin Lab. The expression plasmids HA-IKK $\alpha_{\Delta H}$  and MT-IKK $\alpha_{\Delta LH}$  were constructed by inserting the PCR-amplified corresponding region, using a HA-IKK $\alpha$  construct as a template, into the mammalian expression vectors pcDNA3.1 and pcS2-MT (Invitrogen) respectively. GST-N-CoR was generated by PCR and cloned in-frame into a PGEX-5X-1 vector (Pharmacia). The expression vector k-ras $V_{12D}$  was a gift from Dr. G.Capellà Lab.

### Antibodies

$\alpha$ -I $\kappa$ B $\alpha$  (sc-1643),  $\alpha$ -p65 (sc-109),  $\alpha$ -IKK $\beta$  (sc-7330),  $\alpha$ -HDAC1 (sc-7872),  $\alpha$ -IKK $\gamma$  (sc-8330),  $\alpha$ -PCNA (sc-56), were purchased from Santa Cruz Biotechnology.  $\alpha$ -IKK $\alpha$  (op-133) from Oncogen.  $\alpha$ -P-IKK $\alpha$ -Ser180/IKK $\beta$ -Ser181 (2681),  $\alpha$ -P-IKK $\alpha$ -Ser176,180/IKK $\beta$ -Ser177,181 (2697S),  $\alpha$ -IKK $\alpha$  (2682),  $\alpha$ -P-I $\kappa$ B $\alpha_{32-36}$  (92465),  $\alpha$ -p65 (pS536) (3031S) from Cell Signaling.  $\alpha$ -SMRT(06-891),  $\alpha$ -Ac-K9-H3 (9441S), from Upstate.  $\alpha$ - $\gamma$ tubulin from Sigma.  $\alpha$ -HA (12CA5) from Covance.  $\alpha$ -MT (9E10). The phosphospecific SMRT antibody  $\alpha$ -pS2410 has been previously described (Hoberg et al., 2004)

### Cell lines and culture reagents.

Cell lines used in this study were: HEK-293T, NIH-3T3, HS27, HCT-116, SW480, Ls-174, HT-29 and CCR19. Cells were grown using standard culture techniques, in DMEM 10% FBS. Human TNF $\alpha$  is from Preprotech and is used at 40 ng/ml. siRNA against exon2 of IKK $\alpha$  is from Ambion and is used a 100nM

### Western Blotting

A protein lysate (80-100 $\mu$ g) was subjected to 9-10% SDS/PAGE. The separated proteins were transferred to an immobilon-P transfer membrane (Millipore) and blotted with the indicated antibodies to the recommended concentration.

### Cell fractionation

Nuclei were isolated in 0.1% NP-40/PBS for 5 min. on ice, followed by centrifugation at 1900 rpm and were lysed for 30 min in 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 5mM EGTA, 5mM EDTA, 20mM NaF and complete protease inhibitor cocktail (Roche). The supernatant was the cytoplasmic fraction.

### **Immunoprecipitation assay of endogenous protein**

Cells were lysates for 30 min. at 4°C in 300µl of PBS containing 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 100 mM Na-orthovanadate, 0.25 mM PMSF and complete protease inhibitor cocktail (Roche). After centrifugation, supernatants were pre-cleared for 2h. twice with 1% of BSA, 1µg of irrelevant IgGs and 50µl ProteinA-sepharose beads, for each sample. The pre-cleared lysates were incubated O/N with 2-4 µg of indicated antibodies. Next day ProteinA-sepharose beads were added to the lysed and after 2h., the beads were extensively washed with the precipitation buffer and samples were assayed by western blot.

### **Immunoprecipitation assay of transfected tagged-proteins**

Cells were lysed for 30 min. at 4°C in 500 µl of IPP buffer (10mM Tris pH:8, 500mM NaCl, 0,1% NP40, 5mM EDTA, 50mM NaF, 1mM PMSF, 10µg/ml Leupeptin and 10µg/ml Aprotinin). After centrifugation, supernatants were incubated for 3h. at 4°C with 1-2µg of indicated antibody coupled to ProteinA-sepharose beads. Beads were extensively washed with the precipitation buffer and samples were assayed by western blot.

### **Pull-Down Assay**

GST fusion proteins were purified from *Escherichia Coli* BL-21 strain in a buffer containing 20mM Tris-HCl pH:7.4, 1M NaCl, 0,2mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 1mg/ml lysozyme, 1mM PMSF, and a protease inhibitor complex (Roche) and bound to glutathione-Sepharose (Amersham-Biosciences). Sepharose beads with GST fusion proteins were first blocked with untransfected HEK-293T cell lysates by 1h. of incubation at 4°C and then incubated with 400ug of HEK-293T-transfected cell lysates in a buffer containing 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 5mM EGTA, 5mM EDTA, 20mM NaF, and protease inhibitor complex (Roche). The reaction was incubated for 2h at 4°C and then washed six times with the same buffer. Bound proteins were analyzed by western blot.

### **ChIP Assay**

Chromatin from crosslinked cells was sonicated, pre-cleared, incubated overnight with the indicated antibodies in RIPA buffer, and precipitated with protein G/A-Sepharose. Cross-linkage of the coprecipitated DNA-protein complexes was reversed, and DNA was used as a template for semiquantitative PCR.

### **Detection of Mutations of *IKKα***

PCR primers (5'-GTAAAGTGTGGGCTGAAGCAGTG-3' and 5'-AATGGCACGCTGTTCCAGAG-3') flanking intron 14 and 15 of the human *IKKα* gene were used to generate a genomic DNA fragment. An expanded high-fidelity Taq-polymerase (*pfuTurbo*, from Stratagene), was used for the PCR. The PCR products were subcloned into PGEM-T vectors (Promega) and sequenced.

### **Gel filtration assay on a Superdex S200 column**

One hundred microliters of HCT116 nuclear extract were directly load onto a Superdex S200 gel filtration column (GE Healthcare) equilibrated with buffer A containing 500mM of NaCl and eluted with the same buffer. One drop (40 microliters approximately) per fraction was collected, and half of it was run in a gel and analyzed by western blot.

### **Protein Kinase assay**

Nuclei from cells were isolated and lysed for 30min at 4°C in 300µl of PBS containing 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 100 mM Na-orthovanadate, 0.25 mM PMSF and complete protease inhibitor cocktail (Roche). After centrifugation, supernatants were load in a Superdex S200 column. Fraction 1 (containing fractions 19-27) and Fraction 2 (containing 36-45) eluted from the column were pre-cleared for 1h and incubated with 3 µg of  $\alpha$ -IKK $\alpha$  or  $\alpha$ -P-IKK $\alpha$ / $\beta$  overnight at 4°C. After incubation with ProteinA-Sepharose beads during 2h, precipitates were washed and assayed for kinase activity on GST-N-CoR and GST-SMRT fusion proteins. The kinase reaction was performed 30 minutes at 30°C in the following buffer: 20mM Tris pH 7,5, 5mM MgCl<sub>2</sub> and 1mM DTT.

## Results

### CRC cells express a nuclear form of IKK $\alpha$ of 45kD

Activation of both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  relies on the phosphorylation status of two specific serines located in their activation loop. These residues correspond to serines 176 and 180 of IKK $\alpha$  and serines 177 and 181 of IKK $\beta$ . By subcellular fractionation followed by western blot analysis, we determined the activation status and the subcellular distribution of the IKK proteins in different CRC cell lines (HCT116, SW480, Ls-174T i HT-29) compared with the human non-transformed HS27 fibroblasts. Immunodetection with an antibody that recognizes phosphorylated serines 180/181 of IKK $\alpha$  and  $\beta$  ( $\alpha$ -P-IKKs) respectively, demonstrated that phosphorylated full-length IKK $\alpha/\beta$  (with a MW of 85 and 87kD) is mainly localized in the cytoplasm, similar to that observed with the antibodies detecting total IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ . Although some nuclear P-IKK was also found in SW480 and HT29 cell lines. Interestingly, the  $\alpha$ -P-IKK antibody identified an additional band of an apparent MW of 45kD that was predominantly nuclear and exclusive of the tumor cell lines (Fig.1A, upper panel). A band with the same MW was detected with even higher affinity by a different antibody recognizing the two phosphorylated serines in the activation loop of IKK ( $\alpha$ -P-IKKss) (Fig.1A), and in high exposure experiments with the specific  $\alpha$ -IKK $\alpha$  antibody. These results suggest the existence of a 45kD form of the IKK proteins, most likely IKK $\alpha$ , which is nuclear and phosphorylated in both serines of the activation loop. To further demonstrate that the 45kD band recognized by the  $\alpha$ -P-IKK antibodies was actually a phosphorylated protein, we repeated the western-blot analysis with nuclear extracts from HCT-116 previously treated with calf intestinal phosphatase (CIAP). In figure 1B we show that CIAP treatment strongly diminishes the levels of this band as detected by the  $\alpha$ -P-IKKs antibody (Fig.1B), as expected. PCNA is shown as nuclear loading control.

Since  $\alpha$ -P-IKK antibodies do not distinguish between IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  homologues, western-blot analysis with the specific  $\alpha$ -IKK $\alpha$  and  $\alpha$ -IKK $\beta$  antibodies suggested that IKK $\alpha$  was the only nuclear IKK. To confirm that the phosphorylated 45kD band corresponds to IKK $\alpha$ , we transfected HCT-116 with a siRNA against exon 2 of IKK $\alpha$  and determined its presence with the  $\alpha$ -P-IKKs antibody. Our results indicated that specific siRNA against IKK $\alpha$ , that partially reduces the full length form of 85kD, completely abolishes the 45kD-P-IKK band (Fig.1C), thus indicating that it corresponds to phosphorylated IKK $\alpha$ . In addition, by western blot analysis using cell extracts from different IKK-deficient embryonic fibroblasts (MEF), we detected a 45kD band recognized by the  $\alpha$ -IKK $\alpha$  antibody, corresponding to that found in the HCT-116 cells, that was specifically absent in the IKK $\alpha$  knockouts (Fig.1D). However, the antibody against phosphorylated IKKs failed to recognize the 45kD-IKK $\alpha$  band present in the embryonic fibroblasts (not shown), suggesting that phosphorylation or activation of the nuclear IKK $\alpha$  form was a regulated event. In agreement with this, TNF $\alpha$  treatment increased the amount of 45kD-P-IKK $\alpha$  in a time-dependent manner (Fig.1E). Together these results indicate that the phosphorylated band of 45kD, present in the nucleus of CRC cells correspond to IKK $\alpha$  (from now p45/IKK $\alpha$ ), however this protein can be found in an inactive form in embryonic fibroblasts. This new P-p45/IKK $\alpha$  form is induced by TNF $\alpha$  treatment

and represents the majority of the active IKK (as measured by the  $\alpha$ -P-IKKs antibody) in the nuclear compartment of the colorectal cancer cells.

We next determined whether P-p45/IKK $\alpha$  in the CRC cells was generated by mutations in the IKK $\alpha$  sequence. We focused in the study of exons 14 and 15 since mutations in this region have been previously identified in human Squamous Cell Carcinoma (Liu et al., 2006) and they could translate in a truncated protein around 45kD. By RT-PCR, we amplified the area flanking exons 14 and 15 from RNA isolated from four different CRC cell lines (HCT116, SW480, Ls-174T and CCR19-V1), five primary colorectal tumor samples (identified as #T), three human colorectal tumors grown in athymic mice (CRC#-X), and four tumours from FAP patients (familial adenomatous polyposis) (FAP#). As a control, we used three different samples from normal mucosa (identified as #N) and the non-transformed HS27 cells. By sequencing the different fragments, we found a small number of mutations in some of the clones from tumor samples (summarized in Table 1), which mapped in the Leuzine Zipper domain of IKK $\alpha$  and some were consistent with the generation of a predicted protein of 50kD. The mutations include nucleotide insertions that generate premature STOP codons. Of particular interest is the deletion of exon 14 that was found in CRC8-X, which resulted in a frame shift that generates a STOP codon at position AA520. Nevertheless, in the vast majority of the analyzed samples, including SW480, Ls-174T and CCR19, we did not find any modification of the wild type sequence, suggesting that somatic mutations do not explain the presence of truncated P-IKK $\alpha$  in the nucleus of these cells.

#### **p45/IKK $\alpha$ form of IKK $\alpha$ can be generated from the full-length IKK $\alpha$ protein**

We next tested the possibility that p45/IKK $\alpha$  was generated by proteolytic processing of the full-length IKK $\alpha$  (FL-IKK $\alpha$ ). To do this, we obtained HCT-116 clones that stably express the full-length IKK $\alpha$  fused to the hemagglutinin epitope (HA) in the N-terminal end and analyzed them by western blot. Our results demonstrated that the fusion protein HA-IKK $\alpha$  was partially processed into a truncated form of around 45kD detected with the  $\alpha$ -HA antibody (Fig.2A). This band migrated together with the endogenous 45kD band from nuclear HCT116 extracts (Fig.2B). Moreover, analysis of immunoprecipitated HA-IKK $\alpha$ , using a  $\alpha$ -HA antibody, with the specific  $\alpha$ -IKK $\alpha$  antibody indicated that the 45kD band corresponds to the N-terminal part of the IKK $\alpha$  protein (Fig.2D). Interestingly, mutations in the serines 176 and 180 into alanines (S176/180A) or glutamic acid (S176/180E) did not impair the processing of HA-IKK $\alpha$  suggesting that is not dependent on the activation status (Fig.2C).

Together, these results indicate that proteolytic processing of the full-length IKK $\alpha$  generates a 45kD form found in CRC cells.

### Truncated IKK $\alpha$ displays different functional characteristic than the full-length form

To study the biochemical features of p45/IKK $\alpha$ , we generated two different fragments of IKK $\alpha$ , one that includes the N-terminal part of the protein, but lacks the HLH domain (HA-IKK $\alpha$  $\Delta$ H) and another one that lacks the HLH plus the LZ domains (MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH). Next, we transfected HEK-293T with full-length IKK $\alpha$  (HA-IKK $\alpha$ ) or the truncated constructs and performed coprecipitation experiments with the  $\alpha$ -HA or the  $\alpha$ -MT antibody. Western blot analysis of the immunoprecipitates demonstrated that both MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH (not shown) and HA-IKK $\alpha$  $\Delta$ H failed to interact with IKK $\beta$  and p100 compared with HA-IKK $\alpha$  (Fig.3A). To test whether the truncated IKK $\alpha$  could dimerize with full-length IKK $\alpha$  we co-transfected HEK-293T with MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH together with HA-IKK $\alpha$  or HA-IKK $\beta$  and precipitated the lysates with the  $\alpha$ -HA antibody. By western blot analysis, we found that MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH coprecipitated with HA-IKK $\alpha$  together with endogenous NEMO but not with endogenous IKK $\beta$  (Fig.3B), suggesting that p45/IKK $\alpha$  is in a complex with full-length IKK $\alpha$  and NEMO. To further validate this possibility we performed gel filtration experiments in Superdex S200 columns from Ls-174T (not shown) and HCT-116 (Fig.3C) nuclear extracts. By western blot analysis, we found that P-p45/IKK $\alpha$  co-eluted with the non-phosphorylated IKK $\alpha$  and NEMO in the high molecular weight fractions (larger than 210kD), in agreement with the results obtained in the coprecipitation experiments and strongly suggesting that P-p45/IKK $\alpha$  is in a complex with full length non-phosphorylated IKK $\alpha$  and NEMO. Surprisingly, full-length P-IKK $\alpha$  was recovered in fractions 38-45 likely corresponding to monomeric IKK (Fig.3C).

We have previously published that nuclear IKK $\alpha$  from CRC cells phosphorylates SMRT and N-CoR corepressors leading to aberrant Notch-dependent gene activation (Fernandez-Majada et al., 2007; Fernandez-Majada et al., 2007b). To determine which P-IKK $\alpha$  form (the full-length or the truncated) was responsible for this tumor-associated function, we immunoprecipitated P-IKK $\alpha$  from fractions 19-25 and fractions 38-45, with either the  $\alpha$ -IKK $\alpha$  or the  $\alpha$ -P-IKK antibodies, and assayed the precipitates for their ability to phosphorylate GST-SMRT (not shown) or GST-N-CoR (Fig.3D). *In vitro*, the only P-IKK $\alpha$  capable of phosphorylating both N-CoR (Fig.3D) and SMRT (not shown) was the one from fractions 19-25 where only the P-p45/IKK $\alpha$  is detected. In contrast, we did not detect any IKK kinase activity on SMRT or N-CoR in fractions 38-45 corresponding to 85kD-P-IKK $\alpha$  elutes (Fig.3D). Together, these results strongly suggest that P-p45/IKK $\alpha$  is the kinase that phosphorylates SMRT and N-CoR.

To further demonstrate that P-p45/IKK $\alpha$  was specifically involved in phosphorylating nuclear corepressors *in vivo*, we transfected HEK-293T with activated full-length P-IKK $\alpha$  (HA-IKK $\alpha$  $\Delta$ EE) or with the truncated active forms HA-IKK $\alpha$  $\Delta$ H $\Delta$ EE and MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH $\Delta$ EE, and tested their activity on different IKK $\alpha$  substrates by western blot. In agreement with the *in vitro* data, expression of the truncated MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH $\Delta$ EE led to an increase in the phosphorylation of serine 2410 of SMRT, concomitant with an increase in histone H3 acetylation. Conversely, truncated P-IKKs failed to induce phosphorylation of known IKK targets such as p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  or p100 processing to p52, compared to the 85kD form (Fig.3E). Since p65, p100 and I $\kappa$ B $\alpha$  are essentially cytoplasmic proteins, these results suggest that there is some kind of subcellular specialization that

distinguishes the kinase activities of the 85kD and the 45kD forms of IKK $\alpha$ . However, it remains to be elucidated which are the substrates of the nuclear full-length P-IKK $\alpha$  that elutes as a monomere in the Superdex S200 columns.

Recently, it has been shown that IKK $\alpha$  binds to the promoter of different genes such as *Maspin* or 14-3-3 $\sigma$  to regulate histone modifications, including phosphorylation or acetylation (Anest et al., 2004; Anest et al., 2003; Luo et al., 2007; Yamamoto et al., 2003) likely by its direct association with histone H3 (Zhu et al., 2007). By pull down and ChIP experiments, we found that truncated IKK $\alpha$  forms, but not the full-length IKK $\alpha$ , failed to bind histone H3 (Fig.4A) and to associate with the promoters of *hes5* and *clAP2* genes (Fig.4B). These results suggest that the function of nuclear full-length IKK $\alpha$  may be related with chromatin-modifications such as phosphorylation of H3.

### **Truncated P-IKK $\alpha$ enhances the tumorigenic capacity of k-ras on NIH-3T3 cells.**

To test the possibility that P-p45/IKK $\alpha$  was responsible for some of the pro-tumorigenic activities ascribed to IKK $\alpha$ , we performed a foci formation assay on NIH-3T3. We did not observe any transforming activity for none of the activated IKK $\alpha$  constructs when transfected alone. Next, we asked whether active IKK $\alpha$  forms may enhance the tumorigenic activity of the k-ras mutant, k-ras<sub>V12D</sub>. As shown in figure 5A and 5B, truncated IKK $\alpha$  (MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH<sub>EE</sub>) increases both the number and the size of the foci induced by k-ras<sub>V12D</sub> on NIH-3T3 fibroblasts. In contrast, we did not observed any cooperative effect between k-ras and activated full-length IKK $\alpha$  in three independent experiments. Of note, the expression levels of the different IKK $\alpha$ <sub>EE</sub> constructs and k-ras<sub>V12D</sub> were comparable in the same experiment (Fig.5C).

### **E3 ubiquitin ligase $\beta$ -TrCP binds to the IKK $\alpha$ protein**

Since P-p45/IKK $\alpha$  can collaborate with k-ras in tumorigenic transformation, we next investigated the mechanism underlying the processing of full-length IKK $\alpha$  to generate the 45kD form. The E3 ubiquitin ligase  $\beta$ -TrCP exert an essential role in the NF $\kappa$ B pathway inducing the total or partial proteasomal degradation of different NF $\kappa$ B family members, such as I $\kappa$ B $\alpha$  or p100. For this reason, we first determined by Co-IP experiments whether endogenous  $\beta$ -TrCP interacted with IKK $\alpha$  in HCT116 cells, untreated or treated with TNF $\alpha$ . We specifically detected endogenous IKK $\alpha$  in the  $\beta$ -TrCP precipitates that was absent in the IgG control (Fig.6A). We next search in the IKK $\alpha$  sequence for the presence of  $\beta$ -TrCP binding consensus (DpSG $\psi$ XpS, being pS a phosphorylated serine and  $\psi$  a hydrophobic aminoacid) (see Fig.6B), and identified several putative sites distributed along the protein (Fig.6C). As one of the consensus includes the serines 176 and 180 in the activation loop of IKK $\alpha$ , we tested whether association with  $\beta$ -TrCP was affected in the kinase dead IKK $\alpha$ <sub>SS176,180AA</sub> or the constitutively active IKK $\alpha$ <sub>SS176,180EE</sub> mutants. Our results indicate that both mutants bind to  $\beta$ -TrCP comparable to the wild type (Fig.6D), indicating that serines in the activation loop are not involved in this interaction. This is in agreement with results from figure 2C

showing that mutation of serines 176 and 180 to alanine or glutamate does not modify the stability or the processing of the full-length HA-IKK $\alpha$  protein. Although the specific  $\beta$ -TrCP binding site on IKK $\alpha$  has not been identified yet, there is at least one in the N-terminal half since the interaction with  $\beta$ -TrCP is maintained by the MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH (Fig.6E).

### **$\beta$ -TrCP induces IKK $\alpha$ ubiquitination and processing**

Since  $\beta$ -TrCP binds to the IKK $\alpha$  protein, we hypothesized that this E3 ubiquitin ligase could be involved in IKK $\alpha$  ubiquitination. We found that ectopic HA- $\beta$ -TrCP expression increases the ubiquitination of MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH and this effect is not dependent on TNF $\alpha$  treatment (Fig.7A). Conversely, a dominant negative  $\beta$ -TrCP mutant ( $\beta$ -TrCP $\Delta$ F) reduces the basal ubiquitination of MT-IKK $\alpha$  $\Delta$ LH (Fig.7B) indicating that  $\beta$ -TRCP targets the N-terminal half of IKK $\alpha$  for ubiquitination. To determine whether  $\beta$ -TrCP-mediated ubiquitination of IKK $\alpha$  plays a role in its degradation or in its processing to the 45kD form, we determined the nuclear levels of endogenous P-p45/IKK $\alpha$  in CRC cells transfected with  $\beta$ -TrCP $\Delta$ F. Our results indicated that  $\beta$ -TrCP $\Delta$ F prevents the formation of truncated P-IKK $\alpha$  in response to TNF $\alpha$  in HCT-116 cells (Fig.7C). Comparable results were obtained with the CRC19 cell line generated in our lab from a tumor xenograft (not shown).

Together our results indicate that IKK $\alpha$  gives rise to a truncated fragment of 45kD in a  $\beta$ -TRCP-dependent manner that is specifically found in its phosphorylated form in the nucleus of CRC cells. This nuclear P-p45/IKK $\alpha$  interacts and co-elutes with non-active IKK $\alpha$  and NEMO and is responsible for phosphorylating SMRT and N-CoR corepressors. Moreover, truncated IKK $\alpha$  cooperates with k-ras in cell transformation.



## Discussion

In this work we have identified a new IKK $\alpha$  form of 45kD that lacks the C-terminal regulatory domains LZ and HLH, but conserves the kinase domain and the nuclear localization signal (see scheme Fig.1F). However, whereas non-phosphorylated p45/IKK $\alpha$  is mainly cytoplasmic, when the kinase is phosphorylated in the two serines of the activation loop it localizes almost exclusively in the nucleus. Most important, we found that this truncated form represents the majority of the activated IKK in the nucleus of CRC cells.

The mechanisms that lead to the formation of this truncated IKK $\alpha$  are not completely understood. One possible mechanism is the presence of mutations, and in fact we have identified some alterations in exons 14 and 15 similar to those described in squamous cell carcinomas. However, these mutations can contribute in some extent to the presence of truncated forms of IKK $\alpha$ , but they do not explain the existence of P-p45/IKK $\alpha$  in most of the cancer cell lines that do not have any change in their sequence. Our results suggests that the main source of p45/IKK $\alpha$  is the proteolytic processing of full-length IKK $\alpha$  likely by  $\beta$ -TrCP, and we propose a mechanism similar to the one that regulates p100 processing to p52 in the alternative NF $\kappa$ B pathway. The fact that TNF $\alpha$  treatment increases the amount of P-p45/IKK $\alpha$  in tumor cells (see Fig.1E) suggest that IKK $\alpha$  processing is an inducible process or but it is also possible that the previously formed p45/IKK $\alpha$  is phosphorylated in the activation loop following stimulation. In fact, the existence of the non-phosphorylated protein in the cytoplasm of fibroblast and the ability of the IKK $\alpha_{AA}$  mutant to be processed would support the latter.

The IKK complex, including IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  and NEMO play an essential role in regulating the NF $\kappa$ B pathway. However, our results indicate that the full-length IKK $\alpha$  and the truncated IKK $\alpha$  form show different specificities. We have found that P-p45/IKK $\alpha$  is totally nuclear and for this reason is not comprised in the cytoplasmic IKK complexes that target I $\kappa$ B or p100. Nevertheless, others and we have described specific nuclear functions for IKK $\alpha$  such as phosphorylation of histone H3 and nuclear corepressors. We have now demonstrated that nuclear truncated P-IKK $\alpha$  is in a complex with IKK $\alpha$  and NEMO that is specifically involved in phosphorylating SMRT and N-CoR thus leading to changes in histone acetylation. In contrast, p45/IKK $\alpha$  failed to bind histone H3 or to associate with the chromatin of *hes5* and *cIAP2* genes in the ChIP experiments, compared with the full-length form. Our results suggest that the IKK $\alpha$  that associates with histone H3 is the full-length form that is the nucleus as a monomer, although we have not tested whether this IKK $\alpha$  is directly involved in phosphorylating serine 10 of histone H3.

Finally, although  $\beta$ -TrCP is likely involved in IKK $\alpha$  processing, more experiments need to be done to understand the mechanisms underlying the generation of p45/IKK $\alpha$ , activation by phosphorylation and the nuclear translocation of both full-length and truncated forms.

The relevance of this work resides in the characterization of a new IKK $\alpha$  form that does not participate in the NF $\kappa$ B pathway but possesses tumorigenic potential. We understand that this

finding opens the possibility of designing new therapeutical anticancer treatments, avoiding the negative effects of using general inhibitors of the IKK activity.

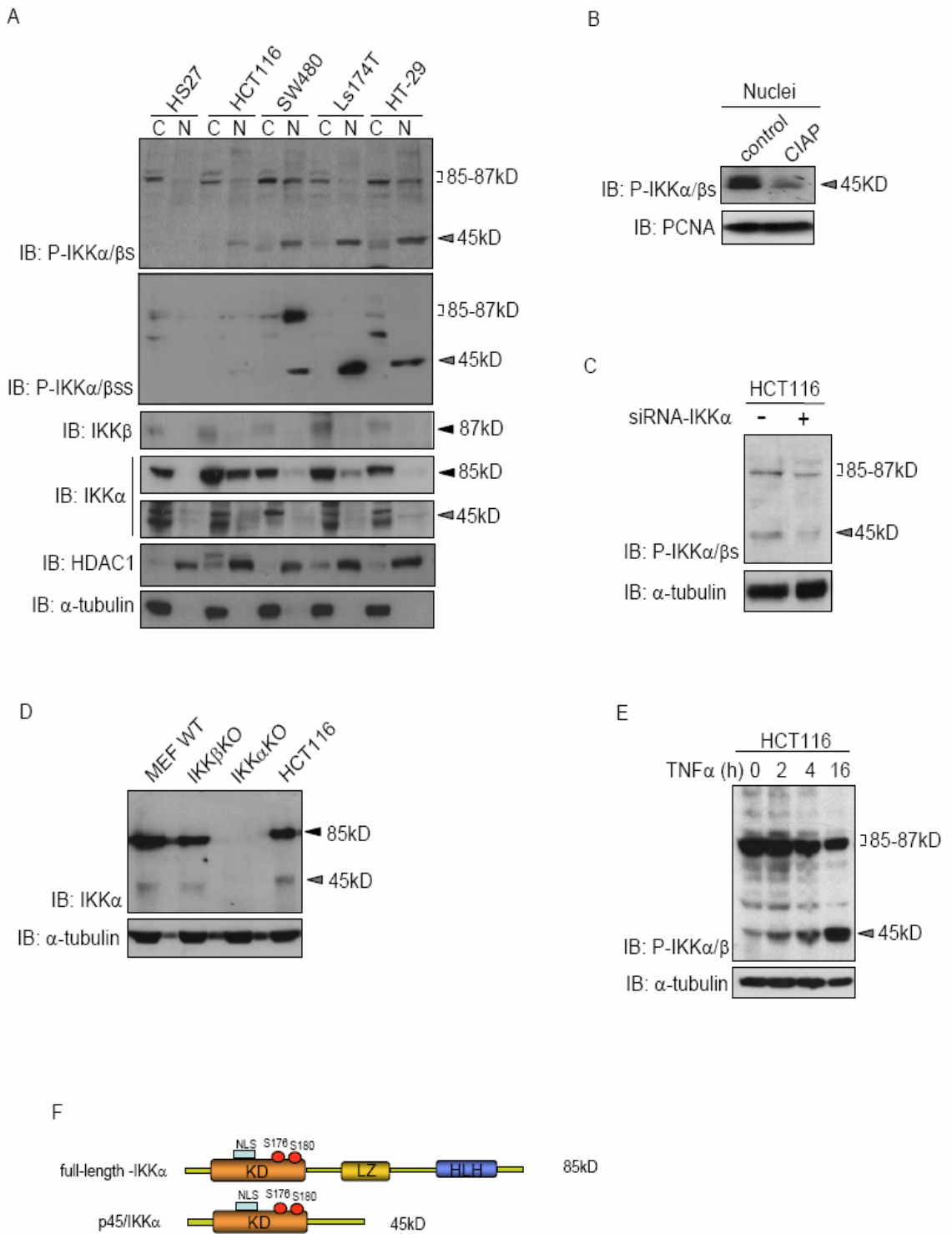
## References

- Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 6, 203-208.
- Anest, V., Cogswell, P. C., and Baldwin, A. S., Jr. (2004). I kappaB kinase alpha and p65/RelA contribute to optimal epidermal growth factor-induced c-fos gene expression independent of I kappaBalpha degradation. *J Biol Chem* 279, 31183-31189.
- Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D., and Baldwin, A. S. (2003). A nucleosomal function for I kappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* 423, 659-663.
- Chen, L. W., Egan, L., Li, Z. W., Greten, F. R., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2003). The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* 9, 575-581.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I kappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388, 548-554.
- Egberts, J. H., Cloosters, V., Noack, A., Schniewind, B., Thon, L., Klose, S., Kettler, B., von Forstner, C., Kneitz, C., Tepel, J., *et al.* (2008). Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 68, 1443-1450.
- Fernandez-Majada, V., Aguilera, C., Villanueva, A., Vilardell, F., Robert-Moreno, A., Aytes, A., Real, F. X., Capella, G., Mayo, M. W., Espinosa, L., and Bigas, A. (2007). Nuclear IKK activity leads to dysregulated notch-dependent gene expression in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 276-281.
- Fernandez-Majada, V., Pujadas, J., Vilardell, F., Capella, G., Mayo, M. W., Bigas, A., and Espinosa, L. (2007b). Aberrant cytoplasmic localization of N-CoR in colorectal tumors. *Cell Cycle* 6, 1748-1752.
- Greten, F. R., Arkan, M. C., Bollrath, J., Hsu, L. C., Goode, J., Miething, C., Goktuna, S. I., Neuenhahn, M., Fierer, J., Paxian, S., *et al.* (2007). NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 130, 918-931.
- Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224.
- Hayden, M. S., West, A. P., and Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-6780.
- Hoberg, J. E., Yeung, F., and Mayo, M. W. (2004). SMRT derepression by the I kappaB kinase alpha: a prerequisite to NF-kappaB transcription and survival. *Mol Cell* 16, 245-255.
- Lee, D. F., and Hung, M. C. (2008). Advances in targeting IKK and IKK-related kinases for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 14, 5656-5662.
- Liu, B., Park, E., Zhu, F., Bustos, T., Liu, J., Shen, J., Fischer, S. M., and Hu, Y. (2006). A critical role for I kappaB kinase alpha in the development of human and mouse squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17202-17207.
- Luo, J. L., Tan, W., Ricono, J. M., Korchynskiy, O., Zhang, M., Gonias, S. L., Cheresch, D. A., and Karin, M. (2007). Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 446, 690-694.

- Madhusudan, S., Foster, M., Muthuramalingam, S. R., Braybrooke, J. P., Wilner, S., Kaur, K., Han, C., Hoare, S., Balkwill, F., Talbot, D. C., *et al.* (2004). A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 6528-6534.
- Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H., and Karin, M. (2005). IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 121, 977-990.
- Maisey, N. (2007). Antitumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) Antibodies in the Treatment of Renal Cell Cancer. *Cancer Invest*, 1-5.
- Marinari, B., Moretti, F., Botti, E., Giustizieri, M. L., Descargues, P., Giunta, A., Stolfi, C., Ballaro, C., Papoutsaki, M., Alema, S., *et al.* (2008). The tumor suppressor activity of IKKalpha in stratified epithelia is exerted in part via the TGF-beta antiproliferative pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17091-17096.
- Park, K. J., Krishnan, V., O'Malley, B. W., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (2005). Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell* 18, 71-82.
- Prajapati, S., Tu, Z., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (2006). IKKalpha regulates the mitotic phase of the cell cycle by modulating Aurora A phosphorylation. *Cell Cycle* 5, 2371-2380.
- Schulze-Luehrmann, J., and Ghosh, S. (2006). Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 25, 701-715.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.
- Sun, B., and Karin, M. (2008). NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene* 27, 6228-6244.
- Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., and Gaynor, R. B. (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 423, 655-659.
- Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91, 243-252.
- Zhu, F., Xia, X., Liu, B., Shen, J., Hu, Y., Person, M., and Hu, Y. (2007). IKKalpha shields 14-3-3sigma, a G(2)/M cell cycle checkpoint gene, from hypermethylation, preventing its silencing. *Mol Cell* 27, 214-227.

# Figures

## Figure 1

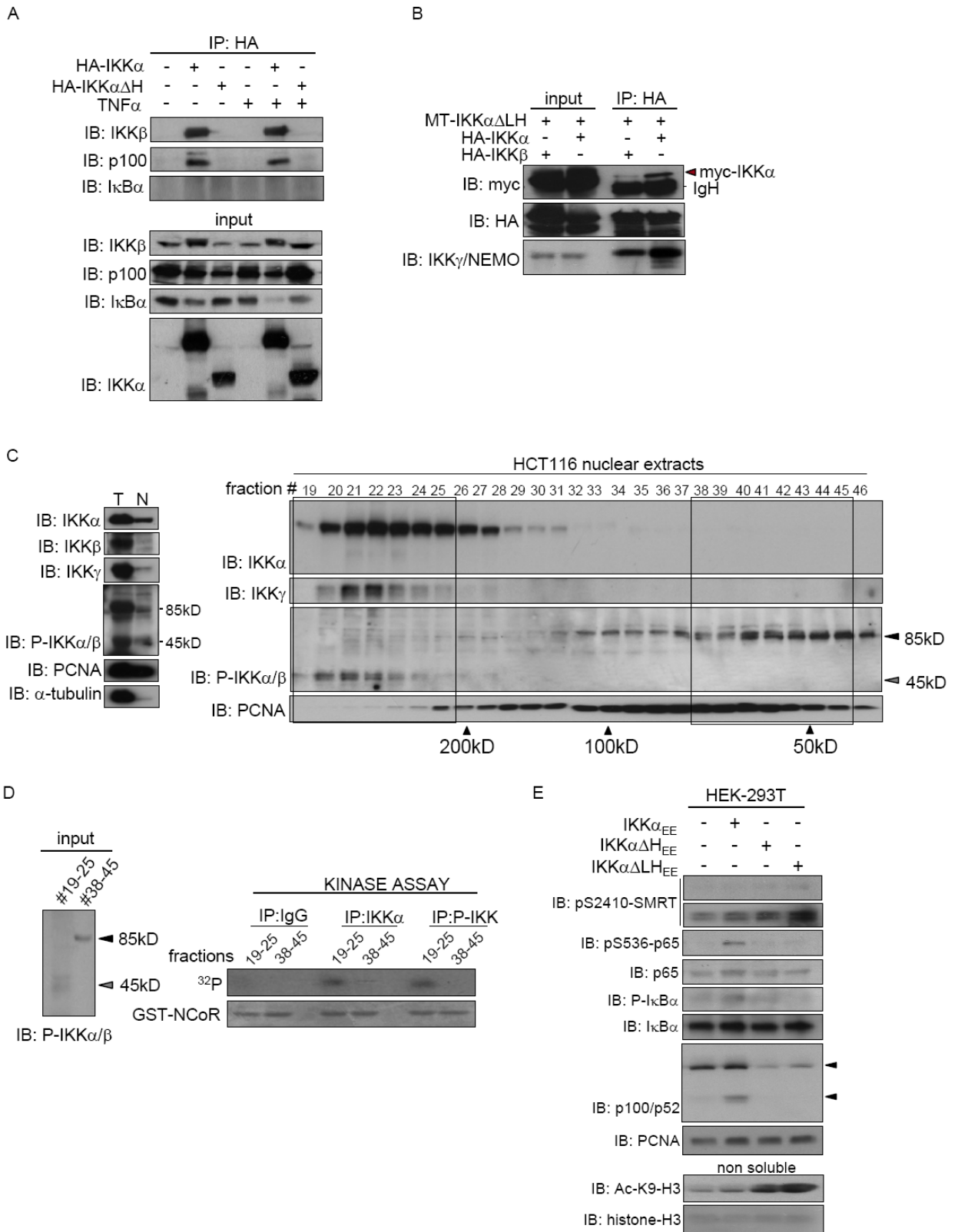


**Table1**

SAMPLE	TYPE OF MUTATION
19322N	WT sequence
17811N	WT sequence
16740N	WT sequence
17889T	K485E;A518T
19322T	A-Insertion in codon 505 that generates a premature STOP at codon 522
16740T	WT sequence
18105T	T-Insertion in codon 483 that generates a premature STOP at codon 490
17811T	WT sequence
CRC8-X	Deletion of exon 14 that generates a premature STOP at codon 520
CRC39-X	WT sequence
CRC54-X	A539T;A522S
FAP#2	L437P
FAP#3	WT sequence
FAP#4	WT sequence
FAP#6	WT sequence
Hs27	WT sequence
HCT116	Same mutation as tumor #18105
SW480	WT sequence
Ls-174T	WT sequence
CCR19	WT sequence

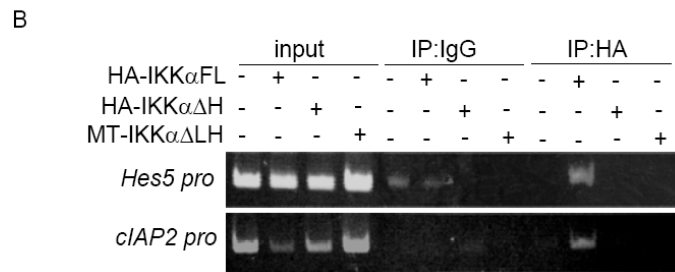
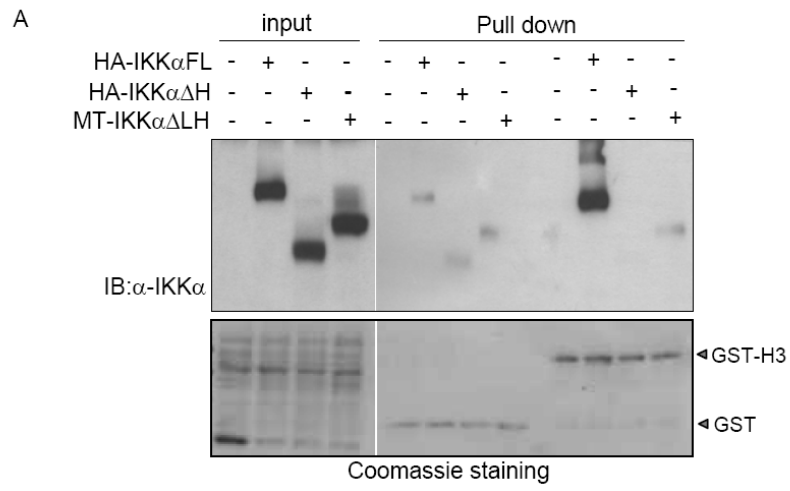


**Figure 3**

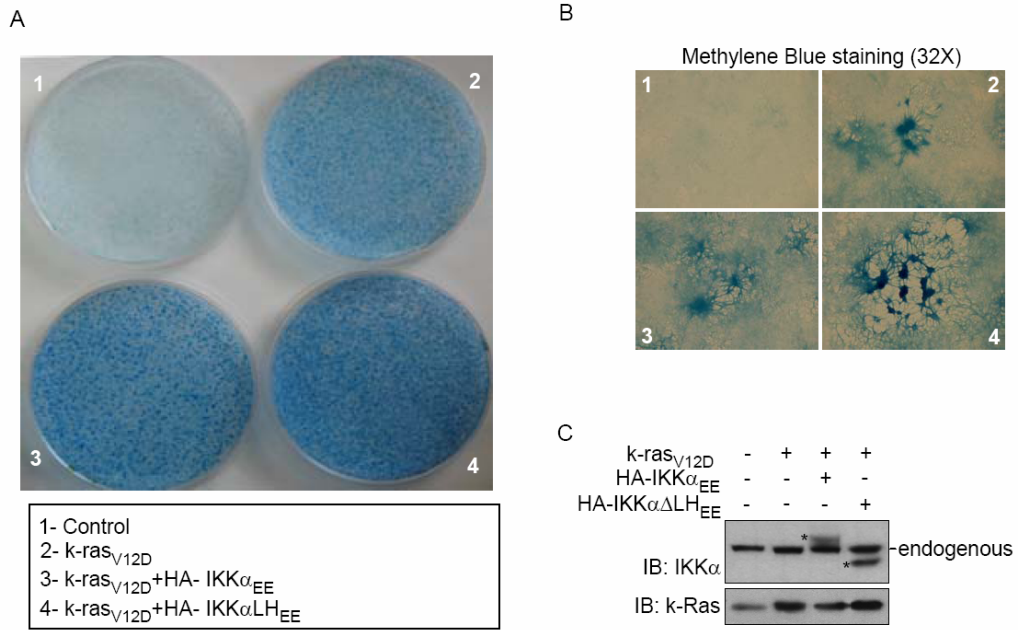




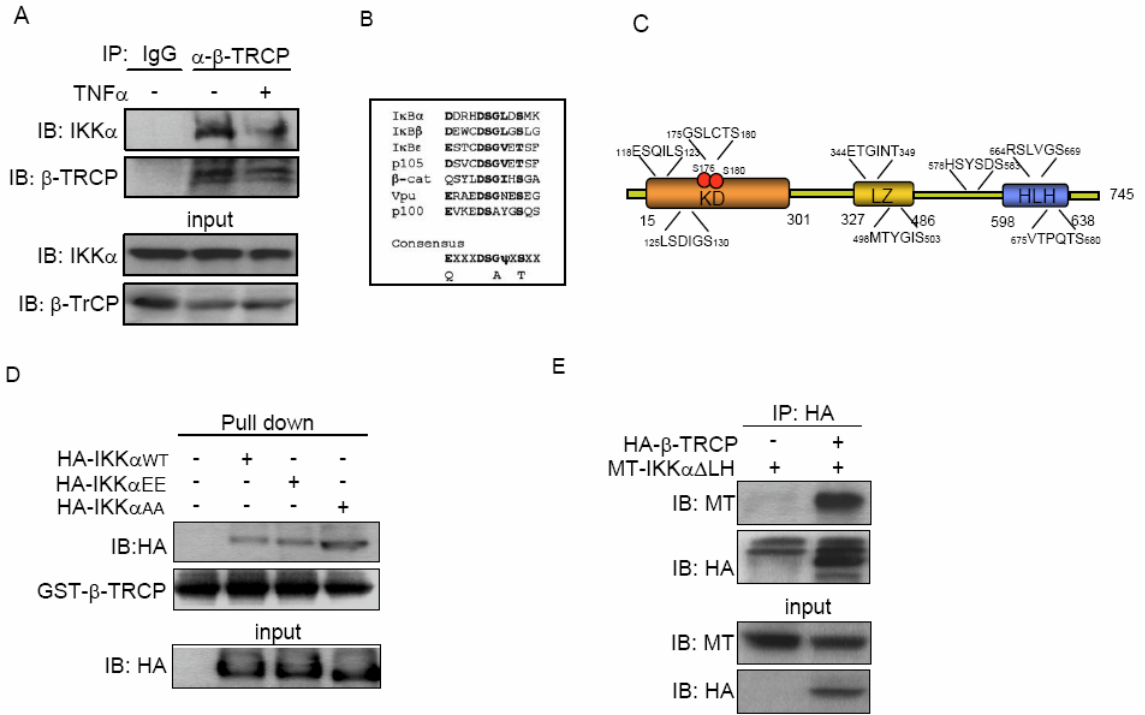
**Figure 4**



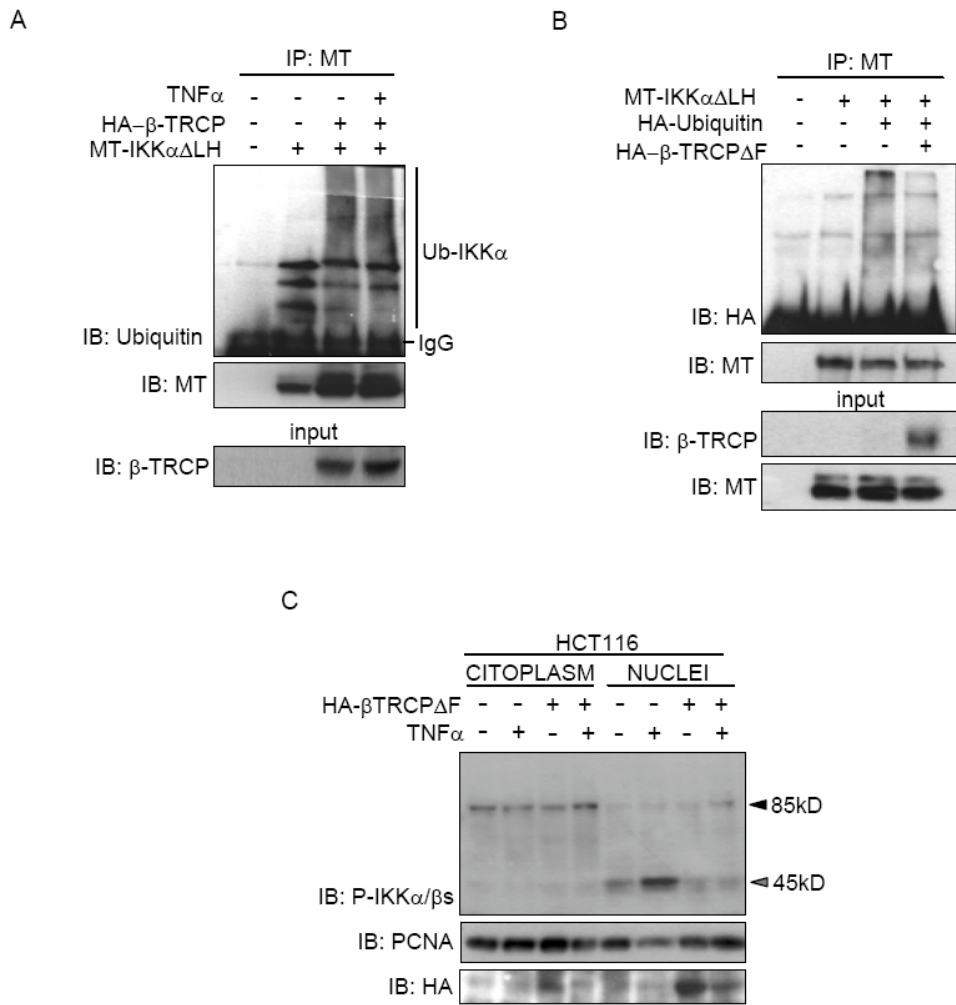
**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**



## Figures Legends

**Fig.1 Cancer Cells Express a New Nuclear IKK $\alpha$  active form.** (A) Western blot analysis of nuclear (N) and cytoplasmic (C) extracts from different tumour cell lines (HCT116, SW480, Ls174T, HT-29), comparing with the non-transformed primary human fibroblast (HS27).  $\alpha$ -HDAC1 and  $\alpha$ -tubulin were used as a fractionation and loading controls. (B) Lysates from HCT116 cells were incubated with calf intestinal phosphatase (CIAP) during 30 minutes at 30°C, then the lysates were analyzed by immunoblotting for the expression of P-IKK $\alpha/\beta$ . (C) Western blot analysis of  $\alpha$ -P-IKK $\alpha/\beta$  in total extracts of HCT116 cells transfected with a siRNA against exon2 of IKK $\alpha$ , or with a control siRNA.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. (D) Whole cell lysates from WT, IKK $\alpha^{-/-}$  and IKK $\beta^{-/-}$  MEFs were analyzed by western blot for the expression of IKK $\alpha$ . The immunoblot reveal that while WT and IKK $\beta^{-/-}$  MEFs express the two forms of IKK $\alpha$ , similar to the HCT116 cells, the IKK $\alpha$  knockout MEFs do not express neither the full length IKK $\alpha$  of 85kD nor the truncated p45kD/IKK $\alpha$ .  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. (E) HCT116 cells were treated with TNF $\alpha$  for the indicated times. Total cell lysates were obtained and analyzed by immunoblotting for the expression of P-IKK $\alpha/\beta$ . The western blot reveals that TNF $\alpha$  treatment increases the amount of truncated P-IKK while the full length P-IKK decrease.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. (F) Schemes of FL-IKK $\alpha$  and p45/IKK $\alpha$ . KD: kinase domain, LZ: Leuzin Zipper, HLH: Helix-Loop-Helix, NLS: Nuclear localization signal.

**Table.1 Analysis for the presence of mutation in the *ikk $\alpha$*  gene of different colorectal cancer samples.** Summary of the results obtained from the mutational analysis by PCR and sequencing of 14 and 15 exons of different colorectal cancer samples. (# biopsyT: Tumor from biopsy #, CRC-#X: colorectal xenograft grown in nude mice #, FAP#: tumor from a FAP patient #, and different tumor cells lines). As a negative control for the presence of mutations, different samples of normal mucosa (# biopsyN) and the non-transformed HS27 cells were used.

**Fig.2 p45/IKK $\alpha$  can be generated from the full-length IKK $\alpha$  protein.** (A) Different HCT116 stable expressing HA-IKK $\alpha$  clones were generated (C1-C4), the lysates from these clones were analyzed by immunoblotting using an antibody against the hemagglutinin epitope ( $\alpha$ -HA). These results reveal the processing of the HA-IKK $\alpha$  in a 45kD IKK $\alpha$  that corresponds to the N-terminal half part of the protein. (B) Western blot analysis using an antibody against hemagglutinin in total extracts from different CCR19 clones stable expressing a construct corresponding to the HA-IKK $\alpha$  *wild type* (HA-IKK $\alpha_{WT}$ ), clones C3-C5; a construct with the two serine of the activation loop mutated to alanine (HA-IKK $\alpha_{AA}$ ), clones C1 and C2; or a construct with these serines mutated to glutamate (HA-IKK $\alpha_{EE}$ ), clones C7-C10. This result suggests that the activation status of IKK $\alpha$  does not affect the processing of the protein. (C) In order to compare the band resulted for the processing of the HA-IKK $\alpha$  and the endogenous p45/IKK $\alpha$ , we ran in the same gel, lysates from a HCT116 stable expressing HA-IKK $\alpha$  clone, where we performed a western blot using an  $\alpha$ -HA antibody; and lysates from the nuclear and cytoplasmic fractionation of HCT116 cells, where we performed a western blot with an  $\alpha$ -P-IKK $\alpha/\beta$ . The image shown correspond to the reconstruction of this two western blots, and clearly demonstrate that the band that comes from the HA-IKK $\alpha$  processing correspond to the endogenous P-p45/IKK $\alpha$ . (D) HEK-293T cells were transfected with HA-IKK $\alpha$ , HA-IKK $\beta$  and HA-I $\kappa$ B $\alpha$ , after two days cell lysates were prepared and immunoprecipitated with  $\alpha$ -HA antibody. The immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with  $\alpha$ -HA and IKK $\alpha$  antibodies. The p45/IKK $\alpha$  was only detected in the immunoprecipitates corresponding to the HA-IKK $\alpha$  transfection.

**Fig.3 p45kD/IKK $\alpha$  and the full-length IKK $\alpha$  have different biochemical and functional characteristics.** (A) HEK-293T cells were transfected with HA-IKK $\alpha_{\Delta H}$  or full-length HA-IKK $\alpha$  constructs, after 48h of transfection, cells were treated or not with TNF $\alpha$  for 15 minutes, then total extracts were immunoprecipitated with the  $\alpha$ -HA antibody, after extensive washing the immunoprecipitates were eluted and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. Non-transfected cells were used as a negative control for the HA-immunoprecipitation. The inputs shown the correct expression of the different endogenous proteins analyzed, and the equal expression of the transfected proteins. (B) Cells HEK-293T were transfected with full-length HA-IKK $\alpha$  and MT-IKK $\alpha_{\Delta LH}$ , after 48h of transfection the lysates were immunoprecipitated with a  $\alpha$ -HA antibody, we detect the presence of the truncated IKK $\alpha$  in the immunoprecipitates using an  $\alpha$ -MT antibody. We used HEK-293T transfected with HA-IKK $\beta$  as a negative control of MT-IKK $\alpha_{\Delta LH}$  Co-immunoprecipitation. (C) Western blot analysis using the indicated antibodies in cytoplasmic and nuclear extracts from HCT116 cells.  $\alpha$ -PCNA and  $\alpha$ -tubulin were used as a fractionation and loading controls. One hundred microliters of HCT116 nuclear extracts, obtained as described in Experimental Procedures, was loaded on a Superdex S200 column. One drop (40 microliters approximately) per fraction was collected, and half of it was run in a gel and analyzed by western blot for IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , and P-IKK $\alpha/\beta$  levels. This experiment was repeated at least three times

obtaining similar results. (D) Kinase activity assay of immunoprecipitated P-IKK, using an IKK $\alpha$  and P-IKK $\alpha/\beta$  antibodies, from fraction 1 and fraction 2 on a GST-NCoR (amino acids 2256-2452) detected by  $^{32}\text{P}$  incorporation. Total levels of GST-N-CoR are shown by comassie blue staining. Fraction 1 containing the P-p45/IKK $\alpha$ , corresponds to fractions 19-25 and fraction 2 corresponds to fractions 38-45 and contains the full length P-IKK $\alpha$ . (E) HEK-293T cells were transfected with different constructs of activated IKK $\alpha$ , specifically IKK $\alpha_{EE}$ , la IKK $\alpha_{\Delta LH_{EE}}$  and IKK $\alpha_{\Delta H_{EE}}$ , two days after transfection soluble and insoluble cell lysates were obtained, as described in Experimental Procedures, and were analyzed by western blot with the indicated antibodies.

**Fig.4 Truncated IKK $\alpha$  forms failed to bind histone H3 or to associate to the chromatin.** (A) Pull-down assay with GST or GST-H3 and cell lysates from HEK-293T transfected with different IKK $\alpha$  constructs corresponding to HA-IKK $\alpha_{FL}$ , HA-IKK $\alpha_{\Delta H}$  and MT-IKK $\alpha_{\Delta LH}$ . The presence of IKK $\alpha$  in the precipitates was determined by western blot with an  $\alpha$ -IKK $\alpha$  antibody. Coomassie staining of GST proteins is shown in the lower panel. Inputs represent the 1/10 of total lysates. (B) ChIPs with  $\alpha$ -HA antibody and no relevant IgG from HEK-293T cells transfected with the different constructs of IKK $\alpha$ . PCR detection of the indicated genes is shown.

**Fig.5 p45/IKK $\alpha$  form enhances k-ras $_{V12D}$ -dependent cell transformation.** A foci formation assay was used to evaluate the transforming potential of full length and truncated IKK $\alpha$  forms. (A) NIH-3T3 cells were transfected with the oncogen k-ras $_{V12D}$  (2), k-ras $_{V12D}$  plus full-length HA-IKK $\alpha_{EE}$  (3), or plus MT-IKK $\alpha_{\Delta LH_{EE}}$  (4). In order to select the transfected cells, an empty vector (pcDNA3.1) carrying the Neomycin resistance was co-transfected in all the cases. After two months in culture, cells were fixed and stained with methylene blue. (B) Images of the transformation foci obtained in each condition. (C) Western blots showing the expression levels of the transfected IKK $\alpha$  proteins (\*), and k-ras $_{V12D}$ , after two week in selection.

**Fig.6 E3 ubiquitin ligase  $\beta$ -TrCP binds to the IKK $\alpha$  protein.** (A) Immunoprecipitation of endogenous  $\beta$ -TrCP from HCT116 cells treated or not with TNF $\alpha$  (16h.), the presence of IKK $\alpha$  in the immunoprecipitates was detected by western blot with  $\alpha$ -IKK $\alpha$  antibody. Inputs of the immunoprecipitation were shown. (B) Sequence alignment of  $\beta$ -TrCP binding site from different targets. (C) Scheme of the putative  $\beta$ -TrCP binding site on IKK $\alpha$  protein. (D) Pull-down assay with GST- $\beta$ -TrCP and cell lysates from HEK-293T transfected with HA-IKK $\alpha_{WT}$ , HA-IKK $\alpha_{AA}$  or HA-IKK $\alpha_{EE}$ . The presence of IKK in the precipitates was determined by western blot with a  $\alpha$ -HA antibody. (E) HEK-293T were co-transfected with MT-IKK $\alpha_{\Delta LH}$  and HA- $\beta$ -TrCP or a P-HA empty vector. Two days after transfection cell lysates were precipitated with a  $\alpha$ -HA antibody, the presence of truncated IKK $\alpha$  in the precipitates was analyzed by western blot using the  $\alpha$ -MT antibody. Inputs of the precipitation are shown.

**Fig.7  $\beta$ -TrCP induces IKK $\alpha$  ubiquitination and processing.** (A) HEK-293T cells were transfected with MT-IKK $\alpha\Delta$ LH in presence or absence of HA- $\beta$ -TrCP. Transfected IKK $\alpha$  was immunoprecipitated with the  $\alpha$ -MT antibody and its ubiquitination status was determined by immunoblot using a  $\alpha$ -ubiquitin antibody. (B) Similar to the previous experiment but transfecting a dominant negative form of HA- $\beta$ -TrCP lacking F-box domain (HA- $\beta$ -TrCP $\Delta$ F) and HA-ubiquitina. After MT immunoprecipitation, ubiquitinated IKK $\alpha$  was determined by western blot using a  $\alpha$ -HA antibody. (C) Western blot analysis of P-IKK $\alpha/\beta$  in cytoplasmic and nuclear extracts from HCT116 transfected or not with HA- $\beta$ -TrCP $\Delta$ F, and treated or not with TNF $\alpha$  (16h.).  $\alpha$ -PCNA was use as a loading control and  $\alpha$ -HA as a control of HA- $\beta$ -TrCP $\Delta$ F expression.



***Capítol 4:***

***Conclusions***

**1-** Les cèl·lules de càncer colorectal presenten una activitat aberrant de les IKKs, independent de l'activació de la via de senyalització d'NFκB.

**2-** L'activitat IKK de les cèl·lules de càncer de còlon es localitza a nivell nuclear, on fosforila als repressors transcripcionals, SMRT (serina 2410) i N-CoR (serines 2345 i 2348), induint el seu export a citoplasma mitjançant les proteïnes 14-3-3.

**3-** A la cromatina, la IKKα es recluta als promotors de gens diana de Notch *hes1*, *herp2* i *hes5*, induint l'alliberament d'SMRT i l'activació transcripcional d'aquests.

**4-** L'inhibidor de l'activitat IKK, BAY11-7082, inhibeix el creixement cel·lular i indueix l'apoptosi de cèl·lules tumorals de càncer de còlon tan *in vitro* com *in vivo*.

**5-** Les cèl·lules de càncer de còlon expressen una forma truncada d'IKKα de 45kD (p45/IKKα), a la qual li manquen diferents dominis reguladors, però conserva el domini quinasa intacte

**6-** La major part de la IKKα fosforilada nuclear que tenen les cèl·lules de càncer de còlon, correspon a la isoforma truncada.

**7-** La forma truncada d'IKKα no participa en l'activació de la via d'NFκB però és responsable de la fosforilació de repressors nuclears.

**8-** p45/IKKα coopera amb k-ras<sub>V12D</sub> en la generació de focus de transformació en cèl·lules NIH-3T3.

## ***Capítol 5:***

### ***Discussió General***

La via d'NF $\kappa$ B juga un paper preferent en la regulació de la resposta inflamatòria, la resposta immune i la supervivència cel·lular, entre d'altres processos. Diferents tipus de càncer així com línies cel·lulars tumorals presenten una activació constitutiva d'NF $\kappa$ B (Basseres and Baldwin, 2006; Gilmore et al., 2002; Naugler and Karin, 2008) que s'associa a un augment de l'activitat IKK i de la fosforilació d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Biswas et al., 2004; Yang and Richmond, 2001), però que en molts casos no dona lloc a l'acumulació nuclear de p65 (Gasparian et al., 2002; Wang et al., 1999). Aquesta és la situació que es dona en les cèl·lules de càncer de còlon i tumors primaris de càncer colorectal (CRC), on hem demostrat que l'activitat IKK és concomitant amb la localització citoplasmàtica de p65 i p52, que són els efectors de la via clàssica i alternativa d'NF $\kappa$ B, respectivament. Aquesta observació concorda amb l'absència de p65 i p52 en els promotors de diferents gens diana d'NF $\kappa$ B i suggereix que l'activitat IKK en les cèl·lules de càncer de còlon té substrats i funcions alternatives. En aquest sentit recentment s'han identificat diferents funcions nuclears de les IKKs que afecten a gens dependents i independents d'NF $\kappa$ B (veure apartat 1.6). Una d'aquestes funcions és la fosforilació de la serina 2410 del repressor SMRT, en resposta a la unió a laminina, que indueix l'activació transcripcional dels gens *ciap-2* i *il-8*. Aquesta fosforilació crea un lloc d'unió per a les proteïnes 14-3-3 que indueixen l'export d'SMRT al citoplasma, juntament amb HDAC3, on es degrada pel proteasoma (Hoberg et al., 2004). Els nostres resultats demostren que aquest mecanisme es responsable de l'export de repressors nuclears (SMRT i N-CoR) en les cèl·lules de càncer colorectal que presenten IKK activada, donant lloc a l'activació dels gens *hes1* i *herp2*, els quals es troben reprimits en la mucosa normal de còlon (Fernandez-Majada et al., 2007; Fernandez-Majada et al., 2007b). El gens *hes1* i *herp2* són gens diana de la via de Notch, la qual té una funció principal en la regulació de l'homeòstasi intestinal normal. De fet, *hes1* és suficient per inhibir la diferenciació del llinatge secretor, i s'ha demostrat que està sobreexpressat en diferents models de càncer colorectal. (Fre et al., 2005; Jensen et al., 2000; van Es et al., 2005).

Una característica general dels tumors sòlids, molt ben defenida en el càncer colorectal, és el fet que l'adquisició del fenotip tumoral té lloc mitjançant l'acumulació seqüencial de mutacions en gens específics. La mutació més prevalent i la que es dona en primer lloc és la del gen APC, que indueix l'acumulació de  $\beta$ -catenina nuclear. S'ha demostrat que la transcripció dependent de  $\beta$ -catenina és responsable de mantenir el fenotip de cèl·lula soca, que és característic de les cèl·lules tumorals (Batlle et al., 2002; van de Wetering et al., 2002). No obstant, aquest no és l'únic requeriment per a la progressió del càncer colorectal sinó que mutacions en altres gens com *kras*, *Ddc*, *Dpc4* *Smad4* i *Tp53* són també importants. En aquest sentit, s'ha demostrat que la inhibició de l'activitat  $\gamma$ -secretasa (la qual regula la via de Notch) redueix la tumorigènesi de ratolins APC<sup>Min/+</sup>, induint una diferenciació parcial de les cèl·lules dels adenomes cap al llinatge mucosecretor (van Es et al., 2005). Pel contrari, l'activació de Notch a l'intestí provoca un bloqueig de la diferenciació de cèl·lules secretores i una expansió dels progenitors immadurs (Fre et al., 2005). Aquests resultats indiquen que la transcripció dependent de Notch té un paper important en la tumorigènesi colorectal i suggereixen que la fosforilació de repressors que dona lloc a l'activació

aberrant de hes1 o herp2 podria, al menys en part, ser responsable d'alguns dels efectes promutorigènics de l'activitat nuclear d'IKK $\alpha$ .

Els complexos repressors de la transcripció estan formats per diferents combinacions d'NCoRs i HDACs, i són responsables del silenciament de programes transcripcionals específics. El mecanisme pel qual N-CoR i SMRT realitzen la seva funció és mitjançant el reclutament d'altres elements repressors com les deacetilases d'histones (HDAC) a promotors específics. Aquesta especificitat ve determinada per la seva unió a diferents factors de transcripció, entre els qual es troben, els receptors nuclears RBPjk, P65 i MyoD. Tot i que no s'han caracteritzat funcions específiques pels diferents NCoRs i la seva expressió és ubiqua, l'animal *knockout* per N-CoR és letal embrionari (Jepsen et al., 2000), indicant que SMRT i N-CoR no són redundants. El fenotip dels animals deficients en N-CoR demostra que aquest repressor té una funció essencial com a regulador de la diferenciació cel·lular, ja que els embrions mutants presenten defectes en la diferenciació eritroide, limfoide i neuronal (Jepsen et al., 2000). Malgrat no s'ha descrit cap funció per a aquest repressor en la diferenciació intestinal, nosaltres hem detectat la presència de cèl·lules negatives per a la tinció d'N-CoR a la base de les criptes de la mucosa normal de còlon (resultats no publicats), en la regió on es troben les cèl·lules mare intestinals (Barker et al., 2007), suggerint que la manca d'N-CoR pot estar associada a un fenotip indiferenciat en aquest teixit. Creiem que l'absència de la proteïna N-CoR podria ser funcionalment comparable a la localització citoplasmàtica d'N-CoR que hem detectat en les mostres de càncer colorectal, suggerint que la desregulació tumoral d'N-CoR podria activar un programa d'expressió gènica similar al de les cèl·lules mare intestinals. A més, tenim dades de que la distribució aberrant d'N-CoR no és exclusiva dels tumors de còlon, sinó que també podria donar-se en càncer humà de bufeta (resultats que no es mostren). Pel contrari, en altres models com el glioblastoma o durant la diferenciació normal dels astròcits, la translocació citoplasmàtica d'N-CoR s'associa amb la diferenciació cel·lular (Hermanson et al., 2002; Park et al., 2007), indicant que la regulació de la transcripció de determinats grups de gens per N-CoR varia segons el context. No obstant, pensem que l'anàlisi de la distribució d'NCoRs pot significar una nova eina diagnòstica per a estadis pre-malignes en càncer de còlon i bufeta, que potser caldria estudiar en altres tipus de cancers. En aquest sentit, s'ha demostrat que el reclutament anòmal de repressors està implicat en el desenvolupament de leucèmies induïdes pel oncogen PML-RAR (Gu et al., 2002).

Encara que en cèl·lules normals la distribució subcel·lular dels repressors transcripcionals és majoritàriament nuclear, la seva translocació a citoplasma pot ser induïda per fosforilació. Així s'han descrit que algunes quinases com, MEK-1, PI3K/Akt, ERK, Calmodulin Kinasa IV i IKK, fosforilen i indueixen l'export citoplasmàtic d'NCoRs en diferents situacions (Hermanson et al., 2002; Hoberg et al., 2004; Hong and Privalsky, 2000; Jang et al., 2001; Jonas and Privalsky, 2004). Els nostres resultats demostren que l'activitat IKK de cèl·lules de càncer de còlon fosforila la serina 2410 d'SMRT, de forma similar als resultats obtinguts en cèl·lules de càncer de pròstata del grup del Dr. MW. Mayo (Hoberg et al., 2006; Hoberg et al., 2004). A més, els resultats del nostre treball indiquen que l'alt grau de conservació entre les proteïnes N-CoR i SMRT afecta també al domini responsable del seu export citoplasmàtic dependent de la fosforilació d'IKK $\alpha$ .

Aquest fet té una gran importància funcional, tal i com ho demostra la prevalença d'N-CoR citoplasmàtic que hem observat en els tumor col·rectals humans. Contràriament, s'ha demostrat que la fosforilació per MEKK1 i PI3K, regula de forma específica la localització cel·lular d'N-CoR i SMRT, respectivament (Hermanson et al., 2002; Jonas and Privalsky, 2004) suggerint l'existència d'altres elements reguladors de la localització subcel·lular no conservats entre ambdues proteïnes. Cal remarcar, que en els teixit hiperplàstics no tumorals, presents en algunes de les biòpsies analitzades, la distribució d'N-CoR és nuclear, suggerint que l'export de repressors no està associat amb l'increment de la proliferació sino amb la transformació tumoral.

A més de la fosforilació, existeixen altres modificacions post-traduccionals dels repressor que poden regular la seva funció. En aquest sentit, s'ha demostrat que la sumoilació d'N-CoR en les lisines 152, 1117 i 1330, contribueix a la seva funció repressora (Tiefenbach et al., 2006).

Tal i com hem dit anteriorment l'associació d'IKK $\alpha$  a la cromatina, és important per l'activació transcripcional tant de gens dependents d'NF $\kappa$ B com *I $\kappa$ B $\alpha$*  i *il-6* (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003), com independent d'NF $\kappa$ B, com *c-fos* (Anest et al., 2004), a través de la fosforilació de la serina 10 de la H3. En el nostres treballs no hem detectat cap correlació entre l'associació d'IKK $\alpha$  als promotors dels gens *hes1* i *herp2* i l'increment en la fosforilació de la H3, en les mostres tumorals de càncer de còlon analitzades. No obstant, no podem descartar que a més de regular la fosforilació de repressors, IKK $\alpha$  pugui tenir altres substrats més específics de la via de Notch com pot ser el propi receptor activat (Notch-IC) o el seu cofactor RBPjk, de forma similar a com fosforila el receptor d'estrògens en cèl·lules de càncer de mama (Park et al., 2005). Una altra possibilitat que estem estudiant és que la IKK $\alpha$  indueix la degradació de la fracció d'*I $\kappa$ B $\alpha$*  que s'associa a la cromatina com a repressor de gens específics, tal i com hem suggerit prèviament (Aguilera et al., 2004).

El descobriment de que en cèl·lules tumorals l'activitat IKK $\alpha$  regula l'activació transcripcional per fosforilació directe de substrats nuclears específics com SMRT i NCoR és molt important a l'hora de dissenyar noves teràpies contra el càncer. En aquest sentit, el tractament de cèl·lules de càncer de còlon amb l'inhibidor de l'activitat IKK, BAY11-7082, evita l'alliberament d'SMRT dels promotors dels gens diana de Notch, i redueix la seva transcripció als nivells de les cèl·lules normals. Més important, la inhibició de l'activitat IKK atura el creixement cel·lular en un model de tumors col·rectals humans implantats en ratolins atímics (Fernandez-Majada et al., 2007).

NF $\kappa$ B és un element clau de la resposta immune i inflamatòria, la qual és responsable de més d'un 20% dels càncers registrats. En base a aquestes dades, la via d'NF $\kappa$ B ha esdevingut una important diana terapèutica per al disseny de fàrmacs, no només dirigits al tractament del càncer, si no també a malalties com l'artritis i a malalties inflamatòries intestinals, entre d'altres. Amb aquest objectiu, s'han identificat diferents components, tant natural com sintètics, que inhibeixen l'activació d'NF $\kappa$ B. Entre aquests components trobem els glucocorticoids, els moduladors selectius del receptor d'estrògen, els antioxidants, els inhibidors del proteasoma, els receptors solubles de TNF $\alpha$ , els anticossos anti-TNF $\alpha$  o els inhibidors específics de l'activitat IKK, entre d'altres (revisat a Sun and Karin, 2008). El compost BAY11-7082, utilitzat en el nostre treball, i que hem demostrat

que inhibeix l'efecte de la IKK $\alpha$  nuclear sobre els gens diana de Notch, és de fet un inhibidor general de l'activitat IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  (Pierce et al., 1997). Per aquest motiu, no podem descartar que part dels efectes terapèutics que presenta sobre el creixement tumoral siguin deguts a la inhibició de l'activitat basal d'NF $\kappa$ B.

En comparació amb els inhibidors generals del proteosoma, que basen la seva funció en l'estabilització d'I $\kappa$ B, la utilització d'inhibidors de les IKK (revisat a Lee and Hung, 2008), així com d'anticossos monoclonals contra el receptor de TNF $\alpha$  o receptors solubles contra aquest factor han significat una millora en l'especificitat dels tractaments (Egberts et al., 2008; Madhusudan et al., 2004; Maisey, 2007), ja sigui en models animals com en assajos clínics amb pacients. No obstant, existeixen múltiples evidències de que l'absència d'activitat IKK pot causar efectes secundaris greus que qüestionen l'ús d'aquests inhibidors en els tractaments contra el càncer o de processos inflamatoris crònics. Per exemple, l'activitat IKK $\alpha$  és molt important en el manteniment de l'homeòstasi de la pell i prevenint l'aparició de tumors en aquest òrgan (Liu et al., 2006; Marinari et al., 2008). En diferents models s'ha demostrat que la IKK $\beta$  és important pel correcte funcionament d'alguns teixits. Per una banda, en un model de carcinoma hepàtic (HCC) induït pel pro-carcinogen químic DEN, la deleció específica d'IKK $\beta$  als hepatòcits incrementa la multiplicitat i el tamany dels tumors (Maeda et al., 2005). L'explicació d'aquest fenomen la trobem en l'augment de la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), degut al tractament, que incrementen l'activitat de JNK. L'activació de la via de JNK causa la mort dels hepatòcits, i això provoca la proliferació compensatòria dels hepatòcits que sobreviuen que facilita la formació de tumors. A més, en un model d'inflamació de l'intestí induïda per isquèmia, la deleció d'IKK $\beta$  en els enteròcits prevé la resposta inflamatòria sistèmica pròpia d'aquest model, però causa un dany massiu de la mucosa intestinal. Aquests resultats indiquen que NF $\kappa$ B juga un paper dual en aquest model, induint el procés inflamatori i protegint la integritat dels teixits (Chen et al., 2003). A més, el processament i secreció d'IL-1 $\beta$  està negativament regulat per l'activació d'NF $\kappa$ B depenent d'IKK $\beta$ , de manera que l'ús d'inhibidors de l'activitat IKK poden incrementar el procés inflamatori, enlloc de bloquejar-lo (Greten et al., 2007). Encara més, hem observat que l'administració sostinguda de l'inhibidor de les IKKs (BAY11-7082) indueix la pèrdua de massa muscular (caquèxia) en el model de ratolins atímics utilitzat en el nostre estudi (resultats no publicats). Totes aquestes dades indiquen que, des d'un punt de vista terapèutic, és imprescindible definir quins són els mecanismes que regulen les funcions tumorigèniques de les IKKs per tal de dissenyar nous inhibidors específics d'aquestes que no afectin a les seves funcions fisiològiques.

En aquest sentit, els treballs del nostre grup han permès identificar l'existència d'una nova forma d'IKK $\alpha$  de 45kD de pes molecular, a la que li manquen els dominis LZ i HLH però conserva intacte el domini quinasa. La forma no activada d'aquesta IKK $\alpha$  es localitza majoritàriament al citoplasma, tant de cèl·lules normals com tumorals, mentre que la forma fosforilada en les dos serines del *loop* d'activació s'expressa específicament en el nucli de les cèl·lules tumorals. El fet que cèl·lules no transformades (HS27) expressin l'IKK $\alpha$  de 45kD al citoplasma suggereix que el processament és un procés fisiològic, i que és l'activació i acumulació al nucli el que li confereix les seves característiques oncogèniques.

Els mecanismes que regulen la formació de la P-p45/IKK $\alpha$  queden per determinar, no obstant hem observat que l'estimulació crònica amb TNF $\alpha$  (8-16h.) incrementa els seus nivells en detriment de la forma de 85kD. Les proteïnes IKK, com altres proteïnes quinasa, regulen la seva activitat mitjançant la fosforilació de dues serines localitzades en el *loop* d'activació dins del propi domini quinasa. En el cas de la IKK $\alpha$ , aquestes serines corresponen als residus 176 i 180. Existeixen anticossos que reconeixen la fosforilació en un o dos d'aquests residus, que s'utilitzen indistintament com a mesura de l'estat d'activació del complex IKK. Els nostres resultats, utilitzant ambdós tipus d'anticossos, demostren que només les formes nuclears de les IKKs, i majoritàriament la de 45kD, es troben fosforilades en les dues serines del *loop* d'activació. Pel contrari, l'activació de les formes citoplasmàtiques d'IKK té lloc a través de la fosforilació de les serines 180/181, suggerint que la fosforilació en un o dos d'aquests residus pot regular diferencialment l'activitat IKK. D'altra banda, hem identificat mutacions similars a les identificades prèviament en carcinomes del pell humans (SCC), que mapen, totes elles, en els exons 14 i 15 de la IKK $\alpha$  (Liu et al., 2006). No obstant, en els nostres resultats la gran majoria de mostres tumorals analitzades no presenten cap canvi en la seqüència de la IKK $\alpha$ , tot i expressar la forma truncada de la proteïna, suggerint que les mutacions somàtiques no són la causa principal de la presència d'aquesta isoforma. Pel contrari, les nostres dades experimentals suggereixen que la p45/IKK $\alpha$  es pot generar per un processament proteolític de la IKK $\alpha$  sencera, probablement dependent de la prèvia ubiquitinació de la proteïna per  $\beta$ -TrCP, de manera similar al processament de p100 a p52 pel proteasoma. Encara que, es possible que la p45/IKK $\alpha$ , o altres formes truncades funcionalment equivalents, puguin ser generades per diferents mecanismes. En aquest sentit, en limfòcits T s'ha descrit un *splicing* alternatiu del mRNA de la IKK $\alpha$ , que causa la deleció de 152 nucleòtids que comprenen la regió del LZ de la proteïna i provoca un canvi en la pauta de lectura que dona lloc a l'aparició d'un codó STOP prematur 20 aminoàcids a C-terminal de la deleció. El resultat final és que aquesta forma de processament alternatiu del missatger codifica per una IKK $\alpha$  de 471 aminoàcids a la que li manquen els dominis LZ i HLH (McKenzie et al., 2000). A més, el canvi de pauta de lectura causat per l'*splicing* alternatiu fa que l'extrem C-terminal de la proteïna contingui una seqüència exclusiva de 20 aminoàcids que la diferencien de la IKK $\alpha$  sencera. La possibilitat de que hi hagi formes de processament similar associades al càncer colorectal queda per determinar. El fet que aquestes formes generin seqüències específiques com a conseqüència del canvi en la pauta de lectura podria permetre obtenir anticossos específics per a identificar-les.

L'anàlisi comparatiu de les formes, sencera i truncada, de la IKK $\alpha$  ha demostrat que ambdues proteïnes tenen característiques bioquímiques i funcionals diferents. Mentre que la IKK $\alpha$  de 85kD és la forma majoritària del citoplasma, es troba associada al complex clàssic de les IKK, i és responsable de les funcions relacionades amb l'activació de la via d'NF $\kappa$ B, la forma p45/IKK $\alpha$  té funcions bàsicament nuclears i independents d'NF $\kappa$ B. Això ho demostra el fet que la p45/IKK $\alpha$  no interacciona amb IKK $\beta$  ni amb p100, i que la seva sobreexpressió no causa la fosforilació d'I $\kappa$ B $\alpha$  ni el processament de p100. No obstant, els experiments de filtració en gel en columnes Superdex S200 i d'immunoprecipitació revelen que, en el nucli de cèl·lules tumorals de còlon, la P- p45/IKK $\alpha$



forma un complex amb l'IKK $\alpha$  sencera no activada i NEMO, mentre que la P-IKK $\alpha$  de 85kD es troba en forma de monòmer. A nivell funcional, la IKK $\alpha$  nuclear de 45kD fosforila els repressors transcripcionals, funció descrita prèviament pel nostre grup (Fernandez-Majada et al., 2007; Fernandez-Majada et al., 2007b). Proposem que la fosforilació dels repressors transcripcionals i el seu alliberament de la cromatina per acció de la P-p45/IKK $\alpha$  causa una disminució de la càrrega d'HDACs que facilita el reclutament de complexos activadors de la transcripció i l'increment local de l'estat d'acetilació de les histones. D'acord amb això, l'expressió ectòpica d'una construcció que mimetitzava la forma truncada de la IKK $\alpha$  activada incrementa l'estat d'acetilació de la H3.

El fet que les formes truncades de P-IKK $\alpha$  es trobi específicament en el nucli de cèl·lules tumorals suggereix que pot tenir funcions tumorigèniques. A favor d'això, hem demostrat que la P-p45/IKK $\alpha$  col·labora amb l'oncogen *k-ras*<sub>V12D</sub> en la transformació tumoral de cèl·lules NIH-3T3, mentre que la IKK $\alpha$  sencera no ho fa. Per altre banda, s'ha proposat que el reclutament de la IKK $\alpha$  a la cromatina a través de la seva interacció directa amb la histona H3 té efectes antitumorals en part al regular l'expressió de 14-3-3 $\sigma$  (Zhu et al., 2007). Els nostres resultats demostren que, a diferència de la IKK $\alpha$  sencera, la IKK $\alpha$  truncada no interacciona amb la H3 ni s'uneix de forma estable amb la cromatina. Proposem que la IKK $\alpha$  que s'associa a la H3 és la forma d'IKK $\alpha$  nuclear de 85kD, que es troba en forma monomèrica, tot i que queda per estudiar si és aquesta quinasa la responsable de fosforilar la histona H3 en els promotors dels gens diana d'NF $\kappa$ B.

Actualment, els nostres esforços estan dirigits a identificar els mecanismes que regulen el processament, la entrada al nucli i l'activació tant de la forma truncada com de la forma sencera d'IKK $\alpha$ . Creiem que el descobriment de l'existència d'una isoforma nuclear de P-IKK $\alpha$  amb funcions independents d'NF $\kappa$ B i capacitat tumorigènica és summament rellevant en el camp de la investigació de noves teràpies contra el càncer, ja que obre la possibilitat d'utilitzar inhibidors d'IKK més específics, que bloquegin exclusivament les seves funcions tumorigèniques, evitant així els efectes adversos d'inhibir les seves funcions fisiològiques.

## *Referències*

Adhikari, A., Xu, M., and Chen, Z. J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 26, 3214-3226.

Aguilera, C., Fernandez-Majada, V., Ingles-Esteve, J., Rodilla, V., Bigas, A., and Espinosa, L. (2006). Efficient nuclear export of p65-IkappaBalpha complexes requires 14-3-3 proteins. *J Cell Sci* 119, 3695-3704.

Aguilera, C., Hoya-Arias, R., Haegeman, G., Espinosa, L., and Bigas, A. (2004). Recruitment of IkappaBalpha to the h promoter is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16537-16542.

Ahmad, R., Raina, D., Trivedi, V., Ren, J., Rajabi, H., Kharbada, S., and Kufe, D. (2007). MUC1 oncoprotein activates the IkappaB kinase beta complex and constitutive NF-kappaB signalling. *Nat Cell Biol* 9, 1419-1427.

Alcamo, E., Hacohen, N., Schulte, L. C., Rennert, P. D., Hynes, R. O., and Baltimore, D. (2002). Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *J Exp Med* 195, 233-244.

Alcamo, E., Mizgerd, J. P., Horwitz, B. H., Bronson, R., Beg, A. A., Scott, M., Doerschuk, C. M., Hynes, R. O., and Baltimore, D. (2001). Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J Immunol* 167, 1592-1600.

Anest, V., Cogswell, P. C., and Baldwin, A. S., Jr. (2004). IkappaB kinase alpha and p65/RelA contribute to optimal epidermal growth factor-induced c-fos gene expression independent of IkappaBalpha degradation. *J Biol Chem* 279, 31183-31189.

Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D., and Baldwin, A. S. (2003). A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* 423, 659-663.

Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelier, F., Thomas, D., and Hay, R. T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 15, 2689-2696.

Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., *et al.* (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-221.

Barken, D., Wang, C. J., Kearns, J., Cheong, R., Hoffmann, A., and Levchenko, A. (2005). Comment on "Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression". *Science* 308, 52; author reply 52.

Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., and Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-1007.

Barre, B., and Perkins, N. D. (2007). A cell cycle regulatory network controlling NF-kappaB subunit activity and function. *Embo J* 26, 4841-4855.

Basak, S., Kim, H., Kearns, J. D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S. L., Benedict, C. A., Ware, C. F., Ghosh, G., Verma, I. M., and Hoffmann, A. (2007). A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* 128, 369-381.

Basseres, D. S., and Baldwin, A. S. (2006). Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25, 6817-6830.

Battle, E., Henderson, J. T., Begthel, H., van den Born, M. M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., and Clevers, H. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111, 251-263.

Becker, C., Fantini, M. C., Schramm, C., Lehr, H. A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., *et al.* (2004). TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21, 491-501.

Beg, A. A., and Baldwin, A. S., Jr. (1993). The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 7, 2064-2070.

Beg, A. A., and Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.

Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., and Baltimore, D. (1995). Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev* 9, 2736-2746.

Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376, 167-170.

Beinke, S., and Ley, S. C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 382, 393-409.

Bender, K., Gottlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1998). Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *Embo J* 17, 5170-5181.

Bernal-Mizrachi, L., Lovly, C. M., and Ratner, L. (2006). The role of NF-kappaB-1 and NF-kappaB-2-mediated resistance to apoptosis in lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9220-9225.

Bigas, A., Martin, D. I., and Milner, L. A. (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* 18, 2324-2333.

Biswas, D. K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A. B., and Iglehart, J. D. (2004). 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.

Blonska, M., You, Y., Geleziunas, R., and Lin, X. (2004). Restoration of NF-kappaB activation by tumor necrosis factor alpha receptor complex-targeted MEKK3 in receptor-interacting protein-deficient cells. *Mol Cell Biol* 24, 10757-10765.

Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288.

Bonnard, M., Mirtos, C., Suzuki, S., Graham, K., Huang, J., Ng, M., Itie, A., Wakeham, A., Shahinian, A., Henzel, W. J., *et al.* (2000). Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *Embo J* 19, 4976-4985.

Boone, D. L., Turer, E. E., Lee, E. G., Ahmad, R. C., Wheeler, M. T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., *et al.* (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 5, 1052-1060.

Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K., and Siebenlist, U. (1993). The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72, 729-739.

Brummelkamp, T. R., Nijman, S. M., Dirac, A. M., and Bernards, R. (2003). Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 424, 797-801.

Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L. A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., and Lo, D. (1995). Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373, 531-536.

Caamano, J. H., Rizzo, C. A., Durham, S. K., Barton, D. S., Raventos-Suarez, C., Snapper, C. M., and Bravo, R. (1998). Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med* 187, 185-196.

Callahan, R., and Egan, S. E. (2004). Notch signaling in mammary development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 145-163.

Cao, Y., Bonizzi, G., Seagroves, T. N., Greten, F. R., Johnson, R., Schmidt, E. V., and Karin, M. (2001). IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* 107, 763-775.

Cao, Y., Luo, J. L., and Karin, M. (2007). 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.

Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H., and Siebenlist, U. (2002). BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3, 958-965.

Connelly, L., Robinson-Benion, C., Chont, M., Saint-Jean, L., Li, H., Polosukhin, V. V., Blackwell, T. S., and Yull, F. E. (2007). A transgenic model reveals important roles for the NF-kappa B alternative pathway (p100/p52) in mammary development and links to tumorigenesis. *J Biol Chem* 282, 10028-10035.

Cuevas, I. C., Slocum, A. L., Jun, P., Costello, J. F., Bollen, A. W., Riggins, G. J., McDermott, M. W., and Lal, A. (2005). Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. *Cancer Res* 65, 5070-5075.

Cummins, E. P., Berra, E., Comerford, K. M., Ginouves, A., Fitzgerald, K. T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J. E., Moynagh, P., Pouyssegur, J., and Taylor, C. T. (2006). Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18154-18159.

Chauhan, D., Catley, L., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Velankar, M., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Yasui, H., Letai, A., *et al.* (2005). A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell* 8, 407-419.

Chen, H., Li, M., Campbell, R. A., Burkhardt, K., Zhu, D., Li, S. G., Lee, H. J., Wang, C., Zeng, Z., Gordon, M. S., *et al.* (2006). Interference with nuclear factor kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase signaling by TRAF6C small interfering RNA inhibits myeloma cell proliferation and enhances apoptosis. *Oncogene* 25, 6520-6527.

Chen, L. F., Mu, Y., and Greene, W. C. (2002). Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *Embo J* 21, 6539-6548.

Chen, L. F., Williams, S. A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J. M., Buckbinder, L., and Greene, W. C. (2005). NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol* 25, 7966-7975.

Chen, L. W., Egan, L., Li, Z. W., Greten, F. R., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2003). The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* 9, 575-581.

Chua, H. L., Bhat-Nakshatri, P., Clare, S. E., Morimiya, A., Badve, S., and Nakshatri, H. (2007). NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 26, 711-724.

Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., and Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17, 525-535.

Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284, 309-313.

Demicco, E. G., Kavanagh, K. T., Romieu-Mourez, R., Wang, X., Shin, S. R., Landesman-Bollag, E., Seldin, D. C., and Sonenshein, G. E. (2005). RelB/p52 NF-kappaB complexes rescue an early delay in mammary gland development in transgenic mice with targeted superrepressor IkappaB-alpha expression and promote carcinogenesis of the mammary gland. *Mol Cell Biol* 25, 10136-10147.

Descargues, P., Sil, A. K., and Karin, M. (2008). IKKalpha, a critical regulator of epidermal differentiation and a suppressor of skin cancer. *Embo J* 27, 2639-2647.

Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Brisken, C., and Dotto, G. P. (2005). p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes Dev* 19, 1485-1495.

Devin, A., Lin, Y., Yamaoka, S., Li, Z., Karin, M., and Liu, Z. (2001). The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol* 21, 3986-3994.

DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388, 548-554.

Doffinger, R., Smahi, A., Bessia, C., Geissmann, F., Feinberg, J., Durandy, A., Bodemer, C., Kenwrick, S., Dupuis-Girod, S., Blanche, S., *et al.* (2001). X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* 27, 277-285.

Duncan, A. W., Rattis, F. M., DiMascio, L. N., Congdon, K. L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J. M., Willert, K., Gaiano, N., and Reya, T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6, 314-322.

Duran, A., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2003). Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *Embo J* 22, 3910-3918.

Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G., and Gelinas, C. (2006). Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 25, 6800-6816.

Ea, C. K., Deng, L., Xia, Z. P., Pineda, G., and Chen, Z. J. (2006). Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22, 245-257.

Egan, S. E., St-Pierre, B., and Leow, C. C. (1998). Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 228, 273-324.

Egberts, J. H., Cloosters, V., Noack, A., Schniewind, B., Thon, L., Klose, S., Kettler, B., von Forstner, C., Kneitz, C., Tepel, J., *et al.* (2008). Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 68, 1443-1450.

Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D., and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649-661.

Espinosa, L., Ingles-Esteve, J., Robert-Moreno, A., and Bigas, A. (2003). IkappaBalpha and p65 regulate the cytoplasmic shuttling of nuclear corepressors: cross-talk between Notch and NFkappaB pathways. *Mol Biol Cell* 14, 491-502.

Espinosa, L., Santos, S., Ingles-Esteve, J., Munoz-Canoves, P., and Bigas, A. (2002). p65-NFkappaB synergizes with Notch to activate transcription by triggering cytoplasmic translocation of the nuclear receptor corepressor N-CoR. *J Cell Sci* *115*, 1295-1303.

Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759-767.

Fernandez-Majada, V., Aguilera, C., Villanueva, A., Vilardell, F., Robert-Moreno, A., Aytes, A., Real, F. X., Capella, G., Mayo, M. W., Espinosa, L., and Bigas, A. (2007). Nuclear IKK activity leads to dysregulated notch-dependent gene expression in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 276-281.

Fernandez-Majada, V., Pujadas, J., Vilardell, F., Capella, G., Mayo, M. W., Bigas, A., and Espinosa, L. (2007b). Aberrant cytoplasmic localization of N-CoR in colorectal tumors. *Cell Cycle* *6*, 1748-1752.

Fiorini, E., Schmitz, I., Marissen, W. E., Osborn, S. L., Touma, M., Sasada, T., Reche, P. A., Tibaldi, E. V., Hussey, R. E., Kruisbeek, A. M., *et al.* (2002). Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell* *9*, 637-648.

Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* *425*, 475-479.

Fox, C. J., Hammerman, P. S., Cinalli, R. M., Master, S. R., Chodosh, L. A., and Thompson, C. B. (2003). The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev* *17*, 1841-1854.

Franzoso, G., Carlson, L., Poljak, L., Shores, E. W., Epstein, S., Leonardi, A., Grinberg, A., Tran, T., Schariton-Kersten, T., Anver, M., *et al.* (1998). Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med* *187*, 147-159.

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* *435*, 964-968.

Fujita, F., Taniguchi, Y., Kato, T., Narita, Y., Furuya, A., Ogawa, T., Sakurai, H., Joh, T., Itoh, M., Delhase, M., *et al.* (2003). Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol* *23*, 7780-7793.

Fujita, T., Nolan, G. P., Liou, H. C., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* *7*, 1354-1363.

Fukata, M., Chen, A., Klepper, A., Krishnareddy, S., Vamadevan, A. S., Thomas, L. S., Xu, R., Inoue, H., Arditi, M., Dannenberg, A. J., and Abreu, M. T. (2006). Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* *131*, 862-877.

Gasparian, A. V., Yao, Y. J., Kowalczyk, D., Lyakh, L. A., Karseladze, A., Slaga, T. J., and Budunova, I. V. (2002). The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* *115*, 141-151.

Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* *109 Suppl*, S81-96.

Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* *16*, 225-260.

Gilmore, T., Gapuzan, M. E., Kalaitzidis, D., and Starczynowski, D. (2002). Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction in the generation and treatment of human cancer. *Cancer Lett* *181*, 1-9.

Gilmore, T. D. (1999). Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. *Oncogene* *18*, 6925-6937.

Gloire, G., Dejjardin, E., and Piette, J. (2006). Extending the nuclear roles of IkappaB kinase subunits. *Biochem Pharmacol* *72*, 1081-1089.

Grady, W. M., and Markowitz, S. D. (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *3*, 101-128.

Gray, G. E., Mann, R. S., Mitsiadis, E., Henrique, D., Carcangiu, M. L., Banks, A., Leiman, J., Ward, D., Ish-Horowitz, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* *154*, 785-794.

Grego-Bessa, J., Luna-Zurita, L., del Monte, G., Bolos, V., Melgar, P., Arandilla, A., Garratt, A. N., Zang, H., Mukoyama, Y. S., Chen, H., *et al.* (2007). Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell* *12*, 415-429.

Greten, F. R., Arkan, M. C., Bollrath, J., Hsu, L. C., Goode, J., Miething, C., Goktuna, S. I., Neuenhahn, M., Fierer, J., Paxian, S., *et al.* (2007). NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* *130*, 918-931.

Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* *118*, 285-296.

Greten, F. R., and Karin, M. (2004). The IKK/NF-kappaB activation pathway—a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 206, 193-199.

Grumont, R. J., and Gerondakis, S. (1994). Alternative splicing of RNA transcripts encoded by the murine p105 NF-kappa B gene generates I kappa B gamma isoforms with different inhibitory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4367-4371.

Grumont, R. J., Rourke, I. J., O'Reilly, L. A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., and Gerondakis, S. (1998). B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med* 187, 663-674.

Gu, B. W., Xiong, H., Zhou, Y., Chen, B., Wang, L., Dong, S., Yu, Z. Y., Lu, L. F., Zhong, M., Yin, H. F., *et al.* (2002). Variant-type PML-RAR(alpha) fusion transcript in acute promyelocytic leukemia: use of a cryptic coding sequence from intron 2 of the RAR(alpha) gene and identification of a new clinical subtype resistant to retinoic acid therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7640-7645.

Guan, E., Wang, J., Laborda, J., Norcross, M., Baeuerle, P. A., and Hoffman, T. (1996). T cell leukemia-associated human Notch/translocation-associated Notch homologue has I kappa B-like activity and physically interacts with nuclear factor-kappa B proteins in T cells. *J Exp Med* 183, 2025-2032.

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

Hatada, E. N., Nieters, A., Wulczyn, F. G., Naumann, M., Meyer, R., Nucifora, G., McKeithan, T. W., and Scheidereit, C. (1992). The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2489-2493.

Hay, R. T. (2004). Modifying NEMO. *Nat Cell Biol* 6, 89-91.

Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224.

He, Y., and Pear, W. S. (2003). Notch signalling in B cells. *Semin Cell Dev Biol* 14, 135-142.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* 199, 1641-1650.

Hermanson, O., Jepsen, K., and Rosenfeld, M. G. (2002). N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* 419, 934-939.

Herrmann, O., Baumann, B., de Lorenzi, R., Muhammad, S., Zhang, W., Kleesiek, J., Malferteiner, M., Kohrmann, M., Potrovita, I., Maegele, I., *et al.* (2005). IKK mediates ischemia-induced neuronal death. *Nat Med* 11, 1322-1329.

Heusch, M., Lin, L., Gelezianas, R., and Greene, W. C. (1999). The generation of nfkb2 p52: mechanism and efficiency. *Oncogene* 18, 6201-6208.

Hirofani, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K. (2005). The nuclear IkappaB protein IkappaBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J Immunol* 174, 3650-3657.

Hoberg, J. E., Popko, A. E., Ramsey, C. S., and Mayo, M. W. (2006). IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol* 26, 457-471.

Hoberg, J. E., Yeung, F., and Mayo, M. W. (2004). SMRT derepression by the IkappaB kinase alpha: a prerequisite to NF-kappaB transcription and survival. *Mol Cell* 16, 245-255.

Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O., and Woodgett, J. R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86-90.

Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L., and Baltimore, D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298, 1241-1245.

Hollstein, M. C., Peri, L., Mandard, A. M., Welsh, J. A., Montesano, R., Metcalf, R. A., Bak, M., and Harris, C. C. (1991). Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations. *Cancer Res* 51, 4102-4106.

Hong, S. H., and Privalsky, M. L. (2000). The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Mol Cell Biol* 20, 6612-6625.

Horikawa, T., Yang, J., Kondo, S., Yoshizaki, T., Joab, I., Furukawa, M., and Pagano, J. S. (2007). Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 67, 1970-1978.

Houde, C., Li, Y., Song, L., Barton, K., Zhang, Q., Godwin, J., Nand, S., Toor, A., Alkan, S., Smadja, N. V., *et al.* (2004). Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood* 104, 3697-3704.

Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK $\alpha$  subunit of I $\kappa$ B kinase. *Science* 284, 316-320.

Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K. I., Yoshida, K., and Karin, M. (2001). IKK $\alpha$  controls formation of the epidermis independently of NF- $\kappa$ B. *Nature* 410, 710-714.

Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H., and Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKK $\gamma$  by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- $\kappa$ B activation by genotoxic stress. *Cell* 115, 565-576.

Huang, W. C., Ju, T. K., Hung, M. C., and Chen, C. C. (2007). Phosphorylation of CBP by IKK $\alpha$  promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF- $\kappa$ B. *Mol Cell* 26, 75-87.

Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). NF- $\kappa$ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 114, 569-581.

Hubmann, R., Schwarzmeier, J. D., Shehata, M., Hilgarth, M., Duechler, M., Dettke, M., and Berger, R. (2002). Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99, 3742-3747.

Irvine, K. D. (1999). Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Curr Opin Genet Dev* 9, 434-441.

Ishitani, T., Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Shibuya, H., Gaynor, R. B., and Matsumoto, K. (2003). Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *Embo J* 22, 6277-6288.

Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194, 237-255.

Itoh, M., Kim, C. H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y. J., Maust, D., Yeo, S. Y., Lorick, K., Wright, G. J., Ariza-McNaughton, L., *et al.* (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* 4, 67-82.

Izzo, J. G., Malhotra, U., Wu, T. T., Luthra, R., Correa, A. M., Swisher, S. G., Hofstetter, W., Chao, K. S., Hung, M. C., and Ajani, J. A. (2007). Clinical biology of esophageal adenocarcinoma after surgery is influenced by nuclear factor- $\kappa$ B expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1200-1205.

Jang, M. K., Goo, Y. H., Sohn, Y. C., Kim, Y. S., Lee, S. K., Kang, H., Cheong, J., and Lee, J. W. (2001). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV stimulates nuclear factor- $\kappa$ B transactivation via phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem* 276, 20005-20010.

Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O. D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* 24, 36-44.

Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T. M., Gleiberman, A. S., Lunnyak, V., McEvilly, R. J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., *et al.* (2000). Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* 102, 753-763.

Jonas, B. A., and Privalsky, M. L. (2004). SMRT and N-CoR corepressors are regulated by distinct kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 279, 54676-54686.

Jono, H., Lim, J. H., Chen, L. F., Xu, H., Trompouki, E., Pan, Z. K., Mosialos, G., and Li, J. D. (2004). NF- $\kappa$ B is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF- $\kappa$ B: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway. *J Biol Chem* 279, 36171-36174.

Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Mathas, S., Stein, H., and Dorken, B. (2002). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99, 3398-3403.

Jundt, F., Probsting, K. S., Anagnostopoulos, I., Muehlinghaus, G., Chatterjee, M., Mathas, S., Bargou, R. C., Manz, R., Stein, H., and Dorken, B. (2004). Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood* 103, 3511-3515.

Karin, M. (1999). How NF- $\kappa$ B is activated: the role of the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18, 6867-6874.

Karin, M. (2006). Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.

Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002). NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2, 301-310.



Kearns, J. D., Basak, S., Werner, S. L., Huang, C. S., and Hoffmann, A. (2006). I $\kappa$ B provides negative feedback to control NF- $\kappa$ B oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *J Cell Biol* 173, 659-664.

Kim, B. Y., Gaynor, R. B., Song, K., Dritschilo, A., and Jung, M. (2002). Constitutive activation of NF- $\kappa$ B in Ki-ras-transformed prostate epithelial cells. *Oncogene* 21, 4490-4497.

Kim, D. W., Gazourian, L., Quadri, S. A., Romieu-Mourez, R., Sherr, D. H., and Sonenshein, G. E. (2000). The RelA NF- $\kappa$ B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* 19, 5498-5506.

Klement, J. F., Rice, N. R., Car, B. D., Abbondanzo, S. J., Powers, G. D., Bhatt, P. H., Chen, C. H., Rosen, C. A., and Stewart, C. L. (1996). I $\kappa$ B deficiency results in a sustained NF- $\kappa$ B response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol* 16, 2341-2349.

Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D., and Courtois, G. (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- $\kappa$ B signalling by deubiquitination. *Nature* 424, 801-805.

Krikos, A., Laherty, C. D., and Dixit, V. M. (1992). Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 267, 17971-17976.

Kumano, K., Chiba, S., Kunisato, A., Sata, M., Saito, T., Nakagami-Yamaguchi, E., Yamaguchi, T., Masuda, S., Shimizu, K., Takahashi, T., *et al.* (2003). Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* 18, 699-711.

Lai, E. C., Deblandre, G. A., Kintner, C., and Rubin, G. M. (2001). Drosophila neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. *Dev Cell* 1, 783-794.

Lawrence, T., Bebiec, M., Liu, G. Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005). IKK $\alpha$  limits macrophage NF- $\kappa$ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434, 1138-1143.

Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A., and Weinstein, B. M. (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 128, 3675-3683.

Le Borgne, R., Bardin, A., and Schweisguth, F. (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751-1762.

Lee, D. F., and Hung, M. C. (2008). Advances in targeting IKK and IKK-related kinases for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 14, 5656-5662.

Lee, T. K., Poon, R. T., Yuen, A. P., Ling, M. T., Kwok, W. K., Wang, X. H., Wong, Y. C., Guan, X. Y., Man, K., Chau, K. L., and Fan, S. T. (2006). Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 12, 5369-5376.

Leong, K. G., and Karsan, A. (2006). Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 107, 2223-2233.

Leong, K. G., Niessen, K., Kulic, I., Raouf, A., Eaves, C., Pollet, I., and Karsan, A. (2007). Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med* 204, 2935-2948.

Li, N., and Karin, M. (1998). Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF- $\kappa$ B through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13012-13017.

Li, Q., Lu, Q., Hwang, J. Y., Buscher, D., Lee, K. F., Izpisua-Belmonte, J. C., and Verma, I. M. (1999). IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev* 13, 1322-1328.

Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K. F., and Verma, I. M. (1999). Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase 2 gene. *Science* 284, 321-325.

Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J. D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347.

Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deirincq, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). The IKK $\beta$  subunit of I $\kappa$ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 189, 1839-1845.

Liang, C., Zhang, M., and Sun, S. C. (2006). beta-TrCP binding and processing of NF- $\kappa$ B2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell Signal* 18, 1309-1317.

Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (2004). Regulation of the NF- $\kappa$ B-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* 279, 26243-26250.

Ling, L., Cao, Z., and Goeddel, D. V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3792-3797.

Liu, B., Park, E., Zhu, F., Bustos, T., Liu, J., Shen, J., Fischer, S. M., and Hu, Y. (2006). A critical role for I kappaB kinase alpha in the development of human and mouse squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17202-17207.

Liu, B., Xia, X., Zhu, F., Park, E., Carbajal, S., Kiguchi, K., DiGiovanni, J., Fischer, S. M., and Hu, Y. (2008). IKKalpha is required to maintain skin homeostasis and prevent skin cancer. *Cancer Cell* 14, 212-225.

Lucas, P. C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L. M., Abazeed, M. E., Chen, F. F., Yamaoka, S., Seto, M., and Nunez, G. (2001). Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* 276, 19012-19019.

Luo, J. L., Tan, W., Ricono, J. M., Korchynskyi, O., Zhang, M., Gonias, S. L., Cheresch, D. A., and Karin, M. (2007). Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 446, 690-694.

Mabb, A. M., Wuerzberger-Davis, S. M., and Miyamoto, S. (2006). PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 8, 986-993.

Madhusudan, S., Foster, M., Muthuramalingam, S. R., Braybrooke, J. P., Wilner, S., Kaur, K., Han, C., Hoare, S., Balkwill, F., Talbot, D. C., *et al.* (2004). A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 6528-6534.

Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H., and Karin, M. (2005). IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 121, 977-990.

Maisey, N. (2007). Antitumor Necrosis Factor (TNF-a) Antibodies in the Treatment of Renal Cell Cancer. *Cancer Invest*, 1-5.

Marinari, B., Moretti, F., Botti, E., Giustizieri, M. L., Descargues, P., Giunta, A., Stolfi, C., Ballaro, C., Papoutsaki, M., Alema, S., *et al.* (2008). The tumor suppressor activity of IKKalpha in stratified epithelia is exerted in part via the TGF-beta antiproliferative pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17091-17096.

Massoumi, R., Chmielarska, K., Hennecke, K., Pfeifer, A., and Fassler, R. (2006). Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 125, 665-677.

May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glockner, J., Pober, J. S., and Ghosh, S. (2000). Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 289, 1550-1554.

Mayo, M. W., Norris, J. L., and Baldwin, A. S. (2001). Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. *Methods Enzymol* 333, 73-87.

McKenzie, F. R., Connelly, M. A., Balzarano, D., Muller, J. R., Geleziunas, R., and Marcu, K. B. (2000). Functional isoforms of IkappaB kinase alpha (IKKalpha) lacking leucine zipper and helix-loop-helix domains reveal that IKKalpha and IKKbeta have different activation requirements. *Mol Cell Biol* 20, 2635-2649.

McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J., and Olson, E. N. (2000). Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106-111.

McKinsey, T. A., Zhang, C. L., and Olson, E. N. (2001). Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 21, 6312-6321.

McWhirter, S. M., Fitzgerald, K. A., Rosains, J., Rowe, D. C., Golenbock, D. T., and Maniatis, T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 233-238.

Meffert, M. K., Chang, J. M., Wiltgen, B. J., Fanselow, M. S., and Baltimore, D. (2003). NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6, 1072-1078.

Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E. A. (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* 14, 29-36.

Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., and Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278, 860-866.

Milner, L. A., and Bigas, A. (1999). Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 93, 2431-2448.

Miller, B. S., and Zandi, E. (2001). Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem* 276, 36320-36326.

Miyamoto, S., and Verma, I. M. (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B story. *Adv Cancer Res* 66, 255-292.

Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C. A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I. M., Wolfe, M. S., *et al.* (2003). Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3, 565-576.

Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G., and Anderson, D. J. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101, 499-510.

Natoli, G., Saccani, S., Bosisio, D., and Marazzi, I. (2005). Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nat Immunol* 6, 439-445.

Naugler, W. E., and Karin, M. (2008). NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 18, 19-26.

Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M., and Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 317, 121-124.

Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., *et al.* (2007). Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 446, 557-561.

Nickoloff, B. J., Osborne, B. A., and Miele, L. (2003). Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 22, 6598-6608.

Nickoloff, B. J., Qin, J. Z., Chaturvedi, V., Denning, M. F., Bonish, B., and Miele, L. (2002). Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ* 9, 842-855.

Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C. C., Clevers, H., Dotto, G. P., and Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 33, 416-421.

O'Neil, J., Grim, J., Strack, P., Rao, S., Tibbitts, D., Winter, C., Hardwick, J., Welcker, M., Meijerink, J. P., Pieters, R., *et al.* (2007). FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med* 204, 1813-1824.

Oakley, F., Mann, J., Ruddell, R. G., Pickford, J., Weinmaster, G., and Mann, D. A. (2003). Basal expression of IkappaBalpha is controlled by the mammalian transcriptional repressor RBP-J (CBF1) and its activator Notch1. *J Biol Chem* 278, 24359-24370.

Oeckinghaus, A., Wegener, E., Welteke, V., Ferch, U., Arslan, S. C., Ruland, J., Scheidereit, C., and Krappmann, D. (2007). Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation. *Embo J* 26, 4634-4645.

Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B., and Bernstein, I. D. (2003). Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol* 14, 143-150.

Orlowski, R. Z., and Baldwin, A. S., Jr. (2002). NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 8, 385-389.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.

Palomero, T., Dominguez, M., and Ferrando, A. A. (2008). The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia. *Cell Cycle* 7, 965-970.

Palomero, T., Lim, W. K., Odom, D. T., Sulis, M. L., Real, P. J., Margolin, A., Barnes, K. C., O'Neil, J., Neuberg, D., Weng, A. P., *et al.* (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18261-18266.

Park, D. M., Li, J., Okamoto, H., Akeju, O., Kim, S. H., Lubensky, I., Vortmeyer, A., Dambrosia, J., Weil, R. J., Oldfield, E. H., *et al.* (2007). N-CoR pathway targeting induces glioblastoma derived cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle* 6, 467-470.

Park, G. Y., Wang, X., Hu, N., Pedchenko, T. V., Blackwell, T. S., and Christman, J. W. (2006). NIK is involved in nucleosomal regulation by enhancing histone H3 phosphorylation by IKKalpha. *J Biol Chem* 281, 18684-18690.

Park, J. M., Greten, F. R., Wong, A., Westrick, R. J., Arthur, J. S., Otsu, K., Hoffmann, A., Montminy, M., and Karin, M. (2005). Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity* 23, 319-329.

Park, K. J., Krishnan, V., O'Malley, B. W., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (2005). Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell* 18, 71-82.

Pasparakis, M., Schmidt-Suppran, M., and Rajewsky, K. (2002). IkappaB kinase signaling is essential for maintenance of mature B cells. *J Exp Med* 196, 743-752.

- Paxian, S., Merkle, H., Riemann, M., Wilda, M., Adler, G., Hameister, H., Liptay, S., Pfeffer, K., and Schmid, R. M. (2002). Abnormal organogenesis of Peyer's patches in mice deficient for NF-kappaB1, NF-kappaB2, and Bcl-3. *Gastroenterology* 122, 1853-1868.
- Pierce, J. W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore, S. A., Collins, T., and Gerritsen, M. E. (1997). 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.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., and Ben-Neriah, Y. (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461-466.
- Potten, C. S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020.
- Prajapati, S., Tu, Z., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (2006). IKKalpha regulates the mitotic phase of the cell cycle by modulating Aurora A phosphorylation. *Cell Cycle* 5, 2371-2380.
- Prendes, M., Zheng, Y., and Beg, A. A. (2003). Regulation of developing B cell survival by RelA-containing NF-kappa B complexes. *J Immunol* 171, 3963-3969.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J. C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., *et al.* (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* 20, 3427-3436.
- Reiley, W. W., Zhang, M., Jin, W., Losiewicz, M., Donohue, K. B., Norbury, C. C., and Sun, S. C. (2006). Regulation of T cell development by the deubiquitinating enzyme CYLD. *Nat Immunol* 7, 411-417.
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G., and Karin, M. (2008). NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453, 807-811.
- Robert-Moreno, A., Espinosa, L., de la Pompa, J. L., and Bigas, A. (2005). RBPJkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development* 132, 1117-1126.
- Robert-Moreno, A., Guiu, J., Ruiz-Herguido, C., Lopez, M. E., Ingles-Esteve, J., Riera, L., Tipping, A., Enver, T., Dzierzak, E., Gridley, T., *et al.* (2008). Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1. *Embo J* 27, 1886-1895.
- Romieu-Mourez, R., Kim, D. W., Shin, S. M., Demicco, E. G., Landesman-Bollag, E., Seldin, D. C., Cardiff, R. D., and Sonenshein, G. E. (2003). Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors. *Mol Cell Biol* 23, 5738-5754.
- Rothwarf, D. M., and Karin, M. (1999). The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* 1999, RE1.
- Rudolph, D., Yeh, W. C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A. J., and Mak, T. W. (2000). Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev* 14, 854-862.
- Ruocco, M. G., Maeda, S., Park, J. M., Lawrence, T., Hsu, L. C., Cao, Y., Schett, G., Wagner, E. F., and Karin, M. (2005). I{kappa}B kinase (IKK){beta}, but not IKK{alpha}, is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J Exp Med* 201, 1677-1687.
- Rupec, R. A., Jundt, F., Rebholz, B., Eckelt, B., Weindl, G., Herzinger, T., Flaig, M. J., Moosmann, S., Plewig, G., Dorken, B., *et al.* (2005). Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha. *Immunity* 22, 479-491.
- Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y. C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S., and Lu, K. P. (2003). Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 12, 1413-1426.
- Saccani, S., Marazzi, I., Beg, A. A., and Natoli, G. (2004). Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response. *J Exp Med* 200, 107-113.
- Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G. (2001). Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J Exp Med* 193, 1351-1359.
- Sancho, E., Battle, E., and Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 695-723.

Santagata, S., Demichelis, F., Riva, A., Varambally, S., Hofer, M. D., Kutok, J. L., Kim, R., Tang, J., Montie, J. E., Chinnaiyan, A. M., *et al.* (2004). JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer Res* 64, 6854-6857.

Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 1087-1095.

Scartozzi, M., Bearzi, I., Pierantoni, C., Mandolesi, A., Loupakis, F., Zaniboni, A., Catalano, V., Quadri, A., Zorzi, F., Berardi, R., *et al.* (2007). Nuclear factor-kB tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. *J Clin Oncol* 25, 3930-3935.

Schmidt-Supprian, M., Tian, J., Grant, E. P., Pasparakis, M., Maehr, R., Ovaa, H., Ploegh, H. L., Coyle, A. J., and Rajewsky, K. (2004). Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4566-4571.

Schmidt, D., Textor, B., Pein, O. T., Licht, A. H., Andrecht, S., Sator-Schmitt, M., Fusenig, N. E., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. (2007). Critical role for NF-kappaB-induced JunB in VEGF regulation and tumor angiogenesis. *Embo J* 26, 710-719.

Schwarz, E. M., Krimpenfort, P., Berns, A., and Verma, I. M. (1997). Immunological defects in mice with a targeted disruption in Bcl-3. *Genes Dev* 11, 187-197.

Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.

Senftleben, U., Li, Z. W., Baud, V., and Karin, M. (2001). IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity* 14, 217-230.

Shin, H. M., Minter, L. M., Cho, O. H., Gottipati, S., Fauq, A. H., Golde, T. E., Sonenshein, G. E., and Osborne, B. A. (2006). Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention. *Embo J* 25, 129-138.

Siebenlist, U., Franzoso, G., and Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10, 405-455.

Sil, A. K., Maeda, S., Sano, Y., Roop, D. R., and Karin, M. (2004). IkappaB kinase-alpha acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature* 428, 660-664.

Silverman, J. A., and Thorgeirsson, S. S. (1995). Regulation and function of the multidrug resistance genes in liver. *Prog Liver Dis* 13, 101-123.

Smahi, A., Courtois, G., Vabres, P., Yamaoka, S., Heuertz, S., Munnich, A., Israel, A., Heiss, N. S., Klauck, S. M., Kioschis, P., *et al.* (2000). Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* 405, 466-472.

Song, L. L., Peng, Y., Yun, J., Rizzo, P., Chaturvedi, V., Weijzen, S., Kast, W. M., Stone, P. J., Santos, L., Loreda, A., *et al.* (2008). Notch-1 associates with IKKalpha and regulates IKK activity in cervical cancer cells. *Oncogene* 27, 5833-5844.

Strasser, A., Grumont, R. J., Stanley, M. L., and Gerondakis, S. (1999). The transcriptional regulator Rel is essential for antigen receptor-mediated stimulation of mature T cells but dispensable for positive and negative selection of thymocytes and T cell apoptosis. *Eur J Immunol* 29, 928-935.

Su, L. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Preisinger, A. C., Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A., and Dove, W. F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256, 668-670.

Sun, B., and Karin, M. (2008). NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene* 27, 6228-6244.

Sun, L., Deng, L., Ea, C. K., Xia, Z. P., and Chen, Z. J. (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* 14, 289-301.

Suyang, H., Phillips, R., Douglas, I., and Ghosh, S. (1996). Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 16, 5444-5449.

Tak, P. P., and Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107, 7-11.

Takaku, K., Oshima, M., Miyoshi, H., Matsui, M., Seldin, M. F., and Taketo, M. M. (1998). Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 92, 645-656.

Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N., and Akira, S. (1999). Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* 284, 313-316.

Tam, W. F., Lee, L. H., Davis, L., and Sen, R. (2000). Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* 20, 2269-2284.

Tanaka, M., Fuentes, M. E., Yamaguchi, K., Durnin, M. H., Dalrymple, S. A., Hardy, K. L., and Goeddel, D. V. (1999). Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* 10, 421-429.

Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M., and Lin, A. (2001). Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 414, 313-317.

Tapia, M. A., Gonzalez-Navarrete, I., Dalmases, A., Bosch, M., Rodriguez-Fanjul, V., Rolfe, M., Ross, J. S., Mezquita, J., Mezquita, C., Bachs, O., *et al.* (2007). Inhibition of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin. *Cell Cycle* 6, 2284-2292.

Tegethoff, S., Behlke, J., and Scheidereit, C. (2003). Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 23, 2029-2041.

Tergaonkar, V., Correa, R. G., Ikawa, M., and Verma, I. M. (2005). Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NF-kappaB activity. *Nat Cell Biol* 7, 921-923.

Tew, G. W., Lorimer, E. L., Berg, T. J., Zhi, H., Li, R., and Williams, C. L. (2008). SmgGDS regulates cell proliferation, migration, and NF-kappaB transcriptional activity in non-small cell lung carcinoma. *J Biol Chem* 283, 963-976.

Thiery, J. P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15, 740-746.

Thome, M. (2004). CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol* 4, 348-359.

Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. (1995). I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 80, 573-582.

Tiefenbach, J., Novac, N., Ducasse, M., Eck, M., Melchior, F., and Heinzl, T. (2006). SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription. *Mol Biol Cell* 17, 1643-1651.

Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., *et al.* (2000). NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 404, 778-782.

Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschirzitis, T., Farmer, H., Ashworth, A., and Mosialos, G. (2003). CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 424, 793-796.

Tu, Z., Prajapati, S., Park, K. J., Kelly, N. J., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (2006). IKK alpha regulates estrogen-induced cell cycle progression by modulating E2F1 expression. *J Biol Chem* 281, 6699-6706.

Vacca, A., Felli, M. P., Palermo, R., Di Mario, G., Calce, A., Di Giovine, M., Frati, L., Gulino, A., and Screpanti, I. (2006). Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kappaB pathways in T-cell development and leukemia. *Embo J* 25, 1000-1008.

Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P. H., Keats, J. J., Wang, H., Vignali, D. A., Bergsagel, P. L., and Karin, M. (2008). Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 9, 1364-1370.

van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.

van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959-963.

van Hogerlinden, M., Rozell, B. L., Ahrlund-Richter, L., and Toftgard, R. (1999). Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res* 59, 3299-3303.

Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J* 22, 1313-1324.

Vilimas, T., Mascarenhas, J., Palomero, T., Mandal, M., Buonamici, S., Meng, F., Thompson, B., Spaulding, C., Macaroun, S., Alegre, M. L., *et al.* (2007). Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nat Med* 13, 70-77.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., and Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.

Wang, D., Westerheide, S. D., Hanson, J. L., and Baldwin, A. S., Jr. (2000). Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem* 275, 32592-32597.

Wang, S., Sdrulla, A. D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., and Barres, B. A. (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21, 63-75.

Wang, W., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Larry, L., Cleary, K. R., and Chiao, P. J. (1999). The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 5, 119-127.

Weichert, W., Boehm, M., Gekeler, V., Bahra, M., Langrehr, J., Neuhaus, P., Denkert, C., Imre, G., Weller, C., Hofmann, H. P., *et al.* (2007). High expression of RelA/p65 is associated with activation of nuclear factor-kappaB-dependent signaling in pancreatic cancer and marks a patient population with poor prognosis. *Br J Cancer* 97, 523-530.

Weih, D. S., Yilmaz, Z. B., and Weih, F. (2001). Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *J Immunol* 167, 1909-1919.

Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S. M., Zlobin, A., Osborne, B. A., Gottipati, S., Aster, J. C., Hahn, W. C., *et al.* (2002). Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* 8, 979-986.

Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., and Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269-271.

Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C. G., Sai, H., Tobias, J., *et al.* (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* 20, 2096-2109.

Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., *et al.* (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430, 694-699.

Wessells, J., Baer, M., Young, H. A., Claudio, E., Brown, K., Siebenlist, U., and Johnson, P. F. (2004). BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. *J Biol Chem* 279, 49995-50003.

Whiteside, S. T., and Israel, A. (1997). I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 8, 75-82.

Wu, C. J., and Ashwell, J. D. (2008). NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3023-3028.

Wu, Z. H., Shi, Y., Tibbetts, R. S., and Miyamoto, S. (2006). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 311, 1141-1146.

Wulczyn, F. G., Naumann, M., and Scheidereit, C. (1992). Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 358, 597-599.

Xiao, G., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7, 401-409.

Yamamoto, M., and Akira, S. (2005). TIR domain-containing adaptors regulate TLR signaling pathways. *Adv Exp Med Biol* 560, 1-9.

Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., *et al.* (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I kappaBzeta. *Nature* 430, 218-222.

Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (2001). Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med* 1, 287-296.

Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., and Gaynor, R. B. (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 423, 655-659.

Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., and Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I kappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93, 1231-1240.

Yang, J., Amiri, K. I., Burke, J. R., Schmid, J. A., and Richmond, A. (2006). BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways. *Clin Cancer Res* 12, 950-960.

Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.

Yang, J., and Richmond, A. (2001). Constitutive I $\kappa$ B kinase activity correlates with nuclear factor- $\kappa$ B activation in human melanoma cells. *Cancer Res* 61, 4901-4909.

Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J., and Zoghbi, H. Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294, 2155-2158.

Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., and Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *Embo J* 23, 2369-2380.

Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C. M., Carcangiu, M. L., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6414-6418.

Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997). The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 91, 243-252.

Zaph, C., Troy, A. E., Taylor, B. C., Berman-Booty, L. D., Guild, K. J., Du, Y., Yost, E. A., Gruber, A. D., May, M. J., Greten, F. R., *et al.* (2007). Epithelial-cell-intrinsic IKK- $\beta$  expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 446, 552-556.

Zhang, B., Wang, Z., Li, T., Tsitsikov, E. N., and Ding, H. F. (2007). NF- $\kappa$ B2 mutation targets TRAF1 to induce lymphomagenesis. *Blood* 110, 743-751.

Zhang, J., Stirling, B., Temmerman, S. T., Ma, C. A., Fuss, I. J., Derry, J. M., and Jain, A. (2006). Impaired regulation of NF- $\kappa$ B and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. *J Clin Invest* 116, 3042-3049.

Zhang, S. Q., Kovalenko, A., Cantarella, G., and Wallach, D. (2000). Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK $\gamma$ ) upon receptor stimulation. *Immunity* 12, 301-311.

Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., and Yankner, B. A. (2000). Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol* 2, 463-465.

Zhao, Q., and Lee, F. S. (1999). Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor- $\kappa$ B through I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  and I $\kappa$ B kinase- $\beta$ . *J Biol Chem* 274, 8355-8358.

Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1, 661-671.

Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W., and Dixit, V. M. (2004). Bcl10 activates the NF- $\kappa$ B pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 427, 167-171.

Zhu, F., Xia, X., Liu, B., Shen, J., Hu, Y., Person, M., and Hu, Y. (2007). IKK $\alpha$  shields 14-3-3 $\sigma$ , a G(2)/M cell cycle checkpoint gene, from hypermethylation, preventing its silencing. *Mol Cell* 27, 214-227.

Zou, P., Kawada, J., Pesnicak, L., and Cohen, J. I. (2007). Bortezomib induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B cells and prolongs survival of mice inoculated with EBV-transformed B cells. *J Virol* 81, 10029-10036.