

BRUNO KAUFMANN ROBBS

**“Regulação do ciclo, morte e transformação
celular pelos membros da família NFAT de
fatores de transcrição”**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Bruno Kaufmann Robbs

**Regulação do ciclo, morte e transformação
celular pelos membros da família NFAT de fatores
de transcrição**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Biofísica) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Biofísica).

Orientador: João P. Bioso Viola

**Rio de Janeiro
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Robbs, Bruno K.

Regulação do ciclo, morte e transformação celular pelos membros da família NFAT de fatores de transcrição. Rio de Janeiro: UFRJ/CCS/IBCCF/2009
191p, 45f

Orientador: João P. Biaso Viola

Tese (doutorado) – UFRJ/IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Biofísica), 2009.

1. NFAT 2.apoptose 3.ciclo celular 4.transformação celular

I. Viola. João P. Biaso II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, IBCCF III. Regulação do ciclo, morte e transformação celular pelos membros da família NFAT de fatores de transcrição

Este trabalho foi realizado na Divisão de Biologia Celular do Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA), sob a orientação do Dr. João P. de Biaso Viola e com o auxílio financeiro da Fundação Ary Frauzino (FAF/INCA), da CAPES, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do *Fogarty International Research Collaboration Award* (FIRCA/NIH), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (ICGEB).

Folha de aprovação

Regulação do ciclo, morte e transformação celular pelos membros da família NFAT de fatores de transcrição.

Bruno Kaufmann Robbs

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Biofísica) do IBCCF, CCS, UFRJ, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutor em Ciências (Biofísica).

Dr. João P. Biaso Viola, Pesquisador, Divisão de Biologia Celular, INCA
(Orientador)

Dr. Rafael Linden, Professor Titular, IBCCF, UFRJ
(Membro da Banca)

Dr. Carlos Gil M. Ferreira, Pesquisador, Serviço de Pesquisa Clínica, INCA
(Membro da Banca)

Dr. Roger Chamas, Professor Titular, FM, USP
(Membro da Banca)

Dr. Bruno Lourenço Diaz, Professor Adjunto, IBCCF, UFRJ
(Revisor)

Dr. Célio Freire de Lima, Professor Adjunto, IBCCF, UFRJ
(Suplente)

Dr. Martin Bonamino, Pesquisador, Divisão de Biologia Celular, INCA
(Suplente)

Aos meus pais, Norma e Paschoal, que sempre me apoiaram em todas as
minhas decisões e indecisões e apostaram na minha vontade.

AGRADECIMENTOS

Essa é a melhor parte onde lembramos dos apoios que tivemos em tudo que enfrentamos. Apesar de ser difícil o desenvolvimento de uma tese, nesses momentos é que vemos o quanto as pessoas que amamos e que nos apoiaram são fundamentais para a vida (saudável). A vida (e o trabalho) sem o amor e a partilha de bons momentos com amigos seria para mim como um estágio de iniciação científica, onde trabalhamos muito, recebemos pouco e não sabemos muito bem o que e por quê estamos fazendo isso. Então, essas pessoas que vou agradecer abaixo foram as responsáveis por transformar esse “estágio” em uma vida completa.

À meus pais, Norma e Paschoal, que daria para escrever mais umas duas teses só de agradecimento para vocês. Pelo amor, carinho e apoio em minhas decisões. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos Charles e Gabrielle, pelas conversas, risos e conselhos trocados. Obrigado pela presença de vocês e de seus produtos (Júlia, Guido, Mariana e Natália) em minha vida.

À Patrícia minha amada mulher! Obrigado por você existir (as vezes agente pensa que é lenda) e por me fazer muito muito muito feliz. Sem você esse trabalho teria sido muito menos prazeroso e mais difícil.

Ao João Viola que me orientou tanto na pesquisa quanto em como ser um pesquisador. Obrigado pela paciência, atenção, apoio (monetário e de incentivo) e pela amizade. Obrigado pelo excelente orientador e pessoa que é!

Obrigado as pessoas que me ajudaram diretamente nesse trabalho: André Cruz, Giuliana Mognol e Pedro Ivo Lucena. Sem vocês esse trabalho teria sido impossível de ser realizado. Obrigado pela força e amizade de vocês. Em especial, obrigado pela amizade da Giuliana que além de ter propiciado boas trocas de idéias no lab sua presença é sempre engraçada!

Obrigado a todos do lab! Em especial à Flávia, Patrícia, Renata, Steffi, Bianca, Bruna e Douglas (não necessariamente nessa ordem). A presença e ajuda de vocês foram muito importantes e divertidas ao longo desse trabalho. Obrigadu!

Obrigado ao pessoal do apoio e do biotério que facilitaram e possibilitaram o desenvolvimento desse trabalho.

E obrigado a todos do INCA (CPQ) que me agüentaram, ajudaram, atrapalharam (de vez em quando), me divertiram e me apoiaram!!!

Obrigado as agencias de auxílio financeiro Fundação Ary Frauzino (FAF/INCA), da CAPES, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do *Fogarty International Research Collaboration Award* (FIRCA/NIH), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (ICGEB), que possibilitaram o desenvolvimento desse trabalho

Obrigado a todos!!!

*“Os que têm o poder de ferir e não o fazem,
Que não fazem aquilo que mais aparentariam fazer,
Que, aos outros movendo, são eles mesmos como pedras,
Imóveis, frios e lentos à tentação;
Eles corretissimamente são os que herdaram as graças dos Céus
E controlam as riquezas da Natureza dos gastos;
São os senhores e donos de si mesmo,
Enquanto que os outros, só os criados de suas excelências.
A flor do verão é doce para todo o verão
Apesar de para si mesma ela ser só nascer e fenecer;
Mas se aquela flor ficar doente,
A erva mais daninha já a deixou muito para trás:
 Pois que suas ações tornam amargas as coisas mais doces:
 Lírios podres cheiram pior que os matinhos.”*

(Sonetos de William Shakespeare em Pequenas Verdades, Tradução de Marcos Beltrão Frederico. Poema XCIV)

Resumo

Título - Regulação do ciclo, morte e transformação celular pelos membros da família NFAT de fatores de transcrição

Bruno Kaufmann Robbs

João P. BIASO VIOLA

O fator nuclear de células T ativadas (NFAT) foi primeiramente descrito como o principal fator de transcrição envolvido na ativação e diferenciação de células T. A família NFAT é composta por cinco diferentes genes, NFAT1-5, que codificam para diferentes isoformas protéicas. Diversos estudos *in vitro* sugerem que os membros da família NFAT são proteínas redundantes. Contudo, a análise dos camundongos deficientes para as proteínas NFAT sugere papéis diferentes para os membros da família NFAT de fatores de transcrição na regulação da proliferação celular e apoptose. De fato, camundongos NFAT1^{-/-} são viáveis e apresentam hiperproliferação linfocitária enquanto os camundongos NFAT2^{-/-} morrem em estágio embrionário e linfócitos de camundongos quiméricos RAG1^{-/-} x NFAT2^{-/-} demonstram uma proliferação reduzida. O NFAT pode também regular diversos fatores envolvidos no ciclo celular e na sobrevivência que podem influenciar no crescimento tumoral, onde foi demonstrado que o NFAT regula genes do ciclo celular como CDK4, c-myc e ciclinas A2 e D1 e está envolvido na morte celular induzida por ativação em linfócitos, induzindo a expressão de Fas-L. Aqui nós demonstramos que três formas constitutivamente ativas de diferentes isoformas variantes de *splicing* das proteínas NFAT1 e NFAT2 (CA-NFAT1-C, CA-NFAT2-A e CA-NFAT2-A2) induzem fenótipos distintos em células NIH3T3. Enquanto a expressão do CA-NFAT1-C e CA-NFAT2-A2 induz uma parada do ciclo celular e apoptose em fibroblastos NIH3T3, o CA-NFAT2-A leva a um aumento da capacidade de proliferação e induz a transformação celular. Além disso, diferentemente do CA-NFAT2-A, o CA-NFAT2-A2 é capaz de induzir a apoptose em células NIH3T3 e essa propriedade reduz a capacidade desse membro NFAT2 de transformar essas células. Em contrapartida, a expressão do CA-NFAT1-C é capaz de reverter a transformação de células NIH3T3 induzida pelo oncogene H-rasV12. Esses dados demonstram que o NFAT1-C e o NFAT2-A2 são funcionalmente diferentes do NFAT2-A e nossos dados mostram que essa diferença, pelo menos parcialmente, é devida ao domínio TAD C-terminal e N-terminal dessas proteínas, respectivamente. Em conjunto, esses dados sugerem que o NFAT1-C funciona como um gene supressor de tumor e o NFAT2-A como um oncogene, suportando um papel diferencial para esses dois fatores de transcrição no desenvolvimento tumoral.

Palavras-chave: NFAT, apoptose, ciclo celular, transformação celular

ABSTRACT

Title- Regulation of cell cycle, death and transformation by NFAT members of transcription factors

Bruno Kaufmann Robbs

João P. Biaso Viola

Nuclear factor of activated T cells (NFAT) was first described as a major activation and differentiation transcription factor in T cells. NFAT family comprises five different genes, NFAT1-5, which codes for several different protein isoforms. Several *in vitro* studies suggest that NFAT family members are redundant proteins. However, analysis of mice deficient for NFAT proteins suggested different roles for NFAT family of transcription factors in regulation of cell proliferation and apoptosis. In fact, NFAT1^{-/-} mice are viable and present lymphocyte hyperproliferation whereas NFAT2^{-/-} mice are embryonic lethal and lymphocytes from RAG1^{-/-} x NFAT2^{-/-} chimeric mice showed reduced proliferation. NFAT may also regulate several cell cycle and survival factors influencing tumor growth and survival, where it has been shown that NFAT can regulate cell cycle involved genes as CDK4, c-myc and cyclin A2 and D1, and is involved in lymphocyte activated cell death by inducing the expression of Fas-L expression. Here, we demonstrate that three constitutively active forms of NFAT proteins (CA-NFAT1-C, CA-NFAT2-A and CA-NFAT2-A2) induce distinct phenotypes in NIH3T3 cells. Whereas CA-NFAT1-C and CA-NFAT2-A2 expression induces cell cycle arrest and apoptosis in NIH3T3 fibroblasts, CA-NFAT2-A leads to increased proliferation capacity and induction of cell transformation. Furthermore, differently from CA-NFAT2-A, CA-NFAT2-A2 is able to induce apoptosis in NIH3T3 cells whereas this propriety reduces the capacity of this NFAT2 member to transform these cells. On the other hand, CA-NFAT1-C expression subverted the transformation of NIH3T3 cells induced by the H-rasV12 oncogene. These data demonstrate that NFAT1-C and NFAT2-A2 are functionally different from NFAT2-A and our data show that these differences are at least partially due to the protein C-terminal and N-terminal TAD domains of these proteins, respectively. These results suggest that NFAT1-C acts as a tumor suppressor gene and NFAT2-A acts as an oncogene, supporting differential roles for these two transcription factors in tumor development.

Keywords: NFAT, apoptosis, cell cycle, cell transformation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 – Fenótipo dos camundongos deficientes para os membros da família NFAT.....	48
Tabela 2 – Genes envolvidos no controle do ciclo e morte celular regulados ao nível transcricional pelo NFAT.....	51
Figura 1 – Representação esquemática dos membros da família NFAT de fatores de transcrição controlados por influxo de Ca^{2+}	22
Figura 2 – Via de ativação das proteínas NFAT.....	26
Figura 3 – Motivos estruturais conservados entre as proteínas NFAT presentes dentro dos domínios TAD.....	28
Figura 4 – Os estágios do ciclo celular.....	40
Figura 5 – Via Intrínseca e Via Extrínseca de morte celular por apoptose.....	44
Figura 6 – Vetores retrovirais.....	58
Figura 7 – Alinhamento esquemático das proteínas NFAT usadas nesse estudo.....	69
Figura 8 – Validação dos vetores retrovirais contendo os cDNA dos NFAT.....	71
Figura 9 - As proteínas CA-NFAT são capazes de induzir a transativação gênica constitutivamente.....	72
Figura 10 - A atividade sustentada do NFAT1-C e do NFAT2-A induz fenótipos opostos em células NIH3T3.....	74
Figura 11 - O papel do CA-NFAT1-C e CA-NFAT2-A no controle do ciclo celular.....	76
Figura 12 - O CA-NFAT1-C, mas não o CA-NFAT2-A é capaz de induzir morte celular por apoptose nas células NIH3T3.....	78
Figura 13 - A atividade constitutiva do NFAT2-A, mas não do NFAT1-C é capaz de induzir a formação de foci em cultura.....	81

Figura 14 -	A expressão do CA-NFAT2-A é capaz de induzir o crescimento independente de ancoragem das células NIH3T3.....	83
Figura 15 -	A atividade sustentada do NFAT2-A em células NIH3T3 promove a proliferação em condições reduzidas de soro.....	84
Figura 16 -	A atividade sustentada do NFAT2-A em células NIH3T3 induz a proliferação e previne a morte celular induzida por privação de soro.....	86
Figura 17 -	O CA-NFAT2-A é capaz de induzir a formação de tumores em camundongos imunodeficientes.....	87
Figura 18 -	Os vetores retrovirais levam a expressão de níveis comparáveis e com peso molecular aparente esperado das proteínas CA-NFAT2 em células NIH3T3.....	90
Figura 19 -	O variante de splicing CA-NFAT2-A2 é capaz de induzir uma redução da proliferação e indução da morte celular em células NIH3T3.....	91
Figura 20 -	A isoforma NFAT2-A2 é capaz de induzir a transformação celular com menos intensidade em relação ao NFAT2-A.....	93
Figura 21 -	A ablação do N-terminal da proteína CA-NFAT2-A2 é capaz de reverter a supressão da proliferação.....	95
Figura 22 -	O N-terminal do CA-NFAT2-A2 é fundamental para a indução da morte celular em células NIH3T3.....	96
Figura 23 -	A ablação do N-terminal da proteína CA-NFAT2-A2 induz um aumento do potencial de transformação desta proteína.....	97
Figura 24 -	Construção das células NIH3T3 expressando os conhecidos oncogenes <i>c-myc</i> e <i>H-rasV12</i>	99
Figura 25 -	A proteína H-rasV12, mas não o c-myc é capaz de induzir o primeiro fenótipo de transformação celular em células NIH3T3.....	101
Figura 26 -	Células que expressam a proteína H-rasV12 superproliferam e apresentam um aumento na entrada do ciclo celular.....	102

Figura 27 -	A expressão de H-rasV12 nas células NIH3T3 é capaz de induzir o crescimento independente de ancoragem.....	103
Figura 28 -	O CA-NFAT1-C suprime a proliferação celular de células neoplásicas.....	104
Figura 29 -	O CA-NFAT1-C suprime o ciclo celular de células neoplásicas.....	105
Figura 30 -	A via de sinalização induzida pelo NFAT1-C leva a morte celular de células NIH3T3 transformadas pelo H-rasV12.....	106
Figura 31 -	A proteína CA-NFAT1-C é capaz de reduzir a formação de foci em cultura de células transformadas.....	107
Figura 32 -	O CA-NFAT1-C, mas não o CA-NFAT2-A é capaz de impedir o crescimento independente de ancoragem de células transformadas.....	109
Figura 33 -	O CA-NFAT1-C age como um gene supressor de tumor.....	110
Figura 34 -	A ablação do C-terminal longo do CA-NFAT1-C induz um aumento da proliferação celular.....	112
Figura 35 -	A ablação do C-terminal longo do CA-NFAT1-C abole a capacidade de induzir a parada do ciclo celular e apoptose.....	113
Figura 36 -	O CA-NFAT1- Δ C é capaz de induzir a formação de foci em cultura.....	114
Figura 37 -	A proteína truncada do CA-NFAT1-C que não possui o C-terminal induz um fenótipo transformado intermediário.....	115
Figura 38 -	A proteína truncada do CA-NFAT1-C que não possui o C-terminal induz um fenótipo transformado intermediário.....	116
Figura 39 -	A proteína CA-NFAT1- Δ C previne a morte e induz a entrada no ciclo celular de células em privação de fatores de crescimento.....	118
Figura 40 -	A porção C-terminal da proteína CA-NFAT1-C é a responsável pela propriedade supressora de tumor.....	119
Figura 41 -	O CA-NFAT1-C é capaz de reprimir a proliferação celular induzida pelo CA-NFAT2-A.....	121

Figura 42 -	O CA-NFAT1-C é capaz de induzir a morte celular em células transformadas pelo CA-NFAT2-A.....	122
Figura 43 -	O CA-NFAT1-C reduz a formação de foci induzida pelo CA-NFAT2-A.....	123
Figura 44 -	O CA-NFAT1-C reduz o crescimento independente de ancoragem induzido pelo CA-NFAT2-A.....	124
Figura 45 -	O CA-NFAT1-C suprime o fenótipo transformado induzido pelo CA-NFAT2-A.....	125

LISTA DE ABREVEIATURAS

AAD -	Domínio ácido de ativação (acidic activation domain)
AICD -	Morte celular induzida por ativação (Activation-induced cell death)
AIF -	Fator de indução da apoptose (apoptosis-inducing factor)
AP -	Proteína Ativadora (activator protein)
Apaf -	Fator ativador de proteases apoptóticas (Apoptotic protease activating factor)
Bcl -	Oncogene associado a linfoma de célula B (B cell lymphoma associated oncogene)
BH -	Domínio de homologia a Bcl-2 (Bcl-2 homology domain)
Bid -	Agonista de morte com domínio de interação BH3 (BH3 interacting domain death agonist)
BLyS -	Estimulador de linfócitos B (B lymphocyte stimulator)
CA -	Contitativamente ativa
Ca ²⁺ -	Íon divalente de cálcio
CAD -	DNase ativada por caspase (caspase activated DNase)
CDK -	Cinase dependente de ciclina (cyclin-dependent kinase)
CK -	Caseína cinase
CKI -	Inibidor de CDK (CDK Inhibitor)
CMV -	Citomegalovírus
COX-2 -	Ciclooxigenase-2
CRAC -	Canais de Ca ²⁺ ativados por liberação de Ca ²⁺
CsA -	Ciclosporina A
D.O. -	Densidade óptica
DAG -	Diacilglicerol
DBD -	Domínio de ligação ao DNA (DNA binding domain)
DF -	Receptores de morte (Death Receptors)
DMEM -	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco modified Eagle medium)
DNA -	Ácido desoxiribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
E2F -	Fator de ligação ao Promotor de E2 (E2 promoter binding factor)

EGFP -	Proteína fluorescente verde melhorada (enhanced green fluorescent protein)
EMSA -	Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética (electrophoretic mobility shift assay)
EndoG -	Endonuclease G
EPM -	Erro padrão da média (standard error of the mean)
ER -	Receptor de estrógeno (estrogen receptor)
ERK -	MAP cinase regulada extracelularmente (Extracellular-regulated MAP kinase)
G ₁ /G ₂ -	Fase de pausa (gap)
GSK3 -	Glicogênio sintase cinase 3
IAP -	Proteína inibidora de apoptose (Inhibitor of apoptosis protein)
ICAD -	Proteína inibidora da DNase ativada por caspase (Inhibitor of caspase activated DNase)
IFN -	Interferon
IL -	Interleucina
IP -	Iodeto de propídeo
IP3 -	Inositol-1,4,5-trifosfato
IRES -	Sítio de entrada interna de ribossomo (Internal ribosome entry site)
JNK -	Cinase da região N-terminal de c-Jun (c-Jun N-terminal Kinase)
Luc -	Luciferase
M -	Mitose
MEF2 -	Fator reforçador de miócito (Myocyte enhancing factor)
mTOR -	Alvo mecanístico da rapamicina (mechanistic target of rapamycin)
NES -	Sinal de exportação nuclear (Nuclear exportation signal)
NFAT -	Fator Nuclear de células T ativadas (Nuclear Factor of activated T cells)
NHR -	Região de homologia do NFAT (NFAT homology region)
NLS -	Sinal de localização nuclear (nuclear localization signal)
Nur77 -	Receptor nuclear órfão 77 (orphan nuclear receptor 77)

OREBP -	Proteína ligante do elemento osmótico responsivo (osm response element binding protein)
PCL -	Proteína fosfolipase (phospholipase protein)
PKA -	Proteína cinase A
PKC -	Proteína cinase C
Rag -	Recombinase
RHR -	Região de homologia as proteínas Rel (Rel homology region)
RNA -	Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)
S -	Fase de Síntese
SFB -	Soro fetal bovino
TAD -	Domínio de transativação (Transactivation domain)
TCR -	Receptor de células T (T cell receptor)
TNF -	Fator de necrose tumoral (Tumor necrose factor)
TonE-BP -	Proteína ligante de elemento responsivo a tonicidade (protein binding to the tonicity response element)
TRAIL -	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TNF-related apoptosis inducing ligand)
WT -	Selvagem (Wild type)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. FAMÍLIA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NFAT	20
1.1.1. <i>O NFAT1 e o NFAT2</i>	35
1.2. REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR E APOPTOSE	38
1.2.1. <i>Ciclo celular</i>	38
1.2.2. <i>Apoptose</i>	41
1.2.3. <i>As proteínas NFAT na regulação de genes do ciclo celular e da apoptose</i>	47
1.3. O NFAT NA TUMORIGÊNESE	52
2. OBJETIVOS	55
2.1. OBJETIVO GERAL	55
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3. MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1. ANIMAIS	56
3.2. CULTURA DE CÉLULAS	56
3.3. COSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RETROVIRÁIS	57
3.4. PRODUÇÃO DE RETROVÍRUS E INFECÇÃO DE CÉLULAS ALVO	59
3.5. CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES TRANSFORMADAS NIH3T3-H-RASV12 E NIH3T3-C-MYC-ER.	61
3.6. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	62
3.7. ANÁLISE DE CICLO CELULAR E SUB-G ₀	62
3.8. MARCAÇÃO POR ANEXINA V	63
3.9. PERDA DE INIBIÇÃO POR CONTATO: ENSAIO DE FORMAÇÃO DE FOCO	63
3.10. CRESCIMENTO INDEPENDENTE DE ANCORAGEM EM MEIO SEMI-SÓLIDO	64
3.11. CRESCIMENTO TUMORAL EM CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES	65

3.12 ANÁLISE POR WESTERN BLOT	65
3.13 IMUNOLOCALIZAÇÃO DO NFAT	66
3.14 ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO	67
4. RESULTADOS	68
4.1 VALIDAÇÃO DOS VETORES RETROVIRAIS	68
4.2 O CA-NFAT1-C É CAPAZ DE INDUZIR UM FENÓTIPO OPOSTO EM RELAÇÃO AO CA-NFAT2-A	72
4.3 A ATIVIDADE DO CA-NFAT2-A, MAS NÃO DO CA-NFAT1, É CAPAZ DE INDUZIR TODOS OS MARCOS DE TRANSFORMAÇÃO CELULAR NA NIH3T3	79
4.4 O NFAT2-A E NFAT2-A2 TEM PAPÉIS DIFERENTES NA REGULAÇÃO DA MORTE CELULAR DA CÉLULA NIH3T3	87
4.5 O CA-NFAT1-C DEMONSTRA A CAPACIDADE DE AGIR COMO UM SUPRESSOR DE TUMOR	97
4.6 O DOMÍNIO TAD-C DO NFAT1 É RESPONSÁVEL PELO FENÓTIPO SUPRESSOR DE TUMOR	110
4.7 O CA-NFAT1-C SUPRIME A TRANSFORMAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELO CA-NFAT2-A	119
5. DISCUSSÃO	127
6. CONCLUSÕES	143
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
8. ANEXOS	159
8.1 IFN-GAMMA PRODUCTION BY CD8+ T CELLS DEPENDS ON NFAT1 TRANSCRIPTION FACTOR AND REGULATES TH DIFFERENTIATION	160
8.2 LIPID BODIES ARE RESERVOIRS OF CYCLOOXYGENASE-2 AND SITES OF PROSTAGLANDIN-E2 SYNTHESIS IN COLON CANCER CELLS	169
8.3 DUAL ROLES FOR NFAT TRANSCRIPTION FACTOR GENES AS ONCOGENES AND TUMOR SUPPRESSORS	178

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família de fatores de transcrição NFAT

As proteínas que pertencem à família de fatores de transcrição NFAT (fator nuclear de células T ativadas) exercem um papel central na indução da transcrição de genes durante a resposta imune (revisado por Rao *et al.*, 1997). O NFAT foi primeiramente identificado em células T como um fator nuclear que podia ser induzido e que se ligava à região distal do promotor do gene de IL-2 humana (Shaw *et al.*, 1988). Contudo, após todas as proteínas da família NFAT terem sido isoladas e molecularmente caracterizadas, tornou-se claro que sua expressão não estava limitada a células T. Pelo menos um membro da família NFAT é expresso em quase todos os tipos celulares que foram analisados (revisado por Macian, 2005). A família de fatores de transcrição NFAT é composta por cinco diferentes membros codificados em cinco diferentes genes onde suas proteínas são denominadas NFAT1 (NFATp ou NFATc2), NFAT2 (NFATc ou NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx ou NFATc3) e NFAT5 (TonE-BP ou OREBP) (revisado por Rao *et al.*, 1997; Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999; Macian, 2005). As proteínas codificadas por esses genes tem em comum as seguintes características que as tornam parte da família: (1) elas são relacionadas por similaridade de sequência de aminoácidos; (2) todas se ligam ao sítio distal de NFAT do promotor de IL-2, *in vitro*; (3) são capazes de induzir a transcrição a partir de construções repórteres responsivas a NFAT após

estimulação, e (4) com exceção do NFAT5, todas se ligam e cooperam com a proteína AP-1 (Masuda *et al.*, 1998). Em adição, todos os membros da família NFAT tem diversos variantes de *splicing* que culminam em 24 variantes detectados para o NFAT3 (Vihma *et al.*, 2008). O NFAT5 possui inúmeras características específicas que o difere dos membros clássicos da família NFAT (NFAT1-4), entre elas somente o NFAT5 é ativado por estresse osmótico, enquanto os outros membros são ativados através de vias dependentes de cálcio (Lopez-Rodriguez *et al.*, 1996; Macian *et al.*, 2001). Na Figura 1 estão representados os quatro membros da família NFAT que são regulados por influxo de cálcio (NFAT1-NFAT4) e que possuem a região de homologia ao NFAT (NHR) e de homologia as proteínas Rel (RHR) completos. Os domínios das proteínas NFAT e suas principais funções estão descritos a seguir.

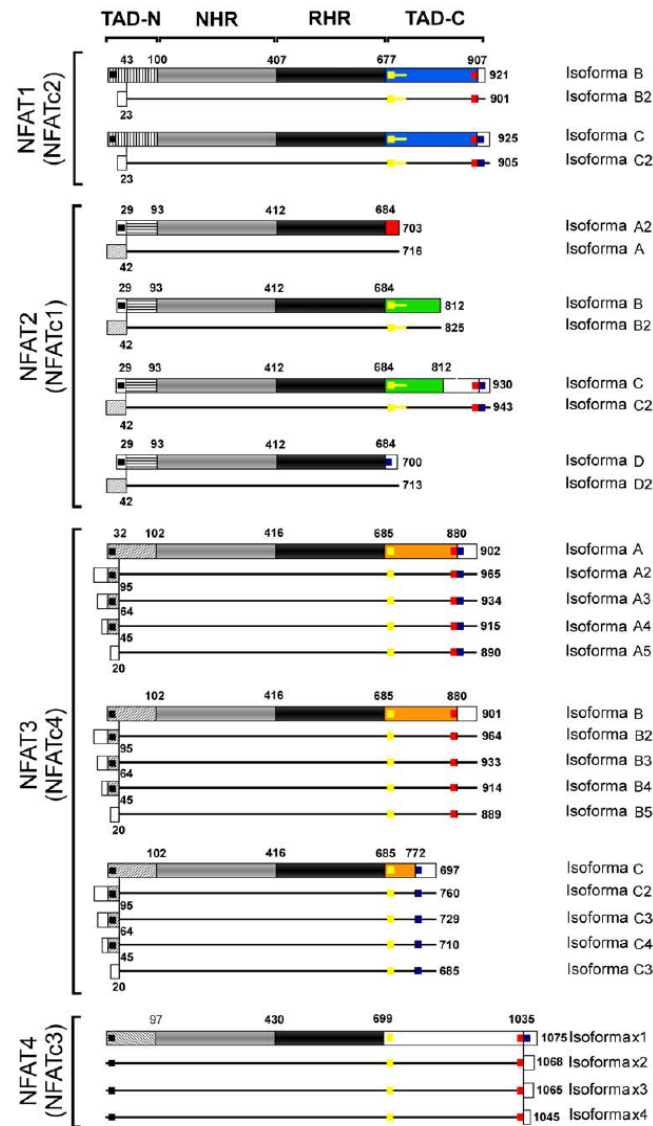


Figura 1: Representação esquemática dos membros da família NFAT de fatores de transcrição controlados por influxo de Ca^{2+} . Nomenclatura: NFAT1 (NFATp ou NFATc2), NFAT2 (NFATc ou NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx ou NFATc3). Essa família de proteínas apresenta uma região de homologia as proteínas Rel (RHR, “Rel homology region”) que possui o domínio de ligação ao DNA (DBD) do NFAT e é altamente conservada entre as proteínas NFAT. A região NHR (“NFAT homology region”) é conservada entre os membros NFAT1-4 e é responsável pela regulação da ativação das proteínas NFAT por influxo de Ca^{2+} . Os dois domínios de transativação também estão representados (TAD) que podem ser N- ou C- terminais. Para as isoformas, cores e padrões idênticos e linhas contínuas representam sequências idênticas. Os três motivos conservados dentro dos TAD estão mostrados por: caixa preta, motivo N-terminal; caixa amarela, motivo central; caixa azul-vermelha, motivo C-terminal. A divisão entre cada domínio está nomeada acima e a numeração corresponde à posição da proteína humana. O nome das isoformas estão indicados na parte direita da figura. A função de cada domínio e motivo está melhor discutido no texto. Figura adaptada de Macian, 2005 e Vihma, 2008.

A característica mais proeminente das proteínas da família NFAT é a alta conservação de sequência de aminoácido (~65% de identidade por alinhamento de sequência) localizada na porção central das proteínas denominada região homóloga a Rel (RHR; “Rel homology domain”; Figura 1) que possui aproximadamente 290 aminoácidos de tamanho. Como demonstrado na Figura 1, o RHR se localiza entre os resíduos de aminoácidos ~ 400 e ~ 700 em todos os membros da família NFAT. Apesar da baixa identidade de sequência primária entre o domínio RHR das proteínas NFAT e o das proteínas Rel (~15% de identidade por alinhamento de sequência), a região RHR da proteína NFAT possui homologia estrutural com o domínio de ligação ao DNA das proteínas Rel/NF κ B (Nolan *et al.*, 1994; Jain *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). Por isso, todas as proteínas NFAT podem ser classificadas como membros da superfamília Rel. De fato, o domínio de ligação ao DNA do NFAT, que está presente na região RHR, possui características semelhantes às das proteínas da família Rel como sítio de ligação ao DNA semelhante e a capacidade de formar dímeros tipo Rel/NF κ B (McCaffrey *et al.*, 1994; Macian *et al.*, 1999). O RHR confere a todas as proteínas NFAT a característica de se ligar a mesma sequência de DNA consenso 5'-GGAAA-3' (revisado por Rao *et al.*, 1997).

Outra região conservada entre as proteínas NFAT é denominada região de homologia do NFAT (NHR; “NFAT homology domain”; Figura 1). O domínio NHR possui aproximadamente 300 aminoácidos e está localizado a 3' em relação ao RHR (Figura 1). Apesar dessa região apresentar baixo grau de

identidade de sequência linear (~35% de identidade por alinhamento de sequência) entre os membros da família NFAT, ela possui grande conservação de diversos domínios característicos da família NFAT que são ricos em resíduos de serina e prolina (Masuda *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1996). Aparentemente a principal função do NHR é de controlar a localização subcelular das proteínas NFAT (Luo *et al.*, 1996; Shibasaki *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 1997, Beals *et al.*, 1997). As proteínas NFAT translocam do citoplasma para o núcleo em resposta a mobilização sustentada de Ca^{2+} e retornam para o citoplasma quando o sinal de Ca^{2+} termina (revisado por Rao *et al.*, 1997; Crabtree *et al.*, 1994). O domínio NHR é altamente fosforilados em múltiplos resíduos de serina conservadas em células em repouso, e sob ativação celular elas são defosforiladas pela serina/treonina fosfatase, calcineurina, o maior regulador do NFAT (Jain *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1996; Shibasaki *et al.*, 1996; Beal *et al.*, 1997; Aramburu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). O sítio de ligação da calcineurina também está codificado nessa região. O processo de ativação do NFAT está descrito a seguir (Figura 2) e foi extensamente revisado recentemente por Macian, 2005 e Hogan *et al.*, 2003). A estimulação de receptores acoplados a mobilização de Ca^{2+} , como o TCR, receptores $\text{Fc}\gamma$, $\text{Fc}\epsilon$ e IgG, e receptores acoplados à proteína G, levam a ativação da proteína fosfolipase C- γ (PCL- γ). A ativação da PCL C- γ leva a produção de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e de diacilglicerol (DAG) a partir da hidrólise do fosfolípido de membrana, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. O IP3 uma vez produzido pode se ligar ao seu receptor presente nas membranas do retículo endoplasmático e

mitocôndrias e induzir a liberação e conseqüente aumento dos níveis de Ca^{2+} , no citoplasma dessas células. O aumento do Ca^{2+} leva a abertura dos canais de Ca^{2+} ativados por liberação de cálcio (CRAC) na membrana plasmática que leva a um aumento sustentado dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . O aumento sustentado de Ca^{2+} no citoplasma leva a ativação da calcineurina, que defosforila diretamente as proteínas NFAT, levando a uma mudança conformacional e a exposição do sinal de localização nuclear (NLS), que induz a translocação do NFAT para o núcleo. Após a sua entrada no núcleo, o NFAT pode formar homodímeros (Macian *et al.*, 1999; Falvo *et al.*, 2008), interagir com a proteína ativadora 1 (AP1; Rao *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999; Macian *et al.*, 2001) ou com outros parceiros transcripcionais (revisado por Macian *et al.*, 2001) para promover a transcrição gênica (Figura 2). A ativação desses outros fatores parceiros de transcrição do NFAT pode ocorrer através de sinais que são transmitidos por diferentes vias de sinalização como a via de RAS-MAPK, PKC e outras. Uma vez terminado o estímulo que leva ao influxo de Ca^{2+} , os níveis intracelulares de Ca^{2+} voltam ao normal levando a re-fosforilação do NFAT no núcleo por diversas proteínas cinases como a caseína cinase 1, glicogênio sintase cinase 3 (GSK3), proteína cinase A (PKA) e outras. Essa re-fosforilação leva a exposição do sinal de exportação nuclear (NES) e esconde o sinal de localização nuclear (NLS) levando a exportação do NFAT do núcleo para o citoplasma terminando assim com a atividade transcripcional do NFAT (revisado por Macian, 2005). A Calcineurina é altamente sensível a inibidores como a ciclosporina A (CsA) e FK506 que, devido a importante função do NFAT na

resposta imune, funcionam como potentes imunossupressores e por isso revolucionaram os transplantes de órgãos reduzindo a rejeição de tecidos transplantados após a introdução da CsA em 1983 (Rao *et al.*, 1997).

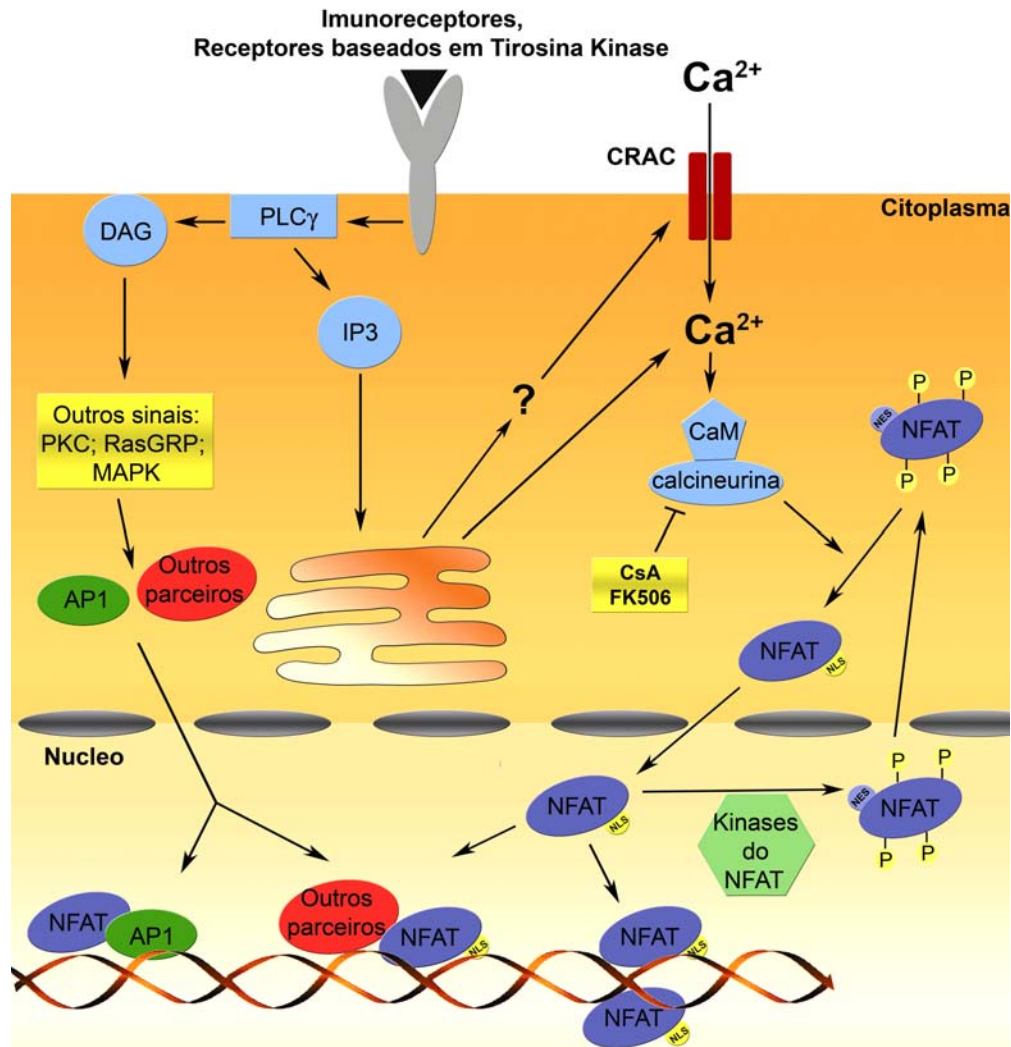


Figura 2: Via de ativação das proteínas NFAT. Desenho esquemático demonstrando a ativação e translocação da proteína NFAT do citoplasma para o núcleo, como melhor descrito no texto. CRAC, “Calcium-Release-Activated Calcium Channels”; CsA, Ciclosporina A; NLS, “Nuclear Localization Signal”; NES, “Nuclear Exportation Signal”. Adaptado de Macian, 2005.

Flanqueando esses domínios estão dois domínios descritos de ativação da transcrição (TAD; “transcription activation domains”; Figura 1). Essas duas

regiões são altamente variáveis entre os membros da família NFAT e suas isoformas, onde o TAD N-terminal (TAD-N) possui em torno de 100 resíduos de aminoácidos e o TAD C-terminal varia entre 15 a 400 resíduos dependendo da isoforma do NFAT (Figura 1; Vihma *et al.*, 2008). Apesar de muito tempo ter se passado após a descrição dos membros da família NFAT e o conhecimento da existência de diversas variantes de *splicing*, ainda pouco se sabe da importância funcional dessas diferentes proteínas.

A principal, se não a única, função descrita dos membros da família NFAT é de agir como fatores de transcrição na regulação da expressão de diversos genes. O NFAT pode regular a transcrição de dois modos: primeiro diretamente controlando a transcrição gênica uma vez que possui seu próprio domínio de ativação da transcrição (TAD; Luo *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1996; Imamura *et al.*, 1998; Chuvpilo *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; Hock *et al.*, 2003), e segundo através da interação com proteínas parceiras co-reguladoras que podem diretamente recrutar a maquinaria basal de transcrição ou induzir modificações epigenéticas de diversos promotores alvo influenciando a iniciação da transcrição (revisado por Macian *et al.*, 2001). Como descrito a seguir, os domínios TAD do NFAT possuem ambas as funções, onde podem levar à ativação da transcrição e interagir com parceiros de transcrição. Portanto, diferentes TAD do NFAT e conseqüentemente variantes de *splicing* do NFAT poderiam levar a funções não redundantes desses fatores de transcrição. As regiões TAD do NFAT podem estar completamente ausentes em algumas isoformas dessas proteínas ou reter alguns pequenos motivos conservados

entre os diferentes membros da família (Figura 1 e 3; Vihma *et al.*, 2008). Três principais pequenos motivos conservados podem ser identificados dentro dos TAD dos variantes de *splicing* do NFAT e podem ser denominados de: motivo N-terminal (caixa preta, Figura 1 e 3); motivo central (caixa amarela; Figura 1 e 3) e motivo C-terminal que pode ser dividido em dois sub-motivos nomeados 1 e 2 (sub-motivo 1, caixa vermelha; sub-motivo 2, caixa azul; Figura 1 e 3). Excluindo-se os motivos citados acima, a região TAD do NFAT possui pouca conservação de sequência entre os diferentes membros.

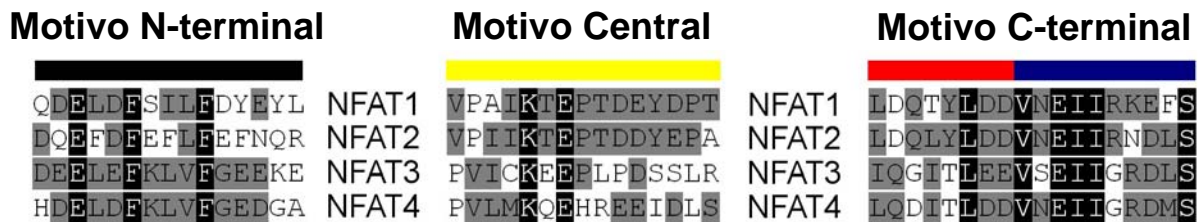


Figura 3: Motivos estruturais conservados entre as proteínas NFAT presentes dentro dos domínios TAD. Da esquerda para a direita: Motivo N-terminal (caixa preta); motivo central (caixa amarela); motivo C-terminal (caixa vermelha, sub-motivo 1; caixa azul, sub-motivo 2). A cor de cada motivo corresponde a cor das caixas representadas nas sequências dos NFAT na Figura 1. A sequência do NFAT1-C de cada motivo foi alinhada com as sequências correspondentes das isoformas de outros membros NFAT. Resíduos similares ou com conservação parcial estão coloridos de cinza e idênticos entre todos os membros estão coloridos de preto.

O motivo N-terminal é rico em resíduos ácidos e hidrofóbicos (Figura 3; caixa preta) e apesar de baixa conservação de sequência entre os membros NFAT, que varia de 27 a 60% de identidade, ele poderia de fato funcionar como um domínio ácido de ativação da transcrição (AAD) (revisado por Rao *et al.*, 1997, Hock *et al.*, 2003). AAD são formados por aminoácidos ácidos intercalados por resíduos hidrofóbicos (geralmente fenilalaninas) e estão entre

os mais potentes ativadores da transcrição (Triezenberg *et al.*, 1995). De fato, muito foi descoberto através de ensaios de um-híbrido usando o promotor contendo um sítio de ligação a GAL4 e pela fusão do domínio de ligação ao DNA (DBD) da proteína GAL4 (Gal4-DBD) com diferentes fragmentos das proteínas NFAT. Portanto, por ensaios de um-híbrido foi demonstrado que a região da proteína NFAT2-A2 incluindo os aminoácidos 1 a 30 (região contendo o motivo N-terminal; Figura 1 e 3) era suficiente e necessária para induzir um alto sinal de ativação da transcrição (Hock *et al.*, 2003). Isso também foi observado para as proteínas NFAT1-C e NFAT3-A em suas regiões incluindo os aminoácidos 1-144 e 1-217, respectivamente, demonstrando que essas regiões do NFAT1 e NFAT3 também contêm um domínio potente de ativação da transcrição (Luo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2001). Em contrapartida, os fragmentos 1-44 e 1-106 da proteína NFAT2-A que não possuem o motivo N-terminal não foram capazes de induzir a ativação da transcrição (Chuvpilo *et al.*, 1999; Hock *et al.*, 2003). Isso sugere que apesar da baixa identidade de sequência entre o motivo N-terminal do NFAT1 e NFAT2 (33%; Figura 3) ambos são capazes de levar a ativação da transcrição e a falta desse motivo é suficiente para bloquear essa propriedade do TAD-N do NFAT. Além disso, a importância do motivo N-terminal não está restrita a sua propriedade de ativação da transcrição. Recentemente foi demonstrado que a proteína caseína cinase 1 (CK1) se liga especificamente ao motivo N-terminal da proteína NFAT1-C onde os resíduos bem conservados de fenilalanina 30 e 34, presentes em todos os membros NFAT que possuem o motivo N-terminal, são fundamentais para essa ligação (Figura 3; Okamura *et*

al., 2004). Uma vez ligada ao NFAT1, CK1 é capaz de induzir a re-fosforilação do domínio NHR e a exportação nuclear do NFAT onde mutações dos resíduos de fenilalaninas para alaninas do motivo N-terminal levou a localização anormal do NFAT1 no núcleo (Okamura *et al.*, 2004).

Independente de qual membro da família NFAT que está sendo analisado, uma única proteína fosfatase, a calcineurina, reconhece e defosforila todos os resíduos de fosfo-serinas relevantes para a ativação do NFAT (revisado por Rao *et al.*, 1997). Apesar disso, há cada vez mais evidências que mesmo em uma única célula, onde todas as proteínas NFAT estão sujeitas a um mesmo parâmetro de sinalização de Ca^{2+} e calcineurina, proteínas NFAT individuais podem apresentar padrões distintos de localização subcelular (revisado por Hogan *et al.*, 2003). Esse fato poderia acontecer pela inativação do NFAT por múltiplas proteínas cinases que poderiam possuir especificidade por diferentes isoformas do NFAT. As proteínas cinase capazes de re-fosforilar o NFAT e inativá-lo e os membros da família NFAT que foram demonstrados serem capazes de interagir com elas são: p38 (NFAT1, NFAT2, NFAT3) (Gómez del Arco *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003); GSK3 (NFAT1, NFAT2, NFAT3, NFAT4) (Beals *et al.*, 1997; Graef *et al.*, 1999; Neal *et al.*, 2001; Sheridan *et al.*, 2002; Okamura *et al.*, 2004; Sanna *et al.*, 2005; van-der-Velden *et al.*, 2008); PKA (NFAT2) (Sheridan *et al.*, 2002); JNK (NFAT2, NFAT4) (Chow *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 2000; Chow *et al.*, 2000); ERK e CK2 (NFAT2) (Porter *et al.*, 2000; Chow *et al.*, 2000) e mais recentemente mTOR (NFAT3) (Yang *et al.*, 2008). Portanto, sugeriu-se que a taxa de desativação do NFAT poderia ser

influenciada por qual proteína cinase estaria sendo ativada em determinada condição celular e se a proteína NFAT disponível para a proteína cinase possui a sequência apropriada para a ligação e consequente inativação do NFAT (revisado por Hogan *et al.*, 2003). Apesar da maioria das proteínas cinases descritas como capazes de re-fosforilar o NFAT interagirem com seu domínio NHR, os diferentes variantes de *splicing* do NFAT que não possuem o motivo N-terminal, que servem de sítio de ligação para a CK1, podem ter diferentes cinéticas de inativação e, portanto, apresentar diferentes funções.

O motivo central do NFAT está localizado imediatamente após o domínio RHR e é moderadamente conservado entre os membros da família NFAT (caixa amarela; Figura 1 e 3). Apesar da baixa conservação desse motivo entre os membros NFAT2 e NFAT4 (13% de identidade por alinhamento de sequência), as proteínas NFAT1 e NFAT2 apresentam um alto grau de identidade (73% de identidade por alinhamento de sequência). Interessantemente, as proteínas NFAT1 e NFAT2 possuem um alongamento de 60 resíduos de aminoácidos dessa região (43% de identidade por alinhamento de sequência; faixa amarela após o motivo central; Figura 1) que está completamente ausente no NFAT2-A, -D, NFAT3 e NFAT4. Aparentemente, o motivo central não está envolvido na ativação da transcrição uma vez que os fragmentos do NFAT2 690-720 e 690-812 se demonstraram incapazes de induzir a transcrição em ensaios de um-híbrido (Chuvpilo *et al.*, 1999). Contudo, uma propriedade interessante desse motivo é a capacidade de ser sumoilado. Estudos recentes demonstraram que o resíduo de lisina do NFAT1 e NFAT2, que é muito bem conservado entre todos

os membros da família NFAT que possuem o motivo central, (Figura 1 e 3) pode ser sumoilado (Terui *et al.*, 2004; Nakay *et al.*, 2009). Um outro sítio de sumoilação foi mapeado para a lisina 897 e lisina 914 do NFAT1 e NFAT2, respectivamente, mas esse sítio não possui conservação entre os membros NFAT3 e NFAT4. A sumoilação ocorre principalmente dentro do motivo consenso ψ -Lis-x-Glu, onde ψ pode ser um aminoácido hidrofóbico grande (Rodriguez *et al.*, 2001). Enquanto o NFAT1, NFAT2 e NFAT4 possuem esse motivo consenso no motivo central, o NFAT3 possui um motivo Lis-x-Glu, mas ao invés de um resíduo ψ , ele possui uma cisteína (Figura 3). Aparentemente, a sumoilação do resíduo de lisina do motivo central e da região mais próxima ao C-terminal estão intimamente relacionados à localização subcelular do NFAT1 e NFAT2 e suas funções transcricionais. Para o NFAT1 foi proposto que a sumoilação da lisina do motivo central é importante para sua atividade transcricional e a sumoilação da lisina 897 está envolvida na retenção nuclear do NFAT1, onde a mutação desses sítios leva a disfunções transcricionais do NFAT (Terui *et al.*, 2004). Em estudo mais recente, foi demonstrado que a sumoilação da isoforma longa do NFAT2 (isoforma C; Figura 1) leva à acumulação nuclear do NFAT2-C em corpos nucleares de leucemias promielocítica e que isso induz a interação do NFAT com proteínas histona deacetilases induzindo a deacetilação de histonas (Nakay *et al.*, 2009). Isso leva ao fechamento da cromatina e induz uma repressão da transcrição (Nakay *et al.*, 2009). A mutação desse domínio de sumoilação ou a utilização da forma curta do NFAT2, que não possui o motivo central (NFAT2-A), abole completamente

essa propriedade do NFAT2 (Nakay *et al.*, 2009). Essa inativação da transcrição parece ser específica do gene de IL-2, enquanto a expressão de outros genes como o de IL-13 e IFN- γ não foi alterada ou até sofreram aumento pela sumoilação do NFAT2, respectivamente (Nakay *et al.*, 2009). Portanto, propõe-se que a sumoilação dos resíduos de lisina pode compor um mecanismo altamente isoforma específico do NFAT de influenciar a ativação da transcrição.

O motivo C-terminal está localizado na porção final do TAD-C das proteínas NFAT. Esse motivo tem alta identidade de sequência de aminoácidos por alinhamento (em torno de 57% de identidade por alinhamento de sequência) entre os diferentes membros da família NFAT e pode ser sub dividido em dois sub-motivos que são codificados em diferentes éxons e estão sujeitos a variações de *splicing*: sub-motivo 1 e 2 (caixa vermelha e azul, respectivamente; Figura 1 e 3). A intercessão entre o sub-motivo 1 e 2 cria um região altamente similar L-E/D-E/D-V-N/S-E-I-I entre os membros NFAT (100% de similaridade de por alinhamento de sequência; Figura 3). Esse motivo parece ser muito importante na propriedade de ativação da transcrição do TAD-C. Foi demonstrado que as regiões 727-925 do NFAT1-C, 690-930 do NFAT2-C e 771-902 do NFAT3-A possuem um forte domínio de ativação da transcrição, em ensaios de um-híbrido, e que a retirada do motivo C-terminal, pelo menos no caso do NFAT2, abole completamente essa propriedade (Luo *et al.*, 1996; Chuvpilo *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001). Além disso, a importância da interseção do sub-motivo 1 e 2 se tornou clara quando se comparou isoformas do NFAT que variam em seu último éxon como no caso do NFAT1-C que possui o sub-

motivo 2 e o NFAT1-B onde o sub-motivo 2 está ausente (caixa azul; Figura 1 e 3). Quando se comparou a capacidade de transativação por ensaios de gene repórter utilizando-se um promotor responsivo ao NFAT, a proteína NFAT1-C demonstrou ser pelo menos duas vezes mais potente na indução da transcrição do que o NFAT1-B (Luo *et al.*, 1996). Isso também foi demonstrado para as isoformas do NFAT-4 que não possuem o sub-motivo 2 no motivo C-terminal onde as isoformas x2, x3 e x4 induziram uma transativação pelo menos três vezes menor de um promotor responsivo ao NFAT quando comparada com a isoforma x1, que contém o motivo C-terminal completo (Imamura *et al.*, 1998).

Portanto, as proteínas NFAT possuem uma grande variedade de domínios TAD flanqueando seu domínio regulatório de ativação (NHR) e de ligação ao DNA (RHR) que podem variar amplamente por *splicing* alternativo. Como essas regiões possuem capacidade de regular a transcrição gênica, as diferentes variantes de *splicing* do NFAT que não possuem ou possuem parcialmente determinado motivo conservado podem de fato ter funções diferentes. Contudo ainda faltam evidências diretas que demonstrem um papel das diferentes isoformas do NFAT na fisiologia celular. A falta do domínio TAD-N ou TAD-C do NFAT não leva à geração de proteínas dominante-negativas incompetentes para a transcrição. Foi demonstrado que a região NHR do NFAT também possui um domínio potente de ativação da transcrição. A região 113-205 que se encontra dentro do domínio NHR do NFAT2 e que pode estar presente em outras proteínas da família NFAT é capaz de induzir a ativação da transcrição em ensaios de um-híbrido (Avots *et al.*, 1999; Chuvpilo *et al.*, 1999).

Em contrapartida, em ensaios de um-híbrido, o domínio RHR do NFAT1 e do NFAT2 se mostrou incompetente na indução da transcrição sugerindo que esse domínio não possui um domínio de ativação da transcrição (Luo *et al.*, 1996; Avots *et al.*, 1999). O RHR do NFAT1 é suficiente para induzir a transativação da região distal responsiva ao NFAT do promotor de IL-2 em ensaios de gene repórter (Luo *et al.*, 1996). Contudo, a mutação dos nucleotídeos adjacentes do sítio de ligação do NFAT, no promotor de IL-2, que não impedem a ligação do NFAT ao DNA abole completamente a transativação induzida pelo RHR do NFAT1 (Luo *et al.*, 1996). Portanto, foi sugerido que como o RHR não possui domínios de ativação da transcrição, essas mutações adjacentes no sítio de ligação do NFAT poderiam impedir a ligação de proteínas parceiras do NFAT, sugerindo a importância do recrutamento de proteínas parceiras no auxílio da iniciação da transcrição por essa região do NFAT (Luo *et al.*, 1996).

1.1.1 O NFAT1 e o NFAT2

As principais proteínas NFAT expressas em células T periféricas e que são responsáveis pela ativação e diferenciação dessas células são o NFAT1 e o NFAT2 (revisado por Rao *et al.*, 1997). O NFAT1 foi a primeira proteína identificada da família NFAT a partir de bibliotecas de cDNA do clone Ar-5 de células T murinas como uma proteína capaz de se ligar e induzir um desvio do sítio distal do NFAT do promotor de IL-2, em ensaios de EMSA (McCaffrey *et al.*,

1993). Três variantes de *splicing* para o NFAT1 foram inicialmente clonadas em camundongos e foram nomeadas isoformas A, B e C e duas dessas foram posteriormente também descritas em células humanas (isoforma B e C; Figura 1; Northrop *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1996). Apesar da proteína murina NFAT1-A ter sido a primeira proteína NFAT clonada é improvável que exista em células normais. A porção 3'-terminal dessa isoforma a partir do nucleotídeo 2799pb de seu mRNA está a ~100 giga-bases de distância do resto do gene, o que sugere a presença de uma translocação no gene do NFAT1 nas células Ar-5. Além disso, a proteína NFAT1-A não foi detectada em nenhuma célula utilizando-se um anticorpo específico contra o C-terminal específico desta isoforma (Wang *et al.*, 1995). A isoforma NFAT1-B e -C diferem em seu C-terminal a partir do aminoácido 909 em camundongo e 907 em humanos, dentro do motivo C-terminal (Figura 1 e 3). Outros variantes de *splicing* foram recentemente descritos que variam exclusivamente na porção N-terminal da proteína (Figura 1; Vihma *et al.*, 2008). Não há relatos sobre regulação ao nível transcripcional da expressão do NFAT1 e de suas isoformas, onde aparentemente o NFAT1 apresenta expressão constitutiva nas células onde é expresso. O NFAT1 é expresso como um mRNA de ~8 kb em diversos tecidos com uma grande distribuição de isoformas (Masuda *et al.*, 1995; Hoey *et al.*, 1995; Vihma *et al.*, 2008). Contudo, ao nível protéico há apenas informações limitadas sobre a distribuição de isoformas do NFAT1 em diferentes tecidos devido à falta de estudos utilizando anticorpos específicos para cada isoforma do NFAT1 e porque os variantes de *splicing* do NFAT1 apresentam peso molecular aparente

(120 kDa) similar por análise de Western blot dificultando a distinção entre elas. A proteína NFAT1 é encontrada em células de músculo esquelético (Abbott *et al.*, 1998) e musculatura lisa vascular (Boss *et al.*, 1998), células cartilaginosas (Ranger *et al.*, 2000), adipócitos (Ho *et al.*, 1998), sistema nervoso central (Ho *et al.*, 1994), e em diversas células do sistema imune (Wang *et al.*, 1995).

Já a proteína NFAT2 foi primeiramente purificada de timócitos bovino, sequenciada e utilizada para isolar o cDNA que a codifica a partir de bibliotecas de cDNA de células T Jurkat humanas (Northrop *et al.*, 1994). O NFAT2 humano possui quatro diferentes isoformas nomeadas A, B, C e D (Figura 1; Northrop *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996; Chuvpilo *et al.*, 1999; Vihma *et al.*, 2008), onde apenas o NFAT2-A, -B e -C foram encontrados em camundongos (Pan *et al.*, 1997; Strausberg *et al.*, 2002; Vihma *et al.*, 2008). Interessantemente, o NFAT2 é o único gene da família NFAT que pode ser regulado ao nível transcripcional através de uma alça autoregulatória. Essa característica é isoforma-específica onde apenas o NFAT2-A está sob o controle de um promotor dependente de NFAT chamado P1 (Figura 1; Chuvpilo *et al.*, 2002). O NFAT pode se ligar e ativar o promotor distal forte P1 e induzir a iniciação da transcrição a partir do éxon 1 e o *splicing* alternativo para o éxon 3 (Zhou *et al.*, 2002) e, junto com a atividade de um sítio poli-A fraco a 3' do éxon 9 (Chuvpilo *et al.*, 1999), levar à síntese massiva do NFAT2-A (Chuvpilo *et al.*, 2002). Enquanto o éxon 2 do gene do NFAT2 codifica o motivo N-terminal, a inclusão do éxon 1 pela ativação do promotor P1 leva à produção de proteínas que não possuem esse motivo. Apesar da ativação do P1 levar à expressão do NFAT2-A, em células não

ativadas, outras isoformas do NFAT2 podem incluir o éxon 1 em taxa limitada e ultrapassando o sítio precoce de poli-A, gerar as formas longas (isoformas B e C; Figura 1; Chuvpilo *et al.*, 2002). Já o promotor P2, no gene do NFAT2, controla a expressão constitutiva do NFAT2 e inicia a transcrição a partir do éxon 2 e não pode ser induzido por uma alça autoregulatória (Chuvpilo *et al.*, 2002). O NFAT2 é expresso em tecidos humanos como dois mRNAs de 4.6 kb e 2,7-kb (Masuda *et al.*, 1995; Hoey *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1996). O mRNA do NFAT2 pode ser detectado em osteoclastos (Day *et al.*, 2005), baço, timo, leucócitos periféricos do sangue, coração, músculo, fígado, testículo, ovário, intestino e cérebro (Park *et al.*, 1996; Vihma *et al.*, 2008). A nível protéico, anticorpos contra o NFAT2 reconhecem três diferentes bandas de 86-kDa, 110-kDa e 140-kDa que se acredita corresponderem as isoformas A, B e C do NFAT2, respectivamente (Lyakh *et al.*, 1997; Chuvpilo *et al.*, 2002). Contudo, devido à falta de anticorpos específicos para cada isoforma do NFAT2 ainda é difícil determinar quais isoformas das proteínas estão sendo expressas em determinado tecido. A proteína NFAT2 já foi encontrada no endocárdio, válvulas cardíacas e septo (de la Pompa *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998), células da musculatura lisa vascular (Boss *et al.*, 1998; Karpurapu *et al.*, 2008), células pancreáticas (Buchholz *et al.*, 2006), células tronco da pele (Horsley *et al.*, 2008), osteoclasto (Matsumoto *et al.*, 2004) e diversas células do sistema imune (Timmerman *et al.*, 1997).

1.2 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR E APOPTOSE

1.2.1 Ciclo celular

A homeostase tecidual é dependente de um balanço perfeito entre a proliferação e a morte celular. O balanço entre sinais positivos e negativos determina a decisão entre se a célula irá viver e proliferar ou morrer. Um desbalanço nesses processos pode resultar em diversas doenças. O principal objetivo da divisão celular é de replicar o DNA sem erros e segregar o DNA cromossomal duplicado igualmente para duas células filhas, expandindo assim o número de células existentes. O processo de divisão celular pode ser separado em duas principais fases: a intérfase e a mitose. Durante a interfase ocorre a replicação do DNA, já durante a mitose ocorre o processo de condensação da cromatina e de divisão celular. A interfase pode ser separada em três diferentes fases onde a replicação do DNA ocorre na fase S (síntese) que é precedida por uma fase de pausa chamada G_1 (“gap” 1), durante a qual a célula está se preparando para replicar o DNA, e é sucedida por outra pausa denominada G_2 (“gap” 2), durante a qual a célula está se preparando para a mitose (Figura 4). Células na fase G_1 do ciclo celular, antes de se comprometerem para a replicação do DNA, podem entrar em um estado de repouso chamado de G_0 . Além disso, a fase G_1 é um intervalo no qual a célula responde aos sinais extracelulares que irão induzir e determinar se as células irão replicar seu DNA e dividir ou, alternativamente, sair do ciclo celular e entrar em repouso (G_0). A

Diferentes classes de ciclinas são expressas em cada fase do ciclo celular e cada uma delas se liga a CDK específicas levando ao controle fino do ciclo celular. A entrada no ciclo celular é dependente de estímulos mitogênicos extracelulares, que fazem a célula transitar do estágio de quiescência G_0 para a fase G_1 . Recentemente, foi sugerido que a ciclina C é expressa na transição G_0/G_1 e se liga à CDK3 que leva a entrada na fase G_1 (Ren *et al.*, 2004). Durante a progressão do ciclo celular, outros complexos ciclinas/CDK são formados onde: o complexo ciclina D/CDK4 ou CDK6 é importante para a progressão durante a fase G_1 ; ciclina E/CDK2 promove a entrada da fase S; ciclina A/CDK2 promove a progressão da fase S; ciclina A/CDK1 promove a entrada na mitose, e o complexo ciclina B/CDK1 promove a progressão da mitose (Figura 4; Smits *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2004; Vermeulen *et al.*, 2003a). Os complexos ciclina/CDK fosforilam progressivamente a proteína Rb (Retinoblastoma) levando a liberação do fator de transcrição E2F (“E2 Promoter Binding Factor”) que induz a transcrição de genes envolvidos na entrada e progressão do ciclo celular como o c-myc, DNA polimerase e proteínas envolvidas com a formação do fuso mitótico, entre outras (Matsumura *et al.*, 2003). Enquanto a regulação das ciclinas está restrita ao nível transcripcional e por degradação via proteassomo, as proteínas CDK podem ser reguladas negativamente por fosforilação e pelas proteínas inibidoras de CDK (CKI). As principais CKI são $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ e $p57^{Kip2}$ que possuem a propriedade de inibir principalmente a função dos complexos ciclina E/CDK2 e ciclina A/CDK2 e portanto a entrada e

progressão da fase S do ciclo celular (Figura 4; Zerfass-Thome *et al.*, 1997; Sherr *et al.*, 2000).

1.2.2 Apoptose

Em oposição ao processo de proliferação celular se encontra o processo de morte celular programada por apoptose na manutenção do equilíbrio celular. A apoptose é importante tanto durante o desenvolvimento embrionário e manutenção dos tecidos adultos quanto no desenvolvimento de doenças, onde a sua falha pode levar ao câncer ou a má formação tecidual. Os principais efetores da morte celular por apoptose são as proteínas cisteína-proteases denominadas caspases. As caspases são sintetizadas como zimogênios e sinais que levam a morte celular por apoptose induzem a conversão desses precursores para proteases ativas (revisado por Assunção Guimarães *et al.*, 2004). As caspases podem se dividir em dois grupos: as caspases iniciadoras (caspase-1; -2; -4; -5; -8; -9; -10 e -14) que são ativadas por auto-proteólise por oligomerização e as caspases efetoras (caspase-3; -6 e -7) que são ativadas por outras proteases, como pelas caspases iniciadoras e pela granzima B (revisado por Assunção Guimarães *et al.*, 2004). Uma vez ativadas, as caspases efetoras levam ao processo de morte celular programada pela clivagem de mais de 280 diferentes alvos de sua ação proteolítica que promovem a morte celular de forma ordenada (Fischer *et al.*, 2003). Um importante alvo das caspases efetoras é a proteína

inibidora da DNase ativada por caspase (ICAD), que sua clivagem permite a entrada da DNase ativada por caspase (CAD) no núcleo, que causa a fragmentação oligonucleossomal do DNA e consequente morte da célula (Liu *et al.*, 1997; Sakahira *et al.*, 1998). Contudo, as caspases não são os únicos efetores da apoptose, onde, outros fatores liberados da mitocôndria, após sua permeabilização, como o fator de indução da apoptose (AIF) e a Endonuclease G (EndoG) podem também levar a fragmentação do DNA (Figura 5; Susin *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; van Loo *et al.*, 2001).

A apoptose pode ser iniciada por diferentes estímulos, como por exemplo, privação de fatores de crescimento, sinalização proveniente do meio exterior ou alguma outra forma de dano/estresse celular. Existem duas vias apoptóticas principais denominadas via intrínseca e via extrínseca. No primeiro caso, estímulos provenientes do interior das células como lesões no DNA celular, desestruturação do citoesqueleto, alterações no retículo endoplasmático são capazes de induzir a apoptose pela via intrínseca de apoptose através da indução da liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol (Amarante-Mendes & Green, 1999). Pela importância da mitocôndria nesse processo de apoptose essa via também pode ser chamada de via mitocôndrial. O citocromo c liberado é capaz de interagir com as proteínas Apaf-1 e caspase-9, formando um complexo heptamérico conhecido como apoptossomo (Figura 5).

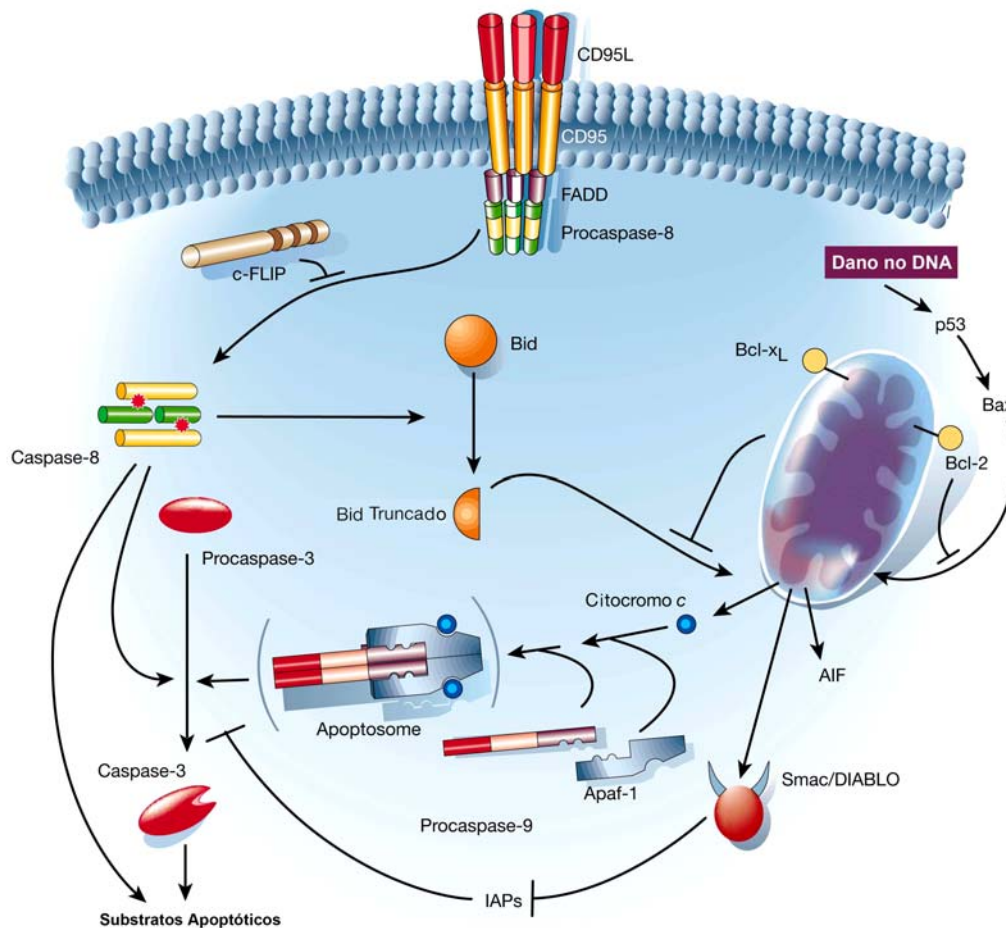


Figura 5: Via intrínseca e via extrínseca de morte celular por apoptose. Modelo esquemático das duas principais vias de morte celular por apoptose. A via extrínseca está representada como iniciada pela ligação do ligante de Fas (Fas-L; CD95L) com o seu receptor Fas (CD95). Essa via pode também ser ativada pela ligação do TNF- α ou TRAIL a seus receptores, como descrito no texto. A ativação dos receptores de morte leva à ativação da caspase-8 que levará à ativação das caspases efetoras ou da via mitocondrial. A via intrínseca está representada como iniciada através da geração de danos no DNA e subsequente ativação da via mitocondrial que culminará na ativação das caspases efetoras e morte da célula. Adaptado de Hengartner, 2000.

Uma vez formado esse complexo, a caspase-9 se torna ativa e capaz de ativar proteoliticamente as caspases efetoras -3, -6 e -7, que levarão a mudanças morfológicas e bioquímicas da célula resultando na morte por apoptose (Bratton *et al.*, 2001). Por outro lado, a ligação das proteínas da família

do fator de necrose tumoral (FasL, TNF- α e TRAIL) a seus receptores, denominados receptores de morte (“Death Receptors”; Fas, TNFR1 e DR4/DR5, respectivamente), no espaço extracelular induz a via extrínseca de apoptose (Figura 5; Contassot *et al.*, 2007). A ativação da via extrínseca pelos receptores de morte leva à ativação por auto-proteólise da caspase-8 iniciadora que pode ativar diretamente as caspases efetoras (principalmente a caspase-3) ou levar à ativação da proteína Bid que induzirá a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, integrando dessa maneira as duas vias de sinalização apoptótica (Figura 5; revisado por Hengartner *et al.*, 2000 Nature). Bid é um dos membros da família de proteínas Bcl-2. Essa família de proteínas é responsável pela regulação da apoptose pela via mitocôndrial através do controle da permeabilização da membrana externa da mitocôndria e liberação do citocromo c e de outras proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma.

A família de proteínas Bcl-2 pode ser subdividida em três grupos de acordo com a presença de quatro domínios conservados de homologia Bcl-2 (BH1; BH2; BH3 e BH4; revisado em Gross *et al.*, 1999). O grupo 1 da família Bcl-2 é composta por membros anti-apoptóticos que apresentam os quatro domínios BH (BH1-BH4) e tem como membros as proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl2A1 e Bcl-B. O grupo 2 e 3 são compostos por membros pró-apoptóticos, onde as proteínas do grupo 2 tem três domínios BH (BH1-BH3), como Bax, Bak e Bok, e as proteínas do grupo 3 tem apenas um domínio BH (BH3), como Bim, Bad, Bik, Bid, Noxa, Puma, Bmf e Hrk (revisado por Hengartner, 2000; Kim, 2005). Aparentemente, as proteínas do grupo 2, como

Bax e Bak, formam hetero- ou homo-oligômeros que são responsáveis pela mediação da permeabilização da membrana mitocondrial e subsequente liberação de citocromo c para o citoplasma e ativação da caspase 9 e caspase 3 (Figura 5; revisado por Kim, 2005). Em contrapartida, as proteínas anti-apoptóticas do grupo 1 da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL, são responsáveis por manter a célula viva através da inibição da permeabilização da membrana por Bax e Bak (revisado por Kim, 2005). Após estímulo apoptótico, as proteínas do grupo 3, que possuem apenas o domínio BH3 (“BH3-*only*”), inserem esse domínio BH, uma α -hélice anfipática, em uma cavidade hidrofóbica formada pelos domínios BH1, BH2 e BH3 das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Hinds & Day, 2005). Esse acoplamento permite a ativação de Bax e/ou Bak (Cheng *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001), que então formam oligômeros na membranas externa mitocondrial, perturbando a sua integridade e levando ao efluxo de citocromo c e subsequente apoptose da célula. Portanto, a ativação das proteínas do grupo 3 (“BH3-*only*”) leva ao processo de morte celular por apoptose pela via mitocondrial. A via extrínseca de apoptose ativa principalmente a proteína do grupo 3, Bid, por uma proteólise ativadora realizada pela caspase 8. Já a via intrínseca pode induzir a apoptose pela ativação de diversas outras proteínas do grupo 3, como a indução da expressão de Noxa e Puma pela ativação de p53 em resposta a danos no DNA (Oda *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001) e Bim pela ativação de FOXO3A em resposta à privação de fatores de crescimento (Dijkers *et al.*, 2000). Apesar da importância das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 na regulação

negativa da apoptose, através do impedimento da permeabilização da mitocôndria, outras proteínas são capazes de inibir diretamente a atividade das caspases e, portanto, a apoptose. A família de proteínas inibidoras da apoptose (IAP) é composta por diversas proteínas (XIAP; cIAP1; cIAP2; ILP2; NAIP; Bruce; Survivina) que são capazes de inibir a atividade das proteínas caspases-3 e -9 efetoras de duas maneiras: através da indução da degradação dessas caspases pelo sistema ubiquitina-proteassoma; ou inibindo diretamente a sua atividade enzimática, dependendo da IAP analisada (Salvesen & Duckett, 2002; Riedl & Shi, 2004; Vaux & Silke, 2005). Outra via de inibição da apoptose pode ocorrer mais acima da cascata de sinalização, onde a proteína c-FLIP pode inibir a atividade da caspase-8 impedindo a morte celular pela via extrínseca (Scaffidi *et al.*, 1999).

1.2.3 As proteínas NFAT na regulação de genes do ciclo celular e da apoptose

As proteínas que pertencem à família NFAT de fatores de transcrição desempenham um papel central na transcrição de genes indutíveis durante a resposta imune (revisado por Rao *et al.*, 1997). Sítios de ligação para o NFAT estão presentes nas regiões promotoras/*enhancer* de diversos genes envolvidos na resposta imune como das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ e GM-CSF (revisado por Rao *et al.*, 1997; Kiani *et al.*, 2000; Macian, 2005). Contudo, em

1996 surgiram evidências de que o NFAT poderia não somente atuar na regulação da resposta imune, mas ter um papel relevante no controle da entrada do ciclo celular. Foi demonstrado que a transição da fase G₁/S do ciclo celular poderia ser mediada pela sinalização de Ca²⁺ (Tomoro *et al.*, 1996). Posteriormente, surgiram evidências que a proteína calcineurina, principal reguladora da ativação do NFAT, poderia possuir um papel fundamental no controle do ciclo celular uma vez que seus inibidores (CsA e FK506) foram capazes de inibir a expressão de ciclina A e E, *in vitro* (Tomoro *et al.*, 1998). Corroborando esses dados, a partir do desenvolvimento de camundongos deficientes para os membros da família NFAT tornou-se claro que as proteínas NFAT não tem seu papel restrito na regulação da resposta imune como se acreditava anteriormente. O fenótipo dos camundongos deficientes para os membros da família NFAT está resumido na tabela 1 e descrito abaixo.

Proteínas NFAT	Fenótipo dos animais deficientes para o NFAT	Referências
NFAT1	Hiperproliferação de linfócitos acompanhada de esplenomegalia. Aumento moderado da resposta de células T e B com uma superprodução de IL-4 e outras citocinas Th2, e diminuição de expressão de IFN-g. Hipereosinofilia e alergia.	Xanthoudakis <i>et al.</i> , 1996; Hodge <i>et al.</i> , 1996; Schuh <i>et al.</i> , 1998
NFAT2	Fenótipo letal (defeito no desenvolvimento de válvulas cardíacas). No sistema de complementação de blastocisto de animais RAG ^{-/-} , células T e B apresentam uma redução de proliferação e uma moderada redução da resposta Th2 com uma diminuição da produção de IL-4.	Yoshida <i>et al.</i> , 1998; Ranger <i>et al.</i> , 1998
NFAT3	Nenhuma alteração aparente.	Graef <i>et al.</i> , 2001
NFAT4	Moderado comprometimento no desenvolvimento de células CD4 e CD8 devido a um aumento da apoptose de timócitos duplo positivos. Moderada hiperativação de células T periféricas.	Oukka <i>et al.</i> , 1998

Tabela 1: Fenótipo dos camundongos deficientes para os membros da família NFAT. Breve descrição do fenótipo apresentado pela ablação dos genes do NFAT1, NFAT2, NFAT3 e NFAT4 em camundongos.

Camundongos deficientes para a proteína NFAT1 desenvolvem, com três meses de idade, uma síndrome de hiperproliferação linfocitária que se reflete em um moderado aumento dos órgãos linfóides acompanhado por uma redução da morte celular (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Hodge *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1998). Além disso, esses camundongos apresentam um retardo significativo na involução do timo e um defeito na deleção de células T CD4⁺ ativadas, *in vivo*, o que sugere um defeito na terminação da resposta imune pelo processo de morte celular induzida por ativação (AICD) (Schuh *et al.*, 1998). A retirada do NFAT1 também induz um aumento de resposta imune do tipo Th2, onde após estímulo secundário com ovalbumina ocorre uma superexpressão de citocinas do tipo Th2, principalmente de IL-4, e um aumento no número de eosinófilos (Xanthoudakis *et al.*, 1996). Esse fenótipo sugere que o NFAT1 pode funcionar como um regulador negativo da expressão gênica e da proliferação celular e como controlador do processo de morte celular. Em contrapartida, camundongos deficientes para o NFAT2 (NFAT2^{-/-}) morrem dentro do útero devido a um defeito no desenvolvimento das válvulas cardíacas e do septo (de la Pompa *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998). Contudo, no sistema quimérico utilizando blastócitos deficientes para Rag complementados com células embrionárias NFAT2^{-/-}, as células B e T desses camundongos apresentaram uma redução da proliferação quando comparadas com células do camundongo selvagem e apresentam uma redução da expressão de IL-4 em linfócitos T (Ranger *et al.*, 1998; Yoshida, *et al.*, 1998). Esses dados sugerem que a proteína NFAT2 apresenta funções exclusivas em relação aos outros membros da família NFAT, uma vez que é o

único que induz um fenótipo letal, e que poderia funcionar como um regulador positivo da expressão gênica e da proliferação celular. Como esperado, os camundongos deficientes para o NFAT3 e NFAT4 não apresentaram um fenótipo claro na regulação da proliferação celular de células T e B periféricas, uma vez que não são expressos (NFAT3) ou estão presentes em níveis muito inferiores em relação ao NFAT1 e NFAT2 nessas células (NFAT4; Graef *et al.*, 2001; Oukka *et al.*, 1998). Contudo, camundongos NFAT4^{-/-} apresentam um aumento da morte celular em timócitos duplo positivos (CD4⁺ CD8⁺) que é acompanhado de uma redução na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Oukka *et al.*, 1998), sugerindo que outros membros da família NFAT também possuem funções de regulação da morte celular.

Os fenótipos dos camundongos deficientes para o NFAT sugerem que esses fatores de transcrição podem ter papéis relevantes e aparentemente não redundantes no processo de proliferação e morte celular de linfócitos. Corroborando esses dados, estudos recentes demonstraram que o NFAT está diretamente envolvido na regulação de diversos genes importantes na regulação do ciclo e morte celular, como p21^{Cip1}, CDK4 e ciclina A2 que regulam diretamente a progressão do ciclo celular e TNF- α , Fas-L e c-FLIP que estão envolvidos no processo de morte celular por apoptose (Tabela 2). Foi demonstrado que o fenótipo de hiperproliferação linfocitária de camundongos NFAT1^{-/-} está correlacionado com um encurtamento do tempo de divisão celular e com a superexpressão de diversas ciclinas como A2, B1, E e F (Caetano *et al.*, 2002). Em contrapartida, a superexpressão de uma forma constitutiva do NFAT2

em uma linhagem celular de pré-adipócitos (3T3-L1) é capaz de induzir um encurtamento do ciclo celular que está correlacionado com o aumento da expressão da ciclinas D e de c-myc (Neal & Clipstone, 2003). Além disso, foi sugerido que o NFAT1-C, mas não o NFAT2-A (isoforma curta do NFAT-2) é capaz de aumentar a morte celular induzida por ativação (AICD) quando superexpressos em linfócitos T de camundongos (Chuvpilo *et al.*, 2002). Esses dados sugerem que a família de fatores de transcrição NFAT são importantes reguladores do processo de ciclo e morte celular e que os membros dessa família podem exercer funções diferenciadas nesse processo.

Função	Gene	Regulação	Referência
Ciclo Celular	p21	Ativação	Santini <i>et al.</i> , 2001
	CDK4	Repressão	Baksh <i>et al.</i> , 2002
	c-myc	Ativação	Buchholz <i>et al.</i> , 2006
	Ciclina A2	Repressão ou Ativação	Carvalho <i>et al.</i> , 2007; Karpurapu <i>et al.</i> , 2008
Apoptose	Fas-L	Ativação	Holtz-Heppelmann <i>et al.</i> , 1998; Latinis <i>et al.</i> , 1997
	Nur77	Ativação	Youn <i>et al.</i> , 2000
	c-FLIP	Ativação	Ueffing <i>et al.</i> , 2008; Zaichuk <i>et al.</i> , 2004
	TNF- α	Ativação	McCaffrey <i>et al.</i> , 1994; Park <i>et al.</i> , 1996; Oum <i>et al.</i> , 2002

Tabela 2: Genes envolvidos no controle do ciclo e morte celular regulados ao nível transcricional pelo NFAT. Os genes estão divididos de acordo com a sua função no controle do ciclo celular e apoptose. A coluna regulação descreve a função descrita do NFAT na regulação de determinado gene, que pode ser regulado positivamente (ativação) ou negativamente (repressão) pela ligação do NFAT a seu promotor.

1.3 O NFAT NA TUMORIGÊNESE

Tumores se desenvolvem como consequência de alterações no controle da proliferação celular resultando no acúmulo de células. A perda da regulação do processo de divisão celular associado com a supressão da apoptose constituem a plataforma mínima na qual todas as evoluções neoplásicas ocorrem (Evan & Vousden, 2001). Duas classes de genes podem estar envolvidas com a transformação neoplásica: oncogenes e genes supressores de tumor (Blume-Jensen & Hunter, 2001; Sherr, 2004). Onde oncogenes estão envolvidos no controle positivo da formação de tumor, levando ao seu desenvolvimento e crescimento; os genes supressores de tumor tem como função manter a homeostase celular sendo sua perda um dos fatores que podem levar ou facilitar o desenvolvimento tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000). Estudos anteriores indicam que a família do fator de transcrição NFAT pode estar envolvida tanto na regulação do ciclo celular quanto no processo de morte celular programada (revisado por Viola *et al.*, 2005). Essas características sugerem que a família NFAT pode estar envolvida no controle da homeostase celular e, portanto no processo de tumorigênese.

A desregulação da sinalização de NFAT/calcineurina e/ou a expressão anormal de seus componentes tem sido descrita em tumores sólidos de origem epitelial, linfomas e leucemias linfóides. A proteína NFAT2 foi encontrada no núcleo de cerca de 70% dos casos de linfomas de Burkitt, 30% dos linfomas de células B grandes difusas (DLBCL) e em 70% dos casos de carcinoma

pancreático (Marafioti *et al.*, 2005; Buchholz *et al.*, 2006). A ativação do NFAT em linhagens celulares derivadas de DLBCL e leucemia linfoblástica aguda de células T é fundamental para a progressão do ciclo celular e sobrevivência dessas células, indicando que o NFAT está envolvido na transformação dessas células (Pham *et al.*, 2005; Medyouf *et al.*, 2007). Além disso, a transdução de um mutante constitutivamente ativo da calcineurina em células leucêmicas foi capaz de aumentar a agressividade dessas células e de aumentar a progressão da leucemia *in vivo* (Medyouf *et al.*, 2007). Esses dados colocam inesperadamente a família de fatores de transcrição NFAT como importantes reguladores do processo de transformação celular.

Além disso, as proteínas NFAT tem sido implicadas em vias importantes para o desenvolvimento tumoral, como no processo de angiogênese, migração e invasão celular (Hanahan & Weiberg, 2000). O NFAT foi identificado como sendo capaz de regular a expressão de COX-2 (Ciclooxigenase-2) e com isso induzir o aumento do crescimento de células endoteliais vasculares, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hernandez *et al.*, 2001). A expressão de COX-2 induzida pelo NFAT também influenciou positivamente a capacidade de invasão de linhagens celulares de câncer de mama, *in vitro* (Yiu & Toker, 2006). A importância do NFAT na mobilidade e potencial metastático de células de câncer de mama também foi relatado em outros estudos, onde o bloqueio da atividade do NFAT por CsA impediu essas características (Jauliac *et al.*, 2002; Yoeli-Lerner *et al.*, 2005). Em conjunto, esses dados sugerem que as proteínas NFAT estão diretamente envolvidas no processo de transformação celular e tumorigênese.

Com o passar dos anos, a família de fatores de transcrição NFAT está ficando cada vez maior através da descoberta de diversas isoformas de um mesmo membro NFAT, podendo ser formadas por variantes de *splicing* ou por inícios de transcrição alternativos (Figura 1). Aparentemente, essas diferentes isoformas apresentam como principais diferenças estruturais os seus domínios de transativação (TAD-N ou TAD-C terminal; Figura 1) que flanqueiam a proteína NFAT. Apesar da primeira proteína NFAT ter sido descrita em 1993 ainda pouco se sabe sobre os papéis individuais de cada membro dessa família (NFAT1-4) e menos ainda sobre o significado das diferentes isoformas desses membros. Além disso, a família NFAT tem progressivamente demonstrado um grande envolvimento no controle da progressão do ciclo, morte e transformação celular. Devido a grande heterogenicidade de isoformas dos membros da família NFAT e pela já demonstrada importante função na regulação gênica dos diversos domínios e motivos diferencialmente presentes em cada uma dessas isoformas, é de extremo interesse entender qual a função de determinado membro e isoforma da proteína NFAT no controle da homeostase celular. Devido à grande diferença entre os fenótipos de proliferação dos linfócitos dos camundongos deficientes para o NFAT1 e NFAT2, escolheu-se esses membros para aprofundar o estudo do envolvimento da família de fatores de transcrição NFAT na regulação do ciclo, morte e transformação celular.

2. OBJETIVOS:

2.1 Objetivo geral:

Caracterizar o envolvimento dos membros da família de fatores de transcrição NFAT, NFAT1 e NFAT2, no controle do ciclo, morte e transformação celular.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar o fenótipo induzido pela expressão da proteína CA-NFAT1-C e CA-NFAT2-A na regulação do ciclo e morte celular.
- Caracterizar o envolvimento dos variantes de *splicing* do NFAT2, NFAT2-A e NFAT2-A2, na proliferação e morte celular.
- Identificar um possível papel supressor de tumor da proteína CA-NFAT1-C.
- Analisar a importância do domínio TAD C-terminal da proteína CA-NFAT1-C no processo de supressão tumoral.
- Verificar a capacidade do CA-NFAT1-C de inibir a transformação celular induzida pelo CA-NFAT2-A.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais.

Camundongos atímicos BALB/c nude/nude entre 8 e 12 semanas de idade foram utilizados para todos os ensaios *in vivo* e foram mantidos no biotério da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos conforme as normas estabelecidas pelo “Guide for the care and use of laboratory animals” (Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório; National Institute of Health).

3.2 Cultura de células.

Todas as culturas de células foram mantidas em meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (exceto quando indicado), NaHCO_3 (40 mM), NaH_2PO_4 (1,0 mM), Piruvato de Sódio (1,0 mM), solução de vitaminas MEM 1x, solução de aminoácidos MEM essenciais e não-essenciais 1 x, L-glutamina (2,0 mM), β -mercaptoetanol (55 μM), HEPES (10 mM), estreptomicina (100 mg/L) e penicilina (100.000 U) (todos Invitrogen). Todas as culturas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 .

3.3 Construção dos plasmídeos retrovirais.

O vetor retroviral pLEGFP-N1 derivado do vírus de leucemia murina de Moloney (MoMuLV) foi adquirido da BD-Biosciences (San Jose, CA). Através da clonagem pelo uso de enzimas de restrição Not1 e BamH1 e ligação do cassete IRES-EGFP do vetor pIRES-EGFP (BD-Biosciences, San Jose, CA) no vetor pLEGFP-N1 (aberto com Not1 e BamH1) foi construído o vetor retroviral pLIREs-EGFP (Figura 6).

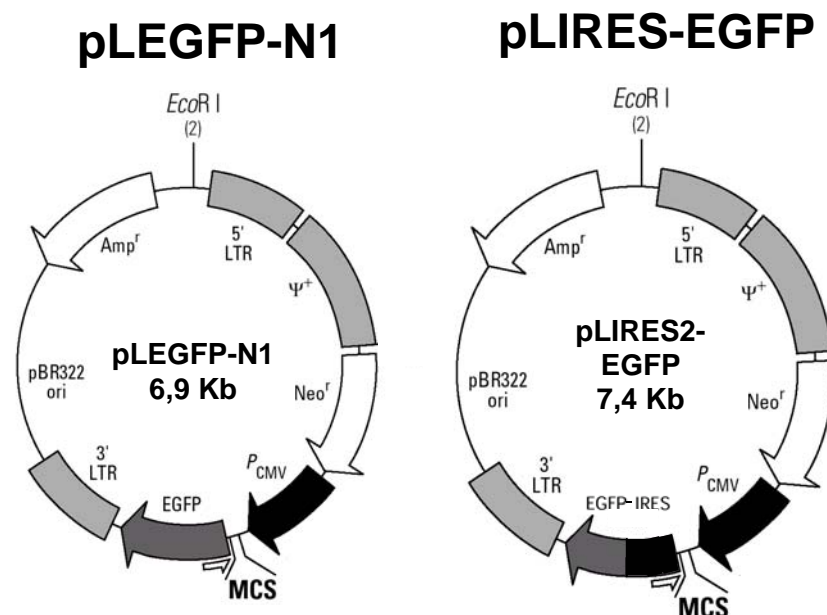


Figura 6: Vetores retrovirais. Representação esquemática dos vetores retrovirais pLEGFP e pLIREs2-EGFP utilizados no estudo. Ambos os vetores apresentam a região retroviral regulatória LTR (“Long terminal repeat”, terminal repetido longo), derivado do vírus de leucemia murina de Moloney, e o sinal de empacotamento viral Ψ (psi). A principal diferença entre os dois plasmídeos é a presença da entrada interna de ribossomo (IRES) presente no vetor pLIREs2-EGFP que leva a produção de um mRNA bicistrônico. EGFP, proteína fluorescente verde melhorada (“enhanced green fluorescent protein”); MCS, sítio múltiplo de clonagem (“multiple cloning site”); pCMV, promotor do citomegalovírus humano; Neo, gene de resistência a neomicina; Amp, gene de resistência a ampicilina; pBR322, origem de replicação do plasmídeo. O tamanho da construção está apresentado em kilobase (Kb).

Nesses dois vetores retrovirais foram clonados, utilizando enzimas de restrições e posterior ligação, os cDNAs do NFAT1-C e CA-NFAT1-C que foram gentilmente cedidos pela Dr. Anjana Rao e os cDNAs do NFAT2-A, NFAT2-A2 e do CA-NFAT2-A e CA-NFAT2-A2 que foram gentilmente cedidos pela Dr. Melisa Brown. A construção do CA-NFAT1-C com a ablação do C-terminal a partir do aminoácido 698 do NFAT1 (pLIREs-EGFP-CA-NFAT1-ΔC) foi construída através da criação de um sítio de restrição da enzima Stu1, logo após o RHR do NFAT1-C usando o sistema GeneTailor Site-Directed Mutagenesis (Invitrogen), e posteriormente usando esse novo sítio para retirar o C-terminal do NFAT1-C. Os primers para a mutagenese sítio dirigida foram: 5'AACCATCTTTGATCTGC**AGGCCT**GCCCATGGAG e 5'AGGACCTCCCTCGCGAAATCAGACGTA. O sítio Stu1 criado está em negrito. Essa construção mantém o sinal de localização nuclear do SV40 do C-terminal do CA-NFAT1-C. A ablação do N-terminal do CA-NFAT2-A2 para a construção do CA-NFAT2-ΔN foi feita através da amplificação do CA-NFAT2-A2 utilizando os primers a seguir: 5'GCG**CTCGAG**atgCACTACAGTTATGTGTCC e 5'CCAG**GTCGAC**AGCATTATTCAGTGGAGACACAC. O primeiro se anela a 5' do CA-NFAT2-A2 na região logo após o motivo N-terminal dessa proteína, o segundo anela após o STOP códon do CA-NFAT2-A2. Em negrito foi criado um sítio para a enzima Xho1 e em negrito e sublinhado um sítio para Sal1, esses sítios de restrição foram utilizados para a clonagem no vetor retroviral. Em letras minúsculas está o novo códon de iniciação criado (atg) para o CA-NFAT2-ΔN. O cDNA do CA-NFAT2-ΔN codifica uma proteína que se inicia a partir do aminoácido 30 do NFAT2-A2.

Após a construção do CA-NFAT2- Δ N e do CA-NFAT1- Δ C, esses cDNAs foram sub-clonados no vetor retroviral pLIREs-EGFP. O vetor retroviral pBabe-H-rasV12 foi gentilmente cedido pelo Dr. Scott Lowe. O vetor retroviral pBabe-c-myc-ER foi gentilmente cedido pelo Dr. Gerald Evan. Todas as construções foram confirmadas por digestão e mapeamento por enzima de restrição e por sequenciamento.

3.4 Produção de retrovírus recombinantes e infecção de células alvo.

Foi utilizado a linhagem celular EcoPack2 ecotrópica (BD-Biosciences, San Jose, CA) como célula empacotadora dos retrovírus. Essas células foram transfectadas de forma transiente por precipitação por fosfato de cálcio seguindo o protocolo descrito abaixo.

Dia 1: As células EcoPack2 eram plaqueadas em placas de Petri tratadas de 10cm de diâmetro no total de 4×10^6 células/placa em 10ml de meio de cultura.

Dia 2: Essas células eram transfectadas utilizando o DNA dos vetores retrovirais purificados por colunas de Maxi-Prep (Gibco). O DNA era precipitado misturando-se: 20 μ g de DNA; 250 μ l de tampão fosfato 2x (280mM NaCl; 10mM KCl; 1,5mM Na₂HPO₄; 12mM dextrose; 50mM HEPES; pH7,1); 50 μ l de CaCl₂ 2,5M e avolumando para 500 μ l com H₂O deionizada. Essa mistura era então misturada avidamente por borbulhamento e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, o precipitado (500 μ l) era adicionado às células empacotadoras.

Dia 3: As células empacotadoras transfectadas eram lavadas duas vezes com PBS e adicionadas de 5ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone). Nesse mesmo dia as células alvo NIH3T3 eram plaqueadas em placas de 6 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço).

Dia 4: Os sobrenadantes das células empacotadoras contendo vírus eram recolhidos; centrifugados por 5 min a 500g para retirar eventuais células soltas e fragmentos celulares. Os vírus eram ou concentrados utilizando colunas Amicon Ultracel 50k (Millipore, Billerica, MA) através de centrifugação a 2400g por 15 minutos ou utilizados sem concentração prévia e eram posteriormente suplementados com 8 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland). O sobrenadante era adicionado junto com meio DMEM novo (1:1) às células alvo, que eram centrifugadas duas vezes a 380g por 45 minutos com intervalo de 90 minutos entre as centrifugações.

Dia 5: As células alvo (NIH3T3) eram então soltas da placa por tripsinização e o percentual de transdução era acessado por citometria de fluxo e análise da expressão de EGFP.

Para os experimentos de co-expressão do CA-NFAT1-C e do CA-NFAT2-A, as células NIH3T3 foram primeiramente transduzidas com o CA-NFAT2-A, expandidas por uma semana e depois re-transduzidas com o CA-NFAT1-C ou com o vetor vazio. A eficiência de transdução, nesse caso, foi analisada para o CA-NFAT2-A por expressão de EGFP logo antes o segundo round de transdução e para o CA-NFAT1-C por marcação intracelular utilizando o

anticorpo policlonal anti-67.1 (região N-terminal do NFAT1-C) e IgG anti-coelho marcado com rodamina (KPL) e posterior análise por citometria de fluxo.

Para garantir a reprodutibilidade, cada experimento foi repetido utilizando células derivadas de infecções virais independentes.

3.5 Construção das linhagens celulares transformadas NIH3T3-H-*rasV12* e NIH3T3-c-*myc*-ER.

As linhagens celulares transformadas de NIH3T3 foram construídas através da infecção retroviral dos plasmídeos contendo os conhecidos oncogenes H-*rasV12* e c-*myc* que estavam codificadas nos vetores pBabe-H-*rasV12*, pBabe-c-*myc*-ER. O sobrenadante condicionado e concentrado das células empacotadoras transfectados com os vetores pBabe-H-*rasV12* ou pBabe-c-*myc*-ER foram adicionados às células NIH3T3 (2×10^4 células) e incubados por 24 horas. Depois de infectadas, as células foram selecionadas pelo antibiótico Puromicina ($15\mu\text{g/ml}$; Sigma) por 14 dias e posteriormente, clones foram isolados para gerar diversas linhagens clonais. A expressão de H-*rasV12* e de c-*myc* foi demonstrada por *Western blot*. Para os experimentos superexpressando o NFAT, o clone A1 de NIH3T3 H-*rasV12* foi selecionado e utilizado para todos os experimentos.

3.6 Ensaios de proliferação celular.

Células NIH3T3 selvagem ou NIH3T3 transformadas com H-*ras*V12 foram infectadas com o plasmídeo controle vazio ou com os plasmídeos contendo os cDNAs dos NFAT e foram utilizadas para os ensaios de proliferação celular. As células foram plaqueadas em triplicata em placas de 96 poços. Para ensaios em sub-confluência, 8×10^2 células foram plaqueadas por poço; para ensaios em confluência, 8×10^3 células foram plaqueadas. Em diferentes tempos após a infecção retroviral o estado de proliferação celular foi avaliado por duas técnicas: Incorporação por cristal violeta que consiste em fixar as células com etanol 100% por 10 minutos, corar as células fixadas com 0,05% de cristal violeta em 20% de etanol por 10 minutos, lavar 3 vezes com água destilada e ressolubilizar o cristal violeta com metanol 100% por 5 minutos e ler a absorbância da placa em um espectrofotômetro a 595nm. Os ensaios de proliferação por incorporação de Timidina- H^3 foram feitos utilizando pulsos de Timidina- H^3 ($5\mu\text{Ci/ml}$) por 8 horas aplicados as células infectadas ou não com os plasmídeos contendo cDNAs dos NFAT. As células foram recolhidas e a incorporação de Timidina- H^3 foi analisada por cintilografia líquida em tempos variados.

3.7 Análise de ciclo celular e Sub- G_0 .

Placas de 6 poços foram inoculadas com NIH3T3 infectadas ou não com os cDNAs dos NFAT totalizando $2,4 \times 10^4$ ou $2,4 \times 10^5$ células por poço, para

ensaios em sub-confluência ou confluência, respectivamente. Nos dias indicados, as células foram tripsinizadas, e lavadas uma vez com salina tamponada com fosfato (PBS). As células foram então coradas com iodeto de propídeo (75 μ M) na presença de NP-40. Análise do conteúdo de DNA foi determinado coletando 10.000 eventos para ciclo celular e 20.000 eventos para análise Sub-G₀ por citometria de fluxo. As fases do ciclo celular e proporção de células com marcação Sub-G₀ foram determinados utilizando o programa CELLQuest (BD Biosciences).

3.8 Marcação por Anexina-V.

Células NIH3T3 infectadas ou não com os vetores contendo os NFAT foram plaqueadas em sub-confluência e foram tripsinizadas 24 horas depois, lavadas com PBS e marcadas com Anexina-V conjugada com ficoeritrina (BD Biosciences), e analisadas por citometria de fluxo.

3.9 Perda de inibição por contato: ensaio de formação de foco.

NIH3T3 selvagens ou NIH3T3 transformadas com *c-myc* ou *H-rasV12* foram infectadas com o plasmídeo controle vazio ou com os plasmídeos contendo os cDNAs dos NFAT e foram diluídas de 1:5 à 1:500 com NIH3T3 selvagens não infectadas para facilitar a visualização dos focos de

transformação. Essa mistura foi plaqueada em uma densidade final de 5×10^4 células/poço da placa de 6 poços. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após duas semanas as células foram analisadas tanto por microscopia de contraste de fase quanto por microscopia de fluorescência para a detecção da expressão de EGFP. Para a visualização dos focos, as placas foram lavadas com PBS e fixadas com etanol absoluto por 10 minutos e coradas com cristal violeta 0,05% em 20% de etanol por 10 minutos e foram lavadas 3 vezes com água destilada.

3.10 Crescimento independente de ancoragem em meio semi-sólido.

Placas de seis poços foram forradas com meio suplementados com 0,6% de agarose de baixo ponto de fusão para evitar adesão celular ao fundo do poço. Células NIH3T3 selvagens ou H-*rasV12*, infectadas ou não com os cDNAs dos NFAT foram tripsinizadas, e 5×10^3 ou 1×10^3 NIH3T3 selvagem ou H-*rasV12*, respectivamente, foram ressuspensas em 3 ml de meio de cultura contendo 0,3% de agarose. Após plaqueamento, as colônias foram cultivadas por diferentes espaços de tempo (de duas semanas para as NIH3T3 H-*rasV12* e quatro semanas para as NIH3T3 selvagens). Colônias representativas foram então visualizadas por microscopia de contraste de fase e de fluorescência para detecção do EGFP e o número total de colônias foi contado.

3.11 Crescimento tumoral em camundongos imunodeficientes.

Camundongos atímicos BALB/c Nude foram inoculados com NIH3T3 selvagens ou H-*ras*V12 infectadas ou não com os cDNAs dos NFAT. Essas células foram tripsinizadas, lavadas e ressuspensas em PBS. Os camundongos foram injetados sub-cutaneamente no flanco esquerdo com 5×10^5 ou 3×10^5 células NIH3T3 selvagem ou H-*ras*V12, respectivamente, e o volume tumoral foi avaliado a cada cinco dias usando a fórmula: $V=0,52 \times (\text{comprimento}^2 \times \text{largura})$. O número de camundongos utilizados em cada experimento está indicado na legenda das figuras. Os camundongos injetados com células NIH3T3 selvagens foram sacrificados e fotografados 70 dias após o inóculo e 10 dias após para os injetados com células NIH3T3-H-*ras*V12.

3.12 Análise por *Western blot*.

As células (NIH3T3 ou HEK293T; 5×10^5 células) infectadas ou não com os vetores retrovirais contendo os NFAT foram centrifugadas e ressuspensas em 20 μl de tampão de ressuspensão (40 mM de Tris-Cl pH 7,5, 10 mM de EDTA e 60 mM de pirofosfato de sódio), 20 μl de SDS 10%, 10 μl (*loading buffer*) e aquecidas por 15 minutos a 100°C. Os extratos das proteínas foram separados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 6-12%. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando o

sistema de transferência “Trans-Blot Semi-Dry electrophoretic transfer cell” (BioRad) como recomendado pelo fabricante. As membranas foram posteriormente bloqueadas com tampão Tris salina (TBS; 10 mM Tris-Cl, 150mM NaCl, pH 7,4) com 5% de leite desnatado por duas horas. Posteriormente, foram lavadas com TBS-T (TBS mais 0,05% Tween) e incubadas nesse mesmo tampão por duas horas com o anticorpo primário (NFAT1, anticorpo policlonal anti-67.1 (reconhece a região N-terminal do NFAT1); NFAT2, anticorpo monoclonal 7A6 (reconhece a região do DBD do NFAT2; Santa Cruz); GAPDH, anticorpo monoclonal 6C5 (Santa Cruz); Ras, anticorpo monoclonal F132 (Santa Cruz); actina, anticorpo monoclonal AC-40 (Sigma)). A membrana foi lavada três vezes com TBS-T e incubada por mais uma hora com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase de raiz forte (HRP). Em seguida, as membranas foram lavadas seis vezes com TBS-T e reveladas com o substrato da peroxidase utilizando o sistema “ECL Western blotting reagent” (GE Healthcare), como recomendado pelo fabricante.

3.13 Imunolocalização do NFAT:

Células HEK293T transfectadas com o vetor vazio ou vetores contendo o NFAT foram fixadas com 4% de paraformaldeído em temperatura ambiente por 15 minutos. As células foram permeabilizadas e sítios não específicos foram bloqueados com PBS 1x contendo 0,5% de NP-40 e 5% de SFB em diversas lavagens de 5 minutos. As células foram incubadas por 1 hora em temperatura

ambiente com os anticorpos contra NFAT1 ou NFAT2 em PBS 1x contendo 0,5% NP-40 e 5% SFB. Posteriormente, as células foram lavadas novamente antes da incubação com o anticorpo IgG anti-coelho ou anti-camundongo marcado com rodamina (KPL) por 30 minutos para o NFAT1 e NFAT2, respectivamente, e DAPI (300 nM) por 1 minutos. As células foram visualizadas em um microscópio de fluorescência Olympus BX60 e células representativas foram fotografadas.

3.14 Ensaio de transativação:

Células T Jurkat (3×10^6 células/600 μ l) foram eletroporadas (950 μ F, 250V) em cubetas de 0,4 cm (GenePulser Cuvette; Bio-Rad Laboratories) no eletroporador GenePulser II (Bio-Rad Laboratories). As células foram cotransfectadas com três plasmídeos diferentes em meio sem SFB como descrito a seguir: (1) o vetor retroviral indicado (30 μ g), (2) o plasmídeo repórter 3xNFAT-Luciferase (3 μ g), e (3) o plasmídeo de expressão da *Renilla* (pRL-TK, Promega) para a normalização (0,1 μ g). Após 24h da transfecção, as células foram recolhidas e lisadas por 15 minutos em temperatura ambiente com 50 μ l do reagente de lise de cultura (Promega). Os extratos brutos (20 μ l) foram adicionados a 50 μ l do substrato de luciferase (Promega) e a atividade da Luciferase foi medida em um Luminômetro de Microplacas Verita (Turner Biosystems). A atividade da Luciferase foi expressa em o número de vezes de indução em relação à célula expressando o vetor vazio.

4. RESULTADOS

4.1. Validação dos vetores retrovirais

Com o objetivo de estudar o envolvimento dos fatores de transcrição NFAT na proliferação e morte celular, nós utilizamos os bem caracterizados mutantes constitutivamente ativos do NFAT denominados CA-NFAT. As formas CA-NFAT contêm diversas mutações em seu domínio de homologia do NFAT (NHR) de resíduos serina para alanina que impedem sua fosforilação e subsequente inibição (Okamura *et al.*, 2000). As formas CA-NFAT se encontram constitutivamente localizadas no núcleo, são capazes de se ligar ao DNA e de ativar a expressão de genes endógenos o que permite a análise dos fenótipos induzidos pela superexpressão do NFAT na ausência de estímulos externos que poderiam mascarar a função dessas proteínas (Okamura *et al.*, 2000; Monticelli *et al.*, 2002). Os cDNAs das isoformas NFAT1-C, NFAT2-A e NFAT2-A2 e suas formas constitutivamente ativas foram introduzidos no vetor retroviral pLIRES-EGFP conforme descrito no Material e Métodos. Além dessas isoformas, uma forma truncada do NFAT1 (NFAT1- Δ C) foi construída através da retirada do C-terminal longo do NFAT1-C e sub-clonada no vetor pLIRES-EGFP. Todas as isoformas do NFAT clonadas no vetor retroviral estão representadas de forma esquemática e alinhadas na Figura 7. Os cDNA dos NFAT clonados no pLIRES-EGFP estão sob o controle transcripcional do promotor de citomegalovírus humano (CMV) e contém, à 3', um sítio de entrada interna de ribossomo (IRES)

controlando a tradução da proteína EGFP. Portanto, o produto da transcrição é um mRNA bicistrônico que leva a expressão concomitante da proteína NFAT e EGFP (Figura 6).

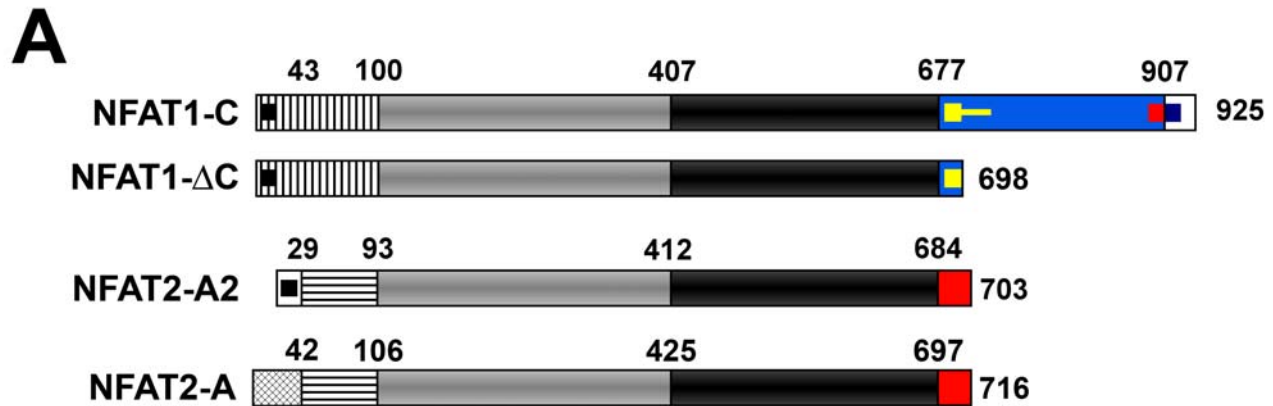


Figura 7: Alinhamento esquemático das proteínas NFAT usadas nesse estudo. A proteína NFAT1- Δ C foi construída pela ablação do C-terminal longo da proteína NFAT1-C, logo após o motivo central. Duas isoformas do NFAT2 foram utilizadas (NFAT2-A2 e -A) que variam apenas em seu N-terminal, onde apenas o primeiro possui o motivo N-terminal. Cores e numeração estão igualmente representadas como na Figura 1.

Para validar se os vetores retrovirais estavam produzindo proteínas NFAT funcionais, vetores pLIREs-EGFP contendo os cDNA das diferentes isoformas do NFAT foram transfectados por precipitação por fosfato de cálcio na linhagem celular HEK293T. Como esperado, as proteínas extraídas dessas células e analisadas por Western blot apresentaram peso molecular aparente em torno de 120 kDa para o NFAT1-C selvagem (WT) e entre 100 e 90 kDa para o NFAT2-A e NFAT2-A2 selvagens (WT) (Figura 8A). Já as formas constitutivamente ativas ou que não possuía o C-terminal longo, no caso do CA-NFAT1- Δ C, apresentaram um peso molecular aparente sempre menor em comparação com suas formas WT (Figura 8A). Isso se deve, nos primeiros casos, à ausência de

grupamentos fosfatos que estão presentes na forma inativa do NFAT-WT e que levam a alterações de migração em gel SDS-PAGE por motivos ainda pouco conhecidos, e no segundo caso devido à ausência do domínio TAD C-terminal longo da proteína NFAT1-C. Quando analisada por imunofluorescência a localização sub-celular das proteínas NFAT expressas em células HEK293T foi observado, como esperado, que as formas selvagens (WT) do NFAT1-C, NFAT2-A e NFAT2-A2 estão restritas ao citoplasma dessas células não ativadas (Figura 8B). Em contrapartida, todos os vetores contendo as formas CA- do NFAT produziram proteínas que se localizaram constitutivamente no núcleo dessas células não ativadas (Figura 8B).

Além disso, e corroborando com a funcionalidade dos vetores construídos, às proteínas NFAT geradas pelo vetor pLIREs-EGFP foram capazes de levar a transativação de uma construção repórter de luciferase responsiva ao NFAT (3xNFAT-Luc). Células T Jurkat foram transfectadas de forma transiente por eletroporação com o vetor pLIREs-EGFP vazio ou contendo as isoformas do NFAT junto com o vetor 3xNFAT-Luc e a capacidade de transativação foi analisada por ensaio de luciferase. Enquanto o vetor vazio (controle) levou a uma baixa transativação da luciferase, a superexpressão das proteínas selvagens do NFAT (WT) levaram a um moderado aumento da transativação de luciferase (Figura 9) em células T Jurkat não ativadas. Em contrapartida, todas as formas constitutivamente ativas do NFAT (CA) foram capazes de levar a um grande aumento de transativação, variando de duas a três vezes de aumento de indução, em relação as suas formas não CA (Figura 9). Portanto, a análise

desses dados sugere que os vetores retrovirais contendo os cDNA das isoformas do NFAT estão sendo capaz de levar à expressão de proteínas NFAT funcionais e que as formas CA do NFAT estão realmente funcionando como esperado.

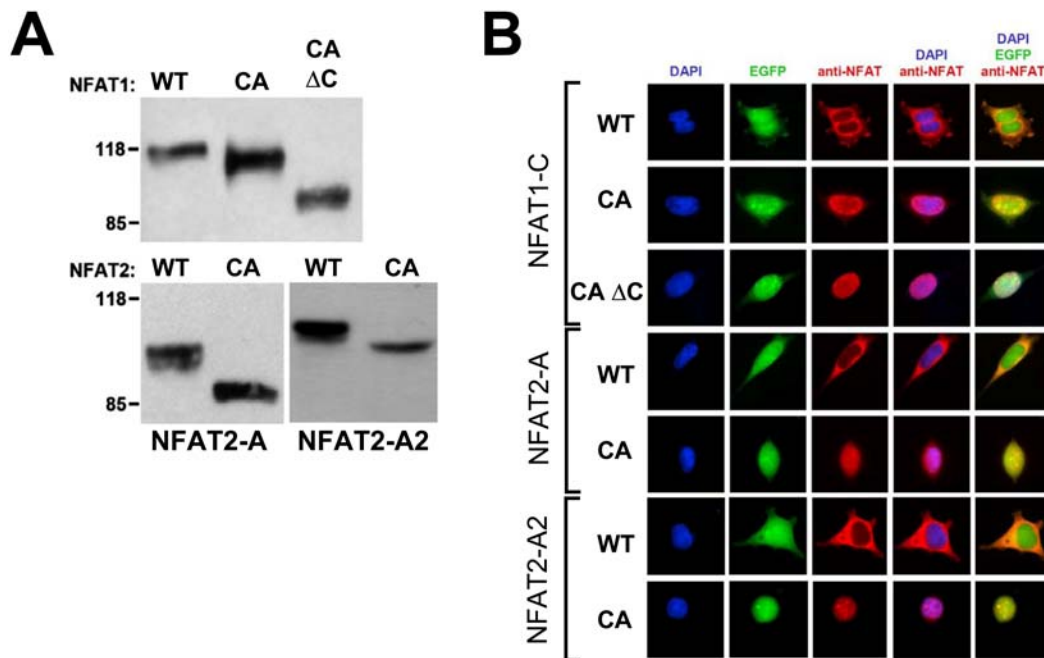


Figura 8: Validação dos vetores retrovirais contendo os cDNA dos NFAT. Todas as construções com as proteínas CA-NFAT apresentaram peso molecular esperado e se localizaram constitutivamente no núcleo. Células HEK 293T foram transfectadas por precipitação por fosfato de cálcio com o vetor pLIRE2-EGFP contendo o cDNA do NFAT1-C, NFAT1- Δ C, NFAT2-A e NFAT2-A2 selvagens (WT) e suas formas constitutivamente ativas (CA). As células foram mantidas não estimuladas. Todos os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. A) As células foram cultivadas por 48 horas após a transfecção e a proteína total do lisado foi obtida e o nível de expressão e peso molecular aparentes das proteínas NFAT foram determinados por análise de Western blot. B) A localização sub-celular das proteínas NFAT foi determinada 48 horas após a transfecção por análise por imunofluorescência. Em Azul, marcação do núcleo por DAPI; em Verde, proteína verde fluorescente (EGFP); em vermelho, proteínas NFAT. Todas as proteínas CA-NFAT estavam localizadas no núcleo como esperado.

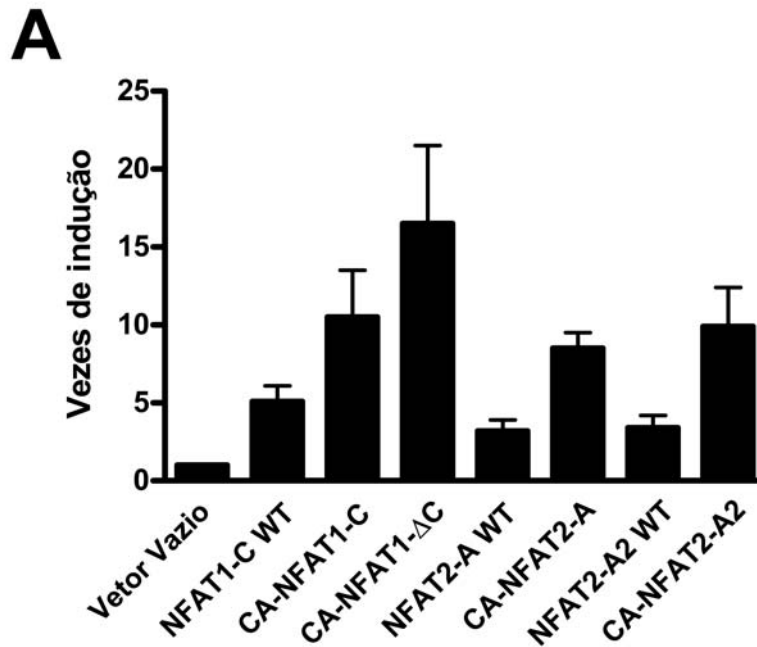


Figura 9: As proteínas CA-NFAT são capazes de induzir a transativação gênica constitutivamente. Células Jurkat T foram co-transfectadas por eletroporação com o vetor de expressão (pLIRE2-EGFP ou pLIRE2-EGFP-NFAT) e o vetor repórter de luciferase 3xNFAT-Luc. As células foram deixadas não estimuladas. Após 24 horas, a atividade de luciferase foi medida e expressa de forma relativa à célula transfectada com o vetor vazio (pLIRE2-EGFP; Veze de Indução). Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.2. O CA-NFAT1-C é capaz de induzir um fenótipo oposto em relação ao CA-NFAT2-A

Para analisar a capacidade do NFAT de regular a proliferação e a morte celular, nós utilizamos a linhagem celular NIH3T3 que tem a vantagem de não ser transformada e de não expressar nem o NFAT1 nem o NFAT2. Essas células foram transfectadas pela metodologia de transdução retroviral em todos

os experimentos para entregar os cDNA dos diferentes NFAT. Essa técnica facilitou a transferência de genes onde se era capaz de infectar rotineiramente >85% das células NIH3T3 quando analisado por expressão de EGFP. Esse alto nível percentual de infecção permitiu a análise da população total de células logo após a infecção, assim prevenindo qualquer alteração causada pelo isolamento de linhagens celulares a partir de clones de células, o que poderia mascarar um determinado fenótipo induzido pelo NFAT. Todas as construções apresentaram capacidade de infecção similar da célula NIH3T3 quando analisado por expressão de EGFP (dado não mostrado).

Um alinhamento esquemático dos cDNA do CA-NFAT1-C e CA-NFAT2-A utilizados nesses experimentos está representado na Figura 10A. Quando inicialmente as células NIH3T3 foram infectadas com os cDNA dos CA-NFAT ou com o vetor vazio pLIREs-EGFP, pode-se notar uma marcante diferença entre as culturas. Enquanto as células NIH3T3 selvagens ou infectadas com o vetor vazio (controle) demonstraram densidade e viabilidade celular similares, quando acompanhadas por contagem celular e exclusão de azul de tripan, as células expressando o CA-NFAT2-A apresentaram aumento no número total de células. Essa característica do CA-NFAT2-A foi completamente oposta quando comparada com as células expressando o CA-NFAT1-C que demonstraram uma marcante redução do número total de células e em sua viabilidade quando analisada por exclusão de azul de tripan (dados não mostrados). Para analisar essa diferença da capacidade de crescimento, foi realizado um ensaio de cinética de proliferação celular acompanhado por incorporação de cristal violeta

que apresenta uma correlação direta com o número total de células na cultura. Diferente das células controle expressando o vetor vazio que pararam de proliferar logo após alcançarem a confluência, as células expressando o CA-NFAT2-A foram capazes que ultrapassar a monocamada de células e continuaram crescendo acima da confluência (Figura 10B).

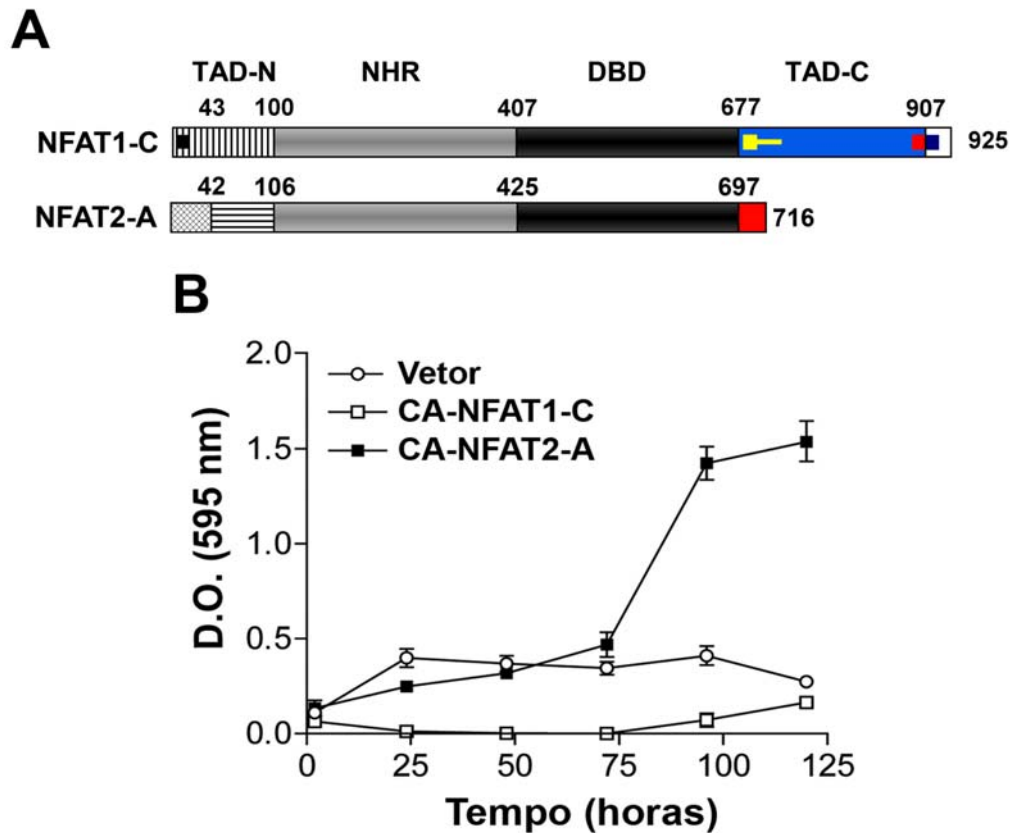


Figura 10: A atividade sustentada do NFAT1-C e do NFAT2-A induz fenótipos opostos em células NIH3T3. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C ou CA-NFAT2-A, plaqueadas e analisadas para o crescimento celular. A) Alinhamento esquemático das proteínas NFAT utilizadas para os experimentos das Figuras 10 a 17. B) Cinética de proliferação analisada por marcação por cristal violeta. D.O., densidade óptica. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. de triplicatas em um experimento representativo de pelo menos três repetições.

Surpreendentemente, as células expressando CA-NFAT1-C mostraram um fenótipo completamente oposto. Essas células não alcançaram a confluência, acumularam em número reduzido de células e continuaram proliferando em baixa taxa por todo o experimento (Figura 10B). Esses resultados sugerem que o CA-NFAT2-A é capaz de induzir a perda de inibição por contato da célula NIH3T3 levando ao crescimento celular contínuo, mesmo em cultura confluenta. Já o CA-NFAT1-C é capaz de levar a uma redução do crescimento celular destas células. De fato, células NIH3T3 expressando o CA-NFAT1-C mostraram uma dramática redução de células proliferando e se encontravam predominantemente restritas na fase G₁ do ciclo celular, 48 horas após a transdução, quando comparada com o controle (Figura 11A e 11B). Esses dados foram obtidos a partir da análise de incorporação de Timidina-H³ e marcação por Iodeto de Propídeo e análise do conteúdo de DNA, respectivamente, em culturas não confluentes de NIH3T3. Em contraste, células NIH3T3 expressando CA-NFAT2-A continuaram proliferando em culturas superconfluentes e mantiveram um perfil de ciclo celular típico de células proliferando ativamente, quando comparada com o controle (Figura 11A e 11B). Esses dados sugerem que o NFAT1-C e NFAT2-A possuem papéis diferentes no controle do crescimento celular e proliferação celular.

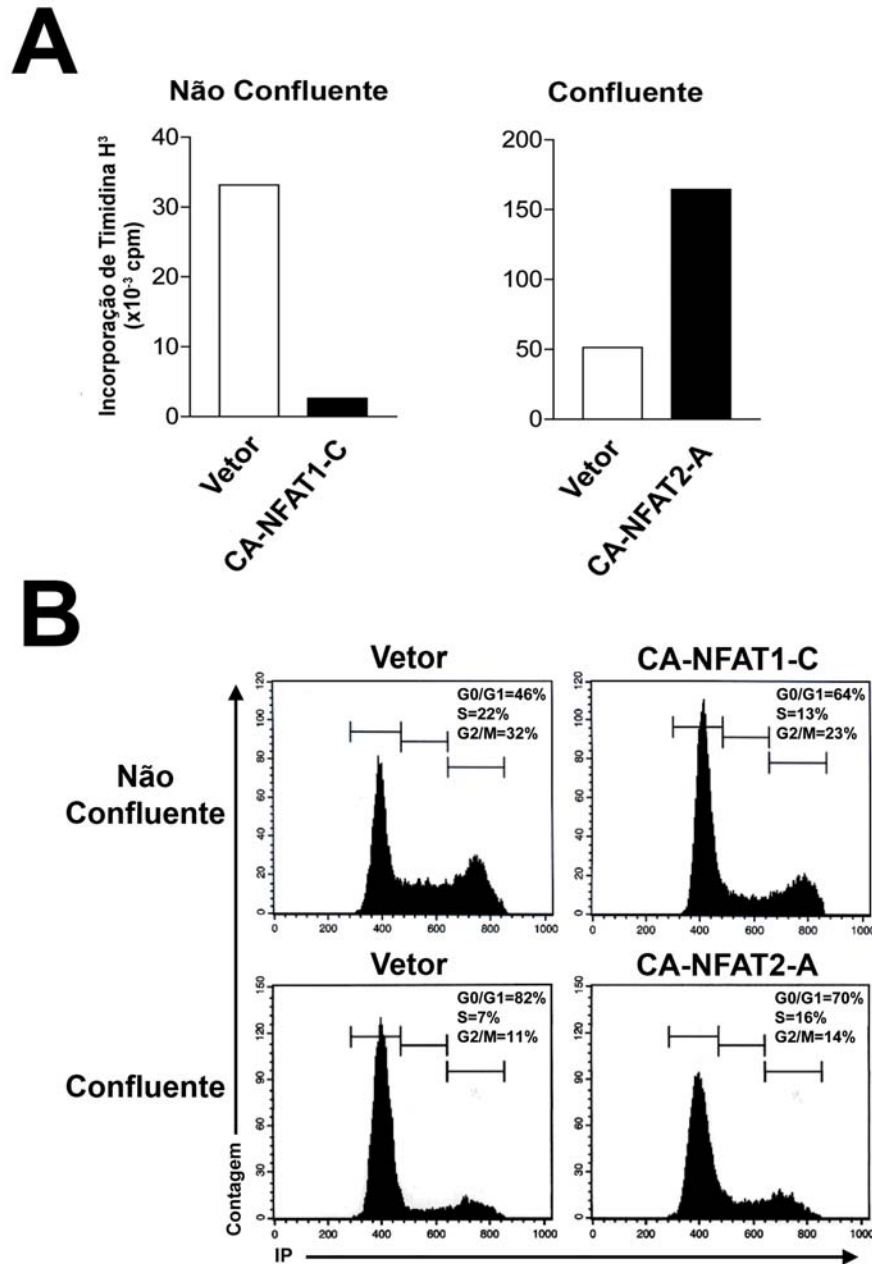


Figura 11: O papel do CA-NFAT1-C e CA-NFAT2-A no controle do ciclo celular. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C ou CA-NFAT2-A, plaqueadas com as confluências indicadas e analisadas para o ciclo celular. A) O processo de duplicação do DNA foi analisado 48 horas após a infecção por incorporação de timidina-H³. B) O ciclo celular foi analisado 48 horas após a transdução. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes. As células foram fixadas e marcadas com iodo de propídeo (IP) e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. O percentual de células em cada fase do ciclo (G₀/G₁, S e G₂/M) estão indicadas. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Como as células expressando o CA-NFAT1-C aparentemente sofriam uma redução em número, no ensaio de cinética de proliferação, questionou-se se isso poderia ser devido a indução de morte celular. Células NIH3T3 expressando o vetor vazio apresentaram uma baixa proporção de células com conteúdo de DNA sub-G₀, como demonstrado por citometria de fluxo e marcação por Iodeto de Propídeo, o que é um indicativo de células entrando em apoptose (Figura 12A). Isso sugere que essas células apresentam um baixo grau de apoptose em cultura. Esse baixo nível de apoptose também pode ser observado para as células expressando o CA-NFAT2-A (Figura 12A). Contudo, 72 horas após a infecção com o CA-NFAT1-C, aproximadamente um terço das células exibiam um conteúdo de DNA sub-G₀, indicando que o CA-NFAT1-C é capaz de induzir apoptose nas células NIH3T3 (Figura 12A). Para confirmar se a morte celular induzida pelo CA-NFAT1-C era realmente apoptose, foi realizada uma marcação por Anexina-V para analisar a exposição de fosfatidilserina. A marcação por anexina-V das células expressando CA-NFAT1-C, 48 horas após a infecção, mostrou que a fragmentação do DNA é precedida pela externalização da fosfatidilserina, confirmando que o CA-NFAT1-C é capaz de induzir apoptose nas células NIH3T3 (Figura 12B). Em contrapartida, a expressão do vetor vazio ou do CA-NFAT2-A, nas células NIH3T3, não foram capazes de levar a uma alta exposição da fosfatidilserina (Figura 12B). Analisados em conjunto, esses resultados indicam que a ativação sustentada da via de sinalização do NFAT1 inibe o ciclo celular e induz a apoptose, ambos refletindo no número total de células e que esse fenótipo é completamente

oposto àquele induzido pela ativação sustentada do NFAT2 que leva a uma acumulação de células na cultura.

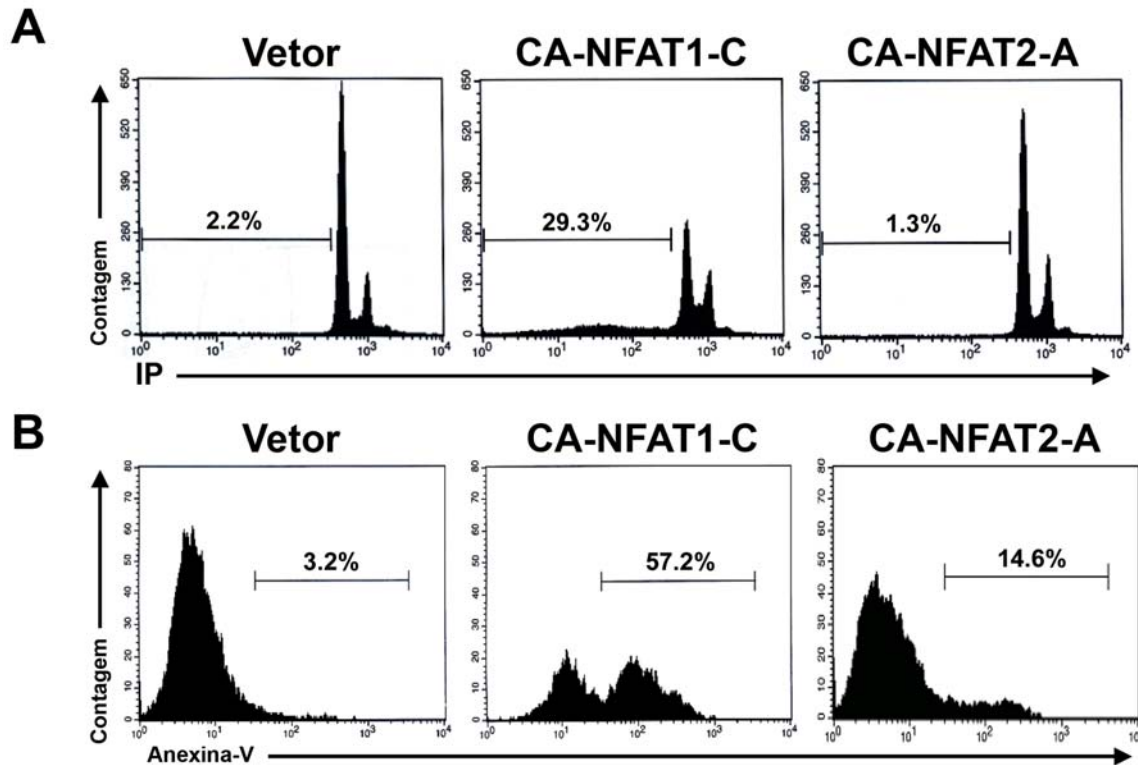


Figura 12: O CA-NFAT1-C, mas não o CA-NFAT2-A é capaz de induzir morte celular por apoptose nas células NIH3T3. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C ou CA-NFAT2-A, plaqueadas e analisadas para morte celular. A) Análise de morte celular. As células foram plaqueadas em confluência e, 72 horas após a transdução, foram marcadas por iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. O percentual de morte celular (sub-G₀) está indicado na figura. B) As células foram plaqueadas em confluência e, 48 horas após a transdução, foram marcadas por anexina V e analisadas por citometria de fluxo. O percentual de células positivas para fosfatidilserina está indicado na figura. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

4.3. A atividade do CA-NFAT2-A, mas não do CA-NFAT1, é capaz de induzir todos os marcos de transformação celular na NIH3T3

Como foi anteriormente demonstrado que a atividade sustentada do NFAT2-A é capaz de induzir um fenótipo de célula transformada na linhagem celular de pré-adipócito 3T3-L1 (Neal *et al.*, 2003), fez-se a pergunta se o CA-NFAT2-A também poderia ser capaz de transformar a célula NIH3T3. Foi observado em dados anteriores dessa tese que as células NIH3T3 expressando o CA-NFAT2-A exibem um aparente crescimento acima da confluência o que indica uma perda de inibição de crescimento por contato. Para melhor visualizar esse fenótipo foram realizados ensaios de formação de *foci* em cultura, onde células expressando o vetor vazio, o CA-NFAT1-C ou o CA-NFAT2-A foram plaqueadas junto com um excesso de células NIH3T3 selvagens não infectadas. Posteriormente, as células cresceram em cultura por 12-15 dias e a formação de *foci* transformados foi analisada por marcação por cristal violeta ou por microscopia de fluorescência. As células infectadas com o vetor vazio ou com o CA-NFAT1-C geraram apenas um pequeno número de pequenos *foci* quando analisado por marcação por cristal violeta, sugerindo que essas duas construções não são capazes de transformar as células NIH3T3 (Figura 13A, painel esquerdo). Contrariamente, quando o CA-NFAT2-A foi expresso nessas células, um grande número de focus se formaram (Figura 13A). Como o EGFP e as proteínas CA-NFAT são expressos em um mesmo mRNA bicistrônico no vetor retroviral pLIREs-EGFP, as células que expressavam as proteínas CA-

NFAT ou vetor vazio podiam ser rastreadas diretamente através de sua discriminação das células NIH3T3 selvagens por microscopia de fluorescência e visualização do EGFP. Como resultado dessa análise foi encontrado que células infectadas com o vetor vazio eram indistinguíveis morfológicamente das células vizinhas não transduzidas (Figura 13A, painel direito). Além disso, a maior parte dos *foci* formados nas células expressando o vetor vazio eram negativas para EGFP, indicando que a formação de *foci* nessas culturas eram transformações espontâneas das células NIH3T3 e não foram causadas pela transdução retroviral (Figura 13A, painel direito). Ainda mais, nenhum *focus* formado na cultura expressando o CA-NFAT1-C mostrou fluorescência do EGFP, confirmando que essa proteína não é capaz de transformar a célula NIH3T3 (Figura 13A, painel direito). Oposto a esses dados, todas as células expressando o CA-NFAT2-A na cultura mista formaram *foci* prontamente detectáveis (Figura 13A, painel direito). Juntos, esses dados sugerem que a via de sinalização do CA-NFAT2-A é capaz de induzir a perda de inibição de crescimento por contato nas células NIH3T3 levando a formação de *foci* em cultura o que não é visto nas células expressando o CA-NFAT1-C.

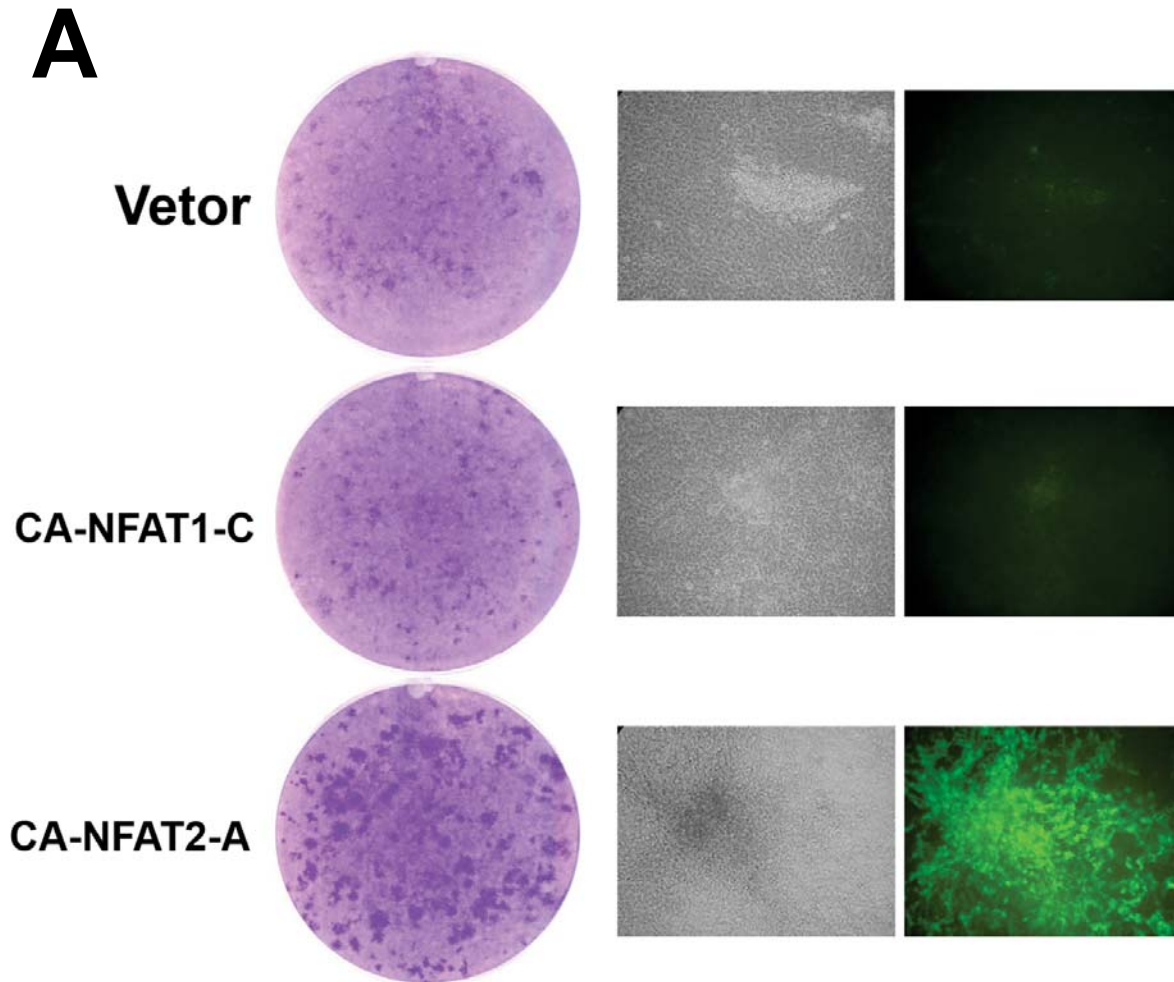


Figura 13: A atividade constitutiva do NFAT2-A, mas não do NFAT1-C é capaz de induzir a formação de *foci* em cultura. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C ou CA-NFAT2-A. As células transduzidas com os vetores indicados foram misturadas 1:5 com células NIH3T3 selvagens não infectadas e cultivadas por 15 dias após a confluência. A formação de *foci* foi analisada por marcação por Cristal Violeta (esquerda) ou por microscopia de contraste de fase (centro) e microscopia de fluorescência para a expressão de EGFP (direita) de *foci* representativos de NIH3T3. Todos os resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

Para analisar outras características do potencial de transformação das proteínas CA-NFAT, células NIH3T3 foram plaqueadas em meio semi-sólido de agarose que não permite a adesão celular, analisando assim a capacidade de crescimento independente de ancoragem. As células expressando o CA-NFAT2-

A demonstraram serem capazes de formar prontamente um grande número de colônias de grande volume quando comparado com as células expressando o vetor vazio (Figura 14A e 14B). Em contra-partida, as células expressando o CA-NFAT1-C ou vetor vazio somente formaram um pequeno número de colônias formadas por apenas poucas células (Figura 14A e 14B). No caso das células infectadas com o CA-NFAT1, nenhuma das colônias formadas era fluorescente e foram provavelmente formadas por células NIH3T3 não infectadas, indicando que além da falta de capacidade de transformar as células NIH3T3, o CA-NFAT1-C suprime a formação de colônias (Figura 14B, painéis inferiores). Esses dados corroboram as observações anteriores do ensaio de formação de *foci* onde a atividade sustentada do NFAT1-C não era capaz de induzir um fenótipo transformado da NIH3T3 e oposto ao das células expressando o CA-NFAT2-A, que prontamente mostravam sinais de transformação. Outra observação importante foi a de que nenhum *focus* ou colônia nas culturas expressando o CA-NFAT1-C apresentaram fluorescência para EGFP indicando que o NFAT1-C pode suprimir um fenótipo transformado.

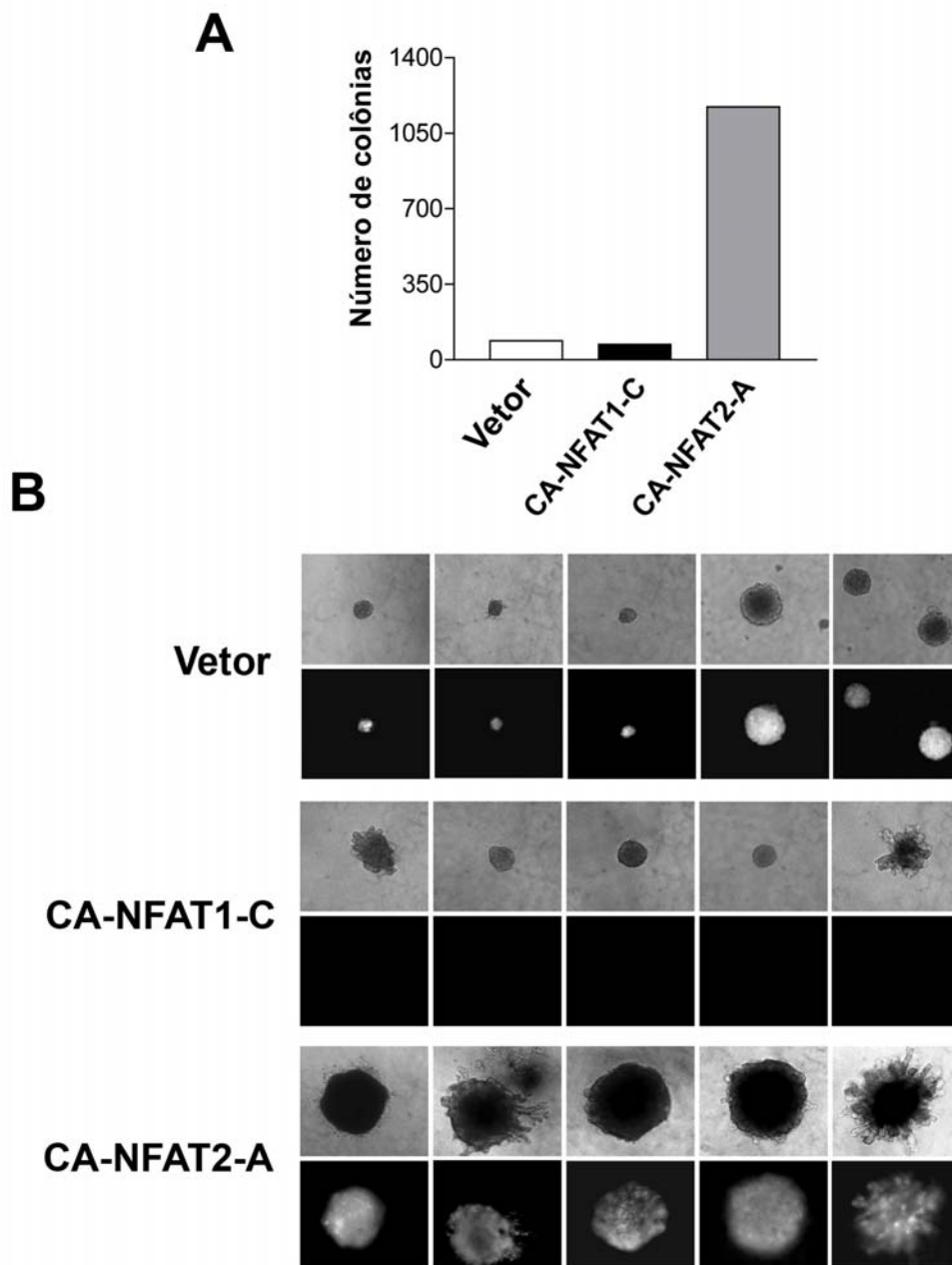


Figura 14: A expressão do CA-NFAT2-A é capaz de induzir o crescimento independente de ancoragem das células NIH3T3. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C ou CA-NFAT2-A. As células transduzidas com os vetores indicados foram crescidas em meio semi-sólido de agarose. As células NIH3T3 (5×10^3) foram plaqueadas e 30 dias depois foram analisadas. A) Quantificação por contagem das colônias. B) Microscopia de fase (painel superior) ou de fluorescência para a expressão de EGFP (painel inferior) de colônias representativas de A. Todos os resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

Para melhor analisar o efeito das proteínas NFAT na transformação celular da célula NIH3T3, foi testada a capacidade do CA-NFAT2-A de afetar a proliferação em condições reduzidas de soro, que é conhecida por ser capaz de induzir a parada do ciclo celular e a morte celular por apoptose, em fibroblastos normais. Quando cultivadas em meio de cultura contendo apenas 0,5% de soro fetal bovino (SFB), as células NIH3T3 controle apresentaram baixa taxa de proliferação quando acompanhadas por marcação por cristal violeta e incorporação de Timidina- H^3 (Figura 15A e 15B). Em contrapartida, as células NIH3T3 expressando CA-NFAT2-A demonstraram a capacidade de crescer em privação de soro durante toda a cinética de proliferação e em uma alta taxa de duplicação (Figura 15A e 15B).

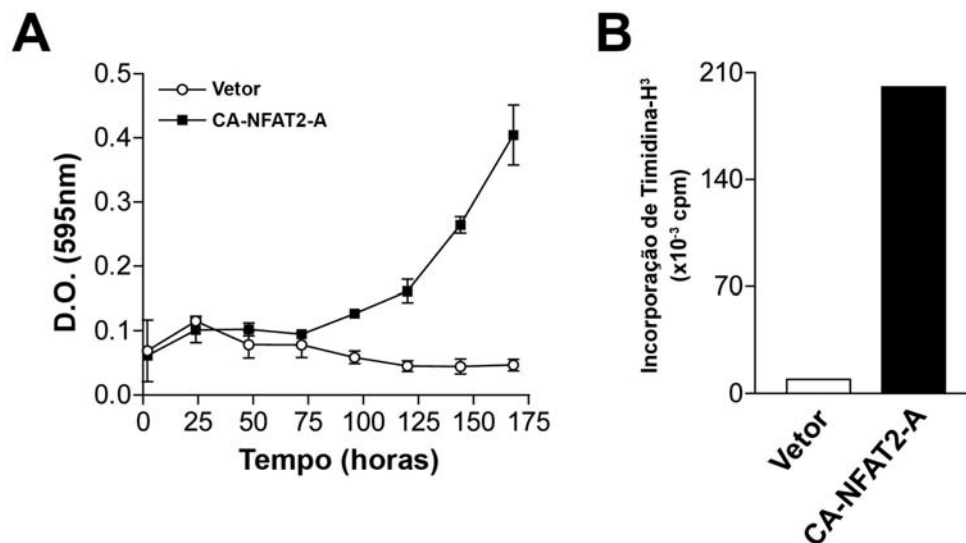


Figura 15: A atividade sustentada do NFAT2-A em células NIH3T3 promove a proliferação em condições reduzidas de soro. Células NIH3T3 selvagens foram infectadas com retrovírus contendo o vetor vazio ou o CA-NFAT2-A. As células foram cultivadas em confluência em condição reduzida de soro (0,5% v/v SFB). Células infectadas foram plaqueadas e a proliferação celular foi determinada por: A) incorporação de Cristal Violeta ou B) incorporação de timidina- H^3 144 horas após o plaqueamento. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. de triplicatas em um experimento representativo de pelo menos três repetições.

Além disso, a redução dos níveis de soro na cultura levou a uma acentuada parada na fase G_1 do ciclo celular das células NIH3T3 expressando o vetor vazio (Figura 16A) e essas células apresentaram uma grande quantidade de células entrando em apoptose quando analisado o conteúdo de DNA sub- G_0 (Figura 16B). Surpreendentemente, a expressão do CA-NFAT2-A nas células NIH3T3 foi capaz de induzir a entrada no ciclo celular, como mostrado por um moderado aumento nas fases S e G_2/M do ciclo celular (Figura 16A), e foi capaz de prevenir completamente a apoptose induzida por retirada de fator de crescimento (Figura 16B).

Como uma última confirmação do potencial de transformação do CA-NFAT2-A, foi testado se essa proteína era capaz de induzir a formação de tumor em camundongos nude atímicos. Para isso, células NIH3T3 expressando o vetor vazio ou a proteína CA-NFAT2-A foram inoculadas no flanco de camundongos nude BALB/c e os animais foram monitorados para a formação de tumor. Enquanto todos os camundongos inoculados com células expressando o CA-NFAT2-A apresentaram grandes tumores no flanco com um contínuo crescimento de seu volume ao longo do tempo, nenhum camundongo inoculado com as células expressando o vetor vazio apresentou tumores detectáveis, nem mesmo 70 dias após a inoculação (Figura 17A e 17B). Analisados em conjunto, esses dados claramente demonstram o potencial oncogênico e sugerem um papel único para o fator de transcrição NFAT2, onde a proteína NFAT1 parece ser incapaz de induzir um fenótipo transformado nas células NIH3T3.

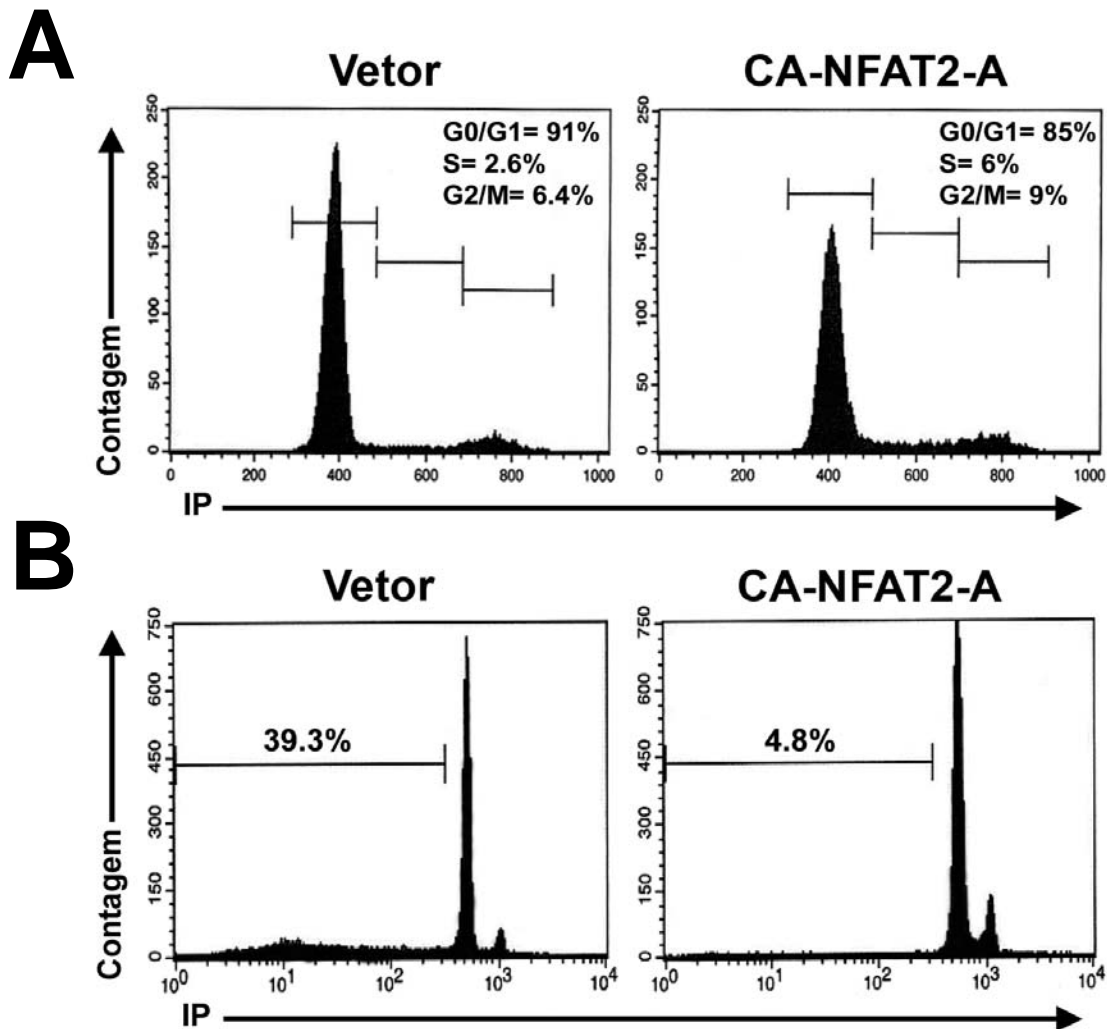


Figura 16: A atividade sustentada do NFAT2-A em células NIH3T3 induz a proliferação e previne a morte celular induzida por privação de soro. Células NIH3T3 selvagens foram infectadas com retrovírus contendo o vetor vazio ou o CA-NFAT2-A. As células foram cultivadas em confluência em condição reduzida de soro (0,5% v/v SFB). Células infectadas foram plaqueadas e a progressão através das fases do ciclo celular e a morte celular foram determinadas por: A) marcação por iodeto de propídeo 144 horas após o plaqueamento e análise das fases do ciclo como na Figura 11B; ou B) marcação por iodeto de propídeo 144 horas após o plaqueamento e análise da morte celular como na Figura 12A. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

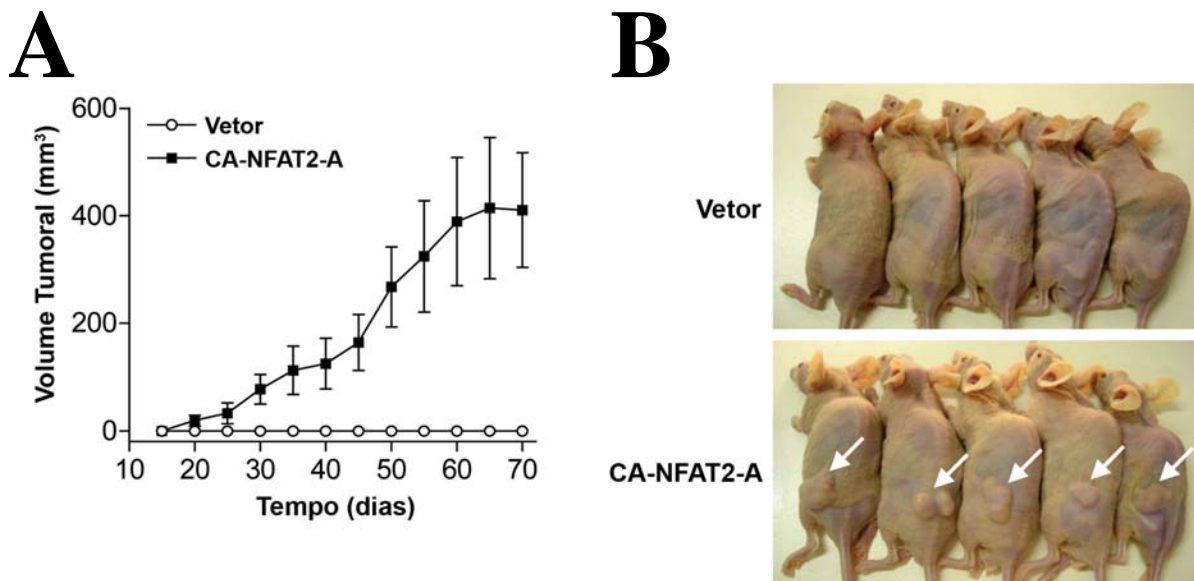


Figura 17: O CA-NFAT2-A é capaz de induzir a formação de tumores em camundongos imunodeficientes. Formação de tumor em camundongos BALB/c nude após injeção subcutânea de 5×10^5 células NIH3T3 infectadas com o vetor vazio (n=6) ou CA-NFAT2-A (n=7). Os volumes dos tumores foram medidos a cada 5 dias e os dados estão mostrados como a média \pm EPM (A). Tumores de cinco camundongos representativos estão indicados por setas brancas (B).

4.4. O NFAT2-A e NFAT2-A2 tem papéis diferentes na regulação da morte celular da célula NIH3T3

A família NFAT de fatores de transcrição é composta por cinco diferentes membros codificados em diferentes genes. Todos os membros da família NFAT possuem diversos variantes de *splicing* que variam principalmente na porção N-terminal e C-terminal de suas proteínas (Vihma *et al.*, 2008). O NFAT2 tem quatro isoformas diferentes denominadas A, B, C e D que variam principalmente em seu C-terminal (Northrop *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996; Chuvpilo *et al.*, 1999;

Vihma *et al.*, 2008). Variantes de *splicing* dessas isoformas foram descritas e consistem de um início de transcrição alternativo que troca o éxon 2 de 29 aminoácidos pelo éxon 1 de 42 aminoácidos (Chuvpilo *et al.*, 2000; Vihma *et al.*, 2008). O que torna interessante essa mudança do início de transcrição é que ela é exclusiva do gene do NFAT2 e é auto-regulada pelo próprio NFAT (Chuvpilo *et al.*, 2002). Portanto, em uma célula não ativa, onde o NFAT está restrito ao citoplasma, o NFAT2-A2, NFAT2-B, NFAT2-C e NFAT2-D que possuem o éxon 2 como N-terminal de suas proteínas são as isoformas de NFAT2 prevalentes expressas na célula (Figura 1). Após estímulo que induza a ativação do NFAT, ocorre a ativação do promotor responsivo a NFAT no gene do NFAT2 que leva à mudança do início de transcrição levando a expressão das isoformas que possuem o éxon 1 como o N-terminal da proteína e, por *splicing* alternativo, ocorre a exclusão do éxon 2 (Chuvpilo *et al.*, 2002). Portanto, através desse início de transcrição diferente são formadas proteínas NFAT2 que variam apenas nos 29 aminoácidos iniciais como no caso do NFAT2-A e NFAT2-A2 (Figura 18A). Para estudar um possível papel do N-terminal da proteína NFAT2 no controle da proliferação e morte celular, o cDNA do CA-NFAT2-A, CA-NFAT2-A2 e uma forma truncada do NFAT2 que não possui o primeiro éxon da proteína (CA-NFAT2- Δ N) foi clonado no vetor retroviral pLIREs-EGFP. Um alinhamento esquemático desses três cDNAs está representado na Figura 18A. Para confirmar que os vetores retrovirais estavam funcionando corretamente, células NIH3T3 foram transduzidas ou não com o vetor vazio, CA-NFAT2A, CA-NFAT2-A2 ou CA-NFAT2- Δ N e as proteínas dessas células foram analisadas

por *Western blot*. Como esperado, as células NIH3T3 não transduzidas ou infectadas com o vetor vazio não expressam quantidades detectáveis do NFAT2 (Figura 18B). Em contrapartida, os vetores retrovirais contendo o cDNA do CA-NFAT2A, CA-NFAT2-A2 ou CA-NFAT2- Δ N expressaram proteínas do tamanho esperado e em quantidades comparáveis (Figura 18B) possibilitando a análise de suas funções na célula NIH3T3.

Para analisar uma possível relevância dos diferentes inícios de transcrição que ocorre no gene do NFAT2, células NIH3T3 foram infectadas com o vetor vazio, CA-NFAT2-A ou CA-NFAT2-A2 e submetidas a um ensaio de cinética de proliferação acompanhada por cristal violeta. Como demonstrado anteriormente, enquanto as células NIH3T3 expressando o vetor vazio atingem a confluência e param de proliferar, as células infectadas com o CA-NFAT2-A foram capazes de proliferar acima da confluência (Figura 19A). Surpreendentemente, quando células NIH3T3 foram infectadas com o vetor contendo o CA-NFAT2-A2, elas reduziram em número e mantiveram uma baixa taxa de proliferação durante todo o experimento (Figura 19A). A cinética de proliferação das células expressando a proteína CA-NFAT2-A2 foi semelhante ao de células expressando o CA-NFAT1-C (Figura 19A) indicando que essa proteína poderia estar sendo capaz de induzir a apoptose na célula NIH3T3 como o CA-NFAT1-C.

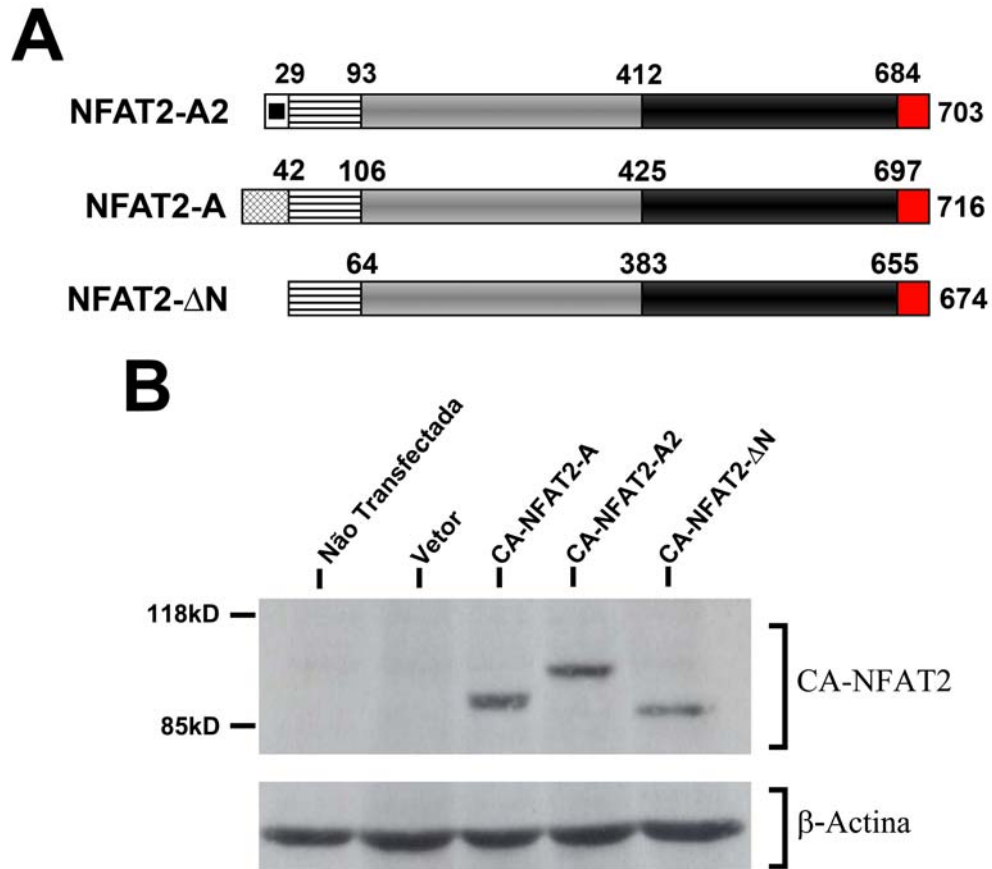


Figura 18: Os vetores retrovirais levam à expressão de níveis comparáveis e com peso molecular aparente esperado das proteínas CA-NFAT2 em células NIH3T3. A) Alinhamento esquemático das proteínas NFAT2 utilizadas para os experimentos das Figuras 18 a 23. A única diferença de sequência primária entre essas construções está no N-terminal das proteínas. B) Análise da expressão protéica das construções retrovirais contendo as variantes das proteínas CA-NFAT2. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovírus contendo o vetor vazio ou os cDNAs dos variantes de *splicing* do CA-NFAT2, como indicado na figura, e 48 horas depois as proteínas totais de 5×10^5 células foram extraída e o nível de expressão e peso molecular aparentes das proteínas NFAT foram determinados por análise de *Western blot*.

Para verificar essa hipótese, o conteúdo de DNA sub- G_0 foi analisado 72 horas após a transdução retroviral da célula NIH3T3. Células expressando o vetor vazio ou o CA-NFAT2-A apresentaram um baixo grau de fragmentação do DNA (Figura 19B). Contrariamente, células NIH3T3 expressando o CA-NFAT2-A2 demonstraram um alto grau de apoptose, onde em torno de 34% das células

estavam morrendo (Figura 19B). Esses dados sugerem um papel oposto para essas duas isoformas do NFAT2 no controle da morte celular.

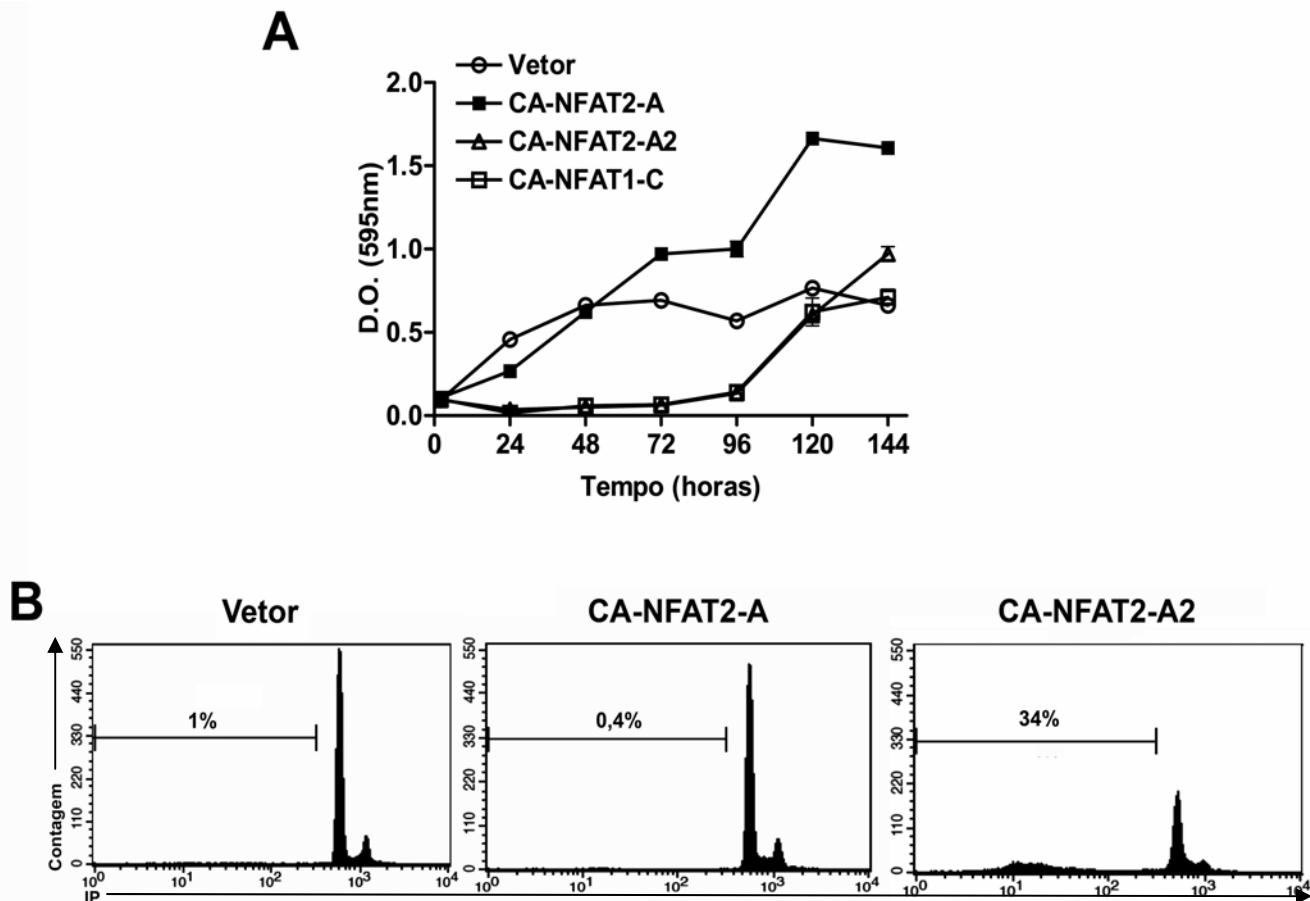


Figura 19: O variante de splicing CA-NFAT2-A2 é capaz de induzir uma redução da proliferação e indução da morte celular em células NIH3T3. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C, CA-NFAT2-A ou CA-NFAT2-A2, plaqueadas e analisadas para o crescimento e morte celular. A) Cinética de proliferação analisada por marcação por cristal violeta. D.O., densidade óptica. B) Análise de morte celular. As células foram plaqueadas em confluência e, 72 horas após a transdução, foram marcadas por iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo, como na Figura 12A. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. de triplicatas em um experimento representativo de pelo menos três repetições.

Como o CA-NFAT2-A foi capaz de induzir a transformação celular da NIH3T3, a próxima pergunta feita foi se o CA-NFAT2-A2 também seria capaz de induzir o fenótipo transformado nessas células. Enquanto a expressão do vetor vazio, na célula NIH3T3, não foi capaz de induzir a formação de *foci* em cultura e nem de induzir a formação de tumores em camundongos imunodeficientes, células expressando o CA-NFAT2-A prontamente formaram uma grande quantidade de *foci* e foram capazes de crescer e formar tumores de grande volume em camundongos BALB/c nude (Figura 20A, 20B e 20C). Surpreendentemente, a simples troca de 42 aminoácidos do N-terminal do NFAT2-A por 29 aminoácidos do N-terminal do NFAT2-A2 foi capaz de reduzir drasticamente o potencial de transformação da célula NIH3T3. Células NIH3T3 expressando o CA-NFAT2-A2 formaram apenas poucos *foci* em cultura e quando inoculadas em camundongos imunodeficientes, mostraram um taxa reduzida de crescimento tumoral quando comparado com as células expressando o CA-NFAT2-A (Figura 20A, 20B e 20C). Esses dados em conjunto sugerem que ambas as proteínas, CA-NFAT2-A e CA-NFAT2-A2, são capazes de induzir um fenótipo transformado na linhagem celular NIH3T3, mas diferentemente do NFAT2-A, o NFAT2-A2 é capaz de induzir uma intensa morte celular o que pode influenciar diretamente no processo de transformação celular.

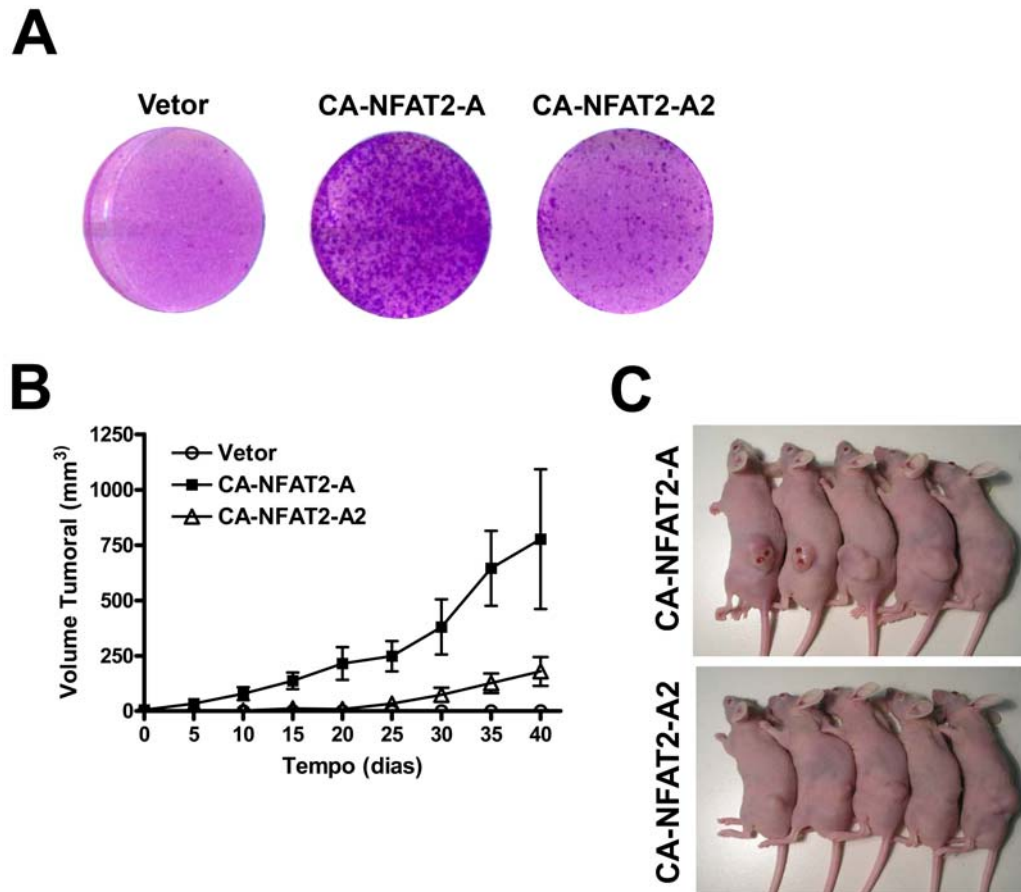


Figura 20: A isoforma NFAT2-A2 é capaz de induzir a transformação celular com menos intensidade em relação ao NFAT2-A. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovirus contendo o vetor vazio, CA-NFAT2-A ou CA-NFAT2-A2. A) As células transduzidas com os vetores indicados foram misturadas 1:5 com células NIH3T3 selvagens não infectadas e cultivadas por 15 dias após a confluência. A formação de *foci* foi analisada por marcação por Cristal Violeta. B- C) Formação de tumor em camundongos BALB/c nude após injeção subcutânea de 5×10^5 células NIH3T3 infectadas com o vetor vazio (n=5), CA-NFAT2-A (n=5) ou CA-NFAT2-A2 (n=5). Os volumes dos tumores foram medidos a cada 5 dias e os dados estão mostrados como a média \pm EPM (B). Tumores de cinco camundongos representativos estão indicados por *setas brancas* (C). Todos os resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

A análise da sequência primária da proteína NFAT2-A e NFAT2-A2 mostra claramente que a única diferença entre as duas proteínas são os seus primeiros 42 aminoácidos do domínio N-terminal de transativação do NFAT (TAD-N; Figura 18A). No intuito de avaliar a função desses aminoácidos na

proliferação e morte celular, foi construída uma proteína CA-NFAT2 que não possui, exatamente, a diferença entre essas duas variantes do NFAT2. Essa construção foi introduzida no vetor pLIREs-EGFP e foi denominada CA-NFAT2- Δ N (Figura 18A). Como observado anteriormente, células NIH3T3 expressando o CA-NFAT2-A foram capazes de proliferar acima da confluência quando comparados com as células controle (Figura 21A). Em contrapartida, células expressando o CA-NFAT2-A2 sofreram uma redução em número e proliferaram em uma baixa taxa durante todo o experimento (Figura 21A). Contrariamente, a expressão da proteína CA-NFAT2- Δ N, que não possui o N-terminal da proteína, foi capaz de induzir uma intensa proliferação celular, atingindo níveis comparáveis as células expressando o CA-NFAT2-A (Figura 21A). Além disso, enquanto a expressão do CA-NFAT2-A2 em células NIH3T3 induziu uma intensa morte celular, como mostrado pela marcação sub-G₀, isso não ocorreu com células expressando o vetor vazio, o CA-NFAT2-A e o CA-NFAT2- Δ N (Figura 22A). A morte celular induzida pelo CA-NFAT2-A2 aparentemente é por apoptose uma vez que é capaz de induzir a exposição de fosfatidilserina na membrana celular em períodos anteriores a fragmentação do DNA (Figura 22B). Em contrapartida, o vetor vazio, o CA-NFAT2-A ou o CA-NFAT2- Δ N não foram capazes de induzir a apoptose na célula NIH3T3 como mostrado por marcação por exposição de fosfatidilserina (Figura 22B). Esses dados em conjunto sugerem que o N-terminal da proteína NFAT2-A2 é capaz de regular a indução da morte celular programada por apoptose na linhagem celular NIH3T3 e que a

simples retirada desses 29 aminoácidos iniciais é capaz de reverter esse fenótipo.

A

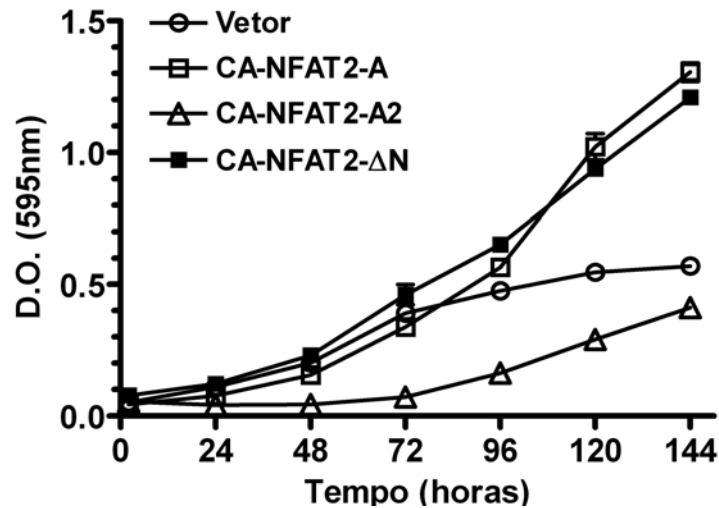


Figura 21: A ablação do N-terminal da proteína CA-NFAT2-A2 é capaz de reverter a supressão da proliferação. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT2-A, CA-NFAT2-A2 ou CA-NFAT2-ΔN, plaqueadas e analisadas para o crescimento celular. Cinética de proliferação analisada por marcação por cristal violeta. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. de triplicatas em um experimento representativo de pelo menos três repetições.

Por último, para verificar se a morte celular induzida pelo CA-NFAT2-A2 está influenciando negativamente a transformação da célula NIH3T3, foi analisada a capacidade da forma truncada CA-NFAT2-ΔN de induzir o fenótipo de transformação celular. Enquanto células NIH3T3 expressando o vetor vazio ou o CA-NFAT2-A2 formam apenas pequenos *foci* e em número reduzido, tanto o CA-NFAT2-A quanto o CA-NFAT2-ΔN levaram à formação de um grande número de *foci*, que tomaram toda a placa de cultura (Figura 23A). A única diferença na sequência primária entre o CA-NFAT2-A e o CA-NFAT2-A2 está restrita aos aminoácidos iniciais destas proteínas e a ablação dessa diferença

leva a um fenótipo acentuado de transformação celular. Portanto, esses dados sugerem que o N-terminal de 29 aminoácidos do NFAT2-A2 é importante para a indução da morte celular programada na linhagem celular NIH3T3 e que a retirada dessa região é capaz de levar à transformação celular em níveis comparáveis ao induzido pelo CA-NFAT2-A. Ainda mais, como o CA-NFAT2- Δ N se mostrou capaz de transformar a NIH3T3, aparentemente o N-terminal de 42 aminoácidos do NFAT2-A não exerce uma função importante no processo de transformação celular da célula NIH3T3.

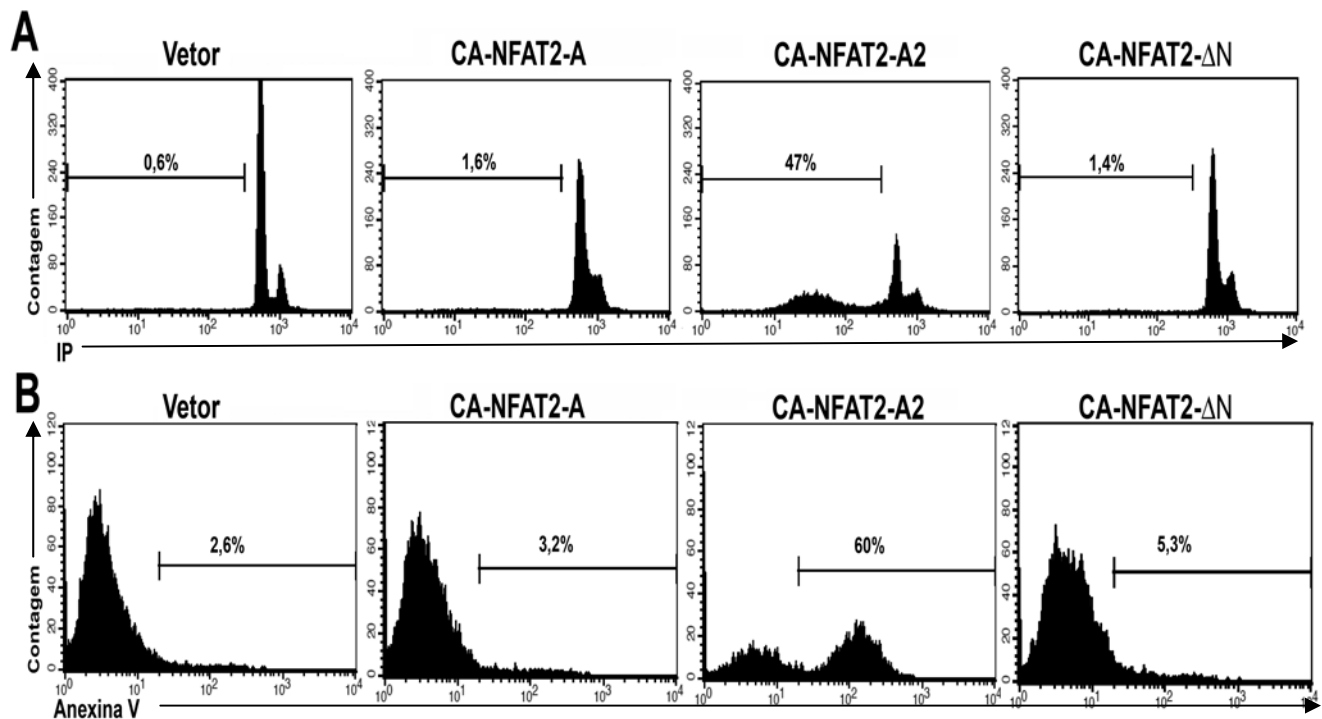


Figura 22: O N-terminal do CA-NFAT2-A2 é fundamental para a indução da morte celular em células NIH3T3. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C ou CA-NFAT2-A, plaqueadas e analisadas para morte celular. A) Análise de morte celular 72 horas após a transdução por marcação de iodeto de propídeo, como na Figura 12A. B) Análise de morte celular por exposição de fosfatidilserina, 48 horas após a transdução, como na Figura 12B. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

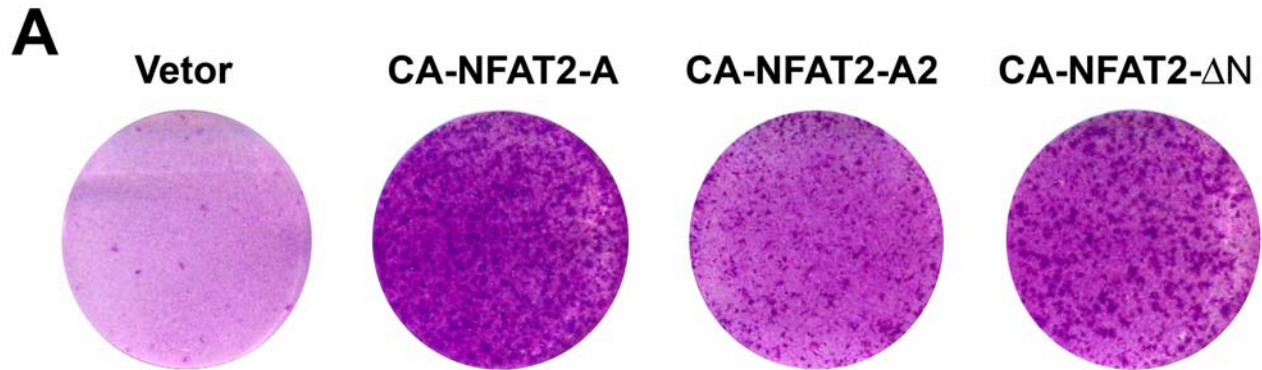


Figura 23: A ablação do N-terminal da proteína CA-NFAT2-A2 induz um aumento do potencial de transformação desta proteína. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovirus contendo o vetor vazio, CA-NFAT2-A, CA-NFAT2-A2 ou CA-NFAT2- Δ N. As células transduzidas com os vetores indicados foram misturadas 1:5 com células NIH3T3 selvagens não infectadas e cultivadas por 15 dias após a confluência. A formação de *foci* foi analisada por marcação por cristal violeta. Todos os resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

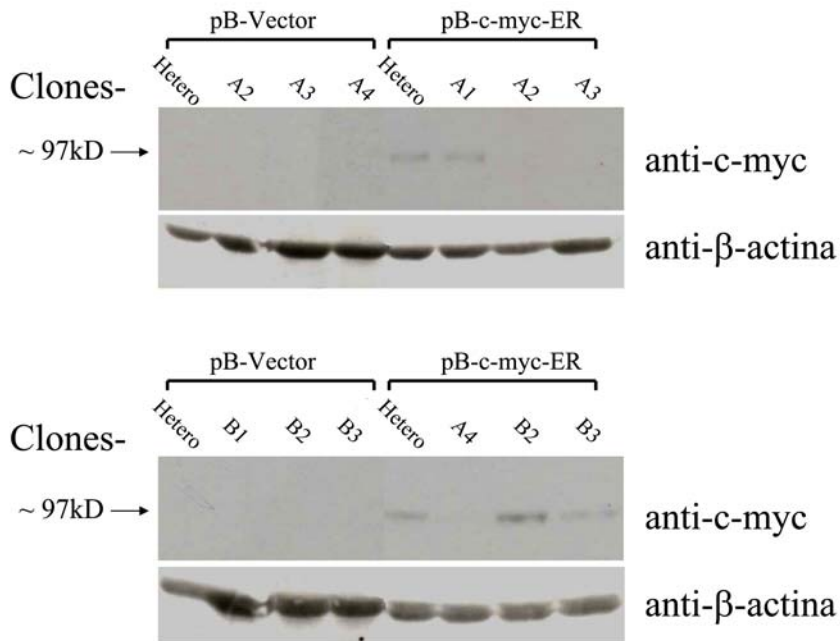
4.5. O CA-NFAT1-C demonstra a capacidade de agir como um supressor de tumor

Nosso grupo de pesquisa mostrou anteriormente que linfócitos de camundongos deficientes para a proteína NFAT1 apresentam um fenótipo hiperproliferativo que se correlaciona com uma expressão aumentada das ciclinas A2, B1, E e F (Caetano *et al.*, 2002). Ranger e colaboradores também demonstraram que esses camundongos apresentam uma maior propensão a desenvolver transformações neoplásicas de cartilagem (Ranger *et al.*, 2000). Esses dados sugerem que o NFAT1 pode ser um regulador negativo da proliferação e transformação celular, o que correlaciona com os resultados obtidos nas células NIH3T3. Para testar diretamente se o NFAT1 tem a

capacidade de suprimir o crescimento celular e de reverter um fenótipo celular transformado foram construídos clones de células NIH3T3 carregando conhecidos oncogenes no intuito de criar uma linhagem celular transformada. Para tanto, células NIH3T3 foram infectadas com os vetores retrovirais contendo o cDNA do *c-myc* (pBabe-*c-myc*-ER) ou da forma constitutivamente ativa do *H-ras* (pBabe-*H-ras*V12). A proteína *c-myc*, no contexto desse vetor se encontra em fusão com o receptor de estrógeno (ER) e só se torna capaz de translocar para o núcleo e exercer sua função na presença da droga tamoxifeno (Littlewood *et al.*, 1995). As células infectadas com os vetores contendo o *c-myc*-ER ou o *H-ras*V12 foram selecionadas por 14 dias com antibiótico, expandidas e posteriormente, clones foram isolados. No total, seis clones de células transduzidas com o pBabe-*c-myc*-ER e sete com o pBabe-*H-ras*V12 foram isolados e a expressão de suas proteínas exógenas foi analisada por Western blot (Figura 24A e 24B). Enquanto as células NIH3T3 transfectadas com o vetor pBabe vazio (pB-Vetor) ou a NIH3T3 selvagem não apresentaram expressão detectável de proteínas *c-myc* ou de *H-ras* nessa exposição, as culturas heterogêneas (não clonais) de NIH3T3 infectadas com os vetores contendo os oncogenes, apresentaram expressão das proteínas nos tamanhos esperados (Figura 24A e 24B). O peso molecular aparente esperado para a proteína H-Ras é de ~21 kD e para a proteína *c-myc* de ~67 kD, contudo, devido a fusão do *c-myc* com o ER, o peso molecular aparente esperado é de ~95 kD. Após a seleção clonal dessas células, todos os clones infectados com o pBabe-*H-ras*V12 apresentaram expressão da proteína *H-ras* e apenas três clones

infectados com o vetor pBabe-*c-myc*-ER apresentaram expressão da proteína *c-myc*-ER (Figura 24A e 24B).

A



B

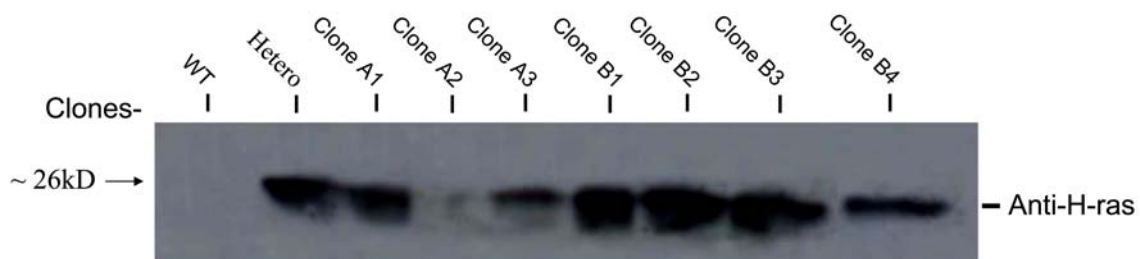


Figura 24: Construção das células NIH3T3 expressando os conhecidos oncogenes *c-myc* e *H-rasV12*. Células NIH3T3 foram infectadas com os vetores pBabe-Vector (vetor vazio), pBabe-*c-myc*-ER ou pBabe-*H-rasV12* e selecionadas por 14 dias com o antibiótico puromicina. Posteriormente, essas células foram isoladas e expandidas para formar clones. A) *Western blot* mostrando a expressão da proteína *c-myc*-ER em clones das células NIH3T3. B) *Western blot* mostrando a expressão da proteína *H-rasV12* em clones das células NIH3T3. O peso molecular está indicado (esquerda).

Para testar se a expressão do oncogene c-myc estava sendo capaz de induzir um dos primeiros sinais de transformação celular na NIH3T3 realizou-se um ensaio de formação de *foci* em cultura. Para esse ensaio utilizamos o clone A2 de NIH3T3 que carrega o vetor vazio (controle) e o clone B2 da NIH3T3-c-myc-ER que é o clone que demonstrou a maior expressão da proteína c-myc-ER por *Western blot* (Figura 24A). Quando essas células foram cultivadas em conjunto com células NIH3T3 selvagens na ausência de tamoxifeno, apenas poucos *foci* se formaram apresentando tamanhos reduzidos, como o esperado (Figura 25A). Contudo, tanto o clone expressando o vetor vazio quanto o clone expressando o c-myc-ER, também não foram capazes de formar *foci* em cultura, mesmo na presença de tamoxifeno (Figura 25A). Esse dado sugere que a proteína c-myc-ER não está sendo capaz de induzir a transformação celular da célula NIH3T3. Em contrapartida, quando testado o clone A1 da célula NIH3T3 expressando o oncogene H-rasV12 para sua capacidade de formação de *foci*, essa célula formou prontamente uma grande quantidade de *foci* quando comparada com células NIH3T3 selvagens (Figura 25B). Isso sugere que a proteína H-rasV12 pode ser capaz de transformar essa linhagem celular.

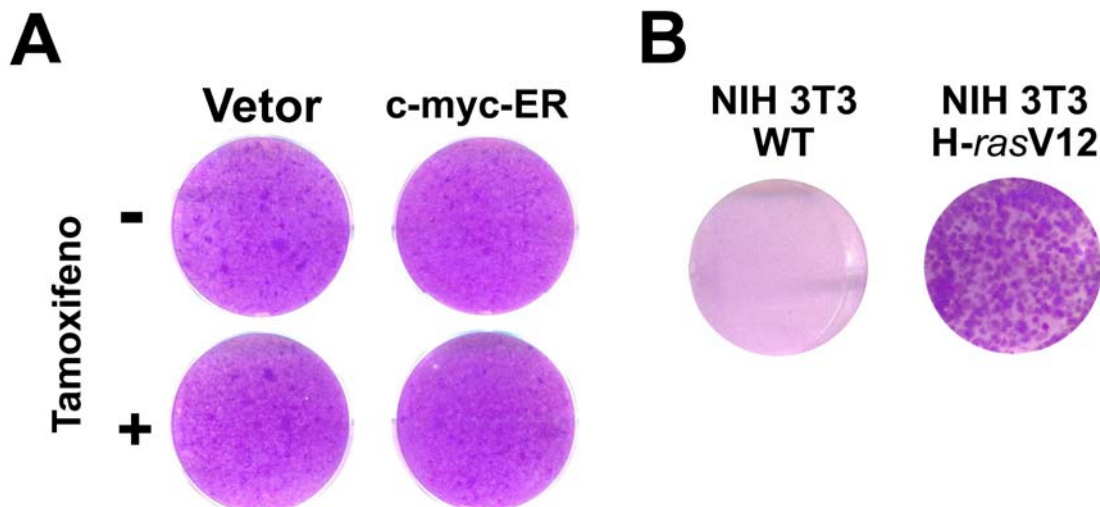


Figura 25: A proteína H-rasV12, mas não o c-myc é capaz de induzir o primeiro fenótipo de transformação celular em células NIH3T3. Clones de células NIH3T3 expressando o vetor vazio (clone A2) ou as proteína c-myc-ER (clone B2) e H-rasV12 (clone A1) foram misturadas 1:5 com células NIH3T3 selvagens e cultivadas por 15 dias. A formação de *foci* foi analisada por marcação por Cristal Violeta. A) Formação de *foci* de clone expressando o vetor vazio ou o c-myc-ER, com ou sem a adição de tamoxifeno (100nM) como indicado. B) Formação de *foci* de clone expressando a proteína H-rasV12. Todos os resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

Para testar se a proteína H-rasV12 também era capaz de induzir outras características de uma célula transformada, analisou-se o perfil de proliferação da NIH3T3-H-rasV12 (NIH3T3 clone A1 que carrega o vetor pBabe-H-rasV12). Em um ensaio de cinética de proliferação, como esperado, as células NIH3T3 selvagens foram capazes de proliferar nos primeiros dias do experimento, mas ao atingir a confluência essas células pararam de proliferar (Figura 26A). Contrariamente, o clone A1 da NIH3T3-H-rasV12 foi capaz de proliferar durante todo o experimento, mesmo após atingir a confluência (Figura 26A) sugerindo que a proteína H-rasV12 está sendo capaz de reduzir a sensibilidade a sinais anti-proliferativos da célula NIH3T3. Corroborando esses dados, células NIH3T3-H-rasV12 demonstraram uma maior população de células entrando no processo

de ciclo celular, onde cerca de um terço a mais de células estão entrando na fase de síntese (fase S) quando comparadas com células selvagens (Figura 26B).

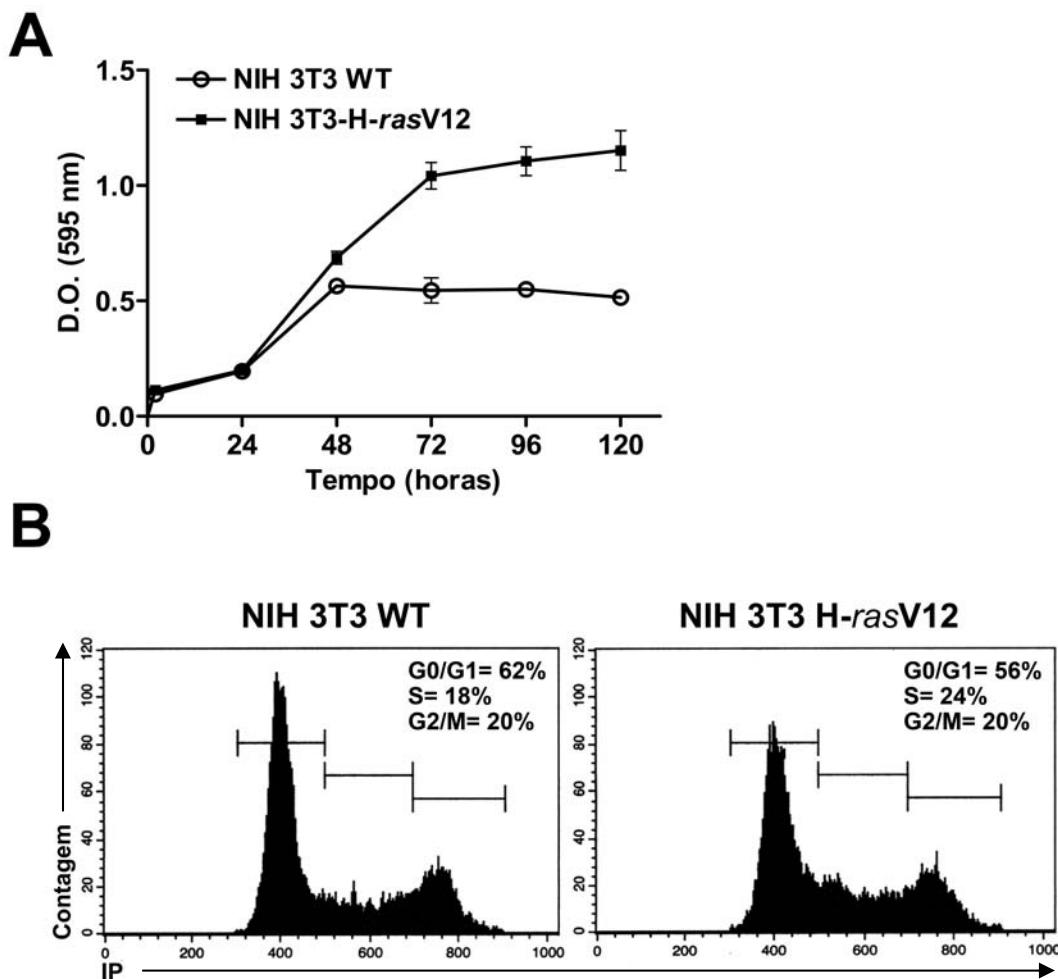


Figura 26: Células que expressam a proteína H-rasV12 superproliferam e apresentam um aumento na entrada do ciclo celular. Células NIH3T3 selvagens ou NIH3T3-H-rasV12 (clone A1) foram plaqueadas e a proliferação e ciclo celular foram analisados. As células foram analisadas para, A) proliferação por marcação por Cristal Violeta ou B) para o ciclo celular por marcação por iodeto de propídeo 24 horas após o plaqueamento. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. de triplicatas em um experimento representativo de pelo menos três repetições.

No intuito de analisar a capacidade da proteína H-rasV12 de induzir o crescimento independente de ancoragem, células NIH3T3 selvagens e NIH3T3-

H-*ras*V12 foram plaqueadas em meio semi-sólido. Enquanto as células NIH3T3 selvagens formaram apenas pequenas colônias, formadas por poucas células e em baixo número, células transformadas com a proteína H-*ras*V12 foram capazes de formar colônias muito grandes e em grande quantidade (Figura 27A e 27B). Esses dados em conjunto sugerem que as células NIH3T3-H-*ras*V12 foram realmente transformadas pelo oncogene H-*ras*V12 tornando-as um ótimo modelo de célula transformada para a análise do potencial de supressão de tumor da proteína CA-NFAT1-C.

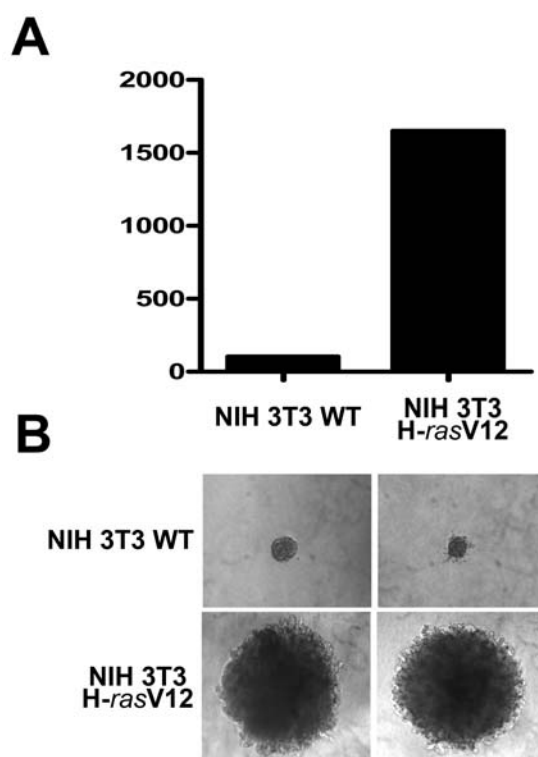


Figura 27: A expressão de H-*ras*V12 nas células NIH3T3 é capaz de induzir o crescimento independente de ancoragem. Células NIH3T3 selvagens ou NIH3T3-H-*ras*V12 (clone A1) foram utilizadas para o experimento. As células (1×10^3) foram crescidas em meio semi-sólido de agarose por 15 dias e depois analisadas. A) Quantificação por contagem das colônias. B) Microscopia de contraste de fase de colônias representativas de A. Todos os resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes

Subsequentemente, foi testado se o CA-NFAT1-C era capaz de suprimir essas características transformadas do clone NIH3T3-H-*ras*V12. Como mostrado na Figura 28A, células NIH3T3-H-*ras*V12 e NIH3T3-H-*ras*V12 infectadas com o vetor vazio crescem de forma similar, mas notavelmente, a infecção com o CA-NFAT1-C foi capaz de reduzir o crescimento celular das células transformadas NIH3T3-H-*ras*V12 durante todo o tempo da cinética de proliferação.

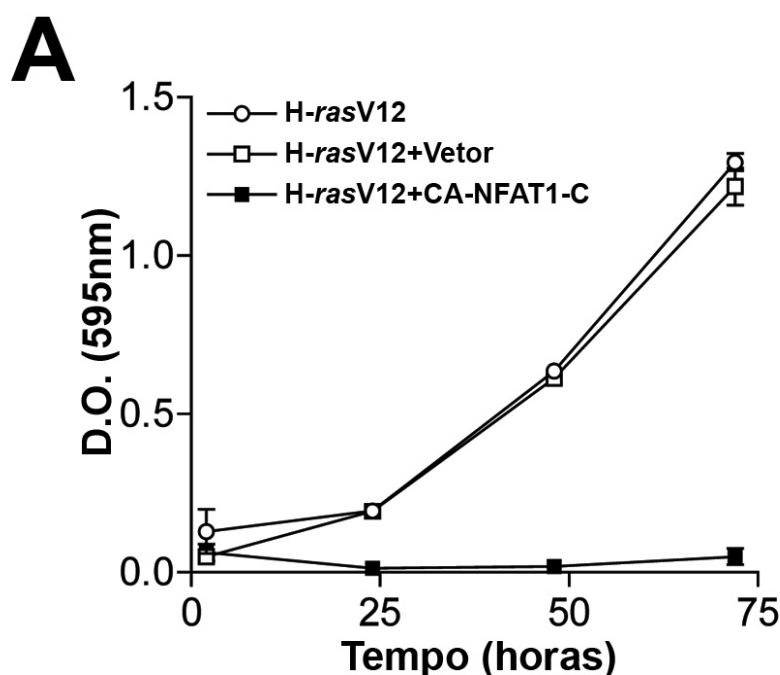


Figura 28: O CA-NFAT1-C suprime a proliferação celular de células neoplásicas. Células NIH3T3-H-*ras*V12 não infectadas ou infectadas com os retrovírus portando o vetor vazio ou o CA-NFAT1-C foram plaqueadas e a proliferação celular foi analisada por marcação por Cristal Violeta. Os resultados foram analisados como na Figura 10B. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. de triplicatas em um experimento representativo de pelo menos três repetições.

Essa redução do crescimento foi acompanhada por uma grande redução da duplicação de DNA, onde células NIH3T3-H-*ras*V12 expressando a proteína

CA-NFAT1-C demonstraram uma dramática queda na incorporação de timidina- H^3 , quando comparado com as células controle (Figura 29A). Além disso, enquanto células NIH3T3-H-*ras*V12 selvagens ou infectadas com o vetor vazio apresentaram uma distribuição característica de células proliferando ativamente, células NIH3T3-H-*ras*V12 expressando a proteína CA-NFAT1-C apresentaram um acúmulo na fase G₁ do ciclo celular (Figura 29B). Esses dados sugerem que a via de sinalização regulada pelo NFAT1-C pode influenciar negativamente o processo de ciclo celular, mesmo de células transformadas com um potente oncogene, como a proteína H-*ras*V12.

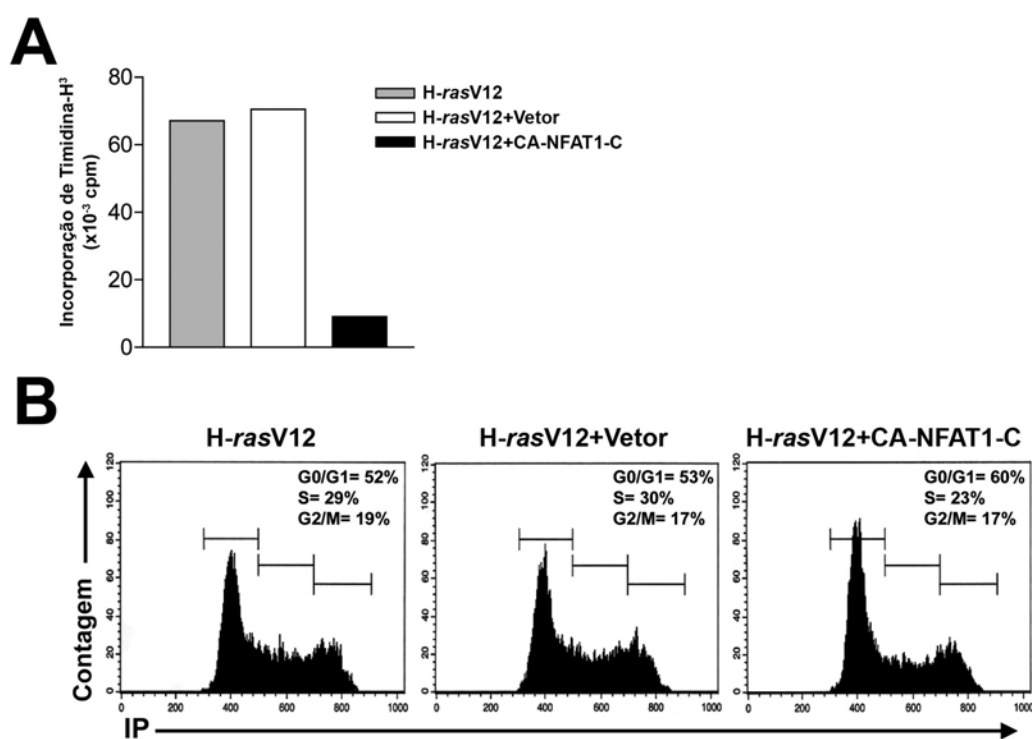


Figura 29: O CA-NFAT1-C suprime o ciclo celular de células neoplásicas. Células NIH3T3-H-*ras*V12 não infectadas ou infectadas com os retrovírus portando o vetor vazio ou o CA-NFAT1-C foram plaqueadas e analisadas como na Figuras 11A e 11B. As células foram analisadas para, A) divisão celular por incorporação de timidina H^3 , em culturas não confluentes, 48 horas após o plaqueamento e B) para ciclo celular por marcação de iodeto de propídeo, em culturas não confluentes, 48 horas após o plaqueamento. Todos os resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

Foi observado nos resultados anteriores que a expressão da proteína CA-NFAT1-C nas células NIH3T3 selvagens era capaz de induzir a morte celular por apoptose (Figura 12A e 12B) e que a expressão dessa proteína nas células NIH3T3-H-*rasV12* foi aparentemente capaz de reduzir o número de células em cultura (Figura 28A). Portanto, para avaliar a capacidade do CA-NFAT1-C de a induzir morte celular nas células NIH3T3-H-*rasV12* transformadas foi realizado um ensaio de morte celular acompanhado por marcação por iodeto de propídeo e análise do conteúdo de DNA sub-G₀. Enquanto células NIH3T3-H-*rasV12* infectadas ou não com o vetor vazio apresentaram baixa taxa de morte celular, a expressão da proteína CA-NFAT1-C foi capaz de induzir uma intensa morte celular nessas células transformadas (Figura 30A).

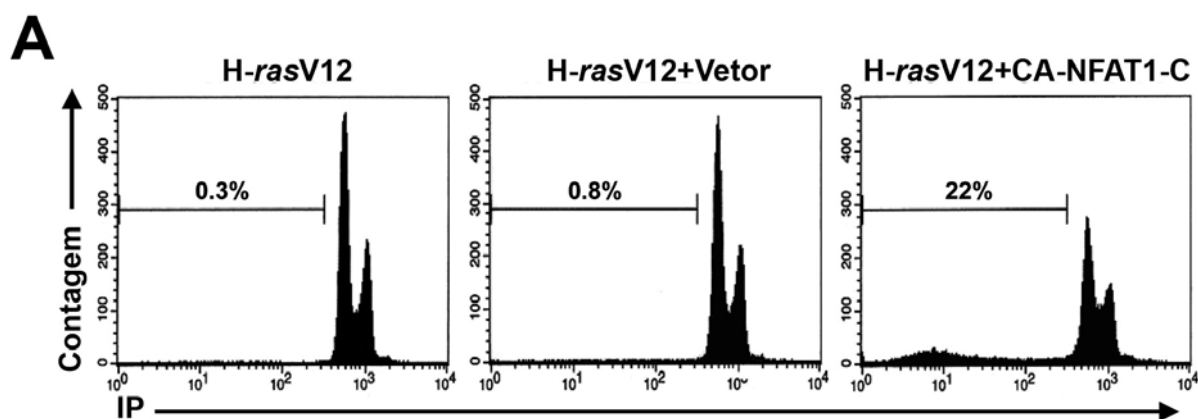


Figura 30: A via de sinalização induzida pelo NFAT1-C leva a morte celular de células NIH3T3 transformadas pelo H-*rasV12*. Células NIH3T3-H-*rasV12* não infectadas ou infectadas com os retrovírus portando o vetor vazio ou o CA-NFAT1-C foram plaqueadas e analisadas como na Figura 12A. A morte celular foi analisada 72 horas após a transdução. Todos os resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

Os dados até aqui reportados demonstram que a atividade sustentada do NFAT1 reduz o ciclo celular e induz apoptose nas células transformadas NIH3T3-H-*rasV12* o que culmina na redução do número de células em cultura. A

próxima pergunta foi se essas características do CA-NFAT1-C também poderiam levar a reversão de outros marcadores da transformação celular. De fato, a expressão do CA-NFAT1-C nas células NIH3T3-H-*ras*V12 foi claramente capaz de reduzir o número de *foci* formados em cultura quando comparado com células NIH3T3-H-*ras*V12 transduzidas ou não com o vetor vazio que prontamente formam uma grande quantidade de *foci* (Figura 31A). Além disso, os *foci* formados nas culturas de células infectadas com o CA-NFAT1-C eram todas negativas para EGFP quando analisadas por microscopia de fluorescência, indicando que eles foram formados por células não transduzidas (Figura 31A, painel inferior). Em contrapartida a maior parte dos *foci* formados pelas NIH3T3-H-*ras*V12 infectadas com o vetor vazio apresentavam fluorescência para o EGFP (Figura 31A, painel inferior).

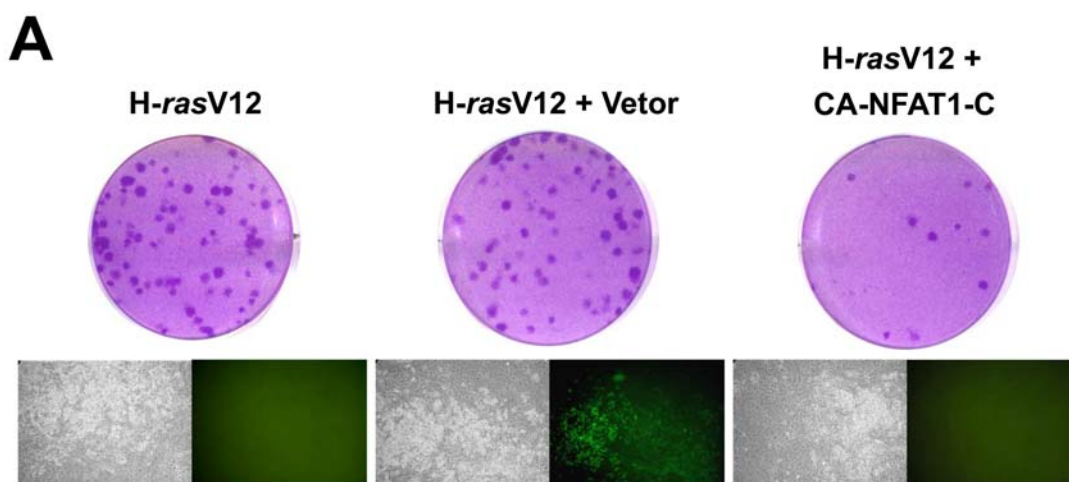


Figura 31: A proteína CA-NFAT1-C é capaz de reduzir a formação de *foci* em cultura de células transformadas. Células NIH3T3-H-*ras*V12 foram infectadas com retrovírus portando o vetor vazio ou o CA-NFAT1-C. Células NIH3T3-H-*ras*V12 transduzidas com as construções indicadas foram misturadas 1:500 com células NIH3T3 selvagens e cultivadas por 15 dias após a confluência. A formação de *foci* foi acessada pela marcação por Cristal Violeta (painel superior) e *foci* representativos foram analisados por microscopia de fase ou de fluorescência para a expressão de EGFP (painel inferior). Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Além disso, células NIH3T3-H-*rasV12* selvagens ou expressando o vetor vazio foram capazes de formar uma grande número de colônias em meio semi-sólido e essas colônias eram formadas por uma grande quantidade de células (Figura 32A e 32B). Como o esperado, o mesmo pode ser visto para as células NIH3T3-H-*rasV12* infectadas com o CA-NFAT2-A, mostrando que essa proteína não é capaz de reverter a transformação celular (Figura 32A e 32B). Surpreendentemente, quando as células NIH3T3-H-*rasV12* foram infectadas com o vetor contendo o CA-NFAT1-C, essas células formaram apenas um baixo número de colônias que eram constituídas de poucas células (Figura 32A e 32B). Quando a expressão de EGFP foi analisada, quase todas as colônias das células expressando o vetor vazio ou o CA-NFAT2-A eram fluorescentes, o que foi visto apenas em colônias muito pequenas nas culturas transduzidas com o CA-NFAT1-C (Figura 32B, painéis inferiores).

Analisados em conjunto, esses dados indicam que quando o CA-NFAT1-C é expresso nas células NIH3T3-H-*rasV12*, essas células não são mais capazes de formar *foci* em cultura e reduzem dramaticamente o número e o tamanho de colônias formadas na ausência de substrato sólido. Além disso, quando células NIH3T3-H-*rasV12* infectadas ou não com o vetor vazio foram inoculadas no flanco de camundongos BALB/c nude, elas prontamente formaram tumores de elevado tamanho que apresentaram crescimento constante de seu volume ao longo do tempo (Figura 33A e 33B). Apesar do forte fenótipo transformado induzido pelo oncogene H-*rasV12* nas células NIH3T3, a sinalização constante do CA-NFAT1-C foi claramente capaz de reduzir o

tamanho dos tumores em camundongos atímicos (Figura 33A e 33B), sugerindo fortemente que o NFAT1 pode funcionar como um gene supressor de tumor.

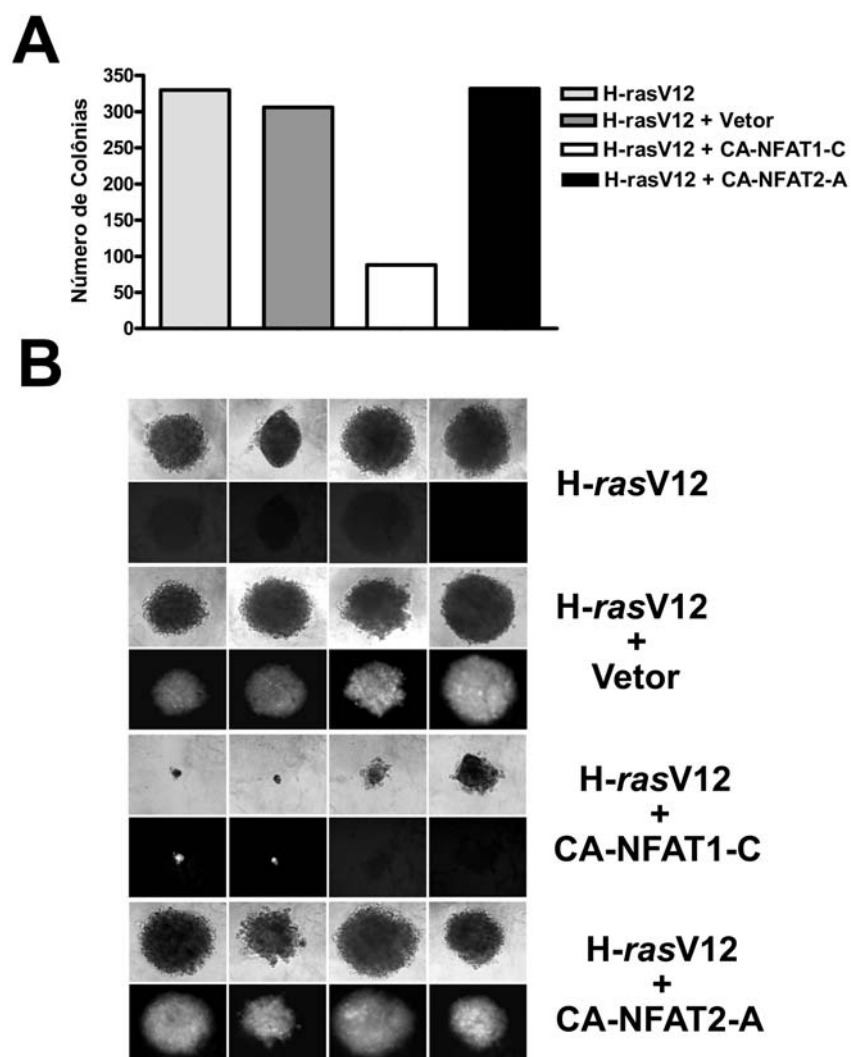


Figura 32: O CA-NFAT1-C, mas não o CA-NFAT2-A é capaz de impedir o crescimento independente de ancoragem de células transformadas. Células NIH3T3-H-*rasV12* foram infectadas com retrovírus portando o vetor vazio, o CA-NFAT1-C ou o CA-NFAT2-A. Células NIH3T3-H-*rasV12* (1×10^3) transduzidas com as construções indicadas foram plaqueadas em meio semi-sólido e analisadas 14 dias depois. A) Quantificação de colônia de células transformadas. B) Microscopia de contraste defase (painel superior) ou de fluorescência para a expressão de EGFP (painel inferior) de colônias representativas de A. Esses resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

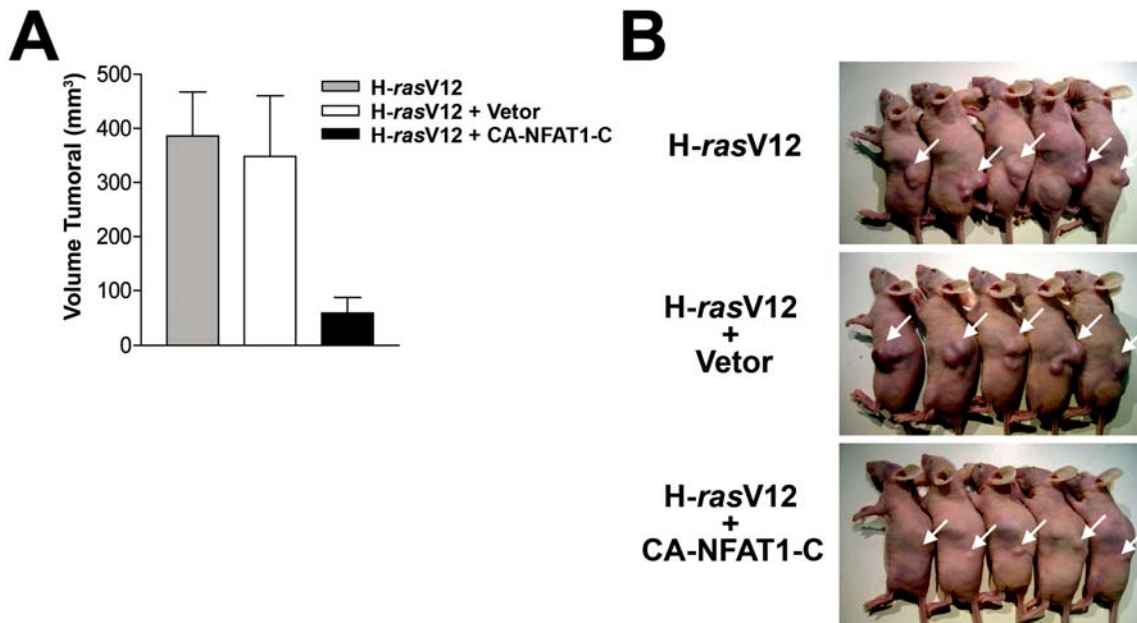


Figura 33: O CA-NFAT1-C age como um gene supressor de tumor. Células NIH3T3-H-*rasV12* foram infectadas com retrovírus portando o vetor vazio ou o CA-NFAT1-C. Formação de tumor após injeção subcutânea de 3×10^5 células expressando NIH3T3-H-*rasV12* (n=7), NIH3T3-H-*rasV12* vetor vazio (n=7) ou NIH3T3-H-*rasV12*-CA-NFAT1-C (n=5). A) Volume tumoral 15 dias após a injeção. Os dados estão mostrados como média \pm SEM. B) Tumores de cinco camundongos representativos estão indicados por setas brancas.

4.6. O domínio TAD-C do NFAT1 é responsável pelo fenótipo supressor de tumor

Os dados anteriormente demonstrados nesse trabalho sugerem dois papéis diferentes para os fatores de transcrição NFAT1 e NFAT2. Enquanto o NFAT2-A constitutivamente ativo age como um oncogene, sendo capaz de transformar a célula NIH3T3, o NFAT1 age como um repressor da proliferação e indutor da morte celular programada, além de ser capaz de subverter o fenótipo transformado da célula NIH3T3-H-*rasV12*, sugerindo o papel supressor de

tumor. A análise esquemática da sequência primária alinhada dos cDNA do NFAT1-C e NFAT2-A está representada na Figura 32A. Como pode ser prontamente notado, o NFAT1 tem um longo domínio TAD C-terminal que está presente em diversos outros membros da família NFAT, com algumas variações em suas sequências primárias, mas que está completamente ausente no NFAT2-A devido a um sítio poli A downstream do éxon 9 (Figura 1; Chuvipilo *et al.*, 1999). A próxima questão levantada foi se o domínio C-terminal do NFAT1-C poderia ser o responsável pelas diferenças observadas entre as proteínas NFAT1-C e o NFAT2-A. Para responder essa pergunta foi construída uma proteína NFAT1-C truncada logo após do domínio RHR, que não possui o C-terminal longo (NFAT1- Δ C), que se assemelha ao C-terminal curto do NFAT2-A (Figura 34A). Surpreendentemente, em uma cinética de proliferação celular as células NIH3T3 expressando o CA-NFAT1 Δ C mostraram um fenótipo completamente diferente do que as células NIH3T3 expressando a proteína completa CA-NFAT1-C (Figura 34B). Enquanto o CA-NFAT1-C induziu uma redução do crescimento celular quando comparado com as células controle, às células expressando o CA-NFAT1- Δ C demonstraram a capacidade de proliferar acima da confluência quase atingindo o nível de proliferação do CA-NFAT2-A (Figura 34B).

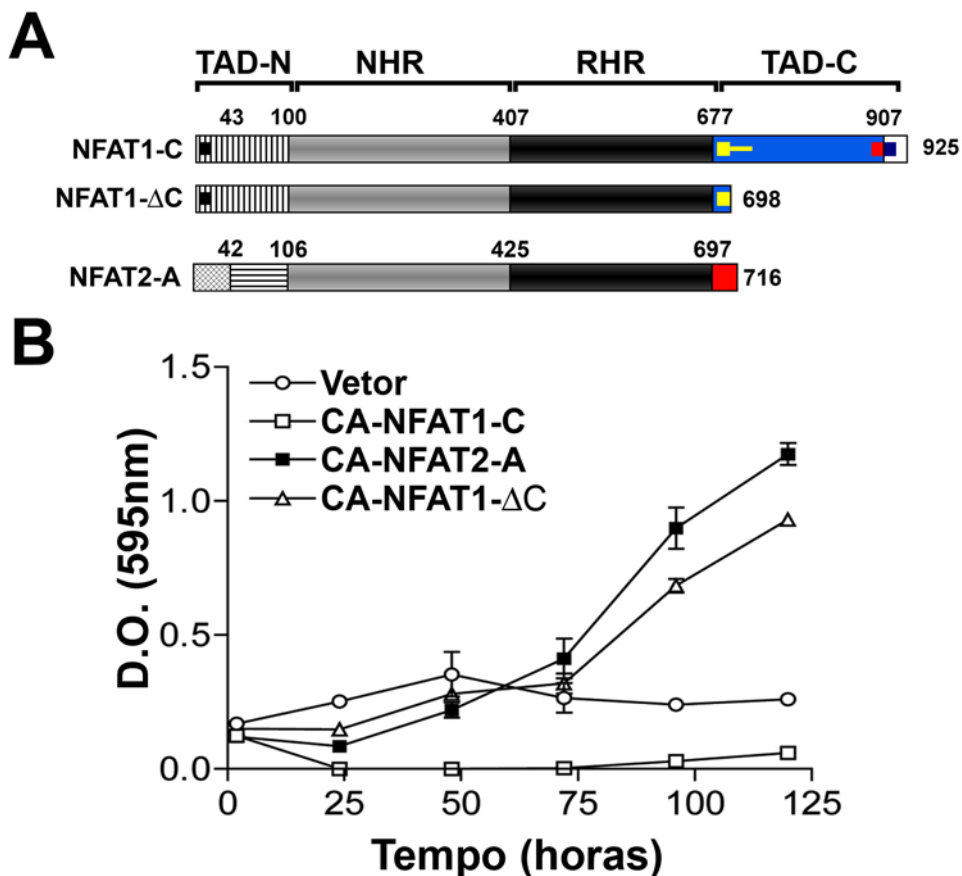


Figura 34: A ablação do C-terminal longo do CA-NFAT1-C induz um aumento da proliferação celular. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C, CA-NFAT2-A ou CA-NFAT1-ΔC, plaqueadas e analisadas para o crescimento celular. A) Alinhamento esquemático das proteínas NFAT utilizadas para os experimentos das Figuras 34B a 40. B) Cinética de proliferação analisada por marcação por cristal violeta. Os resultados estão expressos como média \pm D.P. de triplicatas em um experimento representativo de pelo menos três repetições.

Corroborando esse dado, em uma cultura não confluyente de NIH3T3, a expressão de CA-NFAT1-C foi capaz de induzir uma leve parada do ciclo celular e um grau significativo de apoptose como mostrado pelo aumento da fase G₁ do ciclo celular e pelo conteúdo de DNA sub-G₀ quando comparado com as células controle, respectivamente (Figura 35A e 35B). Contrariamente, a ablação do C-terminal do NFAT1-C (CA-NFAT1-ΔC) foi suficiente para abolir completamente

esse fenótipo e de induzir um fenótipo parecido ao do CA-NFAT2-A (Figura 35A e 35B). Juntos, esses dados demonstram que a habilidade da proteína CA-NFAT1-C de induzir a apoptose e a parada do ciclo celular na célula NIH3T3 é, pelo menos parcialmente, dependente do seu domínio TAD C-terminal.

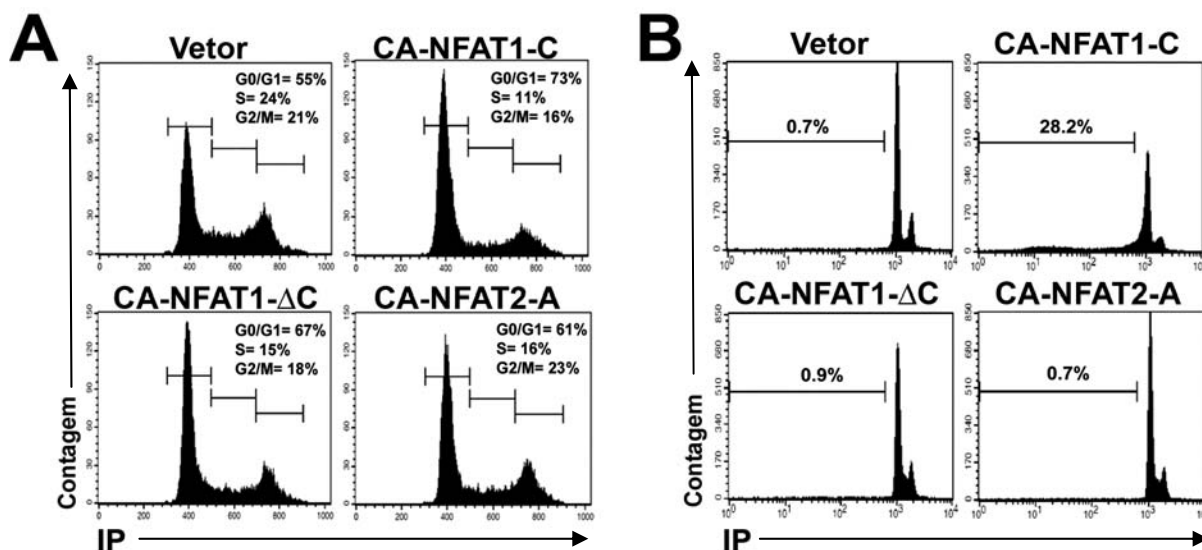


Figura 35: A ablação do C-terminal longo do CA-NFAT1-C abole a capacidade de induzir a parada do ciclo celular e apoptose. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C, CA-NFAT2-A ou CA-NFAT1-ΔC, plaqueadas e analisadas para o ciclo e morte celular. A) Análise do ciclo celular, como na Figura 11B. B) Análise da morte celular como na Figura 12A. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Como o CA-NFAT1-ΔC foi capaz de induzir uma proliferação acima da confluência indicando a perda de inibição por contato e demonstrou características semelhantes de células expressando o CA-NFAT2-A, a próxima pergunta foi se essa proteína também era capaz de induzir outros fenótipos de transformação. Como mostrado na Figura 36A, enquanto a NIH3T3 expressando o vetor vazio ou o CA-NFAT1-C formaram apenas pequenos *foci* e em baixa quantidade, a expressão do CA-NFAT1-ΔC foi capaz de induzir a formação de

foci em cultura. Contudo, a proteína truncada CA-NFAT1- Δ C claramente induziu a formação de *foci* menores quando comparado com os de células expressando o CA-NFAT2-A (Figura 36A).

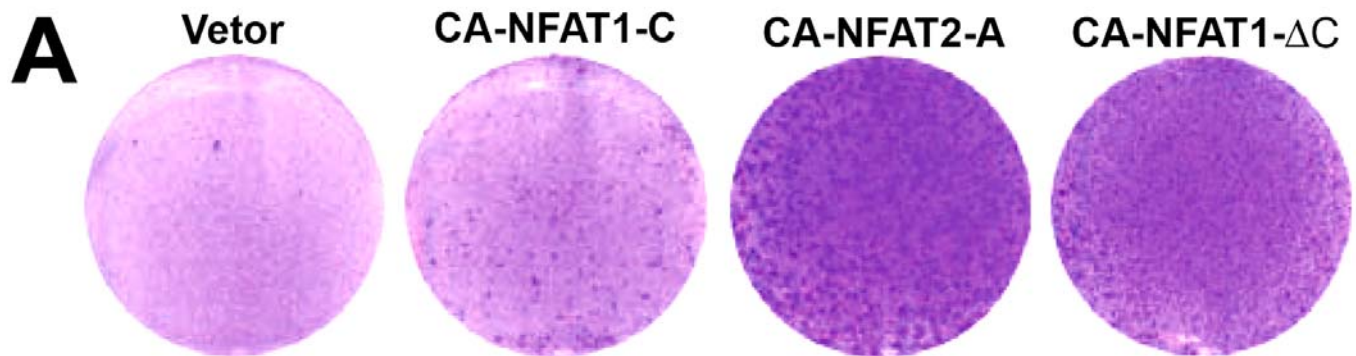


Figura 36: O CA-NFAT1- Δ C é capaz de induzir a formação de foci em cultura. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C, CA-NFAT2-A ou CA-NFAT1- Δ C, plaqueadas e analisadas para a formação de foci em cultura. As células foram plaqueadas e analisadas como descrito na Figura 13. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Além disso, quando analisada a capacidade de formação de colônia em meio semi-sólido da célula NIH3T3, a expressão da proteína CA-NFAT1-C não foi capaz de induzir a formação de colônias, formando apenas pequenas colônias, como esperado (Figura 37A e 37B). Contrariamente, a expressão do CA-NFAT1- Δ C foi capaz de induzir a formação do dobro de colônias quando comparado com as células expressando o vetor vazio ou a CA-NFAT1-C (Figura 37A). Mais uma vez, as colônias formadas pelas células expressando o CA-NFAT1- Δ C foram menos abundantes e menores quando comparadas com células NIH3T3 expressando o CA-NFAT2-A (Figura 37A e 37B).

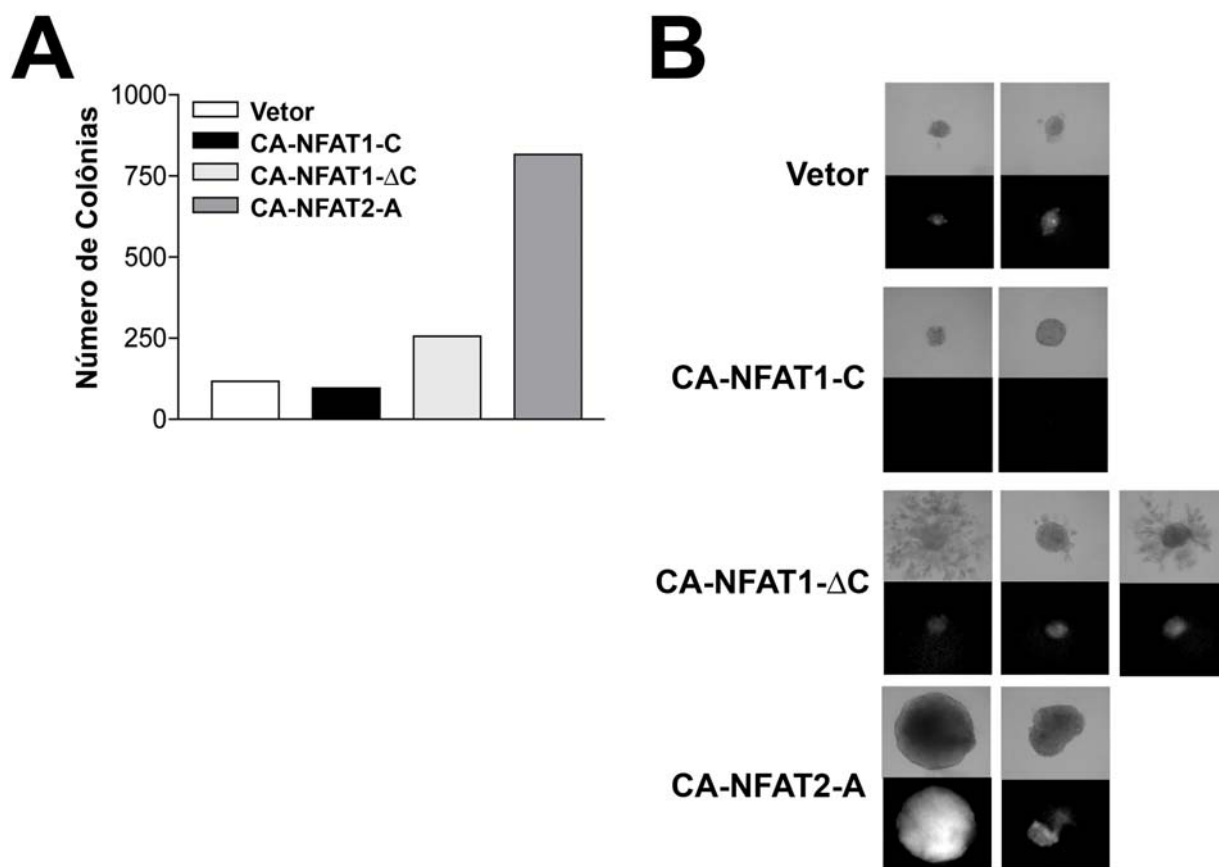


Figura 37: A proteína truncada do CA-NFAT1-C que não possui o C-terminal induz um fenótipo transformado intermediário. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT1-C, CA-NFAT2-A ou CA-NFAT1-ΔC, plaqueadas e analisadas para o crescimento celular independente de ancoragem. A análise da formação de colônias em meio semi-sólido foi realizada como descrito na Figura 14. A) Quantificação das colônias em meio semi-sólido. B) Microscopia de fase (painéis superiores) e de fluorescência para a expressão de EGFP (painéis inferiores) de colônias representativas de A. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Posteriormente, foi analisada a capacidade de crescimento celular em condições reduzida de soro. Células NIH3T3 infectadas com o vetor vazio não foram capazes de proliferar em meio com privação de fatores de crescimento, pelo contrário, apresentaram uma redução em número ao longo do experimento (Figura 38A). Em contrapartida, células NIH3T3 expressando o CA-NFAT1-ΔC

cultivadas em meio com 0,5% de SFB demonstraram um crescimento celular intermediário quando comparadas com células expressando o CA-NFAT2-A e o vetor vazio (Figura 38A).

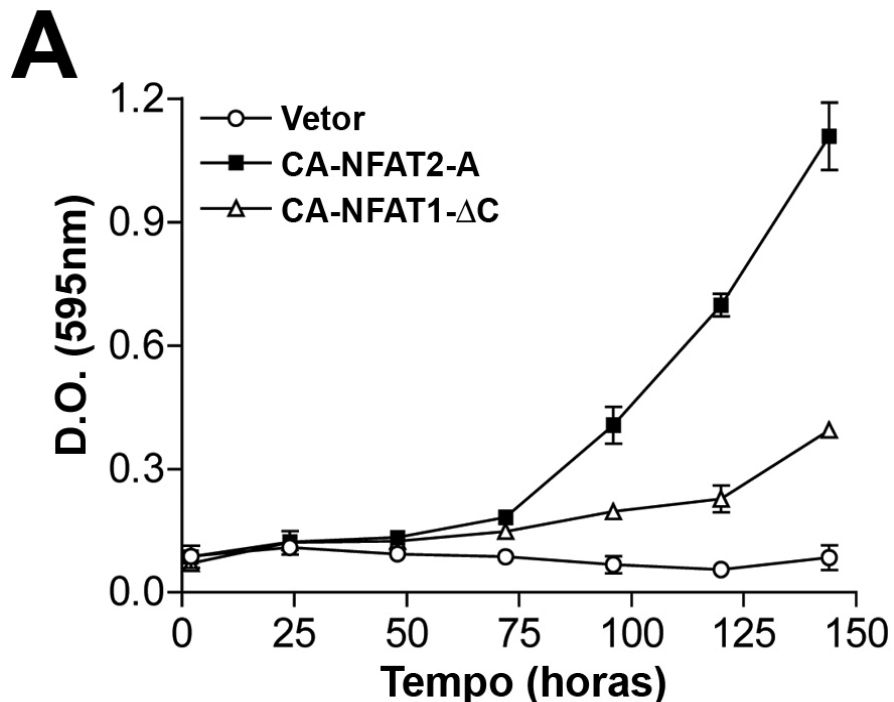


Figura 38: A proteína truncada do CA-NFAT1-C que não possui o C-terminal induz um fenótipo transformado intermediário. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT2-A ou CA-NFAT1-ΔC, plaqueadas e analisadas para o crescimento celular em privação de soro. A análise da proliferação celular em meio na presença de 0,5% de SFB foi realizado como descrito na Figura 15A. As células foram plaqueadas e analisadas a cada dia por marcação por Cristal Violeta. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Portanto, aparentemente as células expressando o CA-NFAT1-ΔC ou estão sendo protegidas da morte celular induzida pela retirada dos fatores de crescimento ou estão sendo capazes de proliferar nessas condições. No intuito de analisar qual das duas hipóteses seria a verdadeira, as células em cultura com 0,5% de SFB por 6 dias (120 horas) foram marcadas por iodeto de propídeo

e analisadas quanto seu conteúdo de DNA (Figura 39). O tempo de 6 dias foi escolhido pois é o que apresenta a maior diferença de proliferação entre as diversas células estudadas (Figura 38A). As células NIH3T3 infectadas com o vetor vazio apresentaram uma acentuada parada do ciclo celular acompanhada da indução de apoptose de cerca de um terço de suas células (Figura 39A e 39B). Surpreendentemente, células expressando o CA-NFAT1- Δ C mostraram um perfil de proliferação semelhante à de células expressando o CA-NFAT2-A, contudo, com uma moderada redução do percentual de células entrando na fase G₂/M do ciclo celular (Figura 39A). Além disso, a expressão do CA-NFAT1- Δ C nas células NIH3T3 foi capaz de proteger as células da apoptose induzida pela retirada de fatores de crescimento quando comparada com células expressando o vetor vazio (Figura 39B). Portanto, aparentemente a retirada do domínio TAD C-terminal longo do CA-NFAT1-C leva a esse fator de transcrição a agir de forma semelhante ao CA-NFAT2-A na prevenção da morte celular e progressão do ciclo celular, em privação de soro.

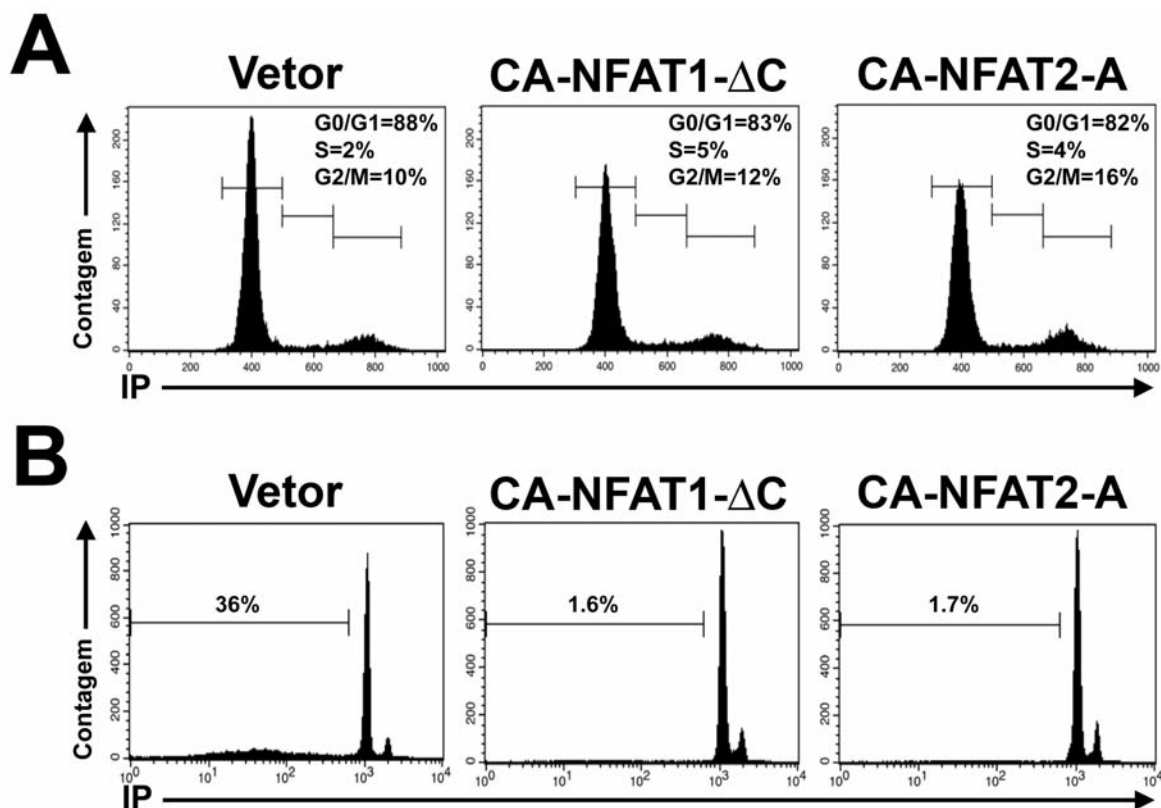


Figura 39: A proteína CA-NFAT1- Δ C previne a morte e induz a entrada no ciclo celular de células em privação de fatores de crescimento. As células NIH3T3 foram infectadas com o retrovírus contendo o vetor vazio, CA-NFAT2-A ou CA-NFAT1- Δ C, plaqueadas e analisadas para o ciclo e morte celular em privação de soro. A análise da proliferação celular em meio na presença de 0,5% de SFB foi realizado como descrito na Figura 16. O ciclo celular (A) e a morte celular (B) das células infectadas foram analisados 144 horas após o plaqueamento em condições reduzidas de soro. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Por último, foi testada a capacidade do CA-NFAT1- Δ C de regular o desenvolvimento tumoral (Figura 40). Enquanto células NIH3T3 expressando o CA-NFAT2-A formaram tumores prontamente detectáveis após injeção em camundongos BALB/c nude, células expressando o vetor vazio ou o CA-NFAT1- Δ C falharam em desenvolver tumores (Figura 40A), até 80 dias após a injeção (dado não mostrado). Contudo, a proteína CA-NFAT1- Δ C não foi capaz de reprimir o crescimento tumoral das células transformadas NIH3T3-H-*ras*V12. Em

conjunto, esses dados indicam que o domínio C-terminal do NFAT-1 é responsável pela característica pró-apoptótica, repressora do ciclo e supressora de tumor desta proteína. Sobretudo, a ablação do domínio C-terminal do NFAT1 confere um fenótipo de transformação parcial que se assemelha ao fenótipo induzido após a expressão da proteína NFAT2-A.

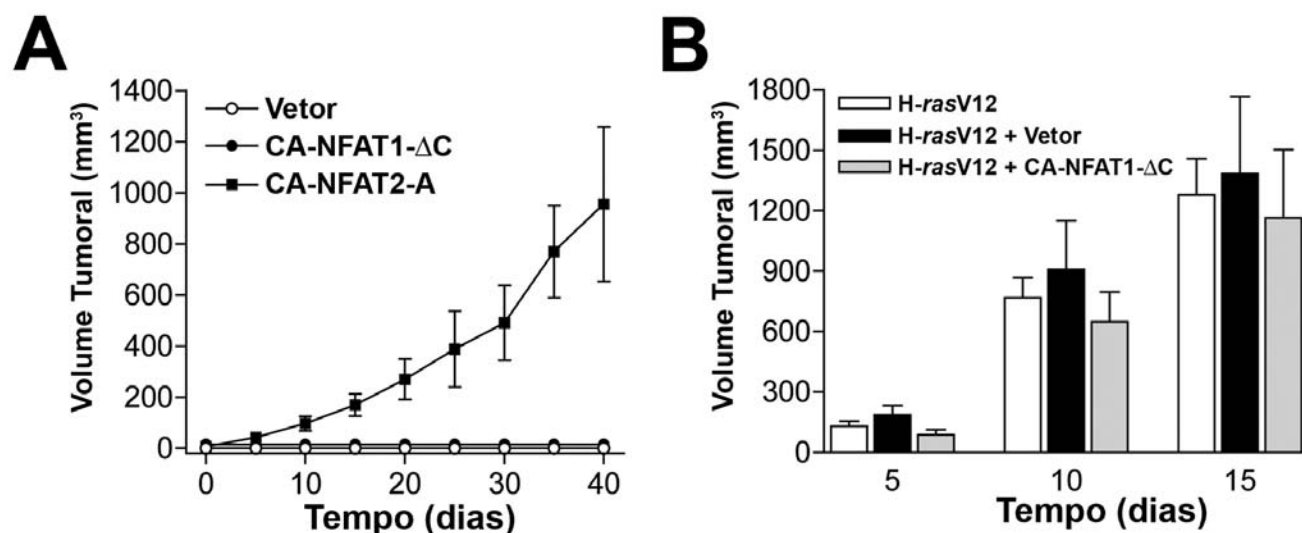


Figura 40: A porção C-terminal da proteína CA-NFAT1-C é a responsável pela propriedade supressora de tumor. A) Formação de tumor em camundongos BALB/c nude após injeção subcutânea de 5×10^5 células NIH3T3 infectadas com o vetor vazio (n=5), CA-NFAT2-A (n=5) ou CA-NFAT1-ΔC (n=5). B) Formação de tumor em camundongos BALB/c nude após injeção subcutânea de 3×10^5 células NIH3T3-H-*rasV12* não infectadas ou infectadas com o vetor vazio (n=5), CA-NFAT2-A (n=5) ou CA-NFAT1-ΔC (n=5). Os volumes dos tumores foram medidos a cada 5 dias e os dados estão mostrados como a média \pm EPM.

4.7. O CA-NFAT1-C suprime a transformação celular induzida pelo CA-NFAT2-A

Como a ativação sustentada do NFAT1 foi capaz de subverter a forte transformação celular do oncogene H-*rasV12*, a próxima pergunta foi qual seria

o efeito do CA-NFAT1-C nas células NIH3T3 transformadas pelo CA-NFAT2-A. Na tentativa de responder essa questão, células NIH3T3 foram infectadas com o vetor vazio ou com o CA-NFAT2-A e posteriormente cultivadas por uma semana para que as células pudessem adquirir o fenótipo transformado induzido pelo CA-NFAT2-A. Após esse tempo, as células foram re-infectadas com o vetor vazio ou com o CA-NFAT1-C e um dia depois, utilizadas para os experimentos a seguir. Como ambos os vetores do CA-NFAT1-C e do CA-NFAT2-A carregam o EGFP como gene repórter, o primeiro turno de infecção foi confirmado por expressão de EGFP e o segundo turno através de marcação intracelular para o NFAT1. De fato, em torno de 85% das células NIH3T3 infectadas com o CA-NFAT2-A eram positivas para o EGFP após a primeira infecção, enquanto em torno de 83% expressavam o NFAT1 após o segundo turno de infecção. Como mostrado anteriormente, as células NIH3T3 expressando o CA-NFAT2-A são capazes de proliferar acima da confluência (Figura 10B), o mesmo pode ser visto para as células que sofreram o segundo turno de infecção com o vetor vazio (Figura 41A). Em contrapartida, quando as células NIH3T3 transformadas pelo CA-NFAT2-A foram infectadas com o vetor expressando o CA-NFAT1-C, essas células não ultrapassaram a confluência durante toda a cinética de proliferação, pelo contrário elas reduziram em número e mantiveram uma baixa taxa de proliferação (Figura 41A).

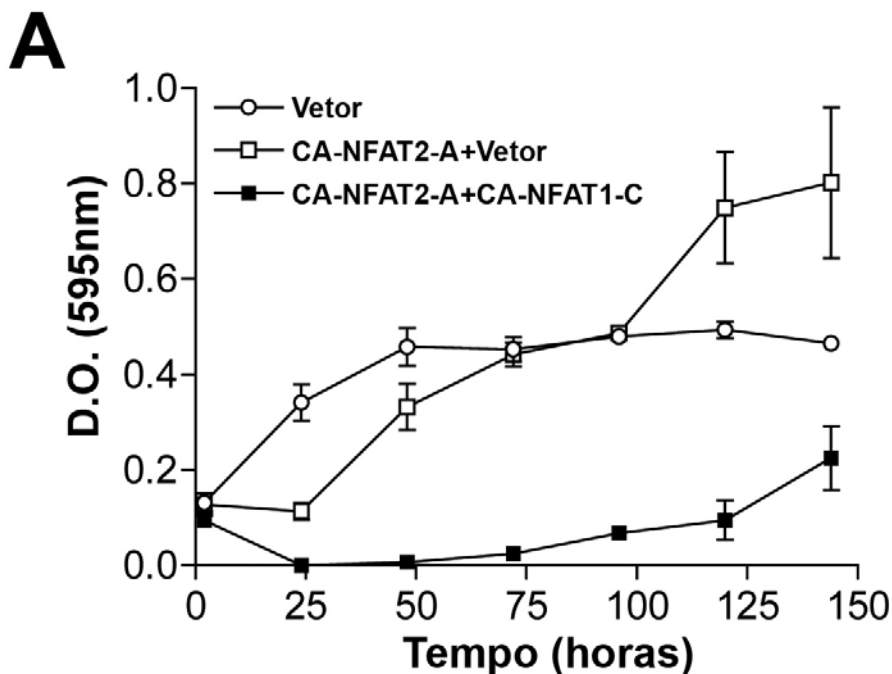


Figura 41: O CA-NFAT1-C é capaz de reprimir a proliferação celular induzida pelo CA-NFAT2-A. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovírus contendo o CA-NFAT2-A (NIH3T3-CA-NFAT2-A), e uma semana depois as células foram re-infectadas com o vetor vazio ou CA-NFAT1-C. 24 horas após o segundo round de infecção as células foram plaqueadas (0 horas) e analisadas para a proliferação celular diariamente por incorporação de Cristal Violeta como descrito na Figura 10B. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Corroborando esse dado, a expressão da proteína CA-NFAT1-C nas células NIH3T3 transformadas pelo CA-NFAT2-A foi capaz de induzir uma intensa morte celular nessas células (Figura 42A). Contrariamente, as células controle ou expressando o CA-NFAT2-A e o vetor vazio, não apresentaram uma morte celular significativa (Figura 42A).

A

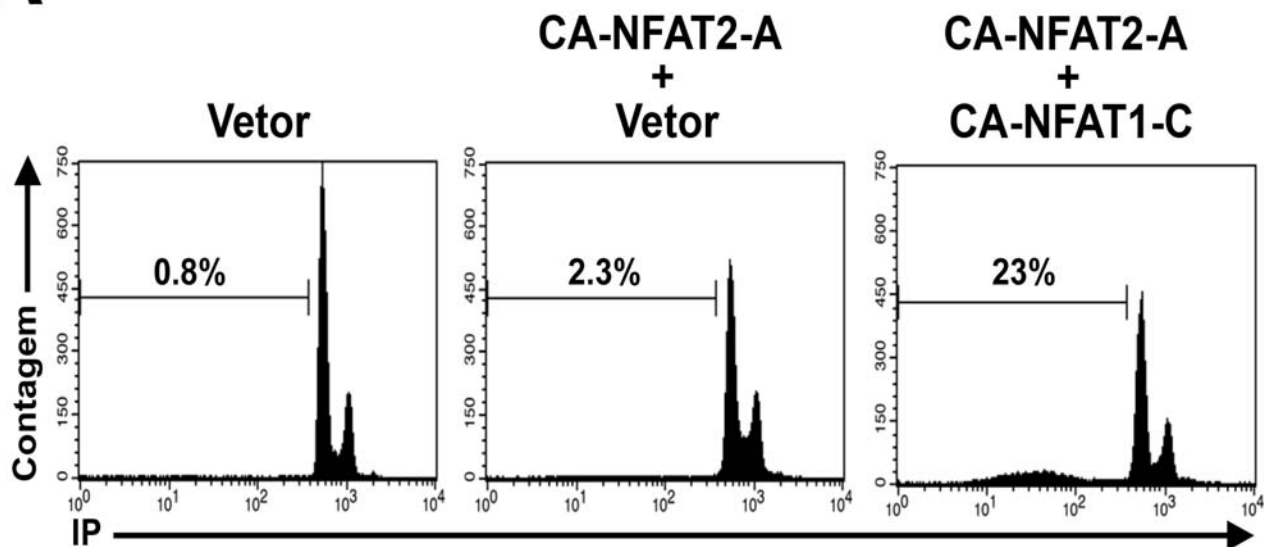


Figura 42: O CA-NFAT1-C é capaz de induzir a morte celular em células transformadas pelo CA-NFAT2-A. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovírus contendo o CA-NFAT2-A (NIH3T3-CA-NFAT2-A), e uma semana depois as células foram re-infectadas com o vetor vazio ou CA-NFAT1-C. 24 horas após o segundo round de infecção as células foram plaqueadas (0 horas) e analisadas para a morte celular por marcação de iodeto de propídeo, 48 horas após o plaqueamento, como descrito na Figura 12A. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Além disso, a expressão do CA-NFAT1-C foi capaz de reverter os diversos sinais de transformação celular induzidos pelo CA-NFAT2-A. Enquanto célula NIH3T3 expressando o CA-NFAT2-A e o vetor vazio são capazes de formar uma grande quantidade de *foci* em cultura, a expressão concomitante do CA-NFAT1-C abole, quase que por completo, a formação de *foci* da NIH3T3 (Figura 43A).

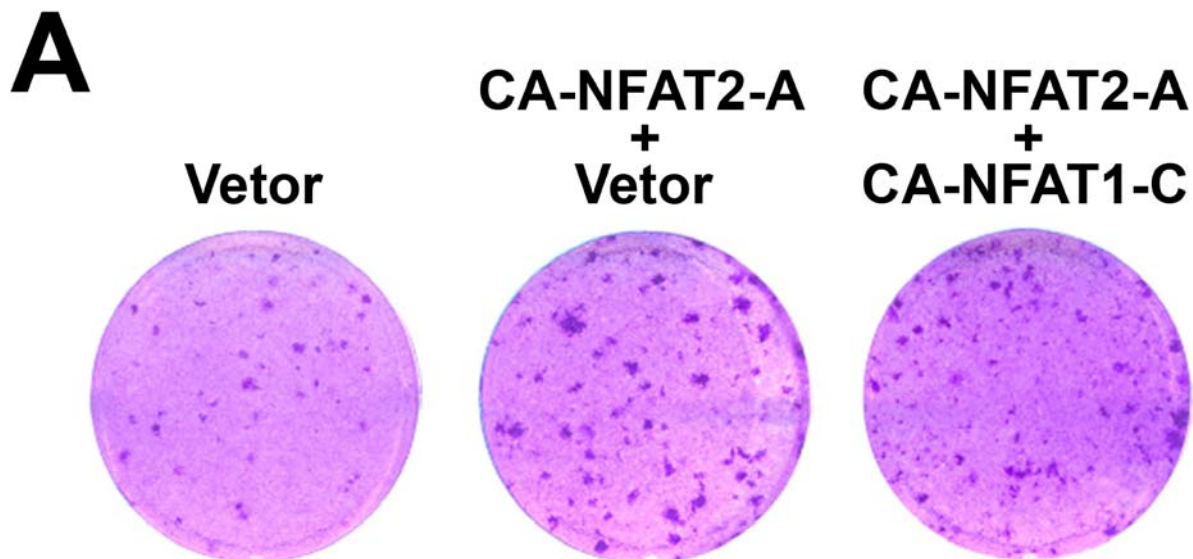


Figura 43: O CA-NFAT1-C reduz a formação de foci induzida pelo CA-NFAT2-A. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovirus contendo o CA-NFAT2-A (NIH3T3-CA-NFAT2-A), e uma semana depois as células foram re-infectadas com o vetor vazio ou CA-NFAT1-C. 24 horas após o segundo round de infecção as células foram plaqueadas (0 horas) e analisadas para a formação de foci em cultura como descrito na Figura 13. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Ainda mais, a expressão concomitante do CA-NFAT2-A com o vetor vazio na célula NIH3T3 é capaz de induzir a formação de grande número de colônias em meio semi-sólido e essas colônias apresentam um volume aumentado quando comparadas as células controle (Figura 44A e 44B). Contudo, quando as células expressando o CA-NFAT2-A são infectadas com o CA-NFAT1-C, isso leva tanto a redução do número quanto do volume das colônias formadas na ausência de substrato sólido (Figura 44A e 44B).

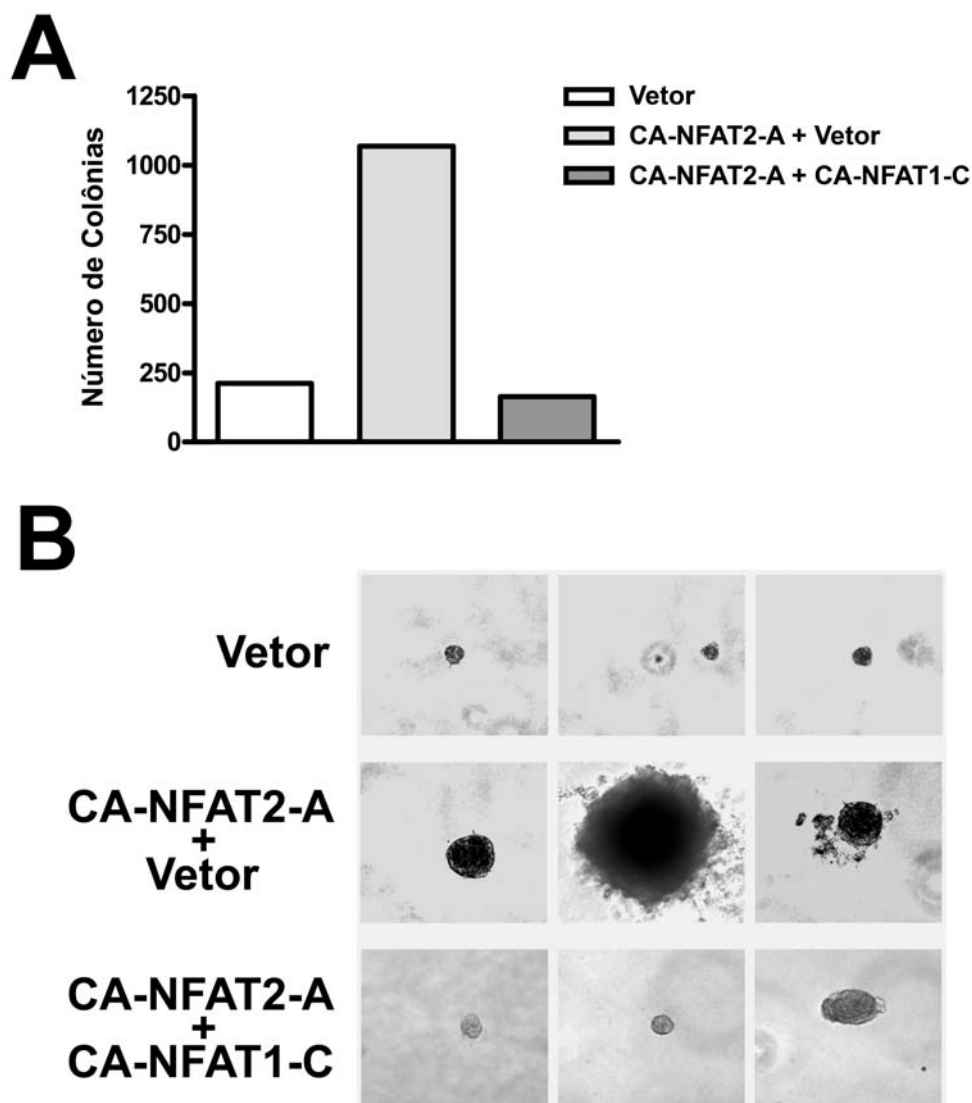


Figura 44: O CA-NFAT1-C reduz o crescimento independente de ancoragem induzido pelo CA-NFAT2-A. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovírus contendo o CA-NFAT2-A (NIH3T3-CA-NFAT2-A), e uma semana depois as células foram re-infectadas com o vetor vazio ou CA-NFAT1-C. 24 horas após o segundo round de infecção as células foram plaqueadas (0 horas) e analisadas para a formação de colônias em meio semi-sólido como descrito na Figura 14. A) Quantificação de colônias 30 dias após o plaqueamento. B) Microscopia de contraste de fase de colônias representativas de A. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Por último, a expressão do CA-NFAT1-C nas células transformadas pelo CA-NFAT2-A é capaz de inibir completamente a formação de tumores *in vivo* (Figura 45). Enquanto as células NIH3T3 expressando o CA-NFAT2-A e o vetor

vazio formam tumores de grande volume e que crescem ao longo do tempo, as células infectadas com o vetor vazio ou com o CA-NFAT2-A + CA-NFAT1-C não formaram tumores quando inoculadas no flanco de camundongos BALB/c nude (Figura 45A e 45B).

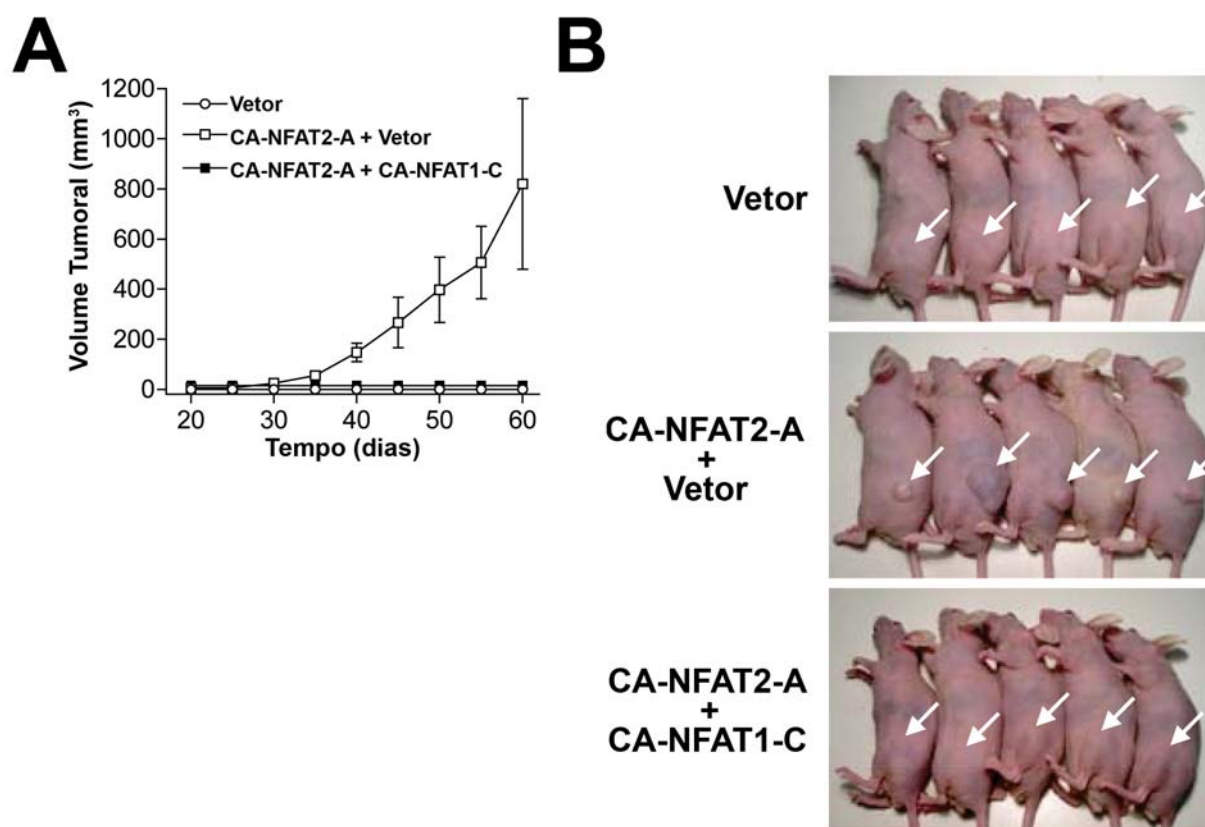


Figura 45: O CA-NFAT1-C suprime o fenótipo transformado induzido pelo CA-NFAT2-A. Células NIH3T3 foram infectadas com retrovírus contendo o CA-NFAT2-A (NIH3T3-CA-NFAT2-A), e uma semana depois as células foram re-infectadas com o vetor vazio ou CA-NFAT1-C. 24 horas após o segundo round de infecção as células foram contadas e 5×10^5 células foram injetadas subcutaneamente em camundongos BALB/c nude e o crescimento tumoral foi avaliado como descrito na Figura 17. NIH3T3-vetor vazio (n=5); NIH3T3-CA-NFAT2-A + vetor vazio (n=5); NIH3T3-CA-NFAT2-A + CA-NFAT1-C (n=5). A) Os volumes tumorais foram medidos a cada 5 dias. Os dados mostram a média \pm EPM. B) Tumores de cinco camundongos representativos estão indicados por setas brancas. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Esses experimentos demonstraram que as células NIH3T3 continuam transformadas após o segundo turno de infecção retroviral e o tempo de intervalo após a primeira infecção. E em conjunto, esses dados demonstram que a sinalização do NFAT1-C é suficiente para abolir o potencial de transformação da isoforma NFAT2-A.

5. Discussão

Nessa tese de doutorado foi mostrado que a atividade dos membros da família de transcrição NFAT, NFAT1, NFAT2 e variantes de *splicing*, são capazes de regular diferentes mecanismos envolvidos no crescimento e morte celular dos fibroblastos NIH3T3. A isoforma curta CA-NFAT2-A induz um forte fenótipo de transformação celular, enquanto o CA-NFAT1-C e CA-NFAT2-A2 suprimem o crescimento celular aparentemente pelos seus domínios TAD C-terminal ou N-terminal, respectivamente. Foi demonstrado que a expressão do CA-NFAT2-A é suficiente para induzir a célula NIH3T3 a perder a inibição de crescimento por contato, a se torna capaz de crescer independentemente de ancoragem e em privação de fatores de crescimento, e de induzir a formação de tumores em camundongos imunodeficientes. Esses dados mostram que o CA-NFAT2-A leva a NIH3T3 a adquirir todos os bem caracterizados marcos de transformação celular definindo-o como um possível oncogene (Hanahan *et al.*, 2000).

Em contrapartida, o CA-NFAT1-C e o CA-NFAT2-A2 mostraram papéis opostos na regulação do ciclo e morte celular quando comparados com o CA-NFAT2-A. A proteína CA-NFAT2-A2 foi capaz de reduzir a capacidade da célula NIH3T3 de proliferar e induziu uma intensa morte celular por apoptose. Além disso, essa proteína foi capaz de induzir um fenótipo transformado na célula NIH3T3, mas em níveis muito reduzidos, formando *foci* e tumores menores quando comparados com células expressando o CA-NFAT2-A (Figura 20).

Aparentemente, o domínio responsável pela indução da morte celular pelo CA-NFAT2-A2 está localizado em seu N-terminal. A ablação dos primeiros 29 aminoácidos da proteína CA-NFAT2-A2 foi capaz de bloquear por completo a morte celular induzida por esse fator de transcrição e de gerar um fenótipo transformado semelhante ao de células expressando a proteína CA-NFAT2-A (Figuras 21-23). Assim como a expressão do CA-NFAT2-A2, o CA-NFAT1-C foi capaz de induzir apoptose nas células NIH3T3 selvagens e de regular negativamente o ciclo celular resultando na redução de acúmulo celular (Figura 28-30). A atividade constitutiva do NFAT1 adicionalmente foi capaz de subverter o fenótipo transformado da célula NIH3T3 induzido pelo oncogene H-*rasV12*, onde reduziu o ciclo celular e induziu apoptose o que resultou em uma dramática diminuição do número de *foci* e de colônias formadas em meio semi-sólido (Figura 31 e 32). Além disso, a análise do crescimento tumoral de células transformadas NIH3T3-H-*rasV12* inoculadas no flanco de camundongos imunodeficientes BALB/c nude demonstrou que a expressão do CA-NFAT1-C é capaz de reduzir drasticamente o volume tumoral (Figura 33). Foi sugerido que um gene candidato a supressor de tumor deveria ser capaz de subverter um fenótipo transformado quando re-introduzido em células neoplásicas e a sua falta em uma célula ou animal deveria levar a um aumento da propensão de adquirir um fenótipo transformado (Marshall, 1991). Nossos dados mostram diretamente que o CA-NFAT1-C possui a capacidade de induzir o processo de reversão do fenótipo transformado e dados da literatura sugerem que camundongos deficientes para o gene do NFAT1 tem maior propensão de sofrer

transformações neoplásicas (Figuras 28-33; Robbs *et al.*, 2008; Ranger *et al.*, 2000; Glud *et al.*, 2005). Esses dados sugerem fortemente que o NFAT1 é um gene supressor de tumor. Para melhor entender o papel do NFAT1 no controle do crescimento e morte celular, mostramos que a ablação do domínio TAD C-terminal da proteína é suficiente para bloquear completamente a função pró-apoptóticas do NFAT1. Essa proteína CA-NFAT1- Δ C truncada é capaz de induzir um fenótipo parcial de transformação nas células NIH3T3 se assemelhando ao fenótipo induzido pelo CA-NFAT2A (Figuras 34-40). Por fim, o fenótipo de transformação celular induzido pela proteína CA-NFAT2-A foi completamente revertido pela superexpressão do CA-NFAT1-C sugerindo que diferentes membros da família podem ter funções complementares e que a expressão balanceada dessas proteínas pode ser importante para a célula entrar em programas que vão determinar se elas irão viver e proliferar ou morrer (Figuras 41-45). Essa foi a primeira vez que um papel duplo dentro da família NFAT foi caracterizado no controle do ciclo e morte celular, no mesmo modelo, apesar de evidências dessa dicotomia estarem progressivamente emergindo.

Estudos recentes sugerem que a família de fatores de transcrição NFAT desempenha um papel muito mais abrangente no controle do ciclo celular do que se acreditava anteriormente e suas contribuições no processo de tumorigênese estão se tornando mais claros. A fosfatase calcineurina é o principal regulador da ativação do NFAT. De fato, foi observado que alguns linfomas humanos de células B e T tem ativação sustentada da calcineurina, sugerindo que as proteínas NFAT podem desempenhar um papel no processo

de tumorigênese (Medyouf *et al.*, 2007). Ainda mais, alguns estudos sugerem que a ativação da calcineurina é essencial para a progressão tumoral. Um exemplo da importância da calcineurina pode ser observado utilizando seu inibidor o imunossupressor ciclosporina A, essa inibição impede a formação de tumores em modelos murinos que desenvolvem linfomas espontaneamente, colocando um papel central para a ativação do NFAT no desenvolvimento tumoral (Medyouf *et al.*, 2007). Corroborando esses dados, a expressão do NFAT2 foi associada com diversas transformações malignas como em linfomas de células B grandes e de Burkitt (Marafiot *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2005) e em carcinoma de cólon e pancreático (Duque *et al.*, 2005; Heit *et al.*, 2006), onde foi demonstrado que a expressão e ativação do NFAT2 é essencial para o desenvolvimento do câncer. Contrariamente, um estudo recente demonstrou que a hipermetilação da região promotora do gene *NFAT2* leva a uma redução da expressão de sua proteína em linfomas Hodgkin clássicos humano e em linfomas humanos anaplástico de células grandes (Akimzhanov *et al.*, 2008). Apesar desse trabalho parecer contraditório com os dados apresentados nessa tese, há evidências que essas células de linfomas perderam também a sinalização via seu imunoreceptor por redução da expressão de seu TCR, sugerindo que tenham ultrapassado a necessidade da sinalização via NFAT para o desenvolvimento do tumor (Bonzheim *et al.*, 2004; Schwering *et al.*, 2003). Além disso, a repressão da transcrição do gene do NFAT2 leva à redução tanto da expressão da proteína NFAT2-A, que pode apresentar um papel oncogênico, quanto do NFAT2-A2, que pode levar a um processo de morte

celular, como mostrado nessa tese. Portanto, pode ser que no caso desses linfomas específicos a redução da expressão de uma proteína pró-apoptótica (NFAT2-A2) seja a principal vantagem adquirida uma vez que já tenham adquirido outras alterações que tenham levado a transformação celular. Além disso, a expressão ectópica da isoforma CA-NFAT2-A em uma linhagem celular de pré-adipócitos 3T3-L1 mostrou ser suficiente em induzir o fenótipo característico de células transformadas (Neal *et al.*, 2003). A ativação do NFAT2 também está implicada na expressão de diversos fatores envolvidos na regulação do ciclo celular e de sobrevivência incluindo ciclinas D1 e D2, c-myc, ciclooxigenase-2, ligante de CD40 e BlyS que poderiam de fato ajudar no processo de crescimento tumoral e evasão da apoptose (Buchholz *et al.*, 2006; Íñiguez *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2006). Devido à indisponibilidade de anticorpos específicos para as diferentes isoformas do NFAT2, nesses estudos não se determinou quais isoformas estavam sendo responsáveis pela ativação desses genes. Contudo, ao menos no caso das ciclinas, c-myc e ciclooxigenase-2 a superexpressão da isoforma NFAT2-A era capaz de regular positivamente esses genes, contudo não foi testado se outras isoformas do NFAT2, como a isoforma NFAT2-A2, tem o mesmo efeito. Seria de fato interessante, a partir do estudo aqui apresentado, que futuros trabalhos atentassem para quais isoformas desempenham determinada função no processo de regulação gênica. Corroborando com a função do NFAT2-A de induzir a proliferação celular, camundongos deficientes para o NFAT2 não são viáveis e morrem no período embrionário, resultado de uma malformação grave

das válvulas cardíacas (de la Pompa *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998). Contudo, camundongos quiméricos NFAT2^{-/-} x Rag-1^{-/-}, que não possuem o NFAT2 apenas em suas células B e T, demonstraram um número reduzido de timócitos e proliferação deficiente em linfócitos periféricos sugerindo um importante papel desse fator de transcrição na regulação positiva da proliferação celular (Ranger *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998). Os dados apresentados nessa tese reforçam fortemente essas observações e demonstram diretamente que a atividade sustentada do NFAT2-A é suficiente em induzir a progressão do ciclo celular e é capaz de induzir a transformação em uma linhagem imortalizada. Interessantemente, o NFAT2 é o único gene na família NFAT que pode ser induzido, ao ser regulado ao nível de transcrição por uma alça auto-regulatória. Essa característica é isoforma específica onde apenas o NFAT2-A está sob o controle do promotor que pode ser induzido e que é dependente de ligação do próprio NFAT (Chuvpilo *et al.*, 2002). A ativação da via de sinalização do NFAT leva à expressão massiva da proteína NFAT2-A e à redução das outras isoformas do NFAT2, inclusive do NFAT2-A2 (Chuvpilo *et al.*, 1999; Chuvpilo *et al.*, 2002). Portanto, como o NFAT2-A apresenta a importante característica de controlar a proliferação e induzir a prevenção da morte celular, como demonstrado nos resultados, o fenótipo observado no camundongo deficiente para o gene NFAT2 pode ser devido à perda da expressão da isoforma NFAT2-A apenas. Seria de grande interesse a construção de camundongos que não possuísse apenas uma dessas duas isoformas do NFAT2, como do NFAT2-A ou

NFAT2-A2, onde poderiam ser analisadas as contribuições de cada uma delas isoladamente.

Foi previamente demonstrado que linfócitos de camundongos deficientes para o NFAT1 (NFAT1^{-/-}) apresentam um fenótipo de hiperproliferação quando comparados com linfócitos de camundongos selvagens e apresentam esplenomegalia e retardo na involução do timo (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1998; Schuh *et al.*, 1998). Ranger e colaboradores também reportaram que os camundongos NFAT1^{-/-} desenvolvem massas cartilaginosas extraósseas que se assemelham a condrossarcomas (Ranger *et al.*, 2000). Além disso, o NFAT1 mostrou ser capaz de se ligar diretamente e regular negativamente a região promotora de dois controladores do ciclo celular, CDK4 e ciclina A2, levando à uma redução substancial dos seus níveis protéicos (Baksh *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2007). Contudo, a relevância dessa redução na entrada do ciclo celular e no fenótipo de proliferação não foi analisada nesses estudos. Apesar da regulação negativa desses genes poder ser responsável pela parada do ciclo celular na fase G1/S que foi observada na célula NIH3T3 expressando o CA-NFAT1-C, o mecanismo que leva a esse fenótipo no modelo dessa tese ainda continua desconhecido. Como a regulação da sinalização através de cada um das vias mencionadas acima é reconhecida como capaz de influenciar vários aspectos do fenótipo tumoral, será de grande interesse determinar se alguns desses efeitos são mediados por ações diferenciais do NFAT1 e NFAT2.

Outro papel evidente dos membros da família NFAT na biologia das células NIH3T3 foi observado no controle da apoptose. Foi demonstrado nesse trabalho que o NFAT1 e diferentes isoformas do NFAT2 apresentam papéis opostos no controle da apoptose. A apoptose opera em organismos adultos na manutenção normal da homeostase celular. A violação da homeostase pode ser um evento patogênico primário que resulta em diversas doenças. Enquanto a insuficiência de apoptose pode se manifestar como câncer ou autoimunidade, a aceleração da morte celular é evidente em doenças degenerativas agudas e crônicas, imunodeficiência e infertilidade. NFAT1 e NFAT2 são expressos em altos níveis em células T periféricas onde são os principais controladores das funções efetoras e estão também envolvidos no controle da terminação da resposta imune através da indução da apoptose (revisado por Rao *et al.*, 1997). A morte celular induzida por ativação (“activation-induced cell death” – AICD) é uma forma particular de apoptose que é de grande importância para a terminação da resposta imune e, portanto, na manutenção da homeostase do sistema imune. Uma importante rota de AICD é através da ativação dos denominados receptores de morte pelos seus ligantes, em particular, o ligante de Fas, TNF- α e mais recentemente TRAIL. Foi demonstrado que o NFAT regula diretamente a expressão da proteína Fas-L através da ligação ao seu promotor e indução da transativação que leva ao aumento do nível protéico na célula (Latinis *et al.*, 1997). Outro possível alvo para o NFAT é a regulação de TRAIL, um novo membro de fatores pró-apoptóticos da família TNF. O promotor de TRAIL tem diversos sítios putativos de ligação ao fator de transcrição NFAT e

foi demonstrado que ele é regulado por NFAT em ensaios utilizando repórter de luciferase (Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2000). Apesar desses dois mecanismos poderem ser relevantes para a ativação da morte celular, ainda não há nenhuma evidência de um papel diferencial em sua regulação por membros distintos da família NFAT. Outro alvo interessante para a regulação do NFAT é o gene do TNF- α . Enquanto a proteína NFAT2 parece ser incapaz de se ligar e transativar o promotor de TNF- α , na linhagem celular HeLa, pela baixa afinidade do domínio de ligação ao DNA do NFAT2 (DBD) ao promotor do TNF- α , o NFAT1 é capaz de se ligar levando a um aumento da expressão da proteína TNF- α (Oum *et al.*, 2002). Contrariamente, recentemente foi demonstrado que em células Jurkat T o NFAT2 é capaz de se ligar ao promotor de TNF- α com uma afinidade semelhante à proteína NFAT1 sugerindo que uma diferença de afinidade membro específicas a alguns promotores pode ocorrer dependendo do tipo de célula que estão sendo analisadas (Kaminuma *et al.*, 2008). Contudo, mesmo quando o NFAT2 é capaz de se ligar ao promotor de TNF- α , ele não é capaz de levar a sua transativação enquanto a proteína NFAT1-C é capaz. Essa diferença foi mapeada na região do domínio TAD C-terminal do NFAT1 onde sua retirada da proteína NFAT1 abole completamente a transativação do TNF- α . Contudo, a fusão dessa porção C-terminal do NFAT1-C com a proteína NFAT2-A, construindo uma proteína híbrida, torna o NFAT2 capaz de levar à expressão do TNF- α pelo NFAT2 (Kaminuma *et al.*, 2008). Esses dados sugerem uma possível diferença entre essas duas proteínas (NFAT1 e NFAT2) no controle da morte celular através da regulação do TNF- α podendo ser devida ou pela

afinidade ao DNA ou pela presença do domínio C-terminal do NFAT1. Apesar da ativação do gene do TNF- α poder explicar a habilidade do CA-NFAT1-C, mas não do CA-NFAT2-A de induzir a apoptose em nosso modelo, não explica porque o CA-NFAT2-A2 também é capaz de induzir apoptose, uma vez que não possui o C-terminal longo, como o da proteína CA-NFAT1-C. Além disso, aparentemente a via de ativação da morte celular nas células NIH3T3 não parece passar por secreção de um fator indutor de morte como o TNF- α , uma vez que o meio condicionado de células infectadas com o CA-NFAT1-C não é capaz de induzir morte celular em células NIH3T3 selvagens (dados preliminares não mostrados). Portanto, apesar da regulação da via de morte celular induzida por TNF- α poder explicar parcialmente os dados observados nessa tese, ainda faltam experimentos que demonstrem claramente quais são as verdadeiras funções do TNF- α no processo de apoptose induzido pelo NFAT.

Além da indução dos ligantes de receptores de morte celular, foi mostrado que o NFAT é capaz de regular a transcrição do receptor esteroide nuclear órfão Nur77. Nur77 foi identificado como sendo importante no processo de seleção negativa de timócitos, sendo um gene de resposta precoce à sinalização via TCR que leva o timócito a apoptose (Liu *et al.*, 1994; Woronicz *et al.*, 1994). A atividade de Nur77 também é importante no processo de morte celular por AICD de células T e B periféricas e em diferentes tipos de linhagens celulares tumorais (Liu *et al.*, 1994; Woronicz *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998; Uemura *et al.*, 1998). Aparentemente, a proteína Nur77 é capaz de se ligar e fazer um heterodímero com Bcl-2 o que induz uma mudança conformacional nessa

proteína convertendo o Bcl-2 de um fator anti- para pró-apoptótico (Lin *et al.*, 2004). Interessantemente, o NFAT não precisa se ligar diretamente ao DNA do promotor de Nur77 para levar a sua transcrição. De fato, proteínas da família MEF2 se ligam ao promotor do Nur77 e recrutam o NFAT para fazer um domínio composto de ativação da transcrição (Youn *et al.*, 2000). Além disso, aparentemente apenas o NFAT1-C é capaz de se ligar à MEF-2 através de seu domínio C-terminal longo (Youn *et al.*, 2000), sendo que o NFAT2-A e NFAT3-A são incapazes de realizar essa interação (Blaeser *et al.*, 2000). A regulação positiva preferencial de Nur77 pelo NFAT1-C poderia justificar a morte celular observada nas células NIH3T3 expressando o CA-NFAT1-C e o por quê o CA-NFAT2-A e a forma truncada CA-NFAT1- Δ C não induzem morte nessas células. Contudo, caso essa seja a causa da morte observada nas células NIH3T3, ela não justificaria a morte celular induzida pela proteína CA-NFAT2-A2, uma vez que ela também não possui o domínio C-terminal longo presente no NFAT1-C. Portanto, os mecanismos pelos quais o NFAT1-C e o NFAT2-A2 induzem diferencialmente a morte celular por apoptose na linhagem celular NIH3T3 ainda permanecem desconhecidos.

A observação que o CA-NFAT1-C e o CA-NFAT2-A2 induzem apoptose e parada do ciclo celular e de forma oposta a proteína truncada CA-NFAT1 Δ C e a CA-NFAT2-A previnem a apoptose induzida por retirada de soro e levam a um aumento da proliferação de células NIH3T3 indica que esses fatores de transcrição (NFAT1 e NFAT2) exibem ambas propriedades individuais e sobrepostas. Além disso, o fato das proteínas CA-NFAT1- Δ C e CA-NFAT2- Δ N

apresentarem funções opostas às suas proteínas selvagens sugere que as diferenças funcionais são parcialmente devido aos domínios TAD C- e N-terminal do NFAT, respectivamente. Contudo, não se pode atribuir totalmente a capacidade oncogênica do NFAT2-A a falta do domínio TAD C-terminal longo, uma vez que a proteína truncada CA-NFAT1- Δ C não foi capaz de induzir a formação de tumor em camundongos BALB/C nude. Uma pergunta que surge é se a retirada do domínio TAD N-terminal da proteína CA-NFAT1- Δ C poderia potencializar o efeito da retirada do TAD C-terminal e criar assim uma proteína com características mais semelhantes ao CA-NFAT2-A na indução de tumor em camundongo. A região N-terminal (TAD-N) do NFAT1-C e do NFAT2-A2 possuem em comum um domínio putativo ácido de ativação da transcrição (“acidic activation domain” - AAD) que está completamente ausente na isoforma NFAT2-A (Figura 1). Esse domínio AAD está representado no N-terminal de todos os membros da família NFAT e é excluído da proteína NFAT2-A após ativação celular por uma alteração no início de transcrição (Chuvpilo *et al.*, 1999). Portanto, tanto o N-terminal contendo o domínio AAD quanto o C-terminal das proteínas NFAT podem ser importantes no controle do processo de morte celular. O C-terminal do NFAT1-C também possui similaridade de sequência as regiões correspondentes do NFAT2-C isoforma longa, NFAT3 e NFAT4, principalmente no motivo C-terminal do TAD-C que possui a sequência LDQTYLDDVNEIRKEFS, que está representada totalmente ou parcialmente em todos os membros da família NFAT com exceção das isoformas curtas do NFAT2 (revisado por Rao *et al.*, 1997; Hoey *et al.*, 1995). O C-terminal do

NFAT1 e NFAT2-C isoforma longa são capazes de induzir a transativação de genes atribuindo uma função no processo de regulação da transcrição para essa região (Luo *et al.*, 1996; Chuvpilo *et al.*, 1999). Uma possibilidade é que os fatores de transcrição NFAT agem ativando a apoptose e induzindo a parada do ciclo celular através da transativação de genes alvo pelas regiões conservadas localizadas no N- e C-terminal destas proteínas. Até agora, não há nenhum dado na literatura que sugira um papel de indutor da apoptose para o domínio N-terminal do NFAT e apenas evidências limitadas que o domínio C-terminal desta proteína possa atuar como um anti-oncogene, que estão de acordo com os dados descritos nos resultados. Foi recentemente mostrado, em camundongos utilizando um modelo de linfomas de células T induzido por retrovírus indutores de linfomas de células T (SL3-3), que o C-terminal do NFAT4 é um alvo para a inserção retroviral (Glud *et al.*, 2005). Linfomas em camundongos infectados com o vírus SL3-3 ocorriam quando havia uma inserção na região promotora do gene NFAT4, que bloqueia a síntese da proteína, ou na região 3' do íntron 9 do gene do NFAT4, levando a geração de uma isoforma curta do NFAT4, que não possui a região C-terminal, mais que ainda contem o RHR e é similar em tamanho ao NFAT2-A. Além disso, a falta do NFAT4 em camundongos (NFAT4^{-/-}) leva a um aumento da susceptibilidade a formação de linfomas induzidos por infecção viral (Glud *et al.*, 2005). Isso sugere que o NFAT4 também é um gene supressor de tumor e que a retirada de seu C-terminal é suficiente para inibir essa função. Isso também é verdade para o gene NFAT2 onde varias inserções no íntron 8 foram encontradas em diferentes tipos de

modelos de câncer induzidos por inserção viral (“Mouse Retrovirus Tagged Cancer Gene Database”, Akagi *et al.*, 2004). A inserção no íntron 8 leva à formação do NFAT2 isoforma curta e previne a inclusão do C-terminal longo que está sendo proposto nessa tese que seja um domínio supressor de tumor da família de fatores de transcrição NFAT. Outra correlação interessante que pode ser feita é que camundongos expressam uma isoforma curta do NFAT1 que não possui o C-terminal e que essa isoforma é expressa principalmente nos tecidos do cérebro e do coração (Plyte *et al.*, 2001). Como ambos esses órgãos não são capazes de se auto regenerar e estão continuamente sujeitos a influxos de cálcio levando a ativação do NFAT, esses tecidos estão susceptíveis a apoptose induzida pelo NFAT1 e conseqüentemente a danos teciduais. Apesar desses órgãos poderem também expressar as isoformas longas do NFAT, pode-se sugerir que a super expressão de suas contrapartes curtas poderia prevenir a apoptose pela competição por promotores alvos de genes pró-apoptóticos.

Enquanto ainda falta ser demonstrado em estudos futuros se o N- e C-terminal das proteínas NFAT diferem no controle da apoptose e ciclo celular, a tese aqui apresentada mostra uma surpreendente diferença de fenótipo induzido pelas proteínas NFAT1, NFAT2 e o variante de *splicing* NFAT2-A2. Os efeitos individuais induzidos pelas proteínas NFAT pode se basear em sua capacidade de controlar ambos genes pro- e anti-apoptóticos assim como do ciclo celular. Isso sugere que um limiar de expressão celular para o nível de proteínas NFAT e isoformas que estão sendo expressas determina que grupo de genes alvo será ativado e conseqüentemente o destino da célula. Em células T periféricas

virgens, o NFAT1 e as isoformas do NFAT2 que contém o N-terminal com o domínio AAD (ex. NFAT2-A2) são as proteínas expressas prevalentes. A ligação e ativação via TCR leva à massiva indução da expressão da isoforma NFAT2-A enquanto o nível de NFAT1 se mantém constante e ocorre uma dramática redução das outras isoformas do NFAT2 (Chuvpilo *et al.*, 1999). Isso sugere que a indução da isoforma NFAT2-A em linfócitos T pode garantir que essas células exerçam sua função efetora e proliferem sem a rápida indução da morte por apoptose. De fato, foi demonstrado que a super expressão das proteínas NFAT1-C ou NFAT2-C isoforma longa levam a um aumento da AICD em células primárias T CD4⁺, enquanto a superexpressão da isoforma NFAT2-A não teve nenhum impacto na AICD (Chuvpilo *et al.*, 2002). Esses resultados dão suporte aos dados dessa tese que demonstrou que o domínio N- e C-terminal das proteínas NFAT2-A2 e NFAT1-C, respectivamente, regulam a apoptose. Ainda mais, os resultados aqui demonstrados sugerem que a sinalização do NFAT1 abole o efeito induzido pelo NFAT2-A. Contudo, mais estudos precisam ser realizados para melhor entendimento do papel fisiológico entre o balanço da expressão do NFAT1, NFAT2 e suas isoformas. A presença de domínios na família NFAT que são capazes de induzir fenótipos anti-oncogênicos está de acordo com o mecanismo intrínseco sugerido de supressão de tumor, onde oncogenes carregam sua própria maquinaria de supressão para evitar o desenvolvimento do câncer (Lowe *et al.*, 2004). A proteína c-myc é um bom exemplo dessa propriedade onde ela apresenta ambas as habilidades de induzir a formação de tumor e a apoptose e que sua função anti-oncogênica reside no

seu N-terminal e que pode ser suprimida por mutações ou por *splicing* alternativo (Chang *et al.*, 2000; Benassayag *et al.*, 2005). Os membros da família NFAT podem trabalhar de mesma maneira e, portanto, podem agir como supressores de tumor ou oncogenes.

6. CONCLUSÕES

- O fenótipo proliferativo induzido nas células NIH3T3 pelos membros da família de transcrição NFAT é isoforma e variante dependente.
- A proteína CA-NFAT2-A é capaz de induzir todos os marcos de transformação celular na NIH3T3 podendo ser considerada como um possível oncogene.
- A proteína CA-NFAT2-A2 é capaz de induzir uma intensa morte celular e essa capacidade é dependente do N-terminal desta proteína.
- A proteína CA-NFAT1-C é capaz de reverter o fenótipo transformado da célula NIH3T3-H-*ras*V12 podendo ser considerada como um possível supressor de tumor.
- A porção C-terminal da proteína CA-NFAT1-C é fundamental para o efeito de supressão de tumor.
- Portanto, o processo de regulação da transcrição e do processamento de *splicing* alternativo nos genes dos membros da família NFAT pode ter um papel muito importante na decisão se a célula irá proliferar e efetuar sua função ou morrer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akagi K, Suzuki T, Stephens RM, Jenkins NA, Copeland NG (2004) RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D523-527

Akimzhanov A, Krenacs L, Schlegel T, Klein-Hessling S, Bagdi E, Stelkovic E, Kondo E, Chuvpilo S, Wilke P, Avots A, Gattenlohner S, Muller-Hermelink HK, Palmetshofer A, Serfling E (2008) Epigenetic changes and suppression of the nuclear factor of activated T cell 1 (NFATC1) promoter in human lymphomas with defects in immunoreceptor signaling. *Am J Pathol* **172**(1): 215-224

Amarante-Mendes GP, Green DR (1999) The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res* **32**(9): 1053-1061

Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG (1998) Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* **1**(5): 627-637

Assuncao Guimaraes C, Linden R (2004) Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* **271**(9): 1638-1650

Avots A, Buttman M, Chuvpilo S, Escher C, Smola U, Bannister AJ, Rapp UR, Kouzarides T, Serfling E (1999) CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* **10**(5): 515-524

Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, Du J, Fosmire S, Fisher DE, DeCaprio JA, Modiano JF, Burakoff SJ (2002) NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* **10**(5): 1071-1081

Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR (1997) Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* **11**(7): 824-834

Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* **275**(5308): 1930-1934

Benassayag C, Montero L, Colombie N, Gallant P, Cribbs D, Morello D (2005) Human c-Myc isoforms differentially regulate cell growth and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **25**(22): 9897-9909

Blaeser F, Ho N, Prywes R, Chatila TA (2000) Ca(2+)-dependent gene

expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem* **275**(1): 197-209

Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**(6835): 355-365

Bonzheim I, Geissinger E, Roth S, Zettl A, Marx A, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Rudiger T (2004) Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood* **104**(10): 3358-3360

Boss V, Abbott KL, Wang XF, Pavlath GK, Murphy TJ (1998) The cyclosporin A-sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells. Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT-mediated transcription by phospholipase C-coupled cell surface receptors. *J Biol Chem* **273**(31): 19664-19671

Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM (2001) Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* **20**(5): 998-1009

Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V (2006) Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J* **25**(15): 3714-3724

Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MB, Barcinski MA, Viola JP (2002) NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J* **16**(14): 1940-1942

Carvalho LD, Teixeira LK, Carrossini N, Caldeira AT, Ansel KM, Rao A, Viola JP (2007) The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. *Cell Cycle* **6**(14): 1789-1795

Chang DW, Claassen GF, Hann SR, Cole MD (2000) The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals. *Mol Cell Biol* **20**(12): 4309-4319

Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC (1998) Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* **392**(6671): 42-48

Chen L, Rao A, Harrison SC (1999) Signal integration by transcription-factor assemblies: interactions of NF-AT1 and AP-1 on the IL-2 promoter. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**: 527-531

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**(3): 705-711

Chow CW, Dong C, Flavell RA, Davis RJ (2000) c-Jun NH(2)-terminal kinase inhibits targeting of the protein phosphatase calcineurin to NFATc1. *Mol Cell Biol* **20**(14): 5227-5234

Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ (1997) Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* **278**(5343): 1638-1641

Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, Glockner J, Fischer C, Kerstan A, Escher C, Inashkina I, Hlubek F, Jankevics E, Brabletz T, Serfling E (1999) Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* **162**(12): 7294-7301

Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, Schulze-Luehrmann J, Santner-Nanan B, Feoktistova E, Konig T, Avots A, Schmitt E, Berberich-Siebelt F, Schimpl A, Serfling E (2002) Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* **16**(6): 881-895

Chuvpilo S, Zimmer M, Kerstan A, Glockner J, Avots A, Escher C, Fischer C, Inashkina I, Jankevics E, Berberich-Siebelt F, Schmitt E, Serfling E (1999) Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* **10**(2): 261-269

Contassot E, Gaide O, French LE (2007) Death receptors and apoptosis. *Dermatol Clin* **25**(4): 487-501, vii

Crabtree GR, Clipstone NA (1994) Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* **63**: 1045-1083

Day CJ, Kim MS, Lopez CM, Nicholson GC, Morrison NA (2005) NFAT expression in human osteoclasts. *J Cell Biochem* **95**(1): 17-23

de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL, Crabtree GR, Mak TW (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* **392**(6672): 182-186

Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffier PJ (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* **10**(19): 1201-1204

Duque J, Fresno M, Iniguez MA (2005) Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **280**(10): 8686-8693

Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**(6835): 342-348

Falvo JV, Lin CH, Tsytsykova AV, Hwang PK, Thanos D, Goldfeld AE, Maniatis T (2008) A dimer-specific function of the transcription factor NFATp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(50): 19637-19642

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**(1): 76-100

Fu L, Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo A, Yoshimura L, Ford RJ (2006) Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* **107**(11): 4540-4548

Glud SZ, Sorensen AB, Andrulis M, Wang B, Kondo E, Jessen R, Krenacs L, Stelkovics E, Wabl M, Serfling E, Palmetshofer A, Pedersen FS (2005) A tumor-suppressor function for NFATc3 in T-cell lymphomagenesis by murine leukemia virus. *Blood* **106**(10): 3546-3552

Gomez del Arco P, Martinez-Martinez S, Maldonado JL, Ortega-Perez I, Redondo JM (2000) A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem* **275**(18): 13872-13878

Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR (2001) Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* **105**(7): 863-875

Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW, Crabtree GR (1999) L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* **401**(6754): 703-708

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**(15): 1899-1911

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70

Heit JJ, Apelqvist AA, Gu X, Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR, Kim SK (2006) Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* **443**(7109): 345-349

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**(6805): 770-776

Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, Lorenzo E, Martinez-Martinez S, Grau R, Fresno M, Redondo JM (2001) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* **193**(5): 607-620

Hinds MG, Day CL (2005) Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants. *Curr Opin Struct Biol* **15**(6): 690-699

Ho AM, Jain J, Rao A, Hogan PG (1994) Expression of the transcription factor NFATp in a neuronal cell line and in the murine nervous system. *J Biol Chem* **269**(45): 28181-28186

Ho IC, Kim JH, Rooney JW, Spiegelman BM, Glimcher LH (1998) A potential role for the nuclear factor of activated T cells family of transcriptional regulatory proteins in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15537-15541

Ho SN, Thomas DJ, Timmerman LA, Li X, Francke U, Crabtree GR (1995) NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity. *J Biol Chem* **270**(34): 19898-19907

Hock MB, Brown MA (2003) Nuclear factor of activated T cells 2 transactivation in mast cells: a novel isoform-specific transactivation domain confers unique FcepsilonRI responsiveness. *J Biol Chem* **278**(29): 26695-26703

Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH (1996) Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* **4**(4): 397-405

Hoey T, Sun YL, Williamson K, Xu X (1995) Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* **2**(5): 461-472

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* **17**(18): 2205-2232

Holtz-Heppelmann CJ, Algeciras A, Badley AD, Paya CV (1998) Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. *J Biol Chem* **273**(8): 4416-4423

Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH, Fuchs E (2008) NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* **132**(2): 299-310

Imamura R, Masuda ES, Naito Y, Imai S, Fujino T, Takano T, Arai K, Arai N (1998) Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *J*

Immunol **161**(7): 3455-3463

Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M (2000) An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* **275**(31): 23627-23635

Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG, Rao A (1995) A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J Biol Chem* **270**(8): 4138-4145

Jain J, Miner Z, Rao A (1993) Analysis of the preexisting and nuclear forms of nuclear factor of activated T cells. *J Immunol* **151**(2): 837-848

Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A (2002) The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* **4**(7): 540-544

Kaminuma O, Kitamura F, Kitamura N, Hiroi T, Miyoshi H, Miyawaki A, Miyatake S (2008) Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF-alpha gene expression in T cells. *J Immunol* **180**(1): 319-326

Karpurapu M, Wang D, Singh NK, Li Q, Rao GN (2008) NFATc1 targets cyclin A in the regulation of vascular smooth muscle cell multiplication during restenosis. *J Biol Chem* **283**(39): 26577-26590

Kiani A, Rao A, Aramburu J (2000) Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* **12**(4): 359-372

Kim R (2005) Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* **103**(8): 1551-1560

Latinis KM, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA (1997) Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem* **272**(50): 31427-31434

Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**(6842): 95-99

Li Y, Lin B, Agadir A, Liu R, Dawson MI, Reed JC, Fontana JA, Bost F, Hobbs PD, Zheng Y, Chen GQ, Shroot B, Mercola D, Zhang XK (1998) Molecular determinants of AHPN (CD437)-induced growth arrest and apoptosis in human lung cancer cell lines. *Mol Cell Biol* **18**(8): 4719-4731

Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao X, Dawson MI, Reed JC, Zhang XK (2004) Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear

orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* **116**(4): 527-540

Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI (1995) A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* **23**(10): 1686-1690

Liu J, Masuda ES, Tsuruta L, Arai N, Arai K (1999) Two independent calcineurin-binding regions in the N-terminal domain of murine NF-ATx1 recruit calcineurin to murine NF-ATx1. *J Immunol* **162**(8): 4755-4761

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**(2): 175-184

Liu Y, Borchert GL, Surazynski A, Hu CA, Phang JM (2006) Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling. *Oncogene* **25**(41): 5640-5647

Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA (1994) Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* **367**(6460): 281-284

Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A (1999) NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7214-7219

Lopez-Rodriguez C, Kluin-Nelemans HC, Corbi AL (1996) AP-1 regulates the basal and developmentally induced transcription of the CD11c leukocyte integrin gene. *J Immunol* **156**(10): 3780-3787

Lowe SW, Cepero E, Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**(7015): 307-315

Luo C, Burgeon E, Carew JA, McCaffrey PG, Badalian TM, Lane WS, Hogan PG, Rao A (1996) Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol Cell Biol* **16**(7): 3955-3966

Luo C, Burgeon E, Rao A (1996) Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1. *J Exp Med* **184**(1): 141-147

Luo C, Shaw KT, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG, Rao A (1996) Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(17): 8907-8912

Lyakh L, Ghosh P, Rice NR (1997) Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol Cell Biol* **17**(5): 2475-2484

Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**(6): 472-484

Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**(19): 2476-2489

Macian F, Rao A (1999) Reciprocal modulatory interaction between human immunodeficiency virus type 1 Tat and transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol* **19**(5): 3645-3653

Marafioti T, Pozzobon M, Hansmann ML, Ventura R, Pileri SA, Robertson H, Gesk S, Gaulard P, Barth TF, Du MQ, Leoncini L, Moller P, Natkunam Y, Siebert R, Mason DY (2005) The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br J Haematol* **128**(3): 333-342

Marshall CJ (1991) Tumor suppressor genes. *Cell* **64**(2): 313-326

Masuda ES, Imamura R, Amasaki Y, Arai K, Arai N (1998) Signalling into the T-cell nucleus: NFAT regulation. *Cell Signal* **10**(9): 599-611

Masuda ES, Liu J, Imamura R, Imai SI, Arai KI, Arai N (1997) Control of NFATx1 nuclear translocation by a calcineurin-regulated inhibitory domain. *Mol Cell Biol* **17**(4): 2066-2075

Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannum C, Arai K, Arai N (1995) NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol* **15**(5): 2697-2706

Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, Hisatake K, Nogi Y (2004) Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem* **279**(44): 45969-45979

Matsumura I, Tanaka H, Kanakura Y (2003) E2F1 and c-Myc in cell growth and death. *Cell Cycle* **2**(4): 333-338

McCaffrey PG, Goldfeld AE, Rao A (1994) The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor- α gene transcription. *J Biol Chem* **269**(48): 30445-30450

McCaffrey PG, Perrino BA, Soderling TR, Rao A (1993) NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive

drugs. *J Biol Chem* **268**(5): 3747-3752

Medyouf H, Alcalde H, Berthier C, Guillemin MC, dos Santos NR, Janin A, Decaudin D, de The H, Ghysdael J (2007) Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **13**(6): 736-741

Monticelli S, Rao A (2002) NFAT1 and NFAT2 are positive regulators of IL-4 gene transcription. *Eur J Immunol* **32**(10): 2971-2978

Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**(2): 221-234

Nakano K, Vousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3): 683-694

Nayak A, Glockner-Pagel J, Vaeth M, Schumann JE, Buttman M, Bopp T, Schmitt E, Serfling E, Berberich-Siebelt F (2009) Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J Biol Chem* **284**(16): 10935-10946

Neal JW, Clipstone NA (2001) Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. *J Biol Chem* **276**(5): 3666-3673

Neal JW, Clipstone NA (2003) A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J Biol Chem* **278**(19): 17246-17254

Nolan GP (1994) NF-AT-AP-1 and Rel-bZIP: hybrid vigor and binding under the influence. *Cell* **77**(6): 795-798

Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR (1994) NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* **369**(6480): 497-502

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**(5468): 1053-1058

Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahliliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* **6**(3): 539-550

Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A (2004) A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* **24**(10): 4184-4195

Oukka M, Ho IC, de la Brousse FC, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH (1998) The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* **9**(3): 295-304

Oum JH, Han J, Myung H, Hleb M, Sharma S, Park J (2002) Molecular mechanism of NFAT family proteins for differential regulation of the IL-2 and TNF-alpha promoters. *Mol Cells* **13**(1): 77-84

Pan S, Koyano-Nakagawa N, Tsuruta L, Amasaki Y, Yokota T, Mori S, Arai N, Arai K (1997) Molecular cloning and functional characterization of murine cDNA encoding transcription factor NFATc. *Biochem Biophys Res Commun* **240**(2): 314-323

Park J, Takeuchi A, Sharma S (1996) Characterization of a new isoform of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) gene family member NFATc. *J Biol Chem* **271**(34): 20914-20921

Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lin-Lee YC, Ford RJ (2005) Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* **106**(12): 3940-3947

Plyte S, Boncristiano M, Fattori E, Galvagni F, Paccani SR, Majolini MB, Oliviero S, Ciliberto G, Telford JL, Baldari CT (2001) Identification and characterization of a novel nuclear factor of activated T-cells-1 isoform expressed in mouse brain. *J Biol Chem* **276**(17): 14350-14358

Porter CM, Havens MA, Clipstone NA (2000) Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J Biol Chem* **275**(5): 3543-3551

Ranger AM, Gerstenfeld LC, Wang J, Kon T, Bae H, Gravallesse EM, Glimcher MJ, Glimcher LH (2000) The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med* **191**(1): 9-22

Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravallesse EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH (1998) The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* **392**(6672): 186-190

Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**: 707-747

Ren S, Rollins BJ (2004) Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* **117**(2): 239-251

Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 897-907

Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mognol GP, Viola JP (2008) Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol* **28**(23): 7168-7181

Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT (2001) SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* **276**(16): 12654-12659

Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**(6662): 96-99

Salvesen GS, Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6): 401-410

Sanna B, Bueno OF, Dai YS, Wilkins BJ, Molkenin JD (2005) Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol* **25**(3): 865-878

Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP (2001) Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9575-9580

Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**(3): 1541-1548

Schuh K, Kneitz B, Heyer J, Bommhardt U, Jankevics E, Berberich-Siebelt F, Pfeffer K, Muller-Hermelink HK, Schimpl A, Serfling E (1998) Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *Eur J Immunol* **28**(8): 2456-2466

Schwering I, Brauninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann ML, Dalla-Favera R, Rajewsky K, Kuppers R (2003) Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **101**(4): 1505-1512

Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR (1988) Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**(4862): 202-205

Sheridan CM, Heist EK, Beals CR, Crabtree GR, Gardner P (2002) Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NF-ATc1 by priming

for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* **277**(50): 48664-48676

Sherr CJ (2000) The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **60**(14): 3689-3695

Sherr CJ (2004) Principles of tumor suppression. *Cell* **116**(2): 235-246

Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F (1996) Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* **382**(6589): 370-373

Smits VA, Medema RH (2001) Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta* **1519**(1-2): 1-12

Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16899-16903

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**(6718): 441-446

Terui Y, Saad N, Jia S, McKeon F, Yuan J (2004) Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem* **279**(27): 28257-28265

Timmerman LA, Healy JI, Ho SN, Chen L, Goodnow CC, Crabtree GR (1997) Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members. *J Immunol* **159**(6): 2735-2740

Tomono M, Toyoshima K, Ito M, Amano H (1996) Calcineurin is essential for DNA synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem J* **317** (Pt 3): 675-680

Tomono M, Toyoshima K, Ito M, Amano H, Kiss Z (1998) Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **353**(2): 374-378

Triezenberg SJ (1995) Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev* **5**(2): 190-196

Ueffing N, Schuster M, Keil E, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (2008) Up-regulation of c-FLIP short by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells. *Blood* **112**(3): 690-698

Uemura H, Chang C (1998) Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment. *Endocrinology* **139**(5): 2329-2334

van der Velden JL, Schols AM, Willems J, Kelders MC, Langen RC (2008) Glycogen synthase kinase 3 suppresses myogenic differentiation through negative regulation of NFATc3. *J Biol Chem* **283**(1): 358-366

van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenaabeele P (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* **8**(12): 1136-1142

Vaux DL, Silke J (2005) IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 287-297

Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR (2003) Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* **36**(3): 165-175

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36**(3): 131-149

Vihma H, Pruunsild P, Timmusk T (2008) Alternative splicing and expression of human and mouse NFAT genes. *Genomics* **92**(5): 279-291

Viola JP, Carvalho LD, Fonseca BP, Teixeira LK (2005) NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res* **38**(3): 335-344

Wang DZ, McCaffrey PG, Rao A (1995) The cyclosporin-sensitive transcription factor NFATp is expressed in several classes of cells in the immune system. *Ann N Y Acad Sci* **766**: 182-194

Wang Q, Ji Y, Wang X, Evers BM (2000) Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene. *Biochem Biophys Res Commun* **276**(2): 466-471

Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A (1994) Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* **367**(6460): 277-281

Wu CC, Hsu SC, Shih HM, Lai MZ (2003) Nuclear factor of activated T cells c is a target of p38 mitogen-activated protein kinase in T cells. *Mol Cell Biol* **23**(18): 6442-6454

Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A (1996) An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* **272**(5263): 892-895

Yang T, Davis RJ, Chow CW (2001) Requirement of two NFATc4 transactivation domains for CBP potentiation. *J Biol Chem* **276**(43): 39569-39576

Yang TT, Xiong Q, Enslin H, Davis RJ, Chow CW (2002) Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* **22**(11): 3892-3904

Yang TT, Yu RY, Agadir A, Gao GJ, Campos-Gonzalez R, Tournier C, Chow CW (2008) Integration of protein kinases mTOR and extracellular signal-regulated kinase 5 in regulating nucleocytoplasmic localization of NFATc4. *Mol Cell Biol* **28**(10): 3489-3501

Yiu GK, Toker A (2006) NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **281**(18): 12210-12217

Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A (2005) Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* **20**(4): 539-550

Yoshida H, Nishina H, Takimoto H, Marengere LE, Wakeham AC, Bouchard D, Kong YY, Ohteki T, Shahinian A, Bachmann M, Ohashi PS, Penninger JM, Crabtree GR, Mak TW (1998) The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* **8**(1): 115-124

Youn HD, Chatila TA, Liu JO (2000) Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J* **19**(16): 4323-4331

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**(3): 673-682

Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T, Volpert OV (2004) Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* **199**(11): 1513-1522

Zerfass-Thome K, Schulze A, Zwerschke W, Vogt B, Helin K, Bartek J, Henglein B, Jansen-Durr P (1997) p27KIP1 blocks cyclin E-dependent transactivation of cyclin A gene expression. *Mol Cell Biol* **17**(1): 407-415

Zhou B, Cron RQ, Wu B, Genin A, Wang Z, Liu S, Robson P, Baldwin HS (2002) Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2. *J Biol Chem* **277**(12): 10704-10711

Zhou P, Sun LJ, Dotsch V, Wagner G, Verdine GL (1998) Solution structure of the core NFATC1/DNA complex. *Cell* **92**(5): 687-696

Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* **15**(12): 1481-1486

8. ANEXOS

8.1 Teixeira, L. K., B. P. Fonseca, A. Vieira-de-Abreu, B. A. Barboza, B. K. Robbs, P. T. Bozza, and J. P. Viola. IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. J Immunol, v.175, n.9, Nov 1, p.5931-9. 2005.

8.2 Accioly, M. T., P. Pacheco, C. M. Maya-Monteiro, N. Carrossini, B. K. Robbs, S. S. Oliveira, C. Kaufmann, J. A. Morgado-Diaz, P. T. Bozza, and J. P. Viola. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. Cancer Res, v.68, n.6, Mar 15, p.1732-40. 2008.

8.3 Robbs, B. K., A. L. Cruz, M. B. Werneck, G. P. Mognol, and J. P. Viola. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. Mol Cell Biol, v.28, n.23, Dec, p.7168-81. 2008.

IFN- γ Production by CD8⁺ T Cells Depends on NFAT1 Transcription Factor and Regulates Th Differentiation¹

Leonardo K. Teixeira,* Bruna P. F. Fonseca,* Adriana Vieira-de-Abreu,[†] Bianca A. Barboza,* Bruno K. Robbs,* Patrícia T. Bozza,[†] and João P. B. Viola^{2*}

CD8⁺ T lymphocytes are excellent sources of IFN- γ ; however, the molecular mechanisms that dictate IFN- γ expression upon TCR stimulation in these cells are not completely understood. In this study, we evaluated the involvement of NFAT1 in the regulation of IFN- γ gene expression in murine CD8⁺ T cells and its relevance during Th differentiation. We show that CD8⁺, but not CD4⁺, T cells, represent the very first source of IFN- γ upon primary T cell activation, and also that the IFN- γ produced by naive CD8⁺ T cells may enhance CD4⁺ Th1 differentiation *in vitro*. TCR stimulation rapidly induced IFN- γ expression in CD8⁺ T lymphocytes in a cyclosporin A-sensitive manner. Evaluation of CD8⁺ T cells showed that calcium influx alone was sufficient to activate NFAT1 protein, transactivate IFN- γ gene promoter, and induce IFN- γ production. In fact, NFAT1-deficient mice demonstrated highly impaired IFN- γ production by naive CD8⁺ T lymphocytes, which were totally rescued after retroviral transduction with NFAT1-encoding vectors. Moreover, NFAT1-dependent IFN- γ production by the CD8⁺ T cell compartment was crucial to control a Th2-related response *in vivo*, such as allergic inflammation. Consistently, CD8 α - as well as IFN- γ -deficient mice did not mount a Th1 immune response and also developed *in vivo* allergic inflammation. Our results clearly indicate that IFN- γ production by CD8⁺ T cells is dependent of NFAT1 transcription factor and may be an essential regulator of Th immune responses *in vivo*. *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 5931–5939.

Upon T cell stimulation, CD4⁺ T lymphocytes may undergo a Th1/Th2 differentiation that is mostly characterized by the distinct pattern of cytokines they secrete. Th1 cells produce IFN- γ , which is essential for the eradication of intracellular pathogens, whereas Th2 cells secrete IL-4, IL-5, and IL-13, which are crucial to the elimination of extracellular organisms and to sustain allergic reactions. Several factors can influence the differentiation pathway of CD4⁺ Th cells, especially the cytokines prevailing within the microenvironment where these cells encounter Ags (1, 2). IL-12 and IFN- γ are known to be the major Th1-inducing cytokines (3). IFN- γ is a pleiotropic cytokine that is essential for both innate and adaptive immunities (4), and its role in CD4⁺ Th1 differentiation has been intensely addressed. *In vitro* studies have shown that IFN- γ exerts both indirect and direct effects during Th1 development (5, 6). It induces APCs to produce IL-12, which is of great importance during Th1 cell commitment (7, 8). In addition, IFN- γ is responsible for inducing/maintaining the expression of the β -chain of the IL-12R (IL-12R β 2) on CD4⁺ T cells, indicating an important role for IFN- γ in the Th1 effects mediated by IL-12 (9, 10). Furthermore, IFN- γ and Th1 responses are considered to be protective against Th2-related disorders such

as asthma and allergy (11–13). In animal models, the adoptive transfer of IFN- γ -producing cells into allergen-sensitized recipients has protected from airway eosinophilia after Ag challenge (14, 15). Defective IFN- γ production also predisposes toward the development of allergic diseases, and patients with severe asthma present significantly reduced IFN- γ production in response to allergen compared with control individuals (16, 17).

Different transcription factors have been shown to regulate IFN- γ gene expression in T lymphocytes (3, 18). In CD4⁺ T cells, T-bet, the master switch of the Th1 response, is a key regulator of IFN- γ production in developing Th1 lymphocytes (19). However, T-bet expression is induced by IFN- γ signaling pathway through STAT1, and thus is dependent on an initial source of IFN- γ (10, 20). Several cellular compartments of the immune system have been characterized as potential sources of IFN- γ *in vivo*, including NK cells and CD8⁺ T cells (21, 22). It has been suggested that CD8⁺ T cells may represent an early source of IFN- γ , which acts directly on CD4⁺ Th1 differentiation (22). Nevertheless, there are no available data concerning the involvement of TCR-induced transcription factors in the regulation of IFN- γ expression in CD8⁺ T cells.

NFAT proteins are pre-existing cytoplasmic transcription factors that are rapidly activated in T lymphocytes upon TCR stimulation (23). The activation of NFAT proteins requires sustained intracellular calcium levels that are induced shortly after TCR triggering (23, 24). Calcium influx then activates the Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin, which dephosphorylates NFAT (25, 26). Once activated, NFAT translocates to the nucleus, where it binds to regulatory sequences and regulates the expression of several cytokine genes, including IFN- γ (27, 28). The process of NFAT activation is blocked by immunosuppressive drugs, such as cyclosporin A (CsA)³ and FK506, which inhibit the phosphatase activity of calcineurin (29, 30). In fact, NFAT1-deficient mice

*Division of Cellular Biology, Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil; and [†]Laboratory of Immunopharmacology, Department of Physiology and Pharmacodynamics, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Received for publication February 4, 2005. Accepted for publication August 24, 2005.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from Instituto Nacional de Câncer/Fundação Ary Frauzino, Furnas Centrais Elétricas S.A. and Conselho Nacional de Pesquisas (to J.P.B.V.); and Howard Hughes Medical Institute and Conselho Nacional de Pesquisas (to P.T.B.). L.K.T. and B.A.B. were supported by an Instituto Nacional de Câncer/Fundação Ary Frauzino fellowship; B.P.F.F., A.V.-A. and B.K.R. were supported by a Conselho Nacional de Pesquisas fellowship.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. João P. B. Viola, Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti 37, Rio de Janeiro, Brasil 20231-050. E-mail address: jpviola@inca.gov.br

³ Abbreviations used in this paper: CsA, cyclosporin A; EGFP, enhanced GFP; Eomes, eomesodermin; IRES, internal ribosomal entry sequence.

(NFAT1^{-/-}) present a preferential differentiation toward a Th2 phenotype, including low levels of IFN- γ and high levels of IL-4 (31, 32). Consistently, CD4⁺ T cells from NFAT1^{-/-} mice present an impaired IFN- γ production (33), but no reports regarding the participation of NFAT1 in the regulation of IFN- γ in CD8⁺ T lymphocytes have been described.

Thus, we addressed the involvement of NFAT1 transcription factor in the regulation of IFN- γ production in CD8⁺ T cells and its influence on Th1/Th2 immune responses using *in vitro* and *in vivo* models of Th differentiation. In this study we show that naive CD8⁺ T cells do produce high levels of IFN- γ upon TCR triggering during the primary response, which is dependent on NFAT1 transcription factor. Also, we demonstrate that IFN- γ production by the CD8⁺ T cell compartment enhances CD4⁺ Th1 differentiation *in vitro* and is crucial to control allergic inflammation, which has been related to a Th1/Th2 immune response deregulation. Our results thus suggest that NFAT1 protein plays a positive regulatory role in IFN- γ production in CD8⁺ T cells, which may modulate Th immune response *in vivo*.

Materials and Methods

Animals, cells, and reagents

C57BL/6, NFAT1^{-/-}, CD8 α ^{-/-}, and IFN- γ ^{-/-} 8- to 12-wk-old female mice were used in all experiments. Animals were bred and maintained in the Brazilian National Cancer Institute animal facility. Animals were treated according to the animal care guidelines of the Council for International Organizations of Medical Sciences. All primary cells (lymph nodes, CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes) and the mouse CD8⁺ CTLL-R8⁺ cell line were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, L-glutamine, streptomycin-penicillin, essential and nonessential amino acids, sodium pyruvate, vitamins, and 2-ME (all from Invitrogen Life Technologies). Hybridomas 2C11 (anti-CD3) and 53-6.7 (anti-CD8) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. All Abs were purified from hybridoma supernatants by chromatography over protein G (Amersham Biosciences), and their activities were functionally tested by cellular proliferation, complement-dependent depletion, and ELISA. The cytokines IFN- γ , IL-2, IL-12, and IL-18 were purchased from PepruTech. The polyclonal Ab 67.1 (Dr. A. Rao, Harvard University, Boston, MA) was used to detect the NFAT1 protein. PMA and ionomycin were obtained from Calbiochem, and the immunosuppressive drug CsA was obtained from LC Laboratories. CFA and OVA were purchased from Sigma-Aldrich. The solutions of May-Grünwald and Giemsa were obtained from Merck. Polybrene (hexadimethrin bromide) was obtained from Fluka Chemie, and chondroitin 6-sulfate sodium salt was purchased from Sigma-Aldrich.

Cell isolation and flow cytometry

In all experiments, different cell populations (CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cells) were obtained from lymph nodes (inguinal, brachial, axillary, and superficial cervical). Purified single-cell suspensions were isolated by negative selection with magnetic beads (Micro Beads, MACS technology) according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Streptavidin magnetic beads were conjugated to specific-biotinylated Abs (anti-CD4, anti-CD8, and anti-B220/CD45R) to sort out undesired cell populations. For cytometric analysis, cells were stained with specific fluorochrome-labeled Abs as previously described (32). Labeled mAbs were all obtained from BD Pharmingen, and cells were analyzed by flow cytometry on a FACScan (BD Biosciences). Cell populations were isolated to >95% purity.

CD4⁺ Th differentiation

CD4⁺ and CD8⁺ T cells were purified from C57BL/6 (IFN- γ ^{+/+}) or IFN- γ ^{-/-} as described. For cocultivation assays, CD4⁺ T cells from IFN- γ ^{+/+} mice were cultured together with CD8⁺ T cells from either IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice (CD4:CD8 ratio, 2:1) and primarily stimulated *in vitro* for 72 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml) in the presence of IL-12 (10 ng/ml). On the third day, cells were harvested, washed, and rested for 48 h. After resting, CD4⁺ T cells were isolated again as described and were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 48 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, cell-free supernatants were assessed for IFN- γ or IL-4 by ELISA.

ELISA and intracellular cytokine staining

Cells were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 24, 48, or 72 h at 37°C with different stimuli as indicated. Cell-free supernatant was as-

essed for IFN- γ and IL-4 protein levels by ELISA according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen). For intracellular cytokine staining, indicated cell populations (1 \times 10⁶ cells) from naive C57BL/6, NFAT1^{+/+}, and NFAT1^{-/-} mice were stimulated *in vitro* for 72 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). Brefeldin A (1/1000; Cytofix/Cytoperm; BD Pharmingen) was added to the culture 5 h before the staining procedure. Briefly, cells were harvested, and surface markers were stained with anti-CD8-FITC or anti-CD4-FITC Ab. Cells were next fixed and permeabilized for intracellular cytokine staining with anti-IFN- γ -PE Ab, then analyzed by flow cytometry.

RNase protection assays, Western blot, and immunofluorescence staining

For RNase protection assay analysis, purified CD8⁺ T cells (2 \times 10⁶ cells) from C57BL/6 mice were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 6 h at 37°C with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml) as indicated. CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before anti-CD3 stimulation. Total RNA was immediately extracted with TRIzol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen Life Technologies). mRNA expression was analyzed with a multiprobe RNase protection assay kit (Ribo-Quant; BD Pharmingen). For IFN- γ expression analysis, mCK-1 and mCK-2 multiprobe sets were used, and RNA loading was estimated by measuring GAPDH and L32 housekeeping genes.

To detect the presence of the NFAT1 protein, purified CD8⁺ T cells from C57BL/6 mice or the CTLL-R8⁺ cell line (2 \times 10⁶ cells) were left unstimulated or were *in vitro* stimulated for 15 min at 37°C with ionomycin (5 μ M). CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before stimulation. Total protein lysates were obtained as previously described (26). Briefly, cells were lysed in buffer containing 40 mM Tris (pH 7.5), 60 mM sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, and 5% SDS, followed by incubation at 100°C for 20 min. Small-scale nuclear extracts were made as previously described (34). Briefly, cells were resuspended in buffer containing 0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris (pH 7.5), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EGTA, 2 mM leupeptin, 1 mg/ml aprotinin, and 1 mM PMSF. The supernatant was removed to a separate tube, and the nuclear pellet was lysed in the same buffer as described above. Cell extracts were analyzed by electrophoresis on 6% SDS-PAGE. The separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane, and NFAT1 protein was detected by the polyclonal Ab 67.1 as previously described (26).

Intracellular localization of NFAT1 protein was addressed in purified CD8⁺ T cells (2 \times 10⁵ cells) from C57BL/6 mice by immunofluorescence staining, also as previously described (26). Briefly, cells were attached to coverslips previously coated for 1 h with 2% gelatin and were left unstimulated or were stimulated for 16 h at 37°C with ionomycin (5 μ M). CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before ionomycin. Then cells were fixed in 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Nonidet P-40, and stained with anti-NFAT1 67.1 Ab. The cells were photographed under \times 100 magnification with a Zeiss Axiovert S100 microscope.

Retroviral construction and lymphocyte transduction

The pLIREs-EGFP bicistronic vector was constructed by inserting a 1.4-kb *BgIII*-*NotI* fragment from the pIRES2-EGFP vector (BD Clontech), comprising the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry sequence (IRES) and the enhanced GFP (EGFP) coding region, into the pLEGFP-N1 retroviral vector (BD Clontech; pLIREs-EGFP-empty). To generate the retroviral vector encoding for NFAT1, the full-length cDNA from NFAT1 isoform C was cloned into the pLIREs-EGFP (pLIREs-EGFP-NFAT1). Then, the BD Eco-Pack2 ecotropic packing cell line (BD Biosciences) was transiently transfected with retroviral vectors by calcium phosphate precipitation for 16 h. Cell-free virus-containing supernatant was collected 48 h after transfection, and concentrated as previously described (35). The supernatant was supplemented with IL-2 (20 U/ml), and immediately used for spin infection (twice, 45 min each time, 1800 rpm, room temperature) of purified CD8⁺ T cells from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice previously stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) for 24 h. Infected cells were incubated at 37°C for an additional 48 h, supplemented with fresh medium, and stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) for another 48 h. Cells were then stained for intracellular cytokine as described above, and EGFP⁺ CD8⁺ lymphocytes were analyzed by flow cytometry for IFN- γ production as described.

Transactivation assays

CTLL-R8⁺ cell line (2 \times 10⁶ cells) was electroporated (950 μ F, 250 V) in a 0.4-cm GenePulser Cuvette (Bio-Rad) with 5 μ g of the indicated IFN- γ -promoter constructs fused to a luciferase reporter gene (Luc; donated by Dr. C. Wilson, University of Washington, Seattle, WA) (28) in serum-free

medium. After 24 h, cells were washed and left unstimulated or were stimulated in vitro for 16 h at 37°C with PMA (10 nM) or ionomycin (5 μ M) as indicated. CsA (5 μ M) was added to cells 15 min before any other treatment when indicated. The next day, cells were harvested, and lysis was performed for 20 min at room temperature with 50 μ l of 1 \times cell culture lysis reagent (Promega). Crude extract (10 μ l) was added to 100 μ l of luciferase assay substrate (Promega). Luciferase activity was promptly measured in a Monolight 3010 Luminometer (Analytical Luminescence Laboratory) and was expressed as relative light units.

Eomesodermin (Eomes) RT-PCR

Purified CD8⁺ T cells (2×10^6 cells) from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice were left unstimulated (0 h) or were in vitro stimulated for the indicated time periods at 37°C with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies), and semiquantitative RT-PCR for murine Eomes expression was performed using the Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads, according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). The primers used were as follows: Eomes, 5'-GCC CAC GTC TAC CTG TGC AAC CG-3' and 5'-TGT TAT TGG TGA GTT TTA ACT TCC C-3' (334-bp product); and GAPDH, 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3' and 5'-ACG ACA TAC TCA GCA CCA GCA TCA-3' (276-bp product). PCR conditions were as follows: 95°C for 3 min; 35 cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 45 s; and final elongation at 72°C for 10 min. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels and visualized with ethidium bromide.

Pleurisy model

Naive animals were s.c. sensitized with 200 μ g (0.1 ml) of OVA emulsified in CFA in a hind footpad, as previously described (36). Fifteen days later, animals were intrathoracically challenged with PBS or OVA (12 μ g) as indicated. After 24 h, thoracic cavity was rinsed with 1 ml of PBS/0.1% BSA. Cells were then cytocentrifuged and stained with May-Grünwald/Giemsa for differential leukocyte analysis. Draining lymph nodes (popliteal and inguinal) were harvested, and cells (2×10^6 cells) were stimulated in vitro for 48 h with plate-bound anti-CD3 (1 μ g/ml). Cell-free supernatants were then assessed for IFN- γ and IL-4 by ELISA. For in vivo CD8⁺ T cell depletion, NFAT1^{+/+} mice were i.v. treated with anti-CD8 Ab (100 μ g/animal) every 2 days in a total of five injections before sensitization (NFAT1^{+/+} and anti-CD8). Thereafter, mice continued to be treated with anti-CD8 Ab (100 μ g/animal) every 2 days until challenge. CD8⁺ T cell depletion was evaluated by flow cytometry of lymph nodes, which always showed <3% CD8⁺ T cells.

Statistical analysis

Statistical analysis of values from wild type (+/+) and knockout (-/-) mice and between control and treated groups was performed using unpaired Student's *t* test for single comparison. A value of *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Influence of IFN- γ produced by CD8⁺ T cells on CD4⁺ Th1 differentiation

The cytokine IL-12 was initially characterized as the dominant cytokine influencing the Th1 phenotype (3, 7, 8). However, additional studies have shown that other cytokines, such as IFN- γ , may also play a role during Th1 development (5, 6). In an in vitro model of Th differentiation, disruption of IFN- γ R signaling pathway drastically reduced IFN- γ production by CD4⁺ T cells even when stimulated in the presence of IL-12, indicating that IFN- γ directly enhances CD4⁺ Th1 differentiation (data not shown). Several cellular sources of IFN- γ may enhance CD4⁺ Th1 differentiation, such as NK, dendritic cells and CD8⁺ T cells (3, 21, 22). As shown in Fig. 1A, upon TCR stimulation of primary lymph node cells, CD8⁺ T lymphocytes represent the very first source of IFN- γ production. To specifically address the influence of the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells on CD4⁺ Th1 differentiation, naive CD4⁺ T lymphocytes cultivated together with CD8⁺ T cells from IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice were stimulated in vitro for 72 h with anti-CD3. After this primary stimulation, CD4⁺ T lymphocytes were purified, stimulated in vitro, and assessed for their ability to produce IFN- γ and IL-4. We observed in this study that

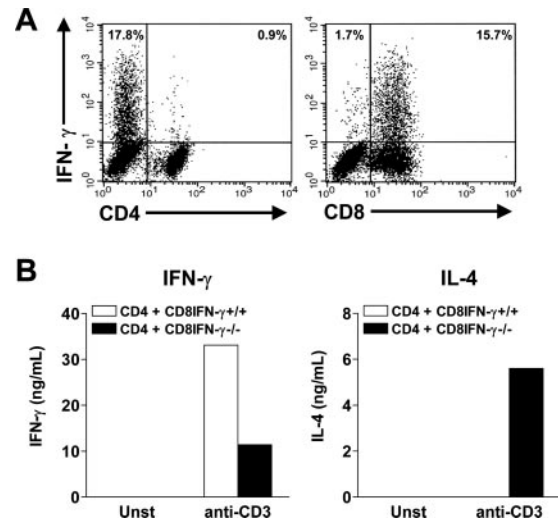


FIGURE 1. IFN- γ produced by CD8⁺ T lymphocytes enhances CD4⁺ Th1 differentiation. *A*, Total lymph node cells from naive C57BL/6 mice were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, cells were analyzed for intracellular IFN- γ production at 72 h as described. Data are representative of three independent animals. *B*, Purified CD4⁺ T lymphocytes from IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice were cultivated together with CD8⁺ T cells from IFN- γ ^{+/+} or IFN- γ ^{-/-} mice, and then stimulated in vitro for 72 h with anti-CD3 (1 μ g/ml) in the presence of IL-12 (10 ng/ml). On the third day, cells were rested for 48 h. After resting, CD4⁺ T cells were purified again and were left unstimulated (Unst) or were stimulated in vitro for 48 h with anti-CD3 (1 μ g/ml). Cell-free supernatants were assessed for IFN- γ and IL-4 by ELISA. All results are from a pool of three mice and are representative of two independent experiments.

CD4⁺ T cells, which were cocultivated with IFN- γ -competent CD8⁺ T cells, clearly produce more IFN- γ and less IL-4 than those cocultivated with IFN- γ -deficient CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 1B). Thus, our results demonstrate that the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells enhances Th1 phenotype development of CD4⁺ T lymphocytes during primary stimulation in vitro.

IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes

The molecular mechanisms that control IFN- γ gene expression in CD4⁺ Th cells are widely known; however, the mechanisms that dictate its expression in CD8⁺ T lymphocytes are not completely elucidated. Thus, we decided to address the molecular pathways by which CD8⁺ T cells produce IFN- γ . We show in this study that purified naive CD8⁺ T cells produce IFN- γ upon TCR stimulation, but not in response to IL-12/IL-18 treatment alone (Fig. 2A). We also observed that the IFN- γ production level was not altered when anti-CD28 costimulation was administered together with anti-CD3 (data not shown). However, IL-12/IL-18 administration highly increased IFN- γ levels when associated with TCR triggering, suggesting that both cytokines may play a secondary role on TCR-induced IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 2B). To evaluate the influence of other pathways in IFN- γ production, we stimulated naive CD8⁺ T cells with different stimuli. Surprisingly, ionomycin-driven Ca²⁺ influx was sufficient to induce IFN- γ production in CD8⁺ T cells, which was slightly potentiated by PMA administration (Fig. 2C). However, PMA stimulation alone was not sufficient to induce IFN- γ production in these cells (Fig. 2C). In addition, we found that IFN- γ expression is totally dependent on TCR stimulation, because IFN- γ transcript levels could be detected as early as 6 h after TCR triggering, but not in unstimulated CD8⁺ T cells (Fig. 2D). In this study, we also show that IFN- γ expression/production by CD8⁺ T lymphocytes is totally inhibited when CsA is administered together

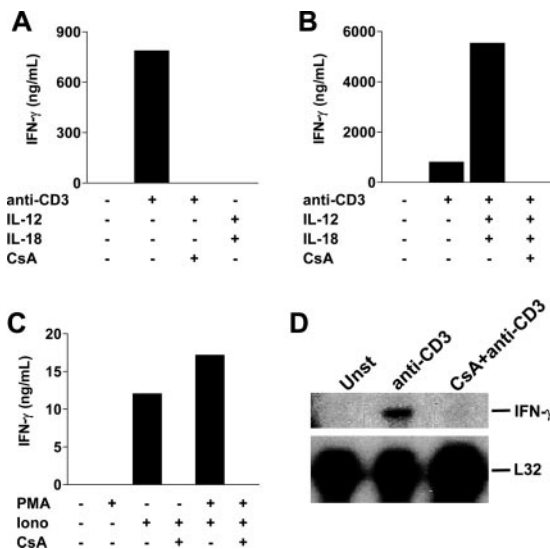


FIGURE 2. TCR triggering induces IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes in a CsA-sensitive manner. CD8⁺ T lymphocytes were purified from naive C57BL/6 mice as described, and then left unstimulated or stimulated in vitro as indicated: anti-CD3 (1 μ g/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-18 (50 ng/ml), PMA (10 nM), ionomycin (Iono; 5 μ M), or CsA (5 μ M). CsA was added 15 min before the other treatments. *A–C*, Analysis of IFN- γ production by CD8⁺ T cells after 72 h of stimulation as indicated. Cell-free supernatant was assessed for IFN- γ by ELISA. *D*, Analysis of IFN- γ expression in CD8⁺ T cells by RNase protection assay after 6 h of stimulation. RNA loading was estimated by measuring the intensity of L32 housekeeping ribosomal protein gene. All results are from a pool of three mice and are representative of three independent experiments.

with any other stimulus (Fig. 2). These results clearly demonstrate that CD8⁺ T lymphocytes are competent for IFN- γ production upon TCR engagement, and IFN- γ expression was totally inhibited by CsA at the transcriptional level.

CD8⁺ T lymphocytes present functional NFAT1 protein

The activation of NFAT transcription factors requires sustained intracellular Ca²⁺ levels induced by TCR engagement (23). Calcium influx then activates the Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin, which is blocked by the immunosuppressive drug CsA (23). Taking into account that IFN- γ expression is Ca²⁺ dependent and blocked in a CsA-sensitive manner, we decided to investigate whether CD8⁺ T lymphocytes presented NFAT transcription factor. We demonstrate for the first time, to our knowledge, that naive CD8⁺ T cells do present inactive endogenous NFAT1 transcription factor (phosphorylated form), which is activated by ionomycin-induced Ca²⁺ influx (dephosphorylated form), and blocked by CsA (Fig. 3). In fact, ionomycin treatment not only led to NFAT1 dephosphorylation, but also resulted in NFAT1 nuclear translocation, which was again blocked by CsA as observed by Western blot of nuclear lysate and immunofluorescence staining of CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 3).

Effect of NFAT transcription factor on IFN- γ promoter

We then examined the ability of NFAT transcription factor to regulate the IFN- γ promoter in a CD8⁺ T cell line. The CTLL-R8⁺ cell line presents endogenous NFAT1 whose activation is induced by ionomycin and blocked by CsA (Fig. 4A). Moreover, the CTLL-R8⁺ cell line did not produce IFN- γ when maintained in culture without stimulation, but ionomycin treatment was sufficient to induce its production, as assessed by ELISA (data not shown). We then transiently transfected these cells with different IFN- γ promoter constructs containing NFAT-binding sites and driving

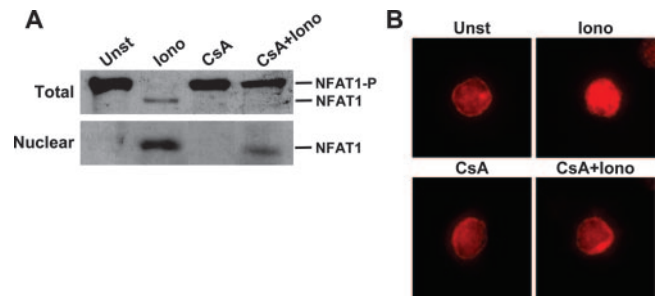


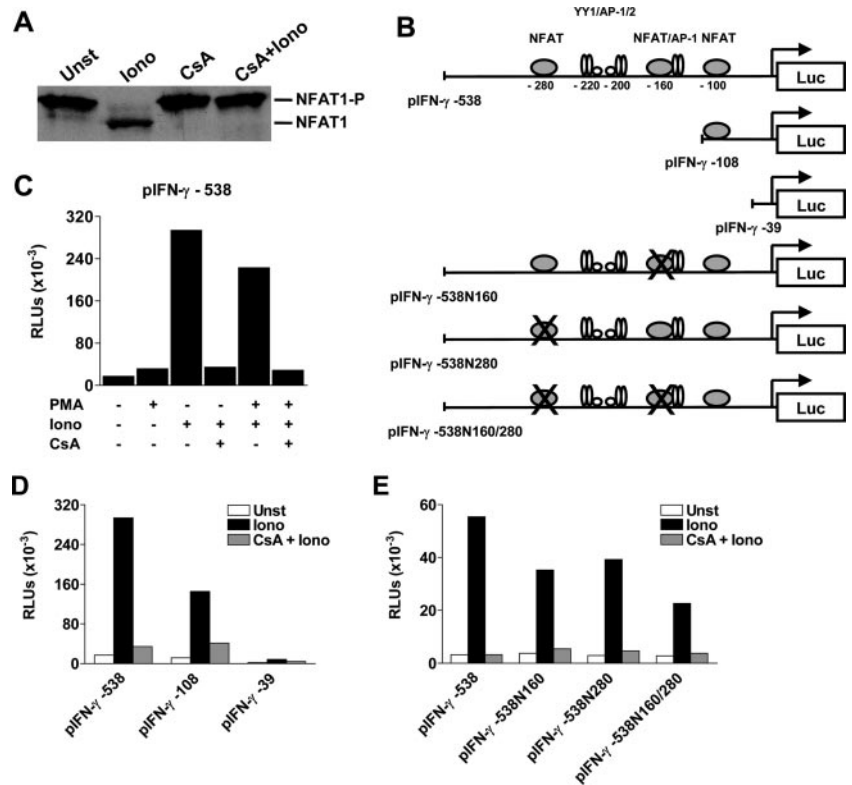
FIGURE 3. NFAT1 is dephosphorylated and translocated to the nucleus in CD8⁺ T lymphocytes after Ca²⁺ influx. CD8⁺ T lymphocytes were purified from naive C57BL/6 mice as described, and then left unstimulated (Unst) or stimulated in vitro as indicated: ionomycin (Iono; 5 μ M) or CsA (5 μ M). CsA was added 15 min before ionomycin. *A*, Detection of NFAT1 transcription factor in CD8⁺ T cells in total lysates (Total; upper panel) or nuclear lysates (Nuclear; lower panel) by Western blot analysis after 15 min of stimulation. NFAT1, dephosphorylated NFAT1; NFAT1-P, phosphorylated NFAT1. *B*, Cellular localization of NFAT1 protein in CD8⁺ T cells by immunofluorescence staining after 15 min of stimulation. All results are representative of at least two independent experiments.

the luciferase reporter gene (Fig. 4B). Three NFAT-binding sites were approximately identified at positions -100, -160, and -280 bp through the proximal 538 bp of the IFN- γ promoter (pIFN- γ -538; Fig. 4B) (28). Interestingly, ionomycin stimulation was sufficient to highly transactivate the IFN- γ proximal promoter construct pIFN- γ -538 (Fig. 4C). In accordance with primary CD8⁺ T cells results, PMA administration alone did not induce luciferase activity or enhance reporter expression when associated with ionomycin, indicating that ionomycin-driven Ca²⁺ influx alone was sufficient to induce optimal response (Fig. 4C). The partial promoter construct pIFN- γ -108, which contained a single NFAT-binding site, still showed 50% luciferase activity compared with the full-length promoter construct (Fig. 4D). Again, IFN- γ promoter activity remained sensitive to CsA (Fig. 4, C and D). However, promoter construct pIFN- γ -39 showed no luciferase expression at all (Fig. 4D). To evaluate the direct role of NFAT on IFN- γ promoter transactivation, we analyzed the effects of point mutations in different NFAT binding sites (Fig. 4B) (28). As shown in Fig. 4E, point mutations at the NFAT -160 site (N160), -280 site (N280), or both sites (N160/N280) decreased luciferase activity compared with the wild-type pIFN -538 construct. Point mutation at both sites (N160/N280) decreased luciferase expression by an average of 50% compared with the pIFN -538 construct, which is similar to the reduction observed in the pIFN- γ -108 construct (Fig. 4, D and E). It is still important to note in this study the presence of a third intact NFAT binding site at position -100, which could explain at least some of the luciferase activity observed in the double mutant (N160/N280) and pIFN -108 constructs (Fig. 4, D and E). This site might play an important unrecognized role in IFN- γ promoter regulation in CD8⁺ T cells. Moreover, luciferase expression always remained sensitive to CsA in all constructs (Fig. 4, D and E). Based on these results, we conclude that NFAT transcription factor plays a positive role in regulation of the IFN- γ promoter in the CD8⁺ T cell compartment.

Involvement of NFAT1 in IFN- γ production by CD8⁺ T cells

To unequivocally test the hypothesis that NFAT1 is required for IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes, we evaluated intracellular IFN- γ production by these cells in NFAT1-deficient mice (NFAT1^{-/-}). Strikingly, upon stimulation of purified naive CD3⁺ T lymphocytes from NFAT1^{+/+} mice, CD8⁺, but not CD4⁺, T

FIGURE 4. NFAT is able to transactivate IFN- γ promoter in the CD8⁺ T cell line. CTLL-R8⁺ cells were left unstimulated (Unst) or were stimulated in vitro as indicated: ionomycin (Iono; 5 μ M), PMA (10 nM), or CsA (5 μ M). CsA was added 15 min before the other treatments. **A**, Detection of NFAT1 transcription factor in CTLL-R8⁺ cells by Western blot analysis 15 min after stimulation. NFAT1, dephosphorylated NFAT1; NFAT1-P, phosphorylated NFAT1. **B**, Schematic view of the plasmid constructs used in the transactivation assay. Different IFN- γ -promoter constructs containing NFAT-binding sites were used: pIFN- γ -538 (proximal 538 bp of IFN- γ promoter), pIFN- γ -108, pIFN- γ -39, pIFN- γ -538N160 (point mutation in the NFAT -160 site), pIFN- γ -538N280 (point mutation in the NFAT1 -280 site), and pIFN- γ -538N160/N280 (double mutation). Element binding sites for the transcription factors NFAT, AP-1, AP-2, and YY-1 are indicated. **C–E**, CTLL-R8⁺ cells were transfected with the indicated IFN- γ -promoter constructs and left unstimulated (Unst) or stimulated in vitro for 16 h as indicated. Then luciferase activity (Luc) was measured, and gene reporter activity was expressed as relative light units (RLUs). All results are representative of at least two independent experiments.



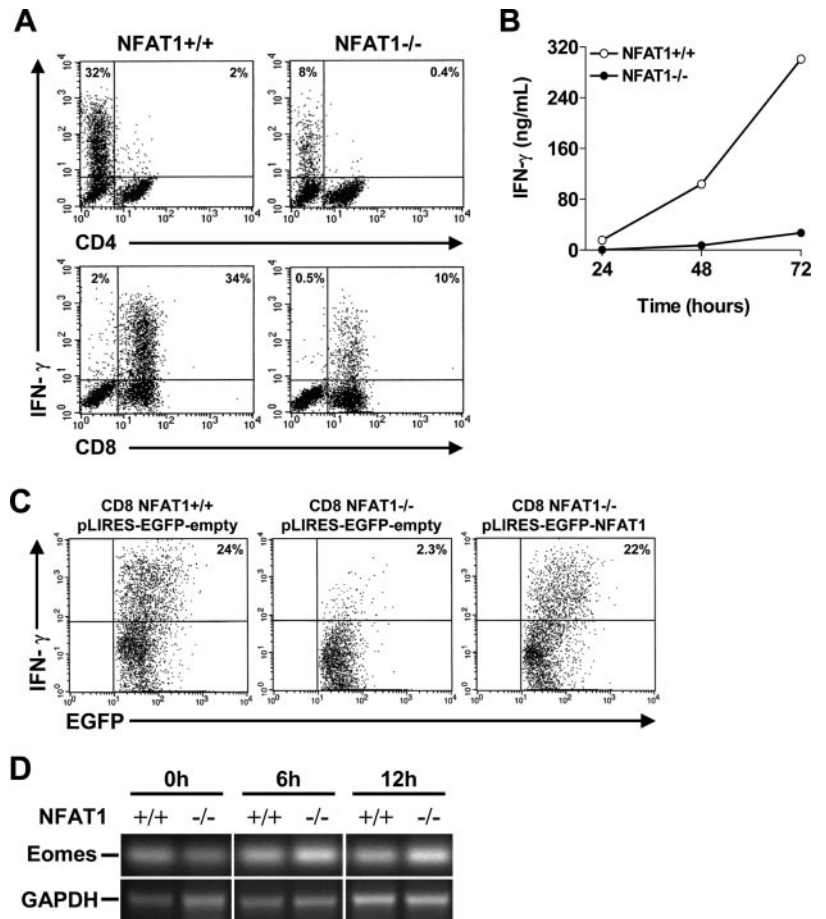
cells represented the main source of IFN- γ during the primary response (Fig. 5A). Furthermore, NFAT1^{-/-} mice showed a 3-fold decrease in the frequency of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells compared with NFAT1^{+/+} mice after 72 h of in vitro stimulation (Fig. 5A). Also, NFAT1^{-/-} CD8⁺ T cells showed a drastic impairment of IFN- γ production compared with NFAT1^{+/+} CD8⁺ T cells, as assessed by ELISA (Fig. 5B). To investigate the essential role of NFAT1 transcription factor during IFN- γ expression in CD8⁺ T cells, NFAT1^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes were retrovirally transduced with an NFAT1-encoding vector. As shown in Fig. 5C, CD8⁺ T cells from NFAT1^{-/-} mice infected with pLIREs-EGFP-empty construct showed drastically decreased IFN- γ -producing cells compared with NFAT1^{+/+} CD8⁺ T cells infected with the same construct. However, the frequency of IFN- γ -producing cells was rescued in NFAT1^{-/-} CD8⁺ T cells retrovirally transduced with NFAT1-encoding vector (pLIREs-EGFP-NFAT1) to the same levels as the NFAT1^{+/+} CD8⁺ T cells (Fig. 5C). Although these results clearly demonstrate that IFN- γ expression in CD8⁺ T lymphocytes is extremely dependent on NFAT1, we also decided to investigate the expression levels of the transcription factor Eomes, which has been shown to be responsible for IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes (37). As shown in Fig. 5D, no differences were observed on Eomes gene expression levels in CD8⁺ T lymphocytes from NFAT1^{+/+} compared with NFAT1^{-/-} mice. Thus, our results clearly demonstrate that the IFN- γ produced by T lymphocytes upon TCR stimulation primarily originates from CD8⁺ T cells and depends mostly on NFAT1 transcription factor.

In vivo consequences of NFAT1-dependent IFN- γ production

To further characterize the relevance of the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells during in vivo Th immune responses, we took advantage of a well-defined pleurisy model. Allergic diseases are usually characterized by eosinophil tissue infiltration, increase in the level of serum IgE, and a Th2 pattern of cytokine production,

including IL-4, IL-5, and IL-13, which is totally dependent on CD4⁺ T lymphocytes (38). It has been clearly shown that Th1 cytokines, such as IFN- γ and IL-12, may suppress and counteract the Th2 response of some allergic diseases (11, 12). Thus, we asked whether NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T cells could modulate the Th1/Th2 immune response and control allergic inflammation in vivo. We performed a pleurisy model of allergic inflammation to evaluate the influence of IFN- γ on eosinophil infiltration and cytokine production profile. As previously demonstrated, we show in this study that NFAT1^{-/-} mice present more eosinophils in the pleural cavity than wild-type mice after Ag challenge (Fig. 6) (36, 39). Reinforcing our proposal, in vivo depletion of CD8⁺ T cells from wild-type mice (NFAT1^{+/+} plus anti-CD8) led to eosinophilia in the pleural cavity similar to levels in NFAT1^{-/-} mice (Fig. 6). Consistently, CD8 α ^{-/-} and IFN- γ ^{-/-} mice also presented more pleural eosinophils compared with respective wild-type mice (Fig. 6). To better understand the immune response generated in vivo in this model, we analyzed the cytokine production profile after restimulation ex vivo. As shown in Fig. 7, NFAT1^{-/-} mice presented an enhanced Th2 phenotype, including higher levels of IL-4 production and lower levels of IFN- γ compared with wild-type mice. Surprisingly, CD8⁺ T cell-depleted NFAT1^{+/+} mice, which presented eosinophilia similar to NFAT1^{-/-} mice, did not show high levels of IL-4 production (Fig. 7). However, IFN- γ production was strikingly decreased to levels similar to those in NFAT1^{-/-} mice (Fig. 7). Consistently, the frequency of IFN- γ -competent CD4⁺ T cells in CD8⁺ T cell-depleted mice was also decreased to the level in NFAT1^{-/-} mice as analyzed by intracellular cytokine staining (data not shown). Interestingly, CD8 α ^{-/-} mice also presented a highly decreased IFN- γ response compared with respective wild-type mice, but showed a mild increase in IL-4, which was observed in IFN- γ ^{-/-} mice (Fig. 7). These results suggest that NFAT1 transcription factor-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T cells plays a crucial role in eosinophil migration in this model of allergic inflammation

FIGURE 5. NFAT1 is crucial for IFN- γ production in CD8⁺ T lymphocytes. *A*, CD3⁺ T lymphocytes were purified from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice as described and were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). After stimulation, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed for intracellular IFN- γ production at 72 h as described. *B–D*, CD8⁺ T lymphocytes were purified as described from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice and were stimulated in vitro with anti-CD3 (1 μ g/ml). *B*, Cell-free supernatants of stimulated cells were assessed for IFN- γ by ELISA at the indicated time points. *C*, Cells were transduced with either pLIRESEGFP-empty or -NFAT1 vector after 24 h of stimulation. Then, EGFP⁺ cells were analyzed by flow cytometry for intracellular IFN- γ production at 96 h as described. *D*, Eomes gene expression was analyzed by semiquantitative RT-PCR at the indicated time points. RNA loading was estimated by measuring the intensity of the GAPDH housekeeping gene. All results are from a pool of three mice and are representative of at least two independent experiments.



and may be important to control Th immune responses and allergic diseases in vivo.

Discussion

In this study, we have demonstrated that IFN- γ production by CD8⁺ T cells during the primary response is dependent on NFAT1 transcription factor. Little is known about the molecular mechanisms that regulate IFN- γ production in CD8⁺ T cells. T-bet, the master switch of the Th1 response, is a key regulator of IFN- γ expression in CD4⁺ T cells (19). Nonetheless, it is noteworthy that T-bet expression is induced through the IFN- γ signaling pathway, and thus its effects are dependent on an initial source of this cytokine (10, 20). Pearce et al. (37) have shown that the transcription factor Eomes, a T-bet paralog, controls effector functions of CD8⁺ T cells, including IFN- γ

production. However, this transcription factor is highly induced in activated CD8⁺ T lymphocytes, but moderately detectable in naive CD8⁺ T cells (37). Also, the regulatory mechanisms that dictate Eomes gene expression in CD8⁺ T lymphocytes are not completely elucidated. In fact, Eomes expression was induced in CD8⁺ T cells early after TCR triggering (Fig. 5D), but this does not seem to explain the striking differences observed in IFN- γ production by NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes.

By contrast, the NFAT family of transcription factors is largely known to be activated soon after TCR stimulation. Within minutes after Ca²⁺ influx, NFAT translocates to the nucleus and binds to regulatory sequences of the IFN- γ promoter region, regulating its expression (23, 27, 28). In this study we have shown that ionomycin-induced calcium influx was sufficient for IFN- γ production

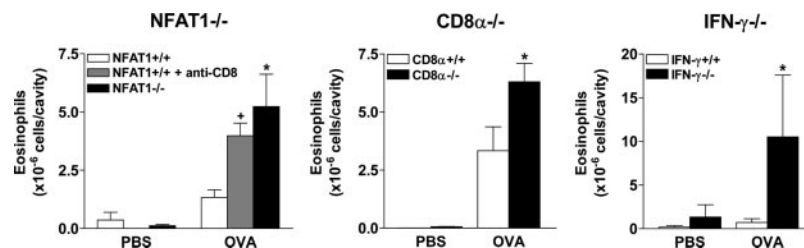
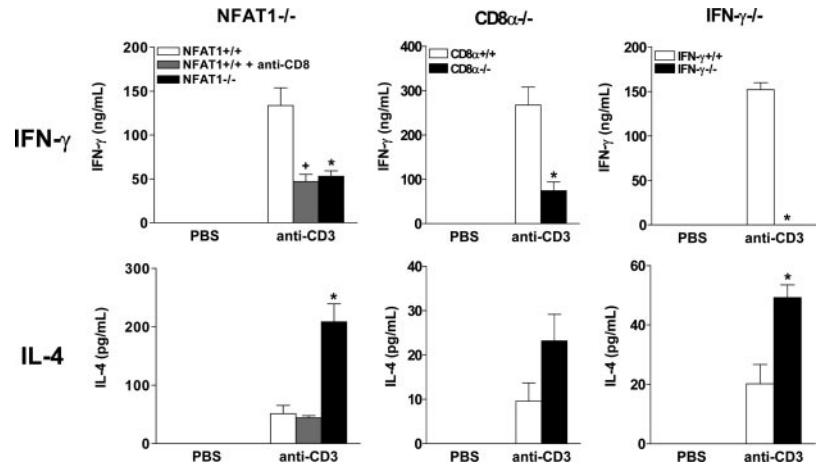


FIGURE 6. NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes controls eosinophilia in vivo. Naive animals (NFAT1^{+/+}, NFAT1^{-/-}, CD8 α ^{+/+}, CD8 α ^{-/-}, IFN- γ ^{+/+}, and IFN- γ ^{-/-}) or CD8⁺ T cell-depleted mice (NFAT1^{+/+} plus anti-CD8) were s.c. sensitized with OVA (200 μ g) emulsified in CFA in a hind footpad as described. Fifteen days later, animals were intrathoracically challenged with PBS or OVA (12 μ g) as indicated. After 24 h, the thoracic cavity was assessed for differential leukocyte analysis. The total number of pleural eosinophils is shown in control (PBS) and treated (OVA) groups. Data are expressed as the mean \pm SEM of values from five mice and are representative of two independent experiments. *, Significantly different from wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$); +, significantly different from non-CD8⁺ T cell-depleted, wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$).

FIGURE 7. IFN- γ production by CD8⁺ T cells regulates the cytokine profile in vivo. Naive animals were treated as described in Fig. 6. One day after challenge, the draining lymph nodes (popliteal and inguinal) of the indicated animals were stimulated in vitro for 48 h with anti-CD3 (1 μ g/ml). Then cell-free supernatants were assessed for IFN- γ and IL-4 by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SEM values from five mice and are representative of two independent experiments. *, Significantly different from wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$); +, significantly different from non-CD8⁺ T cell-depleted, wild-type, OVA-challenged mice ($p < 0.05$).



in naive CD8⁺ T lymphocytes. In fact, the three NFAT-binding sites identified in the proximal regulatory region of the IFN- γ promoter are required for maximum inducibility of this gene in Jurkat T cells and primary murine splenocytes (27, 28). Consistently, CD4⁺ T lymphocytes lacking NFAT1 display a substantial defect in IFN- γ gene expression, independent of the down-regulatory effects of IL-4 and GATA-3 (33). It has also been proposed that NFAT transcription factors may act as candidates to drive early transcription of cytokine genes in T cells, because they can recruit histone acetyltransferases and thus initiate localized histone modification in the IFN- γ promoter region (40–42). Thus, TCR-inducible transcription factors, such as NFAT1, may represent the very first switch on IFN- γ production in CD8⁺ T cells.

The local cytokine microenvironment is fundamental to define the Th1/Th2 balance that CD4⁺ T cells may undergo during Ag recognition (1, 2). The cytokine IFN- γ induces IL-12 production by APCs and also up-regulates the expression of IL-12R β 2 on CD4⁺ T cells through the activation of T-bet (7–10). Both mechanisms are widely known to promote/enhance CD4⁺ Th1 differentiation (3). Myeloid cells, such as dendritic cells and macrophages, represent an early source of IFN- γ and IL-12 in the innate arm of the immune system (3, 4). In fact, CD8a⁺ dendritic cells are able to prime CD4⁺ T lymphocytes toward the Th1 phenotype (43, 44). Furthermore, it has been recently demonstrated that NK cells may also represent an initial source of IFN- γ during Th1 polarization of naive CD4⁺ T cells (21). Our data indicate that upon TCR stimulation of primary T cells, CD8⁺, but not CD4⁺, T lymphocytes, are excellent producers of IFN- γ , which is crucial to enhance CD4⁺ Th1 differentiation (Fig. 1). We thus suggest that CD8⁺ T cells also function as another source of IFN- γ that may reinforce and amplify an adaptive Th1-specific response. In accordance, it has been argued that the IFN- γ secreted by CD8⁺ T cells acts directly on CD4⁺ Th1 priming and also stimulates APCs to secrete IL-12 (22). In that work, in vivo injections of anti-CD3 in various MHC gene knockout mice have clearly demonstrated that IFN- γ is rapidly produced by a distinct population of CD8⁺ T cells and polarizes CD4⁺ T cells toward the Th1 phenotype (22). It has also been shown that the presence of IFN- γ during the early phase of CD4⁺ Th priming is essential for Th1 phenotype stabilization, because CD4⁺ T cells lacking the IFN- γ gene or its receptor do not mount an efficient Th1 response and retain the capacity to produce IL-4 (6). We thus suggest that CD8⁺ T lymphocytes represent an early source of NFAT1-dependent IFN- γ production during the initial adaptive response, which may account for the consolidation of Th1 immunity.

Altering the cytokine-producing profile of Th cells by inducing Th1 responses has been proposed to be protective against Th2-related dis-

orders, such as allergy (11–13). Our findings show that IFN- γ and also CD8⁺ T cells are regulators of eosinophil recruitment and Th immune responses in vivo. Because the IFN- γ produced by CD8⁺ T lymphocytes was highly dependent on NFAT1, we suggest that mice lacking this transcription factor could not counteract a Th2 response and presented overexpression of Th2 cytokines and eosinophilia in vivo. Thus, the impaired NFAT1-dependent IFN- γ production by CD8⁺ T cells could be an alternative explanation for the allergic phenotype described in the NFAT1-deficient mice (36, 39). However, we cannot rule out the hypothesis that NFAT1^{-/-} mice present a Th2-biased phenotype in consequence of an intrinsic defect of CD4⁺ T cells to silence IL-4. This hypothesis could explain the low levels of IL-4 production observed in CD8⁺ T cell-depleted mice and the only moderate increase in CD8 α - and IFN- γ -deficient mice, rather than the profound increase in IL-4 levels observed in NFAT1^{-/-} mice (Fig. 7).

In vivo studies of airway allergic inflammation have demonstrated that IFN- γ , CD8⁺ T cells, and also CD4⁺ Th1 cells are able to regulate Ag-induced eosinophil infiltration by inhibiting Th2 responses (11–15). Interestingly, T-bet-deficient mice had impaired IFN- γ production and also developed spontaneous airway hyper-responsiveness similar to asthma patients, who revealed deficient T-bet expression of the lungs and significantly lower IFN- γ secretion by PBMC compared with healthy individuals (45, 46). In accordance, it has been recently shown in a model of *Leishmania major* infection that the IFN- γ produced by CD8⁺ T cells directly promotes Th1 differentiation and down-regulates initial Th2 immune responses (47). Although depletion of CD8⁺ T lymphocytes in NFAT1^{+/+} mice induced eosinophil infiltration in our model of allergic inflammation (Fig. 6), we cannot exclude the involvement of other cell types in this phenomenon. In addition to CD8⁺ T cells, in vivo treatment with anti-CD8 Ab could deplete CD8a⁺ dendritic cells, which have been implicated in Th1 differentiation as well (43, 44). Thus, it is still possible that the absence of both CD8⁺ T cells and CD8a⁺ dendritic cells might explain the enhanced allergic inflammation observed in CD8-depleted NFAT1^{+/+} mice. Nevertheless, conflicting results have been documented regarding the protective action of CD8⁺ T and CD4⁺ Th1 cells against allergic diseases (48–50).

The suppressive effects of IFN- γ on allergic inflammation may be explained by several mechanisms. It is most likely that IFN- γ directly induces the differentiation of naive T cells toward the Th1 phenotype and/or represses Th2 cell recruitment/differentiation rather than acting on eosinophils itself (4–6). It is also possible that IFN- γ suppresses the release of Th2 cytokines from activated T cells (51, 52) and thus inhibits the following Th2-dependent

eosinophil recruitment (11, 38). However, other reports have shown inhibitory properties of IFN- γ directly on eosinophil infiltration into inflammatory tissues (53, 54). Our results support the idea that NFAT1 plays a positive regulatory role in IFN- γ production by CD8⁺ T cells and may control allergic inflammation *in vivo*. In contrast, a recent report have shown that inhibition of all NFAT family members in T cells prevents allergic pulmonary inflammation, early eosinophil recruitment to the lungs, and Th2 response development (55). These results support the idea that different NFAT members may play specific roles during immune responses *in vivo*, because this family consists of five proteins with distinct properties in the regulation of cytokine genes.

In conclusion, we demonstrate in this study that IFN- γ production by naive CD8⁺ T cells during primary stimulation is highly dependent on NFAT1 transcription factor. We also indicate that CD8⁺ T cells and IFN- γ are essential to control allergic inflammation. Finally, we suggest that NFAT1 protein plays a positive regulatory role on IFN- γ production in CD8⁺ T cells, which is central to the generation of Th1 immune responses *in vivo*.

Acknowledgments

We are especially grateful to M. A. Barcinski and B. L. Diaz for comments on the work and manuscript, and to members of our laboratory for helpful advice and discussions. We are in debt to A. Rao, C. Wilson, and F. Cunha for kindly providing reagents, and to E. Abrantes for help with gene reporter experiments.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Seder, R. A., and W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 635–673.
- Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787–793.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 713–758.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.* 15: 749–758.
- Bradley, L. M., D. K. Dalton, and M. Croft. 1996. A direct role for IFN- γ in regulation of Th1 cell development. *J. Immunol.* 157: 1350–1358.
- Zhang, Y., R. Apilado, J. Coleman, S. Ben-Sasson, S. Tsang, J. Hu-Li, W. E. Paul, and H. Huang. 2001. Interferon γ stabilizes the T helper cell type 1 phenotype. *J. Exp. Med.* 194: 165–172.
- Ma, X., J. M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S. F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri. 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon γ in monocytic cells. *J. Exp. Med.* 183: 147–157.
- Seder, R. A., R. Gazzinelli, A. Sher, and W. E. Paul. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10188–10192.
- Mullen, A. C., F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, A. L. Kung, N. Cereb, T. P. Yao, S. Y. Yang, et al. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292: 1907–1910.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 3: 549–557.
- Iwamoto, I., H. Nakajima, H. Endo, and S. Yoshida. 1993. Interferon γ regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 177: 573–576.
- Dow, S. W., J. Schwarze, T. D. Heath, T. A. Potter, and E. W. Gelfand. 1999. Systemic and local interferon γ gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Hum. Gene Ther.* 10: 1905–1914.
- Cohn, L., R. J. Homer, N. Niu, and K. Bottomly. 1999. T helper 1 cells and interferon γ regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J. Exp. Med.* 190: 1309–1318.
- Suzuki, M., R. Taha, D. Ihaku, Q. Hamid, and J. G. Martin. 1999. CD8⁺ T cells modulate late allergic airway responses in Brown Norway rats. *J. Immunol.* 163: 5574–5581.
- Suzuki, M., K. Maghni, S. Molet, A. Shimbara, Q. A. Hamid, and J. G. Martin. 2002. IFN- γ secretion by CD8 T cells inhibits allergen-induced airway eosinophilia but not late airway responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 803–809.
- Leonard, C., V. Tormey, C. Burke, and L. W. Poulter. 1997. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17: 368–375.
- Renzi, P. M., J. P. Turgeon, J. E. Marcotte, S. P. Drblik, D. Bérubé, M. F. Gagnon, and S. Spier. 1999. Reduced interferon- γ production in infants with bronchiolitis and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 1417–1422.
- Murphy, K. M., W. Ouyang, J. D. Farrar, J. Yang, S. Ranganath, H. Asnagli, M. Afkarian, and T. L. Murphy. 2000. Signaling and transcription in T helper development. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 451–494.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295: 338–342.
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, et al. 2001. T. bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15137–15142.
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for Th1 priming. *Nat. Immunol.* 5: 1260–1265.
- Das, G., S. Sheridan, and C. A. Janeway, Jr. 2001. The source of early IFN- γ that plays a role in Th1 priming. *J. Immunol.* 167: 2004–2010.
- Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 707–747.
- Lewis, R. S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 497–521.
- Shaw, K. T. Y., A. M. Ho, A. Raghavan, J. Kim, J. Jain, J. Park, S. Sharma, A. Rao, and P. G. Hogan. 1995. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11205–11209.
- Loh, C., K. T. Y. Shaw, J. Carew, J. P. B. Viola, C. Luo, B. A. Perrino, and A. Rao. 1996. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.* 271: 10884–10891.
- Sica, A., L. Dorman, V. Viggiano, M. Cippitelli, P. Ghosh, N. Rice, and H. A. Young. 1997. Interaction of NF- κ B and NFAT with the interferon- γ promoter. *J. Biol. Chem.* 272: 30412–30420.
- Sweetser, M. T., T. Hoey, Y. L. Sun, W. M. Weaver, G. A. Price, and C. B. Wilson. 1998. The roles of nuclear factor of activated T cells and ying-yang 1 in activation-induced expression of the interferon- γ promoter in T cells. *J. Biol. Chem.* 273: 34775–34783.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S. L. Schreiber. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807–815.
- Clipstone, N. A., and G. R. Crabtree. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357: 695–697.
- Hodge, M. R., A. M. Ranger, F. Charles de la Brousse, T. Hoey, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher. 1996. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4: 397–405.
- Kiani, A., J. P. B. Viola, A. H. Lichtman, and A. Rao. 1997. Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* 7: 849–860.
- Kiani, A., F. J. Garcia-Cózar, I. Habermann, S. Laforsch, T. Aebischer, G. Ehninger, and A. Rao. 2001. Regulation of interferon- γ gene by nuclear factor of activated T cells. *Blood* 98: 1480–1488.
- Jain, J., P. G. McCaffrey, V. E. Valge-Archer, and A. Rao. 1992. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 365: 801–804.
- McMillin, D. W., N. Landazuri, B. Gangadharan, B. Hewes, D. R. Archer, H. T. Spencer, and J. M. Le Doux. 2005. Highly efficient transduction of repopulating bone marrow cells using rapidly concentrated polymer-complexed retrovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 768–775.
- Viola, J. P. B., A. Kiani, P. T. Bozza, and A. Rao. 1998. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* 7: 2223–2230.
- Pearce, E. L., A. C. Mullen, G. A. Martins, C. M. Krawczyk, A. S. Hutchins, V. P. Zediak, M. Banica, C. B. DiCioccio, D. A. Gross, C. A. Mao, et al. 2003. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor eomesodermin. *Science* 302: 1041–1043.
- Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 255–281.
- Xanthoudakis, S., J. P. B. Viola, K. T. Shaw, C. Luo, J. D. Wallace, P. T. Bozza, D. C. Luk, T. Curran, and A. Rao. 1996. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272: 892–895.
- García-Rodríguez, C., and A. Rao. 1998. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J. Exp. Med.* 187: 2031–2036.
- Avots, A., M. Buttman, S. Chuvpilo, C. Escher, U. Smola, A. J. Bannister, U. R. Rapp, T. Kouzarides, and E. Serfling. 1999. CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* 10: 515–524.
- Avni, O., D. Lee, F. Macian, S. J. Szabo, L. H. Glimcher, and A. Rao. 2002. T_H cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat. Immunol.* 3: 643–651.
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 189: 587–592.
- Maldonado-Lopez, R., C. Maliszewski, J. Urbain, and M. Moser. 2001. Cytokines regulate the capacity of CD8 α^+ and CD8 α^- dendritic cells to prime Th1/Th2 cells *in vivo*. *J. Immunol.* 167: 4345–4350.
- Finotto, S., M. F. Neurath, J. N. Glickman, S. Qin, H. A. Lehr, F. H. Y. Green, K. Ackerman, K. Haley, P. R. Galle, S. J. Szabo, et al. 2002. Development of

- spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295: 336–338.
46. Nurse, B., M. Haus, A. S. Puterman, E. G. Weinberg, and P. C. Potter. 1997. Reduced interferon- γ but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 662–668.
 47. Uzonna, J. E., K. L. Joyce, and P. Scott. 2004. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon γ -producing CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 199: 1559–1566.
 48. Hamelmann, E., A. Oshiba, J. Paluh, K. Bradley, J. Loader, T. A. Potter, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. 1996. Requirement for CD8⁺ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J. Exp. Med.* 183: 1719–1729.
 49. Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 103: 175–183.
 50. Miyahara, N., K. Takeda, T. Kodama, A. Joetham, C. Taube, J. W. Park, S. Miyahara, A. Balhorn, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2004. Contribution of antigen-primed CD8⁺ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13. *J. Immunol.* 172: 2549–2558.
 51. Coyle, A. J., S. Tsuyuki, C. Bertrand, S. Huang, M. Aguet, S. S. Alkan, and G. P. Anderson. 1996. Mice lacking the IFN- γ receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J. Immunol.* 156: 2680–2685.
 52. Elser, B., M. Lohoff, S. Kock, M. Giaisi, S. Kirchhoff, P. H. Krammer, and M. Li-Weber. 2002. IFN- γ represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* 17: 703–712.
 53. Luttmann, W., E. Dauer, S. Schmidt, O. Marx, M. Hossfeld, H. Matthys, and J. C. Virchow, Jr. 2000. Effects of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on CD95/Fas ligand-mediated apoptosis in human blood eosinophils. *Scand. J. Immunol.* 51: 54–59.
 54. Fulkerson, P. C., N. Zimmermann, E. B. Brandt, E. E. Muntel, M. P. Doecker, J. L. Kavanaugh, A. Mishra, D. P. Witte, H. Zhang, J. M. Farber, et al. 2004. Negative regulation of eosinophil recruitment to the lung by the chemokine monokine induced by IFN- γ (Mig, CXCL9). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1987–1992.
 55. Diehl, S., T. Krahl, L. Rinaldi, R. Norton, C. G. Irvin, and M. Rincón. 2004. Inhibition of NFAT specifically in T cells prevents allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 172: 3597–3603.

Lipid Bodies Are Reservoirs of Cyclooxygenase-2 and Sites of Prostaglandin-E₂ Synthesis in Colon Cancer Cells

Maria T. Accioly,¹ Patricia Pacheco,² Clarissa M. Maya-Monteiro,² Nina Carrossini,¹ Bruno K. Robbs,¹ Silvia S. Oliveira,¹ Cristiane Kaufmann,¹ José A. Morgado-Diaz,¹ Patricia T. Bozza,² and João P.B. Viola¹

¹Division of Cellular Biology, National Cancer Institute; and ²Laboratory of Immunopharmacology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Lipid bodies (lipid droplets) are emerging as dynamic organelles involved in lipid metabolism and inflammation. Increased lipid body numbers have been described in tumor cells; however, its functional significance in cancer has never been addressed. Here, we showed increased number of lipid bodies in tumor tissues from patients with adenocarcinoma of colon submitted to surgical resection when compared with an adjacent normal tissue. Accordingly, increased numbers of lipid bodies were observed in human colon adenocarcinoma cell lines and in a H-rasV12-transformed intestinal epithelial cell line (IEC-6 H-rasV12) compared with nontransformed IEC-6 cells. The functions of lipid bodies in eicosanoid synthesis in cancer cells were investigated. CACO-2 cells have increased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) when compared with IEC-6 cells. We showed by immunolocalization that, in addition to perinuclear stain, COX-2 and prostaglandin E (PGE) synthase present punctate cytoplasmic localizations that were concordant with adipose differentiation-related protein-labeled lipid bodies. The colocalization of COX-2 at lipid bodies was confirmed by immunoblot of subcellular fractionated cells. Direct localization of PGE₂ at its synthesis locale showed that lipid bodies are sources of eicosanoids in the transformed colon cancer cells. Treatment with either aspirin or the fatty acid synthase inhibitor C75 significantly reduced the number of lipid bodies and PGE₂ production in CACO-2 and in IEC-6 H-rasV12 cells with effects in cell proliferation. Together, our results showed that lipid bodies in colon cancer cells are dynamic and functional active organelles centrally involved in PGE₂ synthesis and may potentially have implications in the pathogenesis of adenocarcinoma of colon. [Cancer Res 2008;68(6):1732–40]

Introduction

Increased lipogenesis has emerged as a common phenotype to numerous human carcinomas and has been associated to poor prognosis in breast, prostate, and colon cancer (1, 2). Altered lipid metabolism in cancer cells involves modulation of multiple lipogenic enzymes (1, 2). In fact, enzymes involved in fatty acid synthesis, as well as metabolic regulators, are potential targets for antineoplastic intervention and chemoprevention (1, 2). In virtually all organisms, including mammalian cells, cytoplasmic lipids are

stored in hydrophobic organelles called lipid bodies or lipid droplets. Cytoplasmic lipid bodies are osmiophilic structures, surrounded by a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition, have a neutral lipid rich core, and contain a variable protein composition (3–5). Although in the past, the presence of lipid bodies in cells were largely associated with lipid storage and transport, it has become apparent that lipid bodies are dynamic and functionally active organelles (4, 5).

Increased numbers of lipid bodies are described pathologic observation in cancer cells both in experimental settings and in clinical conditions (4). However, mechanisms that regulate lipid body formation and their functional significance to the cellular biology of the tumor are not known. Recent studies based on lipid body content have shown that lipid bodies, beside their rich lipid content, contain several functionally diverse types of proteins, including adipose differentiation-related protein (ADRP) and caveolin (6–9), lipid metabolic enzymes and proteins of Rab family (10–12), eicosanoid-forming enzymes (13, 14), and protein kinases, such as phosphoinositide 3-kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase, and protein kinase C (PKC; refs. 15–17). Therefore, lipid bodies may function in lipid metabolism, membrane trafficking, and intracellular signaling and might have potential implications to mechanisms of cell proliferation and differentiation.

In inflammatory cells, lipid bodies have important roles in regulating arachidonic acid (AA; 20:4, n-6) metabolism. Indeed, AA, an essential polyunsaturated fatty acid with signaling functions and the precursor of prostaglandins and leukotrienes, is stored in its esterified form at lipid bodies (15, 18). Accumulating evidence indicates that AA metabolism plays an important role in colon carcinogenesis. Unesterified AA itself is a signal for apoptosis of colon cancer cells, and conversely, enzymatic conversion of AA or esterification of AA into lipid pools depletes unesterified AA, thereby removing a proapoptotic signal and promoting carcinogenesis (19, 20). Different products of AA metabolism are also implicated in carcinogenesis. As much as 80% to 90% of colon carcinomas show an enhanced cyclooxygenase-2 (COX-2; prostaglandin H synthase) expression compared with normal intestinal mucosa (21–23). COX-2 is the enzyme that catalyzes the rate-limiting step in eicosanoids synthesis, converting AA into prostaglandins (24). Accordingly, high levels of prostaglandins, particularly prostaglandin E₂ (PGE₂), were observed in colorectal cancers (25, 26). Moreover, compelling data from epidemiologic studies, clinical trials, and animal experiments indicate that aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAID) inhibit colorectal carcinogenesis (reviewed in refs. 27, 28).

Leukocyte lipid bodies associated with inflammatory responses were shown to compartmentalize enzymes involved in AA release (cPLA₂; ref. 15) and metabolic conversion into prostaglandins

Requests for reprints: João P.B. Viola, Divisão de Biologia Celular Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37 Rio de Janeiro, 20231-050 RJ, Brazil. Phone: 55-21-3233-1322; Fax: 55-21-3233-1470; E-mail: jpviola@inca.gov.br.
©2008 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1999

(COX) and leukotrienes (5-lipoxygenase; LTC₄ synthase; refs. 13, 14). Moreover, quantitative correlations between an enhanced generation of eicosanoids and levels of lipid body formation have been established in different cell types, suggesting that lipid bodies might function as specific sites involved in eicosanoids synthesis by cells engaged in inflammation (14, 29, 30). Recently, direct assessment of newly synthesized eicosanoids into its locale of synthesis has placed lipid bodies as specific sites of LTC₄ and PGE₂ synthesis within inflammatory leukocytes (31, 32).

In the present study, the occurrence and functions of lipid bodies in colon cancer were investigated. Here, we showed that human colon adenocarcinoma cell lines and colon cancer biopsies from patients present a drastic increase in lipid body numbers. Lipid bodies in these cells contain COX-2 and are structurally distinct cytoplasmic sites for PGE₂ production in an adenocarcinoma cell line. Furthermore, treatment with either aspirin or fatty acid synthase (FAS) inhibitor inhibited PGE₂ production and cell proliferation that correlated to an inhibition of lipid body formation in cancer cells. Together, our results place lipid bodies as functional organelles involved in prostaglandin synthesis in cancer cells and might have roles to the pathogenesis of colon cancer.

Materials and Methods

Human subjects. Samples of colon cancer and adjacent grossly normal-appearing tissue were obtained from three patients at the time of surgery from patients undergoing colon surgical resection at Brazilian National Cancer Institute. Control specimens were collected from the accompanying normal mucosa distant at 5 to 10 cm from the carcinoma. Samples for electron microscopy were immediately fixed as described below. This study was carried out with approval of the Brazilian National Cancer Institute's Ethic Committee.

Cell culture. CACO-2, LOVO, HT-29, and HCT-116 cells were grown in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS). IEC-6 cells were also grown in DMEM containing 10% FBS supplemented with 0.1 unit of insulin. All cells were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Production of recombinant retroviruses and infection of IEC-6 cells. The retroviral expression vector pBabe-H-rasV12 has been previously described and was kindly donated by Dr. Lowe (Cold Spring Harbor Laboratory; ref. [33]). BD EcoPack2 ecotropic packing cell line (BD Biosciences) was transiently transfected with retroviral vector by calcium phosphate precipitation for 24 h. Cell-free virus-containing supernatant was collected 48 h after transfection and concentrated using Amicon Ultracel 50k (Millipore). The supernatant was supplemented with 8 µg/mL polybrene (FLUKA Chemie) and immediately used for spin infection (2 × 45 min at 380 × g) of 5 × 10⁴ IEC-6 cells. Infected cells were incubated at 37°C for further 24 h and selected for puromycin (Sigma-Aldrich) resistance (7.5 µg/mL) for 14 d.

Lipid body staining and enumeration. Cells (5 × 10⁶ per well) were left unstimulated and untreated or treated with aspirin (500 µg/mL) or C75 (50 µg/mL) for 24 h. Lipid bodies were stained as previously described in each triplicate well ([29]). In brief, cells (10⁵ cells/mL) were fixed in 3.7% formaldehyde in calcium/magnesium-free HBSS (pH 7.4), rinsed in 0.1 mol/L cacodylate buffer, stained in 1.5% OsO₄ (30 min), rinsed in distilled water (dH₂O), immersed in 1.0% thiocarbohydrazide (5 min), rinsed in 0.1 mol/L cacodylate buffer, restained in 1.5% OsO₄ (3 min), rinsed, and then dried and mounted. The morphology of fixed cells was observed, and lipid bodies were enumerated by light microscopy with 100× objective lens in 50 consecutively scanned cells.

Electron microscopy. Lipid bodies were analyzed as previously described ([34]). Briefly, samples were fixed for 1 h in 1% glutaraldehyde in 0.1 mol/L cacodylate buffer (pH 7.2). Then, samples were washed with 0.1 mol/L cacodylate buffer (pH 7.2) followed by a second wash with 0.1 mol/L imidazole buffer (pH 7.5). Samples were then postfixed for 30 min with 2%

OsO₄ diluted in 0.1 mol/L imidazole buffer, washed in the 0.1 mol/L imidazole, dehydrated in a graded series of acetone and embedded in PolyBed 812 resin. Ultrathin sections were stained for 2 min with lead citrate and examined by transmission electron microscopy. Lipid bodies were enumerated by electron microscopy in 100 consecutively scanned cells.

Isolation of lipid bodies by subcellular fractionation. Lipid bodies were isolated by subcellular fractionation based on the buoyancy property of these lipid-rich organelles in sucrose gradients as described ([15, 16]). CACO-2 cells (10⁸/mL) in 20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L KCl buffer (pH 7.4) containing 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL benzamidin, 0.7 µg/mL pepstatin, and 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride were disrupted by nitrogen cavitation at 700ψ for 5 min at 4°C. The cavitate was collected dropwise and mixed with an equal volume of disruption buffer containing 1.08 mol/L sucrose. The homogenates were centrifuged at 1800 rpm for 5 min to remove the nuclei. The supernatants were overlaid sequentially with 2.0 mL each of 0.27 mol/L sucrose buffer, 0.135 mol/L sucrose buffer, and Top solution [25 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, and 1 mmol/L EGTA (pH 7.4)] and centrifuged at 35,000 rpm at 4°C for 1 h. Seven discrete fractions were collected sequentially from top to bottom: a top layer of lipid body (fraction 1), the mid-zone between lipid bodies and cytosol (fractions 2–3), the cytosol (fractions 4–5), and the microsomal and pellet (fractions 6–7). Proteins from subcellular fractions were concentrated by precipitation with 20% trichloroacetic acid overnight at 4°C. The precipitates were then washed twice with cold acetone. The protein contents in the fractions were analyzed by DC Protein Assay (Bio-Rad). The activity of lactate dehydrogenase was measured as cytosolic marker using the CytoTox 96 kit (Promega).

Western blotting. Proteins from cellular fractions or total cell lysates prepared in reducing and denaturing conditions were separated by SDS-PAGE on polyacrylamide gel. After transfer onto nitrocellulose membranes, nonspecific binding sites were blocked with 5% nonfat milk in TBS-Tween [TBST; 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20]. Membranes were probed with anti-ADRP monoclonal antibody (mAb; AP125, RDI), anti-COX-2 mAb (C-20; Santa Cruz Biotechnology), anti-H-Ras mAb (F132; Santa Cruz Biotechnology), and anti-β-actin mAb (AC-40; Sigma-Aldrich) in TBST with 1% nonfat dry milk. Proteins of interest were then identified by incubating the membrane with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences) in TBST with 1% milk. The membrane was developed with enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences) reagent, and the luminescence was captured by exposure to an autoradiography film.

Immunolocalization. CACO-2 cells (2 × 10⁴/mL) were fixed in 3% formaldehyde at room temperature for 10 min and permeabilized with 0.05% saponin/HBSS solution for 10 min. The unspecific sites were blocked with 1% normal human serum for 10 min. The cells were incubated for 1 h simultaneously with goat polyclonal anti-COX-2 (C-20; Santa Cruz Biotechnology) or goat polyclonal anti-PGE synthase (PGES; S-16; Santa Cruz Biotechnology) and mouse monoclonal anti-ADRP (AP125; RDI) diluted in 0.05% saponin/HBSS solution. Then, cells were blocked with 1% donkey serum for 10 min before simultaneous incubation with Cy3-conjugated affiniPure F(ab') fragment donkey anti-mouse and Cy2-conjugated affiniPure F(ab') fragment donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 45 min. Then, cells were washed several times with HBSS, mounted in an aqueous mounting medium, and visualized with 100× objective by both phase contrast and fluorescence microscopy.

Immunodetection of PGE₂ at its sites of production. Immunodetection of PGE₂ was performed as previously described ([32]). In brief, cells (2 × 10⁴/mL) were fixed and permeabilized during 1 h at 37°C with water-soluble 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodimide (EDAC; 0.5% in HBSS). Then, cells were washed with HBSS and blocked with 2% donkey serum for 15 min before incubation with anti-PGE₂ mAb (Cayman Chemicals) for 45 min. The cells were washed with HBSS and incubated with Cy3-conjugated affiniPure F(ab') fragment donkey anti-mouse for 45 min. Lipid bodies were fluorescent labeled with Bodipy 493/503 (Molecular Probes), added together with the secondary antibodies. The

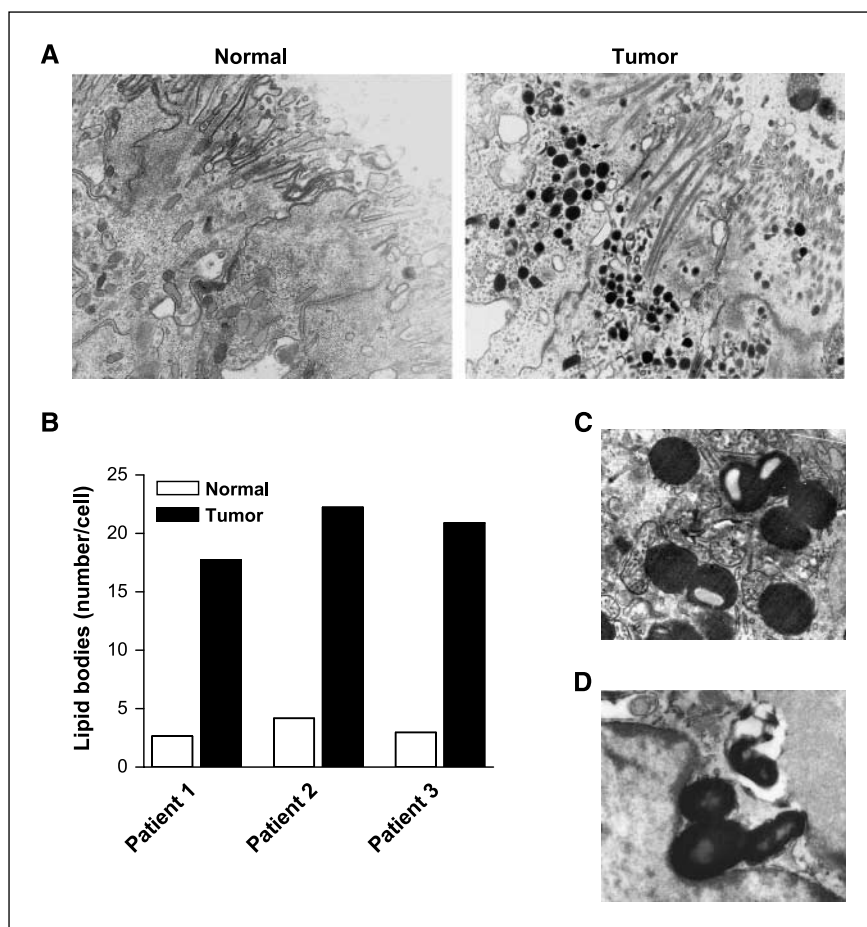


Figure 1. Analysis of lipid bodies of paired samples of human colon cancer and normal tissue. Pairs of samples of colon cancer and adjacent nonneoplastic tissue obtained at the time of surgery from patients undergoing colon surgical resection as described. *A*, analysis of thin sections of the adjacent normal tissue (*Normal*) and colon cancer (*Tumor*) examined by transmission electron microscopy. *B*, quantitative analyses of the lipid body numbers of the adjacent normal tissue and colon cancer. Lipid bodies were enumerated by electron microscopy and presented as mean from 100 consecutively scanned cells in tissues from three independent patients. *C* and *D*, electron microscopy analysis of the lipid bodies of the colon cancer sample. The presented images are representative from three independent patients.

cells were washed with HBSS, then mounted in an aqueous mounting medium, and visualized with 100 \times objective by both phase contrast and fluorescence microscopy. The specificity of the PGE₂ immunolabeling was ascertained by the incubation (10 min before EDAC) with the COX inhibitor indomethacin (10 μ g/mL) to avoid the synthesis of PGE₂ and by the use of an isotype control (MOPC 31c; BD Pharmingen).

Cell proliferation assay. Cells (5×10^4 per well) were left unstimulated and untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24, 48, 72, and 96 h. After treatment, cell proliferation was assayed in each triplicate well. Briefly, cells were fixed with ethanol for 10 min, stained with 0.05% violet crystal in 20% ethanol for 10 min, solubilized with methanol, and read by spectrometer at 595 nm.

EIA. Cells (2×10^6 per well) were left unstimulated and untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24 h. After the treatment, PGE₂ was assayed in each triplicate well supernatant. Determination of PGE₂ levels by enzyme immunoassay was accomplished using PGE₂ monoclonal enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical).

Statistical analysis. Statistical analysis of values from control and treated groups was determined using an unpaired Student's *t* test for single comparison or an ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls for multiple comparisons. *P* < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Lipid bodies are increased in human colon cancer. Ultrastructural evaluation of lipid bodies were performed by electron microscopy of paired samples of human colon cancer and normal tissue distant from the tumor. Patients' pairs of samples of cancer and nonneoplastic tissues were processed as

described in material and methods. Analysis of adenocarcinoma of colon from patients showed round, nonmembrane-bound lipid bodies exhibiting variable osmiophilia, ranging from light to strong electron dense organelles that were prominently increased in number and size in tumor tissues when compared with a normal tissue from the same patient submitted to surgical resection (Fig. 1A). Electron microscopy quantitative analyzes showed a dramatic increase in lipid body numbers in all studied patients (Fig. 1B). Moreover, lipid bodies in tumor tissues were imaged as heterogeneous organelles. They frequently displayed lucent areas and granular and/or membranous internal structures or showed irregular surfaces (Fig. 1). Images suggesting budding, coalescence, or fusions of lipid bodies were identified (Fig. 1). Remarkably, lipid bodies from tumor tissues showed clear interaction with nucleus, ER, and mitochondria (Fig. 1C and D).

Adenocarcinoma cell line CACO-2 presents an increased number of lipid bodies, COX-2 overexpression, and high levels of PGE₂ production. To evaluate the possible involvement of lipid bodies in the pathogenesis of colon cancer, the presence of lipid bodies in a human colon adenocarcinoma cell line (CACO-2 cells) was compared with a nontransformed rat intestinal epithelial cell line (IEC-6 cells). Both cell lines were maintained in culture medium by 24 h and stained with osmium tetroxide. As shown in Fig. 2A, CACO-2 cells present enhanced lipid body formation when compared with IEC-6 cells, which have few or absence of these cytoplasmic structures. Electron microscopy analysis showed cytoplasmic organelles that were identified by their shape,

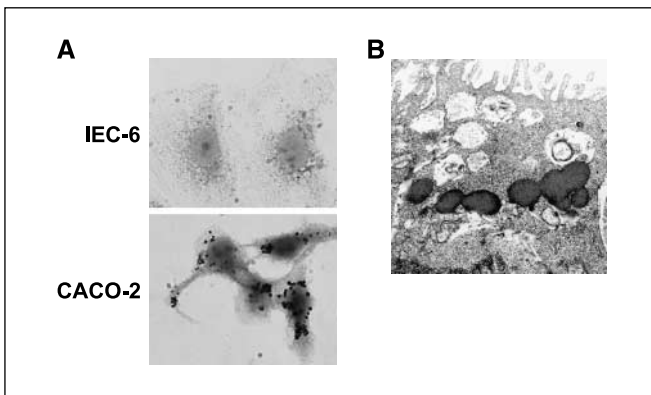


Figure 2. Analysis of lipid bodies in IEC-6 and CACO-2 cell lines. *A*, IEC-6 and CACO-2 cells were grown without stimulation for 24 h and stained for lipid bodies as described. Then, cells were analyzed by phase contrast microscopy with 100 \times objective lens. *B*, analysis of lipid bodies by electron microscopy in unstimulated CACO-2 cells as described in *A*. These results are representative from three independent experiments.

osmiophilia, and lack of a limiting membrane as lipid bodies (Fig. 2*B*). Images suggesting fusion of lipid bodies with each other were frequently observed, as well as, interactions with other organelles including ER, nuclei, and cytoplasmic vacuoles (Fig. 2*B* and data not shown).

Quantitative analysis of lipid bodies shows a 4-fold to 5-fold increase of lipid body numbers in CACO-2 cells when compared with IEC-6 cells (Fig. 3*A*). To evaluate if increased lipid body numbers were a unique feature of CACO-2 cells or if it was a common aspect to other human colon adenocarcinoma cell lines, LOVO, HT-29, and HCT-116 cells were analyzed (Fig. 3*A*). Increased lipid body numbers in all these cancer cell lines were observed when compared with IEC-6 cells (Fig. 3*A*). Several evidences suggest that the inflammatory process and COX-2 have a central role in colorectal carcinogenesis. COX-2 expression was evaluated in CACO-2 and IEC-6 cell lines. Western blot analysis showed increased expression of COX-2 protein in CACO-2 cells when compared with IEC-6 cells (Fig. 3*B*). Furthermore, CACO-2 cells also presented an enhanced production of PGE₂ when compared with IEC-6 cells (Fig. 3*C*).

Lipid bodies are sites for PGES and COX-2 localization and PGE₂ production in adenocarcinoma cell line. Lipid bodies in inflammatory cells have been shown to function as main sites involved in the oxidative metabolism of AA and eicosanoid synthesis (reviewed in ref. 5). To address the relationship between COX-2 and lipid bodies in cancer cells, the cellular compartment for COX-2 localization was evaluated. Initially, CACO-2 cells were subject to subcellular fractionation, and then cellular fractions were immunoblotted with anti-COX-2. ADRP was used as a marker of lipid bodies for colocalization purpose. ADRP is ubiquitously expressed in many cells and tissues as a major component of lipid droplets (6, 7). As shown in Fig. 4*A*, COX-2 protein localizes in fractions where lipid bodies and nuclei are isolated. On the other hand, ADRP, a protein that is associated to lipid bodies in different cell types, only localizes in the lipid body fraction (Fig. 4*A*).

We then used indirect immunofluorescence microscopy to confirm the localization of COX-2 in intact cells with specific conditions for fixation and permeabilization, which prevent dissolution of lipid bodies. In CACO-2 cells, lipid bodies are readily visualized by a strong ring shape staining for ADRP, indicating a staining pattern localized to the peripheral surface of lipid bodies

similar to the staining pattern for ADRP-associated lipid body in adipocytes and other cells (6, 7). CACO-2 cells stained with anti-COX-2 polyclonal antibody, in addition to perinuclear membrane, showed focal punctate cytoplasmic staining (Fig. 4*B*, top). The presence of COX-2 within lipid body was confirmed by ADRP and COX-2 colocalization within CACO-2 cells (Fig. 4*B*, top). Interestingly, COX-2 lipid body staining was not restricted to lipid body surface, suggestive that COX-2 pervade lipid body core (Fig. 4*B* insert). PGE₂ is formed from AA by cyclooxygenase-catalyzed formation of PGH₂ and further transformation by downstream terminal enzyme PGES (35). Next, we evaluated the localization of the inducible isoform of PGES, mPGES, in CACO-2 cells. As shown in Fig. 4*B* (bottom), mPGES shows a similar localization pattern as the observed for COX-2 with colocalization with ADRP-labeled lipid bodies in addition to perinuclear staining.

Because CACO-2 cells have increased COX-2-enriched and PGES-enriched lipid bodies and enhanced PGE₂ formation, we hypothesized that lipid bodies were domains for compartmentalized PGE₂ synthesis. To investigate intracellular sites of newly formed PGE₂ in colon cancer cells, a recently developed strategy for direct *in situ* immunolocalization of PGE₂ synthesis were used (32). EDAC was used to cross-link eicosanoid carboxyl groups to amines in adjacent proteins, and immobilized PGE₂ was immunofluorescently detected. CACO-2 cells showed intense and punctate immunofluorescent staining for PGE₂ (Fig. 4*C*, top). As shown in Fig. 4*C* (top right), PGE₂ intracellular site of production match

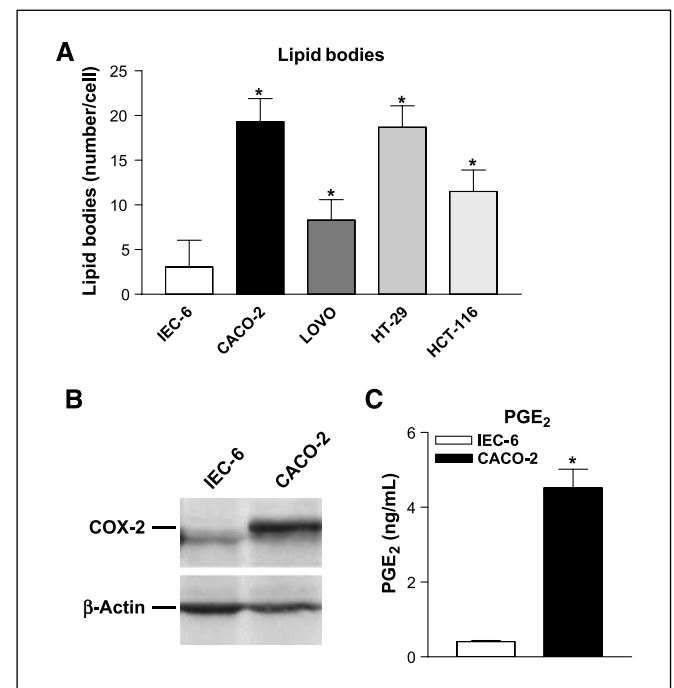


Figure 3. Quantitative analysis of lipid bodies, COX-2, and PGE₂ in colon cancer cell lines. *A*, quantitative analyses of the lipid body numbers in unstimulated IEC-6 and CACO-2, LOVO, HT-29, and HCT-116 cells. The lipid bodies were enumerated in 50 consecutively scanned cells. Columns, mean; bars, SD. *, significantly different values relative to IEC-6 cells ($P < 0.05$). *B*, analysis of COX-2 (top) and β -actin (bottom) expression in total cell lysates of unstimulated IEC-6 and CACO-2 cells by Western blot. β -Actin levels were used for control of protein loading. *C*, analysis of PGE₂ production in unstimulated IEC-6 and CACO-2 cells. In each supernatant, PGE₂ was assayed by EIA. Columns, mean; bars, SD. *, significantly different values relative to IEC-6 cells ($P < 0.05$). These results are representative from three independent experiments.

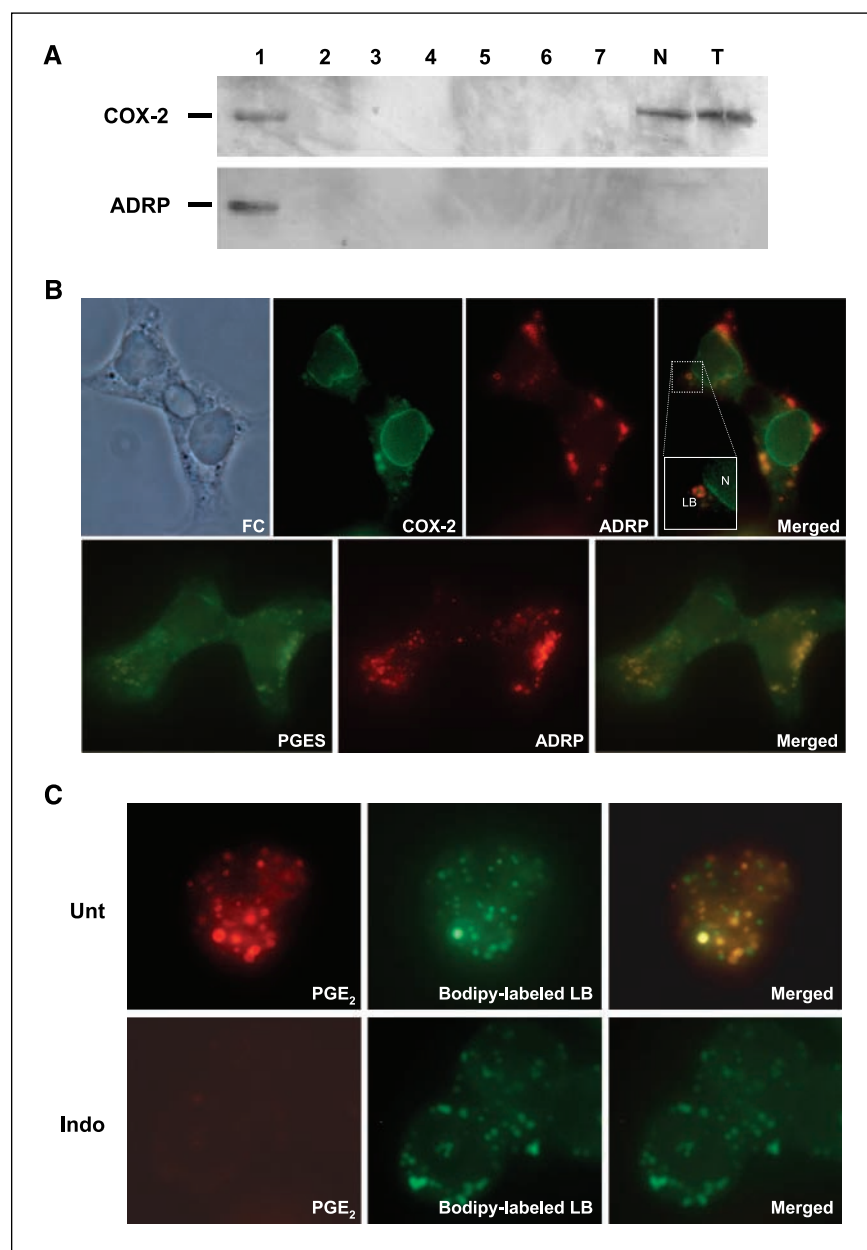


Figure 4. Analysis of COX-2, PGES, and PGE₂ localization in CACO-2 cells. **A**, unstimulated cells were subjected to subcellular fractionation, and fractions were recovered separately. Fractions 1 and 2, lipid bodies; fractions 3 and 4, cytosol; fractions 5, 6, and 7, microsome and membrane; N, nuclear; T, total lysate. Then, fractions were immunoblotted with anti-COX-2 (top) or anti-ADRP (bottom) antibodies. **B**, unstimulated cells were stained with anti-COX-2, anti-PGES, or anti-ADRP antibodies. Top, phase contrast (FC), anti-COX-2 (COX-2), anti-ADRP (ADRP), and merge of COX-2/ADRP (Merged); bottom, anti-PGES (PGES), anti-ADRP (ADRP), and merge of PGES/ADRP (Merged). **C**, unstimulated cells were left untreated (Unt) or treated with indomethacin (Indo) and then stained with anti-PGE₂ antibody and fluorescent Bodipy 493/503. The sequence shows anti-PGE₂ (PGE₂), fluorescent Bodipy 493/503 (Bodipy), and merge of PGE₂/Bodipy (Merged). All results are representative from two independent experiments.

bodipy-stained lipid bodies, placing lipid bodies as sites of PGE₂ synthesis within colon cancer cells. Of note, perinuclear PGE₂-positive staining could also be observed. Specificity of the immunofluorescence for PGE₂ was ascertained by the lack of PGE₂ immunolabeling within indomethacin pretreated CACO-2 cells (Fig. 4C, bottom) and also supported by the absence of immunostaining when an isotype control antibody replaced the anti-PGE₂ mAb (data not shown). These results showed that lipid bodies are intracellular sites for COX-2 and mPGES protein localization and locales of newly formed PGE₂ production in colon cancer cells.

Aspirin and FAS inhibitor C75 inhibited lipid body formation, PGE₂ production, and proliferation in adenocarcinoma cell line. NSAIDs, which inhibit COX, are used as chemopreventive agents for carcinogenesis of colon and cause apoptosis of cancer cells. The mechanism for this response is not

fully understood, but it might result from an absence of a prostaglandin product, an accumulation of AA substrate, or shunting of substrate into a different pathway (28, 36). In addition, NSAIDs, including aspirin and NS398, have been previously shown to inhibit lipid body formation induced by cys-unsaturated fatty acids through COX-independent mechanisms (29, 37). The capacity of aspirin to inhibit lipid body formation in CACO-2 cells was investigated. CACO-2 cells were left untreated or treated with aspirin (500 µg/mL) for 24 hours, and lipid bodies and PGE₂ were evaluated as described above. As shown in Fig. 5A and B, aspirin inhibited lipid body formation and PGE₂ generation in CACO-2 cells. To gain further insights on the functions of lipid bodies in eicosanoid metabolism and roles in cell growth, we analyzed the effect of a noncyclooxygenase inhibitor of lipid body biogenesis.

To this end, CACO-2 cells were treated with the FAS inhibitor C75. FAS is the key biosynthetic enzyme in the fatty acid synthesis.

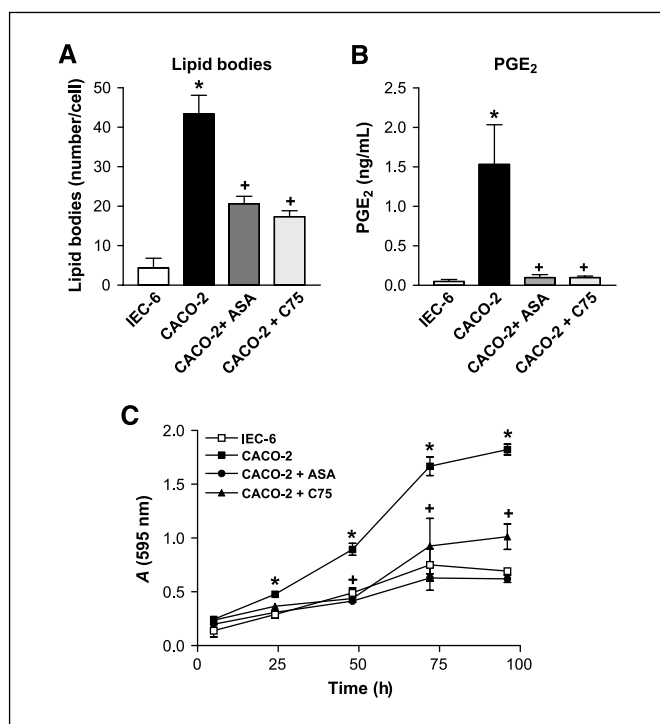


Figure 5. Analysis of lipid bodies, PGE₂ production, and cell growth in CACO-2 cells treated with aspirin and C75. *A*, cells were left unstimulated, and CACO-2 cells were left untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24 h. Then, the lipid bodies were enumerated as described in Fig. 3*A*. *B*, cells were left unstimulated and CACO-2 cells were left untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24 h. Then, PGE₂ was assayed by EIA as described in Fig. 3*C*. *C*, cells were left unstimulated and CACO-2 cells were left untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24, 48, 72, and 96 h. Then, cells were stained with violet crystal and plates were analyzed by spectrometer at 595 nm as described. Points, mean; bars, SD. *, significantly different values relative to IEC-6 cells ($P < 0.05$); +, significantly different values relative to untreated CACO-2 cells ($P < 0.05$). All results are representative from two independent experiments.

Increased expression of FAS has emerged as a common phenotype in most human cancer, including colon cancer (38, 39) and its increased expression and activity associated to poor prognosis in cancer (reviewed in ref. 2). Moreover, it has been well established that FAS pharmacologic inhibition or knockdown by RNA interference leads to selective cytotoxic to human cancer cells (40–42). The mechanisms involved in FAS-induced killing of cancer cells remain an area of intense investigation. The effect of C75 in lipid body formation and PGE₂ production was analyzed. As shown in Fig. 5*A*, C75 significantly inhibited lipid body biogenesis in CACO-2 cells. Accordingly, C75 was shown to significantly inhibit lipid body formation in preadipocytes (43). Strikingly, although C75 is not an enzymatic inhibitor of COX-2 it significantly inhibited PGE₂ production by CACO-2 cells (Fig. 5*B*), thus suggesting that COX-2 compartmentalization within lipid bodies play roles in the enhanced PGE₂ synthetic capacity by colon cancer cells. It should be noted that cell viability 24 hours after treatment with either C75 or aspirin was greater than 95% as assessed by trypan blue exclusion (not shown).

We next examined the effect of aspirin or C75-induced inhibition of lipid body formation in CACO-2 cellular proliferation. CACO-2 cells were left untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24, 48, and 72 hours. As shown in Fig. 5*C*, CACO-2 cells presented an enhanced proliferation when compared with

IEC-6 cells. However, the treatment with either aspirin or C75 significantly decreased the CACO-2 cells proliferation at levels of IEC-6 cells (Fig. 5*C*).

Aspirin and FAS inhibitor C75 inhibited lipid body formation, PGE₂ production, and proliferation in H-Ras transformed IEC-6. To gain further insight into the association of cell transformation and lipid body biogenesis, we transformed IEC-6 cells with a retrovirus construct of H-rasV12. Consistent with published data (44), oncogenic Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells (IEC-6 H-rasV12) shows COX-2 overexpression (Fig. 6*A*) and is associated with an increased cell proliferation phenotype (Fig. 6*B*). As shown in Fig. 6, H-Ras transformed IEC-6 exhibits highly increased lipid body biogenesis (Fig. 6*C*) and enhanced PGE₂ production (Fig. 6*D*) when compared with IEC-6 cells. In addition, treatment with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 10 nmol/L for 1 h) increased lipid body formation in IEC-6 cells (4.8 ± 2.5 in untreated to 23.6 ± 3.5 lipid bodies per cell in IEC-6 cells treated with PMA; $P < 0.05$).

As shown in Fig. 5*C* and *D*, pretreatment with either aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) significantly inhibited lipid body biogenesis and PGE₂ in IEC-6 H-rasV12 cells. Furthermore, the treatment with either aspirin or C75 in parallel to the inhibition of lipid body formation significantly decreased the IEC-6 H-rasV12 cell proliferation to the levels of IEC-6 cells (Fig. 6*B*). Of note, pretreatment with aspirin or C75 failed to inhibit basal lipid body numbers in wild-type IEC-6 (Fig. 6*C*) and inhibited IEC-6 cell growth in <30% within 72 hours (not shown).

Discussion

Lipid bodies are increasingly recognized as dynamic and multifunctional organelles in different cell systems and organisms. The occurrence and functions of lipid bodies in cancer cells are largely unknown. Here, we showed that lipid bodies are increased in neoplastic cells. Furthermore, lipid bodies in colon cancer cells are functionally active organelles that compartmentalize eicosanoid-forming enzymes and are sites for newly formed lipid mediator (PGE₂) production. Together, these findings yielded insights into the functions of lipid bodies in AA metabolism in cancer cells and place lipid bodies as potential targets for therapeutic interventions.

Inflammation is considered a well-established cancer risk factor, and a number of inflammatory conditions predispose to colon cancer, including ulcerative colitis and Crohn's disease (45, 46). Increased biogenesis of lipid bodies has been extensively characterized in cells associated with several human inflammatory diseases (reviewed in ref. 5), including infiltrating leukocytes and intestinal epithelium of patients with Crohn's disease (47). We showed drastic increased numbers of lipid bodies in the tumor tissues from patients with adenocarcinoma of colon submitted to surgical resection when compared with paired normal tissues. Lipid bodies within adenocarcinoma cells appeared as round amorphous osmiophilic inclusions showing variable electron densities and frequently showed an electron-dense rim, devoid of a bilayer membrane, typical features of lipid bodies in other cells. Although our study is limited by its small sample size, it gives support to future studies with large numbers of patients where the relationship between lipid bodies and the different aspects of colon cancer, including the stage, invasiveness, and the outcome could be addressed.

The surface of lipid bodies in cancer cell was shown to be enriched with the protein ADRP, which is in agreement with

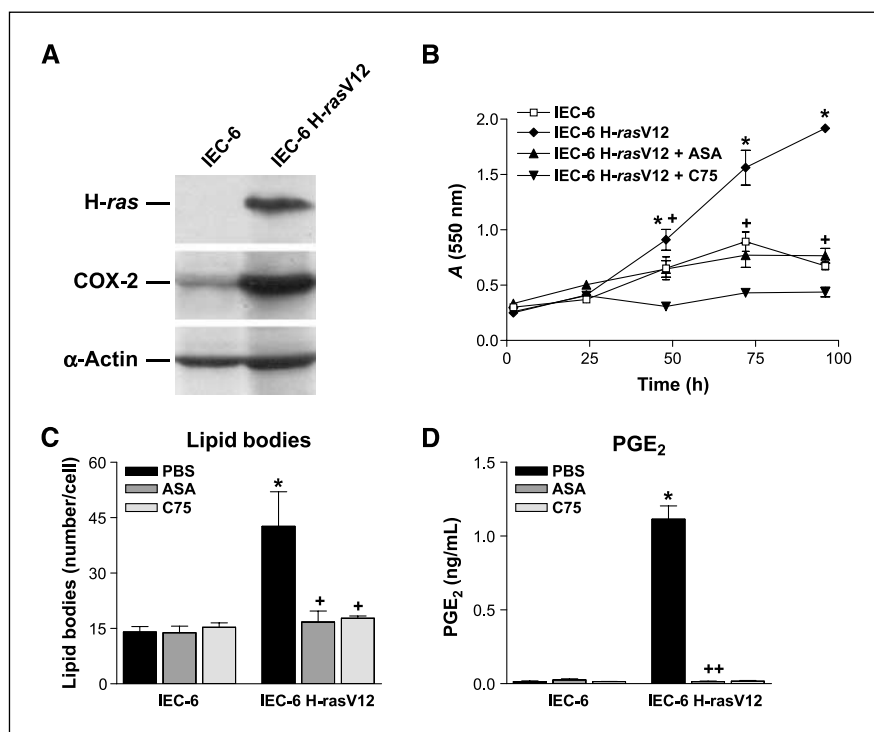


Figure 6. Analysis of lipid bodies, PGE₂ production, and cell growth in *H-ras* transformed IEC-6 cells treated with aspirin and C75. *A*, analysis of *H-Ras* (top), COX-2 (middle), and β -actin (bottom) expression in total cell lysates of unstimulated IEC-6 and IEC-6 *H-rasV12* cells by Western blot. β -Actin levels were used for control of protein loading. *B*, cells were left unstimulated and untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24, 48, 72, and 96 h. Then, cells were stained with violet crystal and plates were analyzed by spectrometer at 595 nm as described. *C*, cells were left unstimulated and untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24 h. Then, the lipid bodies were enumerated as described in Fig. 3*A*. *D*, cells were left unstimulated and untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24 h. Then, PGE₂ was assayed by EIA as described in Fig. 3*C*. Columns, mean; bars, SD. *, significantly different values relative to IEC-6 cells ($P < 0.05$); +, significantly different values relative to untreated IEC-6 *H-rasV12* cells ($P < 0.05$). All results are representative from two independent experiments.

previous demonstrations that ADRP is the main surface protein of lipid bodies in different mammalian cells, including epithelial cells. Accumulating data points to an important role of ADRP in fatty acid uptake, cholesterol, and fatty acid binding and neutral lipid storage (48) and although the biological function of ADRP is not completely known, this protein is a specific probe for lipid bodies enabling its subcellular localization within intact cells and subcellular gradients (6, 7). To assess discrete sites involved in eicosanoid synthesis, eicosanoid-forming enzymes may be immunolocalized at specific intracellular sites. Based on immunolocalization studies of eicosanoid-forming enzymes in many cells, major sites of synthesis of cyclooxygenase pathway-derived eicosanoids are believed to be the ER and perinuclear membranes (24). In addition, extranuclear lipid bodies have been described as sites to where different enzymes involved in prostaglandin synthesis, including cPLA2 and COX-2, translocate upon leukocyte stimulation in inflammatory conditions (13–15, 30). Different evidences support the hypothesis that lipid bodies in neoplastic cells function as distinct intracellular domain for regulated eicosanoid production. First, lipid bodies were sites of COX-2 and PGES compartmentalization. Second, in this study we observed a significant correlation between lipid body numbers and PGE₂ generation in cancer colonic epithelial cells and in *H-rasV12* transformed epithelial cells. Moreover, PGE₂ production was shown to occur at lipid bodies. Direct assessment of intracellular sites for prostaglandin generation has been elusive, as prostanoids and other eicosanoids are newly formed, nonstorable, and rapidly released upon cell stimulation. Recently, a new strategy to cross-link newly formed eicosanoids at its sites of synthesis has been described, enabling the immunofluorescent localization of newly formed eicosanoids at their intracellular formation locale and demonstrating that intracellular compartments involved in both leukotriene and prostaglandin synthesis differ according with the cell type studied and the stimulatory conditions used (31, 32). By

investigating intracellular domains involved in prostaglandin synthesis in colon carcinoma cells, we showed that lipid bodies are intracellular domains for PGE₂ synthesis, placing lipid bodies as important sites in the cellular processing and metabolism of AA, in addition to nuclear membrane in colon cancer cells.

Increased lipid body biogenesis may contribute in different ways to cancer progression. As mentioned above, lipid body arachidonyl-phospholipids might provide a source of substrate AA leading to increased prostaglandin synthesis without requiring the perturbation of the integrity of membranes and directly coupled to cocompartmentalized PGES and COX-2. Lipid bodies could also function as a draining compartment to rapidly take up and reacylate free AA within lipid body lipids, with potentially detrimental outcomes for the host cell as AA has important functions in inducing apoptosis of tumor cells (19, 20).

Together, our results showed that adenocarcinoma of colon beside overexpression of COX-2, have increased numbers of lipid bodies equipped with active PGE₂-synthesizing machinery. These results prompt us to address if lipid body inhibition would have an effect on neoplastic cell proliferation. Different classes of drugs have been described with the capacity to inhibit lipid body formation, although no specific lipid body inhibitor has been identified thus far (reviewed in ref. 5). Thus, to address the hypothesis of lipid body involvement in colon cancer proliferation, parallel assessment of lipid bodies, PGE₂ production, and CACO-2 cell proliferation was obtained with two different classes of drugs that inhibit lipid body formation.

Epidemiologic studies showed that individuals who have taken NSAIDs have a markedly reduced risk of developing colon cancer. In mice, COX-2 inhibitors or traditional NSAIDs lower the incidence of polyps and cancer. It was suggested that inhibition of tumors by NSAIDs involves the common property of COX suppression and the resultant reduction in levels of prostaglandins in tissues (reviewed in refs. 28, 36). Our data show that treatment

with aspirin significantly reduced the number of lipid bodies and PGE₂ levels in CACO-2 and IEC-6 H-*ras*V12 cells (Figs. 5 and 6). The mechanisms involved in aspirin inhibition of lipid body biogenesis are not completely understood. Indeed, previous findings showed that lipid body biogenesis can be induced in COX-deficient cells and aspirin are able to inhibit lipid body formation even in COX-deficient cells, thus suggesting that aspirin inhibitory effect on lipid body biogenesis involves COX-independent mechanisms (29, 37). Clinical and experimental evidence strongly suggest that NSAIDs are anticarcinogenic, antiproliferative, and antineoplastic. In fact, the oncogenic potentials of the prostaglandins were related to its properties to promote cell proliferation and inhibit apoptosis in intestinal epithelial cells (49–51). We observed that CACO-2 cells present a progressive growth when compared with nontransformed epithelial intestinal cells. Inhibition of lipid body formation by either aspirin or FAS inhibitor, correlated to inhibition of PGE₂ generation and cell proliferation (Figs. 5 and 6). Thus, our data provides one more possible mechanism by which NSAIDs and FAS inhibitors exert their effects as anticarcinogenic drug. The inhibition of lipid body generation may affect the subcellular compartmentalization of COX-2 and in consequence inhibit the enhanced prostaglandin synthesis that is related to the pathogenesis of colon cancer.

Besides of its function as organelles involved in the generation of eicosanoids, lipid bodies constitute sites of compartmentalization

of several signaling-relevant proteins, which may have functions beyond AA metabolism. Indeed, proteins with well-established roles in oncogenic cell transformation, tumorigenesis, and metastasis, including PI3K, extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1), ERK2, p38, PKC, and caveolin, were shown to localize in lipid bodies in a variety of cell types (8, 9, 15–17, 52). In addition, lipid body-specific protein ADRP has been recently described as a potential diagnostic and prognostic biomarker for renal cell and hepatocellular carcinoma (53, 54). In conclusion, our findings place lipid bodies as dynamic and functional active organelles centrally involved in PGE₂ synthesis in colon cancer cells that might potentially have implications with the pathogenesis of adenocarcinoma of colon. Thus, the evaluation of lipid bodies in human tissues could potentially be used as diagnostic and/or prognostic index in colon cancer or even as potential target to generate new drugs for cancer treatment.

Acknowledgments

Received 5/29/2007; revised 11/27/2007; accepted 1/9/2008.

Grant support: Brazilian Ministry of Health, FURNAS, CNPq (J.P.B. Viola), Brazilian Ministry of Health-DECIT/CNPq, and FAPERJ (P.T. Bozza). M.T. Accioly and S.S. Oliveira were supported by a fellowship from the Brazilian Ministry of Health, P. Pacheco and C.M. Maya-Monteiro by a fellowship from FAPERJ, N. Carrossini by a fellowship from CAPES, and B.K. Robbs by a fellowship from CNPq.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

References

- Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:358–65.
- Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res* 2006;66:5977–80.
- Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, et al. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem* 2002;277:44507–12.
- Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 2001;40:325–438.
- Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 2007;113:30–49.
- Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, et al. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 1997;38:2249–63.
- Heid HW, Moll R, Schwetlick I, et al. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 1998;294:309–21.
- Fujimoto T, Kogo H, Ishiguro K, et al. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new “membrane domain” in the cell. *J Cell Biol* 2001;152:1079–85.
- Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, et al. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 2001;152:1057–70.
- Liu P, Ying Y, Zhao Y, et al. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* 2004;279:3787–92.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2004;279:46835–42.
- Wan HC, Melo RC, Jin Z, et al. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* 2007;21:167–78.
- Dvorak AM, Weller PF, Harvey VS, et al. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101:136–42.
- Bozza PT, Yu W, Penrose JF, et al. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* 1997;186:909–20.
- Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, et al. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol* 1998;152:759–69.
- Yu W, Cassara J, Weller PF. Phosphatidylinositol 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood* 2000;95:1078–85.
- Chen JS, Greenberg AS, Wang SM. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 2002;86:784–91.
- Dvorak AM, Dvorak HF, Peters SP, et al. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol* 1983;131:2965–76.
- Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, et al. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11280–5.
- Cao Y, Dave KB, Doan TP, et al. Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:8429–34.
- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785–9.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183–8.
- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, et al. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:2556–9.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145–82.
- Pugh S, Thomas GA. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E₂. *Gut* 1994;35:675–8.
- Oka M, Inaba A, Uchiyama T, et al. Prostaglandin E₂ levels and lymphocyte subsets in portal venous drainage of colorectal cancers. *Am J Surg* 1994;167:264–7.
- Ulrich CM, Bigler J, Potter JD. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer* 2006;6:130–40.
- Cha YI, DuBois RN. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med* 2007;58:239–52.
- Bozza PT, Payne JL, Morham SG, et al. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11091–6.
- Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation *in vivo*: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 2002;169:6498–506.
- Bandeira-Melo C, Phoofofo M, Weller PF. Extracellular lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem* 2001;276:22779–87.
- D'Ávila H, Melo RC, Parreira GG, et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis *in vivo*. *J Immunol* 2006;176:3087–97.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593–602.
- Angermuller S, Fahimi HD. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochem J* 1982;14:823–35.

35. Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* 2007;59:207-24.
36. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 2002;190:279-86.
37. Bozza PT, Pacheco P, Yu W, et al. NS-398: cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;67:237-44.
38. Rashid A, Pizer ES, Moga M, et al. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1997;150:201-8.
39. Visca P, Alo PL, Del Nonno F, et al. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res* 1999;5:4111-8.
40. Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, et al. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3450-4.
41. Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, et al. Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:7330-7.
42. De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, et al. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:3799-804.
43. Schmid B, Rippmann JF, Tadayyon M, et al. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:1073-82.
44. Sheng H, Shao J, Dixon DA, et al. Transforming growth factor- β 1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *J Biol Chem* 2000;275:6628-35.
45. Jess T, Gamborg M, Matzen P, et al. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2724-9.
46. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-7.
47. Beil WJ, Weller PF, Peppercorn MA, et al. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF- α in colonic Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 1995;58:284-98.
48. Brasaemle DL. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: Stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 2007;48:2547-59.
49. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
50. Sheng H, Shao J, Morrow JD, et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-6.
51. Sheng H, Shao J, Washington MK, et al. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:18075-81.
52. Cohen AW, Razani B, Schubert W, et al. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 2004;53:1261-70.
53. Yao M, Huang Y, Shioi K, et al. Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:152-60.
54. Yao M, Tabuchi H, Nagashima Y, et al. Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J Pathol* 2005;205:377-87.

Dual Roles for NFAT Transcription Factor Genes as Oncogenes and Tumor Suppressors^{∇†}

Bruno K. Robbs,^{1,2} Andre L. S. Cruz,¹ Miriam B. F. Werneck,^{1‡}
Giuliana P. Mognol,¹ and João P. B. Viola^{1*}

*Division of Cellular Biology, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil,¹ and
Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ),
Rio de Janeiro, Brazil²*

Received 14 February 2008/Returned for modification 14 April 2008/Accepted 13 September 2008

Nuclear factor of activated T cells (NFAT) was first described as an activation and differentiation transcription factor in lymphocytes. Several in vitro studies suggest that NFAT family members are redundant proteins. However, analysis of mice deficient for NFAT proteins suggested different roles for the NFAT family of transcription factors in the regulation of cell proliferation and apoptosis. NFAT may also regulate several cell cycle and survival factors influencing tumor growth and survival. Here, we demonstrate that two constitutively active forms of NFAT proteins (CA-NFAT1 and CA-NFAT2 short isoform) induce distinct phenotypes in NIH 3T3 cells. Whereas CA-NFAT1 expression induces cell cycle arrest and apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts, CA-NFAT2 short isoform leads to increased proliferation capacity and induction of cell transformation. Furthermore, NFAT1-deficient mice showed an increased propensity for chemical carcinogen-induced tumor formation, and CA-NFAT1 expression subverted the transformation of NIH 3T3 cells induced by the H-rasV12 oncogene. The differential roles for NFAT1 are at least partially due to the protein C-terminal domain. These results suggest that the NFAT1 gene acts as a tumor suppressor gene and the NFAT2 short isoform acts gene as an oncogene, supporting different roles for the two transcription factors in tumor development.

The nuclear factor of activated T cells (NFAT) family of transcription factors, first described as a regulator of T-cell activation, is composed of four calcium-responsive proteins named NFAT1 (NFATc2/NFATp), NFAT2 (NFATc1/NFATc), NFAT3 (NFATc4), and NFAT4 (NFATc3/NFATx). All NFAT proteins share a common DNA-binding domain (DBD) that has a moderate sequence similarity to the DBD of the Rel family of transcription factors. This domain endows all NFAT proteins with the specificity to bind the DNA core sequence A/TGGAAA (38). NFAT proteins also share a regulatory conserved N-terminal region called the NFAT homology region (NHR). This region is highly phosphorylated in resting cells, keeping NFAT in an inactive state and restricted to the cytoplasm. An increase in intracellular calcium activates calcineurin, a calcium/calmodulin-dependent serine/threonine phosphatase that directly dephosphorylates the NHR, allowing NFAT to translocate to the nucleus and increase its DNA affinity (12, 41). Once located in the nucleus, NFAT proteins can bind to their target promoter elements and activate the transcription of specific responsive genes, either alone or in combination with other nuclear partners (25). Each NFAT gene may be alternatively spliced into two or more isoforms that differ at the amino and/or carboxyl termini, although the

core of the DBD region remains conserved. Additionally, a transactivation domain located in the variable regions in NFAT has been identified (38).

NFAT1 and NFAT2 are the prevalent NFAT family members expressed in peripheral T lymphocytes. Upon T-cell receptor stimulation, NFAT leads to a change in the expression of a number of cytokine genes, including those for interleukin 2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, and gamma interferon. However, NFAT also regulates other responsive genes, like those for p21^{Waf1}, CD40 ligand, FasL, CDK4, and cyclin A2, indicating that these transcription factors may also be involved in the control of the cell cycle and apoptosis (7, 42). Although NFAT1 and NFAT2 share 72% sequence similarity in their DBDs and act similarly in functional assays, mice deficient in either of these two genes have markedly divergent phenotypes. Three-month-old NFAT1^{-/-} mice develop a lymphocyte hyperproliferative phenotype that is reflected in a mild size increase in peripheral lymphoid organs accompanied by a reduction in cell death and an increased cell cycle rate (6, 19, 39, 44). NFAT1^{-/-} mice also develop neoplastic transformation of cartilage cells that resemble chondrosarcomas (37). In contrast, NFAT2^{-/-} mice die in utero due to a defect in the development of cardiac valves and septa (13, 35). Interestingly, peripheral NFAT2^{-/-} T cells from chimeric NFAT2^{-/-} × RAG^{-/-} mice show impaired proliferation with no apparent defect in apoptosis (36, 45).

The phenotypes of NFAT-deficient mice suggest that this family of transcription factors is likely to play a much broader role in the regulation of cell growth and apoptosis than previously described. Furthermore, divergent functions between NFAT1 and NFAT2 proteins in cell transformation may exist but have not yet been characterized. To address these hypoth-

* Corresponding author. Mailing address: Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rua André Cavalcanti, 37, Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil 20231-050. Phone: (55-21) 3233-1322. Fax: (55-21) 3233-1470. E-mail: jpvioa@inca.gov.br.

‡ Present address: Division of Biological Sciences, University of California, San Diego, CA.

† Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

[∇] Published ahead of print on 22 September 2008.

eses, we utilized previously characterized constitutively active NFAT1 (CA-NFAT1) and NFAT2 short isoform (CA-NFAT2/A) mutants, which are known to be constitutively localized in the nucleus, to bind DNA with high affinity and to activate endogenous NFAT target genes (29, 31). Thus, we used constitutively active proteins to analyze the effects of sustained NFAT activation on the cell cycle and apoptosis. Remarkably, ectopic expression of CA-NFAT1 and CA-NFAT2 short isoform in NIH 3T3 fibroblasts produced opposite phenotypes in the regulation of the cell cycle, apoptosis, and cell transformation. We observed that NFAT2 short isoform acts as a positive regulator of cell proliferation, a repressor of cell death, and an inducer of cell transformation. Conversely, NFAT1 enhanced cell death, repressed the cell cycle, and subverted cell transformation. Taken together, these results strongly suggest that NFAT1 and NFAT2 genes have important, opposing roles in the control of the cell cycle and apoptosis. Furthermore, NFAT1 and NFAT2 short isoform genes may function as a tumor suppressor or an oncogene, respectively, suggesting a putative role in tumor development.

MATERIALS AND METHODS

Animals and cell culture. Athymic BALB/c nude/nude, NFAT1^{+/+}, and NFAT1^{-/-} mice were maintained in the Brazilian National Cancer Institute animal facility. NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} (C57BL/6 × 129/Sv) mice were generated as previously described (44). Eight- to 12-week-old mice were used in all experiments according to the guide for the care and use of laboratory animals (National Institutes of Health). NIH 3T3 cell cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with either 10% fetal bovine serum (FBS) or 0.5% FBS as indicated in the figure legends. The cells were cultured in a humidified environment containing 5% CO₂ at 37°C.

Plasmid construction. The retroviral expression vectors pLIREs-EGFP, pLIREs-EGFP-CA-NFAT1, CA-NFAT2, and pBabe-H-rasV12 were used in the retroviral-transduction experiments. For more information on their construction, see the supplemental material. The CA-NFAT1ΔC truncated protein was constructed by mutation of CA-NFAT1 cDNA at sites C2205G and C2208T, creating a StuI restriction site just after the DBD by using the GeneTailor Site-Directed Mutagenesis system (Invitrogen). The mutated cDNA was then digested with StuI and NruI and religated, deleting the 227-amino-acid C terminus of NFAT1. The CA-NFAT1 construct contains a simian virus 40 nuclear localization signal at its C terminus adjacent to its stop codon, which was maintained. All CA-NFAT cDNAs were subcloned into pLIREs-EGFP. All constructs were confirmed by restriction enzyme mapping and DNA sequencing.

Production of recombinant retroviruses and infection of NIH 3T3 cells. The BD EcoPack2 ecotropic packaging cell line (BD Biosciences, San Jose, CA) was transiently transfected with retroviral vector by calcium phosphate precipitation for 24 h. The virus-containing cell supernatant was collected 48 h after transfection and concentrated using Amicon Ultracel 50k (Millipore, Billerica, MA). The supernatant was supplemented with 8 μg/ml Polybrene (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) and immediately used for spin infection (twice for 45 min each time at 380 × g at room temperature) of 2 × 10⁴ NIH 3T3 cells. The infected cells were incubated at 37°C for an additional 24 h and trypsinized, and the efficiency of transduction was assessed by green fluorescent protein (GFP) expression using flow cytometric analyses. For CA-NFAT1 and CA-NFAT2 coexpression experiments, cells were first infected with CA-NFAT2-containing vector, expanded for 1 week, and then reinfected with CA-NFAT1 or empty vector. The efficiency of transduction was analyzed for CA-NFAT2 expression by GFP expression prior to the second round of infection and for CA-NFAT1 using intracellular staining with NFAT1 polyclonal antibody anti-67.1 and rhodamine-labeled anti-rabbit immunoglobulin G (KPL) by flow cytometric analyses. To ensure reproducibility, each experiment was repeated using cells derived from independent viral infections.

NIH 3T3-H-rasV12 cell construction. NIH 3T3-H-rasV12 cells were generated by transducing NIH 3T3 wild-type cells with the pBabe-H-rasV12 retroviral vector following selection for puromycin (15 μg/ml; Sigma) resistance for 14 days. Seven clones were then isolated and tested for H-rasV12 expression by Western blotting (data not shown). All clones overexpressed H-rasV12, and one was selected for further experimentation.

Cell proliferation studies. NIH 3T3 wild-type or NIH 3T3-H-rasV12 cells infected with either the control pLIREs-EGFP or pLIREs-EGFP-CA-NFAT virus were plated in triplicate in 96-well microtiter plates. For nonconfluent assays, 8 × 10² cells were plated per well; for confluent assays, 8 × 10³ cells were plated per well. Cell proliferation was analyzed at the indicated times by crystal violet or [³H]thymidine incorporation. The crystal violet incorporation assay involved fixing the cells with ethanol for 10 min, followed by staining them with 0.05% crystal violet in 20% ethanol for 10 min and solubilization with methanol. The plate was read on a spectrometer at 595 nm. The [³H]thymidine incorporation assay consisted of pulsing the cells with [³H]thymidine (5 μCi/ml) for 8 h. The cells were then harvested at the indicated times, and [³H]thymidine incorporation was analyzed.

Cell cycle and sub-G₁ analyses. Six-well microtiter plates were inoculated with 2.4 × 10⁴ or 2.4 × 10⁵ cells for nonconfluence and confluence assays, respectively. On the indicated day, the cells were trypsinized and washed once with phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then stained with propidium iodide (75 μM) in the presence of NP-40. Analysis of the DNA content was done by collecting 10,000 events for cell cycle analysis or 20,000 events for sub-G₁ analysis using a FACScalibur flow cytometer and CellQuest software (BD Biosciences).

Annexin V staining. NIH 3T3 cells infected with either pLIREs-EGFP or pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 were plated at subconfluence densities, trypsinized 24 h later, washed with PBS, stained with phycoerythrin-conjugated annexin V (BD Biosciences), and analyzed by flow cytometry.

Focus formation. Infected NIH 3T3 or NIH 3T3-H-rasV12 cells were diluted 1:5 or 1:500, respectively, with uninfected NIH 3T3 wild-type cells. These mixed cultures were plated at a final density of 5 × 10⁴ cells/well of a six-well plate, and the growth medium was changed every 2 days. After 2 weeks, the cells were visualized by both phase-contrast microscopy and fluorescence microscopy for detection of GFP expression. Subsequently, the plates were rinsed in PBS and fixed with ethanol and then stained with 0.05% crystal violet in 20% ethanol to visualize foci.

Semisolid-medium growth and nude-mouse injections. Six-well plates were coated with 1.2% agarose-supplemented growth medium to resist cell adhesion. Infected or uninfected cells were then trypsinized, and 5 × 10³ or 1 × 10³ NIH 3T3 wild-type or H-rasV12 cells, respectively, were resuspended in 3 ml of growth medium containing 0.6% agarose. After being plated, colonies were allowed to grow for 4 weeks for NIH 3T3 wild-type cells or for 2 weeks for NIH 3T3-H-rasV12 cells. Representative colonies were visualized by both phase-contrast microscopy and fluorescence microscopy to detect GFP expression, and the total number of colonies was determined. For analysis of tumorigenic potential in vivo, uninfected cells or cells that had been infected with either the pLIREs-EGFP or the pLIREs-EGFP-CA-NFAT virus were trypsinized, washed, and resuspended in PBS. Athymic BALB/c nude mice were injected subcutaneously in the left flank with 5 × 10⁵ NIH 3T3 wild-type cells or 3 × 10⁵ NIH 3T3-H-rasV12 cells, and tumor volumes (V) were analyzed every 5 days using the following formula: V = 0.52 × (length² × width). The numbers of mice that were injected with NIH 3T3 wild-type or H-rasV12 cells, uninfected or infected with empty vector or CA-NFAT retroviruses, are indicated in the figure legends. Mice were sacrificed, and photographs were taken 70 days after injection for NIH 3T3 wild-type cells or 10 days after injection for NIH 3T3-H-rasV12 cells.

MCA-induced tumor formation. Animals were injected subcutaneously in the hind flank with 50 μg/animal of methylcholanthrene (MCA) suspended in 0.1 ml sesame oil. Tumor development was observed weekly. Mice with a tumor >10 mm in diameter were counted as tumor positive and were sacrificed when they had an overt mass of ≥15 mm.

RESULTS

NFAT1 and NFAT2 sustained activity leads to opposite phenotypes when expressed in NIH 3T3 cells. In order to study the roles of NFAT transcription factors in cellular proliferation, we utilized well-characterized constitutively active CA-NFAT mutants (29, 31). CA-NFAT1 and CA-NFAT2 short isoform (CA-NFAT2/A) mutants were cloned into the retroviral vector pLIREs-EGFP. A schematic alignment of NFAT1 and NFAT2/A (short isoform) proteins is shown in Fig. 1A. Subsequent expression analysis of the encoded CA-NFATs demonstrated that the proteins functioned properly and had all the expected characteristics. NFAT mutant proteins transiently ex-

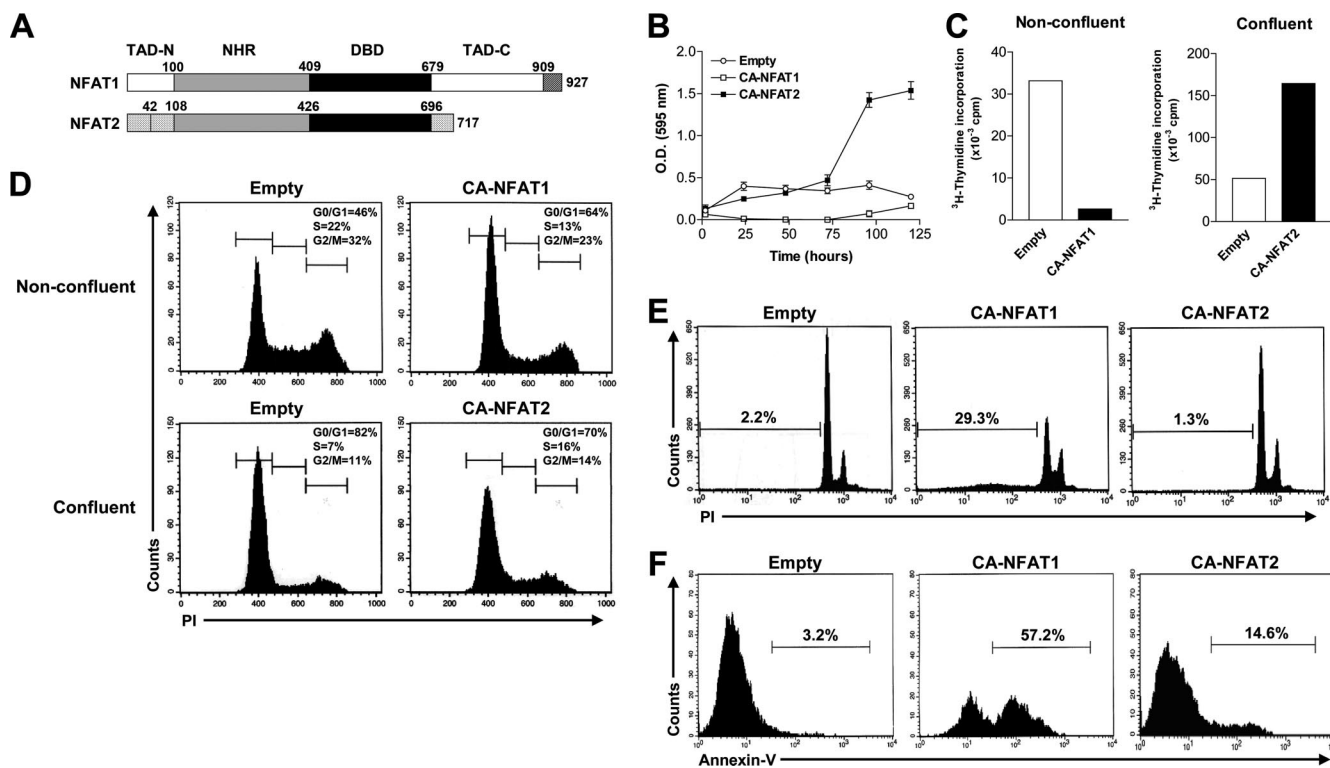


FIG. 1. NFAT1 and NFAT2 sustained activity induces opposite phenotypes in NIH 3T3 cells. Cells were infected with the empty vector or CA-NFAT1 or CA-NFAT2 retrovirus, plated at the indicated confluence, and analyzed for cell growth, cycle, and death. (A) Schematic alignment of NFAT proteins used in the study. TAD, transactivation domain. For protein isoforms, identical shading patterns represent identical sequences. The boundary of each region is labeled above the sequence, with the numbering referring to the amino acid position of the murine protein. (B) Proliferation kinetic analyses by crystal violet staining. O.D., optical density. (C) Cell proliferation after a 24-h period analyzed by [^3H]thymidine incorporation. (D) Cell cycle analysis 48 h after plating. Cells were fixed and stained with propidium iodide (PI) and then analyzed by flow cytometry. The percentage of cells in each stage of the cell cycle (G₀/G₁, S, and G₂/M) is indicated. (E) Cell death analysis. Cells were plated at confluence and then were stained with PI and analyzed by flow cytometry 48 h after being plated. The percentages of cell death (sub-G₀) are indicated. (F) Cells were plated at confluence and then were stained with annexin V and analyzed by flow cytometry 24 h later. The percentages of phosphatidylserine-positive cells are indicated. All results are representative of at least three independent experiments. The standard deviations (error bars) indicate the variance within one experiment.

pressed in HEK293 cells had the expected apparent molecular weight, were constitutively localized in the nucleus compared to wild-type NFAT proteins, and when expressed in Jurkat T cells, CA-NFAT proteins showed the capability to constitutively transactivate an NFAT-responsive reporter luciferase construct (3xNFAT-Luc) compared to wild-type NFATs (see Fig. S1 in the supplemental material). All constructs showed similar infection capabilities, protein expression, protein nuclear localization, and transactivation activities (data not shown), validating their use in elucidating the mechanism behind the observed differences between NFAT1 and NFAT2 in regulating cell proliferation. Retroviral transduction was used, and >85% of NIH 3T3 cells were routinely infected. High levels of infection allow the analysis of the bulk-infected population of cells, preventing any possible cell alteration caused by isolating cell line clones.

When we first infected NIH 3T3 cells with CA-NFAT cDNAs or pLIREs-EGFP empty vector, we noticed a striking difference between the cultures. Whereas NIH 3T3 wild-type cells and cells infected with empty vector (control) showed similar cell densities and viabilities, CA-NFAT2-expressing cells had increased in numbers, a characteristic opposite of CA-NFAT1-expressing

cells, which demonstrated a remarkable reduction in total cell number and viability as analyzed by trypan blue exclusion (data not shown). To further analyze this difference in growth capacity, we performed a proliferation-kinetics assay accompanied by crystal violet incorporation, which correlates with total cell numbers. Unlike control cells, which stopped growing once they had reached confluence, we found that CA-NFAT2-expressing cells overgrew the monolayer and continued to proliferate beyond confluence (Fig. 1B). Surprisingly, CA-NFAT1-expressing cells showed a completely opposite phenotype. They did not reach confluence, accumulated in reduced numbers, and kept a low proliferation profile throughout the experiment (Fig. 1B). In fact, NIH 3T3 cells expressing CA-NFAT1 showed a remarkable reduction in cell proliferation and were predominantly in the G₁ phase of the cell cycle after a 48-h period compared to the control (Fig. 1C and D). In contrast, we found that CA-NFAT2-expressing cells continued to proliferate in an overconfluent culture and maintained a cell cycle profile typical of actively dividing cells (Fig. 1C and D). These data suggest that NFAT1 and NFAT2 have different roles in the control of cell growth and proliferation.

Since CA-NFAT1-expressing cells appeared to suffer a re-

duction in numbers in the proliferation-kinetics assay, we next assessed the involvement of cell death. NIH 3T3 cells infected with empty vector exhibited a low proportion of cells having sub- G_0 DNA content, as shown by flow cytometry, indicative of cells undergoing apoptosis (Fig. 1E). This low level of cell death was also seen in CA-NFAT2-expressing cells (Fig. 1E). However, 72 h after the cells were infected with CA-NFAT1, approximately one-third of the cells exhibited sub- G_0 DNA content, indicating that CA-NFAT1 induced apoptosis in NIH 3T3 cells (Fig. 1E). Annexin V staining of CA-NFAT1-expressing cells 48 h postinfection showed that DNA fragmentation is preceded by an externalization of phosphatidylserine, confirming that CA-NFAT1 is capable of inducing apoptosis in NIH 3T3 cells (Fig. 1F), while control NIH 3T3 cells expressing empty vector or CA-NFAT2 showed only a low level of annexin V staining (Fig. 1F). Taken together, these results indicate that sustained activation of the NFAT1 signaling pathway inhibits the cell cycle and induces apoptosis, as reflected by the decrease in total cell numbers. However, this phenotype is completely opposite to the one induced by sustained activation of NFAT2, which leads to cell accumulation.

CA-NFAT2 activity, but not CA-NFAT1 activity, is able to induce all transformation hallmarks in NIH 3T3 cells. We next asked whether CA-NFAT2 is able to induce a transformed phenotype in NIH 3T3 cells. We previously observed that CA-NFAT2-expressing NIH 3T3 cells exhibit growth beyond confluence, which indicates loss of contact growth inhibition. To better visualize this phenotype, we performed a focus-forming assay in which empty-vector control or CA-NFAT-expressing cells were plated together with an excess of uninfected NIH 3T3 wild-type cells. Next, the cells were grown in culture for 12 to 15 days, and formation of transformed foci was analyzed by crystal violet staining and fluorescence microscopy. Control empty-vector- and CA-NFAT1-infected cells gave rise to only a small number of small foci when analyzed by crystal violet staining, suggesting that these two constructs are not able to transform NIH 3T3 cells (Fig. 2A). However, when CA-NFAT2 was expressed in these cells, a large number of foci formed (Fig. 2A). Since GFP and CA-NFATs were expressed from the same bicistronic mRNA in the pLIREs-EGFP vector, we were able to track cells that expressed CA-NFATs or the empty vector, directly discriminating them from NIH 3T3 wild-type cells by fluorescence microscopy. From this analysis, we found that cells infected with empty vector were morphologically indistinguishable from uninfected neighboring cells (data not shown). Furthermore, most of the foci formed in empty-vector-treated cells were GFP negative, indicating that focus formation in this culture was due to spontaneous transformation of NIH 3T3 cells, rather than to retroviral transduction (Fig. 2B). Also, foci formed in the CA-NFAT1-infected culture did not show GFP fluorescence, confirming that CA-NFAT1 is not able to transform NIH 3T3 cells (Fig. 2B). However, all of the CA-NFAT2-expressing cells in the mixed culture formed readily detectable GFP-bright foci (Fig. 2B).

To further analyze the cell-transforming potential of CA-NFAT proteins, NIH 3T3 cells were plated in semisolid agarose medium, in which there is no solid substratum for cell adhesion to occur. CA-NFAT2-expressing cells readily formed many large, GFP-bright colonies compared to control cells (Fig. 2C and D). Conversely, CA-NFAT1 and control empty-

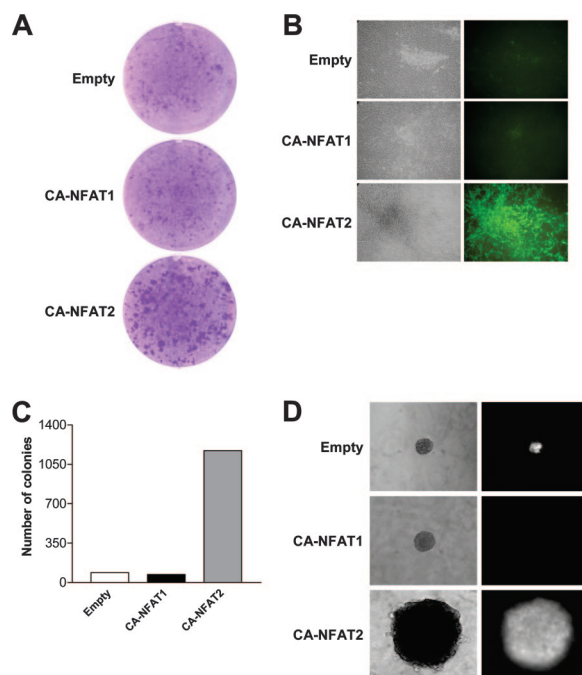


FIG. 2. NFAT2, but not NFAT1, constitutive activity is able to transform NIH 3T3 cells. NIH 3T3 cells were infected with empty vector or CA-NFAT1 or CA-NFAT2 retrovirus. (A) Cells transduced with the indicated constructs were mixed 1:5 with uninfected NIH 3T3 wild-type cells and grown to 15 days postconfluence. Focus formation was assessed by crystal violet staining. (B) Phase-contrast microscopy (left) and optical fluorescence microscopy for GFP expression (right) of representative NIH 3T3 foci from panel A. (C) Quantitation of colonies from NIH 3T3 cells infected with either empty vector or CA-NFAT retroviruses grown in semisolid agarose medium. Cells (5×10^3) were inoculated, and colonies were counted 30 days after being plated. (D) Phase-contrast microscopy (left) and optical fluorescence microscopy for GFP expression (right) of representative NIH 3T3 colonies from panel C. All results are representative of at least three independent experiments.

vector-expressing cells formed only a few small colonies (Fig. 2C and D). In the case of CA-NFAT1-infected cells, none of the colonies formed were fluorescent, and thus, they were likely formed by uninfected NIH 3T3 cells, indicating that CA-NFAT1 suppresses colony formation, as well as being unable to transform NIH 3T3 cells (Fig. 2D).

Furthermore, we tested whether CA-NFAT2 could affect cell proliferation under reduced-serum conditions, which are known to induce cell cycle arrest and apoptosis in normal fibroblasts. When cultured in 0.5% FBS medium, control NIH 3T3 cells failed to grow and exhibited a reduced proliferation rate (Fig. 3A and B). Additionally, a large proportion of control cells had sub- G_0 DNA content, indicative of apoptosis, and a low accumulation of cells in the G_1 phase of the cell cycle (Fig. 3C and D). Remarkably, NIH 3T3 cells expressing CA-NFAT2 showed the ability to grow under serum starvation conditions, exhibited high levels of cell proliferation, and were able to enter the cell cycle, as shown by a moderate increase in cells in the S and G_2/M phases of the cell cycle (Fig. 3A to C). More surprisingly, CA-NFAT2-treated cells were able to prevent growth factor withdrawal-induced apoptosis (Fig. 3D).

As a final confirmation of the transforming potential of

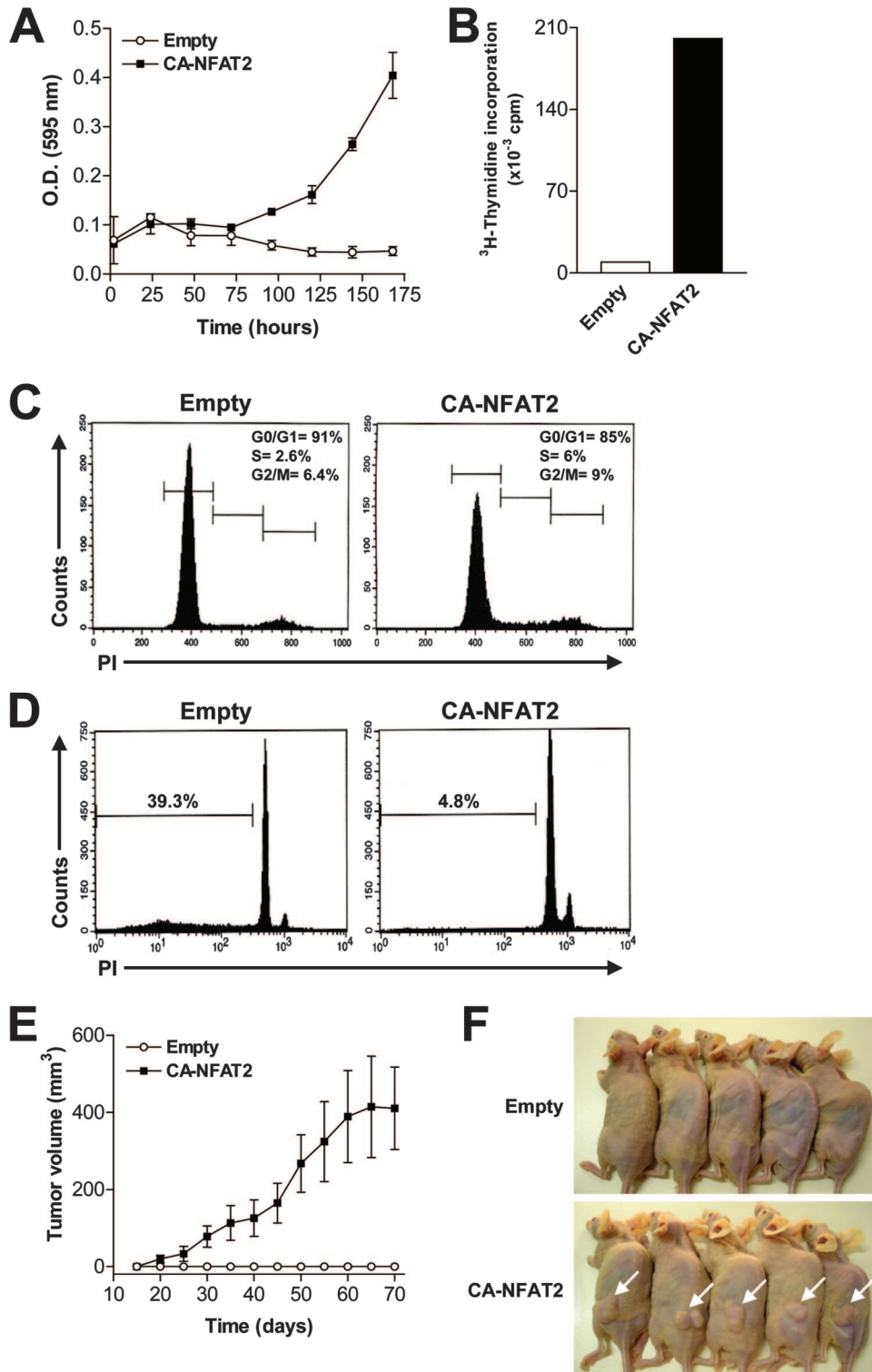


FIG. 3. Sustained NFAT2 activity in NIH 3T3 cells promotes cell cycle progression and prevents apoptosis under reduced-serum conditions and induces the formation of tumors in athymic nude mice. NIH 3T3 wild-type cells were infected with either empty vector or CA-NFAT2 retrovirus. (A and B) Infected cells were plated in triplicate, and cell proliferation was determined by incorporation of crystal violet (A) or by [3 H]thymidine incorporation (B) 144 h after plating. O.D., optical density. (C) Cell cycle analysis of infected cells 144 h after being plated. Cells were analyzed as for Fig. 1D. (D) Cell death analysis 144 h after plating. Cells were analyzed as for Fig. 1E. (A to D) Cells were cultured at confluence under reduced-serum conditions (0.5% [vol/vol] FBS). The results are representative of at least three independent experiments. The standard deviations (error bars) indicate the variance within one experiment. (E and F) Tumor formation in nude mice following subcutaneous injection of 5×10^5 cells infected with empty vector ($n = 6$) or CA-NFAT2 ($n = 7$). (E) Tumor volumes were measured every 5 days, and the data are shown as means \pm standard errors of the mean. (F) Tumors from five representative mice are indicated by white arrowheads.

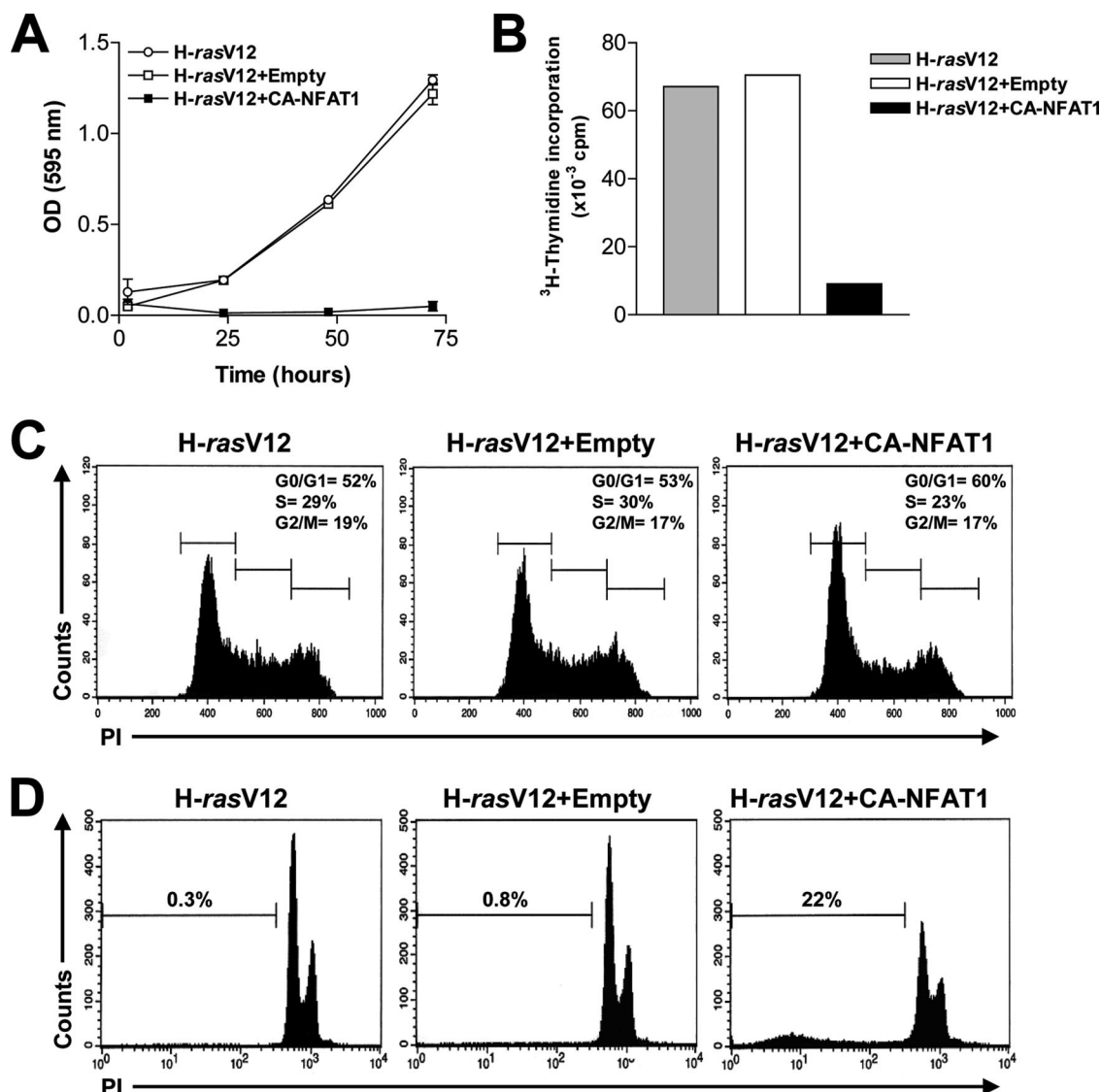


FIG. 4. CA-NFAT1 suppresses cell proliferation and induces death in neoplastic cells. NIH 3T3-H-rasV12 cells, uninfected or infected with either the empty vector or CA-NFAT1 retrovirus, were plated, and cell growth, cycle, and death were analyzed as for Fig. 1. (A and B) Cells were analyzed for proliferation daily by incorporation of crystal violet (A) or in a nonconfluent manner after a 48-h period by [³H]thymidine incorporation (B). OD, optical density. (C) Cell cycle analysis 48 h after plating at subconfluence. (D) Cell death analysis 48 h after plating at confluence. All results are representative of at least three independent experiments.

CA-NFAT2, we tested whether the protein was able to induce tumor formation in athymic nude mice. NIH 3T3 cells expressing empty vector or CA-NFAT2 protein were implanted in the flanks of BALB/c nude mice, and the animals were monitored for tumor formation. Whereas all mice inoculated with CA-NFAT2-expressing cells displayed large flank tumors that continued to grow with time, none of the mice inoculated with control cells exhibited detectable tumors, even 70 days after inoculation (Fig. 3E and F). Taken together, these results clearly highlight the oncogenic potential of NFAT2 and suggest a unique role for the protein, whereas the NFAT1 protein appears unable to induce the transformed phenotype.

Sustained NFAT1 activity shows tumor suppressor capability. We have previously shown that lymphocytes from NFAT1-deficient mice have a hyperproliferative phenotype that corre-

lates with an overexpression of cyclins A2, B1, E, and F (6). Ranger et al. also demonstrated that these mice have a propensity to develop cartilage neoplastic transformation (37). These data suggest that NFAT1 might be a negative regulator of cell proliferation and transformation, which correlates with our results in NIH 3T3 cells. To directly test whether NFAT1 has the capability to suppress cell growth and to subvert a transformed cell phenotype, we constructed NIH 3T3 cell clones that harbor the oncogene H-rasV12 (NIH 3T3-H-rasV12). Analysis of the NIH 3T3-H-rasV12 clones showed the typical transformed phenotype, and one clone was chosen for further experiments (data not shown). Subsequently, we tested whether CA-NFAT1 was able to suppress these transformed characteristics of the NIH 3T3-H-rasV12 clone. As shown in Fig. 4A, NIH 3T3-H-rasV12 cells, uninfected or infected with

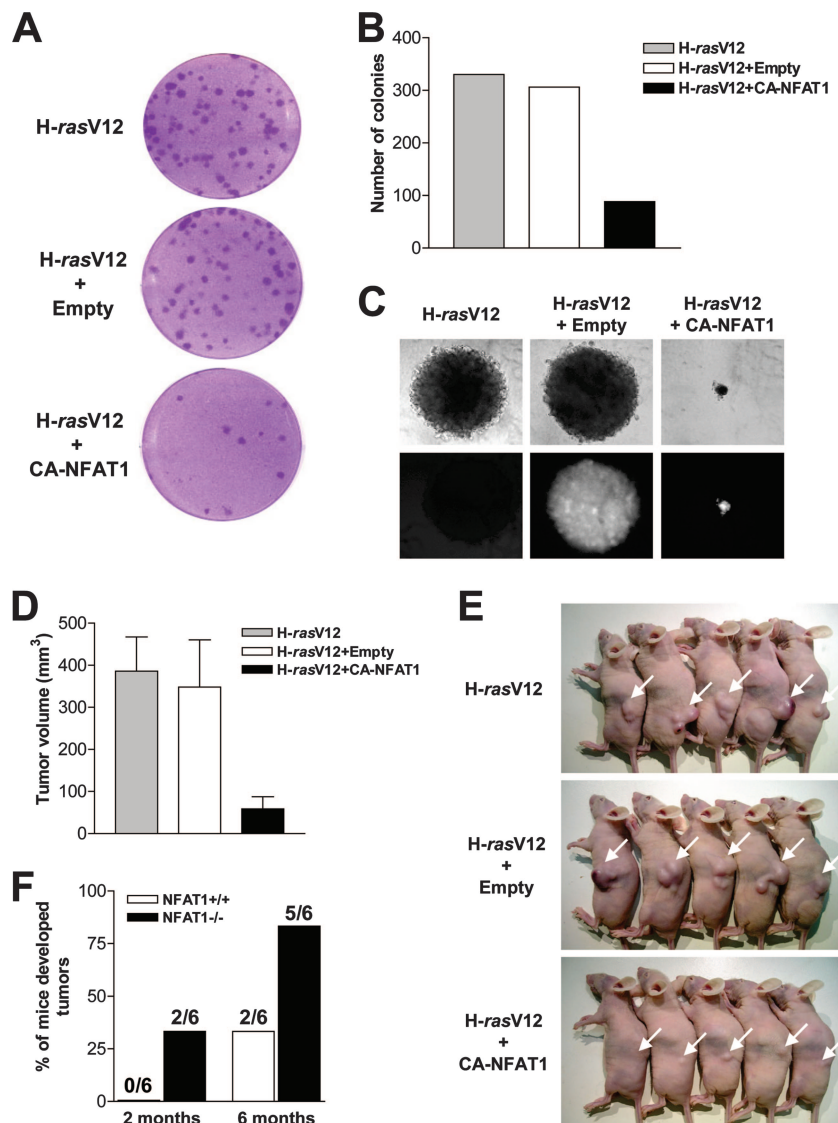


FIG. 5. CA-NFAT1 acts as a tumor suppressor gene. (A to E) NIH 3T3-H-rasV12 cells were infected with the empty vector or CA-NFAT1 retrovirus. (A) NIH 3T3-H-rasV12 cells transduced with the indicated constructs were mixed 1:500 with uninfected NIH 3T3 wild-type cells and grown to 15 days postconfluence. Focus formation was assessed by crystal violet staining. (B) Quantitation of colonies from transformed cells grown in semisolid agarose medium. Cells (1×10^3) were inoculated, and colonies were counted 2 weeks after being plated. (C) Phase-contrast microscopy (top) and optical fluorescence microscopy for GFP expression (bottom) of representative NIH 3T3-H-rasV12 colonies from panel B. These results are representative of at least three independent experiments. (D and E) Tumor formation in nude mice following subcutaneous injection of 3×10^5 NIH 3T3-H-rasV12 ($n = 7$), NIH 3T3-H-rasV12-empty vector ($n = 7$), or NIH 3T3-H-rasV12-CA-NFAT1 ($n = 5$)-expressing cells. Tumor volumes were measured every 5 days. (D) The data are shown as means plus standard errors of the mean. (E) Tumors from five representative mice are indicated by white arrowheads. (F) Susceptibilities of NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice to chemical carcinogen-induced tumors. The animals were injected subcutaneously with a single dose of MCA and evaluated for the occurrence of tumors at the indicated times. The data are expressed as the percentage of the number of mice that developed tumors ($n = 6$).

empty vector, grew similarly. However, CA-NFAT1 expression was able to reduce the cell growth of the transformed NIH 3T3-H-rasV12 cells throughout the time course. This reduction in growth was accompanied by a large decrease in DNA replication and an accumulation in G₁ phase of the cell cycle after a 48-h period postinfection compared to control cells (Fig. 4B and C). CA-NFAT1 expression in NIH 3T3-H-rasV12 cells also induced these transformed cells to undergo apoptosis, as indicated by sub-G₀ DNA content analysis, which was not seen in empty-vector-expressing cells (Fig. 4D).

We next asked whether the CA-NFAT1 cell cycle arrest and cell death induction could lead to a reversion of other hallmarks of cellular transformation. Indeed, CA-NFAT1 expression in NIH 3T3-H-rasV12 was able to clearly reduce the number of foci formed in culture compared to NIH 3T3-H-rasV12 and empty-vector-expressing cells that immediately formed foci (Fig. 5A). Additionally, the foci formed in CA-NFAT1-expressing cells were negative for GFP when analyzed by fluorescence microscopy, indicating that they were formed by nontransduced cells (data not shown). Further, NIH 3T3-

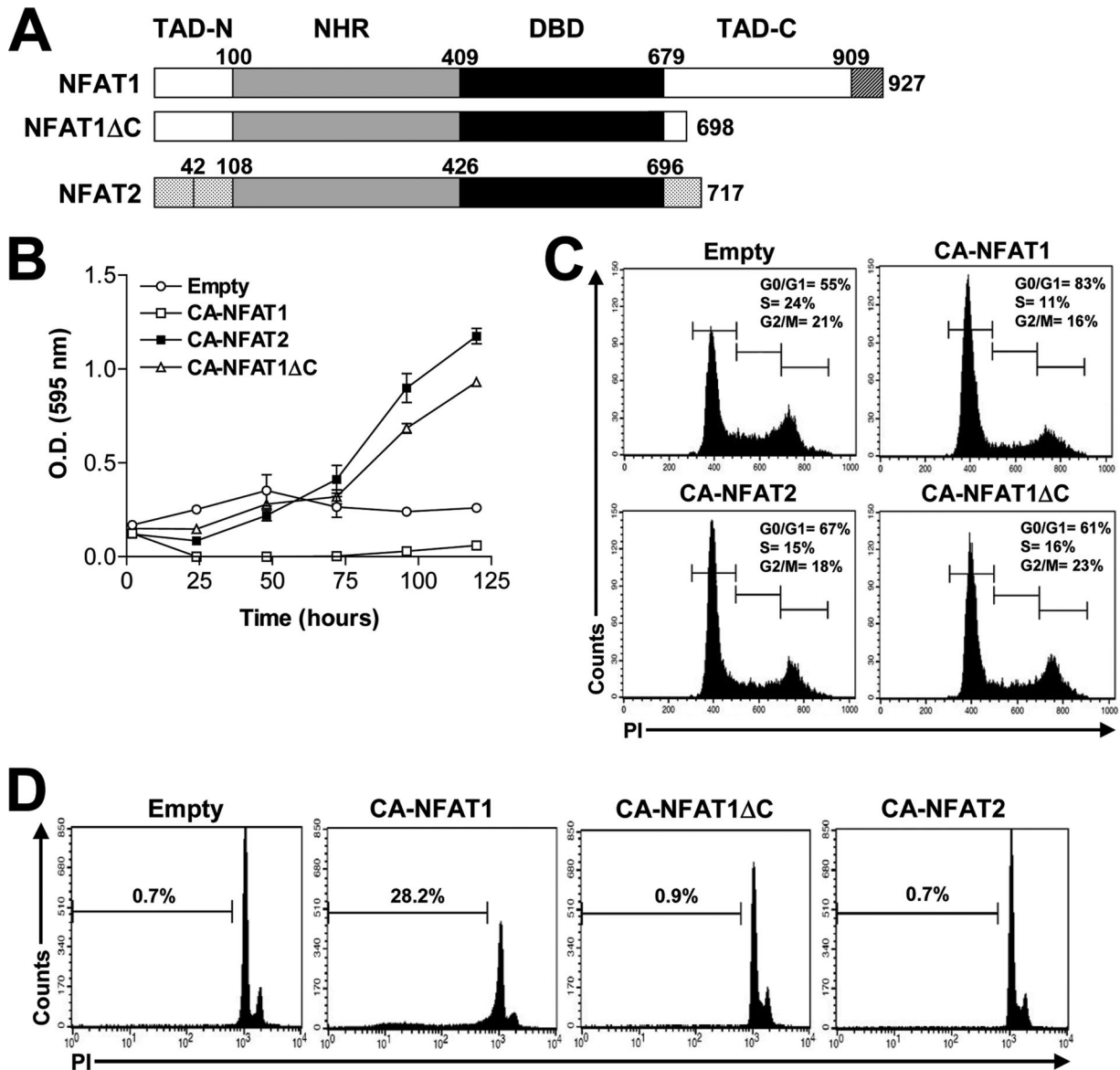


FIG. 6. Deletion of the long C terminus disrupts the ability of CA-NFAT1 to induce apoptosis and cell cycle arrest. (A) Schematic alignment of wild-type NFATs and truncated NFAT1ΔC proteins. See the legend to Fig. 1A for details. (B to D) Cells were infected with either the empty vector or CA-NFAT1, CA-NFAT1ΔC, or CA-NFAT2 retrovirus. The cells were plated, and then cell growth, cycle, and death were analyzed as for Fig. 1. (B) Cells were analyzed for proliferation daily by incorporation of crystal violet. O.D., optical density. The error bars indicate standard deviation. (C) Cell cycle analysis 48 h after plating at subconfluence. PI, propidium iodide. (D) Cell death analysis 48 h after plating at confluence. All results are representative of at least three independent experiments.

H-rasV12 CA-NFAT1-expressing cells formed only a few small colonies in semisolid medium compared to controls (Fig. 5B and C). GFP expression analysis showed that almost all colonies in empty-vector-expressing cells were fluorescent, which was seen only in very small colonies in the CA-NFAT1-expressing culture (Fig. 5C). Furthermore, we inoculated NIH 3T3-*H-rasV12* cells infected or uninfected with control or CA-NFAT1 retroviruses in the flanks of BALB/c nude mice. Although the transformation phenotype induced by the *H-rasV12* oncogene in NIH 3T3 cells is strong, the constant CA-NFAT1 expression and signaling clearly reduced the size of the tumors formed in athymic mice (Fig. 5D and E).

We had shown that CA-NFAT1 is able to subvert the transformed phenotype of NIH 3T3 induced by the *H-rasV12* oncogene. Next, we tested whether the lack of NFAT1 expression was able to increase the rate of tumor formation in NFAT1-deficient mice. Thus, wild-type (+/+) or NFAT1-deficient (-/-) mice were injected subcutaneously with a single dose of MCA and tumor occurrence was evaluated at the indicated times. While no wild-type mice developed tumors after 2 months and only 30% developed tumors after a 6-month period, 33% of NFAT1-deficient mice promptly developed sarcomas and approximately 80% of the mice developed tumors 6 months after MCA injection (Fig. 5F). This result demon-

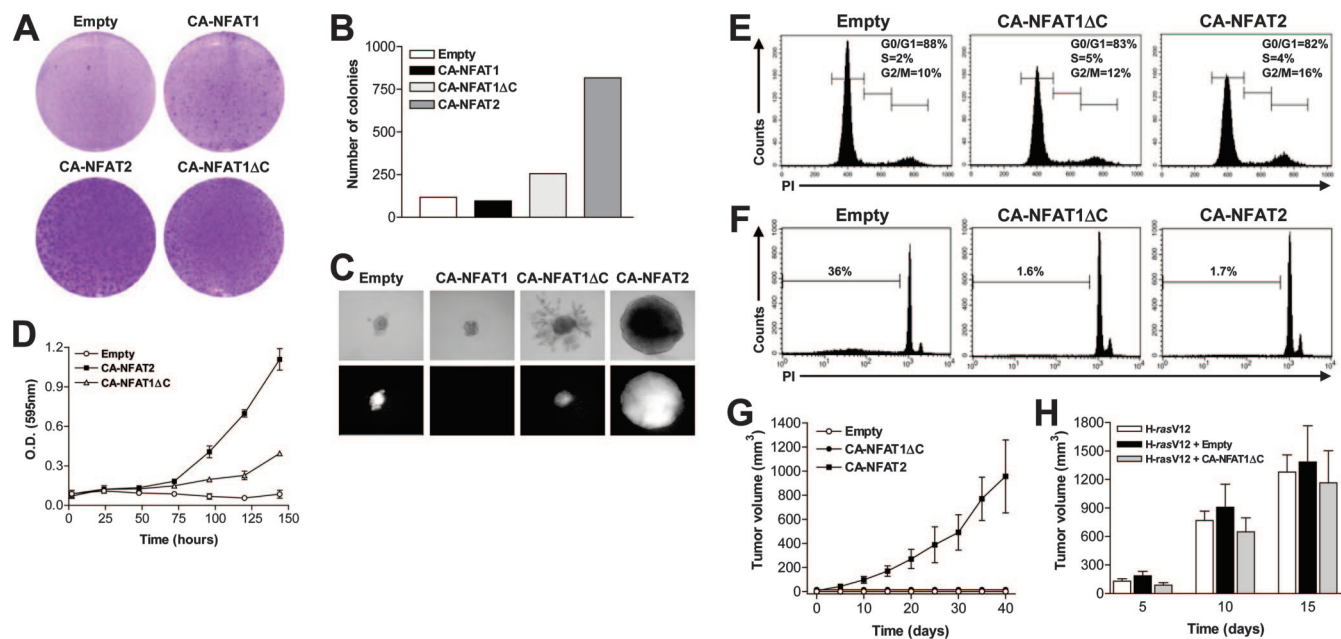


FIG. 7. Truncated CA-NFAT1 protein lacking the C terminus induces an intermediate transformed phenotype. NIH 3T3 cells infected with either the empty vector or CA-NFAT1, CA-NFAT1ΔC, or CA-NFAT2 retrovirus were used for all experiments. Infected cells were cultured in medium containing 10% FBS (A to C) or to subconfluence in the presence of 0.5% FBS (D to F). Focus formation (A) and semisolid-medium growth (B and C) were assessed as for Fig. 2. (C) Phase-contrast microscopy (top) and optical fluorescence microscopy for GFP expression (bottom) of representative NIH 3T3 colonies from panel B. (D) Infected cells were plated in triplicate, and cell proliferation was determined daily by incorporation of crystal violet. (E) Cell cycle analysis 144 h after being plated in reduced serum concentrations (0.5%). The cells were analyzed as for Fig. 1D. (F) Cell death analysis 144 h after being plated in reduced serum concentration (0.5%). The cells were analyzed as for Fig. 1E. All results are representative of at least three independent experiments. (G) Tumor formation in nude mice following subcutaneous injection of 5×10^5 NIH 3T3-empty vector ($n = 5$), CA-NFAT1ΔC ($n = 5$), or CA-NFAT2 ($n = 5$)-expressing cells. Tumor volumes were measured every 5 days, and the data are shown as means \pm standard errors of the mean (SEM). (H) Tumor formation in nude mice following subcutaneous injection of 3×10^5 NIH 3T3-H-rasV12 ($n = 5$), NIH 3T3-H-rasV12-empty vector ($n = 5$), or NIH 3T3-H-rasV12-CA-NFAT1ΔC ($n = 5$)-expressing cells. Tumor volumes were measured every 5 days. The data are shown as means \pm SEM.

strates that the lack of NFAT1 predisposes these mice to develop tumors under the action of chemical carcinogens and, taken together with the *in vitro* data in NIH 3T3 cells, suggests a tumor suppressor role for the NFAT1 protein.

The NFAT1 carboxy terminus is responsible for the tumor suppressor phenotype. To further investigate the different roles of NFAT proteins in the control of the cell cycle and death, a schematic analysis of a primary sequence alignment of murine NFAT1 and NFAT2/A cDNAs was created and is shown in Fig. 6A. As can be readily seen, NFAT1 has a long C terminus that is present in all NFAT family members (data not shown), with some variation in its primary sequence. However, this C terminus is completely absent in NFAT2/A due to an early poly(A) site downstream of exon 9 (10). We next sought to determine whether the NFAT1 C-terminal domain could be responsible for the differences observed between the NFAT1 and NFAT2 proteins. To answer this question, we constructed a truncated NFAT1 protein that lacked the long C terminus (NFAT1ΔC) by making a deletion a few amino acids after its DBD. The resulting mutant resembled the short C terminus of NFAT2/A (Fig. 6A). Strikingly, in a proliferation time course, CA-NFAT1ΔC-expressing NIH 3T3 cells showed a phenotype completely different from that of NIH 3T3 cells expressing the full-length CA-NFAT1 protein (Fig. 6B). Whereas CA-NFAT1 induced a reduction in cell growth compared to control cells, CA-NFAT1ΔC-expressing cells showed overconfluent

growth capability almost reaching CA-NFAT2 levels (Fig. 6B). In an NIH 3T3 cell culture, CA-NFAT1 expression induced a slight cell cycle arrest and significant apoptosis compared to controls, as evident in the increase of the G₁ phase of the cell cycle and the sub-G₀ DNA content, respectively, compared to the control (Fig. 6C and D). Conversely, the deletion of the NFAT1 C terminus (CA-NFAT1ΔC) was sufficient to completely abolish these phenotypes and to induce a CA-NFAT2-like phenotype.

Since CA-NFAT1ΔC was able to induce overconfluent proliferation indicative of loss of contact growth inhibition and showed characteristics of CA-NFAT2/A-expressing cells, we next determined whether the protein was also able to induce other transformation phenotypes. As shown in Fig. 7A, CA-NFAT1ΔC was able to readily induce focus formation in culture, although these foci were smaller than those formed by CA-NFAT2-expressing cells (Fig. 7A). Furthermore, when we analyzed the NIH 3T3 cell colony formation in a semisolid medium, CA-NFAT1 was unable to induce colony formation, while CA-NFAT1ΔC expression was able to double the number of colonies formed compared to empty-vector-expressing cells (Fig. 7B). Once again, the colonies formed by CA-NFAT1ΔC-expressing cells were less abundant and smaller than those of CA-NFAT2-expressing NIH 3T3 cells (Fig. 7B and C). As a final test, we analyzed the cell growth capacity under reduced serum conditions. CA-NFAT1ΔC-expressing

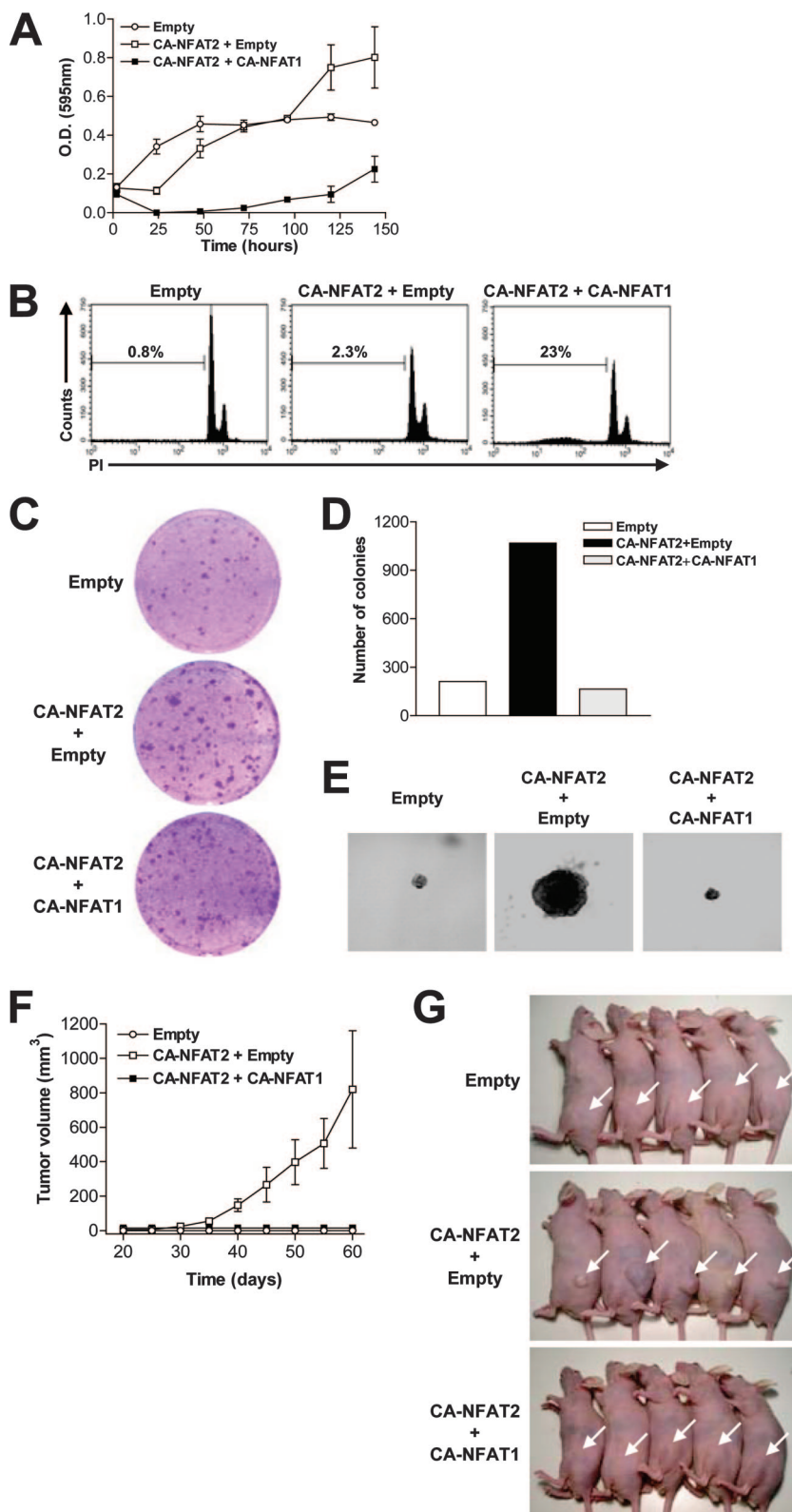


FIG. 8. CA-NFAT1 suppresses the transformed phenotype induced by CA-NFAT2. NIH 3T3 cells were infected with CA-NFAT2 (NIH 3T3-CA-NFAT2), and 1 week later, the cells were reinfected with empty vector or CA-NFAT1. Then, 24 h after the second round of infection, the cells were plated (0 h) and analyzed at the indicated times for proliferation daily by incorporation of crystal violet as for Fig. 1B (A), for cell death 48 h after being plated at confluence as for Fig. 1E (B), for focus formation by crystal violet staining as for Fig. 2A (C), for colony formation in semisolid medium as for Fig. 2C and D (D and E), and for tumor formation in nude mice following subcutaneous injection of 5×10^5 NIH 3T3-empty vector ($n = 5$), NIH 3T3-CA-NFAT2 plus empty vector ($n = 5$), or NIH 3T3-CA-NFAT2 plus CA-NFAT1 ($n = 5$)-expressing cells as for Fig. 3E and F (F and G). (F) Tumor volumes were measured every 5 days. The data are shown as means \pm standard errors of the mean. (G) Tumors from five representative mice are indicated by white arrowheads. All results are representative of at least three independent experiments.

NIH 3T3 cells cultivated in 0.5% FBS medium showed intermediate cell growth compared to that of CA-NFAT2- and empty-vector-expressing cells (Fig. 7D). When these cells were analyzed after a 6-day culture period in 0.5% FBS medium, CA-NFAT1 Δ C-expressing cells showed a proliferation profile similar to that of CA-NFAT2-expressing cells with a moderate decrease of cells entering the G₂/M phase of the cell cycle (Fig. 7E). Remarkably, CA-NFAT1 Δ C expression in NIH 3T3 cells was able to protect the cells from apoptosis induced by growth factor withdrawal compared to empty-vector-expressing cells (Fig. 7F).

We next assessed the capacity of CA-NFAT1 Δ C to promote tumor growth (Fig. 7G). While NIH 3T3 cells expressing CA-NFAT2 formed readily detectable tumors upon injection into BALB/c nude mice, empty-vector- and CA-NFAT1 Δ C-expressing cells failed to do so for the length of the experiment (Fig. 7G), even up to 80 days postinjection (data not shown). Nevertheless, CA-NFAT1 Δ C did not repress tumor growth of NIH 3T3-H-*rasV12*-transformed cells compared to wild-type and empty-vector-expressing NIH 3T3-H-*rasV12* cells (Fig. 7H). Taken together, these data indicate that the C-terminal domain of NFAT1 is responsible for the proapoptotic, cell cycle arrest, and tumor suppressor characteristics of the protein. Moreover, deletion of the NFAT1 C-terminal domain confers a partial cell transformation phenotype that resembles the phenotype induced following NFAT2/A protein expression.

CA-NFAT1 suppresses CA-NFAT2-induced transformation. Since sustained activation of NFAT1 was able to subvert cell transformation by the strong oncogene H-*rasV12*, we next asked what was the effect of CA-NFAT1 on the CA-NFAT2-transformed NIH 3T3 cells. We addressed this question by infecting NIH 3T3 cells with empty vector or CA-NFAT2 and 1 week later reinfected these cells with either empty vector or CA-NFAT1. Both CA-NFAT1 and CA-NFAT2 vectors carry the GFP gene as the reporter gene; therefore, we confirmed the first round of infections by analysis of GFP expression and the second through intracellular staining for NFAT1. In fact, about 85% of CA-NFAT2-infected NIH 3T3 cells were GFP bright after the first infection whereas about 83% expressed NFAT1 after the second round. As shown for CA-NFAT2-expressing NIH 3T3 cells (Fig. 1 to 3), NIH 3T3-CA-NFAT2 cells infected with empty vector displayed an overgrowth phenotype (Fig. 8A), normal levels of cell death (Fig. 8B), loss of contact growth inhibition (Fig. 8C), a capacity for colony formation in a semisolid substrate (Fig. 8D and E), and the ability to form tumors when injected in BALB/c nude mice compared to control cells (Fig. 8F and G). These results demonstrate that cells were still transformed after the second round of infection and after the time elapsed from the first infection. Distinctively, NIH 3T3-CA-NFAT2 cells infected with CA-NFAT1 exhibited a dramatic reduction in cell numbers and a low rate of proliferation compared to controls (Fig. 8A). The reduction in cell numbers was at least partially accounted for by increased cell death (Fig. 8B). Furthermore, CA-NFAT1 expression by NIH 3T3-CA-NFAT2 cells was able to reduce the size and the number of foci in focus-forming assays (Fig. 8C) and colonies in semisolid medium (Fig. 8D and E), suggesting a reversal of the transformed phenotype induced by CA-NFAT2. Finally, the expression of CA-NFAT1 by NIH 3T3-CA-

NFAT2 completely abolished in vivo tumor formation upon inoculation into BALB/c nude mice (Fig. 8F and G). Together, these data demonstrate that NFAT1 signaling is sufficient to abolish the transformation potential of NFAT2 short isoform.

DISCUSSION

In the current study, we showed that sustained activity of NFAT family members, NFAT1 and NFAT2, is able to regulate different mechanisms involved in the growth and death of NIH 3T3 fibroblasts (Fig. 1). The CA-NFAT2 short isoform induces a strong transformation phenotype, whereas CA-NFAT1 suppresses cell growth, apparently through its C-terminal domain. We showed that CA-NFAT2 short isoform is sufficient to induce NIH 3T3 cells to acquire the well-established hallmarks of cellular transformation that define it as a possible oncogene (Fig. 2 and 3) (17). However, CA-NFAT1 shows an antioncogenic activity. It was proposed that a candidate tumor suppressor gene should subvert the transformation phenotype when reintroduced into neoplastic cells and that the absence of the tumor suppressor gene in a cell or an animal should lead to an increased propensity to acquire a transformed phenotype (27). Our data directly show these characteristics for CA-NFAT1 and strongly suggest that NFAT1 is a tumor suppressor gene (Fig. 4 and 5). Moreover, CA-NFAT1 was able to suppress the transformed phenotype induced by CA-NFAT2 short isoform (Fig. 8), suggesting that different family members might have complementary functions and that the balanced expression of the two proteins might be important for the cell to enter into programs that determine whether it will live, proliferate, or die. Furthermore, we established that a CA-NFAT1 C-terminal deletion is sufficient to completely abrogate the proapoptotic function of NFAT1 and that this truncated protein induces a partially transformed phenotype in NIH 3T3 cells resembling the CA-NFAT2-induced phenotype (Fig. 6 and 7). This is the first time that a dual role in the control of the cell cycle and cell death has been characterized within the NFAT family of transcription factors in the same model, although evidence of this dichotomy is progressively emerging.

Recent studies suggest that the NFAT family of transcription factors plays a much broader role in the cell cycle than previously believed, and their contributions to tumorigenesis are becoming clearer. In fact, calcineurin is the major regulator of NFAT activation, and the observation that some human B- and T-cell lymphomas have sustained calcineurin activation suggests that NFAT proteins play a role in tumorigenesis (28). Furthermore, calcineurin activation is essential for tumor progression in a mouse model of lymphoma malignancy (28). Nevertheless, NFAT2 expression has also been linked to several malignant transformations, such as in diffuse large-B-cell and Burkitt's lymphomas (26, 33) and colon and pancreatic carcinomas (14, 18), where it has been demonstrated that NFAT2 expression and activation are essential to the development of cancer. On the other hand, a recent study showed that hypermethylation of the NFAT2 promoter region leads to reduced expression of the protein in human classical Hodgkin's lymphoma and human anaplastic large-cell lymphomas (2). Although these reports seem contradictory to our data, there is evidence that these lymphoma cells have also lost the immu-

noreceptor signaling pathway, suggesting that the need for NFAT signaling in tumorigenesis has been bypassed (4, 40). Furthermore, ectopic expression of the CA-NFAT2 short isoform in the 3T3-L1 preadipocyte cell line established that this was sufficient to induce a transformed phenotype. NFAT2 activation is also implicated in the expression of several cell cycle and survival factors, including cyclins D1 and D2, c-Myc, cyclooxygenase 2, CD40 ligand, and BlyS, that could ultimately aid in tumor growth and apoptosis evasion (5, 15, 20, 30, 33). Furthermore, NFAT2 null mice are embryonic lethal, resulting from a serious malformation of heart valves, while NFAT2^{-/-} × RAG-1^{-/-} chimeric mice showed reduced numbers of thymocytes and impaired proliferation of peripheral lymphocytes, suggesting an important role of the transcription factor in the positive regulation of cell proliferation (13, 35, 36, 45). Our results strongly corroborate these observations and directly demonstrate that sustained activation of NFAT2 short isoform is sufficient to induce cell cycle progression and is able to transform an immortalized cell line. Conversely, it has been previously demonstrated that lymphocytes from NFAT1^{-/-} mice hyperproliferate and that these mice display splenomegaly and delayed thymic involution compared to wild-type mice (39, 44). Ranger et al. also reported that NFAT1^{-/-} mice develop an extrasosseous cartilaginous mass resembling a chondrosarcoma (37). Furthermore, NFAT1 was shown to be able to directly bind to the promoter regions and to negatively regulate two cell cycle controllers, CDK4 and cyclin A2, resulting in a substantial reduction of their protein levels, although the relevance of this reduction to the cell cycle and proliferation was not assessed (3, 7). Although the downregulation of these genes could account for the cell cycle arrest in the G₁/S phase that we observed in NIH 3T3 cells expressing CA-NFAT1, the mechanism underlying this phenotype remains unknown. Since the regulation of signaling through each of the pathways mentioned above is known to influence various aspects of the tumorigenic phenotype, it will be interesting to determine if any of these effects are mediated by different actions of NFAT1 and NFAT2.

Other evidently different roles for NFAT family members in the biology of NIH 3T3 cells are in the control of apoptosis. We have demonstrated that NFAT1 and NFAT2 short isoform act in opposition in the control of apoptosis. Apoptosis operates in adult organisms to maintain normal cellular homeostasis; the violation of this cellular process can result in cancer, autoimmunity, and other diseases. NFAT1 and NFAT2 are highly expressed in peripheral T cells, where they are involved in the control of the termination of the immune response by inducing apoptosis. Activation-induced cell death (AICD) is a particular form of apoptosis that is important for the maintenance of immune system homeostasis. One important route of AICD is the activation of so-called death receptors by its ligands, in particular, FasL, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and, more recently, TRAIL. It has been shown that NFAT directly regulates FasL protein expression by binding to its promoter and inducing transactivation (21). Another possible target for NFAT regulation is TRAIL, a novel member of the TNF family of proapoptotic factors. The TRAIL promoter has several putative binding sites for NFAT transcription factors and has been shown to be regulated by NFAT in luciferase reporter assays (22, 43). Although these two mechanisms may

be relevant in the activation of cell death, there is no evidence of different roles in their regulation by distinct NFAT family members. An interesting target for NFAT regulation is the TNF- α gene. While NFAT2 proteins are unable to bind and transactivate the TNF- α promoter due to a low affinity of the NFAT2 DBD for the TNF- α promoter, NFAT1 is able to do so, leading to increased expression of TNF- α protein (32). This suggests a possible difference between these two proteins in the control of cell death through TNF- α regulation. Although the activation of the TNF- α gene could explain the ability of CA-NFAT1, but not CA-NFAT2, to induce apoptosis in our model, it does not explain why CA-NFAT1 Δ C did not induce apoptosis, as it contains exactly the same DBD as NFAT1 and, presumably, the same affinity for the TNF- α promoter region.

The observation that CA-NFAT1 induces apoptosis and cell cycle arrest while CA-NFAT1 Δ C and CA-NFAT2 prevent apoptosis induced by serum withdrawal and lead to increased proliferation of NIH 3T3 cells indicates that these transcription factors (NFAT1 and NFAT2) exhibit both individual and overlapping properties and that the functional differences are partially due to the C terminus of NFAT1. However, we cannot attribute the oncogenic capacity of NFAT2 short isoform totally to the lack of the long C-terminal domain, since the NFAT1 Δ C truncated protein is not able to induce tumor formation in BALB/c nude mice (Fig. 7G). The NFAT1 C-terminal domain shows sequence similarity to the corresponding regions of human NFAT2 long isoform, NFAT3, or NFAT4 (38). The C termini of human NFAT1 and NFAT2 long isoforms are capable of transactivation, defining this region as having a transcriptional regulatory role (9, 24). One possibility is that the NFAT transcription factor acts by activating apoptosis and inducing cell cycle arrest through the transactivation of target genes by the conserved C-terminal region of the protein. Until now, there has been only limited evidence that the NFAT C-terminal domain acts as an antioncogene, which is in agreement with our data. Recently, using a model of T-cell lymphoma induction by a T-cell lymphomagenic retrovirus (SL3-3) in mice, it was shown that the C terminus of NFAT4 is a target for retroviral insertion (16). Lymphomas in mice infected with the SL3-3 virus occur when there is an insertion in the promoter region of NFAT4, which blocks protein synthesis, or at the 3' region of intron 8 of the NFAT4 gene, leading to the generation of an NFAT4 short isoform, which lacks the C-terminal region but still contains a DBD that is similar in length to that of the NFAT2 short isoform. Furthermore, the lack of NFAT4 in mice (NFAT4^{-/-}) leads to an increased susceptibility to lymphoma induced by virus infection (16). This suggests that NFAT4 is also a tumor suppressor gene and that the lack of its C terminus is sufficient to inhibit this role. This is also true for the NFAT2 gene, in which several viral insertions at intron 9 were found in different types of cancer models induced by viral insertion (Mouse Retrovirus Tagged Cancer Gene Database [1]). The insertion at intron 9 leads to the formation of the NFAT2 short isoform and prevents the inclusion of the long C terminus that we are proposing to be a tumor suppressor domain of the NFAT transcription factor family. Another interesting correlation that can be made is that murine expression of the NFAT1 short isoform lacking the long C terminus is unique to the brain and heart tissues (34). Since both organs are not capable of self-regeneration and are

continuously subject to calcium influx leading to NFAT activation, these tissues are susceptible to NFAT1-induced apoptosis and, consequently, tissue damage. Although these organs may also have the long-isoform NFATs, one may assume that the overexpression of their smaller counterparts could prevent apoptosis by competing to target proapoptotic promoters.

While it remains to be shown in future studies whether the C termini of NFAT proteins differ in the control of apoptosis and the cell cycle, the study presented here shows a remarkable difference in the phenotypes induced by NFAT1 and NFAT2 proteins. The individual effects induced by NFAT proteins may rely on their capability to control the expression of both pro- and antiapoptotic, as well as cell cycle, genes. This suggests that the cellular threshold levels for each NFAT protein and the protein isoform that is being expressed determine which set of target genes will be expressed and, ultimately, the fate of the cell. In naive peripheral T lymphocytes, NFAT1 and NFAT2 long isoform are the prevalent proteins. T-cell receptor engagement leads to a massive induction of the NFAT2 short isoform, while NFAT1 levels remain constant and the NFAT2 long isoform levels are dramatically reduced (9), suggesting that the induction of the NFAT2 short isoform in T lymphocytes might ensure that these cells exert their effector function without inducing rapid apoptosis. In fact, it has been shown that overexpression of human NFAT1 or NFAT2 long isoform leads to an increase of AICD in primary CD4⁺ T cells while NFAT2 short-isoform overexpression has no impact on AICD (11). These results give support to our data, which demonstrate that the C-terminal domain of the NFAT1 protein regulates apoptosis (Fig. 6). Moreover, our data also demonstrate that NFAT1 signaling abolishes the effect of NFAT2 short isoform (Fig. 8). However, more studies need to be done in order to better understand the physiological role of the balance between NFAT1 and NFAT2 short isoform. The presence of a domain in the NFAT family members that is capable of inducing an antioncogenic phenotype agrees with the intrinsic tumor suppression mechanism, in which oncogenes can carry their own suppression machinery to avoid cancer development (23). c-Myc is a good example of this property, as it has the ability to induce both tumor formation and apoptosis and its antioncogenic function, which can be suppressed by mutation or alternative splicing, resides at its N terminus (8). NFAT family members might work in the same way and may thus act as tumor suppressors or oncogenes.

ACKNOWLEDGMENTS

We are especially grateful to A. Rao for comments on the work and the manuscript. We are also grateful to A. Rao for kindly providing the NFAT1 plasmids and NFAT1^{-/-} mice, S. Lowe for the pBabe-HrasV12 plasmid, and M. Brown for the pcDNA3-NFAT2/A plasmid.

This work was supported by grants from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) (CRP/BRA04-02 to J.P.B.V.), the Brazilian National Council for Research (CNPq) (472819/2003-8 and 400968/2005-3 to J.P.B.V.), and the NIH Fogarty International Center (FIRCA) (RO3-TW006466-01 to J.P.B.V.). B.K.R. and A.L.S.C. were supported by a CNPq fellowship and G.P.M. by a CAPES fellowship.

REFERENCES

1. Akagi, K., T. Suzuki, R. M. Stephens, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland. 2004. RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res.* 32:D523–D527.

2. Akimzhanov, A., L. Krenacs, T. Schlegel, S. Klein-Hessling, E. Bagdi, E. Stelkovic, E. Kondo, S. Chuvpilo, P. Wilke, A. Avots, S. Gattenlohrer, H. K. Muller-Hermelink, A. Palmethofer, and E. Serfling. 2008. Epigenetic changes and suppression of the nuclear factor of activated T cell 1 (NFATC1) promoter in human lymphomas with defects in immunoreceptor signaling. *Am. J. Pathol.* 172:215–224.
3. Baksh, S., H. R. Widlund, A. A. Frazer-Abel, J. Du, S. Fosmire, D. E. Fisher, J. A. DeCaprio, J. F. Modiano, and S. J. Burakoff. 2002. NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol. Cell* 10:1071–1081.
4. Bonzheim, I., E. Geissinger, S. Roth, A. Zettl, A. Marx, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink, and T. Rudiger. 2004. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood* 104:3358–3360.
5. Buchholz, M., A. Schatz, M. Wagner, P. Michl, T. Linhart, G. Adler, T. M. Gress, and V. Ellenrieder. 2006. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J.* 25:3714–3724.
6. Caetano, M. S., A. Vieira-de-Abreu, L. K. Teixeira, M. B. Werneck, M. A. Barcinski, and J. P. Viola. 2002. NFATc2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J.* 16:1940–1942.
7. Carvalho, L. D., L. K. Teixeira, N. Carrossini, A. T. Caldeira, K. M. Ansel, A. Rao, and J. P. Viola. 2007. The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. *Cell Cycle* 6:1789–1795.
8. Chang, D. W., G. F. Claassen, S. R. Hann, and M. D. Cole. 2000. The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals. *Mol. Cell. Biol.* 20:4309–4319.
9. Chuvpilo, S., A. Avots, F. Berberich-Siebelt, J. Glockner, C. Fischer, A. Kerstan, C. Escher, I. Inashkina, F. Hlubek, E. Jankevics, T. Brabletz, and E. Serfling. 1999. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J. Immunol.* 162:7294–7301.
10. Chuvpilo, S., M. Zimmer, A. Kerstan, J. Glockner, A. Avots, C. Escher, C. Fischer, I. Inashkina, E. Jankevics, F. Berberich-Siebelt, E. Schmitt, and E. Serfling. 1999. Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* 10:261–269.
11. Chuvpilo, S., E. Jankevics, D. Tyrnin, A. Akimzhanov, D. Moroz, M. K. Jha, J. Schulze-Luehrmann, B. Santner-Nanan, E. Feoktistova, T. Konig, A. Avots, E. Schmitt, F. Berberich-Siebelt, A. Schimpl, and E. Serfling. 2002. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 16:881–895.
12. Clipstone, N. A., and G. R. Crabtree. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357:695–697.
13. de la Pompa, J. L., L. A. Timmerman, H. Takimoto, H. Yoshida, A. J. Elia, E. Samper, J. Potter, A. Wakeham, L. Marengere, B. L. Langille, G. R. Crabtree, and T. W. Mak. 1998. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392:182–186.
14. Duque, J., M. Fresno, and M. A. Iniguez. 2005. Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 280:8686–8693.
15. Fu, L., Y. C. Lin-Lee, L. V. Pham, A. Tamayo, L. Yoshimura, and R. J. Ford. 2006. Constitutive NF-κB and NFAT activation leads to stimulation of the BlyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 107:4540–4548.
16. Glud, S. Z., A. B. Sorensen, M. Andrulis, B. Wang, E. Kondo, R. Jessen, L. Krenacs, E. Stelkovic, M. Wabl, E. Serfling, A. Palmethofer, and F. S. Pedersen. 2005. A tumor-suppressor function for NFATc3 in T-cell lymphomagenesis by murine leukemia virus. *Blood* 106:3546–3552.
17. Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70.
18. Heit, J. J., A. A. Apelqvist, X. Gu, M. M. Winslow, J. R. Neilson, G. R. Crabtree, and S. K. Kim. 2006. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* 443:345–349.
19. Hodge, M. R., A. M. Ranger, F. Charles de la Brousse, T. Hoey, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher. 1996. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4:397–405.
20. Iniguez, M. A., S. Martinez-Martinez, C. Punzon, J. M. Redondo, and M. Fresno. 2000. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 275:23627–23635.
21. Latinis, K. M., L. A. Norian, S. L. Eliason, and G. A. Koretzky. 1997. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J. Biol. Chem.* 272:31427–31434.
22. Liu, Y., G. L. Borchert, A. Surazynski, C. A. Hu, and J. M. Phang. 2006. Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling. *Oncogene* 25:5640–5647.
23. Lowe, S. W., E. Cepero, and G. Evan. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307–315.
24. Luo, C., E. Burgeon, and A. Rao. 1996. Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1. *J. Exp. Med.* 184:141–147.

25. **Macian, F.** 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:472–484.
26. **Marafioti, T., M. Pozzobon, M. L. Hansmann, R. Ventura, S. A. Pileri, H. Robertson, S. Gesk, P. Gaulard, T. F. Barth, M. Q. Du, L. Leoncini, P. Moller, Y. Natkunam, R. Siebert, and D. Y. Mason.** 2005. The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br J. Haematol.* **128**:333–342.
27. **Marshall, C. J.** 1991. Tumor suppressor genes. *Cell* **64**:313–326.
28. **Medyouf, H., H. Alcalde, C. Berthier, M. C. Guillemain, N. R. dos Santos, A. Janin, D. Decaudin, H. de The, and J. Ghysdael.** 2007. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* **13**:736–741.
29. **Monticelli, S., and A. Rao.** 2002. NFAT1 and NFAT2 are positive regulators of IL-4 gene transcription. *Eur. J. Immunol.* **32**:2971–2978.
30. **Neal, J. W., and N. A. Clipstone.** 2003. A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **278**:17246–17254.
31. **Okamura, H., J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J. P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiliani, X. Zhang, J. Qin, P. G. Hogan, and A. Rao.** 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell* **6**:539–550.
32. **Oum, J. H., J. Han, H. Myung, M. Hleb, S. Sharma, and J. Park.** 2002. Molecular mechanism of NFAT family proteins for differential regulation of the IL-2 and TNF-alpha promoters. *Mol. Cell* **13**:77–84.
33. **Pham, L. V., A. T. Tamayo, L. C. Yoshimura, Y. C. Lin-Lee, and R. J. Ford.** 2005. Constitutive NF- κ B and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* **106**:3940–3947.
34. **Plyte, S., M. Boncristiano, E. Fattori, F. Galvagni, S. R. Paccani, M. B. Majolini, S. Oliviero, G. Ciliberto, J. L. Telford, and C. T. Baldari.** 2001. Identification and characterization of a novel nuclear factor of activated T-cells-1 isoform expressed in mouse brain. *J. Biol. Chem.* **276**:14350–14358.
35. **Ranger, A. M., M. J. Grusby, M. R. Hodge, E. M. Gravallesse, F. C. de la Brousse, T. Hoey, C. Mickanin, H. S. Baldwin, and L. H. Glimcher.** 1998. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* **392**:186–190.
36. **Ranger, A. M., M. Oukka, J. Rengarajan, and L. H. Glimcher.** 1998. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* **9**:627–635.
37. **Ranger, A. M., L. C. Gerstenfeld, J. Wang, T. Kon, H. Bae, E. M. Gravallesse, M. J. Glimcher, and L. H. Glimcher.** 2000. The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J. Exp. Med.* **191**:9–22.
38. **Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan.** 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:707–747.
39. **Schuh, K., B. Kneitz, J. Heyer, U. Bommhardt, E. Jankevics, F. Berberich-Siebelt, K. Pfeffer, H. K. Muller-Hermelink, A. Schimpl, and E. Serfling.** 1998. Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **28**:2456–2466.
40. **Schwering, I., A. Brauninger, U. Klein, B. Jungnickel, M. Tinguely, V. Diehl, M. L. Hansmann, R. Dalla-Favera, K. Rajewsky, and R. Kuppers.** 2003. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **101**:1505–1512.
41. **Shibasaki, F., E. R. Price, D. Milan, and F. McKeon.** 1996. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* **382**:370–373.
42. **Viola, J. P., L. D. Carvalho, B. P. Fonseca, and L. K. Teixeira.** 2005. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**:335–344.
43. **Wang, Q., Y. Ji, X. Wang, and B. M. Evers.** 2000. Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**:466–471.
44. **Xanthoudakis, S., J. P. Viola, K. T. Shaw, C. Luo, J. D. Wallace, P. T. Bozza, D. C. Luk, T. Curran, and A. Rao.** 1996. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* **272**:892–895.
45. **Yoshida, H., H. Nishina, H. Takimoto, L. E. Marengere, A. C. Wakeham, D. Bouchard, Y. Y. Kong, T. Ohteki, A. Shahinian, M. Bachmann, P. S. Ohashi, J. M. Penninger, G. R. Crabtree, and T. W. Mak.** 1998. The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* **8**:115–124.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)