



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**DOUGLAS VENDAS FAGET**

**Papel do domínio de transativação C-terminal na apoptose induzida  
por NFAT1 e o potencial uso do CA-NFAT1 na terapia gênica contra o  
câncer**

**Orientador: Dr. João P. B. Viola**

**RIO DE JANEIRO  
2015**



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**DOUGLAS VENDAS FAGET**

Papel do domínio de transativação C-terminal na apoptose induzida por NFAT1 e o potencial uso do CA-NFAT1 na terapia gênica contra o câncer

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Oncologia

**Orientador:** Dr. João P. B. Viola

**RIO DE JANEIRO**  
**2015**

F658i Faget, Douglas Vendas.

Papel do domínio de transativação C-terminal na apoptose induzida por NFAT1 e o potencial uso do CA-NFAT1 na terapia gênica contra o câncer / Douglas Vendas Faget. – Rio de Janeiro, 2015.

133f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015).

Orientador: João P. B. Viola.

1. Fatores de Transcrição NFATC. 2. Apoptose. 3. Neoplasias. 4. Terapia Genética. I. Viola, João P. B. (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 572.8845

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Biologia Celular da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA), sob orientação do Dr. João P. B. Viola e com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para o controle do câncer (INCT-Câncer).

# FOLHA DE APROVAÇÃO

AUTOR: DOUGLAS VENDAS FAGET

**Papel do domínio de transativação C-terminal na apoptose induzida por NFAT1  
e o potencial uso do CA-NFAT1 na terapia gênica contra o câncer**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## EXAMINADORES:

---

Dr. Carlos Gil Ferreira

---

Dra. Helena Lobo Borges

---

Dr. José Garcia Ribeiro Abreu Junior

---

Dr. Ulisses Gazos Lopes

---

Dra. Claudete Klumb – Suplente I

---

Dr. Rodrigo Alves Portela Martins – Suplente II

**RIO DE JANEIRO  
2015**

## **AGRADECIMENTOS**

- À minha namorada, Cristiane, por todo amor, apoio e paciência. Te amo!!!
- À minha família, pelo apoio durante a vida.
- Ao meu orientador, João, pela oportunidade, paciência e compreensão.
- Ao Bruno e Pedro, envolvidos diretamente no trabalho, obrigado pela ajuda.
- Ao Leonardo, obrigado pela ajuda com o protocolo de produção de adenovírus e pelas linhagens celulares cedidas.
- Aos amigos do laboratório, pelos momentos de descontração e pelas discussões construtivas durante as reuniões.
- Aos demais amigos, pelos momentos de diversão fora do laboratório.
- À Alexandra, por ser a melhor secretária e estar sempre disposta a atender nossos pedidos.
- Ao apoio técnico, pelo suporte no dia a dia do laboratório.
- A todos os demais funcionários do INCA que de alguma forma contribuíram para a construção dessa tese.
- Ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para o controle do câncer (INCT-Câncer).

## RESUMO

Papel do domínio de transativação C-terminal na apoptose induzida por NFAT1 e o potencial uso do CA-NFAT1 na terapia gênica contra o câncer

A família do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) é composta por quatro membros regulados por influxo de cálcio. Embora, os fatores de transcrição NFAT apresentem algumas sobreposições de função na regulação gênica, vários estudos têm mostrado papéis distintos para as proteínas NFAT na regulação da morte celular. O domínio de transativação C-terminal (TAD-C) é a região que apresenta a menor similaridade de sequência entre as proteínas NFAT. O TAD-C é essencial para interação entre o NFAT1 e diferentes proteínas, no entanto, sua contribuição para indução de morte celular pelo fator NFAT1 é pouco conhecida. Recentemente, foi demonstrado também que o NFAT1 pode cooperar com a via oncogênica de Ras-Raf-MEK-ERK para induzir apoptose. Portanto, temos como objetivos avaliar quais regiões do TAD-C do NFAT1 são necessárias para indução de apoptose e se a forma constitutivamente ativa do NFAT1 (CA-NFAT1) pode ser utilizada como terapia gênica para indução de morte celular em tumores. Aqui, nós descrevemos pelo menos duas regiões do TAD-C do NFAT1, que conferem atividade proapoptótica ao NFAT1. Além disso, mostramos que quando fundido ao TAD-C do NFAT1, o fator NFAT2, que está associado à transformação celular, induz a apoptose em fibroblastos. Em seguida, observamos que os fibroblastos transformados com H-RasV12 sofreram apoptose de forma intensa mediante tratamento com adenovírus carreando o gene CA-NFAT1 (AdCANFAT1). No entanto, não foi possível observar morte celular na maioria das células tumorais testadas mediante transdução com AdCANFAT1. Apenas as culturas das linhagens tumorais de cólon testadas sofreram apoptose moderada quando tratadas com AdCANFAT1. Além disso, observamos que o tratamento com AdCANFAT1 levou a um massivo aumento da expressão de TNF em todas as linhagens avaliadas. Portanto, estes resultados sugerem que as linhagens de cólon testadas são susceptíveis a apoptose induzida por NFAT1, entretanto, mais estudos são necessários para compreender os aspectos moleculares que tornam, somente, essas linhagens celulares susceptíveis a morte celular induzida por CA-NFAT1.

**Palavras-chave:** NFAT; apoptose; câncer; terapia gênica

## **ABSTRACT**

### **Role of C-terminal transactivation domain in NFAT1-driven apoptosis and the putative use of CA-NFAT1 as gene therapy against cancer**

The family of nuclear factor of activated T cells (NFAT) consists of four calcium-regulated members. Although, the NFAT transcription factors display some overlapping functions on gene regulation, several studies has shown different roles for NFAT proteins on cell death regulation. The C-terminal transactivation domain (TAD-C) is the NFAT protein region that shows the lowest similarity among all NFAT factors. The TAD-C is essential to promote interaction between NFAT1 and other proteins, however, its contribution to cell death induction by NFAT1 is poorly understood. Recently, it has been described that NFAT1 may cooperate with the oncogenic Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway to induce apoptosis. Thus, we aim to assess which region inside NFAT1 TAD-C is required to induce apoptosis and evaluate whether the constitutively active form of NFAT1 (CA-NFAT1) can be applied as gene therapy to induce cell death in tumors. Here, we described at least two regions of NFAT1 TAD-C that confer pro-apoptotic activity to NFAT1. Furthermore, we showed that when fused to NFAT1 TAD-C, NFAT2, which is associated with cell transformation, induces apoptosis in fibroblasts. Next, we observed that H-RasV12 transformed fibroblasts suffer intense apoptosis when treated with CA-NFAT1 carrying adenovirus (AdCANFAT1). Nevertheless, we did not observe cell death on the majority of tumor cell lines analyzed upon AdCANFAT1 treatment. Only two colon tumor cell lines suffered moderate apoptosis upon AdCANFAT1 transduction. Further, we observed that AdCANFAT1 treatment induced a massive increase in TNF gene expression in all analyzed cell lines. Therefore, these results suggest that colon cancer cells are susceptible to NFAT1-induced apoptosis, nevertheless, further studies are required to better understand the molecular features that are involved in turning, only, these cell lines susceptible to CA-NFAT1-induced cell death.

**Keywords:** NFAT; apoptosis; cancer; gene therapy



## LISTA DE ABREVIATURAS

AICD –	Morte celular induzida por ativação (Activation-induced cell death)
AIF –	Fator de indução da apoptose (Apoptosis inducing factor)
AP1 –	Proteína ativadora -1 (Activator protein -1)
Apaf –	Fator ativador de proteases apoptóticas (Apoptotic protease activating factor)
Bad –	Promotor de morte associado a Bcl-2 (Bcl-2-associated death promoter)
Bak –	Antagonista/assassino homólogo a Bcl-2 (Bcl-2 homologous antagonist/killer)
Bax –	Proteína X associada a Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein)
Bcl –	Proteína associada ao linfoma de células B (B cell lymphoma protein)
BH –	Domínio de homologia a Bcl-2 (Bcl-2 homology domain)
Bid –	Agonista da morte com domínio de interação BH3 (BH3 interacting domain death agonist)
Bik –	Assassino que interage com Bcl-2 (Bcl-2 interacting killer)
Bim –	Mediador da morte celular que interage com Bcl-2 (Bcl-2 interacting mediator of cell death)
CAD –	DNase ativada por caspase (Caspase activated DNase)
CA-NFAT –	Forma constitutivamente ativa do NFAT
cDNA –	DNA complementar
c-FLIP –	Proteína inibidora FLICE – celular (cellular – FLICE-inhibitory protein)
CK1 –	Quinase de caseína -1 (Casein kinase -1)
CMV –	Citomegalovírus
COX2 –	Ciclooxigenase -2
CRAC –	Canal de cálcio responsivo à liberação de cálcio (Calcium-release activated calcium channel)
DAG –	Diacilglicerol

DAPI –	4',6-diamidino-2-fenilindol
dATP –	Trifosfato de deoxiadenosina
DBD –	Domínio de Ligação ao DNA (DNA binding domain)
DD –	Domínio de morte (Death domain)
DED –	Domínio efetor de morte (Death effector domain)
DLBCL –	Linfoma de células B grandes e difusas (Diffuse large B cell lymphoma)
DMEM –	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco modified Eagle médium)
DNA –	Ácido desoxirribonucléico
DYRK2 –	Quinase regulada por fosforilação de tirosina de dupla especificidade -2 (Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase -2)
EDTA –	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFP –	Proteína verde fluorescente melhorada (Enhanced Green fluorescent protein)
EndoG –	Endonuclease G
FADD –	Proteína associada a Fas com domínio de morte (Fas-associated protein with death domain)
FcεRI –	Receptor Fc épsilon -I (Fc-epsilon receptor -I)
GSK3 –	Quinase de sintase de glicogênio -3 (Glycogen synthase kinase -3)
HEPES –	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
H-rasV12 –	Proteína H-ras com uma mutação para valina na posição 12
IAP –	Proteína inibidora da apoptose (Inhibitor of apoptosis protein)
iCAD –	Inibidor de CAD (inhibitor of CAD)
IFN-γ –	Interferon -γ
IL –	Interleucina
IP –	Iodeto de propídio
IP3 –	Inositol trifosfato

IRES –	Sítio interno de entrada de ribossomo (Internal ribosomal entry site)
MAPK –	Proteína quinase ativada por mitógeno (Mitogen-activated protein kinase)
Mcl –	Proteína de diferenciação de células leucêmicas mielóides induzida (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein)
MEF2 –	Fator realçador de miócito -2 (Myocyte enhancing factor -2)
MEM –	Meio essencial mínimo
mRNA –	Ácido ribonucléico mensageiro
NES –	Sequência de exportação nuclear (Nuclear export sequence)
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)
NP-40 –	Nonidet P-40
Nur 77–	Receptor nuclear -77 (Nuclear receptor -77)
OREBP –	Proteína ligante do elemento da resposta osmótica (Osmotic response element binding protein)
PAK2 –	Quinase ativada por p21 -2 (p21-activated kinase -2)
PBS –	Salina tamponada com fosfato
PCR –	Reação em cadeia da polimerase
PGE2 –	Prostaglandina –E2
PKC –	Proteína cinase C
PLC- $\gamma$ –	Fosfolipase C - $\gamma$
Puma –	Modulador da apoptose regulado por p53 (p53-upregulated modulator of apoptosis)
RLU –	Unidades relativas de luz
SDS –	Dodecil sulfato de sódio (Sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE –	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
SFB –	Soro fetal bovino
Smac/DIABLO –	Segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria/ Proteína com baixo pI ligante direta de IAP (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP binding protein with low PI)
STIM –	Molécula de interação estromal (Stromal interaction molecule)
SV40 –	Vírus símio -40 (Simian virus -40)
TACE –	Enzima conversora do TNF- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ converting enzyme)
TAD –	Domínio de ativação da transcrição (Transcriptional activation domain)
TAD-C –	TAD C-terminal
TAD-N –	TAD N-terminal
tBid –	Bid truncada
TBS –	Solução tampão Tris
TBS-T –	Solução tampão Tris com Tween
TCR –	Receptor de células T (T cell receptor)
TNF –	Fator de necrose tumoral (Tumor necrose factor)
TNFR –	Receptor de TNF (TNF receptor)
TonEBP –	Proteína ligadora do realçador responsivo a tonicidade (Tonicity-responsive enhancer binding protein)
TRAIL –	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TNF-related apoptosis inducing ligand)
TRAILR –	Receptor de TRAIL (TRAIL receptor)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.1</b>	Representação esquemática das proteínas da família NFAT de fatores de transcrição.....	<b>2</b>
<b>Figura 1.2</b>	Via de sinalização dos fatores de transcrição NFAT.....	<b>5</b>
<b>Figura 1.3</b>	Representação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose..	<b>10</b>
<b>Figura 1.4</b>	Rede de sinalização intracelular regulando diferentes circuitos celulares.....	<b>23</b>
<b>Figura 4.1</b>	A forma constitutivamente ativa do NFAT1 é expressa em altos níveis, está localizada especificamente no núcleo e é capaz de transativar um promotor responsivo a NFAT.....	<b>54</b>
<b>Figura 4.2</b>	Células NIH3T3 expressando CA-NFAT1 sofrem apoptose.....	<b>56</b>
<b>Figura 4.3</b>	Todas as proteínas CA-NFAT1 truncadas apresentam níveis de expressão similares e o peso molecular esperado.....	<b>57</b>
<b>Figura 4.4</b>	A remoção dos aminoácidos 699 a 850 do TAD-C do NFAT1 previne completamente a indução de apoptose pelo CA-NFAT1.....	<b>59</b>
<b>Figura 4.5</b>	Os resíduos de aminoácidos 699 a 735 são suficientes para conferir ao CA-NFAT1 a capacidade de induzir apoptose.....	<b>60</b>
<b>Figura 4.6</b>	O NFAT1 selvagem não é capaz de induzir apoptose em células NIH3T3 mediante estímulo.....	<b>62</b>
<b>Figura 4.7</b>	A quimera CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 é expressa em altos níveis em células NIH3T3 transduzidas com o respectivo vetor.....	<b>63</b>
<b>Figura 4.8</b>	A fusão do NFAT1 TAD-C ao CA-NFAT2 reverte o fenótipo induzido pelo CA-NFAT2.....	<b>65</b>

<b>Figura 4.9</b>	CA-NFAT1 é expresso em altos níveis em células transduzidas com o vetor adenoviral AdCANFAT1.....	<b>67</b>
<b>Figura 4.10</b>	O tratamento com AdCANFAT1 induz apoptose em fibroblastos NIH3T3 H-RasV12.....	<b>68</b>
<b>Figura 4.11</b>	As células B16F10 não são sensíveis ao tratamento com AdCANFAT1.....	<b>70</b>
<b>Figura 4.12</b>	As linhagens de tumor de mama 4T1 e MDA-MB-231 não são susceptíveis ao tratamento com AdCANFAT1.....	<b>72</b>
<b>Figura 4.13</b>	As linhagens de tumor de cólon HCT116 e LoVo sofrem apoptose moderada mediante tratamento com AdCANFAT1...	<b>74</b>
<b>Figura 4.14</b>	A linhagem não transformada HME-1 não sofre apoptose mediante a superexpressão de CA-NFAT1.....	<b>76</b>
<b>Figura 4.15</b>	O tratamento com AdCANFAT1 induz a diminuição de Bcl2 em fibroblastos transformados e o aumento majoritário de Tnf em células de melanoma e em fibroblastos transformados.....	<b>79</b>
<b>Figura 4.16</b>	O tratamento com AdCANFAT1 induz, massivamente, o aumento de TNF em células não transformadas de mama e tumorais de cólon.....	<b>81</b>
<b>Tabela 1.1</b>	Genes envolvidos no controle da apoptose regulados transcricionalmente pelo NFAT.....	<b>15</b>
<b>Tabela 3.1</b>	Lista dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR em tempo real.	<b>52</b>

# ÍNDICE

<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1- Família de fatores de transcrição NFAT.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1- NFAT1.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2- Apoptose.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1- Via intrínseca da apoptose.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2- Via extrínseca da apoptose.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3- NFAT e apoptose.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3- Câncer.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.1- Via de Ras-Raf-MEK-ERK.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.2- NFAT e câncer .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4- Terapia Gênica.....</b>	<b>32</b>
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1- Objetivo Principal.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2- Objetivos Específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1- Cultura de Células.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2- Construção dos plasmídeos.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3- Produção de retrovírus recombinantes e infecção de células-alvo..</b>	<b>43</b>
<b>3.4- Produção de adenovírus recombinantes, infecção de células-alvo.</b>	<b>44</b>
<b>3.5- Transfecção por cloreto de cálcio.....</b>	<b>46</b>
<b>3.6- Ensaio de proliferação celular.....</b>	<b>47</b>
<b>3.7- Análise de ciclo celular e conteúdo de DNA Sub-G0.....</b>	<b>47</b>

3.8- Análise da formação de núcleos picnóticos.....	48
3.9- Análise de exposição de fosfatidilserina.....	48
3.10- Análise por <i>Western Blot</i> .....	48
3.11- Imunolocalização do NFAT.....	49
3.12- Ensaios de Transativação.....	50
3.13- RT-PCR e PCR em tempo real.....	51
4- RESULTADOS.....	53
4.1- Expressão de CA-NFAT1 Induz Apoptose em Fibroblastos NIH3T3.....	53
4.2- A Retirada dos Resíduos de Aminoácidos 699 a 850 do TAD-C do NFAT1 Abole a Apoptose Induzida pelo CA-NFAT1.....	56
4.3- A Fusão do NFAT1 TAD-C ao CA-NFAT2 lhe Confere a Capacidade de Induzir Apoptose.....	62
4.4- O Vetor Adenoviral Carreando o Gene CA-NFAT1 Induz Apoptose em Células NIH3T3 H-RasV12.....	65
4.5- O AdCANFAT1 Induz Apoptose Moderada em Linhagens Tumorais de Cólon.....	68
4.6- O AdCANFAT1 não Induz Apoptose na Linhagem não Transformada HME1.....	75
4.7- O AdCANFAT1 Induz de Forma Massiva o Aumento da Expressão de TNF em Diferentes Linhagens Celulares.....	76
5- DISCUSSÃO.....	82
6- CONCLUSÕES.....	94



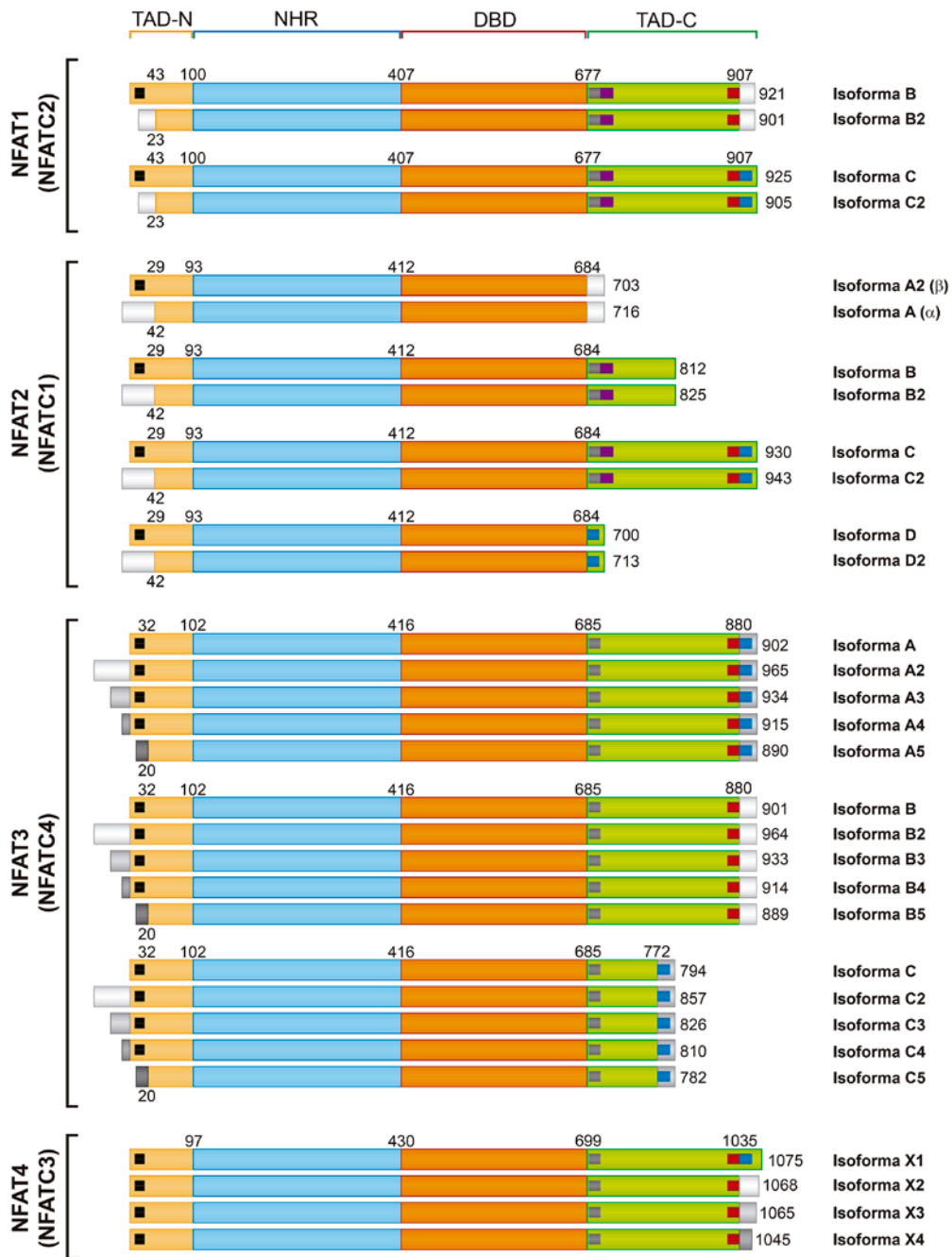
<b>7- REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>107</b>
<b>8.1- Faget, D.V; Lucena, P.I.; Robbs, B.K.; Viola, J.P.B. NFAT1 C-Terminal Domains are Necessary but not Sufficient for Inducing Cell Death.....</b>	<b>108</b>
<b>8.2- Amarante-Mendes, G.P.; Jacysyn, J.F.; Faget, D.V.; Pereira, W.O.; Weinlich, R.; Viola, J.P.B. Capítulo 9: Eventos Significativos na Vida das Células: Ciclo Celular, Proliferação e Quantificação de Morte.</b>	<b>121</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Família de fatores de transcrição NFAT

As proteínas pertencentes à família NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) de fatores de transcrição desempenham um papel central na transcrição gênica durante a resposta imune. Entretanto, após a caracterização molecular e isolamento de cada uma das proteínas da família NFAT ficou claro que a sua expressão não é restrita às células T, pelo menos um membro da família NFAT é expresso em quase todos os tipos celulares examinados (Macian, 2005; Vihma *et al.*, 2008). Atualmente, cinco proteínas já foram descritas e caracterizadas como membros da família NFAT: NFAT1 (NFATp; NFATc2); NFAT2 (NFATc; NFATc1); NFAT3 (NFATc4); NFAT4 (NFATx; NFATc3) e NFAT5 (TonEBP; OREBP) (Rao *et al.*, 1997; Macian, 2005). Destes cinco membros, os quatro primeiros são regulados por influxo de cálcio e o último por estresse hiperosmótico (Macian, 2005). Todas as proteínas NFAT são capazes de transativar o promotor de IL-2 e apresentam um domínio de ligação ao DNA (DBD) altamente conservado (Masuda *et al.*, 1998). Este DBD confere a mesma especificidade de ligação ao DNA a todos os membros da família NFAT. Os membros NFAT1-4 compartilham uma região N-terminal conservada denominada de região de homologia do NFAT que confere a regulação por influxo de cálcio. O único membro da família NFAT não regulado por cálcio, o NFAT5, possui características peculiares que o difere dos demais membros. Além das quatro proteínas originalmente descritas, os membros NFAT1-4 possuem diversas variantes provenientes de *splicing*, inícios alternativos de transcrição e/ou sinais alternativos de poliadenilação, culminando em 36 diferentes variantes humanas para estes genes (Vihma *et al.*, 2008). Na Figura 1.1 estão representadas esquematicamente

as estruturas primárias, os principais domínios das proteínas NFAT1-4 e algumas de suas isoformas.



**Figura 1.1. Representação esquemática das proteínas da família NFAT de fatores de transcrição.** As proteínas desta família apresentam um domínio de ligação ao DNA (DBD), altamente conservado entre si. A região de homologia do NFAT (NHR), responsável pela regulação do NFAT via influxo de cálcio, é conservada entre os membros NFAT1-4. Os dois domínios de transativação (TAD), N- e C- terminais, estão representados na figura. Entre as isoformas, cores idênticas representam seqüências idênticas. Além desses domínios, estão representados alguns motivos conservados (quadrados coloridos presentes nos TADs) entre diferentes membros da família.

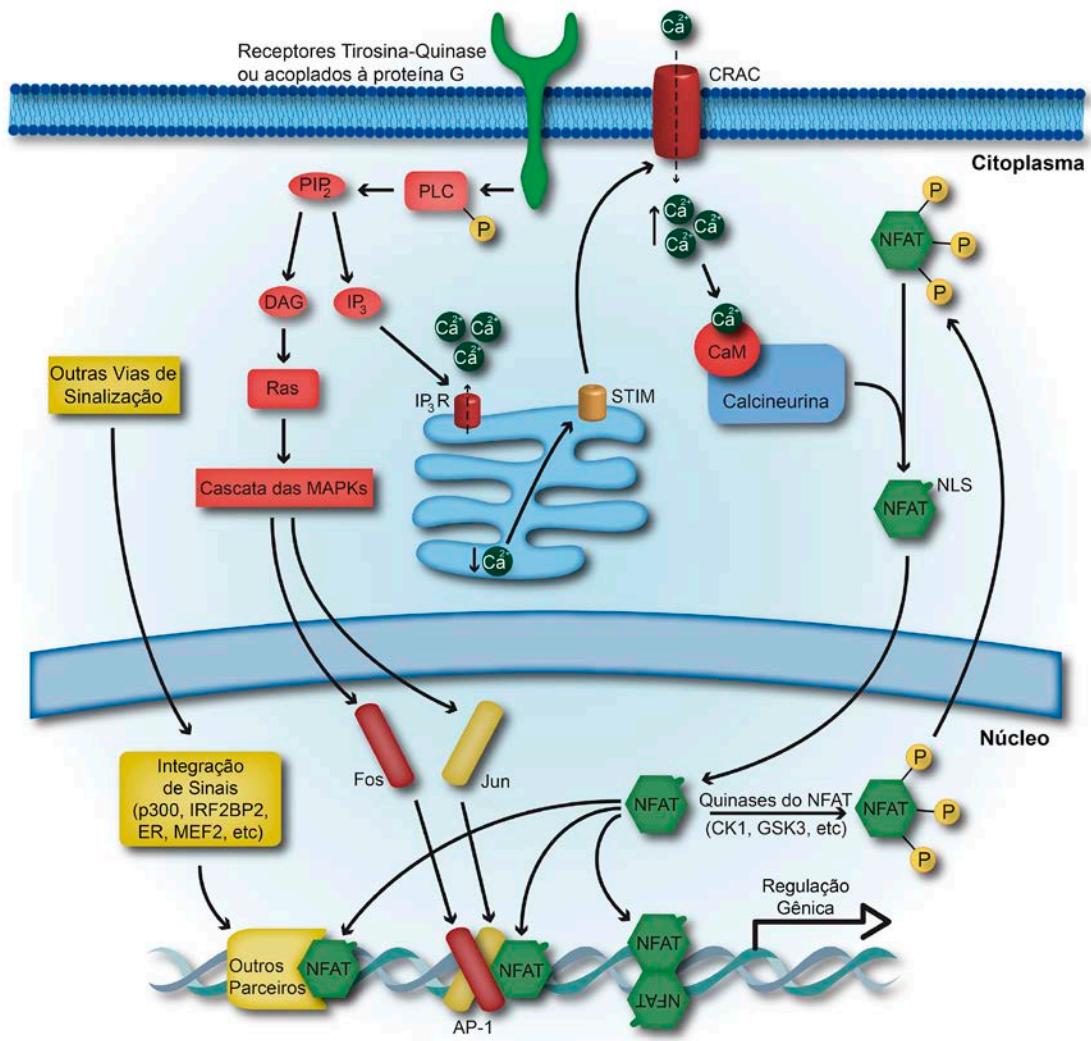
O domínio de ligação ao DNA, a principal região de homologia entre as proteínas NFAT, confere a todos os membros a capacidade de se ligar a sequência de DNA consenso 5' A/TGGAAA 3' e está situado entre os resíduos de aminoácidos  $\approx$ 410 e  $\approx$ 680 de cada membro da família NFAT (Figura 1.1). Este DBD possui uma similaridade moderada na sequência primária, porém, demonstra uma forte similaridade estrutural com o DBD da família Rel de fatores de transcrição. As proteínas NFAT possuem, entre si, 60-70% de identidade de sequência do DBD, no entanto, em comparação com membros da família Rel há somente 15-17% de identidade (Macian *et al.*, 2001). Este DBD contém a alça de reconhecimento altamente conservada (RFRYXCEG) das proteínas da família Rel, representada na família NFAT pela sequência igualmente conservada RAHYETEG, onde cada um dos resíduos sublinhados entra em contato com o DNA (Jain *et al.*, 1995).

Já a região de homologia do NFAT (NHR) de aproximadamente 300 aminoácidos, que está localizada adjacente ao DBD na parte N-terminal, possui uma menor similaridade entre os membros da família NFAT. Apesar da baixa similaridade, esta região apresenta grande conservação de vários motivos característicos das proteínas NFAT e é responsável por controlar a localização subcelular do NFAT. Mediante a um aumento sustentado do cálcio intracelular, o NFAT sofre uma mudança conformacional expondo o seu sinal de localização nuclear (NLS) e transloca do citoplasma para o núcleo (Okamura *et al.*, 2000). A região de homologia do NFAT é altamente fosforilada em vários resíduos de serina conservados, os quais são desfosforilados em resposta ao aumento de cálcio intracelular (Macian, 2005).

Em células em repouso, o NFAT está fosforilado, reside no citoplasma e apresenta baixa afinidade pelo DNA. Em condições fisiológicas, a sinalização via receptores de superfície acoplados à ativação de fosfolipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), tais como

imunorreceptores e receptores associados à proteína G, leva a geração de inositol-(1,4,5)trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Enquanto DAG leva a ativação da via de Ras-MAPK/PKC, IP3 medeia a liberação de cálcio dos estoques intracelulares via receptor de IP3 (IP3R). Mediante a depleção dos estoques de cálcio, a proteína STIM1 forma oligômeros que se movem para junção do retículo endoplasmático com a membrana plasmática, onde interage com o canal de cálcio ORAI1 (Shou *et al.*, 2015). Essa interação leva a uma mudança conformacional em ORAI1 resultando em um aumento sustentado nos níveis intracelulares de cálcio, que por sua vez, leva a ativação da fosfatase de serina-treonina calcineurina, o principal regulador do NFAT. A calcineurina ativada desfosforila o NFAT, promovendo a exposição do seu NLS e consequente translocação nuclear. No núcleo, o NFAT coopera com proteínas parceiras, genericamente denominadas NFATn, formando heterodímeros ou homodímeros, e regula a expressão de diversos genes (Figura 1.2) (Macian, 2005; Falvo *et al.*, 2008). A ativação de proteínas parceiras pode ocorrer através da ativação de outras vias, paralelamente à ativação da via de NFAT. Por exemplo, a principal proteína parceira do NFAT já descrita, a proteína ativadora 1 (AP1), é ativada pelas vias de Ras-MAPK/PKC (Macian *et al.*, 2001). Passado o estímulo de cálcio, o NFAT é refosforilado por diferentes proteínas quinases, como quinase de caseína 1 (CK1), DYRK2 e quinase de sintase de glicogênio 3 (GSK3) (Beals *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Gwack *et al.*, 2006). A refosforilação do NFAT promove uma mudança conformacional onde o NLS é escondido e a sequência de exportação nuclear (NES) é exposta (Okamura *et al.*, 2000). Além dessas proteínas quinases, dois potentes inibidores da calcineurina são capazes de interferir na ativação do NFAT, ciclosporina (CsA) e FK506. Devido à grande importância do NFAT na resposta imune, ambos os inibidores são potentes imunossuppressores utilizados amplamente para evitar a rejeição de tecidos transplantados. Além desses

inibidores, um pequeno peptídeo, VIVIT, é capaz de inibir especificamente a desfosforilação do NFAT mediada pela calcineurina competindo pelo mesmo sítio de ligação. A calcineurina se liga ao NFAT em uma sequência consenso (PXIXIT) presente na NHR, e o peptídeo VIVIT é uma versão de alta afinidade desta sequência capaz de se ligar mais avidamente à calcineurina (Aramburu *et al.*, 1998).



**Figura 1.2. Via de sinalização dos fatores de transcrição NFAT.** Representação esquemática da ativação e translocação do NFAT para o núcleo. PLC – Fosfolipase C; PIP2 – Fosfatidilinositol-(4,5) bifosfato; DAG – Diacilglicerol; IP3 – Inositol-(1,4,5) trifosfato; STIM – Molécula de interação estromal; CRAC – Canal de cálcio responsivo à liberação de cálcio; CaM – Calmodulina; AP1 – Proteína ativadora 1; NLS – Sinal de localização nuclear; P – Grupo Fosfato.

Além do domínio de ligação ao DNA e da região regulatória, as proteínas NFAT possuem dois importantes domínios de ativação da transcrição (TAD – *transcriptional activation domain*) localizados nas regiões N- e C-terminais (Luo *et*

*al.*, 1996b). Estes domínios possuem relativamente pouca conservação de sequência e são, possivelmente, as principais regiões responsáveis pelas diferenças na regulação gênica entre as diferentes isoformas e membros da família NFAT. O TAD N-terminal (TAD-N) se estende até os primeiros  $\approx 100$  aminoácidos das proteínas NFAT. Enquanto, o TAD C-terminal (TAD-C), localizado logo após o DBD, pode variar de  $\approx 10$  a  $\approx 470$  resíduos de aminoácidos dependendo da isoforma (Figura 1.1). Apesar da fraca conservação de sequência, dentro destas regiões existem pequenos motivos conservados. No TAD-N do NFAT1, existe um motivo N-terminal composto por vários resíduos ácidos/hidrofóbicos, <sup>25</sup>QDELD<sub>5</sub>SILFDY<sub>37</sub>, que se assemelham a motivos ácidos de ativação da transcrição (Cress e Triezenberg, 1991; Schmitz *et al.*, 1994). Motivos similares estão presentes no NFAT2/ $\beta$ , NFAT2/B, NFAT2/C, NFAT3 e NFAT4 (Figura 1.1). Já no TAD-C das proteínas NFAT, há outro caso de conservação de sequência, onde o NFAT1/C apresenta o motivo C-terminal, <sup>900</sup>LDQTYLDDVNEIIRKEFS<sup>917</sup>, altamente similar aos existentes no NFAT2/C, NFAT3 e NFAT4/x (Figura 1.1). Interessantemente, o NFAT1/C é mais ativo em ensaios de transativação do que a isoforma NFAT1/B, que não possui parte deste motivo C-terminal (Figura 1.1) (Luo *et al.*, 1996a). Corroborando este dado, o mesmo ocorre para o NFAT4/x que possui um motivo C-terminal bem semelhante ao presente no NFAT1/C. Em ensaios de transativação, o NFAT4/x induz a uma transativação maior do que a isoforma NFAT4/C que não possui parte do motivo C-terminal (Figura 1.1) (Imamura *et al.*, 1998).

A regulação gênica mediada por NFAT, normalmente, ocorre através da sua ligação a regiões promotoras ou a *enhancers* dos genes-alvo. Uma notável característica da maioria dos promotores e *enhancers* dependentes de NFAT é a existência de múltiplos sítios de ligação do NFAT. Isto foi primeiramente observado no *enhancer* de IL-2 (Randak *et al.*, 1990) e no promotor de IL-4 (Chuvpilo *et al.*,

1993), mas o mesmo também ocorre para outros genes regulados por NFAT (Rao *et al.*, 1997). Geralmente, cada uma dessas regiões regulatórias contém de três a cinco sítios para ligação do NFAT, dentro de uma região de 200 a 300 pares de base. A existência de múltiplos sítios, possivelmente, implica em interações sinérgicas entre complexos transativadores contendo NFAT para que ocorra uma ativação da transcrição efetiva. Além disso, os TADs nas regiões N- e C-terminais das proteínas NFAT auxiliam no recrutamento de coativadores, correpressores ou outros fatores de transcrição que podem compor complexos reguladores, promovendo uma ativação ou repressão da transcrição mais efetiva (Masuda *et al.*, 1998).

### 1.1.1 NFAT1

O NFAT foi primeiramente descrito como um fator indutível essencial para a expressão de IL-2 em células T ativadas (Shaw *et al.*, 1988; Ullman *et al.*, 1990). O primeiro membro da família NFAT, o NFAT1, foi inicialmente purificado de extratos citoplasmáticos do clone Ar-5 de células T murinas, através de cromatografia de afinidade utilizando o sítio distal do NFAT presente no promotor da IL-2 murina, e clonado a partir de bibliotecas de cDNA do mesmo clone (McCaffrey *et al.*, 1993). O NFAT1 é principalmente expresso em células T e em diversas células do sistema imune (Rao *et al.*, 1997), mas também já foi detectada presença da proteína em células de músculo esquelético (Abbott *et al.*, 1998), células cartilaginosas (Ranger *et al.*, 2000), neurônios (Ho *et al.*, 1994), adipócitos (Ho *et al.*, 1998) e endotélio (Cockerill *et al.*, 1995). Três variantes de *splicing*, NFAT1/A, NFAT1/B e NFAT1/C foram inicialmente descritas em camundongos e duas variantes, NFAT1/B e NFAT1/C, foram detectadas em humanos (Figura 1.1) (Luo *et al.*, 1996a). As variantes diferem na região do TAD-C, divergindo no resíduo de aminoácido 909 em camundongos e no resíduo 907 em humanos (Luo *et al.*, 1996a). NFAT1/B e



NFAT1/C são as isoformas predominantemente expressas em células T murinas e humanas (Wang *et al.*, 1995). Além dessas, outras isoformas do NFAT1 que variam na região do TAD-N já foram descritas (Vihma *et al.*, 2008). Apesar do grande número de variantes do NFAT1, há poucos estudos comparativos sobre possíveis papéis divergentes entre estas variantes.

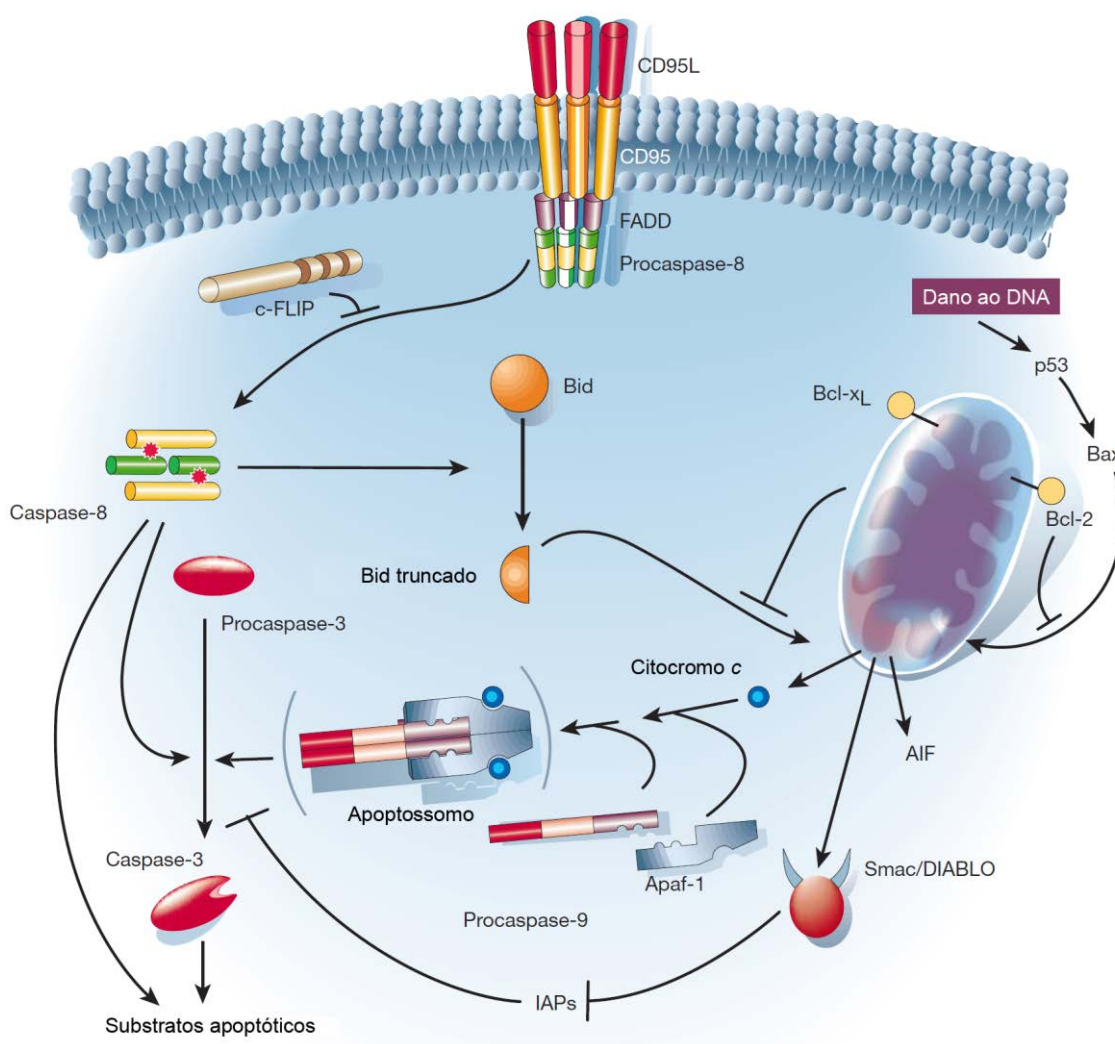
## 1.2 Apoptose

Metazoários frequentemente precisam livrar-se de células para manter a fisiologia regular dos tecidos. Para tal, tão importante como o ciclo e a diferenciação celular, a morte celular programada permite ao organismo controlar, rigorosamente, o número de células e o tamanho dos tecidos, e proteger a si mesmo de células que possam vir a ameaçar a homeostase do organismo. A apoptose é um dos principais mecanismos de proteção contra o surgimento de câncer. Este é o primeiro tipo de morte celular programada a ser descrito, sendo caracterizado por mudanças morfológicas acompanhadas de redução do volume celular, retração de pseudópodos, condensação de cromatina, fragmentação nuclear, *blebbing* da membrana plasmática e engolfamento dos restos celulares por células fagocitárias *in vivo* (Kerr *et al.*, 1972; Kroemer *et al.*, 2009). A maioria dessas mudanças morfológicas é causada por um determinado grupo de cisteíno-proteases que são ativadas especificamente em células apoptóticas. Essas proteases, denominadas de caspases, são sintetizadas como zimogênios e convertidas a proteases ativas mediante sinais indutores de apoptose (Assuncao Guimaraes e Linden, 2004). As caspases podem ser divididas em dois grupos: as caspases iniciadoras (caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 e -14) que são ativadas por autoproteólise induzida por oligomerização e as caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7) que são ativadas por outras proteases, como as caspases iniciadoras e granzima B (Assuncao Guimaraes

e Linden, 2004). Entretanto, as caspases não são as únicas proteínas efetoras da apoptose, mediante a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, outras proteínas como, o fator de indução da apoptose (AIF) e a endonuclease G (EndoG), são liberadas e induzem a apoptose (Figura 1.3) (Lorenzo *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001).

A apoptose pode ser induzida por diferentes estímulos como, por exemplo, privação de fatores de crescimento, sinais extrínsecos ou algum tipo de dano/estresse celular. Duas vias de sinalização são as principais responsáveis pela ativação da apoptose: a via intrínseca e a via extrínseca da apoptose (Amarante-Mendes e Green, 1999; Zimmermann *et al.*, 2001; Galluzzi *et al.*, 2012). Na via intrínseca, a mitocôndria desempenha um papel central, liberando fatores apoptogênicos, tais como o citocromo c, do espaço intermembrana para o citoplasma, que por sua vez é capaz de formar um complexo heptamérico com Apaf-1, caspase-9 e dATP conhecido como apoptossomo (Amarante-Mendes e Green, 1999; Zimmermann *et al.*, 2001). Neste contexto, caspase-9 torna-se ativa e é capaz de ativar através de proteólise as caspases efetoras -3, -6 e -7 (Figura 1.3). Já na via extrínseca, sinais extracelulares podem induzir a apoptose através da ativação de receptores de morte, tais como TNFR-1, Fas (CD95), TRAILR-1 e TRAILR-2 (Amarante-Mendes e Green, 1999; Zimmermann *et al.*, 2001). A ativação desses receptores induz a oligomerização de procaspase-8 ou -10 e sua consequente ativação por autoproteólise (Assuncao Guimaraes e Linden, 2004). A ativação destas caspases leva a ativação direta de caspases efetoras ou a integração da via extrínseca com a via intrínseca através da clivagem da proteína Bid (Figura 1.3) (Wei *et al.*, 2000). Além dessas duas principais vias, a apoptose também pode ser induzida por estresse do retículo endoplasmático, geralmente causado pelo dobramento incorreto de proteínas (Kim *et al.*, 2008). A principal

proteína desencadeadora da apoptose via estresse de retículo, descrita em camundongos, é a caspase-12. Esta proteína é capaz de ativar caspase-9 e desencadear a apoptose (Kim *et al.*, 2008). No entanto, a maioria dos humanos não possui uma caspase-12 funcional. Possivelmente, a caspase-4 humana, que possui 57% de homologia com a caspase-12 murina, seria capaz de desencadear a apoptose induzida por estresse de retículo endoplasmático (Szegezdi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008). Mais detalhes sobre as vias intrínseca e extrínseca da apoptose serão descritos a seguir.



**Figura 1.3. Representação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.** A via extrínseca está representada a partir da ativação dos receptores de morte (na figura está exemplificado pelo receptor Fas (CD95)) que ativam a caspase iniciadora –8. A via intrínseca está representada a partir do dano ao DNA que leva ativação da via mitocondrial. As duas vias são capazes de ativar caspases efetoras, como a caspase-3, que induzem a apoptose. Mais detalhes sobre as duas vias estão descritos no texto. Figura adaptada (Hengartner, 2000).

### 1.2.1 Via intrínseca da apoptose

A permeabilização da membrana externa da mitocôndria e a liberação do citocromo c, do espaço intermembrana para o citoplasma, são essenciais para formação do apoptossomo e consequente ativação da via intrínseca da apoptose. Embora, haja controvérsias sobre o exato mecanismo pelo qual ocorre a permeabilização da membrana externa, não há dúvidas de que as proteínas da família Bcl-2 estão envolvidas (Chipuk e Green, 2008). A família de proteínas Bcl-2 é dividida em três grupos, baseado na presença de até quatro domínios de homologia a Bcl-2 (*Bcl-2 homology domain – BH1-4*). O primeiro grupo é composto pelas proteínas antiapoptóticas tais como, Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, A1 e Mcl-1 que possuem os quatro domínios BH (BH1-4). Já o segundo grupo é composto pelas proteínas proapoptóticas efetoras, tais como Bax e Bak que possuem três domínios BH (BH1-3). E finalmente, o terceiro grupo que é composto por proteínas proapoptóticas *BH3-only* tais como, Bim, Bid, Bik, Bad, Noxa e Puma que possuem apenas o domínio BH3 (Chipuk e Green, 2008).

As proteínas proapoptóticas efetoras Bax e Bak são responsáveis pela permeabilização da membrana externa da mitocôndria, através da criação de um poro por onde são liberados os fatores apoptogênicos (Figura 1.3) (Leber *et al.*, 2007; Chipuk e Green, 2008). Em oposição a essas proteínas, estão as proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 geralmente localizadas na membrana externa mitocondrial que impedem a formação deste poro pelas proteínas Bax e Bak (Leber *et al.*, 2007; Chipuk e Green, 2008). Na ausência de qualquer estímulo indutor de apoptose, as proteínas antiapoptóticas estão constantemente inibindo as proteínas proapoptóticas efetoras (Chipuk e Green, 2008). No entanto, estímulos apoptóticos podem levar a ativação das proteínas proapoptóticas *BH3-only* que agem através de interações proteína-proteína com as proteínas antiapoptóticas ou proapoptóticas

efetoras, sensibilizando a célula ou promovendo diretamente a apoptose (Leber *et al.*, 2007; Chipuk e Green, 2008). Dentro deste grupo de proteínas proapoptóticas BH3-*only*, Bid e Bim são as únicas que podem ativar diretamente Bax e Bak (Wei *et al.*, 2000; Kuwana *et al.*, 2005). As demais proteínas BH3-*only* agem apenas como sensibilizadores ao interagir com as proteínas antiapoptóticas, impedindo-as de se ligar às proteínas proapoptóticas efetoras e desempenhar suas funções (Chipuk e Green, 2008).

A partir da permeabilização da membrana externa da mitocôndria não há retorno e a liberação de fatores apoptogênicos da mitocôndria, tais como citocromo c e Smac/DIABLO, levam ao desencadeamento da apoptose (Liu *et al.*, 1996; Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Enquanto, o citocromo c se liga a Apaf-1, a proteína Smac/DIABLO impede a inibição das caspases por proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), liberando caspase-9 da inibição e permitindo sua associação ao complexo Apaf-1/citocromo c (Figura 1.3) (Ekert *et al.*, 2001). Esta associação leva a ativação das caspases efetoras -3, -6 e -7, entre elas, a caspase-3 é a predominante. Juntas as três caspases efetoras levam ao fenótipo apoptótico pela clivagem de vários substratos (Figura 1.3) (Zimmermann *et al.*, 2001). Por exemplo, a fragmentação de DNA é causada pela ação da caspase-3 no complexo formado por CAD (*caspase-activated DNase*), uma nuclease, e iCAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*), seu inibidor. Em células não apoptóticas, CAD se encontra em um complexo inativo com iCAD, entretanto, durante a apoptose, a caspase-3 cliva iCAD levando a ativação de CAD e consequente fragmentação do DNA (Zimmermann *et al.*, 2001). Outro exemplo é a formação de *blebbing* de membrana, que ocorre em decorrência à clivagem de gelsolina, PAK2 (*p21-activated kinase 2*) e fodrina (Zimmermann *et al.*, 2001).

### 1.2.2 Via extrínseca da apoptose

Os receptores de morte da família do TNFR (*tumoral necrosis factor – receptor*), tais como TNFR-1, Fas (CD95), TRAILR-1 e TRAILR-2, são o ponto de partida para a ativação da via extrínseca da apoptose. Os membros dessa família são caracterizados por uma sequência de 80 aminoácidos na porção intracelular da proteína, denominada de domínio de morte (DD), que é essencial para transmissão do sinal de apoptose (Amarante-Mendes e Green, 1999). Cada um desses receptores pode disparar vias específicas de sinalização, na Figura 1.3 temos representada a via do receptor Fas. Após receber o sinal do seu ligante (FasL), o receptor Fas multimeriza e recruta a proteína adaptadora FADD através de interação homotípica entre os seus DD (Amarante-Mendes e Green, 1999). Além do DD, FADD possui outro domínio chamado de domínio efetor de morte (DED) que interage especificamente com o DED presente na procaspase -8 e -10, formando um complexo (Amarante-Mendes e Green, 1999). Este complexo formado por Fas, FADD e procaspase (-8 ou -10) promove a autoproteólise das procaspases levando à ativação das caspases e ao desencadeamento da via extrínseca da apoptose (Salvesen e Dixit, 1999). A interação entre a procaspase-8 e FADD neste complexo, pode ser impedida pela proteína c-FLIP, um homólogo degenerado das caspases incapaz de desencadear a via de sinalização da apoptose (Figura 1.3) (Irmiler *et al.*, 1997).

A ativação de caspase-8 é capaz de levar a clivagem e consequente ativação das caspases efetoras -3 e -7 (Figura 1.3). Estas caspases efetoras são capazes de clivar uma série de substratos, como já foi descrito no texto, anteriormente. Em decorrência à clivagem desses substratos, ocorre o processo de apoptose. Além disso, a ativação da caspase -8 pode levar a uma integração da via extrínseca com a via intrínseca da apoptose através da clivagem da proteína Bid. Como já foi

comentado no texto, a proteína Bid truncada (tBid) é capaz de ativar Bax e Bak, induzindo a liberação do citocromo c da mitocôndria e consequente ativação de caspase -9 (Figura 1.3) (Wei *et al.*, 2000).

### 1.2.3 NFAT e apoptose

Os fatores de transcrição da família NFAT desempenham um papel central na transcrição gênica durante a resposta imune (Rao *et al.*, 1997). O envolvimento do NFAT na regulação da expressão dos genes de diversas citocinas, tais como da IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$ , já é bem estabelecido (Rao *et al.*, 1997; Macian, 2005). Assim como também está estabelecido o envolvimento dos fatores de transcrição da família NFAT no controle da morte celular. Camundongos NFAT1<sup>-/-</sup>, a partir de seis meses de idade, apresentam uma hiperproliferação linfocitária associada a uma alteração no mecanismo de morte celular e acompanhada de um aumento moderado no tamanho dos órgãos linfoides (Hodge *et al.*, 1996; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1998). A ausência de NFAT1 também leva a um aumento da resposta proliferativa do sistema imune mediante a um estímulo antigênico primário e secundário com *L. major* e ovalbumina, respectivamente (Xanthoudakis *et al.*, 1996). Além disso, os camundongos deficientes para NFAT1 apresentam um retardo na involução tímica e uma redução na deleção de células T CD4<sup>+</sup> ativadas, sugerindo um possível defeito na morte celular induzida por ativação (*AICD* – *activation-induced cell death*), uma forma particular de apoptose essencial para a manutenção da homeostase do sistema imune (Schuh *et al.*, 1998). Em conjunto, esses fenótipos sugerem que o NFAT1 pode agir como um regulador positivo da morte celular. No entanto, o NFAT1 não é o único membro da família envolvido no controle da morte celular, outros membros da família também estão envolvidos. Células T CD4<sup>+</sup> expressando a isoforma longa do NFAT2 (NFAT2/C) ou NFAT1

sofrem mais apoptose após estimulação em comparação a células expressando a isoforma NFAT2/ $\alpha$  (Chuvpilo *et al.*, 2002). Contrariamente ao NFAT1 e NFAT2/C, o NFAT3 parece mediar a sobrevivência celular, o silenciamento da expressão de NFAT3 em neurônios, por interferência de RNA, leva a indução de apoptose (Benedito *et al.*, 2005). Além do NFAT3, o NFAT4 também pode estar envolvido na sobrevivência celular, já que camundongos deficientes para NFAT4 apresentam um aumento da morte celular de timócitos duplo positivos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) acompanhada de uma diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Oukka *et al.*, 1998).

Apesar dos membros da família NFAT possuírem a mesma especificidade de ligação ao DNA, os fenótipos resultantes da superexpressão ou depleção dos diferentes membros da família sugerem que essas proteínas possuem papéis relevantes e não redundantes no controle da morte celular. Corroborando esses dados, diversos estudos já demonstraram que o NFAT está envolvido na regulação de genes importantes no controle da apoptose, tais como TNF- $\alpha$ , FasL, c-FLIP, Nur77 e A1 (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1. Genes envolvidos no controle da apoptose regulados transcricionalmente pelo NFAT.**

	<b>Gene*</b>	<b>Função</b>	<b>Referência</b>
<b>Apoptose</b>	TNF- $\alpha$	Proapoptótico	(Mccaffrey <i>et al.</i> , 1994; Oum <i>et al.</i> , 2002; Kaminuma <i>et al.</i> , 2008)
	FasL	Proapoptótico	(Latinis <i>et al.</i> , 1997; Holtz-Heppelmann <i>et al.</i> , 1998)
	c-FLIP	Antiapoptótico	(Zaichuk <i>et al.</i> , 2004; Ueffing <i>et al.</i> , 2008)
	Nur77	Proapoptótico	(Youn <i>et al.</i> , 2000)
	A1	Antiapoptótico	(Ulleras <i>et al.</i> , 2008)

\*Os genes regulados por NFAT envolvidos na apoptose estão especificados na coluna intitulada "Gene". A função de cada gene no controle da apoptose está indicada na coluna ao lado.



Células T recém-ativadas são resistentes a apoptose induzida por FasL, possivelmente devido à expressão da variante curta de c-FLIP (cFLIP<sub>SHORT</sub>). Como já foi dito, anteriormente, a proteína c-FLIP pode impedir a ativação da via extrínseca da apoptose. A inibição da atividade de calcineurina leva a redução da expressão de cFLIP<sub>SHORT</sub> e aumenta a susceptibilidade de células T à apoptose induzida por FasL, indicando o envolvimento do NFAT na regulação de cFLIP (Ueffing *et al.*, 2008). Os membros NFAT1 e NFAT2 são capazes de se ligar e transativar o promotor de c-FLIP. Contrariamente, o NFAT4 é incapaz de se ligar ao promotor de c-FLIP, sugerindo funções diferentes na regulação deste promotor para os membros da família NFAT (Ueffing *et al.*, 2008). Além do c-FLIP, o NFAT participa da regulação da expressão de outra proteína antiapoptótica, a proteína A1 pertencente à família Bcl-2 (Ulleras *et al.*, 2008). A proteína A1 é capaz de sequestrar tBid e impedir a sua colaboração com os membros proapoptóticos da família Bcl-2, Bax e Bak (Werner *et al.*, 2002). A sobrevivência celular de mastócitos induzida pela ativação de FcεRI é dependente da expressão de A1 (Xiang *et al.*, 2001). Ionomicina, um ionóforo de cálcio, induz a expressão de A1 e a sobrevivência celular em mastócitos, e também é capaz de promover a ativação de calcineurina, indicando um possível papel do NFAT na regulação gênica de A1 (Ulleras *et al.*, 2008). Interessantemente, a forma constitutivamente ativa do NFAT1 é capaz de induzir a um aumento da expressão de A1 em mastócitos, ao contrário da forma constitutivamente ativa do NFAT2/β (Ulleras *et al.*, 2008). A diferença entre a expressão induzida pelos diversos membros da família NFAT pode ser explicada pelo fato de que cada uma das isoformas do NFAT possui domínios de transativação (TAD) nas porções N- e C-terminais diferentes, implicando, possivelmente, em uma menor capacidade de transativação por parte de algumas isoformas ou falta de capacidade de interagir com um determinado parceiro transcricional.

Além das proteínas c-FLIP e A1, já foi descrito que o NFAT também é capaz de regular a expressão de outras proteínas importantes no controle da apoptose. Entre essas proteínas estão três, já comentadas no texto, capazes de ativar a via extrínseca da apoptose, o TRAIL, o FasL e o TNF- $\alpha$ . O promotor de TRAIL possui diversos possíveis sítios de ligação para NFAT e a sua expressão em células T ativadas é sensível a ciclosporina (Mariani e Krammer, 1998; Wang *et al.*, 2000). Além disso, a superexpressão da forma constitutivamente ativa do NFAT1 em células NIH3T3 aumenta a transcrição de TRAIL mediante estímulo com PMA (Robbs *et al.*, 2013). Camundongos deficientes para NFAT1 expressam FasL e TNF- $\alpha$  em níveis mais baixos em comparação aos camundongos selvagens (Hodge *et al.*, 1996). Corroborando esse dado, já foi descrita a existência de dois sítios para NFAT no promotor de FasL capazes de ligar ao NFAT1 e NFAT2 (Latinis *et al.*, 1997). Além disso, células expressando NFAT1, quando estimuladas com ionomicina, induzem uma forte transativação do promotor de FasL (Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998). Já para região promotora do TNF- $\alpha$ , diversos estudos demonstraram a existência de quatro possíveis sítios de ligação para o NFAT (Goldfeld *et al.*, 1993; Mccaffrey *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1996). Embora todos os membros da família NFAT sejam capazes de se ligar ao promotor de TNF- $\alpha$ , existem controvérsias sobre a afinidade dos diferentes membros por cada sítio de NFAT presente no promotor (Esensten *et al.*, 2005). Aparentemente, enquanto o NFAT1 é capaz de se ligar aos quatro sítios de NFAT presentes no promotor de TNF- $\alpha$ , o NFAT2/B pode se ligar a somente dois destes sítios (Tsai *et al.*, 1996; Oum *et al.*, 2002). Interessantemente, essa falta de capacidade de se ligar a todos os sítios de NFAT presentes no promotor de TNF- $\alpha$ , por parte do NFAT2, pode se refletir em uma menor capacidade de transativação. A isoforma NFAT2/ $\alpha$  induz a uma transativação muito menor do promotor de TNF- $\alpha$  em comparação ao NFAT1 em

ensaios repórter de luciferase (Kaminuma *et al.*, 2008). Essa menor capacidade de transativar o promotor de TNF- $\alpha$  foi associada à ausência do TAD-C longo existente no NFAT1 (Figura 1.1). Uma proteína híbrida do NFAT2/ $\alpha$  contendo o TAD-C do NFAT1 é capaz de transativar o promotor de TNF- $\alpha$  de forma semelhante ao NFAT1 (Kaminuma *et al.*, 2008). Além disso, a isoforma longa NFAT2/C, que possui um TAD-C semelhante ao existente no NFAT1, também é capaz de transativar o promotor de TNF- $\alpha$ , porém com uma intensidade menor do que o NFAT1 (Kaminuma *et al.*, 2008). Em conjunto, esses dados sugerem que há funções não redundantes entre as diferentes isoformas e membros da família NFAT, ressaltando a importância dos diferentes TADs dessas proteínas nesta regulação gênica diferenciada.

A principal função descrita para os membros da família NFAT é de agir como fatores de transcrição se ligando diretamente a promotores e/ou *enhancers* para regular a expressão de diversos genes. No entanto, já foi demonstrado que a proteína NFAT1 pode regular a transcrição de Nur77 independentemente da sua ligação ao DNA, agindo como um coativador do fator de transcrição MEF2D (Youn *et al.*, 2000). Nur77 é um receptor nuclear órfão capaz de induzir apoptose em tímócitos imaturos (Liu *et al.*, 1994). Este receptor nuclear órfão pode converter a proteína antiapoptótica Bcl-2 em uma proteína proapoptótica semelhante às proteínas do tipo BH3-*only* (Lin *et al.*, 2004). O promotor de Nur77 possui dois elementos responsivos a calcineurina que são sítios de ligação para o fator de transcrição MEF2 (Woronicz *et al.*, 1995). No entanto, não há relatos na literatura que demonstrem que o fator MEF2 seja regulado pela calcineurina. Corroborando estes dados, foi demonstrado que o NFAT1 é capaz de interagir cooperativamente com MEF2D e aumentar sua atividade transcricional, implicando a via de calcineurina/NFAT na regulação gênica de Nur77 (Youn *et al.*, 2000).

Interessantemente, também foi demonstrado neste mesmo trabalho que a atividade de NFAT1 no controle da transcrição de Nur77 via MEF2D é dependente de seu TAD-C e do seu TAD-N. O NFAT1 é capaz de interagir com o fator MEF2D pelo seu TAD-C e através de seu TAD-N recruta p300 (Garcia-Rodriguez e Rao, 1998; Youn *et al.*, 2000), uma importante proteína coativadora conhecida por auxiliar no recrutamento de fatores basais de transcrição e/ou promover a acetilação de histonas (Snowden e Perkins, 1998). Esses dados em conjunto sugerem que os membros da família de fatores de transcrição NFAT desempenham papéis importantes na regulação do processo de apoptose, ressaltando a importância dos seus domínios de ativação da transcrição (TAD) nesta regulação.

As proteínas NFAT também são capazes de regular a apoptose de forma indireta, regulando transcricionalmente proteínas reguladoras de mediadores do processo de apoptose. O NFAT4 é capaz de ativar a transcrição de Trim17, uma ubiquitina-ligase E3 que é responsável por levar a proteína antiapoptótica Mcl-1 a degradação via proteassoma, promovendo assim apoptose em células neuronais (Mojsa *et al.*, 2015). Nesse trabalho, também foi demonstrado que a superexpressão de NFAT3, ao contrário do NFAT4, não aumenta a expressão de Trim17, corroborando dados anteriores que indicam NFAT3 como uma proteína promotora da sobrevivência celular em neurônios. NFAT3 já foi descrito por regular positivamente a transcrição do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF - *brain derived neurotrophic factor*), uma neurotrofina capaz de desencadear a ativação da via de sobrevivência celular de PI3K-Akt (Vashishta *et al.*, 2009). Juntamente, esses dados demonstram que a regulação positiva ou negativa da apoptose pelas proteínas NFAT vai além da regulação direta da expressão gênica de mediadores apoptóticos.

Diversos estudos aqui descritos demonstram o envolvimento da família de fatores de transcrição NFAT na regulação direta ou indireta de genes/proteínas

envolvidos na apoptose, tornando mais evidente que a função de cada membro nesta regulação não parece ser redundante. Os domínios de ativação da transcrição são, possivelmente, as principais regiões responsáveis por essas diferenças entre os diferentes membros da família NFAT. Aparentemente, os membros da família NFAT apresentam como principal diferença estrutural, os domínios de ativação da transcrição (TAD; Figura 1.1). Apesar da importância dos TADs na função das proteínas NFAT, o grande número de variantes dos TADs foi pouco estudado comparativamente em ensaios funcionais para determinar seu papel na regulação gênica. Devido a esta grande heterogeneidade, temos grande interesse em entender qual a função de diferentes variantes do NFAT e o papel dos TADs na sua função. Diversos estudos já demonstraram que o NFAT1 é capaz de induzir apoptose em diferentes modelos e que essa capacidade é dependente do seu TAD-C (Chuvpilo *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2003; Robbs *et al.*, 2008). Portanto, neste presente estudo, o membro NFAT1 será utilizado para melhor avaliar o papel dos TADs na indução de apoptose por NFAT.

### **1.3 Câncer**

A organização celular em metazoários permitiu a criação de tecidos e órgãos de ampla diversidade anatômica. No entanto, a maioria das células possui em seu genoma mais informação do que o necessário para que estas células possam exercer propriamente as suas funções. Muitas destas células ainda retêm a capacidade de crescer e se dividir mesmo após o completo desenvolvimento do organismo. A retenção desta capacidade de proliferar torna possível a manutenção dos tecidos adultos ao longo da vida do organismo. Entretanto, o balanço entre proliferação e morte celular é essencial para manutenção da homeostase. A perda da capacidade de induzir morte celular ou o aumento desenfreado da proliferação

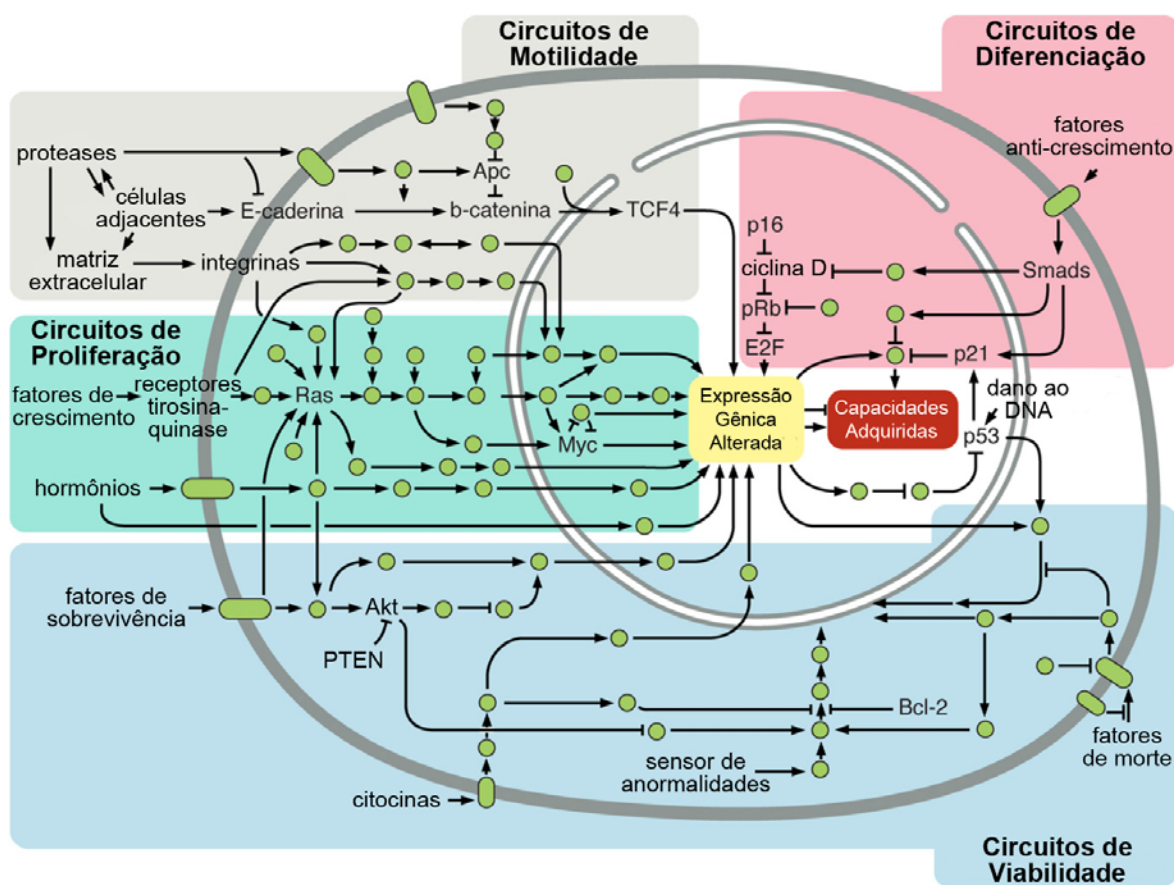
podem levar ao surgimento de câncer, que se desenvolve pelo acúmulo desregulado de células. O câncer é essencialmente uma doença genética que pode ser herdada ou causada por danos ao DNA, que podem ser casuais ou relacionados ao ambiente. A partir desse momento, esta célula ao se dividir passará estas alterações adiante, e no caso de ocorrerem danos adicionais a esse mesmo material genético, o acúmulo de danos pode criar células que progressivamente irão proliferar mais subvertendo os mecanismos de restrição de crescimento.

Alterações em duas amplas classes de genes estão diretamente envolvidas no surgimento e desenvolvimento do câncer: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (Hanahan e Weinberg, 2000). Os proto-oncogenes codificam proteínas que participam normalmente no recebimento e na transmissão de sinais estimuladores da proliferação ou sobrevivência celular. No entanto, quando ocorre a perda da regulação dos proto-oncogenes por mutações ou alterações que levam a uma superexpressão do gene ou a um estado hiperativo da proteína promovendo o crescimento tumoral, estes genes passam a ser denominados de oncogenes. Genes supressores de tumor geralmente retêm o crescimento tumoral se opondo aos oncogenes, portanto danos que levem à perda de função desses genes também podem causar o surgimento de tumores.

As células tumorais são, principalmente, conhecidas e definidas pela sua capacidade de proliferar e sobreviver a sinais indutores de morte celular. No entanto, vale ressaltar que esses não são os únicos aspectos envolvidos no surgimento e na manutenção do câncer. Atualmente, já se chegou ao entendimento de que o câncer não é apenas um conjunto de células em proliferação, e sim uma doença do tecido onde o estroma associado ao tumor desempenha um papel essencial na manutenção do câncer compondo o microambiente tumoral. Além da atuação do estroma tumoral no desenvolvimento do câncer, o genótipo das células tumorais

contribui para a manifestação de outras alterações fisiológicas que ajudam a promover o crescimento maligno, tais como: a criação de novos vasos (angiogênese), instabilidade genômica, evasão do sistema imune, capacidade de migrar e invadir outros tecidos, mudanças no metabolismo celular, aumento da inflamação e capacidade replicativa ilimitada (Hanahan e Weinberg, 2011).

Os circuitos formados por oncoproteínas e proteínas supressoras tumorais formam vias de sinalização celular capazes de promover ou suprimir diferentes aspectos, como os mencionados acima, e são essenciais para a tumorigênese e a manutenção do tumor (Figura 1.4). Nas vias de supressão tumoral, o fator de transcrição p53 é uma proteína-chave, e sua ativação pode culminar no arresto do ciclo celular, no reparo ao DNA, na senescência ou na apoptose, todos estes considerados importantes mecanismos de supressão tumoral (Caetano *et al.*, 2002). A inibição do fator p53, seja por mutação ou por outro mecanismo, é frequente em diversos tipos de tumor, já que ela pode levar à inativação desses diferentes mecanismos de supressão, simultaneamente (Luo *et al.*, 1996b). Em lado oposto, estão as vias de sinalização promotoras do tumor, e nestes circuitos a proteína Ras desempenha papel central, promovendo proliferação, sobrevivência celular, invasão tecidual, alterações metabólicas e angiogênese, diversas características essenciais para o desenvolvimento tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011). O proto-oncogene Ras atua normalmente na fisiologia celular, entretanto, mutações ativadoras de Ras são comuns em 30% dos tumores humanos (Calvo *et al.*, 2010). Diferentes proteínas compõem as vias de sinalização promotoras e supressoras de tumor e para que essas diversas vias se tornem hiperativadas ou inativas, muitas vezes é suficiente que apenas um dos seus mediadores esteja alterado, o que torna essas proteínas mediadoras e as vias que são capazes de desencadear importantes alvos de estudo.



**Figura 1.4. Rede de sinalização intracelular regulando diferentes circuitos celulares.** Alguns dos oncogenes e genes supressores de tumor mais conhecidos são mostrados, estes são capazes de operar diversas vias de sinalização em células normais, no entanto, essas vias podem ser reprogramadas em células tumorais para regular diferentes capacidades adquiridas por esta célula. Esta representação é simplista e mostra diferentes vias de sinalização e os circuitos que estas operam, entretanto, há bastante cruzamento de vias. Figura adaptada (Hanahan e Weinberg, 2011).

### 1.3.1 Via de Ras-Raf-MEK-ERK

A via de sinalização celular encontrada, com maior frequência, hiperativada em diferentes tipos de tumores é a via de Ras-Raf-MEK-ERK e está relacionada, principalmente, com o aumento da proliferação e sobrevivência celular (Roberts e Der, 2007; Alvarez *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 2010). A via de Ras-Raf-MEK-ERK é uma das vias de cascata de MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) mais bem caracterizadas e amplamente estudadas, até hoje. Estas cascatas comprometem três proteínas quinases que participam da transdução de sinais através da



fosforilação de proteínas: uma quinase de quinase de MAPK (MAPKKK), uma quinase de MAPK (MAPKK) e uma MAPK (Roberts e Der, 2007). A ativação de Ras leva ao recrutamento de Raf (c-Raf-1, A-Raf e B-Raf) e induz a sua dimerização e ativação (Samatar e Poulidakos, 2014). Uma vez ativada, Raf fosforila e ativa as proteínas MEK1 e MEK2, que por sua vez, fosforilam e ativam ERK1 e ERK2. As proteínas ERK1-2 ativadas fosforilam e regulam a atividade de uma série de substratos, que são estimados em mais de cento e sessenta proteínas (Roberts e Der, 2007). ERK ativada pode translocar para o núcleo, aonde é capaz de fosforilar e ativar diversos fatores de transcrição, tais como proteínas da família Ets, Fos, Jun e Myc, culminando em alterações da expressão gênica que levarão ao desencadeamento de circuitos relacionados a progressão do ciclo celular, diferenciação, síntese de proteínas e evasão da morte celular (Hanahan e Weinberg, 2000; Roberts e Der, 2007).

A via de Ras-Raf-MEK-ERK funciona abaixo do fluxo de sinalização de receptores tirosina-quinase de superfície, tais como EGFR e HER2. A superexpressão de EGFR e HER2 ocorre com frequência em tumores de mama e está associada a um pior prognóstico (Alvarez *et al.*, 2010). Já os genes da família Ras (N-Ras, K-Ras e H-Ras) são encontrados ativados por mutações em 30% de todos os tipos de câncer, sendo que este percentual pode ser maior em determinados tumores, como o de pâncreas (90%), cólon (50%) e tireoide (50%) (Roberts e Der, 2007). Além disso, a hiperativação ou superexpressão de mediadores abaixo do fluxo de sinalização de Ras ou EGFR também é suficiente para promover a ativação da via de Ras-Raf-MEK-ERK. Há evidências substanciais de que Raf e MEK também promovem crescimento tumoral e auxiliam na progressão do câncer (Shields *et al.*, 2000). Mutações no gene B-Raf são encontradas em 70% dos melanomas e 20% dos tumores de cólon, além do mais, ocorrências de

mutações não sobrepostas em Ras e Raf já foram descritas em melanoma, carcinoma de cólon, câncer de tireoide, de ovário e de pulmão (Roberts e Der, 2007). Em conjunto, esses estudos indicam que esta via de sinalização desempenha papel fundamental no desenvolvimento tumoral.

Devido a sua grande importância, diversas terapias anticâncer que definem como alvos terapêuticos, componentes da via de Ras-Raf-MEK-ERK, já foram e ainda são desenvolvidas. A sinalização do receptor tirosina-quinase EGFR é, comumente, encontrada em vários tumores e pode desencadear não somente a via de Ras-Raf-MEK-ERK como também a via de sobrevivência celular PI3K-Akt (Roberts e Der, 2007). Entre as estratégias já desenvolvidas com sucesso para inibir a sinalização de EGFR estão a utilização de anticorpos monoclonais que se ligam diretamente ao domínio extracelular do EGFR e de pequenas moléculas inibidoras de tirosina-quinase. O primeiro anticorpo monoclonal contra EGFR a ser aprovado para uso clínico foi o cetuximab, que é utilizado, principalmente, para o tratamento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e câncer colorretal metastático (Roberts e Der, 2007). Outro conhecido antagonista da sinalização de EGFR, também utilizado para fins terapêuticos, é o erlotinib, um inibidor de tirosina-quinase, usado no tratamento de câncer de pulmão de não-pequenas células e câncer de pâncreas metastático (Roberts e Der, 2007).

O oncogene Ras, importante componente de diferentes vias de sinalização, também é alvo de estudos para o desenvolvimento de inibidores específicos. As principais estratégias utilizadas para a criação de inibidores de Ras são o impedimento do seu ancoramento à membrana plasmática mediante à inibição de determinadas modificações pós-traducionais, e a inibição da troca de GDP por GTP, que são essenciais para que Ras funcione adequadamente (Roberts e Der, 2007; Samatar e Poulidakos, 2014). Entretanto, grande parte dos inibidores de Ras já

desenvolvidos não é eficaz no combate à transformação celular causada por Ras (Roberts e Der, 2007; Samatar e Poulikakos, 2014). Apesar dos esforços realizados para desenvolver drogas anti-Ras, ainda existe um caminho a ser percorrido até chegar ao uso clínico destas drogas no tratamento contra o câncer.

Muitos esforços também têm sido realizados com o propósito de desenvolver inibidores para demais componentes da via de Ras-Raf-MEK-ERK. Um dos primeiros inibidores de Raf a ser desenvolvido, o sorafenib, foi desenhado para inibir c-Raf-1, no entanto, posteriormente, foi visto que esta molécula também era capaz de inibir, em menor escala, B-Raf (Montagut e Settleman, 2009). O sorafenib é utilizado no tratamento de pacientes com carcinoma de células renais avançado e carcinoma hepatocelular (Montagut e Settleman, 2009; Santarpia *et al.*, 2012). Entretanto, alguns testes clínicos falharam em fornecer evidências de que a inibição de Raf possui valor clínico, apesar da sua contribuição no processo de tumorigênese (Santarpia *et al.*, 2012). Vale ressaltar que sorafenib já foi descrito por inibir receptores tirosina-quinase, tais como VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR- $\beta$  (Montagut e Settleman, 2009; Santarpia *et al.*, 2012). Portanto, é possível que a boa resposta ao tratamento com sorafenib de pacientes com carcinoma de células renais e a ausência de resposta em pacientes com outros tumores dependentes da sinalização de Raf, se deve a importância da angiogênese na progressão do carcinoma de células renais (Montagut e Settleman, 2009). Outros dois inibidores de Raf já desenvolvidos, o vemurafenib e o dabrafenib, causaram grande impacto na melhora da resposta clínica de pacientes com melanoma que possuem as mutações V600E ou V600K em B-Raf (Samatar e Poulikakos, 2014). No entanto, alguns estudos demonstraram que, ao mesmo tempo em que essas moléculas inibem de forma eficaz B-Raf mutado, elas levam a ativação de B-Raf selvagem em baixas concentrações, o que acarretou no aparecimento de outro tumor primário em alguns

pacientes (Samatar e Poulidakos, 2014). Além de inibidores de Raf, moléculas inibidoras de MEK já foram desenvolvidas, no entanto, apesar dos bons resultados em ensaios pré-clínicos, estes inibidores não alcançaram os resultados esperados quando utilizados em testes clínicos de fase II (Santarpia *et al.*, 2012).

Em conjunto, todos estes trabalhos demonstram que apesar dos avanços no desenvolvimento de anticorpos e outras moléculas inibidoras da sinalização de Ras-Raf-MEK-ERK, ainda são poucos os tipos de câncer que apresentam uma boa resposta ao tratamento com estas moléculas. A existência de diversas vias concomitantes a via de Ras-Raf-MEK-ERK em células tumorais, a ocorrência de mutações ativadoras em mais de um mediador de sinalização desta via, o surgimento de vias de sinalização alternativas mediante a inibição da via de Ras-Raf-MEK-ERK e a toxicidade de vários inibidores desta via de sinalização, devido a sua importância em células não cancerosas, tornam muito mais complexo o desenvolvimento de terapias anticâncer que tenham como alvo, mediadores de sinalização da via de Ras-Raf-MEK-ERK.

### **1.3.2 NFAT e câncer**

Um dos primeiros estudos implicando o NFAT no processo de tumorigênese demonstrou que a expressão da forma constitutivamente ativa do NFAT2/ $\alpha$  (CA-NFAT2/ $\alpha$ ) em fibroblastos induz a transformação celular e a formação de colônias (Neal e Clipstone, 2003). Apesar de possuírem funções redundantes, os membros da família NFAT também podem apresentar funções opostas. Diversos estudos já demonstraram que outro membro da família NFAT, o NFAT1, possui atividade supressora de tumor. Como já relatado aqui, os camundongos deficientes para NFAT1 apresentam uma hiperproliferação de linfócitos e aumento dos órgãos linfoides (Hodge *et al.*, 1996; Xanthoudakis *et al.*, 1996). Além destes fenótipos

apresentados, já foi descrito que estes camundongos possuem uma maior propensão a desenvolver tumores de cartilagem em comparação a camundongos selvagens (Ranger *et al.*, 2000). Corroborando estes dados, foi demonstrado que o NFAT1 é capaz de inibir a expressão de CDK4 e ciclina A2, implicando este membro da família NFAT na regulação do ciclo celular e proliferação (Baksh *et al.*, 2002; Caetano *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2007). Em outro estudo, foi demonstrado, em um mesmo modelo, que membros da família NFAT exercem papéis antagônicos no processo de tumorigênese, onde o NFAT1 age como um supressor de tumor e o NFAT2/ $\alpha$  age como um oncogene (Robbs *et al.*, 2008). A expressão do CA-NFAT1 em fibroblastos induz o arresto do ciclo celular e a apoptose, e inibe a transformação celular, enquanto que o CA-NFAT2/ $\alpha$  induz a transformação e o crescimento de tumores em camundongos *Nude* (Robbs *et al.*, 2008). Corroborando estes dados, foi demonstrado que camundongos deficientes para NFAT1 são mais susceptíveis a carcinogênese química em comparação a camundongos selvagens, reafirmando a função supressora de tumor do NFAT1 (Robbs *et al.*, 2008).

As proteínas NFAT estão presentes em diversos tipos de malignidades (Medyouf e Ghysdael, 2008). A proteína NFAT2 está localizada no núcleo em 70% dos casos de linfoma de Burkitt, cerca de 30% dos casos de linfomas de células B grandes difusas (DLBCL) e em 70% dos casos de carcinoma pancreático (Marafioti *et al.*, 2005; Buchholz *et al.*, 2006). Corroborando o papel oncogênico do NFAT2, foi demonstrado que a proliferação e o crescimento independente de ancoragem de células tumorais do pâncreas são dependentes da expressão de NFAT2 e da atividade de calcineurina (Buchholz *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a inibição da atividade de calcineurina é capaz de reverter a proliferação celular e induzir apoptose em linhagens celulares de DLBCL e de leucemia linfóide aguda de células T (Pham *et al.*, 2005; Medyouf *et al.*, 2007). A via de NFAT/calcineurina

também está, diretamente, relacionada ao aumento da proliferação celular em tumores de próstata (Lehen'kyi *et al.*, 2007). Esses dados demonstram a importância das proteínas NFAT na regulação do ciclo celular e da apoptose durante o processo de tumorigênese.

A família NFAT também está implicada em outros eventos determinantes para o desenvolvimento tumoral, como a angiogênese e a motilidade celular (Mancini e Toker, 2009). Como foi primeiramente visto em camundongos duplo nocautes para NFAT3 e NFAT4, a via de NFAT/calcineurina é essencial para angiogênese e organização da vasculatura durante o desenvolvimento (Graef *et al.*, 2001). Portanto, não é surpreendente que a via de NFAT/calcineurina também atue sobre a angiogênese tumoral. A sinalização do fator de crescimento do endotélio vascular A (VEGFA) é capaz de induzir à ativação de PLC $\gamma$ , levando ao aumento do cálcio intracelular e a ativação de calcineurina e, conseqüente, translocação nuclear do NFAT (Ferrara *et al.*, 2003). Por sua vez, o NFAT leva a transativação de genes essenciais para a angiogênese, como COX2, resultando na síntese de prostaglandina E2 (PGE2), um importante mediador da migração de células endoteliais e da formação de vasos (Hernandez *et al.*, 2001). A expressão de COX2 induzida por NFAT também desempenha um papel importante na migração e invasão de células tumorais de mama (Yiu e Toker, 2006). Corroborando este trabalho, outros estudos que já demonstraram a importância do NFAT na motilidade de células de tumor de mama e de glioblastoma (Jauliac *et al.*, 2002; Yoeli-Lerner *et al.*, 2005; Yoeli-Lerner *et al.*, 2009; Tie *et al.*, 2013).

O microambiente tumoral, composto por células do estroma e do sistema imune, exerce papel fundamental na manutenção do câncer. As proteínas NFAT também agem nas células desse microambiente influenciando o desenvolvimento tumoral. Células de adenocarcinoma bronquial quando injetadas nos pulmões de

camundongos NFAT1<sup>-/-</sup> proliferam mais e sofrem menos necrose, comparadas às mesmas células injetadas nos pulmões de camundongos selvagens (Maxeiner *et al.*, 2009). Aparentemente, devido a uma menor produção de IL-2 e TNF- $\alpha$  por células T CD8 e a um aumento do número de células T regulatórias isoladas dos pulmões dos camundongos NFAT1<sup>-/-</sup> (Maxeiner *et al.*, 2009). Por outro lado, outro estudo demonstrou que camundongos deficientes para NFAT1 tem menor susceptibilidade em desenvolver metástases pulmonares em um modelo murino de melanoma (Werneck *et al.*, 2011). Células de melanoma B16F10, conhecidas pela sua capacidade de fazer metástases pulmonares, formam menos colônias nos pulmões de camundongos NFAT1<sup>-/-</sup> em comparação a camundongos selvagens (Werneck *et al.*, 2011). No entanto, neste estudo foi mostrado que a menor susceptibilidade dos camundongos NFAT1<sup>-/-</sup> não estava relacionada à resposta imune antitumoral por parte das células derivadas da medula óssea (Werneck *et al.*, 2011). Mais recentemente, Minami e colaboradores apresentaram resultados semelhantes utilizando o mesmo modelo de metástase pulmonar. Neste trabalho, foi demonstrado que camundongos deficientes para DSCR1, um inibidor da fosfatase calcineurina, apresentam maior número de metástases pulmonares em comparação a camundongos selvagens (Minami *et al.*, 2013b). Neste caso, o aumento do número de metástases ocorreu devido a maior expressão de angiopoietina-2 (ANG-2) no endotélio pulmonar dos camundongos DSCR1<sup>-/-</sup> (Minami *et al.*, 2013b). Em outro estudo, foi demonstrado que os camundongos NFAT1<sup>-/-</sup> são menos susceptíveis a desenvolver câncer de cólon, devido a uma redução da inflamação na região do cólon (Gerlach *et al.*, 2012). Em conjunto, estes estudos demonstram a relevância do NFAT não somente como componente intrínseco da célula tumoral, mas também como componente do microambiente tumoral.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar as funções dos diferentes membros da família NFAT no câncer. As proteínas NFAT1 e NFAT2 são os membros da família NFAT mais estudados. Vários estudos demonstram que estes dois membros possuem papéis opostos, enquanto o NFAT2 seria um oncogene, o NFAT1 seria um gene supressor de tumor. Entretanto, alguns estudos já demonstraram que o NFAT1 também pode agir como um oncogene. O NFAT1 é capaz de induzir a expressão de MDM2, um dos principais reguladores negativos de p53 (Zhang *et al.*, 2012). Além disso, no mesmo trabalho foi demonstrado que a superexpressão de NFAT1 aumenta a resistência de linhagens tumorais de mama ao tratamento com etoposídeo (Zhang *et al.*, 2012). Em outro trabalho, o NFAT1 foi descrito por inibir a transcrição do gene supressor de tumor p15<sup>INK4b</sup> ao induzir formação de heterocromatina na região promotora deste gene (Baumgart *et al.*, 2012). Em conjunto, estes trabalhos demonstram uma dualidade do NFAT1 na regulação da tumorigênese, podendo tanto promover o crescimento tumoral como também restringi-lo.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem papéis oncogênicos para o NFAT1, os fenótipos dos camundongos deficientes para NFAT1 indicam fortemente uma função supressora de tumor para o NFAT1. Além do mais, o NFAT1 é capaz de inibir a transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, como também é capaz de induzir a expressão de genes indutores de apoptose. Nosso grupo, já demonstrou que a expressão da forma constitutivamente ativa do NFAT1 (CA-NFAT1) é capaz de suprimir a transformação celular induzida pelo oncogene H-RasV12, através da ativação do mecanismo de apoptose (Robbs *et al.*, 2008). Interessantemente, o CA-NFAT1 induz apoptose em cooperação com o próprio oncogene H-RasV12 em fibroblastos (Robbs *et al.*, 2013). Neste trabalho, também foi demonstrado que a apoptose induzida pelo CA-NFAT1 é dependente da atividade



de MEK e ERK (Robbs *et al.*, 2013). Corroborando estes dados, Wu e colaboradores já demonstraram que a inibição da via de NFAT/calcineurina em queratinócitos humanos expressando H-RasV12 leva à formação de tumores, indicando que esta via pode ter uma importante função de supressão tumoral (Wu *et al.*, 2010). Em conjunto, estes dados sugerem que o NFAT1 pode suprimir a formação de tumores, surpreendentemente, ao colaborar com a via de Ras-Raf-MEK-ERK.

#### **1.4 Terapia Gênica**

Apesar do enorme conhecimento adquirido sobre a biologia tumoral nas últimas décadas, o câncer foi a segunda maior causa de morte em 2013 no Brasil e a Organização Mundial de Saúde projeta um crescimento de 45% para o ano de 2030 no número de mortes ligadas ao câncer no mundo (Datusus, 2013; Who, 2015). O tratamento contra o câncer tem avançado bastante ao longo dos anos, mas ele ainda é sustentado por três pilares, relativamente, antigos: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Weinberg, 2014). O tratamento cirúrgico se baseia na premissa de que a ressecção de tumores primários irá diminuir drasticamente a ocorrência de metástases. Já a radioterapia começou a ser desenvolvida no final do século 19 e é aplicada de forma localizada minimizando a exposição à radiação de áreas do corpo que não sejam o tumor, uma vez que a radiação também pode causar câncer (Weinberg, 2014). Por último, a quimioterapia começou a ser desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial, mediante a observação de que sobreviventes a um acidente com gás mostarda apresentavam depleção da medula óssea e anemia. Em seguida, na Universidade de Yale, pesquisadores demonstraram que doses intravenosas de gás mostarda levavam a regressão temporária de linfomas (Weinberg, 2014). A partir de então, cresceu o interesse no desenvolvimento de agentes quimioterápicos que levassem, preferencialmente, à morte de células

neoplásicas em prol das células saudáveis. Atualmente, quimioterápicos com diferentes métodos de ação são utilizados na clínica, entre esses estão agentes alquilantes, antraciclinas, análogos de nucleosídeos e desestabilizadores de microtúbulos (Weinberg, 2014). Esses três tratamentos também são, comumente, combinados para obtenção de uma melhor resposta terapêutica. A radio e a quimioterapias são classificadas em terapias adjuvantes, quando sucedem a cirurgia de ressecção, ou neoadjuvantes quando antecedem a cirurgia visando a redução do tamanho do tumor para que seja possível sua ressecção.

Apesar de serem antigos, os tratamentos citados acima foram bem aprimorados ao longo do tempo e ainda são utilizados por serem muito efetivos para determinados tipos de câncer. No entanto, diante do fenômeno de resistência a múltiplas drogas, dos graves efeitos colaterais das terapias apresentadas e do fato de que diversos tipos de tumores ainda permanecem incuráveis, novas formas de terapia continuam a ser desenvolvidas. Nas últimas duas décadas, novos tratamentos surgiram e tem sido utilizados para uma parcela de tumores que não responde bem aos tratamentos clássicos, entre essas novas estratégias estão a imunoterapia, a terapia-alvo e a terapia gênica. A imunoterapia se baseia na utilização de moduladores da resposta imune ou na modificação genética de células do sistema imune para que o próprio sistema do paciente combata as células tumorais. Já a terapia-alvo tem como foco uso de anticorpos ou moléculas inibidoras de proteínas-chave para as principais vias de sinalização ativas em células tumorais. Por sua vez, a terapia gênica visa a melhora terapêutica através da inserção de material genético (DNA ou RNA) em determinada célula.

O conceito de que determinado material genético poderia ser introduzido de forma permanente, segura e funcional em células-alvo surgiu após estudos demonstrarem transferência de material genético entre bactérias (Avery *et al.*, 1944).

Os primeiros testes de terapia gênica em humanos começaram no final da década de 1980 e no início da década de 1990. Primeiramente, linfócitos geneticamente marcados foram infundidos em pacientes com melanoma metastático para demonstrar que um gene poderia ser inserido de forma segura em células de um paciente (Rosenberg *et al.*, 1990). Em 1990, começaram os primeiros testes com fins terapêuticos, onde duas crianças com imunodeficiência severa combinada por deficiência da enzima adenosina deaminase (ADA) tiveram a expressão de ADA restaurada em células T (Anderson, 1992). Em 2002, foram descritos os primeiros casos de cura de uma doença através da terapia gênica. Cinco crianças, portadoras de imunodeficiência combinada severa ligada ao cromossomo X, foram tratadas com infusão de células hematopoiéticas modificadas geneticamente *ex vivo* para recuperar a expressão de  $\gamma c$  (cadeia gama comum) (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002). Entre as cinco crianças tratadas, quatro obtiveram sucesso terapêutico (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002). No entanto, duas crianças tratadas acabaram desenvolvendo leucemia induzida pelo tratamento, devido a uma mutagênese insercional no oncogene LMO2 (McCormack e Rabbitts, 2004). Este evento acabou causando uma péssima repercussão em torno dos estudos de terapia gênica. Entretanto, desde então, muitos estudos trouxeram melhorias aos vetores utilizados na terapia gênica, demonstrando que a ocorrência destes eventos adversos não é comum.

Diversos vetores para entrega do gene já foram desenvolvidos, até hoje. Basicamente, esses vetores podem ser classificados em vetores não-virais e virais. Entre os métodos não-virais mais comuns estão a eletroporação, injeção de DNA desnudo, lipossomos e transposons. Os vetores não-virais de forma geral possuem como principal vantagem o baixo custo da sua produção, no entanto, a baixa eficiência na entrega e a baixa expressão do transgene são as suas principais desvantagens. Por outro lado, avanços no desenvolvimento desses vetores

não-virais já tornaram possível a obtenção de eficiências de transfecção e de expressão similares aos vetores virais (Hackett *et al.*, 2010; Murakami e Sunada, 2011). Por sua vez, os vetores virais mais utilizados compreendem os retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associado e HSV (*Herpes Simplex Virus*) (Kantor *et al.*, 2014). Os vetores retrovirais, incluindo os lentivírus, são capazes de levar a uma alta expressão do transgene já que esses vetores integram o genoma viral ao genoma da célula-alvo. Entretanto, a integração do genoma retroviral constitui também uma das suas principais desvantagens, já que podem ocorrer mutagêneses insercionais dependendo do local de integração no genoma da célula-alvo. Em relação aos vetores adenovirais, o custo mais acessível para produção em larga escala, dentre os vetores virais citados, é uma das suas principais vantagens, e assim como a capacidade de induzir uma rápida e alta expressão do transgene sem que seja necessário integrar o genoma viral ao genoma hospedeiro. Já os vírus adeno-associado não são patogênicos e possuem como principal vantagem a expressão duradoura do transgene. Por último, os vírus Herpes Simplex também são capazes de manter uma expressão prolongada e possuem neurotropismo. A principal desvantagem dos vetores virais aqui citados é a sua imunogenicidade. Desses exemplos, os mais utilizados em terapia gênica contra o câncer são os adenovírus e os retrovírus.

O câncer é caracterizado como uma doença ocasionada por diversas alterações genéticas, devido a este fato, se tornou foco da maioria dos atuais estudos de terapia gênica. Esses estudos envolvem diferentes abordagens. Uma das primeiras abordagens a ser desenvolvida foi a restauração da expressão de genes supressores de tumor em células cancerosas. Vetores adenovirais carreando o gene supressor de tumor p53 foram a primeira terapia gênica aprovada para comercialização. Atualmente, estes adenovírus recombinantes expressando p53

estão registrados sob o nome Gendicine® na China e são, comumente, utilizados em combinação com radioterapia para tratar pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Lane *et al.*, 2010). Por outro lado, a sua contraparte norte-americana, Advexin, não foi aprovada para uso pela agência reguladora FDA (*Food and Drug Administration*) no ano de 2008, apesar de ter obtido bons resultados em teste clínicos (Lane *et al.*, 2010). Além de p53, o gene PTEN, outro conhecido supressor de tumor, também é utilizado em estudos de terapia gênica. A restauração da expressão de PTEN, através de adenovírus recombinante, combinada com o tratamento quimioterápico com cisplatina induz apoptose e arresto do ciclo celular em células tumorais de pulmão *in vitro* e *in vivo* (Luo *et al.*, 1996b). Neste estudo, foi demonstrado que o efeito da combinação entre o tratamento com adenovírus expressando PTEN e o tratamento com cisplatina é mais benéfico do que os tratamentos individuais (Luo *et al.*, 1996b). Juntamente, estes dados indicam que a restauração de um gene supressor de tumor pode trazer melhorias aos atuais tratamentos antitumorais e alternativas terapêuticas para alguns pacientes.

Além da restauração da expressão de genes supressores de tumor, outra estratégia para terapia gênica em câncer é a utilização de vetores adenovirais oncolíticos que são capazes de infectar, especificamente, células tumorais e replicar até causar a lise das mesmas. Normalmente, os vetores virais utilizados em terapia gênica são incapazes de se replicar na célula-alvo, uma vez que esta replicação poderia resultar em uma infecção. No entanto, quando se trata de vírus oncolíticos o efeito desejado é, exatamente, a sua replicação desde que estes vírus sejam capazes de se replicar somente nas células desejadas. Dentro desta estratégia, um dos primeiros vírus oncolíticos a ser desenvolvido, foi nomeado de ONYX-015, e era capaz de replicar somente em células que possuíam p53 inativo (Bischoff *et al.*, 1996). No entanto, bons resultados em testes clínicos utilizando ONYX-015 só foram

alcançados em combinação com tratamentos quimioterápicos (Zhang *et al.*, 2003; Lane *et al.*, 2010). Devido a isso, adenovírus oncolíticos que também levem ao aumento da expressão de um determinado gene foram desenvolvidos (Zhang *et al.*, 2003). Mais recentemente, foi demonstrado que adenovírus oncolíticos expressando TRAIL induzem apoptose e reduzem a viabilidade da linhagem de tumor de pulmão A549 em modelos *in vitro* e *in vivo* (Yang *et al.*, 2015). Outros vírus oncolíticos com diferentes seletividades para célula tumoral e melhor capacidade de lisa-las já foram desenvolvidos. Em 2008, foi demonstrado que adenovírus oncolíticos capazes de replicar somente em células com receptor de estrógeno ativo (AdEHE2F) apresentam maior citotoxicidade do que os adenovírus ONYX-015 em diferentes linhagens tumorais de mama (Bazan-Peregrino *et al.*, 2008).

Algumas das outras abordagens da terapia gênica contra o câncer que estão em desenvolvimento, envolvem a combinação com a imunoterapia. Como a modificação genética de células T do próprio paciente *in vitro* para que passem a expressar genes ou receptores quiméricos que auxiliem o sistema imune a combater as células tumorais quando reinseridas nesse mesmo paciente (Barrett *et al.*, 2015). De maneira semelhante, a terapia gênica também pode ser usada para levar a um aumento da expressão de citocinas específicas em conjunto com a transferência adotiva de linfócitos infiltrantes do tumor ou ainda para induzir a expressão de um antígeno tumoral em células apresentadoras de antígeno (Khammari *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2015). Em conjunto, todas essas diferentes estratégias demonstram a amplitude das possíveis aplicações da terapia gênica para o tratamento de câncer.

No presente projeto, temos como um dos objetivos avaliar se a introdução do gene CA-NFAT1 através de vetores virais em células tumorais é capaz de induzi-las a morte celular. O vetor viral a ser utilizado aqui será o adenovírus do sorotipo 5, devido as vantagens já mencionadas envolvendo a utilização desse vetor e a sua

capacidade de infectar células quiescentes e não-quiescentes. Além disso, como discutido no texto, anteriormente, o gene NFAT1 regula positivamente a expressão de diversos genes indutores de apoptose e inibe genes essenciais para progressão do ciclo celular. Junto a isso, pretendemos utilizar a forma constitutivamente ativa do NFAT1 já que ela não necessita da ativação da fosfatase calcineurina pela célula tumoral, facilitando a ação do NFAT1 na célula-alvo. O CA-NFAT1 é capaz de cooperar com a via de Ras-Raf-MEK-ERK para induzir apoptose em fibroblastos. A apoptose é um dos principais mecanismos celulares de supressão tumoral presente em metazoários. A via de sinalização de Ras-Raf-MEK-ERK tem grande importância no surgimento e manutenção do tumor e suas proteínas mediadoras são alvo de estudo para diversas terapias. No entanto, grande parte das drogas desenvolvidas para inibir essas proteínas são altamente tóxicas e muitas vezes ineficazes devido à existência de múltiplas vias de sinalização redundantes em células tumorais. Portanto, nossa hipótese é de que o CA-NFAT1 pode induzir apoptose em células tumorais, possivelmente, em cooperação com a via de Ras-Raf-MEK-ERK.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Principal**

Avaliar o papel do domínio de transativação C-terminal (TAD-C) na morte celular induzida pelo CA-NFAT1 e avaliar se o CA-NFAT1 pode ser aplicado na terapia gênica para o tratamento de tumores.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar a morte celular induzida por CA-NFAT1.
- Mapear as regiões do domínio de transativação C-terminal (TAD-C) que são essenciais para a morte celular induzida pelo CA-NFAT1.
- Avaliar a capacidade do CA-NFAT1 de induzir morte celular em linhagens tumorais.
- Avaliar a expressão de genes relacionados à apoptose em linhagens tumorais expressando CA-NFAT1.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultura de Células**

As culturas de células das linhagens NIH3T3, NIH3T3 H-RasV12, EcoPack B2, 293A, MDA-MB-231 e B16F10 foram mantidas em meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), NaHCO<sub>3</sub> (40 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 mM), piruvato de sódio (1 mM), solução de vitaminas MEM 1x, solução de aminoácidos MEM essenciais e não-essenciais 1x, L-glutamina (2 mM), β-mercaptoetanol (55 μM), HEPES (10 mM), penicilina (100.000 U/L) e estreptomicina (100 mg/L) (todos Gibco, Carlsbad, CA). As culturas de NIH3T3 H-RasV12 foram mantidas sobre pressão do antibiótico de seleção (7,5 μg/ml de Puromicina) com o intuito de preservar a expressão do gene H-RasV12. As culturas de células das linhagens 4T1, HCT116 e LoVo foram mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com piruvato de sódio (1 mM), L-glutamina (2 mM), β-mercaptoetanol (55 μM), penicilina (100.000 U/L) e estreptomicina (100 mg/L) (todos Gibco). As culturas da linhagem HME1 foram mantidas em meio MCDB131, suplementado com extrato pituitário bovino (30 ng/mL), 1% de soro fetal bovino, holotransferrina (50 μg/mL), fator de crescimento epidermal humano (10 ng/mL), hidrocortisona (0,5 μg/mL), insulina (5 μg/mL), L-glutamina (2 mM), penicilina (100.000 U/L) e estreptomicina (100 mg/L). Todas as culturas de células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.2 Construção dos plasmídeos**

O vetor retroviral utilizado para expressar CA-NFAT1, CA-NFAT2, a quimera CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 e cada uma das construções baseadas no CA-NFAT1 foi o pLIREs-EGFP, derivado do vírus de leucemia murina de Moloney (MMLV) (Robbs

*et al.*, 2008). Este vetor possui uma entrada interna de ribossomo (IRES) permitindo a expressão do gene de interesse e do gene repórter EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) em um mRNA bicistrônico. Os plasmídeos pLIRES-EGFP, pLIRES-EGFP-CA-NFAT1, pLIRES-EGFP-CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927 (pLIRES-EGFP-CA-NFAT1 $\Delta$ C) e pLIRES-EGFP-CA-NFAT2/ $\alpha$  já foram previamente descritos (Teixeira *et al.*, 2005; Robbs *et al.*, 2008). Para clonar as construções CA-NFAT1 $\Delta$ 759-927, CA-NFAT1 $\Delta$ 819-927 e CA-NFAT1 $\Delta$ 889-927 no vetor retroviral pLIRES-EGFP, nós amplificamos porções do CA-NFAT1 por PCR (até os aminoácidos 758, 818 e 888, respectivamente) utilizando um *primer* antissenso adaptado com um sítio de restrição para EcoRV. Estes produtos de PCR foram clivados com XhoI e EcoRV e inseridos no pLIRES-EGFP-CA-NFAT1 entre os sítios de XhoI e NruI. Estas construções foram feitas utilizando o pLIRES-EGFP-CA-NFAT1 como arcabouço para manter o sinal de localização nuclear do antígeno T do SV40 localizado no C-terminal. As construções CA-NFAT1 $\Delta$ 699-758, CA-NFAT1 $\Delta$ 699-818, CA-NFAT1 $\Delta$ 699-888 e CA-NFAT1 $\Delta$ 735-850 foram construídas inserindo um sítio de HpaI dentro do CA-NFAT1 em dois pontos de interesse, correspondente às posições dos aminoácidos indicados nos seus nomes, utilizando o sistema de Mutagênese Sítio-Dirigida *GeneTailor* (Invitrogen, Waltham, MA). Em seguida, o CA-NFAT1 mutado foi clivado com HpaI e ligado, removendo assim os resíduos de aminoácidos localizados entre os sítios de HpaI. Para construir os plasmídeos pLIRES-EGFP-CA-NFAT1DD699-850 e pLIRES-EGFP-CA-NFAT1DD699-735, inserimos, primeiramente, um sítio de restrição de AgeI no CA-NFAT1 logo após o seu DBD, utilizando o sistema de Mutagênese Sítio-Dirigida *GeneTailor* (Invitrogen), construindo o vetor pLIRES-EGFP-CA-NFAT1mutAgeI. A seguir, nós amplificamos por PCR as regiões do NFAT1 TAD-C de interesse utilizando *primers* senso e antissenso adaptados com sítios de restrição para as enzimas AgeI e EcoRV,

respectivamente. Os produtos de PCR foram clivados com Agel e EcoRV e inseridos no vetor pLIREs-EGFP-CA-NFAT1mutAgel entre os sítios de Agel e NruI. A quimera CA-NFAT2-TAD-C-CA-NFAT1 foi construída em duas etapas. Primeiramente, o cDNA do NFAT1 TAD-C foi amplificado por PCR utilizando como molde o pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 e um *primer* senso adaptado com um sítio de XhoI e clonado no vetor pLIREs-EGFP, construindo pLIREs-EGFP-NFAT1-TAD-C. Em seguida, o cDNA do CA-NFAT2 foi amplificado por PCR até o fim do seu DBD utilizando como molde o pLIREs-EGFP-CA-NFAT2/ $\alpha$  e um *primer* antissenso adaptado com um sítio de XhoI e clonado *in-frame* no pLIREs-EGFP-NFAT1-TAD-C, construindo o pLIREs-EGFP-CANFAT2-TAD-C-NFAT1. O vetor adenoviral utilizado para expressar CA-NFAT1 é o pAdEasy-1 derivado do adenovírus sorotipo 5 (He *et al.*, 1998). Para clonar o cDNA do CA-NFAT1 neste vetor adenoviral, é necessário, primeiramente, clonar o seu transgene no vetor pAdTRACK-CMV, este vetor possui dois promotores CMV, cada um regulando o gene de interesse e o gene repórter EGFP, separadamente (He *et al.*, 1998). Para tal fim, o cDNA do CA-NFAT1 foi amplificado por PCR utilizando *primers* senso e antissenso adaptados com os sítios de EcoRV e Sall, respectivamente. Em seguida, este produto de PCR foi clivado com as enzimas de restrição EcoRV e Sall, e subclonado no vetor pAdTRACK-CMV entre os sítios BglII (tratado com a enzima Klenow) e Sall, construindo o pAdTRACK-CMV-CA-NFAT1. Em seguida, o vetor pAdTRACK-CMV-CA-NFAT1 foi transfectado nas bactérias AdEasier-1 (He *et al.*, 1998) com o intuito de promover a recombinação entre o vetor pAdEasy-1 e o pAdTRACK-CMV-CA-NFAT1, seguindo as recomendações do protocolo cedido pelo Dr. Bert Vogelstein disponível no *website* [www.addgene.org](http://www.addgene.org). A partir desta recombinação, foi gerado o pAdCA-NFAT1, o vetor adenoviral carreando o transgene do CA-NFAT1. O mesmo procedimento de

recombinação foi feito para recombinar o pAdTRACK-CMV e o pAdEasy-1 e gerar o vetor adenoviral carreando somente o gene repórter EGFP (pAdEGFP).

Todas as construções aqui descritas foram confirmadas por mapeamento de sítio de restrição e sequenciamento. Todas as sequências de *primers* estão disponíveis mediante solicitação.

### **3.3 Produção de retrovírus recombinantes e transdução de células alvo**

A linhagem celular EcoPack2 B2 ecotrófica, um clone selecionado a partir de células da linhagem Ecopack2 (BD-Biosciences, San Jose, CA), foi utilizada como célula empacotadora dos retrovírus. As células foram transfectadas com o plasmídeo retroviral de forma transiente por fosfato de cálcio, segundo o protocolo descrito abaixo.

Dia 1: As células EcoPack2 B2 foram cultivadas em placas de Petri de 10cm de diâmetro contendo 10ml de meio de cultura ( $4 \times 10^6$  células/placa).

Dia 2: As células EcoPack2 B2 foram transfectadas com o DNA do plasmídeo retroviral purificado por coluna de Maxi-Prep (Qiagen, West Sussex, Reino Unido). O DNA plasmidial foi precipitado misturando-se: 20µg de DNA; 250µl de salina tamponada com HEPES 2x (HBS2x - 280mM NaCl; 10mM KCl; 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 12mM dextrose; 50mM HEPES; pH 7,1); e 50µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5M; em um volume final de 500µl. A seguir, a mistura foi feita avidamente por borbulhamento e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, o precipitado (500µl) foi adicionado às células empacotadoras.

Dia 3: As células empacotadoras transfectadas foram lavadas duas vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) e adicionadas de 5ml de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone, Logan, UT). Neste

mesmo dia, as células alvo NIH3T3 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $2,5 \times 10^4$  células/poço).

Dia 4: O sobrenadante das células empacotadoras contendo o vírus foi recolhido; centrifugado por 5 minutos a 500G para retirada de eventuais células soltas e fragmentos celulares. O sobrenadante contendo as partículas virais foi suplementado com  $8 \mu\text{g/ml}$  de polibreno (Fluka Chemie, Buchs, Suíça). Em seguida, o sobrenadante foi adicionado em conjunto com meio DMEM novo (na proporção de 1:1) às células alvo, que foram então centrifugadas duas vezes a 400G por 45 minutos com intervalo de 90 minutos entre as centrifugações.

Dia 5: As células alvo (NIH3T3) foram soltas da placa por tripsinização e o percentual de transdução analisado por citometria de fluxo, pelo percentual de células EGFP positivas.

### **3.4 Produção de adenovírus recombinantes e transdução de células-alvo**

A linhagem celular 293A (Life Technologies, Carlsbad, CA) foi utilizada como célula produtora das partículas adenovirais. As células foram transfectadas com o plasmídeo adenoviral de forma transiente por fosfato de cálcio, segundo o protocolo descrito abaixo.

Dia 1: As células 293A foram cultivadas em placas de Petri de 10cm de diâmetro contendo 10ml de meio de cultura ( $3,5 \times 10^6$  células/placa). O vetor adenoviral ( $20 \mu\text{g}$ ) foi digerido com a enzima de restrição Pacl.

Dia 2: As células 293A foram transfectadas com o DNA do plasmídeo adenoviral purificado e clivado com enzima Pacl. O DNA plasmidial foi precipitado misturando-se:  $20 \mu\text{g}$  de DNA;  $250 \mu\text{l}$  de HBS 2x; e  $50 \mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2,5M; em um volume final de  $500 \mu\text{l}$ . A seguir, a mistura foi feita avidamente por borbulhamento e incubada em

temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, o precipitado (500µl) foi adicionado às células empacotadoras.

Dia 3: As células produtoras transfectadas foram lavadas duas vezes com PBS.

Dia 9: Novas células 293A foram cultivadas em placas de Petri de 10cm de diâmetro contendo 10ml de meio de cultura ( $3,5 \times 10^6$  células/placa).

Dia 10: As células 293A do "dia 1" foram soltas da placa com auxílio de um pequeno rodo de borracha. Em seguida, estas células foram submetidas a uma centrifugação por 5 minutos a 500G e ressuspensas em 4ml de meio de cultura sem soro. Então, esta suspensão de células foi submetida a quatro ciclos de choque térmico para promover a lise da membrana plasmática e consequente liberação das partículas adenovirais. Cada ciclo de choque térmico consiste em um resfriamento em nitrogênio líquido por 1 minuto, seguido por um aquecimento em banho-maria a 37°C até o preparado viral derreter e, por fim, este mesmo preparado é agitado vigorosamente (*vortex*). Após a lise por choque térmico, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500G e o sobrenadante recolhido. A seguir, 2ml do sobrenadante recolhido é adicionado ao meio de cultura das células 293A cultivadas no "dia 9", para amplificar a produção de partículas adenovirais.

Dia 13: As células 293A do "dia 9" foram soltas da placa com auxílio de um pequeno rodo de borracha. Em seguida, estas células foram submetidas a uma centrifugação por 5 minutos a 500G e ressuspensas em 4ml de meio sem soro. Então, esta suspensão de células foi submetida a quatro ciclos de choque térmico para promover a lise da membrana plasmática e consequente liberação das partículas adenovirais. Após a lise por choque térmico, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500G e o sobrenadante recolhido. Este sobrenadante recolhido contém as partículas adenovirais. A suspensão de partículas adenovirais pode ser utilizada

imediatamente para infecção de células alvo, bastando adicionar ao meio de cultura da célula alvo, ou conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

Para produção de um alto título adenoviral,  $6,5 \times 10^6$  células 293A foram cultivadas em uma garrafa de  $150 \text{ cm}^2$ , em um total de 10 garrafas. Após 24 horas de cultivo, as células 293A foram infectadas com a partícula adenoviral que se deseja purificar (MOI 1-10), e após mais 40 horas de cultivo, as células foram recolhidas e o adenovírus purificado utilizando o Adeno-X Purification Kit (Clontech, Mountain View, CA) seguindo as recomendações do fabricante.

Para realização dos ensaios, as culturas das células-alvo foram transduzidas, após 24 horas de cultivo, ao adicionar as partículas adenovirais à cultura contendo um volume de meio sem soro suficiente para cobrir o fundo da placa (40ul para placa de 96 poços; 200ul para placa de 24 poços) e incubadas por 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após esse tempo, foi adicionado 5 vezes o volume de meio com soro às culturas. Para transdução das linhagens de NIH3T3 H-RasV12 e B16F10 com AdCANFAT1, as partículas adenovirais foram pré-incubadas por 100 minutos com 6ug/ml e 1ug/ml de poli-lisina D, respectivamente (Orlicky e Schaack, 2001).

### **3.5 Transfecção por cloreto de cálcio**

As células EcoPack2 B2 ou 293A foram cultivadas em placas de 6 poços contendo 2ml de meio de cultura ( $2 \times 10^5$  células/placa), por 24 horas. Em seguida, as células foram transfectadas com o DNA plasmidial purificado por coluna de Maxi-Prep (Qiagen). O DNA plasmidial foi precipitado misturando-se: 7 $\mu\text{g}$  de DNA; 100 $\mu\text{l}$  de HBS2X; e 20 $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2,5M; em um volume final de 200 $\mu\text{l}$ . A seguir, a mistura foi feita avidamente por borbulhamento e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, o precipitado de DNA plasmidial (200 $\mu\text{l}$ ) foi adicionado às células empacotadoras.

### **3.6 Ensaios de proliferação celular**

Células NIH3T3 transduzidas com vetor vazio ou com vetores contendo os cDNAs dos NFATs foram utilizadas para os ensaios de proliferação celular. As células foram cultivadas em triplicata em placas de 96 poços ( $8 \times 10^3$  células/poço). Em diferentes tempos após a infecção retroviral o estado de proliferação foi avaliado por incorporação por cristal violeta. Para isto, as células foram fixadas com etanol 100% por 10 minutos, coradas com 0,05% de cristal violeta em 20% de etanol por 10 minutos e lavadas 2 vezes com água destilada, posteriormente o cristal violeta incorporado foi ressolubilizado com metanol 100% por 5 minutos. A absorbância da placa foi acessada no comprimento de onda de 595nm em um espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale,CA).

### **3.7 Análise de ciclo celular e conteúdo de DNA Sub-G0**

Células NIH3T3 transduzidas com vetor retroviral vazio ou com vetores retrovirais expressando as construções NFAT foram cultivadas em subconflência ou confluência ( $2,4 \times 10^4$  células/poço da placa de 6 poços;  $10^5$  células/poço da placa de 12 poços) para análise do ciclo celular e do conteúdo sub-G0, respectivamente. Nos dias indicados, as células foram tripsinizadas e lavadas uma vez com PBS. A seguir, as células foram coradas com iodeto de propídio ( $75 \mu\text{M}$ ) na presença do detergente NP-40.

Para as análises de conteúdo de DNA sub-G0 utilizando os vetores adenovirais,  $5 \times 10^3$  células NIH3T3 H-RasV12 foram cultivadas em placas de 96 poços. As linhagens 4T1, B16F10, HME1, MDA-MB-231, HCT116, LoVo foram cultivadas em placas de 24 poços, nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^4$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10^5$  e  $10^5$  células por poço, respectivamente. As culturas destas células foram



marcadas com iodeto de propídio (75 $\mu$ M) na presença do detergente NP-40 e analisadas por citometria de fluxo no tempos indicados após a adição do adenovírus.

O conteúdo de DNA foi determinado coletando 10.000 eventos para ciclo celular e 15.000 para análise do conteúdo de DNA sub-G0. As fases do ciclo celular e a proporção de células com conteúdo de DNA sub-G0 foram determinadas utilizando o programa CELLQuest (BD Biosciences).

### **3.8 Análise da formação de núcleos picnóticos**

Células NIH3T3 infectadas com os vetores retrovirais foram fixadas com 4% de paraformaldeído em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com tampão de lavagem (PBS 1x; 0,5% de NP40; 5% de SFB) para permeabilização da membrana. Posteriormente, as células foram incubadas com DAPI (300nM) por 1 minuto e visualizadas em um microscópio de fluorescência Olympus BX60, as células representativas foram fotografadas.

### **3.9 Análise de exposição de fosfatidilserina**

Células NIH3T3 transduzidas com vetor vazio ou com os vetores contendo os cDNAs dos NFAT foram cultivadas em confluência (10<sup>5</sup> células/poço da placa de 12 poços). Após 24 horas, as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS e marcadas com Anexina-V conjugada a APC e iodeto de propídio, segundo o protocolo do fabricante (BD Biosciences), e analisadas por citometria de fluxo.

### **3.10 Análise por *Western Blot***

Proteína total foi obtida a partir da lise celular de 4x10<sup>5</sup> células NIH3T3 ou de 3x10<sup>5</sup> células 293A em um tampão contendo 40mM de Tris-Cl pH 7,5, 10mM de EDTA, 60mM de pirofosfato de sódio e 5% de SDS. Em seguida, esse extrato de

proteínas foi aquecido por 15 minutos a 100°C e separado por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 4-10%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando o sistema de transferência *Trans-Blot Semi-Dry electrophoretic transfer cell* (BioRad, Hercules, CA) seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com salina tampão Tris (TBS; 10mM de Tris-Cl, 150mM de NaCl, pH 7,4) com 5% de leite desnatado por 2 horas. A seguir, a membrana foi lavada com TBS-T (TBS adicionado de 0,05% de Tween) e incubada nesse mesmo tampão por duas horas com anticorpo primário (67.1, anticorpo policlonal anti-NFAT1 (Ho *et al.*, 1994) – reconhece a região N-terminal do NFAT1; T2B1, anticorpo policlonal anti-NFAT1 (Wang *et al.*, 1995) – reconhece a região C-terminal do NFAT1/C; 7A6, anticorpo monoclonal anti-NFAT2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX); 6C5, anticorpo monoclonal anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology); ab8227, anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -actina (Abcam)). Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T e incubada por uma hora com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Em seguida, a membrana foi lavada seis vezes com TBS-T e reveladas com substrato da peroxidase utilizando o sistema “ECL Western blotting reagent” (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), seguindo as recomendações do fabricante.

### **3.11 Imunolocalização do NFAT**

Células NIH3T3 transduzidas com vetores retrovirais foram fixadas com 4% de paraformaldeído em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, as células foram permeabilizadas e sítios não específicos foram bloqueados com tampão de lavagem (PBS 1x; 0,5% de NP40; 5% de SFB) em diversas incubações de 5 minutos. Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo contra NFAT1 (67.1, anticorpo policlonal anti-NFAT1 –

reconhece a região N-terminal do NFAT1) em tampão de lavagem. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas com o anticorpo anti-IgG de coelho marcado com rodamina (KPL, Gaithersbur, MD) por 30 minutos e com DAPI (300nM) por 1 minuto. As células foram visualizadas em um microscópio de fluorescência Olympus BX60 e células representativas foram fotografadas.

### 3.12 Ensaio de Transativação

Células T Jurkat ( $2 \times 10^6$  células/600 $\mu$ l) foram eletroporadas (950 $\mu$ F, 250V) em cubetas de 0,4cm (*GenePulser Cuvette*; BioRad) no eletroporador GenePulser II (BioRad). As células foram cotransfectadas com três plasmídeos diferentes em meio sem SFB como descrito a seguir: (1) o plasmídeo retroviral indicado (10 $\mu$ g), (2) o plasmídeo repórter pGL4.30 (2 $\mu$ g) (Promega, Madison, WI), e o plasmídeo de expressão da *Renilla* (0,2 $\mu$ g) (pRL-TK, Promega) para normalização. Após 24 horas da transfecção, as células foram recolhidas e lisadas por 15 minutos em temperatura ambiente com 50 $\mu$ l do reagente de lise (*Dual-Luciferase Reporter Assay System*, Promega). O extrato resultante (20 $\mu$ l) foi adicionado a 30 $\mu$ l do substrato de luciferase (*Dual-Luciferase Reporter Assay System*, Promega) e a atividade da luciferase foi medida em um luminômetro de microplacas Veritas (Turner Biosystems). A seguir, a reação de oxidação do substrato da luciferase foi interrompida para medição da atividade de *Renilla* pela adição do seu substrato diluído no tampão *Stop & Glo* (*Dual-Luciferase Reporter Assay System*, Promega). A atividade de luciferase foi expressa em unidades relativas de luz (RLU) e normalizada pela atividade de *Renilla*.

### 3.13 RT-PCR e PCR em tempo real

Para análise da expressão dos genes TNF, TRAF1 e TNFSF10 (TRAIL), RNA total foi extraído das linhagens celulares testadas utilizando o kit RNeasy (Qiagen). A seguir, 1 µg de RNA total purificado foi tratado com DNase I (Thermo Scientific, Waltham, MA), seguindo as recomendações do fabricante. Após esta etapa, o cDNA foi sintetizado utilizando *primers* randômicos (Invitrogen) e o kit de RT-PCR ImProm-II (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

A reação de PCR em tempo real foi feita utilizando o SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) em combinação com os *primers* listados abaixo (Tabela 3.1), na concentração de 250 nM, e 2 µl de amostra resultante da reação de RT-PCR, seguindo as instruções do fabricante.

Para análise de expressão gênica das células murinas, B16F10 e NIH3T3 H-RasV12, a reação de PCR em tempo real foi feita utilizando o kit de *superarray* PAMM-012 da SABiosciences (Frederick, MD) para 84 genes envolvidos com apoptose. As reações foram feitas utilizando os reagentes fornecidos pelo fabricante e seguindo as suas recomendações. As análises de todos os PCRs em tempo real foram realizadas pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

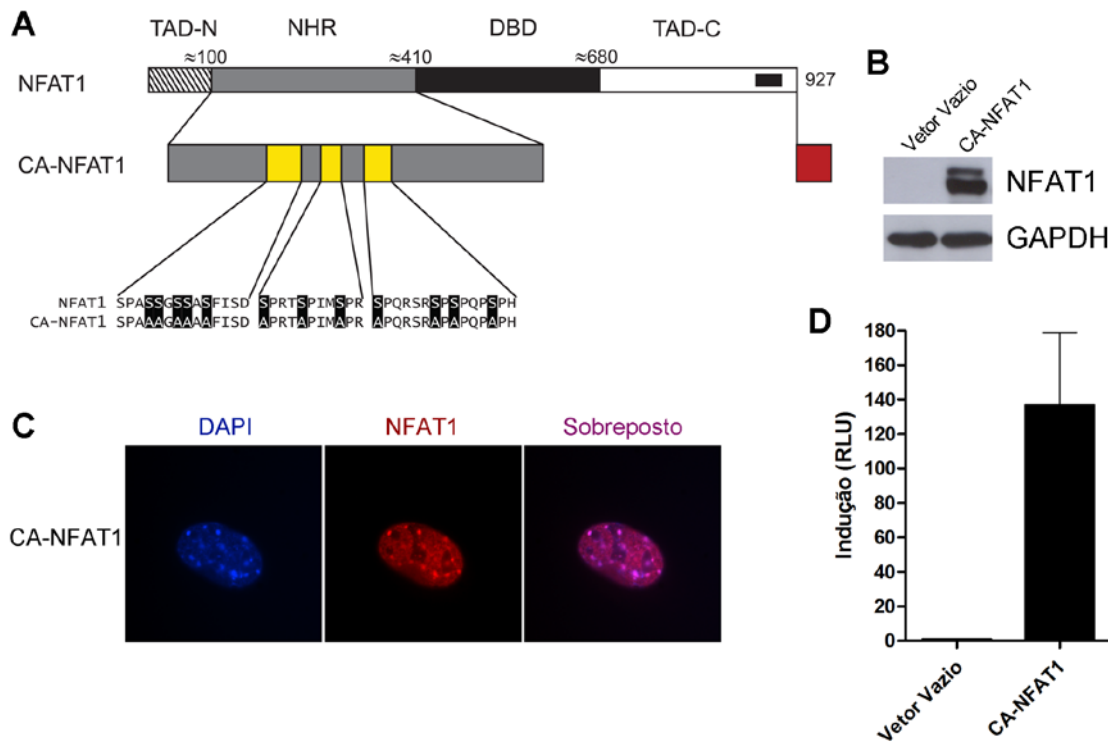
**Tabela 3.1. Lista dos *primers* utilizados na reação de PCR em tempo real.**

<b>Gene</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
TNF <i>H. Sapiens</i>	Senso	5' CAG CCT CTT CTC CTT CCT GA 3'
	Antissenso	5' AGA TGA TCT GAC TGC CTG GG 3'
TRAF1 <i>H. Sapiens</i>	Senso	5' TCT ATA AGC CCA GGA AGC CGT C 3'
	Antissenso	5' GCT TCC CTT GAA GGA GCA GC 3'
TNFSF10 (TRAIL) <i>H. Sapiens</i>	Senso	5' CTG CAG TCT CTC TGT GTG G 3'
	Antissenso	5' TTG GGG TCC CAA TAA CTG TC 3'
TBP <i>H. Sapiens</i>	Senso	5' ACA ACA GCC TGC CAC CTT AC 3'
	Antissenso	5' GTT CTG AAT AGG CTG TGG GG 3'
PGK1 <i>H. Sapiens</i>	Senso	5' CAA GCT GGA CGT TAA AGG GA 3'
	Antissenso	5' CTT GGG ACA GCA GCC TTA AT 3'

## 4. RESULTADOS

### 4.1 A Expressão de CA-NFAT1 Induz Apoptose em Fibroblastos NIH3T3

Com o intuito de estudar o papel do domínio de transativação C-terminal (TAD-C) do NFAT1 na indução de morte celular via NFAT1, nós utilizamos a forma constitutivamente ativa da isoforma C do NFAT1 (CA-NFAT1), previamente descrita (Okamura *et al.*, 2000; Robbs *et al.*, 2008). O CA-NFAT1 possui diversas mutações de resíduos de serina para alanina na NHR que previnem sua fosforilação e consequente inativação (Figura 4.1A). A análise de expressão demonstrou que o CA-NFAT1 é expresso em altos níveis, está restrito ao núcleo e é capaz de transativar um promotor responsivo a NFAT em um ensaio de gene repórter luciferase (Figuras 4.1B, 4.1C e 4.1D), permitindo a análise dos fenótipos induzidos pela expressão de CA-NFAT1 na ausência de estímulos externos. A transdução retroviral foi, primeiramente, utilizada para induzir a expressão de CA-NFAT1 em células NIH3T3. A linhagem NIH3T3 foi utilizada como modelo por ser uma linhagem não transformada e não expressar nenhuma das variantes de NFAT1. Nós confirmamos que mais de 80% das células eram, regularmente, transduzidas por citometria de fluxo, avaliando a quantidade de células positivas para a proteína repórter EGFP (dados não mostrados).

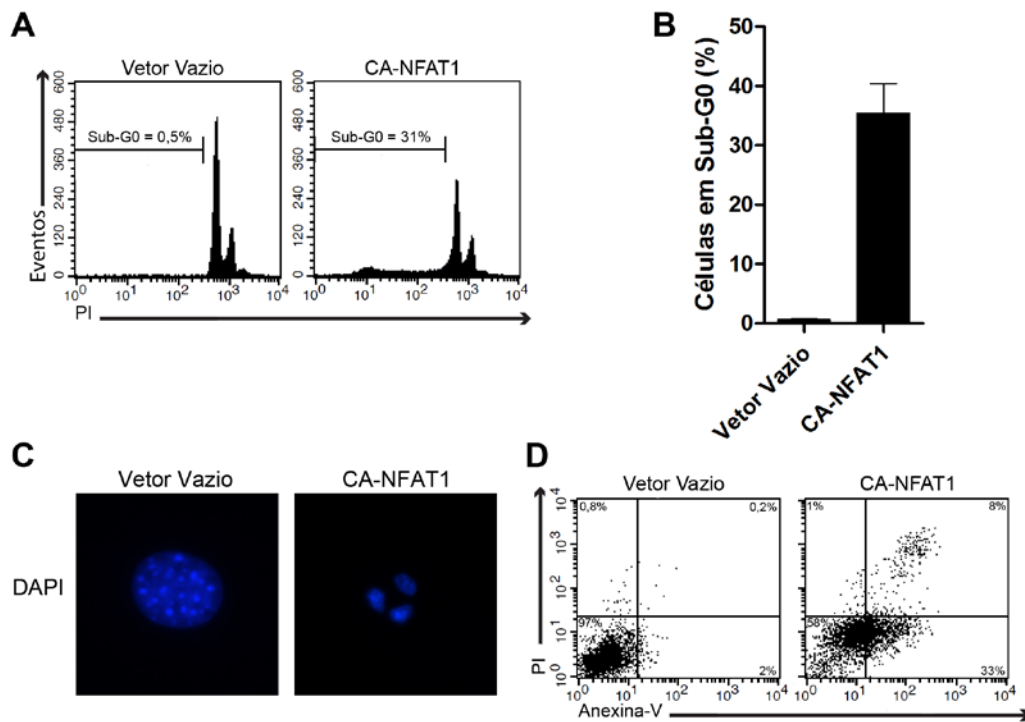


**Figura 4.1.** A forma constitutivamente ativa do NFAT1 é expressa em altos níveis, está localizada especificamente no núcleo e é capaz de transativar um promotor responsivo a NFAT. **(A)** Representação esquemática da estrutura primária do CA-NFAT1. A barra hachurada representa o TAD-N, a barra cinza representa a NHR, a barra preta representa o DBD, a barra branca representa o TAD-C e a barra vermelha representa o sinal de localização nuclear (NLS) do antígeno T do SV40. **(B)** Proteína total de  $4 \times 10^5$  células NIH3T3 transduzidas com vetor vazio ou vetor retroviral expressando CA-NFAT1 foi obtida para análise do nível expressão de CA-NFAT1 por *Western Blot*. **(C)** Análise da sublocalização celular do CA-NFAT1 em células NIH3T3 por microscopia de fluorescência. **(D)** Ensaio de transativação realizado em células Jurkat para avaliar a capacidade de transativação do CA-NFAT1 em um promotor responsivo a NFAT.

O NFAT1 já foi descrito por induzir a expressão de diversos genes proapoptóticos (Mccaffrey *et al.*, 1994; Latinis *et al.*, 1997; Youn *et al.*, 2000). Portanto, nós decidimos avaliar a presença de características de células apoptóticas nos fibroblastos NIH3T3 expressando CA-NFAT1. Para caracterizar o tipo de morte celular induzida pelo NFAT1, células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio (controle) ou vetor retroviral expressando CA-NFAT1, e primeiramente avaliadas para o percentual de células com conteúdo de DNA sub-G0, como indicativo de fragmentação de DNA. Como mostrado nas Figuras 4.2A e 4.2B, as culturas de

células transduzidas com o vetor vazio apresentaram um baixo percentual de células com conteúdo de DNA sub-G0. Por outro lado, após 48 horas de cultivo, aproximadamente 30% das células expressando CA-NFAT1 possuíam conteúdo de DNA sub-G0 (Figuras 4.2A e 4.2B), sugerindo que a expressão de CA-NFAT1 induz apoptose em células NIH3T3. Com o objetivo de melhor caracterizar o fenótipo induzido pela expressão de CA-NFAT1, nós analisamos a formação de núcleos picnóticos, outro indicador de apoptose. Corroborando os resultados anteriores, nós observamos formação de núcleo picnóticos nas células NIH3T3 expressando CA-NFAT1, enquanto as células controle não apresentaram núcleos picnóticos quando observadas por microscopia de fluorescência (Figura 4.2C). Além disso, a expressão de CA-NFAT1 nas células NIH3T3 resultou no aumento da exposição de fosfatidilserina, outra característica clássica de células apoptóticas (Figura 4.2D). Aproximadamente 33% das células expressando CA-NFAT1 estavam positivas para anexina-V e negativas para o marcador de permeabilização, iodeto de propídio, após 24 horas de cultivo (Figura 4.2D). Em contraste, um baixo percentual de células transduzidas com o vetor vazio marcou positivamente para anexina-V (Figura 4.2D). Em conjunto, estes resultados indicam que a expressão de CA-NFAT1 induz apoptose em fibroblastos NIH3T3.



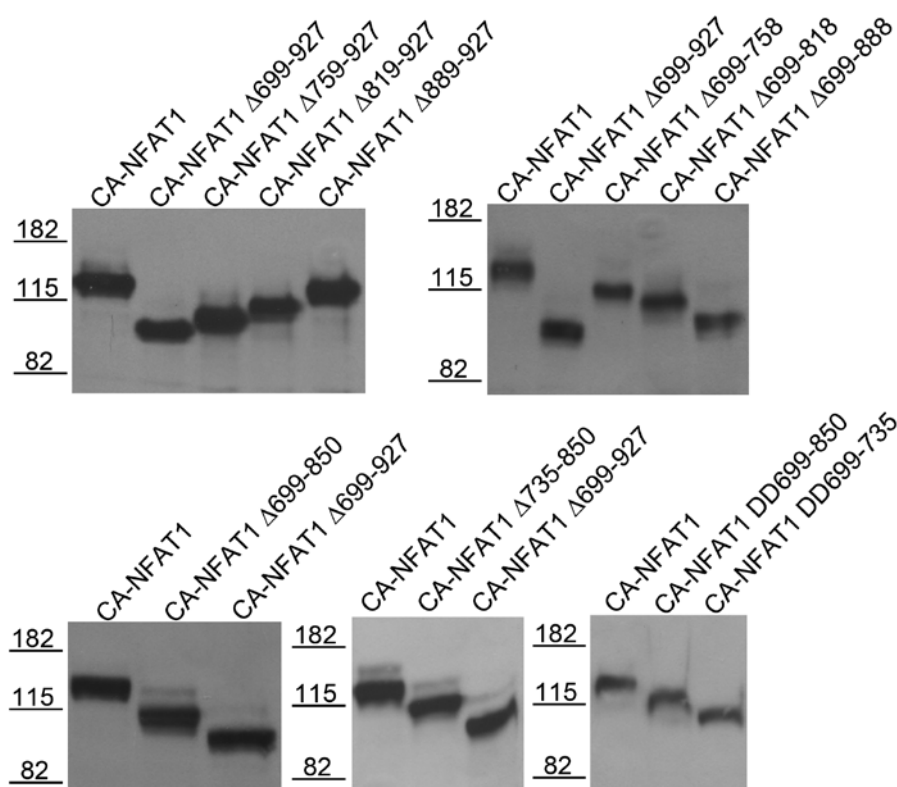


**Figura 4.2. Células NIH3T3 expressando CA-NFAT1 sofrem apoptose.** Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou vetor expressando CA-NFAT1 e submetidas a ensaios para avaliar morte celular. **(A, B)** Células NIH3T3 foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Análise de morte celular realizada após 48 horas de cultivo. O percentual de células em sub-G0 está indicado no gráfico. **(B)** O gráfico mostra a média do percentual de células em sub-G0 obtidos de três experimentos independentes. **(C)** Análise de formação de núcleos picnóticos por marcação com DAPI. As células foram marcadas após 48 horas de cultivo e visualizadas por microscopia de fluorescência. **(D)** Análise da exposição de fosfatidilserina após 24 horas de cultivo. As células foram marcadas com anexina-V e iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo.

## 4.2 A Retirada dos Resíduos de Aminoácidos 699 a 850 do TAD-C do NFAT1 Abole a Apoptose Induzida pelo CA-NFAT1

Os domínios de transativação das proteínas NFAT não são bem conservados entre os membros desta família de fatores de transcrição (Rao *et al.*, 1997). O domínio de transativação C-terminal do NFAT1 (NFAT1 TAD-C) já foi descrito por ser responsável por algumas das diferenças na regulação gênica entre os diferentes membros da família NFAT (Youn *et al.*, 2000; Kaminuma *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2011). Nosso grupo já demonstrou que a capacidade de induzir morte celular do CA-NFAT1 é dependente do seu TAD-C (Robbs *et al.*, 2008), no entanto, não se

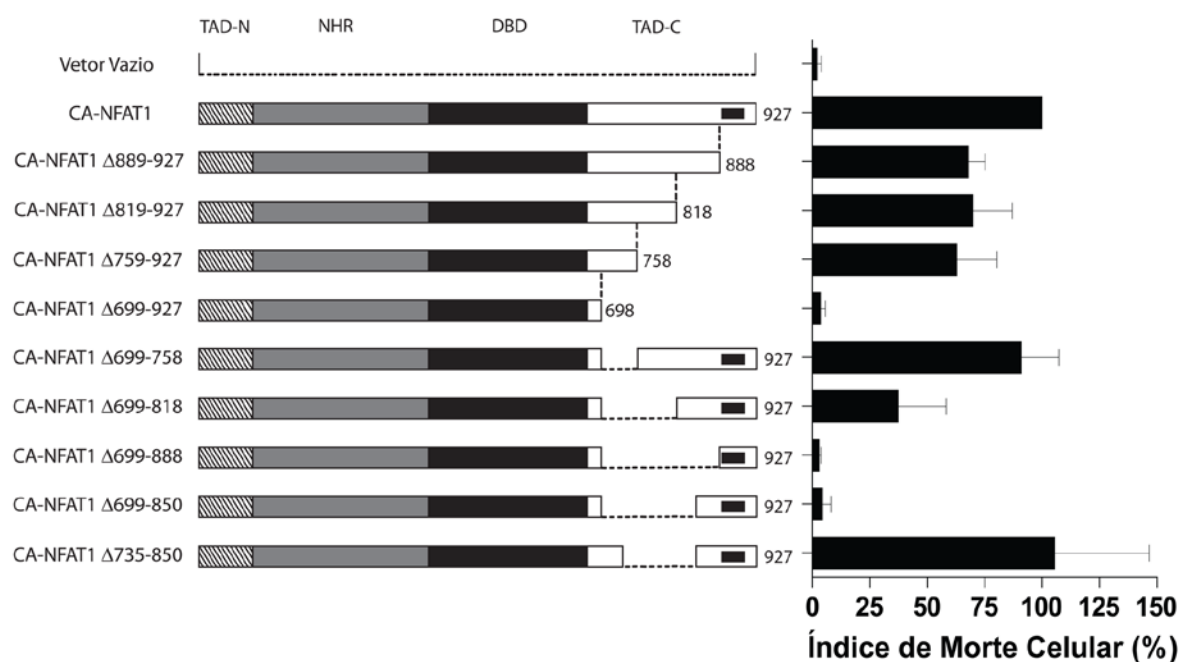
sabe quais aminoácidos do TAD-C são, realmente, necessários para indução de apoptose via CA-NFAT1. Para melhor entender o papel do TAD-C na apoptose induzida pelo NFAT1, nós mapeamos os resíduos de aminoácidos do TAD-C necessários pelo NFAT1 para induzir apoptose. Para este propósito, nós construímos diversas proteínas CA-NFAT1 truncadas que não possuem diferentes regiões do NFAT1 TAD-C. As proteínas CA-NFAT1 truncadas foram nomeadas de acordo com os resíduos de aminoácidos removidos. Todas as proteínas CA-NFAT1 truncadas apresentaram níveis similares de expressão e peso molecular esperado (Figura 4.3).



**Figura 4.3. Todas as proteínas CA-NFAT1 truncadas apresentam níveis de expressão similares e o peso molecular esperado.** Proteína total de  $4 \times 10^5$  células NIH3T3 transduzidas foi obtida para análise do nível expressão de cada proteína CA-NFAT1 truncada por *Western Blot*.

Para avaliar a capacidade dessas proteínas CA-NFAT1 truncadas de induzirem apoptose, nós realizamos a análise do conteúdo de DNA sub-G0 das células NIH3T3 expressando cada uma das construções. Primeiramente,

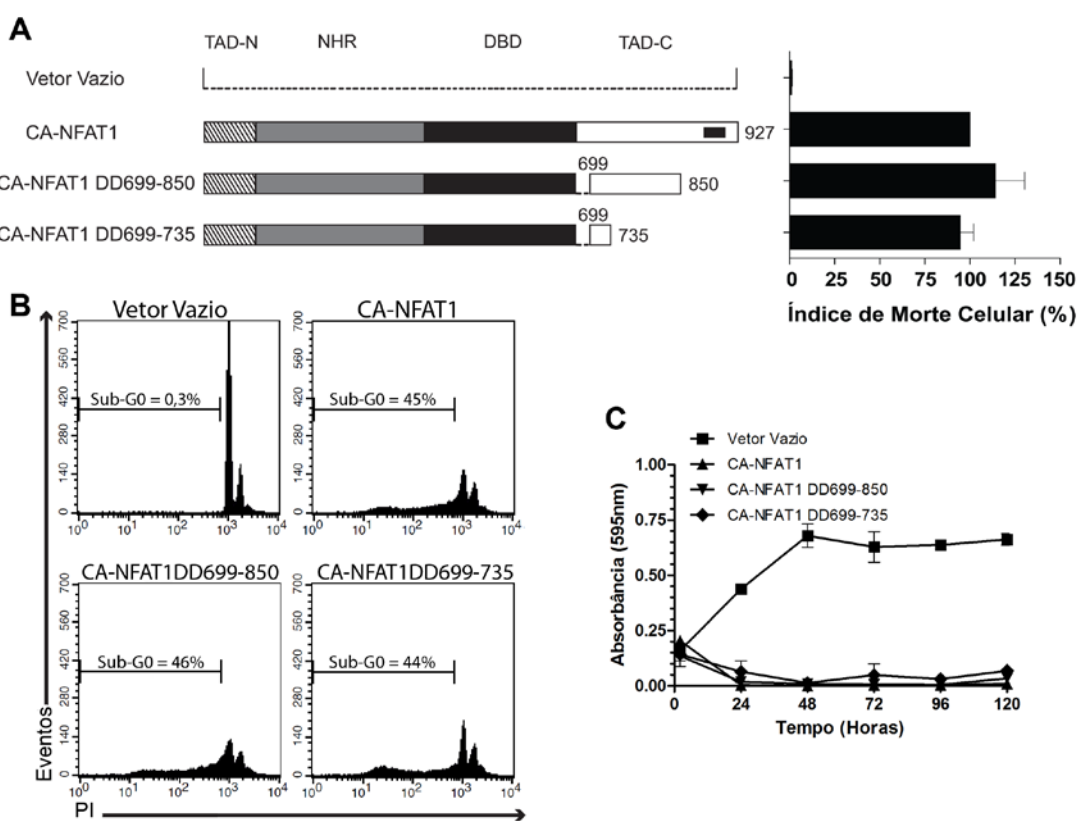
observamos que a proteína CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927, que não possui o TAD-C, perdeu completamente a capacidade de induzir apoptose, ao contrário da proteína CA-NFAT1 completa, indicando que o NFAT1 TAD-C é essencial para indução de apoptose pelo CA-NFAT1 no nosso modelo (Figura 4.4). Por outro lado, a proteína CA-NFAT1 $\Delta$ 759-927 induziu apoptose, de forma similar ao CA-NFAT1, indicando que os resíduos de aminoácidos necessários para indução de apoptose via CA-NFAT1 estão entre os aminoácidos 699 e 758 (Figura 4.4). Entretanto, a proteína truncada CA-NFAT1 $\Delta$ 699-758, que não possui os aminoácidos 699 a 758, ainda foi capaz de induzir apoptose, sugerindo a existência de mais de uma região do NFAT1 TAD-C que pode desempenhar um papel na apoptose induzida pelo CA-NFAT1 (Figura 4.4). Esta hipótese foi sustentada pelos fenótipos induzidos pelas proteínas truncadas CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850 e CA-NFAT1 $\Delta$ 699-818. A proteína CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850 não induziu apoptose quando expressa em células NIH3T3, semelhante ao CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927 (Figura 4.4). Em contraste, a proteína CA-NFAT1 $\Delta$ 699-818 levou a um nível moderado de morte celular quando comparado ao CA-NFAT1 inteiro, indicando que os aminoácidos 819 a 850 também desempenham um papel na apoptose induzida pelo CA-NFAT1 (Figura 4.4). Em seguida, nós adicionamos 35 resíduos de aminoácidos das posições 699 a 734 a proteína truncada CA-NFAT1  $\Delta$ 699-850, construindo assim a proteína CA-NFAT1 $\Delta$ 735-850. Esta proteína truncada (CA-NFAT1 $\Delta$ 735-850) induziu altos níveis de apoptose, de forma semelhante ao CA-NFAT1 inteiro (Figura 4.4). Em conjunto, estes resultados demonstraram que a remoção dos aminoácidos 699 a 850 previne a indução de apoptose pelo CA-NFAT1 e sugerem que existem pelo menos dois domínios dentro do NFAT1 TAD-C, entre os aminoácidos 699 a 734 e 819 a 850, que medeiam a apoptose induzida pelo CA-NFAT1.



**Figura 4.4. A remoção dos aminoácidos 699 a 850 do TAD-C do NFAT1 previne completamente a indução de apoptose pelo CA-NFAT1.** Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou retrovírus expressando CA-NFAT1 ou a proteína CA-NFAT1 truncada indicada. Células NIH3T3 foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo para morte celular. Análise de morte celular realizada após 48 horas de cultivo. O gráfico mostra a média dos níveis de morte celular obtido a partir de três experimentos independentes. Este gráfico foi normalizado considerando o percentual de células em sub-G0 induzidas pelo CA-NFAT1 para 100% de morte celular. O índice de morte celular é a razão entre o percentual de células em sub-G0 induzidas pelo vetor vazio ou a construção CA-NFAT1 indicada e o percentual de células em sub-G0 induzidas pelo CA-NFAT1 inteiro. Um esquema representando o CA-NFAT1 e cada uma das proteínas truncadas é mostrado na figura.

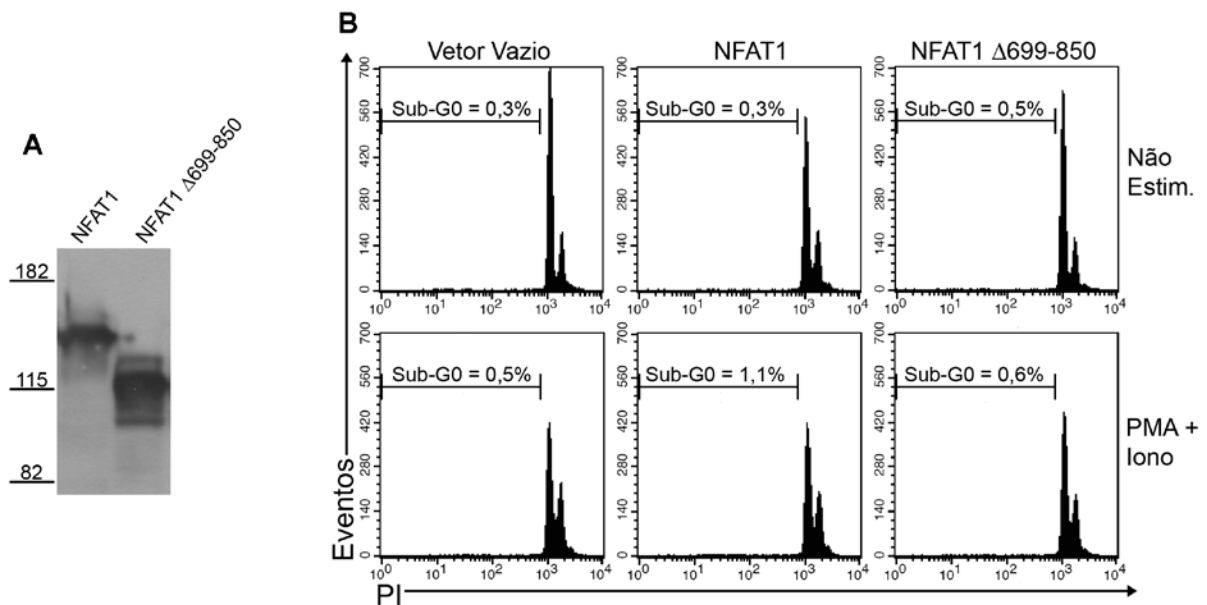
Para nos certificarmos da importância dos aminoácidos 699 a 850 no fenótipo induzido pelo CA-NFAT1, nós construímos mais duas proteínas truncadas, uma contendo apenas os aminoácidos 699 a 735 (CA-NFAT1DD699-735), correspondentes ao primeiro domínio descrito acima, no NFAT1 TAD-C, e a outra contendo os aminoácidos 699 a 850 no NFAT1 TAD-C (CA-NFAT1DD699-850), englobando os dois domínios descritos aqui. A seguir, avaliamos a capacidade de induzir apoptose destas duas construções pela análise do conteúdo de DNA sub-G0. Quando expressas em células NIH3T3, ambas as proteínas truncadas, CA-NFAT1DD699-735 e CA-NFAT1DD699-850, induziram apoptose de forma

semelhante ao CA-NFAT1 (Figuras 4.5A e 4.5B). Logo depois, analisamos os níveis de proliferação, por incorporação de cristal violeta, nas células NIH3T3 expressando cada uma dessas proteínas. A expressão de CA-NFAT1DD699-735 e CA-NFAT1DD699-850 também levou a uma redução da proliferação, semelhantemente, ao CA-NFAT1 (Figura 4.5C). Portanto, estes resultados reafirmam o papel crítico dos aminoácidos 699 a 850 na morte celular induzida pelo CA-NFAT1 e sugerem que somente a presença de um dos domínios mapeados aqui é suficiente para indução de apoptose pelo CA-NFAT1.



**Figura 4.5. Os resíduos de aminoácidos 699 a 735 são suficientes para conferir ao CA-NFAT1 a capacidade de induzir apoptose.** Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou retrovírus expressando CA-NFAT1 ou a proteína CA-NFAT1 truncada indicada. **(A, B)** Células NIH3T3 foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo para morte celular após 48 horas de cultivo. **(A)** O gráfico mostra a média dos níveis de morte celular obtido a partir de três experimentos independentes. **(B)** Gráfico representativo da análise de morte celular. O percentual de células com conteúdo de DNA sub-G0 está indicado. **(C)** Proliferação celular foi avaliada por incorporação de cristal violeta. As células foram cultivadas em triplicata e analisadas por 120 horas. O gráfico mostrado é representativo de três experimentos independentes.

A seguir, nós avaliamos a capacidade de induzir apoptose da forma não constitutivamente ativa do NFAT1 no nosso modelo. Mirando esse objetivo, células NIH3T3 foram transduzidas com vetor controle ou com vetor retroviral expressando NFAT1 ou NFAT1 $\Delta$ 699-850 e analisadas para presença de células apoptóticas. Primeiramente, confirmamos pelo ensaio de *Western Blot* que as proteínas NFAT1 e NFAT1 $\Delta$ 699-850 eram expressas em níveis semelhantes e tinham o peso molecular esperado (Figura 4.6A). Em seguida, na análise de morte celular, observamos que a proteína NFAT1 selvagem não foi capaz de induzir apoptose quando expressa em fibroblastos NIH3T3 estimulados com PMA e ionomicina, não sendo possível analisar a importância dos domínios aqui descritos na morte celular induzida pelo NFAT1 selvagem (Figura 4.6B). Entretanto, nós não podemos descartar que o NFAT1 selvagem também tenha a capacidade de induzir apoptose em células NIH3T3, já que o estímulo de PMA e ionomicina pode desencadear vias de sinalização de sobrevivência, como a via de Ras-Raf-MEK-ERK, que poderiam prevenir a morte celular (Tamm e Kikuchi, 1991; Verin *et al.*, 2000; Samatar e Poulikakos, 2014). Além do mais, este resultado sugere que a atividade sustentada de NFAT1 é necessária para indução de apoptose em fibroblastos NIH3T3.



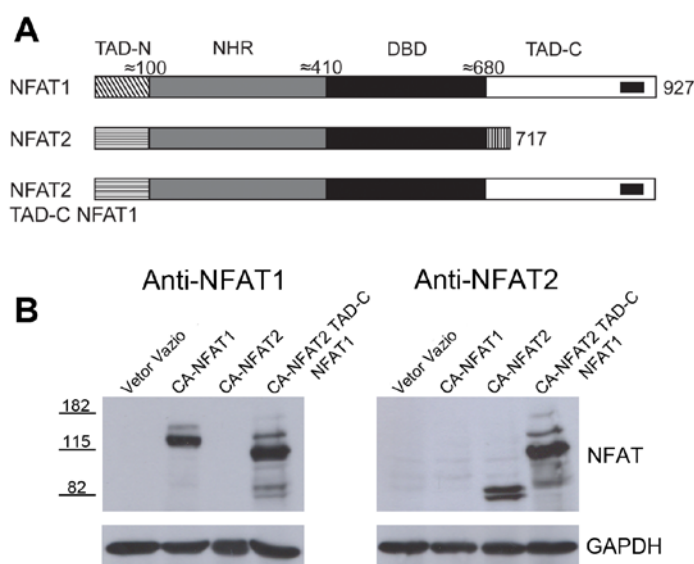
**Figura 4.6. O NFAT1 selvagem não é capaz de induzir apoptose em células NIH3T3 mediante estímulo.** Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou retrovírus expressando NFAT1 ou NFAT1Δ699-850. **(A)** Proteína total de  $4 \times 10^5$  células NIH3T3 transduzidas foi obtida para análise do nível expressão de NFAT1 por *Western Blot*. **(B)** Após 24 horas de transdução, as células foram deixadas sem estímulo (Não Estim.) ou foram estimuladas com PMA (20nM) e ionomicina (2μM). Após 48 horas de estímulo, as células foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo para morte celular. O percentual de células com conteúdo de DNA sub-G0 está indicado na figura.

### 4.3 A Fusão do NFAT1 TAD-C ao CA-NFAT2 lhe Confere a Capacidade de Induzir Apoptose

Os domínios de transativação do NFAT apresentam baixa conservação de sequência entre os membros da família e podem conferir diferentes capacidades na regulação da expressão gênica. Esses domínios são, provavelmente, as principais regiões responsáveis pelas divergências no controle da regulação gênica entre as diferentes proteínas NFAT. Já foi demonstrado que o NFAT1 e o NFAT2 exercem efeitos opostos na proliferação e morte celular (Robbs *et al.*, 2008). O CA-NFAT1 induz arresto do ciclo celular e apoptose em fibroblastos NIH3T3 (Figura 4.2), enquanto o CA-NFAT2 induz proliferação e sobrevivência celular (Robbs *et al.*, 2008). A proteína NFAT2 possui um TAD-C curto, enquanto o NFAT1 possui um TAD-C longo, o qual é necessário para que o NFAT1 seja capaz de induzir apoptose

(Figura 4.4 e 4.5). Portanto, nós decidimos avaliar se o CA-NFAT2 poderia induzir apoptose quando fusionado ao TAD-C do NFAT1 e expresso em células NIH3T3.

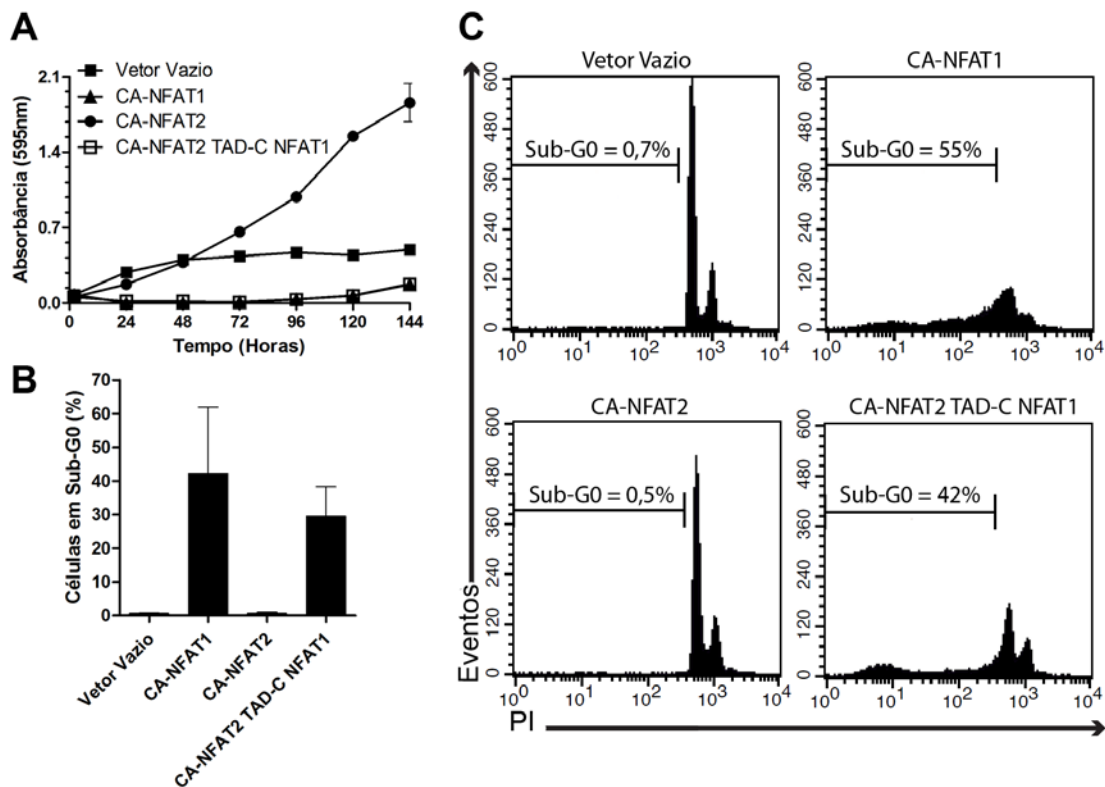
Para este propósito, nós construímos um vetor retroviral expressando a proteína quimérica CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1, resultante da fusão do CA-NFAT2 ao TAD-C do NFAT1 (NFAT1 TAD-C). Um alinhamento esquemático do NFAT1, NFAT2 e da proteína quimérica está demonstrado na Figura 4.7A. Em seguida, nós analisamos através de *Western Blot* se a proteína quimérica CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 possui as regiões tanto do CA-NFAT2 como do NFAT1 TAD-C. Como mostrado na Figura 4.7B, o anticorpo anti-NFAT1 que reconhece o NFAT1 TAD-C, reconheceu o CA-NFAT1 e a proteína quimérica CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 (painel à esquerda), e o anticorpo anti-NFAT2 detectou a expressão de CA-NFAT2 e CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 (painel à direita), indicando que a proteína quimérica CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 está sendo expressa em células NIH3T3.



**Figura 4.7. A quimera CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 é expressa em altos níveis em células NIH3T3 transduzidas com o respectivo vetor. (A)** Um alinhamento esquemático representando o CA-NFAT1, CA-NFAT2 e CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 está demonstrado. **(B)** Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou retrovírus expressando CA-NFAT1, CA-NFAT2 ou CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1. Proteína total de  $4 \times 10^5$  células NIH3T3 transduzidas foi obtida para análise do nível expressão por *Western Blot*.



A seguir, para avaliar a capacidade do CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 de induzir morte celular, células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou com vetor expressando CA-NFAT1, CA-NFAT2 ou CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1, e avaliadas para os níveis de proliferação e para o conteúdo de DNA sub-G0. Como demonstrado na Figura 4.8A, as células expressando CA-NFAT2 proliferaram além da confluência, em contraste com as células expressando CA-NFAT1. Interessantemente, as células expressando CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 apresentaram baixos níveis de proliferação e uma redução no número total de células, de forma semelhante às células expressando CA-NFAT1 (Figura 4.8A). Este resultado demonstrou que o CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 é capaz de induzir um fenótipo semelhante ao induzido pelo CA-NFAT1 em células NIH3T3. Em seguida, nós avaliamos se essa proteína quimérica também é capaz de desencadear apoptose. A análise do conteúdo de DNA sub-G0 revelou que o CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 induziu apoptose do mesmo modo que o CA-NFAT1 (Figuras 4.8B e 4.8C). Em contraste, um baixo número de células expressando CA-NFAT2 apresentou conteúdo de DNA sub-G0 (Figuras 4.8B e 4.8C). Em conjunto, estes resultados sugerem que o NFAT1 TAD-C é capaz de conferir a capacidade de induzir apoptose a outros membros da família NFAT, tal como o NFAT2, conhecidamente descrito por ser um oncogene.



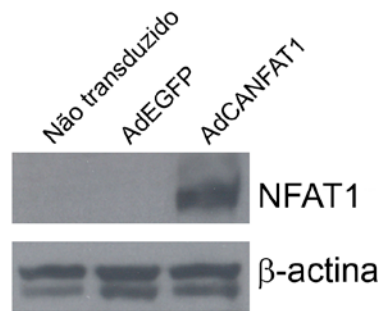
**Figura 4.8. A fusão do NFAT1 TAD-C ao CA-NFAT2 reverte o fenótipo induzido pelo CA-NFAT2.** Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou retrovírus expressando CA-NFAT1, CA-NFAT2 ou CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1. **(A)** Proliferação celular foi avaliada por incorporação de cristal violeta. As células foram cultivadas em triplicata e analisadas por 144 horas. O gráfico mostrado é representativo de três experimentos independentes. **(B, C)** Células NIH3T3 foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo para morte celular. **(B)** Análise de morte celular realizada após 48 horas de cultivo. O gráfico mostra a média dos percentuais de células com conteúdo de DNA sub-G0 obtido a partir de três experimentos independentes. **(C)** Gráfico representativo da análise de morte celular mostrada em (B). O percentual de células com conteúdo de DNA sub-G0 está indicado.

#### 4.4 O Vetor Adenoviral Carreando o Gene CA-NFAT1 Induz Apoptose em Células NIH3T3 H-RasV12

Ao longo dos anos, diversos estudos tem progressivamente demonstrado que o fator de transcrição NFAT1 pode atuar como um gene supressor de tumor (Hodge *et al.*, 1996; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Ranger *et al.*, 2000; Robbs *et al.*, 2008). Corroborando estes dados, o NFAT1 já foi descrito por regular diversos genes indutores de morte celular (Latinis *et al.*, 1997; Youn *et al.*, 2000; Kaminuma *et al.*, 2008). Aqui, nós demonstramos que a forma constitutivamente ativa do NFAT1 (CA-

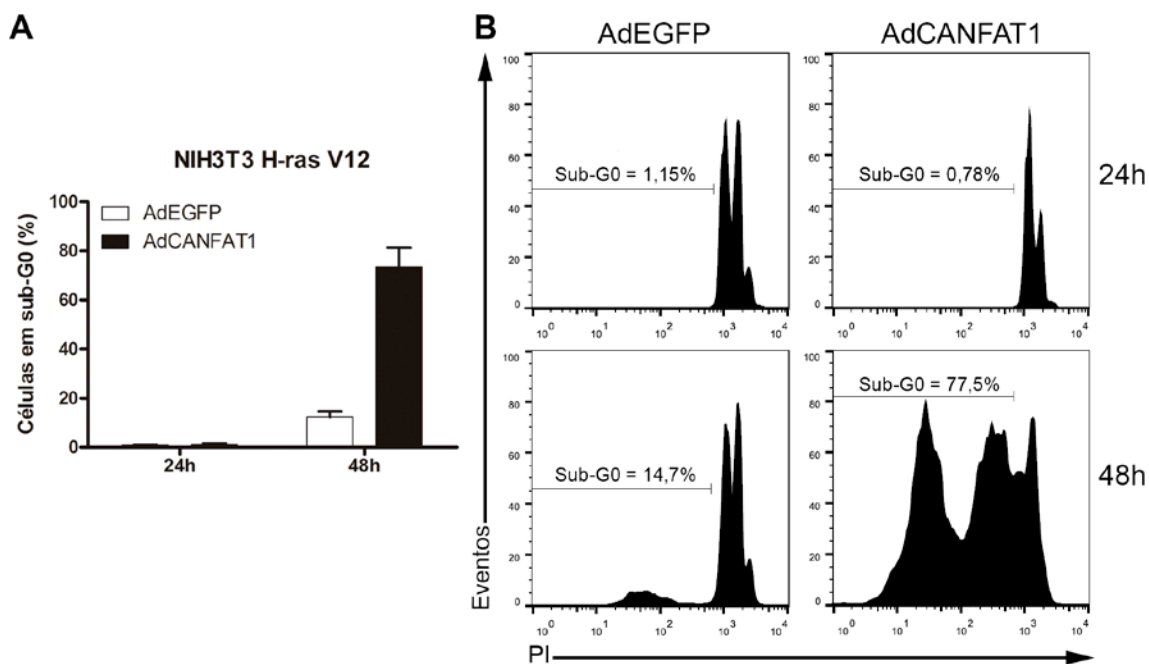
NFAT1) induz apoptose em células NIH3T3 (Figura 4.2). Além disso, mais recentemente, nosso grupo demonstrou que o CA-NFAT1 pode cooperar com a via de Ras-Raf-MEK-ERK para induzir apoptose (Robbs *et al.*, 2013). A via de Ras-Raf-MEK-ERK é capaz de promover sobrevivência e proliferação celular, e se encontra alterada em 50% dos tumores humanos, podendo chegar até a 90% para alguns tipos de câncer (Roberts e Der, 2007; Alvarez *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 2010). Portanto, nós pretendemos avaliar se o CA-NFAT1 poderia ser aplicado como terapia gênica para desencadear apoptose em células tumorais, um dos principais mecanismos celulares de supressão tumoral.

Visando esse objetivo, utilizamos adenovírus sorotipo 5, como vetor, para induzir a expressão de CA-NFAT1 nas células testadas a seguir. Todos os ensaios apresentados a partir daqui foram realizados após a confirmação de que pelo menos 80% das células eram positivas para o gene repórter EGFP após a transdução adenoviral (dados não mostrados). Visando avaliar o nível de expressão de CA-NFAT1 induzido pelo vetor adenoviral, primeiramente, transduzimos células 293A com adenovírus controle (AdEGFP) ou com adenovírus carreando o CANFAT1 (AdCANFAT1) e o extrato total de proteínas dessas células foi analisado por *Western Blot*. Como podemos observar na figura 4.9, somente as células 293A transduzidas com AdCANFAT1 expressam CA-NFAT1. Todos os experimentos mostrados adiante foram realizados utilizando esses mesmos preparados adenovirais.



**Figura 4.9. CA-NFAT1 é expresso em altos níveis em células transduzidas com o vetor adenoviral AdCANFAT1.** Células 293A foram transduzidas com vetor vazio (AdEGFP) ou adenovírus expressando CA-NFAT1 (AdCANFAT1). Proteína total de  $3 \times 10^5$  células 293A transduzidas foi obtida para análise do nível expressão de NFAT1 por *Western Blot*.

Para avaliarmos a capacidade do AdCANFAT1 de induzir apoptose células com via Ras-Raf-MEK-ERK ativa, utilizamos a linhagem NIH3T3 H-RasV12, uma vez que já foi observado que ela é susceptível a expressão de CA-NFAT1 mediante transdução retroviral (Robbs *et al.*, 2013). Em seguida, células NIH3T3 H-RasV12 foram tratadas com AdEGFP ou AdCANFAT1 e submetidas à análise das células com conteúdo de DNA sub-G0. Nessa análise, observamos que ambos os tratamentos não induziram apoptose após 24 horas (Figura 4.10). No entanto, após 48 horas, a cultura de células tratadas com AdCANFAT1 apresentou uma drástica redução no número de células aderidas quando observadas por microscopia (Dados não mostrados). A análise de morte celular confirmou que em torno de 78% de células possuíam conteúdo DNA sub-G0, contrariamente à cultura de células NIH3T3 H-RasV12 tratadas com o vetor controle (AdEGFP) que apresentou em torno de 15% de células subdiploides (Figura 4.10). Portanto, este resultado nos indica que o tratamento com AdCANFAT1 é capaz de induzir apoptose em células NIH3T3 com Ras ativo.



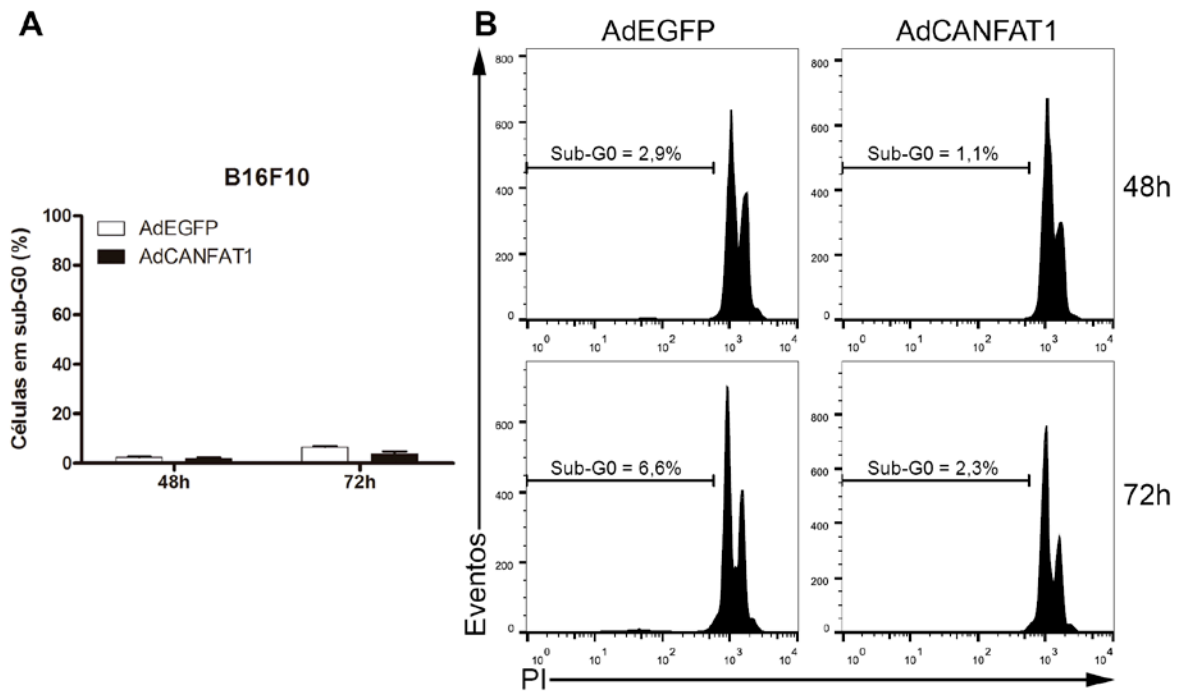
**Figura 4.10. O tratamento com AdCANFAT1 induz apoptose em fibroblastos NIH3T3 H-RasV12.** Células NIH3T3 H-RasV12 foram transduzidas com vetor controle (AdEGFP) ou adenovírus expressando CA-NFAT1 (AdCANFAT1). Nos tempos indicados, as células foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo para morte celular. **(A)** O gráfico mostra a média dos níveis de morte celular obtido a partir de três experimentos independentes. **(B)** Gráfico representativo da análise do percentual de células com conteúdo de DNA sub-G0.

#### 4.5 O AdCANFAT1 Induz Apoptose Moderada em Linhagens Tumorais de Cólon

Em aproximadamente metade dos tumores humanos, a via de Ras-Raf-MEK-ERK está hiperativada. Entre esses tumores, mutações ativadoras são encontradas no oncogene *Ras* em aproximadamente 50% dos tumores de cólon e 25% dos melanomas (Roberts e Der, 2007). Além do oncogene *Ras*, mutações no gene B-Raf são encontradas em 70% dos melanomas e em 20% dos tumores de cólon (Roberts e Der, 2007; Calvo *et al.*, 2010). Outros componentes dessa via também se encontram, frequentemente, alterados em células cancerosas. EGFR e HER2, que estão acima de Ras na via de sinalização, são normalmente encontrados superexpressos em tumores de mama (Dhillon *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2010). Portanto, nosso próximo objetivo foi avaliar se o adenovírus AdCANFAT1 é capaz de

induzir apoptose em linhagens de melanoma, de tumor de mama e de tumor de cólon.

Uma vez que o tratamento com AdCANFAT1 induziu de forma massiva a apoptose em células NIH3T3 H-RasV12, somente, após 48 horas (Figura 4.10), as linhagens tumorais foram analisadas para presença de células apoptóticas após 48 e 72 horas. Primeiramente, avaliamos o fenótipo induzido por AdCANFAT1 na linhagem murina de melanoma B16F10. Para este propósito, células B16F10 foram tratadas com AdEGFP e AdCANFAT1 e submetidas à análise de morte celular. Nessa análise, observamos que o tratamento com adenovírus controle (AdEGFP) não induziu morte celular em células B16F10 após 48 e 72 horas de cultivo. Apenas um baixo número de células B16F10 apresentou conteúdo de DNA sub-G0 quando tratadas com AdEGFP (Figura 4.11). Surpreendentemente, o mesmo foi observado para as células B16F10 tratadas com AdCANFAT1 (Figura 4.11). As culturas tratadas com AdCANFAT1 apresentaram apenas 1,1% e 2,3% de células subdiploides após 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 4.11B). Portanto, este resultado indica que apesar de induzir apoptose em fibroblastos NIH3T3 H-RasV12, o AdCANFAT1 não é capaz de causar o mesmo efeito em células B16F10.



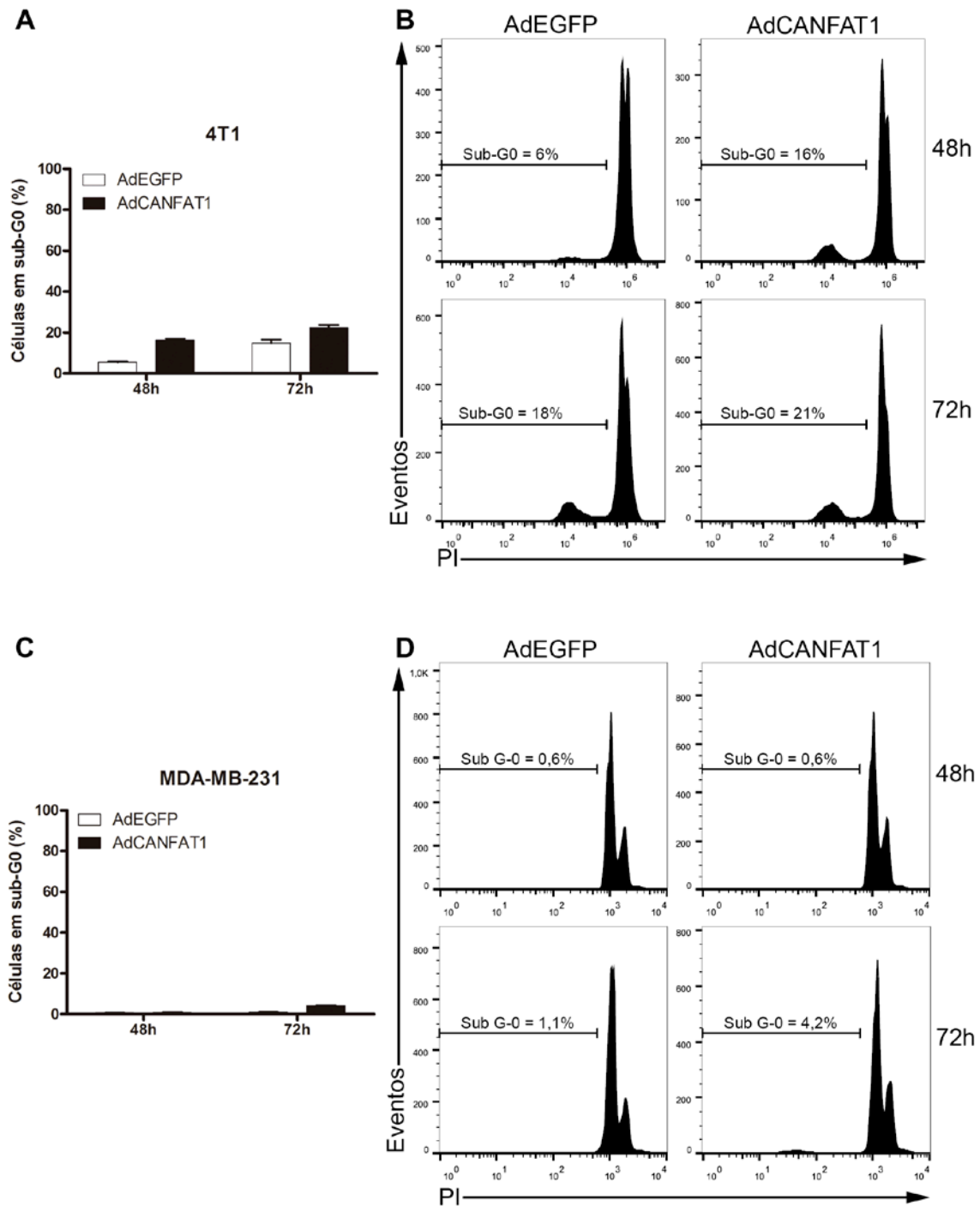
**Figura 4.11. As células B16F10 não são sensíveis ao tratamento com AdCANFAT1.** Células B16F10 foram transduzidas com vetor controle (AdEGFP) ou adenovírus expressando CA-NFAT1 (AdCANFAT1). Nos tempos indicados, as células foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo para morte celular. **(A)** O gráfico mostra a média dos níveis de morte celular obtido a partir de três experimentos independentes. **(B)** Gráfico representativo da análise do percentual de células com conteúdo de DNA sub-G0.

Em seguida, analisamos a indução de apoptose pelo AdCANFAT1 em células de tumor de mama. Nesta etapa, foram avaliadas a linhagem murina 4T1 e a linhagem humana MDA-MB-231. Primeiro, células 4T1 tratadas com AdEGFP ou AdCANFAT1 e submetidas à análise do conteúdo de DNA. Após 24 horas de tratamento, a cultura de células 4T1 tratadas com AdCANFAT1 apresentou por volta de 16% de células subdiploides, por outro lado, a cultura controle (AdEGFP) apresentou apenas 6% de células subdiploides (Figura 4.12A e 4.12B). A princípio, este resultado sugere que o AdCANFAT1 induz, ainda que brandamente, apoptose em células 4T1. No entanto, após 48 horas, ambas as culturas apresentaram um número similar de células com conteúdo de DNA sub-G0. A cultura da linhagem 4T1 tratada com AdEGFP apresentou em torno de 18% de células com conteúdo de

DNA sub-G0, semelhantemente, a cultura tratada com AdCANFAT1 apresentou em torno de 21% de células subdiploides (Figura 4.12A e 4.12B). Apesar do AdCANFAT1 induzir uma apoptose branda após 48 horas, em 72 horas a morte celular causada pelo adenovírus controle e pelo AdCANFAT1 é similar. Portanto, estes resultados sugerem que o efeito observado sobre as células 4T1 pode estar relacionado a uma possível toxicidade do vetor em detrimento à morte celular induzida por CA-NFAT1.

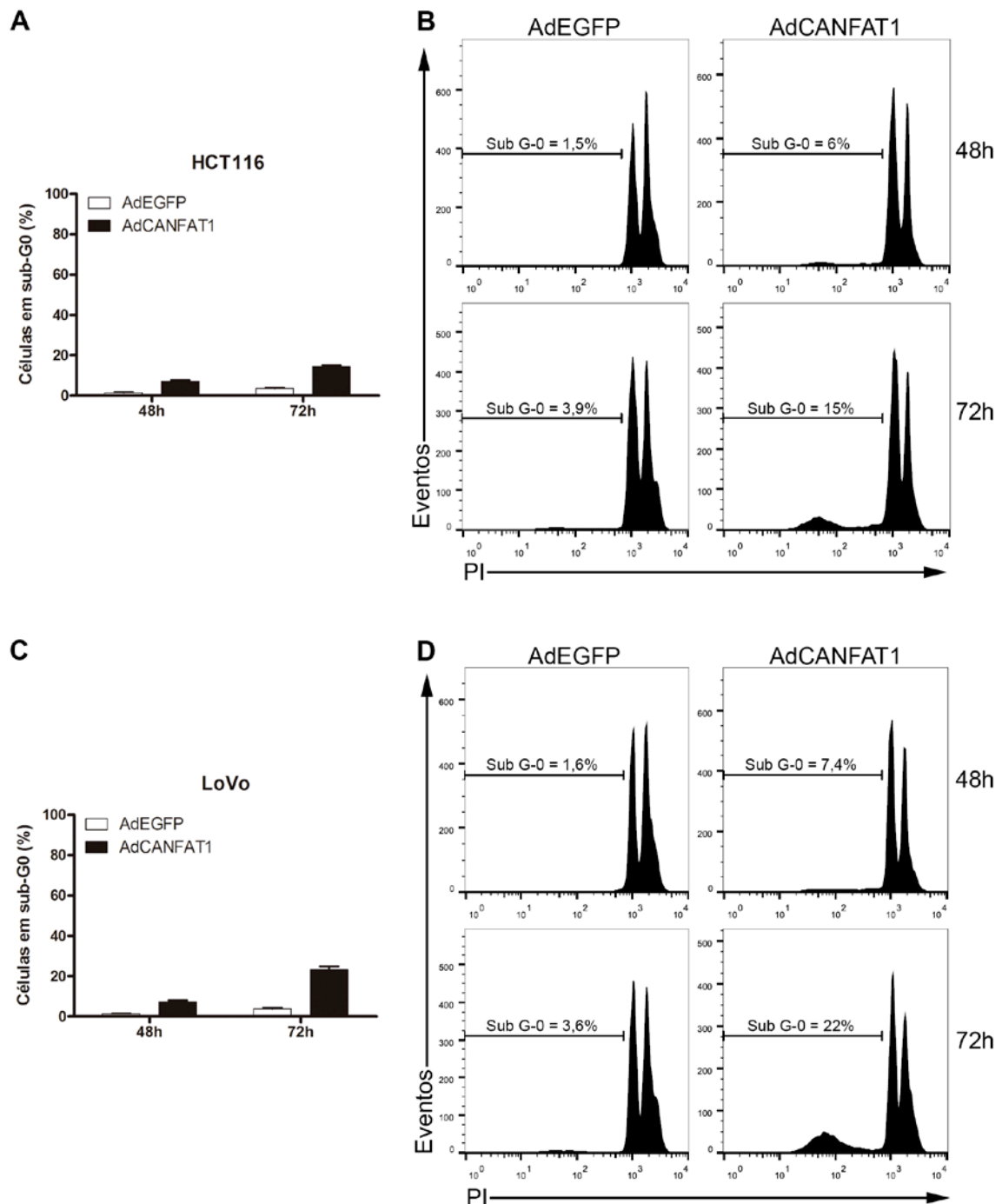
A seguir, avaliamos as culturas de células MDA-MB-231 para a presença de células subdiploides mediante o tratamento com AdEGFP e AdCANFAT1 após 48 e 72 horas. A análise do conteúdo de DNA revelou que as culturas de MDA-MB-231 não sofreram apoptose considerável com ambos os tratamentos em nenhum dos tempos testados (Figura 4.12C e 4.12D). Nesse ensaio, foi possível observar apenas um ligeiro aumento (em torno de 4%) no número de células subdiploides tratadas com AdCANFAT1 após 72 horas (Figura 4.12C e 4.12D). Entretanto, quando observamos o percentual de células NIH3T3 H-RasV12 que sofreram morte celular após 48 horas de tratamento com AdCANFAT1, é possível concluir que o número de células mortas nas culturas de MDA-MB-231 tratadas com esse mesmo vetor é inexpressivo. Portanto, estes resultados sugerem que a linhagem MDA-MB-231 não é sensível ao tratamento com AdCANFAT1, de forma semelhante às células de melanoma B16F10.





**Figura 4.12.** As linhagens de tumor de mama 4T1 e MDA-MB-231 não são susceptíveis ao tratamento com AdCANFAT1. Células 4T1 e MDA-MB-231 foram transduzidas com vetor controle (AdEGFP) ou adenovírus expressando CA-NFAT1 (AdCANFAT1). Nos tempos indicados, as células foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo para morte celular. **(A)** O gráfico mostra a média dos percentuais de células 4T1 com conteúdo de DNA sub-G0 obtido a partir de três experimentos independentes. **(B)** Gráfico representativo da análise do percentual de células 4T1 com conteúdo de DNA sub-G0. **(C)** O gráfico mostra a média dos percentuais de células MDA-MB-231 com conteúdo de DNA sub-G0 obtido a partir de três experimentos independentes. **(D)** Gráfico representativo da análise do percentual de células MDA-MB-231 com conteúdo de DNA sub-G0.

Após avaliar os efeitos do AdCANFAT1 sobre células tumorais de mama e melanoma, nós decidimos analisar duas linhagens tumorais de cólon (HCT116 e LoVo). Para este propósito, as células das linhagens HCT116 e LoVo foram tratadas com adenovírus controle e AdCANFAT1 e analisadas para o percentual de células subdiploides como indicativo de apoptose. Essa análise revelou que a cultura de células HCT116 tratadas com AdEGFP apresentou 1,5% e 3,9% de células subdiploides após 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 4.13A e 4.13B). Contrariamente, em torno de 6% e 15% das células HCT116 tratadas com AdCANFAT1 apresentaram conteúdo de DNA sub-G0 após 48 e 72 horas, respectivamente, indicando a presença de um número maior de células apoptóticas nas culturas tratadas com AdCANFAT1 em comparação às culturas controles (Figura 4.13A e 4.13B). Em relação a linhagem LoVo, observamos que por volta de 1,6% e 3,6% das células LoVo tratadas com AdEGFP apresentaram conteúdo de DNA sub-G0 após 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 4.13C e 4.13D). Por outro lado, a cultura de células LoVo tratadas com AdCANFAT1 apresentou 7,4% e 22% de células subdiploides após 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 4.13C e 4.13D). Juntamente, esses resultados indicam que ambas as linhagens de cólon testadas sofrem apoptose mediante ao tratamento com AdCANFAT1, apesar de ocorrer mais tardiamente em comparação às células NIH3T3 H-RasV12 com o mesmo tratamento. Além disso, vale ressaltar que os percentuais de células subdiploides apresentados pelas culturas de cólon mediante tratamento com AdCANFAT1 são menores do que os alcançados nas culturas de células NIH3T3 H-RasV12.



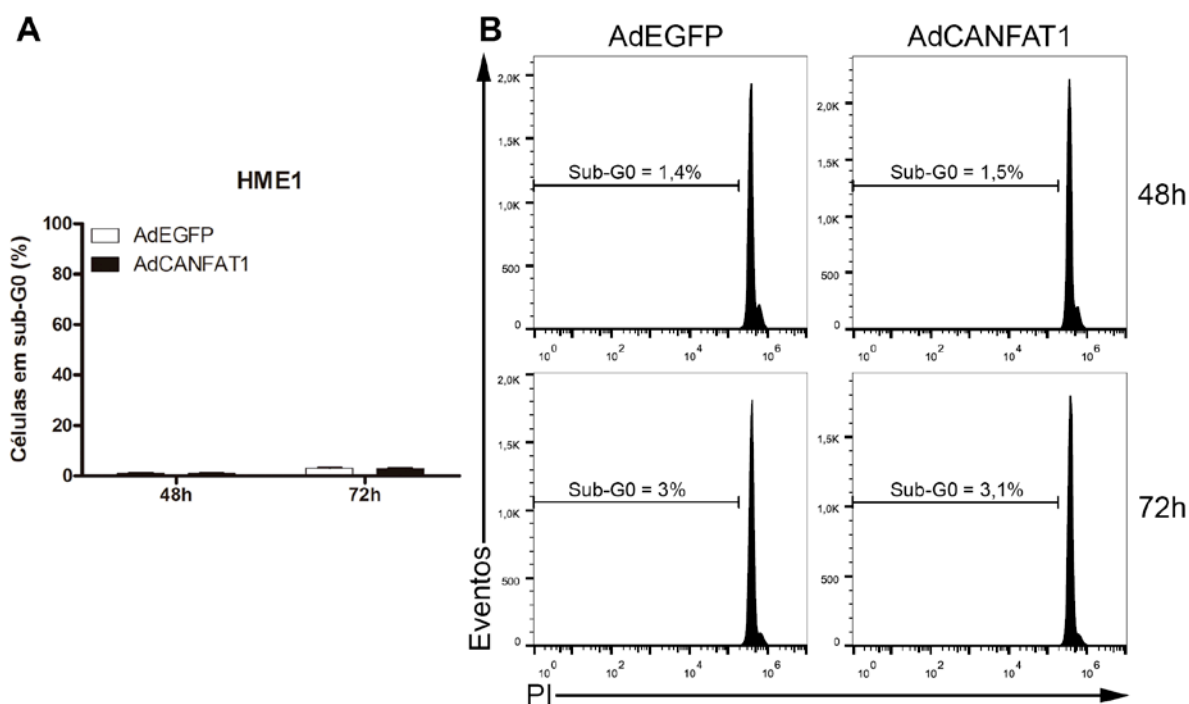
**Figura 4.13. As linhagens de tumor de cólon HCT116 e LoVo sofrem apoptose moderada mediante tratamento com AdCANFAT1.** Células HCT116 e LoVo foram transduzidas com vetor controle (AdEGFP) ou adenovírus expressando CA-NFAT1 (AdCANFAT1). Nos tempos indicados, as células foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo para morte celular. **(A)** O gráfico mostra a média dos percentuais de células HCT116 com conteúdo de DNA sub-G0 obtido a partir de três experimentos independentes. **(B)** Gráfico representativo da análise do percentual de células HCT116 com conteúdo de DNA sub-G0. **(C)** O gráfico mostra a média dos percentuais de células LoVo com conteúdo de DNA sub-G0 obtido a partir de três experimentos independentes. **(D)** Gráfico representativo da análise do percentual de células LoVo com conteúdo de DNA sub-G0.

#### 4.6 O AdCANFAT1 não Induz Apoptose na Linhagem não Transformada HME1

Diferentes estudos já demonstraram o papel de supressor tumoral para o NFAT1. Camundongos deficientes para NFAT1 apresentam hiperproliferação linfocitária e aumento dos órgãos linfoides secundários (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1998). Esses fenótipos podem ser atribuídos ao fato de que os linfócitos desses animais sofrem menos AICD após a ativação (Schuh *et al.*, 1998). Além do que, esses camundongos são mais susceptíveis à carcinogênese química e tem maior propensão em desenvolver condrosarcomas (Ranger *et al.*, 2000; Robbs *et al.*, 2008). Esse papel de supressor tumoral do NFAT1 está, em parte, relacionado a sua capacidade de ativar genes indutores de apoptose, tais como FASL, TNF, TRAIL e NUR77 (McCaffrey *et al.*, 1994; Latinis *et al.*, 1997; Youn *et al.*, 2000; Robbs *et al.*, 2013). Na figura 4.10, nós demonstramos que o tratamento com AdCANFAT1 induz às células NIH3T3 H-RasV12 a sofrerem apoptose. No entanto, as linhagens de tumor de mama e de melanoma, aqui analisadas, não apresentaram o mesmo fenótipo mediante o mesmo tratamento (Figura 4.11 e 4.12). Além disso, as células tumorais de cólon testadas sofreram apoptose, somente, em um tempo mais tardio e de forma moderada (Figura 4.13). Apesar de diversos estudos indicarem uma função supressora de tumor para o NFAT1, esse papel supressor não foi observado em células já transformadas. A linhagem NIH3T3 H-RasV12, apesar de ser transformada, possui origem proveniente das células NIH3T3 não transformadas. Portanto, a seguir, nos perguntamos se o AdCANFAT1 seria capaz de induzir, intensamente, apoptose apenas em linhagens não transformadas.

Para analisar essa hipótese, células normais de mama HME-1 foram tratadas com AdEGFP e AdCANFAT1 e analisadas para presença de células subdiploides por marcação com iodeto de propídio no citômetro de fluxo. A cultura de células tratadas com AdEGFP apresentou 1,4% e 3% de células subdiploides após 48 e 72

horas, respectivamente (Figura 4.14). Semelhantemente, a cultura tratada com AdCANFAT1 exibiu 1,5% e 3,1% de células HME1 com conteúdo de DNA sub-G0 após 48 e 72 horas, respectivamente, indicando que essas células não sofrem apoptose mediante a superexpressão de CA-NFAT1 (Figura 4.14). Juntamente aos demais resultados, estes dados sugerem que a capacidade do CA-NFAT1 de induzir apoptose pode ser dependente do tipo celular onde esse gene está superexpresso.



**Figura 4.14. A linhagem não transformada HME-1 não sofre apoptose mediante a superexpressão de CA-NFAT1.** Células HME-1 foram transduzidas com vetor controle (AdEGFP) ou adenovírus expressando CA-NFAT1 (AdCANFAT1). Nos tempos indicados, as células foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo para morte celular. **(A)** O gráfico mostra a média dos níveis de morte celular obtido a partir de três experimentos independentes. **(B)** Gráfico representativo da análise do percentual de células com conteúdo de DNA sub-G0.

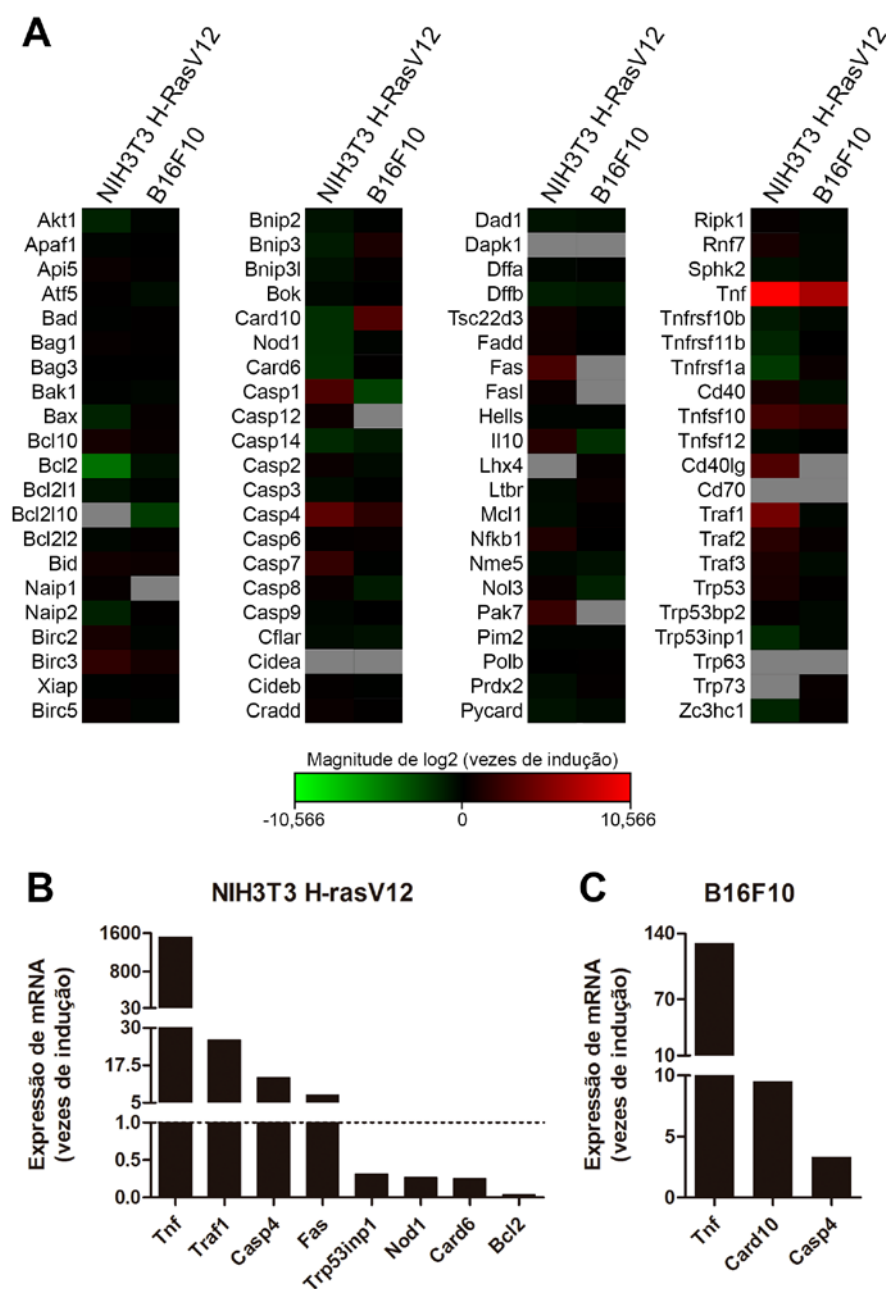
#### 4.7 O AdCANFAT1 Induz de Forma Massiva o Aumento da Expressão de TNF em Diferentes Linhagens Celulares

Os resultados apresentados, anteriormente, demonstram que o tratamento com AdCANFAT1 é capaz de induzir, fortemente, a apoptose em células NIH3T3 H-RasV12, entretanto, o mesmo efeito não foi observado em outras cinco linhagens

tumorais nem na linhagem não transformada HME1. Em células NIH3T3 selvagens, a superexpressão de CA-NFAT1 acompanhada do estímulo com PMA induz o aumento da expressão majoritária de Tnf e em menor escala de Traf1 e Trail (Robbs *et al.*, 2013). Nessas células, o bloqueio de TNF- $\alpha$  através de anticorpos neutralizantes reduz o número de células apoptóticas, indicando que nas células NIH3T3 selvagens a indução de apoptose via TNF- $\alpha$  é o braço efetor da morte celular por CA-NFAT1 (Robbs *et al.*, 2013). Portanto, nosso próximo passo foi analisar a expressão de genes envolvidos na apoptose, incluindo Tnf, mediante o tratamento com AdCANFAT1 nas linhagens testadas aqui, com o objetivo de avaliar se os fenótipos distintos entre essas células mediante o mesmo tratamento se deve a um diferente perfil de expressão gênica induzido pelo CA-NFAT1.

Para este propósito, primeiramente, as células NIH3T3 H-RasV12 foram submetidas a uma análise de PCR em tempo real em um *superarray* para avaliar a expressão de 84 genes murinos relacionados a apoptose. O mRNA dessas células foi isolado após 24 horas de tratamento com AdEGFP ou AdCANFAT1 para a análise de expressão gênica. Em seguida, essa análise revelou que a superexpressão de CA-NFAT1 levou à amplificação de 1516 vezes no mRNA de Tnf e a aumentos mais discretos na expressão de Traf1 (26 vezes), Casp4 (13 vezes) e Fas (8 vezes) (Figura 4.15A e 4.15B). Além disso, as células NIH3T3 H-RasV12 tratadas com AdCANFAT1 também apresentaram uma redução de 25 vezes na expressão de Bcl2, de 4 vezes na expressão de Card6 e Nod1 e de 3 vezes na expressão de Trp53inp1 (Figura 4.15A e 4.15B). Em conjunto, estes resultados demonstram que a superexpressão de CA-NFAT1 em células NIH3T3 H-RasV12 induz um aumento exacerbado da expressão do gene proapoptótico Tnf e uma redução significativa da expressão do gene antiapoptótico Bcl2.

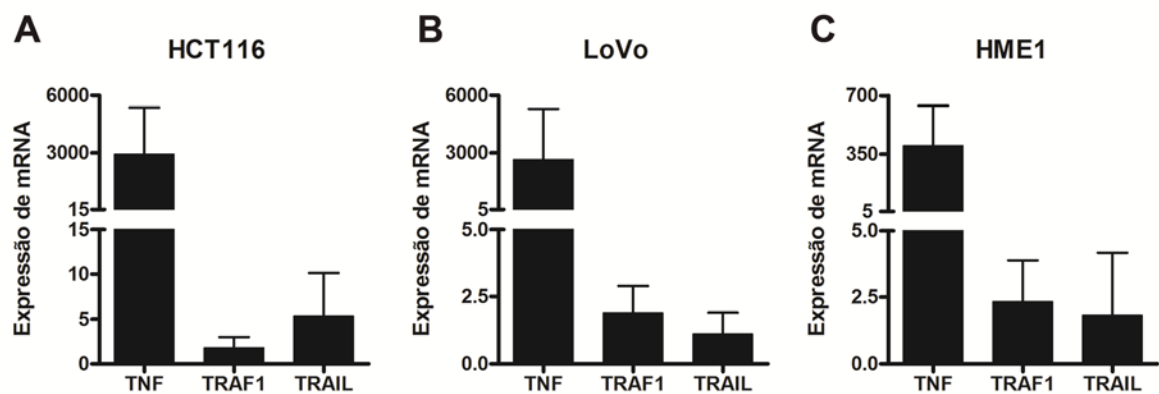
Em seguida, o mRNA das células B16F10 foi extraído nas mesmas condições e submetido a mesma análise de PCR em tempo real. Nesta linhagem, a superexpressão de CA-NFAT1 induziu o aumento de 129 vezes na expressão de Tnf e a amplificação em menor escala do mRNA dos genes Card10 (10 vezes) e Casp4 (3 vezes) (Figura 4.15A e 4.15C). Este resultado indica que mesmo não sendo susceptível ao tratamento com AdCANFAT1, as células B16F10 aumentam majoritariamente a expressão do gene proapoptótico Tnf mediante a superexpressão de CA-NFAT1.



**Figura 4.15.** O tratamento com AdCANFAT1 induz a diminuição de Bcl2 em fibroblastos transformados e o aumento majoritário de Tnf em células de melanoma e em fibroblastos transformados. O mRNA de células NIH3T3 H-RasV12 e B16F10 foi isolado após 24 horas de tratamento com vetor controle (AdEGFP) ou adenovírus expressando CA-NFAT1 (AdCANFAT1) e analisado por PCR em tempo real. **(A)** *Heatmap* da análise de *superarray* mostrando as alterações na expressão de 84 genes mediante o tratamento com AdCANFAT1 em relação ao tratamento controle (AdEGFP). As marcações na cor cinza indicam que a expressão do gene não foi detectada nas células controle nem nas células tratadas com AdCANFAT1. **(B e C)** Estão representados os níveis de expressão dos genes com alterações na expressão maior que duas vezes e que tenham sido detectados abaixo do C(t) 30 em pelo menos um dos tratamentos estão apresentados. **(B)** Gráfico indicando a expressão gênica das células NIH3T3 H-RasV12 tratadas com AdCANFAT1 em comparação às células controle. **(C)** Gráfico indicando a expressão gênica das células B16F10 tratadas com AdCANFAT1 em comparação às células controle.



Uma vez que nosso grupo demonstrou, previamente, que a superexpressão de CA-NFAT1 induz, principalmente, o aumento da expressão de Tnf, Traf1 e Trail em células NIH3T3, decidimos analisar especificamente a expressão desses genes nas linhagens humanas HCT116, LoVo e HME1. O mRNA dessas células foi isolado após 24 horas de tratamento com AdEGFP ou AdCANFAT1 e submetido a análise de PCR em tempo real. Essa análise demonstrou que as células HCT116 e LoVo tiveram um aumento de quase 3000 vezes na expressão de TNF quando tratadas com AdCANFAT1 (Figura 4.16A e 4.16B). Nas células HME1, o mesmo tratamento resultou em um aumento de 400 vezes na expressão de TNF (Figura 4.16C). Enquanto, a expressão de TRAF1 se manteve praticamente estável nas três linhagens, aumentando cerca de 2 vezes em cada linhagem mediante o tratamento com AdCANFAT1 (Figura 4.16). Já em relação a TRAIL, a sua expressão apresentou um aumento de 5 vezes em células HCT116 superexpressando CA-NFAT1, no entanto, vale ressaltar que em duas das três replicatas a expressão de TRAIL nas células tratadas com AdCANFAT1 não foi detectada (Figura 4.16A). Nas células LoVo e HME1, o tratamento com AdCANFAT1 induziu 1 vez e 1,8 vezes a expressão de TRAIL, respectivamente (Figura 4.16B e 4.16C). Em conjunto, estes resultados demonstram que a expressão de CANFAT1 nas linhagens tumorais de cólon e na linhagem não transformada de mama HME1 levam ao aumento significativo na expressão de TNF e a pequenas variações na expressão de TRAF1 e TRAIL.



**Figura 4.16. O tratamento com AdCANFAT1 induz, massivamente, o aumento de TNF em células não transformadas de mama e tumorais de cólon.** O mRNA de células HCT116, LoVo e HME1 foi isolado após 24 horas de tratamento com vetor controle (AdEGFP) ou adenovírus expressando CA-NFAT1 (AdCANFAT1) e analisado por PCR em tempo real para expressão de TNF, TRAF1 e TRAIL. **(A)** Gráfico apresentando a média de expressão dos genes indicados nas células HCT116 tratadas com AdCANFAT1 em comparação às células controle, obtida a partir de três experimentos independentes. **(B)** Gráfico apresentando a média de expressão dos genes indicados nas células LoVo tratadas com AdCANFAT1 em comparação às células controle, obtida a partir de três experimentos independentes. **(C)** Gráfico apresentando a média de expressão dos genes indicados nas células HME1 tratadas com AdCANFAT1 em comparação às células controle, obtida a partir de três experimentos independentes.

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, nós demonstramos que a expressão de CA-NFAT1 induz apoptose em fibroblastos NIH3T3, que foi evidenciada por características tais como fragmentação de DNA, formação de núcleos picnóticos e exposição de fosfatidilserina (Figura 4.2). Além disso, nossos resultados identificaram uma região específica dentro do NFAT1 TAD-C, entre os aminoácidos 699 a 850, que é essencial para indução de apoptose pelo CA-NFAT1 (Figuras 4.4 e 4.5). Embora esta região ainda seja grande, correspondendo a 152 resíduos de aminoácidos, nossos resultados sugerem que dentro do NFAT1 TAD-C existem pelo menos dois domínios de morte, entre os aminoácidos 699 a 734 e 819 a 850, que medeiam a apoptose induzida pelo CA-NFAT1 independentemente de outras regiões do TAD-C (Figuras 4.4 e 4.5). De fato, a proteína truncada CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850 não foi capaz de induzir apoptose, enquanto as proteínas CA-NFAT1 $\Delta$ 735-850, CA-NFAT1 $\Delta$ 699-818 induziram apoptose em células NIH3T3 (Figuras 4.4). Corroborando estes resultados, as construções CA-NFAT1DD699-850 e CA-NFAT1DD699-735 induziram apoptose de forma similar ao CA-NFAT1 inteiro (Figura 4.5). Por outro lado, diversos estudos já demonstraram que o NFAT2/ $\alpha$ , um membro da família NFAT que possui um TAD-C curto, não induz apoptose e está envolvido com transformação celular (Neal e Clipstone, 2003; Robbs *et al.*, 2008). A forma constitutivamente ativa do NFAT2/ $\alpha$  já foi descrita por induzir a formação de colônia, a perda da inibição por contato e o crescimento tumoral em um modelo de formação tumoral de alotransplantes murinos (Neal e Clipstone, 2003; Robbs *et al.*, 2008). Juntamente, estes estudos sugerem que há uma dicotomia entre os membros da família NFAT que é desempenhada pelo seu TAD-C. Interessantemente, essa hipótese foi confirmada ao demonstrarmos que a proteína NFAT2 quimérica,

fusionada ao NFAT1 TAD-C, (CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1) reduziu a proliferação celular e induziu apoptose em células NIH3T3 de forma similar ao CA-NFAT1 (Figura 4.8). Portanto, este resultado confirma que o NFAT1 TAD-C é um mediador central da função proapoptótica do NFAT1.

Após caracterizar a atividade proapoptótica do CA-NFAT1 em fibroblastos NIH3T3, nos perguntamos se a expressão de CA-NFAT1 seria suficiente para induzir o mecanismo de apoptose em células tumorais, uma vez que, nosso grupo demonstrou, previamente, que a cooperação com a via oncogênica de Ras-Raf-MEK-ERK é essencial para a indução de apoptose por CA-NFAT1 (Robbs *et al.*, 2013). No entanto, apesar do vetor adenoviral AdCANFAT1 induzir apoptose em fibroblastos transformados, não observamos o mesmo efeito em diferentes linhagens tumorais testadas (Figura 4.10 a 4.12). Somente as linhagens tumorais de cólon testadas foram susceptíveis à apoptose via CA-NFAT1, ainda que de maneira mais branda (Figura 4.13). Nesse mesmo trabalho onde nosso grupo demonstrou a cooperação da via de Ras-Raf-MEK-ERK com o CA-NFAT1 para indução de apoptose, foi visto que essa cooperação promove o desencadeamento da via extrínseca da apoptose mediante o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  (Robbs *et al.*, 2013). No presente estudo, observamos que as linhagens susceptíveis e não susceptíveis à apoptose por CA-NFAT1 aumentam consideravelmente a expressão de TNF- $\alpha$  quando tratadas com AdCANFAT1 (Figura 4.15 e 4.16).

Para regular a expressão gênica, as proteínas NFAT interagem com diversas proteínas parceiras, tais como outros fatores de transcrição, coativadores e correpressores (Macian, 2005). Algumas dessas interações já foram descritas por ocorrer nos TADs das proteínas NFAT. A proteína ativadora-1 (AP-1), o parceiro transcricional do NFAT melhor caracterizado, foi primeiramente descrita por interagir com NFAT na região do DBD (Macian *et al.*, 2001), no entanto, outra interação

funcional entre NFAT1 e AP-1 foi demonstrada por ocorrer através do NFAT1 TAD-C (Nguyen *et al.*, 2010). NFAT1 também interage com o repressor transcricional IRF2BP2 através do TAD-C (Carneiro *et al.*, 2011). Além disso, o TAD N-terminal do NFAT1 também interage com proteínas parceiras, tais como p300, um conhecido coativador da transcrição (Garcia-Rodriguez e Rao, 1998). Os TADs dos NFATs são estruturas que medeiam a interação entre NFAT e proteínas parceiras, e devido a esta característica aliada a sua baixa conservação de sequência, são extremamente importantes para regulação gênica diferenciada entre as proteínas NFAT. Além dessas interações, o NFAT1 TAD-C também é um sítio para modificações pós-traducionais específicas. A sumoilação nos resíduos K684 e K897 contribui para o aumento da sua atividade transcricional e da sua retenção no núcleo, respectivamente (Terui *et al.*, 2004). No presente estudo, nós demonstramos que o CA-NFAT1 depende de regiões específicas do seu TAD-C para induzir apoptose (Figuras 4.4 e 4.5), no entanto, ainda falta elucidar através de quais mecanismos o NFAT1 TAD-C contribui para indução de apoptose pelo CA-NFAT1.

O NFAT1 TAD-C parece ser particularmente importante para regulação gênica de alguns genes proapoptóticos. O receptor nuclear órfão Nur77, um ativador da via de apoptose mitocondrial, já foi descrito por induzir apoptose em timócitos imaturos e vários tipos de células tumorais (Liu *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010). Nur77 é capaz de converter Bcl-2, uma conhecida proteína antiapoptótica, em uma proteína proapoptótica (Lin *et al.*, 2004). A interação entre NFAT1 e o fator de transcrição MEF2 através do NFAT1 TAD-C é necessária para ativação do promotor de Nur77 (Youn *et al.*, 2000). Interessantemente, esta ativação é independente da ligação do NFAT1 ao DNA (Youn *et al.*, 2000). No entanto, já foi visto que, em células NIH3T3, uma proteína CA-NFAT1 incapaz de se ligar ao DNA não é capaz de induzir apoptose, indicando que a ligação ao DNA é necessária para

indução de morte celular via CA-NFAT1 (Faget *et al.*, 2012). Portanto, este estudo indica que o gene Nur77 não é ativado por CA-NFAT1 para induzir apoptose em fibroblastos NIH3T3, apesar do papel do NFAT1 TAD-C na ativação do promotor de Nur77.

O NFAT1 é expresso em células T periféricas, onde está envolvido na terminação da resposta imune através da morte celular induzida por ativação (AICD). AICD é uma forma de apoptose que é desencadeada pela ativação da via extrínseca através de um ligante. O NFAT1 é capaz de ativar a transcrição de dois desses ligantes, o FasL e o TNF- $\alpha$  (McCaffrey *et al.*, 1994; Latinis *et al.*, 1997). No entanto, o NFAT1 TAD-C é importante para ativação somente de TNF- $\alpha$  pelo NFAT1. O fator NFAT1 é capaz de se ligar ao elemento  $\kappa 3$  do promotor de TNF- $\alpha$  e ativar a sua transcrição (McCaffrey *et al.*, 1994). A ativação do promotor de TNF- $\alpha$  pelo NFAT1 já foi demonstrada por ser dependente do seu TAD-C, uma vez que o NFAT1 é capaz de induzir maior transativação do promotor de TNF- $\alpha$  quando comparado ao NFAT2/ $\alpha$  (Kaminuma *et al.*, 2008). Interessantemente, o NFAT2/ $\alpha$  só foi capaz de ativar o promotor de TNF- $\alpha$  tanto quanto o NFAT1, quando fusionado ao NFAT1 TAD-C (Kaminuma *et al.*, 2008). No entanto, a função específica do NFAT1 TAD-C na regulação de TNF- $\alpha$  ainda permanece desconhecida. A regulação do TNF- $\alpha$  pelo NFAT1 explica os fenótipos observados nas células NIH3T3 expressando CA-NFAT1 e a proteína quimérica CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 (Figuras 4.2 e 4.8). Vale ressaltar que nesse modelo a apoptose induzida por CA-NFAT1 é decorrente do aumento da expressão de TNF- $\alpha$  (Robbs *et al.*, 2013). Portanto, esses estudos e os resultados apresentados sugerem que a apoptose observada em fibroblastos NIH3T3 mediante a expressão da proteína quimérica CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 também é desencadeada pelo aumento da expressão TNF- $\alpha$ .

O mecanismo de AICD também pode ser desencadeado por TRAIL e FasL. O promotor de TRAIL possui diversos possíveis sítios de ligação para NFAT e a sua expressão em células T estimuladas é sensível a ciclosporina, um conhecido inibidor de calcineurina (Mariani e Krammer, 1998; Wang *et al.*, 2000). Além do mais, a expressão de CA-NFAT1 em células NIH3T3 estimuladas com PMA é capaz de aumentar a transcrição de TRAIL (Robbs *et al.*, 2013). Em conjunto, estes estudos indicam que TRAIL também pode ser ativado em células NIH3T3 pelo CA-NFAT1 em nosso modelo, apesar de ainda não haver evidências de que a ativação de TRAIL pelo CA-NFAT1 é dependente do TAD-C. O FasL é outro membro da família do fator de necrose tumoral e desempenha papéis cruciais em diversos processos imunológicos (Ettinger *et al.*, 1995). O NFAT1 presente em extratos nucleares de células T ativadas é capaz de se ligar a dois sítios dentro do promotor de FasL (Latinis *et al.*, 1997), e a expressão ectópica de NFAT1 ativa o promotor de FasL (Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998). Contudo, apesar de ter sido demonstrado que o CA-NFAT1 promove um aumento majoritário da transcrição de TNF- $\alpha$  em fibroblastos NIH3T3 selvagens, o NFAT1 é capaz de regular positivamente outros genes proapoptóticos em outros tipos celulares.

Dentro da perspectiva de que o CA-NFAT1 poderia induzir a expressão de diferentes genes indutores de apoptose, nós propusemos a sua utilização como forma de terapia gênica para o tratamento de tumores. Aqui, nós observamos que a transdução adenoviral, visando a superexpressão de CANFAT1, é capaz de promover mais intensamente a indução de apoptose em fibroblastos NIH3T3 do que a transdução retroviral, indicando que a opção pelo vetor adenoviral foi a mais adequada para levar ao rápido aumento da expressão do CA-NFAT1 (Figura 4.2 e 4.10) (Robbs *et al.*, 2013). No entanto, quando submetemos células de melanoma B16F10 ao tratamento com AdCANFAT1, nenhuma morte celular foi detectada

(Figura 4.11). Em oposição a nossa hipótese, em 2012, foi demonstrado que o silenciamento de NFAT1 é capaz de promover a apoptose em células de melanoma (Perotti *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado que a sinalização de NFAT1 na linhagem de melanoma A375SM contribui para o crescimento tumoral *in vivo* e para o processo de metástase (Braeuer *et al.*, 2012). Outros estudos indicam que a sinalização de NFAT também é importante no contexto das células do microambiente tumoral para promover metástase. Células B16F10 inoculadas em camundongos deficientes para NFAT1 fazem menos metástase para o pulmão (Werneck *et al.*, 2011). Corroborando esse estudo, foi visto que essas mesmas células quando inoculadas em camundongos deficientes para DSCR1, uma proteína inibidora da via de calcineurina/NFAT, formam um maior número de nódulos metastáticos nos pulmões (Minami *et al.*, 2013a). Em vista desses dados, a utilização de adenovírus AdCANFAT1 poderia promover metástase, uma vez que, mediante a aplicação de injeções intratumorais, células do estroma tumoral seriam, igualmente, transduzidas assim como as células tumorais.

Em células de mama, nós demonstramos também que duas linhagens tumorais (4T1 e MDA-MB-231) não sofrem apoptose mediante o aumento da expressão de CA-NFAT1 (Figura 4.12). No entanto, um estudo recente demonstrou que as células MDA-MB-231 superexpressando CA-NFAT1 formam tumores muito menores do que as células controle em modelos murinos de xenotransplante (Kaunisto *et al.*, 2015). Apesar da redução do volume tumoral mediante a expressão de CA-NFAT1 nesse modelo, o autor sugere que essa supressão tumoral ocorre por um mecanismo não-autônomo da célula tumoral, já que não observaram morte celular nem alterações no ciclo celular (Kaunisto *et al.*, 2015). Um outro estudo também aponta na direção de que o NFAT1 é um supressor tumoral, demonstrando que o silenciamento de NFAT1 induz a hiperproliferação de células tumorais de



mama T47D (Zheng *et al.*, 2011). No entanto, outros estudos apontam para direções opostas a essa. Em 2002, já havia sido mostrado que a superexpressão de NFAT1 em células de tumorais de mama MDA-MB-435 era capaz de promover migração celular e invasão (Jauliac *et al.*, 2002). Mais recentemente, foi visto que células 4T1, mediante o silenciamento de NFAT1, não alteram seu perfil de proliferação, mas, têm sua motilidade drasticamente reduzida (Quang *et al.*, 2015). Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que o silenciamento de NFAT1 também levou a uma redução do crescimento tumoral de 4T1 *in vivo* (Quang *et al.*, 2015). Além disso, a expressão de NFAT1 também está envolvida no aumento da resistência a quimioterápicos e da expressão da ubiquitina-ligase MDM2, importante regulador negativo de p53, em células MCF7 (Zhang *et al.*, 2012). Em conjunto, esses trabalhos indicam que o papel de NFAT1 no tumor de mama parece ser ambíguo. Embora, alguns trabalhos demonstrem atividades supressora de tumor para o NFAT1, outros aspectos aqui levantados demonstram que o NFAT1 também age em prol do desenvolvimento tumoral, promovendo migração, invasão tecidual e resistência a quimioterápicos.

O NFAT1 também é bem caracterizado por contribuir com o processo de inflamação que é essencial para o surgimento de vários tipos de câncer. Em especial para o tumor de cólon, a inflamação crônica é um fator primordial para o seu surgimento. Em 2012, foi demonstrado que células tumorais de cólon superexpressam NFAT1 (Gerlach *et al.*, 2012). Nesse mesmo trabalho, foi descrito que camundongos deficientes para NFAT1 desenvolviam menos tumores de cólon em um modelo murino associado a colite (Gerlach *et al.*, 2012). A diminuição da produção da citocina próinflamatória IL-6 em camundongos deficientes para NFAT1 foi determinante para a redução do número de tumores de cólon nesse modelo (Gerlach *et al.*, 2012). Além de IL-6, NFAT1 também regula positivamente uma outra

citocina pró-inflamatória, o TNF- $\alpha$ . Esta citocina, como já apresentada aqui, é capaz de ativar a via extrínseca da apoptose, mas também é capaz de levar ativação de NF $\kappa$ B. A via de NF $\kappa$ B é capaz de promover a transcrição de diferentes ciclinas e genes antiapoptóticos, contribuindo diretamente para a proliferação e sobrevivência celular. Além disso, essa via também é capaz de levar ao aumento de TNF- $\alpha$ , gerando um retroalimentação positiva, e de COX-2, enzima essencial na produção de prostaglandinas. Além disso, em 2012, foi visto que a expressão de NFAT1 em células de tumor de cólon HCT116 também induz ao aumento da expressão do oncogene MDM2 (Zhang *et al.*, 2012). Apesar de termos observado apoptose moderada nas linhagens tumorais de cólon testadas, esses trabalhos indicam que o NFAT1 está envolvido na regulação negativa de p53 e na manutenção de um microambiente inflamatório que é essencial para surgimento de tumores de cólon.

Como já abordado, anteriormente, nosso grupo demonstrou que a apoptose induzida pelo CA-NFAT1 em células NIH3T3 selvagens é mediada por TNF- $\alpha$ . Além do aumento de TNF- $\alpha$ , esse trabalho demonstrou que o CA-NFAT1 eleva também a expressão de TRAF1 e TRAIL em fibroblastos. A proteína TRAF1 é capaz de inibir a ativação de NF- $\kappa$ B via TNF- $\alpha$  como também pode contribuir para o processo de apoptose ao ser clivado pela caspase-8 (Lee e Choi, 2007). No presente estudo, observamos de forma consistente que todas as linhagens normais e tumorais testadas aumentam a expressão de TNF- $\alpha$  mediante o tratamento com AdCANFAT1 (Figura 4.15 e 4.16). Enquanto que a expressão TRAIL e TRAF1 permaneceu praticamente inalterada em quase todas as linhagens tumorais e normais testadas mediante a superexpressão de CA-NFAT1, exceto nas células NIH3T3 H-RasV12 onde a expressão de TRAF1 aumentou 26 vezes (Figura 4.15 e 4.16). O aumento de TNF- $\alpha$  e TRAF1 aliado à redução da expressão de Bcl-2, provavelmente, tornam os fibroblastos transformados NIH3T3 H-RasV12 bastante susceptíveis a apoptose

induzida por CA-NFAT1 (Figura 4.15). Por outro lado, somente o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  nas demais células testadas não parece ser o suficiente para induzir, intensamente, a apoptose. Além do mais, o aumento de TNF- $\alpha$ , isoladamente, pode contribuir para ativação da via de NF- $\kappa$ B promovendo proliferação, sobrevivência celular e inflamação. A apoptose induzida por TNF- $\alpha$  pode ser superada por diferentes mecanismos de sobrevivência em células tumorais, tais como as vias de sinalização desencadeadas pela superexpressão de  $\beta$ -catenina em células tumorais de cólon e pela amplificação de HER2, comum, em tumores de mama (Han *et al.*, 2013; Fouad *et al.*, 2014). A inflamação promovida pela sinalização de TNF- $\alpha$  também contribui para o surgimento e agravamento de tumores de mama e cólon (Popivanova *et al.*, 2008; Grivennikov e Karin, 2011; Fouad *et al.*, 2014). Além disso, o NFAT1 ativo, mediante estímulo de PMA e o ionomicina, eleva os níveis de COX-2 em células tumorais de mama (Yiu e Toker, 2006). Portanto, em conjunto esses trabalhos sugerem que o tratamento com AdCANFAT1 em células tumorais poderia contribuir para o aumento da inflamação tanto via TNF- $\alpha$  como através de prostaglandinas produzidas por COX-2.

Além dos estudos apresentados acima que demonstram a contribuição do NFAT1 em tumores de mama e cólon e melanoma, outros estudos recentes demonstram o envolvimento do NFAT1 no glioblastoma, no câncer de pulmão e de pâncreas. O silenciamento de NFAT1 diminui a invasão de células tumorais de pulmão SK-MES-1 e de glioblastoma U87 em um ensaio de Matrigel® (Liu *et al.*, 2013; Tie *et al.*, 2013). Já em câncer de pâncreas, a expressão de NFAT1 está associada à inibição da expressão de p15<sup>INK4b</sup>, um inibidor de CDK, e ao aumento da resistência à apoptose mediante tratamento quimioterápico (Baumgart *et al.*, 2012; Griesmann *et al.*, 2013). Desta forma, estes estudos corroboram a maioria dos

fenótipos observados mediante a expressão de NFAT1 em células tumorais nos demais trabalhos citados acima.

A iniciação e progressão tumoral envolvem contextos distintos de sinalização em diferentes tipos de câncer. Os fenótipos apresentados pelos camundongos deficientes para NFAT1 são claros ao demonstrar que a ausência de NFAT1 promove a hiperproliferação linfocitária, a redução na deleção de células T ativadas, o surgimento de condrosarcomas e linfomas e aumenta a susceptibilidade à carcinogênese química, indicando que o NFAT1 exerce um papel crucial suprimindo a iniciação de tumores (Hodge *et al.*, 1996; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Ranger *et al.*, 2000; Robbs *et al.*, 2008; May *et al.*, 2014). Corroborando estes fenótipos, o NFAT1 já foi descrito por regular a expressão de genes relacionados à progressão do ciclo celular, tais como ciclina A2 (Regulação Negativa), CDK4 (Regulação Negativa) e p21<sup>waf1</sup> (Regulação Positiva) (Santini *et al.*, 2001; Baksh *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2007). Além disso, como já relatado aqui, NFAT1 também regula positivamente diferentes genes proapoptóticos. Todos esses aspectos mencionados caracterizam o NFAT1 como um gene supressor de tumor. No entanto, os fenótipos apresentados por diferentes linhagens tumorais mediante a ativação ou supressão de NFAT1 indicam que a sua expressão também pode levar a células tumorais, já estabelecidas, a adquirir características agravadoras da doença que auxiliam na progressão tumoral, como a promoção de inflamação, a resistência a quimioterápicos e a capacidade metastática. Portanto, nós avaliamos também se o CA-NFAT1 seria capaz de induzir apoptose somente em células não transformadas. No entanto, células não tumorais de mama HME1 não sofreram apoptose mediante tratamento com AdCANFAT1, mesmo tendo aumentado os níveis de expressão de TNF- $\alpha$  (Figura 4.14 e 4.16). Este resultado aliado aos dados publicados sobre os camundongos deficientes para NFAT1 sugerem que a supressão tumoral de NFAT1

pode estar atrelada aos compartimentos linfocitário e mesenquimal, uma vez que células epiteliais de mama não sofrem apoptose mediante a superexpressão de CA-NFAT1 e camundongos nocautes para NFAT1 desenvolvem sarcomas e linfomas espontâneos.

Além do NFAT1, outras proteínas já descritas como oncoproteínas ou supressores tumorais também desempenham ambos os papéis em determinados contextos. O fator de transcrição c-Myc é amplamente conhecido como um oncogene por regular positivamente a expressão de diversas ciclinas contribuindo para a progressão do ciclo celular em células normais e cancerosas, mas também pode contribuir para expressão de genes proapoptóticos da família Bcl-2 tornando a célula susceptível à apoptose quando em privação de nutrientes (Prendergast, 1999; Hoffman e Liebermann, 2008). Mais recentemente, foi demonstrado que camundongos deficientes em p38 $\alpha$  MAPK são mais susceptíveis a indução de tumor colorretal associado a colite, no entanto, a deleção ou inibição de p38 $\alpha$  após a formação do tumor no mesmo modelo leva à redução da carga tumoral (Gupta *et al.*, 2014). Neste trabalho, foi demonstrado que a deleção de p38 $\alpha$ , anterior a formação tumoral, altera a permeabilidade do intestino o que correlaciona com um aumento do infiltrado inflamatório após o início do protocolo de formação de tumor, por outro lado, a deleção de p38 $\alpha$  após a formação do tumor leva à redução da proliferação e ao aumento da apoptose nessas células (Gupta *et al.*, 2014). Portanto, é possível que o NFAT1 se comporte de maneira semelhante contribuindo para a supressão tumoral ou para progressão tumoral em contextos específicos.

Interessantemente, é possível também que o papel duplo de NFAT1 no câncer não esteja, obrigatoriamente, relacionado a tipos celulares diferentes. Assim como nós demonstramos, aqui, que a fusão do NFAT1 TAD-C ao CA-NFAT2, o faz adquirir a capacidade de induzir apoptose em fibroblastos NIH3T3, a remoção do

NFAT1 TAD-C do CA-NFAT1 faz com que esta proteína passe a induzir hiperproliferação de fibroblastos NIH3T3 (Robbs *et al.*, 2008; Faget *et al.*, 2012). Além disso, fibroblastos NIH3T3 também hiperproliferam quando tratados com meio condicionado de culturas de fibroblastos NIH3T3 expressando CA-NFAT1, o que sugere que o fator CA-NFAT1, além de aumentar os níveis de TNF- $\alpha$ , regula positivamente algum fator mitógeno secretado (dados não publicados). Em vista disso, em conjunto com os resultados e estudos apresentados aqui, a superexpressão de CA-NFAT1 em células tumorais não parece ser uma alternativa terapêutica viável para a maioria dos tipos tumorais testados. Entretanto, vale ressaltar que para determinados tipos tumorais, como os tumores de cólon, a expressão de CA-NFAT1 pode levar a uma resposta terapêutica, uma vez que, que as células tumorais de cólon, testadas aqui, são susceptíveis a apoptose induzida por CA-NFAT1. Portanto, mais estudos ainda são necessários para caracterizar melhor os genes regulados por CA-NFAT1 nestas células e os aspectos moleculares envolvidos na susceptibilidade a apoptose induzida por CA-NFAT1.

## 6. CONCLUSÕES

- A apoptose induzida por CA-NFAT1 em fibroblastos depende de pelo menos dois domínios situados no TAD-C entre os aminoácidos 699 a 734 e 819 a 850.
- O CA-NFAT2, quando fusionado ao NFAT1 TAD-C, é capaz de promover apoptose.
- A expressão de CA-NFAT1 não induz apoptose em células de melanoma e tumorais de mama.
- A expressão de CA-NFAT1 promove apoptose moderada em células tumorais de cólon.
- A expressão de CA-NFAT1 leva ao aumento majoritário de TNF em diferentes linhagens celulares normais e tumorais.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, K. L.; FRIDAY, B. B.; THALLOOR, D. et al. Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. **Mol Biol Cell**, v. 9, n. 10, p. 2905-16, Oct 1998.

ALVAREZ, R. H.; VALERO, V.; HORTOBAGYI, G. N. Emerging targeted therapies for breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 20, p. 3366-79, Jul 10 2010.

AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 9, p. 1053-61, Sep 1999.

ANDERSON, W. F. Human gene therapy. **Science**, v. 256, n. 5058, p. 808-13, May 8 1992.

ARAMBURU, J.; GARCIA-COZAR, F.; RAGHAVAN, A. et al. Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. **Mol Cell**, v. 1, n. 5, p. 627-37, Apr 1998.

ASSUNCAO GUIMARAES, C.; LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 9, p. 1638-50, May 2004.

AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. **J Exp Med**, v. 79, n. 2, p. 137-58, Feb 1 1944.

BAKSH, S.; WIDLUND, H. R.; FRAZER-ABEL, A. A. et al. NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. **Mol Cell**, v. 10, n. 5, p. 1071-81, Nov 2002.

BARRETT, D. M.; GRUPP, S. A.; JUNE, C. H. Chimeric Antigen Receptor- and TCR-Modified T Cells Enter Main Street and Wall Street. **J Immunol**, v. 195, n. 3, p. 755-61, Aug 1 2015.

BAUMGART, S.; GLESEL, E.; SINGH, G. et al. Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer. **Gastroenterology**, v. 142, n. 2, p. 388-98 e1-7, Feb 2012.

BAZAN-PEREGRINO, M.; CARLISLE, R. C.; HERNANDEZ-ALCOCEBA, R. et al. Comparison of molecular strategies for breast cancer virotherapy using oncolytic adenovirus. **Hum Gene Ther**, v. 19, n. 9, p. 873-86, Sep 2008.

BEALS, C. R.; SHERIDAN, C. M.; TURCK, C. W. et al. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1930-4, Mar 28 1997.

BENEDITO, A. B.; LEHTINEN, M.; MASSOL, R. et al. The transcription factor NFAT3 mediates neuronal survival. **J Biol Chem**, v. 280, n. 4, p. 2818-25, Jan 28 2005.

BISCHOFF, J. R.; KIRN, D. H.; WILLIAMS, A. et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. **Science**, v. 274, n. 5286, p. 373-6, Oct 18 1996.



- BRAEUER, R. R.; ZIGLER, M.; KAMIYA, T. et al. Galectin-3 contributes to melanoma growth and metastasis via regulation of NFAT1 and autotaxin. **Cancer Res**, v. 72, n. 22, p. 5757-66, Nov 15 2012.
- BUCHHOLZ, M.; SCHATZ, A.; WAGNER, M. et al. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signaling pathway. **EMBO J**, v. 25, n. 15, p. 3714-24, Aug 9 2006.
- CAETANO, M. S.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; TEIXEIRA, L. K. et al. NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. **FASEB J**, v. 16, n. 14, p. 1940-2, Dec 2002.
- CALVO, F.; AGUDO-IBANEZ, L.; CRESPO, P. The Ras-ERK pathway: understanding site-specific signaling provides hope of new anti-tumor therapies. **Bioessays**, v. 32, n. 5, p. 412-21, May 2010.
- CARNEIRO, F. R.; RAMALHO-OLIVEIRA, R.; MOGNOL, G. P. et al. Interferon regulatory factor 2 binding protein 2 is a new NFAT1 partner and represses its transcriptional activity. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 14, p. 2889-901, Jul 2011.
- CARVALHO, L. D.; TEIXEIRA, L. K.; CARROSSINI, N. et al. The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. **Cell Cycle**, v. 6, n. 14, p. 1789-95, Jul 15 2007.
- CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends Cell Biol**, v. 18, n. 4, p. 157-64, Apr 2008.
- CHUVPILO, S.; JANKEVICS, E.; TYRSIN, D. et al. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 881-95, Jun 2002.
- CHUVPILO, S.; SCHOMBERG, C.; GERWIG, R. et al. Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. **Nucleic Acids Res**, v. 21, n. 24, p. 5694-704, Dec 11 1993.
- COCKERILL, G. W.; BERT, A. G.; RYAN, G. R. et al. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and E-selectin expression in endothelial cells by cyclosporin A and the T-cell transcription factor NFAT. **Blood**, v. 86, n. 7, p. 2689-98, Oct 1 1995.
- CRESS, W. D.; TRIEZENBERG, S. J. Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. **Science**, v. 251, n. 4989, p. 87-90, Jan 4 1991.
- DATASUS, R. F. D. B.-M. D. S.-. Índice de Mortalidade. 2013. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 13/07/2015.
- DHILLON, A. S.; HAGAN, S.; RATH, O. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-90, May 14 2007.
- DU, C.; FANG, M.; LI, Y. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 33-42, Jul 7 2000.
- EKERT, P. G.; SILKE, J.; HAWKINS, C. J. et al. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. **J Cell Biol**, v. 152, n. 3, p. 483-90, Feb 5 2001.

ESENSTEN, J. H.; TSYTSYKOVA, A. V.; LOPEZ-RODRIGUEZ, C. et al. NFAT5 binds to the TNF promoter distinctly from NFATp, c, 3 and 4, and activates TNF transcription during hypertonic stress alone. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 12, p. 3845-54, 2005.

ETTINGER, R.; PANKA, D. J.; WANG, J. K. et al. Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen. **J Immunol**, v. 154, n. 9, p. 4302-8, May 1 1995.

FAGET, D. V.; LUCENA, P. I.; ROBBS, B. K. et al. NFAT1 C-terminal domains are necessary but not sufficient for inducing cell death. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47868, 2012.

FALVO, J. V.; LIN, C. H.; TSYTSYKOVA, A. V. et al. A dimer-specific function of the transcription factor NFATp. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 50, p. 19637-42, Dec 16 2008.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 669-76, Jun 2003.

FOUAD, T. M.; KOGAWA, T.; REUBEN, J. M. et al. The role of inflammation in inflammatory breast cancer. **Adv Exp Med Biol**, v. 816, p. 53-73, 2014.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 107-20, Jan 2012.

GARCIA-RODRIGUEZ, C.; RAO, A. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). **J Exp Med**, v. 187, n. 12, p. 2031-6, Jun 15 1998.

GERLACH, K.; DANIEL, C.; LEHR, H. A. et al. Transcription factor NFATc2 controls the emergence of colon cancer associated with IL-6-dependent colitis. **Cancer Res**, v. 72, n. 17, p. 4340-50, Sep 1 2012.

GOLDFELD, A. E.; MCCAFFREY, P. G.; STROMINGER, J. L. et al. Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter. **J Exp Med**, v. 178, n. 4, p. 1365-79, Oct 1 1993.

GRAEF, I. A.; CHEN, F.; CHEN, L. et al. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. **Cell**, v. 105, n. 7, p. 863-75, Jun 29 2001.

GRIESMANN, H.; RIPKA, S.; PRALLE, M. et al. WNT5A-NFAT signaling mediates resistance to apoptosis in pancreatic cancer. **Neoplasia**, v. 15, n. 1, p. 11-22, Jan 2013.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Ann Rheum Dis**, v. 70 Suppl 1, p. i104-8, Mar 2011.

GUPTA, J.; DEL BARCO BARRANTES, I.; IGEA, A. et al. Dual function of p38alpha MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival. **Cancer Cell**, v. 25, n. 4, p. 484-500, Apr 14 2014.

GWACK, Y.; SHARMA, S.; NARDONE, J. et al. A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. **Nature**, v. 441, n. 7093, p. 646-50, Jun 1 2006.

HACEIN-BEY-ABINA, S.; LE DEIST, F.; CARLIER, F. et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. **N Engl J Med**, v. 346, n. 16, p. 1185-93, Apr 18 2002.

HACKETT, P. B.; LARGAESPADA, D. A.; COOPER, L. J. A transposon and transposase system for human application. **Mol Ther**, v. 18, n. 4, p. 674-83, Apr 2010.

HAN, J.; SOLETTI, R. C.; SADARANGANI, A. et al. Nuclear expression of beta-catenin promotes RB stability and resistance to TNF-induced apoptosis in colon cancer cells. **Mol Cancer Res**, v. 11, n. 3, p. 207-18, Mar 2013.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HE, T. C.; ZHOU, S.; DA COSTA, L. T. et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 5, p. 2509-14, Mar 3 1998.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, Oct 12 2000.

HERNANDEZ, G. L.; VOLPERT, O. V.; INIGUEZ, M. A. et al. 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**, v. 193, n. 5, p. 607-20, Mar 5 2001.

HO, A. M.; JAIN, J.; RAO, A. et al. Expression of the transcription factor NFATp in a neuronal cell line and in the murine nervous system. **J Biol Chem**, v. 269, n. 45, p. 28181-6, Nov 11 1994.

HO, I. C.; KIM, J. H.; ROONEY, J. W. et al. 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**, v. 95, n. 26, p. 15537-41, Dec 22 1998.

HODGE, M. R.; RANGER, A. M.; CHARLES DE LA BROUSSE, F. et al. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. **Immunity**, v. 4, n. 4, p. 397-405, Apr 1996.

HOFFMAN, B.; LIEBERMANN, D. A. Apoptotic signaling by c-MYC. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6462-72, Oct 27 2008.

HOLTZ-HEPPELMANN, C. J.; ALGECIRAS, A.; BADLEY, A. D. et al. Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. **J Biol Chem**, v. 273, n. 8, p. 4416-23, Feb 20 1998.

IMAMURA, R.; MASUDA, E. S.; NAITO, Y. et al. 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**, v. 161, n. 7, p. 3455-63, Oct 1 1998.

IRMLER, M.; THOME, M.; HAHNE, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature**, v. 388, n. 6638, p. 190-5, Jul 10 1997.

- JAIN, J.; BURGEON, E.; BADALIAN, T. M. et al. A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. **J Biol Chem**, v. 270, n. 8, p. 4138-45, Feb 24 1995.
- JAULIAC, S.; LOPEZ-RODRIGUEZ, C.; SHAW, L. M. et al. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 540-4, Jul 2002.
- KAMINUMA, O.; KITAMURA, F.; KITAMURA, N. et al. Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF-alpha gene expression in T cells. **J Immunol**, v. 180, n. 1, p. 319-26, Jan 1 2008.
- KANTOR, B.; BAILEY, R. M.; WIMBERLY, K. et al. Methods for gene transfer to the central nervous system. **Adv Genet**, v. 87, p. 125-97, 2014.
- KAUNISTO, A.; HENRY, W. S.; MONTASER-KOUHSARI, L. et al. NFAT1 promotes intratumoral neutrophil infiltration by regulating IL8 expression in breast cancer. **Mol Oncol**, v. 9, n. 6, p. 1140-54, Jun 2015.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972.
- KHAMMARI, A.; NGUYEN, J. M.; SAINT-JEAN, M. et al. Adoptive T cell therapy combined with intralesional administrations of TG1042 (adenovirus expressing interferon-gamma) in metastatic melanoma patients. **Cancer Immunol Immunother**, v. 64, n. 7, p. 805-15, Jul 2015.
- KIM, I.; XU, W.; REED, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 12, p. 1013-30, Dec 2008.
- KONDO, E.; HARASHIMA, A.; TAKABATAKE, T. et al. NF-ATc2 induces apoptosis in Burkitt's lymphoma cells through signaling via the B cell antigen receptor. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 1, p. 1-11, Jan 2003.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, Jan 2009.
- KUWANA, T.; BOUCHIER-HAYES, L.; CHIPUK, J. E. et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. **Mol Cell**, v. 17, n. 4, p. 525-35, Feb 18 2005.
- LANE, D. P.; CHEOK, C. F.; LAIN, S. p53-based cancer therapy. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 9, p. a001222, Sep 2010.
- LATINIS, K. M.; NORIAN, L. A.; ELIASON, S. L. et al. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. **J Biol Chem**, v. 272, n. 50, p. 31427-34, Dec 12 1997.
- LEBER, B.; LIN, J.; ANDREWS, D. W. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 897-911, May 2007.
- LEE, S. Y.; CHOI, Y. TRAF1 and its biological functions. **Adv Exp Med Biol**, v. 597, p. 25-31, 2007.

- LEHEN'KYI, V.; FLOURAKIS, M.; SKRYMA, R. et al. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. **Oncogene**, v. 26, n. 52, p. 7380-5, Nov 15 2007.
- LI, L. Y.; LUO, X.; WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 95-9, Jul 5 2001.
- LIN, B.; KOLLURI, S. K.; LIN, F. et al. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. **Cell**, v. 116, n. 4, p. 527-40, Feb 20 2004.
- LIU, J. F.; ZHAO, S. H.; WU, S. S. Depleting NFAT1 expression inhibits the ability of invasion and migration of human lung cancer cells. **Cancer Cell Int**, v. 13, n. 1, p. 41, 2013.
- LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, n. 1, p. 147-57, Jul 12 1996.
- LIU, Z. G.; SMITH, S. W.; MCLAUGHLIN, K. A. et al. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. **Nature**, v. 367, n. 6460, p. 281-4, Jan 20 1994.
- LORENZO, H. K.; SUSIN, S. A.; PENNINGER, J. et al. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 6, p. 516-24, Jun 1999.
- LUO, C.; BURGEON, E.; CAREW, J. A. et al. Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 7, p. 3955-66, Jul 1996a.
- LUO, C.; BURGEON, E.; RAO, A. Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1. **J Exp Med**, v. 184, n. 1, p. 141-7, Jul 1 1996b.
- MACIAN, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 6, p. 472-84, Jun 2005.
- MACIAN, F.; LOPEZ-RODRIGUEZ, C.; RAO, A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2476-89, Apr 30 2001.
- MANCINI, M.; TOKER, A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 11, p. 810-20, Nov 2009.
- MARAFIOTI, T.; POZZOBON, M.; HANSMANN, M. L. et al. 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**, v. 128, n. 3, p. 333-42, Feb 2005.
- MARIANI, S. M.; KRAMMER, P. H. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 5, p. 1492-8, May 1998.
- MASUDA, E. S.; IMAMURA, R.; AMASAKI, Y. et al. Signalling into the T-cell nucleus: NFAT regulation. **Cell Signal**, v. 10, n. 9, p. 599-611, Oct 1998.

MAXEINER, J. H.; KARWOT, R.; SAUER, K. et al. A key regulatory role of the transcription factor NFATc2 in bronchial adenocarcinoma via CD8+ T lymphocytes. **Cancer Res**, v. 69, n. 7, p. 3069-76, Apr 1 2009.

MAY, S. L.; ZHOU, Q.; LEWELLEN, M. et al. Nfatc2 and Tob1 have non-overlapping function in T cell negative regulation and tumorigenesis. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100629, 2014.

MCCAFFREY, P. G.; GOLDFELD, A. E.; RAO, A. The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor-alpha gene transcription. **J Biol Chem**, v. 269, n. 48, p. 30445-50, Dec 2 1994.

MCCAFFREY, P. G.; PERRINO, B. A.; SODERLING, T. R. et al. NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. **J Biol Chem**, v. 268, n. 5, p. 3747-52, Feb 15 1993.

MCCORMACK, M. P.; RABBITTS, T. H. Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. **N Engl J Med**, v. 350, n. 9, p. 913-22, Feb 26 2004.

MEDYOUF, H.; ALCALDE, H.; BERTHIER, C. et al. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Nat Med**, v. 13, n. 6, p. 736-41, Jun 2007.

MEDYOUF, H.; GHYSDAEL, J. The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. **Cell Cycle**, v. 7, n. 3, p. 297-303, Feb 1 2008.

MINAMI, T.; JIANG, S.; SCHADLER, K. et al. The calcineurin-NFAT-angiopoietin-2 signaling axis in lung endothelium is critical for the establishment of lung metastases. **Cell Rep**, v. 4, n. 4, p. 709-23, Aug 29 2013a.

MINAMI, T.; JIANG, S.; SCHADLER, K. et al. The Calcineurin-NFAT-Angiopoietin-2 Signaling Axis in Lung Endothelium Is Critical for the Establishment of Lung Metastases. **Cell Rep**, Aug 14 2013b.

MOJSA, B.; MORA, S.; BOSSOWSKI, J. P. et al. Control of neuronal apoptosis by reciprocal regulation of NFATc3 and Trim17. **Cell Death Differ**, v. 22, n. 2, p. 274-86, Feb 2015.

MONTAGUT, C.; SETTLEMAN, J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. **Cancer Lett**, v. 283, n. 2, p. 125-34, Oct 8 2009.

MURAKAMI, T.; SUNADA, Y. Plasmid DNA gene therapy by electroporation: principles and recent advances. **Curr Gene Ther**, v. 11, n. 6, p. 447-56, Dec 2011.

NEAL, J. W.; CLIPSTONE, N. A. A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 278, n. 19, p. 17246-54, May 9 2003.

NGUYEN, T. N.; KIM, L. J.; WALTERS, R. D. et al. The C-terminal region of human NFATc2 binds cJun to synergistically activate interleukin-2 transcription. **Mol Immunol**, v. 47, n. 14, p. 2314-22, Aug 2010.

OKAMURA, H.; ARAMBURU, J.; GARCIA-RODRIGUEZ, C. et al. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. **Mol Cell**, v. 6, n. 3, p. 539-50, Sep 2000.

- ORLICKY, D. J.; SCHAACK, J. Adenovirus transduction of 3T3-L1 cells. **J Lipid Res**, v. 42, n. 3, p. 460-6, Mar 2001.
- OUKKA, M.; HO, I. C.; DE LA BROUSSE, F. C. et al. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. **Immunity**, v. 9, n. 3, p. 295-304, Sep 1998.
- OUM, J. H.; HAN, J.; MYUNG, H. et al. Molecular mechanism of NFAT family proteins for differential regulation of the IL-2 and TNF-alpha promoters. **Mol Cells**, v. 13, n. 1, p. 77-84, Feb 28 2002.
- PEROTTI, V.; BALDASSARI, P.; BERSANI, I. et al. NFATc2 is a potential therapeutic target in human melanoma. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 11, p. 2652-60, Nov 2012.
- PHAM, L. V.; TAMAYO, A. T.; YOSHIMURA, L. C. et al. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3940-7, Dec 1 2005.
- POPIVANOVA, B. K.; KITAMURA, K.; WU, Y. et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 2, p. 560-70, Feb 2008.
- PRENDERGAST, G. C. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. **Oncogene**, v. 18, n. 19, p. 2967-87, May 13 1999.
- QUANG, C. T.; LÉBOUCHER, S.; PASSARO, D. et al. The calcineurin/NFAT pathway is activated in diagnostic breast cancer cases and is essential to survival and metastasis of mammary cancer cells. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1658, 2015.
- RANDAK, C.; BRABLETZ, T.; HERGENROTHER, M. et al. Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. **EMBO J**, v. 9, n. 8, p. 2529-36, Aug 1990.
- RANGER, A. M.; GERSTENFELD, L. C.; WANG, J. et al. The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. **J Exp Med**, v. 191, n. 1, p. 9-22, Jan 3 2000.
- RAO, A.; LUO, C.; HOGAN, P. G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 707-47, 1997.
- ROBBS, B. K.; CRUZ, A. L.; WERNECK, M. B. et al. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 23, p. 7168-81, Dec 2008.
- ROBBS, B. K.; LUCENA, P. I.; VIOLA, J. P. The transcription factor NFAT1 induces apoptosis through cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK pathway and upregulation of TNF-alpha expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 8, p. 2016-28, Aug 2013.
- ROBERTS, P. J.; DER, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3291-310, May 14 2007.
- ROSENBERG, S. A.; AEBERSOLD, P.; CORNETTA, K. et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. **N Engl J Med**, v. 323, n. 9, p. 570-8, Aug 30 1990.

SALVESEN, G. S.; DIXIT, V. M. Caspase activation: the induced-proximity model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 20, p. 10964-7, Sep 28 1999.

SAMATAR, A. A.; POULIKAKOS, P. I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 12, p. 928-42, Dec 2014.

SANTARPIA, L.; LIPPMAN, S. M.; EL-NAGGAR, A. K. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets**, v. 16, n. 1, p. 103-19, Jan 2012.

SANTINI, M. P.; TALORA, C.; SEKI, T. et al. 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**, v. 98, n. 17, p. 9575-80, Aug 14 2001.

SCHMITZ, M. L.; DOS SANTOS SILVA, M. A.; ALTMANN, H. et al. Structural and functional analysis of the NF-kappa B p65 C terminus. An acidic and modular transactivation domain with the potential to adopt an alpha-helical conformation. **J Biol Chem**, v. 269, n. 41, p. 25613-20, Oct 14 1994.

SCHUH, K.; KNEITZ, B.; HEYER, J. et al. Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 8, p. 2456-66, Aug 1998.

SHAW, J. P.; UTZ, P. J.; DURAND, D. B. et al. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. **Science**, v. 241, n. 4862, p. 202-5, Jul 8 1988.

SHIELDS, J. M.; PRUITT, K.; MCFALL, A. et al. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. **Trends Cell Biol**, v. 10, n. 4, p. 147-54, Apr 2000.

SHOU, J.; JING, J.; XIE, J. et al. Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment. **Cancer Lett**, v. 361, n. 2, p. 174-84, Jun 1 2015.

SNOWDEN, A. W.; PERKINS, N. D. Cell cycle regulation of the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. **Biochem Pharmacol**, v. 55, n. 12, p. 1947-54, Jun 15 1998.

SZEGEZDI, E.; FITZGERALD, U.; SAMALI, A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1010, p. 186-94, Dec 2003.

TAMM, I.; KIKUCHI, T. Activation of signal transduction pathways protects quiescent Balb/c-3T3 fibroblasts against death due to serum deprivation. **J Cell Physiol**, v. 148, n. 1, p. 85-95, Jul 1991.

TEIXEIRA, L. K.; FONSECA, B. P.; VIEIRA-DE-ABREU, A. et al. IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. **J Immunol**, v. 175, n. 9, p. 5931-9, Nov 1 2005.

TERUI, Y.; SAAD, N.; JIA, S. et al. Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 27, p. 28257-65, Jul 2 2004.

TIE, X.; HAN, S.; MENG, L. et al. NFAT1 Is Highly Expressed in, and Regulates the Invasion of, Glioblastoma Multiforme Cells. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66008, 2013.



TSAI, E. Y.; YIE, J.; THANOS, D. et al. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 10, p. 5232-44, Oct 1996.

UEFFING, N.; SCHUSTER, M.; KEIL, E. et al. Up-regulation of c-FLIP short by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 690-8, Aug 1 2008.

ULLERAS, E.; KARLBERG, M.; MOLLER WESTERBERG, C. et al. NFAT but not NF-kappaB is critical for transcriptional induction of the prosurvival gene A1 after IgE receptor activation in mast cells. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 3081-9, Mar 15 2008.

ULLMAN, K. S.; NORTHROP, J. P.; VERWEIJ, C. L. et al. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. **Annu Rev Immunol**, v. 8, p. 421-52, 1990.

VASHISHTA, A.; HABAS, A.; PRUUNSILD, P. et al. Nuclear factor of activated T-cells isoform c4 (NFATc4/NFAT3) as a mediator of antiapoptotic transcription in NMDA receptor-stimulated cortical neurons. **J Neurosci**, v. 29, n. 48, p. 15331-40, Dec 2 2009.

VERHAGEN, A. M.; EKERT, P. G.; PAKUSCH, M. et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 43-53, Jul 7 2000.

VERIN, A. D.; LIU, F.; BOGATCHEVA, N. et al. Role of ras-dependent ERK activation in phorbol ester-induced endothelial cell barrier dysfunction. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, n. 2, p. L360-70, Aug 2000.

VIHMA, H.; PRUUNSILD, P.; TIMMUSK, T. Alternative splicing and expression of human and mouse NFAT genes. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 279-91, Nov 2008.

WANG, D. Z.; MCCAFFREY, P. G.; RAO, A. The cyclosporin-sensitive transcription factor NFATp is expressed in several classes of cells in the immune system. **Ann N Y Acad Sci**, v. 766, p. 182-94, Sep 7 1995.

WANG, Q.; JI, Y.; WANG, X. et al. Isolation and molecular characterization of the 5'-upstream region of the human TRAIL gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 276, n. 2, p. 466-71, Sep 24 2000.

WEI, M. C.; LINDSTEN, T.; MOOTHA, V. K. et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. **Genes Dev**, v. 14, n. 16, p. 2060-71, Aug 15 2000.

WEINBERG, R. A. The Rational Treatment of Cancer. In: SCIENCE, G. (Ed.). **The Biology of Cancer**. 2 ed. New York: Garland Science, 2014. cap. 16, p.797-876.

WERNECK, M. B.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; CHAMMAS, R. et al. NFAT1 transcription factor is central in the regulation of tissue microenvironment for tumor metastasis. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, n. 4, p. 537-46, Apr 2011.

WERNER, A. B.; DE VRIES, E.; TAIT, S. W. et al. Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. **J Biol Chem**, v. 277, n. 25, p. 22781-8, Jun 21 2002.

WHO, W. H. O.-. Mortality and global health estimates - Projection of number of deaths. 2015. Disponível em: < <http://apps.who.int/gho/data/node.main.PROJNUMWORLD?lang=en> >. Acesso em: 13/07/2015.

WORONICZ, J. D.; LINA, A.; CALNAN, B. J. et al. Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 11, p. 6364-76, Nov 1995.

WU, X.; NGUYEN, B. C.; DZIUNYCZ, P. et al. Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 368-72, May 20 2010.

XANTHOUDAKIS, S.; VIOLA, J. P.; SHAW, K. T. et al. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. **Science**, v. 272, n. 5263, p. 892-5, May 10 1996.

XIANG, Z.; AHMED, A. A.; MOLLER, C. et al. Essential role of the prosurvival bcl-2 homologue A1 in mast cell survival after allergic activation. **J Exp Med**, v. 194, n. 11, p. 1561-69, Dec 3 2001.

XIE, J.; GUO, X.; LIU, F. et al. In vitro antitumor immune response induced by dendritic cells transduced with human livin alpha recombinant adenovirus. **Cell Immunol**, Jun 19 2015.

YANG, H.; BUSHUE, N.; BU, P. et al. Induction and intracellular localization of Nur77 dictate fenretinide-induced apoptosis of human liver cancer cells. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 7, p. 948-54, Apr 1 2010.

YANG, Y.; XU, H.; HUANG, W. et al. Targeting lung cancer stem-like cells with TRAIL gene armed oncolytic adenovirus. **J Cell Mol Med**, v. 19, n. 5, p. 915-23, May 2015.

YIU, G. K.; TOKER, A. NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. **J Biol Chem**, v. 281, n. 18, p. 12210-7, May 5 2006.

YOELI-LERNER, M.; CHIN, Y. R.; HANSEN, C. K. et al. Akt/protein kinase b and glycogen synthase kinase-3beta signaling pathway regulates cell migration through the NFAT1 transcription factor. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 3, p. 425-32, Mar 2009.

YOELI-LERNER, M.; YIU, G. K.; RABINOVITZ, I. et al. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. **Mol Cell**, v. 20, n. 4, p. 539-50, Nov 23 2005.

YOUN, H. D.; CHATILA, T. A.; LIU, J. O. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. **EMBO J**, v. 19, n. 16, p. 4323-31, Aug 15 2000.

YU, H.; KUMAR, S. M.; FANG, D. et al. Nuclear orphan receptor TR3/Nur77 mediates melanoma cell apoptosis. **Cancer Biol Ther**, v. 6, n. 3, p. 405-12, Mar 2007.

ZAICHUK, T. A.; SHROFF, E. H.; EMMANUEL, R. et al. Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. **J Exp Med**, v. 199, n. 11, p. 1513-22, Jun 7 2004.

ZHANG, X.; ZHANG, Z.; CHENG, J. et al. Transcription factor NFAT1 activates the mdm2 oncogene independent of p53. **J Biol Chem**, v. 287, n. 36, p. 30468-76, Aug 31 2012.

ZHANG, Z. L.; ZOU, W. G.; LUO, C. X. et al. An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy. **Cell Res**, v. 13, n. 6, p. 481-9, Dec 2003.

ZHENG, J.; FANG, F.; ZENG, X. et al. Negative cross talk between NFAT1 and Stat5 signaling in breast cancer. **Mol Endocrinol**, v. 25, n. 12, p. 2054-64, Dec 2011.

ZHU, J.; SHIBASAKI, F.; PRICE, R. et al. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 851-61, May 29 1998.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther**, v. 92, n. 1, p. 57-70, Oct 2001.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo I

Faget, D.V.; Lucena, P.I.; Robbs, B.K.; Viola, J.P.B. **NFAT1 C-Terminal Domains are Necessary but not Sufficient for Inducing Cell Death.** PLoS One, v. 7, n. 10, p. e47868, 2012.

### 8.2 Anexo II

Amarante-Mendes, G.P.; Jacysyn, J.F.; Faget, D.V.; Pereira, W.O.; Weinlich, R.; Viola, J.P.B. **Capítulo 9: Eventos Significativos na Vida das Células: Ciclo Celular, Proliferação e Quantificação de Morte.** In: Citometria de Fluxo – Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa. Ed: Atheneu, 2013, p. 91-103  
ISBN: 9788538804222

# NFAT1 C-Terminal Domains Are Necessary but Not Sufficient for Inducing Cell Death

Douglas V. Faget, Pedro I. Lucena, Bruno K. Robbs, João P. B. Viola\*

Program of Cellular Biology, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

## Abstract

The proteins belonging to the nuclear factor of activated T cells (NFAT) family of transcription factors are expressed in several cell types and regulate genes involved in differentiation, cell cycle and apoptosis. NFAT proteins share two conserved domains, the NFAT-homology region (NHR) and a DNA-binding domain (DBD). The N- and C-termini display two transactivation domains (TAD-N and TAD-C) that have low sequence similarity. Due to the high sequence conservation in the NHR and DBD, NFAT members have some overlapping roles in gene regulation. However, several studies have shown distinct roles for NFAT proteins in the regulation of cell death. The TAD-C shows low sequence similarity among NFAT family members, but its contribution to specific NFAT1-induced phenotypes is poorly understood. Here, we described at least two regions of NFAT1 TAD-C that confer pro-apoptotic activity to NFAT1. These regions extend from amino acids 699 to 734 and 819 to 850 of NFAT1. We also showed that the NFAT1 TAD-C is unable to induce apoptosis by itself and requires a functional DBD. Furthermore, we showed that when fused to NFAT1 TAD-C, NFAT2, which is associated with cell transformation, induces apoptosis in fibroblasts. Together, these results suggest that the NFAT1 TAD-C includes NFAT death domains that confer to different NFAT members the ability to induce apoptosis.

**Citation:** Faget DV, Lucena PI, Robbs BK, Viola JPB (2012) NFAT1 C-Terminal Domains Are Necessary but Not Sufficient for Inducing Cell Death. PLoS ONE 7(10): e47868. doi:10.1371/journal.pone.0047868

**Editor:** Roger Chammas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brazil

**Received:** March 28, 2012; **Accepted:** September 24, 2012; **Published:** October 26, 2012

**Copyright:** © 2012 Faget et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants to J.P.B.V. from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (CRP/BRA09-01), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (478780/2010-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (102.357/2009) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Câncer (573806/2008-0 and 170.026/2008). D.V.F. and B.K.R. were supported by a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and P.I.L. was supported by a fellowship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: jpvioa@inca.gov.br

## Introduction

The proteins belonging to the nuclear factor of activated T cells (NFAT) family of transcription factors were first reported to play a central role in transcription during immune responses. However, after the isolation and characterization of each protein of the NFAT family, it became clear that their expression was not restricted to T cells. At least one member of the NFAT family is expressed by almost every cell type that has been examined, including immune and non-immune cells [1]. The NFAT family consists of four calcium-responsive proteins named NFAT1 (NFATc2/NFATp), NFAT2 (NFATc1/NFATc), NFAT3 (NFATc4) and NFAT4 (NFATc3/NFATx). The regulation of NFAT by calcium influx is mediated by the NFAT homology region (NHR) [2]. This region is highly phosphorylated in resting cells, maintaining NFAT in an inactivated state in the cytoplasm [2]. Through sustained increases of intracellular calcium, NFAT is activated by calcineurin-mediated dephosphorylation and translocates to the nucleus. NFAT proteins also contain a highly conserved DNA-binding domain (DBD), which mediates binding to the DNA core sequence (A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N [2]. In addition to the DNA-binding and regulatory domains, NFAT proteins include two transactivation domains (TAD) located at the N- and C-termini [2,3]. These regions show relatively low sequence conservation among NFAT family members and may confer different regulatory ability of gene expression.

NFAT transcription factors are well-characterized for their role in the regulation of genes related to immune responses, such as interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-13, IL-21, IL-22, GM-CSF and interferon- $\gamma$  [2,4]. However, NFAT proteins have also been reported to regulate a wide range of genes involved in cell differentiation [5], cell cycle [6,7,8] and apoptosis [9,10,11]. Due to their high sequence conservation in the NHR and DBD, NFAT members play some overlapping roles in gene regulation [12,13]. Nevertheless, non-redundant roles are evident in the phenotypes observed in individual NFAT knockout mice. Six-month old NFAT1 deficient mice show lymphocyte hyper-proliferation and an increased size of lymphoid organs [14,15,16]. In addition, mice lacking NFAT1 show retarded thymic involution and a reduction in the deletion of activated CD4<sup>+</sup> T cells, indicating a possible defect in activation-induced cell death (AICD) [16]. In contrast, NFAT2 deficient mice die before day 14.5 of gestation due to a failure to develop normal cardiac valves and septa [17,18]. However, in the RAG-2<sup>-/-</sup> complementation system, NFAT2 deficient T cells show impaired proliferation and secretion of IL-4 [19]. The divergent roles of NFAT members have been further characterized elsewhere [20]. It has previously been shown that NFAT1 and NFAT2 have opposing effects in tumorigenesis [20]. The constitutively active form of NFAT1 (CA-NFAT1) induces cell cycle arrest and apoptosis in NIH3T3 fibroblasts and inhibits H-rasV12-induced transformation [20]. On the other hand, CA-NFAT2 induces cell transformation and tumor growth in allograft

models [20,21]. Interestingly, the long C-terminus TAD (TAD-C) of NFAT1 was shown to be essential for the divergent phenotypes induced by NFAT1 and NFAT2 [20]. In fact, the induction of apoptosis by NFAT1 in NIH3T3 fibroblasts is dependent on its TAD-C [20].

The NFAT1 TAD-C is composed of 248 amino acid residues and extends from amino acid residue 679 to 927. Here, we investigated the amino acid residues and putative domains of NFAT1 TAD-C that are required for NFAT1-induced apoptosis in NIH3T3 fibroblasts. We found at least two regions of the NFAT1 TAD-C that confer the pro-apoptotic activity of NFAT1. These regions comprise amino acids 699 to 734 and 819 to 850 from NFAT1. We also showed that NFAT1 TAD-C is unable to induce apoptosis by itself and requires a functional NFAT DBD. Furthermore, we showed that when fused to NFAT1 TAD-C, NFAT2, an NFAT member associated with cell transformation [20,21], induces apoptosis in fibroblasts. Together, these results suggest that the NFAT1 TAD-C includes NFAT death domains that mediate the induction of apoptosis by different NFAT members.

## Materials and Methods

### Cell Culture

NIH3T3 cells (ATCC, Manassas, VA) were maintained in Dulbecco's modified medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin-streptomycin, essential and nonessential amino acids, sodium pyruvate, vitamins, HEPES and  $\beta$ -mercaptoethanol (All from Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified environment.

### Plasmid Construction

The retroviral expression vector pLIREs-EGFP was used to express CA-NFAT1 (Figure S1), CA-NFAT2 (Figure S1), CA-NFAT1-MutDBD, CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 chimera and each CA-NFAT1 construct described below. The plasmids pLIREs-EGFP, pLIREs-EGFP-CA-NFAT1, pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927 (pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 $\Delta$ C) and pLIREs-EGFP-CA-NFAT2/ $\alpha$  have been previously described [20,22]. To clone the CA-NFAT1 constructs CA-NFAT1 $\Delta$ 759-927, CA-NFAT1 $\Delta$ 819-927 and CA-NFAT1 $\Delta$ 889-927 with TAD-C deletions into the retroviral vector pLIREs-EGFP, we amplified portions of CA-NFAT1 by PCR (to amino acid residues 758, 818 or 888, respectively) using an anti-sense primer adapted with an EcoRV restriction site. The amplicon was cleaved by XhoI and EcoRV and inserted into pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 cleaved by XhoI and NruI. These constructs were made using pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 as a backbone to maintain the nuclear localization signal of the SV40 T antigen located at the C-terminus. The CA-NFAT1 constructs CA-NFAT1 $\Delta$ 699-758, CA-NFAT1 $\Delta$ 699-818, CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850, CA-NFAT1 $\Delta$ 699-888 and CA-NFAT1 $\Delta$ 735-850 were constructed by inserting an HpaI restriction site within CA-NFAT1 at two points of interest corresponding to the amino acid positions specified in their names with the GeneTailor Site Directed Mutagenesis system (Invitrogen, Carlsbad, CA). Then, the mutated CA-NFAT1 was cleaved by HpaI and ligated, thereby deleting the amino acids residues between the HpaI sites. NFAT1 691-927 cDNA was amplified by PCR, using CA-NFAT1 as a template and a sense primer adapted with a new initiation codon. Later, this amplicon was inserted into the retroviral vector pLIREs-EGFP. The CA-NFAT2 TAD-C NFAT1 chimera was constructed in two steps. First, the NFAT1-TAD-C cDNA was amplified by PCR using pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 as template and a sense primer adapted with an XhoI

restriction site and cloned into the retroviral vector pLIREs-EGFP, creating pLIREs-EGFP-NFAT1-TAD-C. Second, the CA-NFAT2 cDNA was amplified by PCR until the end of its DBD using pLIREs-EGFP-CA-NFAT2/ $\alpha$  as a template and an anti-sense primer adapted with an XhoI restriction site and cloned in-frame into pLIREs-EGFP-NFAT1-TAD-C, constructing pLIREs-EGFP-CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1. The CA-NFAT1-MutDBD was constructed by mutating the amino acids residues of arginine, tyrosine and glutamate in positions 423, 426 and 429, respectively, to alanine, using the GeneTailor Site-Directed Mutagenesis system (Invitrogen). These amino acid residues from the highly conserved recognition loop present in the DBD have been shown to be essential for DNA contact [23]. All of the constructs were confirmed by restriction enzyme mapping and DNA sequencing. All of the primer sequences are available upon request.

### Production of Recombinant Retroviruses and Infection of NIH3T3 Cells

The BD EcoPack2 ecotropic packaging cell line (BD Biosciences, San Jose, CA) was transiently transfected with a retroviral vector by calcium phosphate precipitation for 24 h. The virus-containing cell supernatant was collected 48 h after transfection, supplemented with 8  $\mu$ g/ml Polybrene (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) and immediately used for spin infection (twice for 45 min each time at 400 $\times$ g at room temperature) of 2.5 $\times$ 10<sup>4</sup> NIH3T3 cells. The infected cells were incubated at 37°C for an additional 24 h and trypsinized, and the efficiency of transduction was assessed by enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression using flow cytometry analysis. For the CA-NFAT1 and NFAT1 691-927 co-expression experiments, cells were first infected with NFAT 691-927 expression vector, and 48 h after the infection, co-infected with CA-NFAT1 or empty vector. The efficiency of transduction was analyzed for NFAT1 691-927 expression by EGFP expression prior to the second round of infection and for CA-NFAT1 using intracellular staining with the NFAT1 polyclonal antibody anti-67.1 [24] and rhodamine-labeled anti-rabbit immunoglobulin G (KPL, Gaithersburg, MD) by flow cytometric analyses. To ensure reproducibility, each experiment was repeated using cells derived from independent viral infections.

### Cell Proliferation Assay

To assess proliferation, 8 $\times$ 10<sup>3</sup> NIH3T3 wild-type cells infected with either the control pLIREs-EGFP or pLIREs-EGFP-NFAT construct virus were plated in triplicate in 96-well microtiter plates. Cell proliferation was analyzed at the indicated times by crystal violet. The crystal violet incorporation assay was performed by 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 spectrophotometer at 595 nm (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### Cell Cycle and Sub-G0 Analysis

To assess the cell cycle and the sub-G0 DNA content, 2.4 $\times$ 10<sup>4</sup> or 2.4 $\times$ 10<sup>5</sup> NIH3T3 cells were plated in six-well microtiter plates, 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  $\mu$ M) in the presence of NP-40. Analysis of the DNA content was performed by collecting 10,000 events for cell cycle analysis or 15,000 events for sub-G0 analysis using a FACScalibur flow cytometer and CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA).

### Pyknotic Nuclei Formation Analysis

NIH3T3 cells infected with either pLIREs-EGFP or pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 viruses were fixed with paraformaldehyde (4%) at room temperature for 15 minutes. Then, the cells were incubated in wash buffer (PBS 1x, 0.5% NP-40, 5% FBS) for one hour for membrane permeabilization. Later, the cells were incubated in DAPI solution (300 nM) for 1 min and visualized with an Olympus BX60 fluorescence microscope.

### Annexin-V Staining

To assess the level of exposed phosphatidylserine,  $2.4 \times 10^5$  NIH3T3 cells infected with either pLIREs-EGFP or pLIREs-EGFP-NFAT virus were plated in six-well microtiter plates, trypsinized 24 h later, washed with PBS, stained with APC-conjugated annexin-V (BD Biosciences, San Jose, CA), and analyzed by flow cytometry.

### Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

The NFAT1 DBD recombinant protein was expressed as previously described [23]. The NFAT1 mutated DNA-binding domain (MutDBD) was expressed following the same protocol used for the wild type DBD. The DBD and MutDBD were then purified under native conditions with Ni-NTA spin columns according to the manufacturer's instructions (Qiagen, West Sussex, United Kingdom). The proteins were eluted in 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM NaCl and 300 mM imidazole. Oligonucleotide duplexes (5.0  $\mu$ g of each oligo) were generated by denaturation for 10 min at 95°C in hybridization buffer (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl) followed by overnight hybridization at room temperature. Oligonucleotides (50 ng) were labeled for 1 hour at 37°C with 10 U T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Ipswich, MA) and 50  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Later, probes were purified with MicroSpin™ G-25 columns (GE Healthcare). Increasing amounts of purified NFAT1 DBD or NFAT1 MutDBD protein (10 nM, 100 nM, 500 nM and 1  $\mu$ M) were incubated with the indicated labeled oligonucleotides (20,000 counts/min) and 0.2  $\mu$ g/reaction of poly(dI:dC) (Amersham Biosciences) in a total volume of 20  $\mu$ L of binding buffer (10 mM HEPES pH 7.0, 125 mM NaCl, 10% glycerol, 0.25 mM DTT, 0.8 mg/mL BSA) for 20 min at room temperature. DNA-protein complexes were separated by electrophoresis under nondenaturing conditions on a 4% polyacrylamide gel in 1x TBE buffer. Later, the gel was dried onto Whatman filter paper and analyzed by autoradiography. The following oligonucleotide was used for the IL-2 promoter: 5' GCCCAAAGAGGAAAATTTGTTTCATACAG 3'.

### Transactivation Assay

Jurkat cells ( $2 \times 10^6$  cells/600  $\mu$ l) were electroporated (950  $\mu$ F, 250 V) in a 0.4 cm GenePulser Cuvette with GenePulser II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The cells were co-transfected with three different plasmids in serum-free media, as follows: (1) the indicated retroviral vectors (10  $\mu$ g), (2) the pGL4.30 reporter plasmid (2  $\mu$ g) (Promega, Madison, WI), and (3) the pRL-TK *Renilla* expression plasmid for normalization (0.2  $\mu$ g) (Promega). After 24 hours, cells were harvested and lysed for 15 min at room temperature with 50  $\mu$ l of 1x cell culture lysis reagent (Promega). Crude extracts (20  $\mu$ l) were added to 30  $\mu$ l of luciferase assay substrate (Promega), and luciferase activity was promptly measured in a Veritas Microplate Luminometer (Promega). Luciferase activities were expressed as relative light units (RLU).

### Western Blot

Total protein from  $4 \times 10^5$  NIH3T3 cells was obtained from cells lysis 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 15 min. Total cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and the separated proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. The antibodies used were as follows: GAPDH monoclonal antibody 6C5 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), NFAT1 polyclonal antibody anti-67.1 [24] or anti-T2B1 [25] and NFAT2 monoclonal antibody 7A6 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Immunodetection was performed with the ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare).

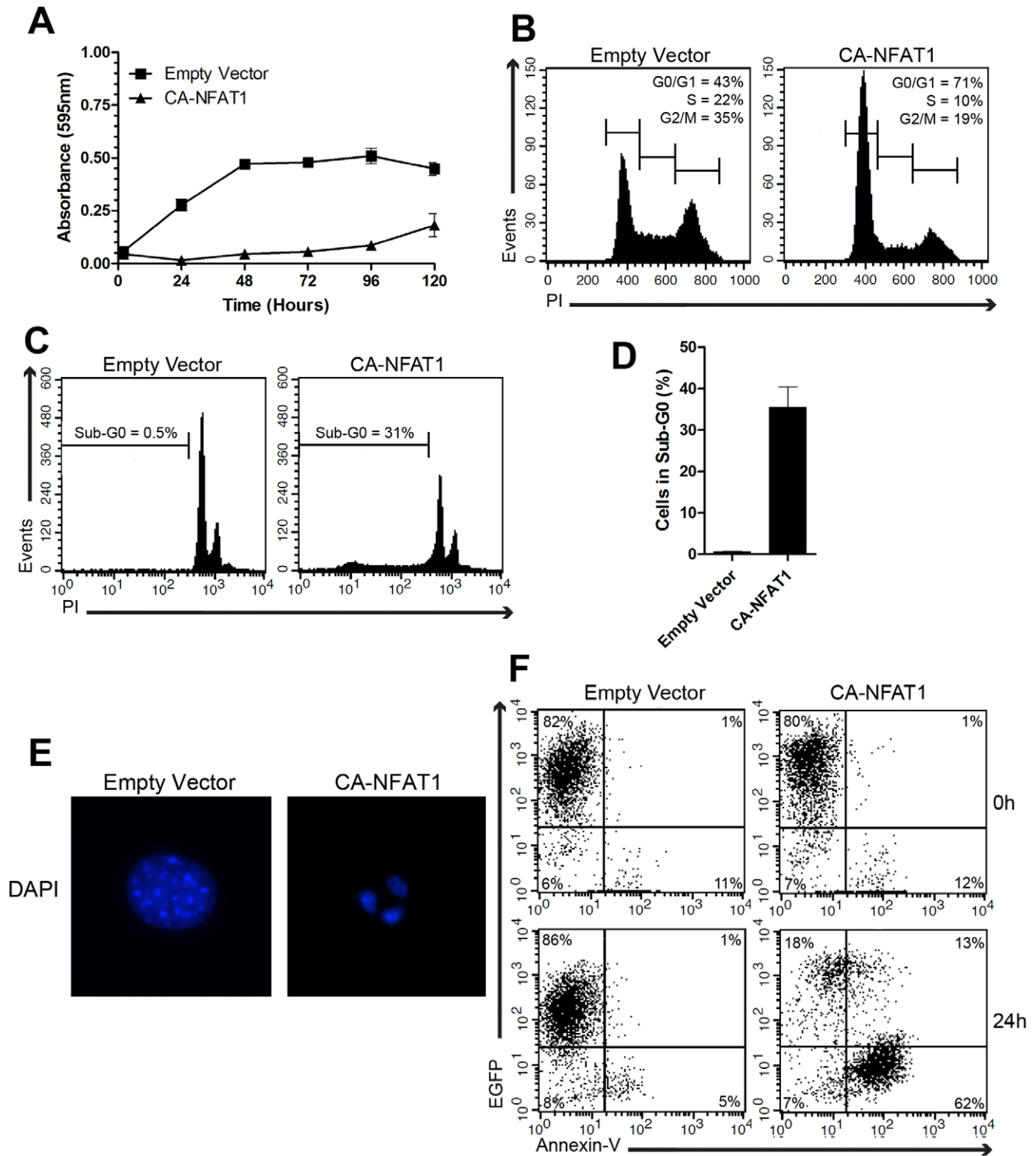
## Results

### CA-NFAT1 Expression in NIH3T3 Fibroblasts Induces Apoptosis

To study the role of the NFAT1 TAD-C in NFAT1-induced cell death, we used the previously described constitutively active form of NFAT1 isoform C (CA-NFAT1) [20,26]. CA-NFAT1 has several mutations of serine residues to alanine in the NHR that prevent its phosphorylation and consequent inactivation (Figure S1). Expression analysis showed that the CA-NFAT1 is restricted to the nucleus and is able to transactivate an NFAT responsive promoter in a luciferase gene-reporter assay allowing the analysis of the phenotype induced by CA-NFAT1 in the absence of external stimuli (data not shown). Retroviral transduction was used to introduce CA-NFAT1 into NIH3T3 cells, and >80% transduction was regularly achieved (data not shown).

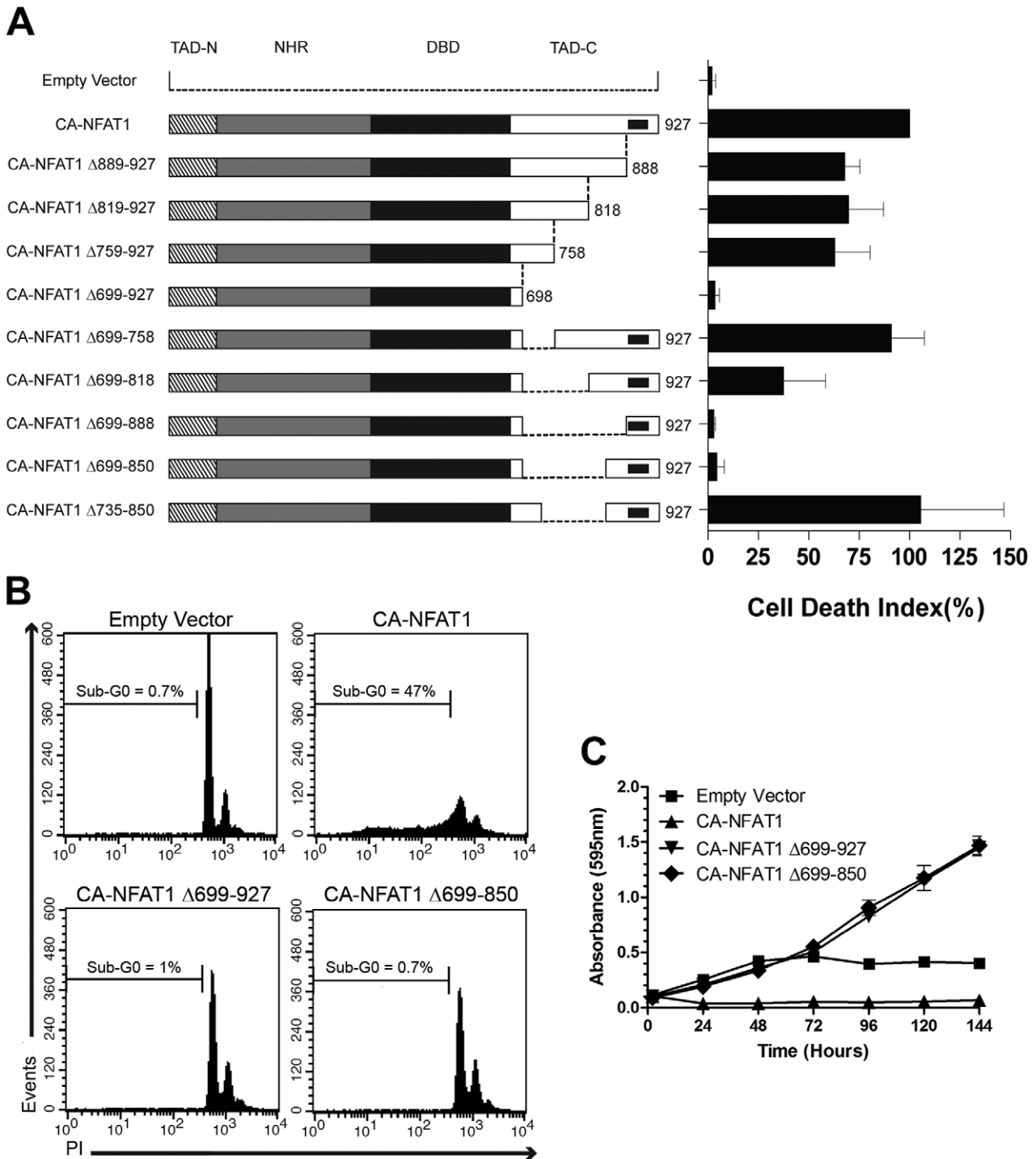
To evaluate the induction of apoptosis by NFAT1, NIH3T3 cells were infected with empty vector (control) or a CA-NFAT1-expressing vector. First, proliferation was assessed by crystal violet incorporation, which correlates with total cell number. While NIH3T3 cells transduced with empty vector proliferated until confluence, CA-NFAT1-expressing cells had low proliferation levels and showed a reduction in total cell number (Figure 1A). Next, to assess whether the low proliferation levels observed in CA-NFAT1-expressing NIH3T3 cells reflects a reduction in the number of cells entering the cell cycle, we evaluated the cell cycle profile 24 hours after plating by propidium iodide staining. Cell cycle analysis revealed that CA-NFAT1 expression arrested cells at G0/G1 phase of the cell cycle (Figure 1B).

In addition to a low proliferation rate, we also observed a reduction in the total number of CA-NFAT1-expressing cells. Thus, we next assessed the presence of apoptotic features in NIH3T3 cells, as NFAT1 has been reported to induce the expression of apoptotic genes [9,10,11]. The sub-G0 DNA content of NIH3T3 cells infected with the empty vector or CA-NFAT1-expressing vector was evaluated by propidium iodide staining to examine DNA fragmentation. As shown in Figures 1C and 1D, control cells showed a low percentage of cells with sub-G0 DNA content. On the other hand, 48 hours after plating, approximately 30% of the CA-NFAT1-expressing cells had sub-G0 DNA content (Figure 1C and 1D), suggesting that CA-NFAT1 expression induces apoptosis of NIH3T3 fibroblasts. To better characterize the phenotype induced by CA-NFAT1, we assessed pyknotic nuclei formation, another indication of apoptosis. In agreement with the sub-G0 DNA content analysis, we observed pyknotic nuclei formation in CA-NFAT1-expressing NIH3T3 cells, while the control cells did not contain pyknotic nuclei as determined by fluorescence microscopy (Figure 1E). Furthermore, the expression of CA-NFAT1 in NIH3T3 cells resulted in high phosphatidylserine exposure, another well-known feature of apoptosis (Figure 1F).

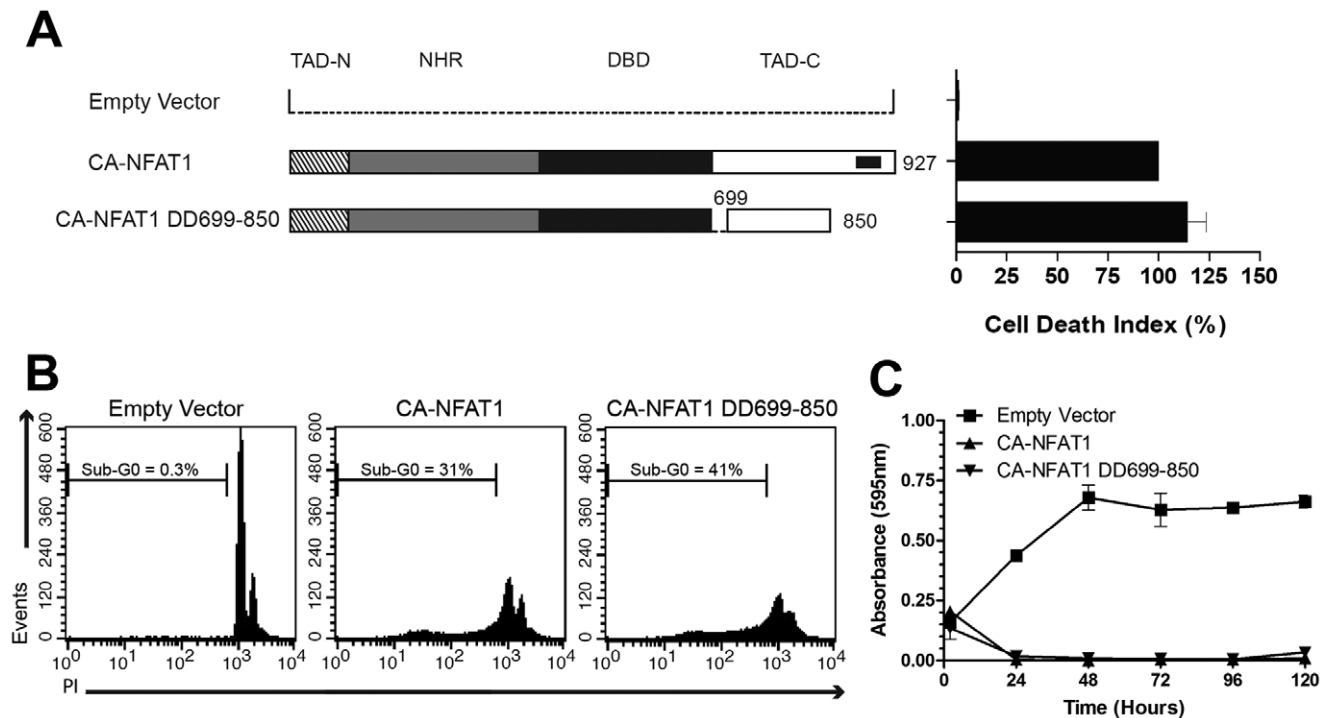


**Figure 1. CA-NFAT1 expression induces cell cycle arrest and apoptosis in NIH3T3 fibroblasts.** NIH3T3 cells were transduced with empty vector or retrovirus expressing CA-NFAT1 and subjected to proliferation, cell death and cell cycle assays. (A) Proliferation was assessed by incorporation of crystal violet. The cells were plated in triplicate and analyzed for proliferation for 120 hours. This graph is representative of three independent experiments. (B, C, D) NIH3T3 cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry for cell cycle and death. (B) Cell cycle was analyzed by the incorporation of propidium iodide (PI). The cells were plated in triplicate and analyzed 24 hours after plating. The percentage of cells in each phase of the cell cycle is indicated in the graphs. (C) Analysis of cell death 48 hours after plating. The percentage of cells in sub-G0 is shown in the graph. (D) The graph shows the average percentage of cells in sub-G0 from three independent experiments. (E) Analysis of pyknotic nuclei by DAPI staining. Cells were stained 48 hours after plating and visualized by fluorescence microscopy. (F) Analysis of phosphatidylserine exposure 24 hours after plating. The cells were stained with APC-conjugated annexin-V and analyzed by flow cytometry. The graph showing annexin-V staining and EGFP fluorescence is representative of three independent experiments.  
doi:10.1371/journal.pone.0047868.g001





**Figure 2. The deletion of amino acids 699 to 850 of TAD-C prevents the induction of apoptosis by CA-NFAT1.** NIH3T3 cells were transduced with empty vector or retrovirus expressing CA-NFAT1 or the indicated CA-NFAT1 truncated proteins. (A, B) NIH3T3 cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry for cell death. (A) Analysis of cell death 48 hours after plating. The graph shows the average levels of cell death observed in three independent experiments. This graph was normalized by setting the percentage of cells with sub-G0 DNA content induced by CA-NFAT1 to 100%. The cell death index shown is the ratio of the percentage of cells in sub-G0 induced by empty vector or the indicated CA-NFAT1 construct and the percentage of cells in sub-G0 induced by full-length CA-NFAT1. A schematic of full-length CA-NFAT1 and the truncated CA-NFAT1 proteins is shown. The crosshatched bar represents TAD-N (N-terminal transactivation domain), the grey bar represents NHR (NFAT-homology region), the black bar represents the DBD (DNA-binding domain), and the white bar represents the TAD-C (C-terminal transactivation domain). (B) Representative graph of sub-G0 DNA content of NIH3T3 cells transduced with empty vector or retrovirus expressing CA-NFAT1, CA-NFAT1  $\Delta$ 699-927 or CA-NFAT1  $\Delta$ 699-850. The percentage of cells in sub-G0 is shown in the graph. (C) Proliferation was assessed by incorporation of crystal violet. The cells were plated in triplicate and analyzed for 144 hours. This graph is representative of three independent experiments.  
doi:10.1371/journal.pone.0047868.g002



**Figure 3. The amino acids 699 to 850 of TAD-C are sufficient to provide to CA-NFAT1 the ability to induce apoptosis.** NIH3T3 cells were transduced with empty vector or retrovirus expressing CA-NFAT1 or CA-NFAT1 DD699-850. (A, B) NIH3T3 cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry for cell death. (A) Analysis of cell death 48 hours after plating. The graph shows the average levels of cell death observed in three independent experiments. This graph was normalized by setting the percentage of cells with sub-G0 DNA content induced by CA-NFAT1 to 100%. The cell death index shown is the ratio of the percentage of cells in sub-G0 induced by the indicated CA-NFAT1 construct and the percentage of cells in sub-G0 induced by full-length CA-NFAT1. A schematic of full-length CA-NFAT1 and CA-NFAT1 DD699-850 proteins is shown. (B) Representative graph of sub-G0 DNA content of NIH3T3 cells transduced with empty vector or retrovirus expressing CA-NFAT1 or CA-NFAT1 DD699-850. The percentage of cells in sub-G0 is shown in the graph. (C) Proliferation was assessed by incorporation of crystal violet. The cells were plated in triplicate and analyzed for 120 hours. This graph is representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0047868.g003

Approximately 75% of the CA-NFAT1-expressing cells were positive for annexin-V 24 hours after plating (Figure 1F). In contrast, a low percentage of cells infected with empty retrovirus was positive for annexin-V (Figure 1F). Together, these data suggest that CA-NFAT1 induces cell cycle arrest and apoptosis in NIH3T3 fibroblasts.

### The Deletion of Amino Acid Residues 699 to 850 of the NFAT1 TAD-C Abolishes CA-NFAT1-induced Apoptosis

The NFAT transactivation domains are not well conserved among NFAT family members [2], and the NFAT1 C-terminus transactivation (NFAT1 TAD-C) domain has been shown to be responsible for some of the differences of NFAT-mediated gene regulation [11,27,28]. Indeed, we have previously shown that the ability of CA-NFAT1 to induce apoptosis is dependent on its TAD-C [20]. However, it is not known which amino acid residues of the TAD-C are required for CA-NFAT1-induced apoptosis. To better understand the role of the TAD-C in NFAT1-induced apoptosis, we mapped the TAD-C amino acids residues required by NFAT1 to induce apoptosis. To this end, we constructed several CA-NFAT1 truncated proteins that lack different regions of the NFAT1 TAD-C. The CA-NFAT1 truncated proteins were named according to the amino acid residues deleted. All of the CA-NFAT1 truncated protein showed similar expression levels and had the expected molecular weight (Figure S2).

To evaluate the ability of these CA-NFAT1 truncated proteins to induce apoptosis, we performed sub-G0 DNA content analysis

of NIH3T3 cells expressing each construct. First, we observed that CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927, which lacks the TAD-C, completely lost the ability to induce apoptosis, in contrast to full length CA-NFAT1, indicating that the NFAT1 TAD-C is essential for induction of apoptosis by CA-NFAT1 in our model (Figure 2A and 2B). On the other hand, CA-NFAT1 $\Delta$ 759-927 induced apoptosis, similar to CA-NFAT1, indicating that the amino acid residues required for CA-NFAT1-mediated apoptosis are between amino acids 699 to 758 (Figure 2A). However, the truncated protein CA-NFAT1 $\Delta$ 699-758, which lacks amino acids 699 to 758, was still able to induce apoptosis, suggesting the existence of multiple regions of the NFAT1 TAD-C that play a role in NFAT1-mediated apoptosis (Figure 2A). This hypothesis was supported by the phenotypes induced by CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850 and CA-NFAT1 $\Delta$ 699-818. CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850 failed to induce apoptosis in NIH3T3 cells, similar to CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927 (Figure 2A and 2B). On the other hand, CA-NFAT1 $\Delta$ 699-818 induced a moderate degree of cell death when compared to the full-length CA-NFAT1, indicating that amino acids 819 to 850 also play a role in NFAT1-induced apoptosis (Figure 2A). Next, we added 35 amino acid residues from positions 699 to 734 to the CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850 construct, creating CA-NFAT1 $\Delta$ 735-850. CA-NFAT1 $\Delta$ 735-850 induced high levels of apoptosis, similar to the full-length CA-NFAT1 (Figure 2A). Together, these results showed that the removal of amino acids 699 to 850 prevents the induction of apoptosis by CA-NFAT1 and suggest that there are at least two domains within TAD-C, between amino acids 699 to 734

and 819 to 850, which mediate CA-NFAT1-induced apoptosis. To further investigate the role of these two domains located between amino acids 699 and 850, we constructed a CA-NFAT1 truncated protein containing only amino acids 699 to 850 from TAD-C (CA-NFAT1 DD699-850) and assessed its ability to induce apoptosis by sub-G0 DNA content analysis. When expressed in NIH3T3 fibroblasts, CA-NFAT1 DD699-850 induced apoptosis similarly to CA-NFAT1 (Figure 3A and 3B). CA-NFAT1 DD699-850 expression also reduced proliferation in a CA-NFAT1-like manner (Figure 3C). Therefore, these results suggest that this region of TAD-C plays a critical role in NFAT1-induced apoptosis.

We also assessed whether there are different roles in apoptosis for NFAT1 splice variants that are divergent in their TAD-C. NFAT1 isoforms B and C are the predominant isoforms in T cells [25]. NFAT1 isoform B diverges in its TAD-C from NFAT1 isoform C at amino acid residue 907. Despite this divergence, sub-G0 DNA content analysis indicated that the constitutively active form of NFAT1 isoform B induced apoptosis in NIH3T3 cells in a manner similar to CA-NFAT1 isoform C (data not shown). This result suggests that both NFAT1 isoforms B and C induce apoptosis and corroborates our conclusion that the NFAT1 TAD-C region required to induce apoptosis is located between amino acids 699 to 850. Moreover, we also evaluated the role of non-constitutively active form of NFAT1 protein on trigger apoptosis. As shown in Figure S3, wild-type NFAT1 was not able to induce apoptosis when expressed in NIH3T3 fibroblasts upon stimulation with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and ionomycin. However, we cannot rule out the role of NFAT1 protein in apoptosis induction, since the PMA plus ionomycin stimulation may trigger survival pathways that could prevent cell death [29]. Furthermore, this result may indicate that sustained activity of NFAT1 is required for induction of cell death.

In addition to the suppression of apoptosis, deletion of the NFAT1 TAD-C has been shown to induce hyper-proliferation in fibroblasts [20]. To assess whether the removal of amino acids 699 to 850 of CA-NFAT1 induces hyper-proliferation, NIH3T3 cells infected with empty vector, CA-NFAT1, CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850 or CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927 were analyzed for proliferation. This assay revealed that CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927, which lacks the NFAT1 TAD-C, and CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850, which fails to induce apoptosis, were able to induce hyper-proliferation of NIH3T3 cells (Figure 2B and 2C). The CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927- and CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850-expressing cells proliferated beyond confluence, while the CA-NFAT1-expressing cells did not (Figure 2C). Taken together, these results further support the role of amino acid residues 699 to 850 in NFAT1-induced apoptosis and suggest that there is a duality of NFAT1 that regulates both proliferation and cell death.

### Overexpression of the NFAT1 C-terminus Peptide is Unable to Prevent CA-NFAT1-mediated Apoptosis

The apoptosis induced by CA-NFAT1 is dependent on amino acid residues 699 to 850 of the NFAT1 TAD-C (Figure 2), however, it is unclear whether the NFAT1 TAD-C alone can induce apoptosis. To assess this hypothesis, we constructed a retroviral vector expressing the NFAT1 C-terminus peptide, NFAT1 691-927. This protein was fused to the nuclear localization signal of the SV40 T antigen for constitutive localization in the nucleus (data not shown). A schematic alignment of NFAT1 and NFAT1 691-927 is shown in Figure 4A. Next, NIH3T3 cells were infected with empty vector or CA-NFAT1- or NFAT1 691-927-expressing vectors, and the cells were subjected to proliferation assays. We observed that the NFAT1 691-927-expressing cells and control cells proliferated

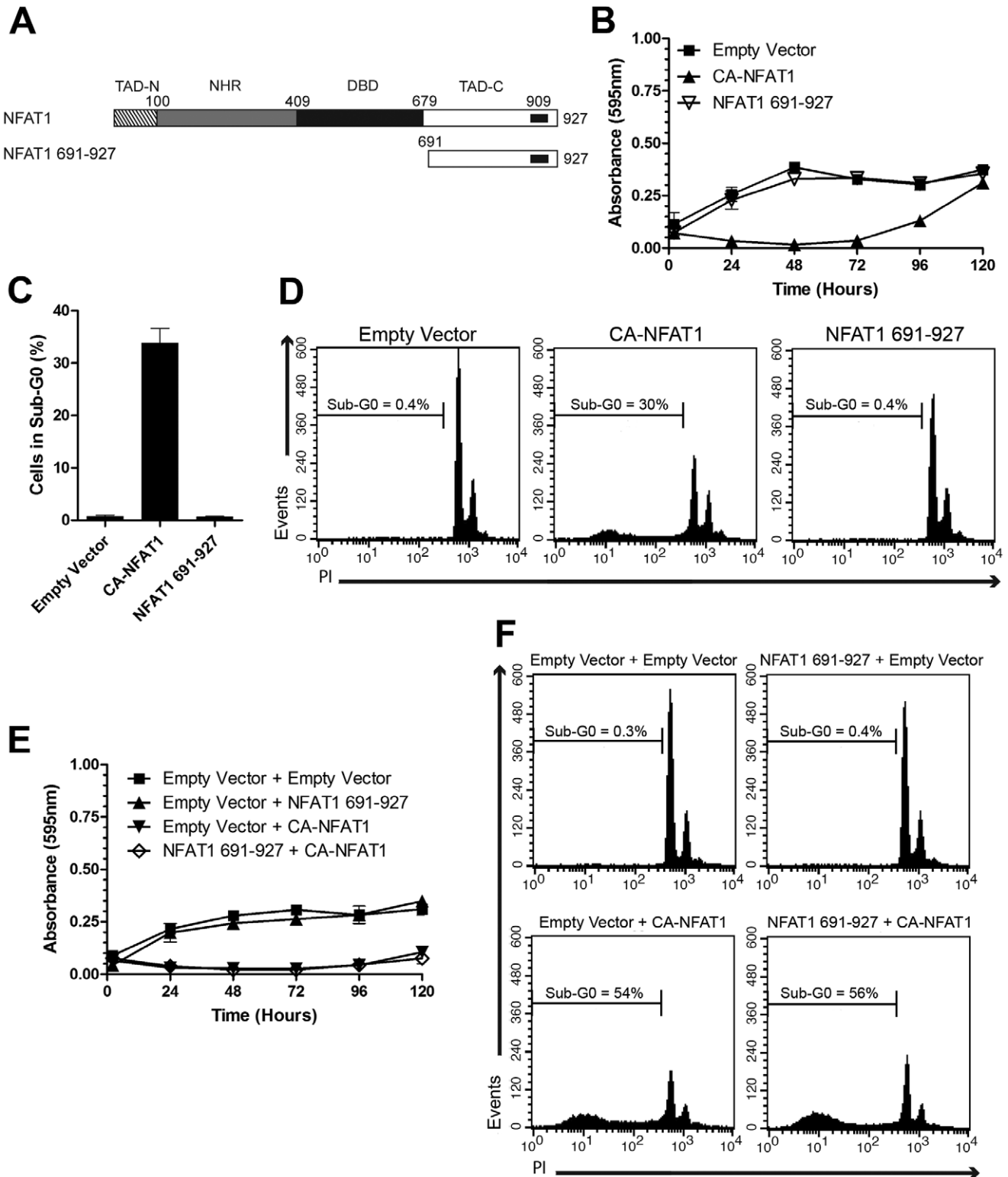
until confluence, in contrast to the CA-NFAT1-expressing cells, indicating that NFAT1 691-927 is unable to induce apoptosis (Figure 4B). These results were later confirmed by sub-G0 DNA content analysis. The NFAT1 691-927-expressing cells had a low percentage of cells with sub-G0 DNA content, which was similar to control cells (Figure 4C and 4D). However, approximately 30% of the CA-NFAT1-expressing cells had sub-G0 DNA content 48 hours after plating (Figure 4C and 4D). Together, these data demonstrate that NFAT1 691-927 does not trigger apoptosis by itself, indicating that other CA-NFAT1 domains are required.

NFAT transcription factors interact with several transcription partners that are important integrators of the calcineurin/NFAT pathway with other signaling pathways [1]. The induction of apoptosis by CA-NFAT1 could be dependent on interaction between the NFAT1 TAD-C and an NFAT partner. Therefore, we hypothesized that NFAT1 691-927 may act as a dominant negative of CA-NFAT1 by competing for the binding to an NFAT partner. To test this hypothesis, NIH3T3 cells were infected with empty vector or the NFAT1 691-927 vector, and co-infected with empty vector or the CA-NFAT1-expressing vector 48 hours later. As shown in Figures 4E and 4F, the NIH3T3 cells that were co-infected with empty retrovirus and CA-NFAT1-expressing cells revealed low levels of proliferation and high levels of DNA fragmentation. Similarly, the NIH3T3 cells that were co-infected with CA-NFAT1 and NFAT1 691-927 vectors displayed low proliferation (Figure 4E) and high percentages of cells with sub-G0 DNA content (Figure 4F), indicating that NFAT1 691-927 does not act as a dominant negative of CA-NFAT1.

### The Induction of Apoptosis by CA-NFAT1 is Dependent on DNA Binding

The main function of the NFAT family members is to regulate the expression of genes. It has been postulated that NFAT proteins depend entirely on their ability to bind to DNA to regulate gene expression. Therefore, to test whether CA-NFAT1-induced apoptosis is dependent on NFAT1-mediated transcriptional activation, we constructed a CA-NFAT1 mutant that is unable to bind to DNA, CA-NFAT1 MutDBD. A schematic representation of CA-NFAT1 MutDBD is shown in Figure 5A. CA-NFAT1 MutDBD expression in NIH3T3 cells was confirmed by Western Blot (Figure 5B). Then, to confirm that the NFAT1 MutDBD cannot bind DNA, we performed an electrophoretic mobility shift assay. As shown in Figure 5C, wild-type NFAT1 DBD was able to bind to DNA in a dose-dependent manner, while NFAT1 MutDBD was unable to bind to DNA at any of the concentrations tested. Further, luciferase gene reporter assays were performed to confirm that the CA-NFAT1 MutDBD cannot activate gene expression. While CA-NFAT1 induced transactivation of an NFAT-responsive luciferase promoter that was 130-fold higher than that of the control, the empty vector and CA-NFAT1 MutDBD induced similarly low levels of transactivation, indicating that CA-NFAT1 MutDBD is unable to bind DNA and transactivate NFAT-responsive promoters (Figure 5D).

To assess whether CA-NFAT1 MutDBD induces cell death, NIH3T3 cells were infected with empty vector or CA-NFAT1 or CA-NFAT1 MutDBD vectors, and cell proliferation was assessed. As shown in Figure 5E, the CA-NFAT1-expressing cells showed a low rate of proliferation and a reduction in total cell number. However, the CA-NFAT1 MutDBD-expressing cells proliferated until confluence, similar to control cells (Figure 5E), demonstrating that CA-NFAT1 MutDBD is unable to induce cell death in NIH3T3 cells. To confirm this finding, the NIH3T3 cells infected with empty vector or CA-NFAT1 or CA-NFAT1 MutDBD vectors were assessed for sub-G0 DNA content by propidium



**Figure 4. The overexpression of NFAT1 691-927 does not prevent the induction of apoptosis by CA-NFAT1.** (A) Schematic representation of the primary structure of NFAT1 and NFAT1 691-927. See Figure 2A for detailed information. (B, C, D) NIH3T3 cells were transduced with empty vector or retrovirus expressing CA-NFAT1 or NFAT1 691-927. (B) Proliferation was assessed by incorporation of crystal violet. NIH3T3 cells were plated in triplicate and analyzed for 120 hours. This graph is representative of three independent experiments. (C, D) NIH3T3 cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed for cell death 48 hours after plating. The graph shows the average percentage of cells in sub-G0 determined in three independent experiments. (D) Representative graph of cell death analysis shown in (C). The percentage of cells in sub-G0 is shown in the graph. (E, F) NIH3T3 cells transduced with empty vector or retrovirus expressing NFAT1 691-927 were re-infected with empty vector or retrovirus expressing CA-NFAT1 and subjected to proliferation and cell death assays. (E) Proliferation was assessed by incorporation of crystal violet. The cells were plated in triplicate and analyzed for 120 hours. This graph is representative of three

independent experiments. (F) Cell death analysis 48 hours after plating. NIH3T3 cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry for cell death. The percentage of cells with sub-G0 DNA content is shown in the graph. doi:10.1371/journal.pone.0047868.g004

iodide staining. The CA-NFAT1-expressing cells had a high percentage of cells with sub-G0 DNA content, while the control cells and CA-NFAT1 MutDBD-expressing cells showed low levels of sub-G0 DNA content, indicating that CA-NFAT1 MutDBD does not induce apoptosis in NIH3T3 cells (Figure 5F and 5G). Taken together, these results demonstrate that CA-NFAT1-mediated apoptosis in NIH3T3 cells requires DNA binding of NFAT1.

### Fusion of the NFAT1 TAD-C to CA-NFAT2 Confers the Ability to Induce Apoptosis

The NFAT transactivation domains have low conservation among NFAT family members and may confer different gene expression regulatory abilities. It has previously been shown that NFAT1 and NFAT2 have opposing effects on cell proliferation and death [20]. CA-NFAT1 induces cell cycle arrest and apoptosis in NIH3T3 fibroblasts [20], while CA-NFAT2 induces cell proliferation and protects cells from dying [20,21]. The NFAT2 protein possesses a short TAD-C, and the long C-terminus of NFAT1 has been shown to be essential for the divergent phenotypes induced by NFAT1 and NFAT2 [20]. Thus, we assessed whether the NFAT1 TAD-C could induce apoptosis when fused to CA-NFAT2 and reverse the phenotype induced by CA-NFAT2 in NIH3T3 cells.

To this end, we fused the NFAT1 TAD-C to CA-NFAT2, creating the chimeric protein expression vector named CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1. A schematic alignment of NFAT1, NFAT2 and the chimeric protein is shown in Figure 6A. Then, we performed Western Blot to assess whether the chimeric CA-NFAT2 protein includes the NFAT1 TAD-C. As shown in Figure 6B, the anti-NFAT1 antibody that recognizes the NFAT1 TAD-C recognized both CA-NFAT1 and CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 (left panel), and the anti-NFAT2 antibody detected the expression of CA-NFAT2 and CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 (right panel), indicating that the CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 chimeric protein is expressed in NIH3T3 cells.

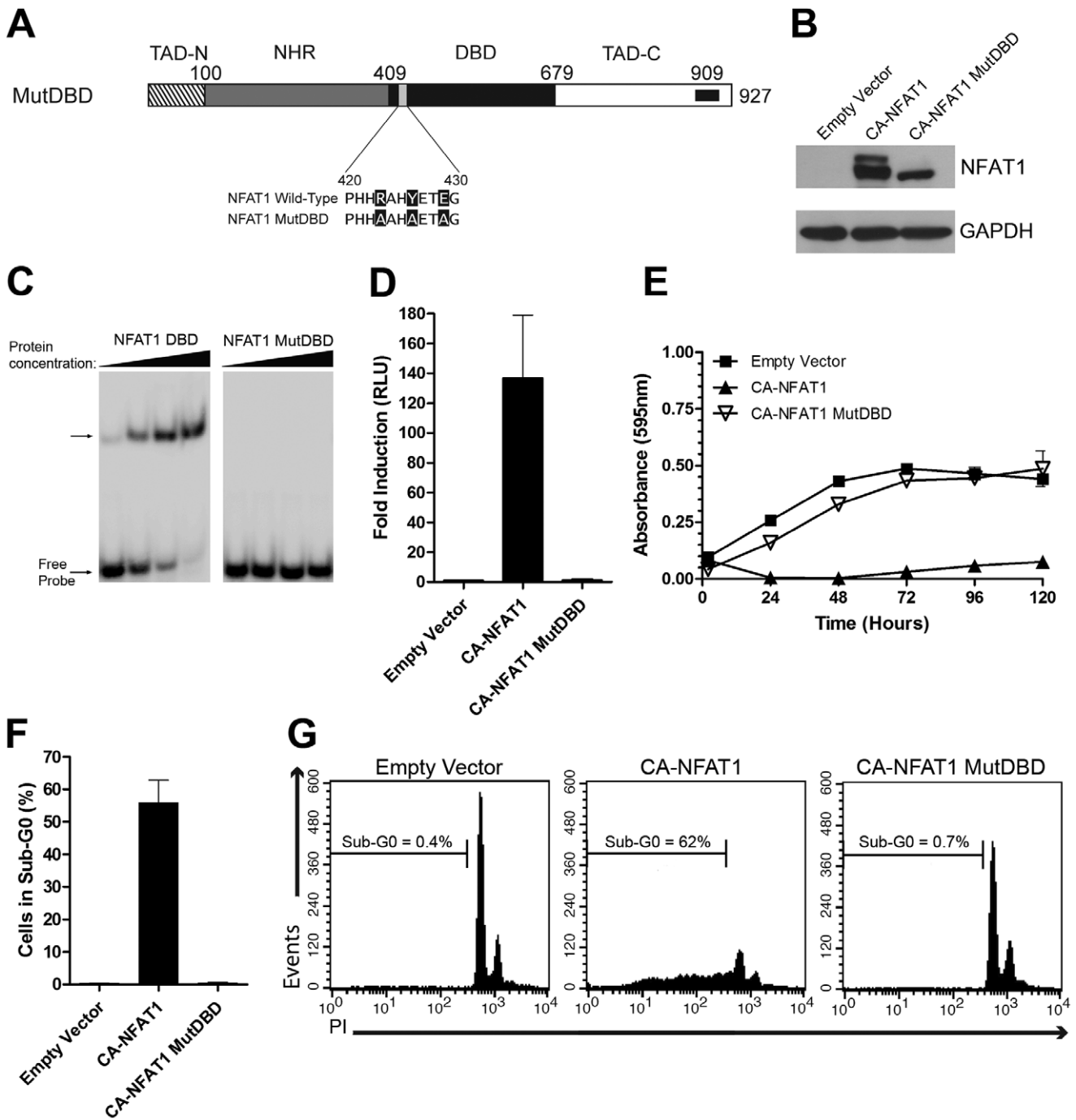
Then, to assess whether CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 can induce cell death, NIH3T3 cells were infected with empty vector or CA-NFAT1-, CA-NFAT2- or CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1-expressing vectors, and the cells were analyzed by proliferation assay and for sub-G0 DNA content. As shown in Figure 6C, the CA-NFAT2-expressing cells proliferated beyond confluence, in contrast to the CA-NFAT1-expressing cells. Interestingly, the CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1-expressing cells had low rates of proliferation and a reduction in total cell number, similar to the CA-NFAT1-expressing cells (Figure 6C). These results demonstrated that CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 is able to induce a phenotype similar to that induced by CA-NFAT1 in NIH3T3 cells. We next determined whether this chimeric protein is also able to trigger apoptosis. Sub-G0 DNA content analysis revealed that CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 induced apoptosis similar to CA-NFAT1 (Figure 6D and 6E). In contrast, a low number of CA-NFAT2-expressing cells had sub-G0 DNA content (Figure 6D and 6E). Taken together, these results suggest that the NFAT1 TAD-C plus a functional NFAT DNA-binding domain confers the ability to induce apoptosis to an NFAT family member.

### Discussion

In this study, we showed that CA-NFAT1 expression induces apoptosis in NIH3T3 fibroblasts, as evidenced by cell features such as DNA fragmentation, pyknotic nuclei formation and phosphatidylserine exposure (Figure 1). Furthermore, our results identified a specific region of the NFAT1 TAD-C, amino acids 699 to 850, that is essential for the apoptosis induced by CA-NFAT1 (Figure 2 and 3). Although this region is still large, comprising 152 amino acids, our data suggest that the NFAT1 TAD-C includes at least two death domains between amino acids 699 to 734 and 819 to 850 that mediate the pro-apoptotic function of NFAT1 independently of other regions of TAD-C. Indeed, the truncated protein CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850 was unable to induce apoptosis, while CA-NFAT1 $\Delta$ 735-850 and CA-NFAT1 $\Delta$ 699-818 induced apoptosis in NIH3T3 cells (Figure 2). Corroborating these results, CA-NFAT1 DD699-850, a CA-NFAT1 construct that contains only the TAD-C amino acids 699 to 850, induced apoptosis similarly to CA-NFAT1 (Figure 3). In addition, we also observed that CA-NFAT1 $\Delta$ 699-927 and CA-NFAT1 $\Delta$ 699-850 drove the NIH3T3 cells to proliferate beyond confluence (Figure 2C). This result suggests that NFAT1 can induce proliferation in the absence of the amino acid residues that are required for the induction of apoptosis. Interestingly, several studies have demonstrated that NFAT2 isoform  $\alpha$ , an NFAT member that possess a short TAD-C, is involved in cell transformation [20,21]. The constitutively active form of NFAT2 isoform  $\alpha$  has been reported to induce colony formation, deregulation of contact inhibition and tumor growth in a mouse allotransplant tumor model [20,21]. Taken together, these studies suggest that there is a dichotomy between NFAT members that is mediated by their TAD-C. To test this hypothesis, we analyzed a chimeric NFAT2 protein (CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1). Interestingly, CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1 reduced cell proliferation and induced apoptosis in NIH3T3 cells in a manner similar to CA-NFAT1 (Figure 6). Therefore, this result confirms that the NFAT1 TAD-C is a central mediator of the NFAT1 pro-apoptotic function.

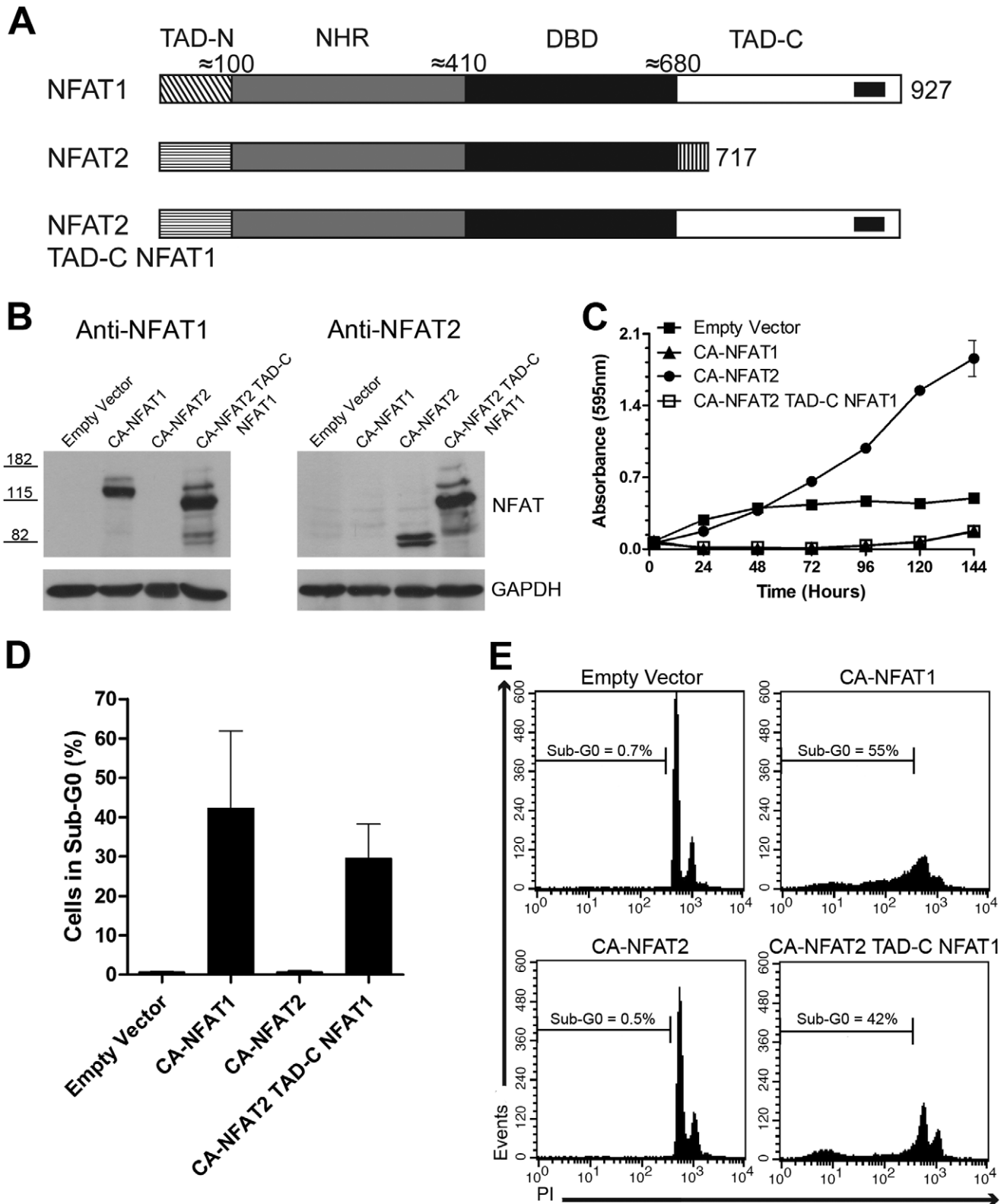
To regulate gene expression, NFAT proteins interact with several proteins, such as transcriptional activators, co-activators and repressors [1]. Some of these interactions have been shown to be mediated by the TADs. Activator protein-1 (AP-1), the most well-characterized NFAT transcription partner, was first reported to interact with NFAT through its DBD [30]. However, functional interaction between AP-1 and NFAT1 has been shown to occur at the NFAT1 TAD-C [31]. NFAT1 also interacts with the IRF2BP2 transcriptional repressor through the TAD-C [28]. Moreover, the NFAT1 N-terminal TAD (TAD-N) interacts with other NFAT partners, such as p300, a well-known transcriptional co-activator [32]. Despite the low sequence similarity, the NFAT TADs are important structures that mediate the interaction between NFAT and partner proteins and are therefore very important for NFAT-mediated gene regulation. In this study, we observed that a NFAT1 TAD-C peptide (NFAT1 691-927) was unable to prevent CA-NFAT1-induced apoptosis by acting as dominant negative (Figure 4), suggesting that CA-NFAT1 may not interact with an NFAT partner protein through its TAD-C to induce apoptosis.

The NFAT1 TAD-C appears to be particularly important for the regulation of some apoptotic genes. Nur77, an activator of the mitochondrial apoptosis pathway, has been shown to induce apoptosis in immature timocytes and several types of cancer cells



**Figure 5. Apoptosis induced by CA-NFAT1 in NIH3T3 fibroblasts is dependent on DNA binding.** (A) Schematic representation of the primary structure of CA-NFAT1 MutDBD. The mutated residues are indicated in the Figure. (B, E, F, G) NIH3T3 cells were transduced with empty vector or retrovirus expressing CA-NFAT1 or CA-NFAT1 MutDBD. (B) The total lysate of transduced NIH3T3 cells was obtained for analysis of NFAT1 and GAPDH expression levels by Western Blot. The molecular weights are indicated in kilodaltons (kDa). (C) The ability of the NFAT1 DBD and NFAT1 MutDBD to bind to DNA was tested by EMSA. The NFAT1 DBD and NFAT1 MutDBD peptides were incubated with oligonucleotides corresponding to the NFAT responsive element in the IL-2 promoter. (D) Jurkat cells were transfected with expression vector (empty vector or vector containing the CA-NFAT1 or CA-NFAT1 MutDBD cDNAs), luciferase reporter vector pGL4.30 and the Renilla luciferase expression vector pRL-TK. After 24 hours, the luciferase activity was measured by the release of luminescence resulting from the oxidation of its substrate (luciferin), normalized with the Renilla vector and expressed as relative light units (RLU). (E) Proliferation was assessed by incorporation of crystal violet. The cells were plated in triplicate and analyzed for 120 hours. This graph is representative of three independent experiments. (F, G) NIH3T3 cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry for cell death. (F) Analysis of cell death 48 hours after plating. The graph represents the average percentage of cells in sub-G0 in three independent experiments. (G) Representative graph of the cell death analysis shown in (F). The percentage of cells in sub-G0 is shown in the graph.

doi:10.1371/journal.pone.0047868.g005



**Figure 6. The fusion of NFAT1 TAD-C to CA-NFAT2 reverses the phenotype induced by CA-NFAT2.** (A) Schematic representation of the primary structures of CA-NFAT1, CA-NFAT2 and CA-NFAT2 TAD-C NFAT1. See Figure 2A legend for details. (B, C, D, E) NIH3T3 cells were transduced with empty vector or retrovirus expressing CA-NFAT1, CA-NFAT2 or CA-NFAT2 TAD-C NFAT1. (B) The total lysate of transduced NIH3T3 cells was obtained for analysis of NFAT expression levels and molecular weight by Western Blot using anti-NFAT1 and anti-NFAT2 antibodies. Levels of the housekeeping protein GAPDH were also analyzed as a loading control. The molecular weights are indicated in kilodaltons (kDa). (C) Proliferation was assessed by incorporation of crystal violet. The cells were plated in triplicate and analyzed for 144 hours. This graph is representative of three independent experiments. (D, E) NIH3T3 cells were stained with propidium iodide (PI) and analyzed for cell death by flow cytometry. (D) Analysis of

cell death 48 hours after plating. The graph shows the average percentage of cells in sub-G0 observed in three independent experiments. (E) Representative graph of cell death analysis shown in (D). The percentage of cells in sub-G0 is shown in the graph. doi:10.1371/journal.pone.0047868.g006

[33,34,35]. Interestingly, Nur77 is able to convert Bcl-2, a well-known anti-apoptotic protein that prevents the release of apoptogenic factors from mitochondria, into a pro-apoptotic protein [36]. The interaction of NFAT1 and the myocyte enhancer factor-2 (MEF2) through the NFAT1 TAD-C is required for activation of the Nur77 promoter [11]. Interestingly, this regulation was shown to be independent of NFAT1 binding to DNA [11]. Here, we assessed whether a mutant CA-NFAT1 that is unable to bind to DNA could induce apoptosis. Our analysis showed that CA-NFAT1 MutDBD did not induce apoptosis in NIH3T3 cells (Figure 5). This result demonstrated that binding to DNA and the transcriptional activity of CA-NFAT1 are required for induction of apoptosis in NIH3T3 cells.

NFAT1 is expressed in peripheral T cells, where it is involved in terminating the immune response by AICD. AICD is a form of apoptosis that is triggered by the activation of the extrinsic pathway by a death ligand. The NFAT1 TAD-C is important for the activation of one of these death ligands, the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gene. NFAT1 binds to the  $\kappa$ 3 promoter element of the TNF- $\alpha$  gene and activates TNF- $\alpha$  transcription [9]. The induction of the TNF- $\alpha$  promoter by NFAT1 has been shown to be dependent on its TAD-C, as NFAT1 is able to transactivate the TNF- $\alpha$  promoter, while NFAT2 is not [27]. Interestingly, NFAT2 is only able to induce the TNF- $\alpha$  promoter when fused to the NFAT1 TAD-C [27]. The role of the NFAT1 TAD-C in the regulation of TNF- $\alpha$  has not been determined. Regulation of TNF- $\alpha$  by NFAT1 may explain the phenotype observed in CA-NFAT1-expressing and CA-NFAT2-TAD-C-NFAT1-expressing cells (Figs. 1, 2 and 6). As TNF- $\alpha$  is most commonly secreted, we assessed whether conditioned media from CA-NFAT1-expressing NIH3T3 cells induced apoptosis in wild-type NIH3T3 cells. Preliminary results from our group showed that supernatants from CA-NFAT1-expressing cells did not induce apoptosis in wild-type NIH3T3 cells (data not published). However, further studies are required to determine whether TNF- $\alpha$  is implicated in CA-NFAT1-mediated apoptosis in NIH3T3 cells.

AICD can also be activated by TRAIL and FasL. The TRAIL promoter possesses several putative NFAT binding sites [37]. In addition, TRAIL expression in stimulated T cells is sensitive to cyclosporine, a well-known inhibitor of calcineurin, suggesting a role for NFAT in its regulation [38]. However, no studies have reported direct regulation of TRAIL by NFAT1. FasL belongs to the tumor necrosis factor family and plays an important role in many immunological processes [39]. NFAT1 protein from nuclear extracts of activated T cells has been shown to bind two sites within the FasL promoter [10], and ectopic NFAT1 expression activates the FasL promoter [40]. However, there is no evidence of a role for the NFAT1 TAD-C in the regulation of the FasL promoter.

Although the TADs harbor the main differences of the NFAT members, the contributions of the TADs to NFAT-induced phenotypes are not well defined. Here, we showed that the NFAT1 TAD-C includes at least two NFAT death domains that mediate the pro-apoptotic function of NFAT1 and can also confer this function to another NFAT member. Apoptosis is implicated in several pathological conditions, including cancer. The evasion of mechanism of apoptosis is considered one of the cancer hallmarks

[41]. Over the past two decades, several studies have demonstrated the roles of NFAT transcription factors in the regulation of cancer and have revealed that the functions of the NFAT members are not redundant [42]. NFAT1 has been reported to be a tumor suppressor gene, whereas NFAT2 has been reported to be an oncogene [20,21,43]. Thus, it appears that NFAT1 and NFAT2 have opposing effects. In our study, we showed that the opposing effects are mediated partially by a specific region of the NFAT1 TAD-C located between amino acids 699 to 850. The tumor suppressor activity of NFAT1 is dependent on its TAD-C [20] and may be conferred by NFAT1 TAD-C to another NFAT member, including a NFAT members described as an oncogene, such as NFAT2. Further studies will be necessary to determine the mechanisms by which NFAT1 induces apoptosis and which genes are differentially regulated by NFAT proteins in this context.

## Supporting Information

**Figure S1 Schematic representation of CA-NFAT proteins.** Schematic representation of the primary structures of CA-NFAT1 and CA-NFAT2. The mutated residues are indicated in the Figure. The crosshatched bar represents TAD-N (N-terminal transactivation domain), the grey bar represents NHR (NFAT-homology region), the black bar represents the DBD (DNA-binding domain), the white bar represents the TAD-C (C-terminal transactivation domain) and the red bar represents the nuclear localization signal (NLS) from T-antigen of simian virus 40 (SV40). (A) CA-NFAT1 representation. (B) CA-NFAT2 representation. (TIF)

**Figure S2 All of the CA-NFAT1 truncated proteins show similar expression levels and have the expected molecular weight.** The total lysate of  $4 \times 10^5$  transduced NIH3T3 cells was obtained for analysis of all CA-NFAT1 truncated protein expression levels and molecular weight by Western Blot using anti-NFAT1 antibody. (TIF)

**Figure S3 Wild-type NFAT1 does not induce apoptosis in NIH3T3 upon stimulation.** NIH3T3 cells were transduced with empty vector or retrovirus expressing NFAT1 or NFAT1  $\Delta$ 699-850 and plated. After plating, cells were left unstimulated (Unst) or stimulated with PMA (20 nM) plus ionomycin (2  $\mu$ M). NIH3T3 cells were stained with propidium iodide and analyzed for cell death by flow cytometry, 48 hours after stimulation. The percentage of cells in sub-G0 is shown in the graph. (TIF)

## Acknowledgments

We are especially grateful to Dr. A. Rao for kindly providing the NFAT reagents.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DVF BKR JPBV. Performed the experiments: DVF PIL. Analyzed the data: DVF BKR JPBV. Contributed reagents/materials/analysis tools: DVF PIL BKR. Wrote the paper: DVF JPBV.



## References

- Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5: 472–484.
- Rao A, Luo C, Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707–747.
- Luo C, Burgeon E, Rao A (1996) Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1. *J Exp Med* 184: 141–147.
- Muller MR, Rao A (2010) NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10: 645–656.
- Horsley V, Pavlath GK (2002) NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol* 156: 771–774.
- Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, Du J, Fosmire S, et al. (2002) NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* 10: 1071–1081.
- Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MB, Barcinski MA, et al. (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.
- Carvalho LD, Teixeira LK, Carrossini N, Caldeira AT, Ansel KM, et al. (2007) The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. *Cell Cycle* 6: 1789–1795.
- McCaffrey PG, Goldfeld AE, Rao A (1994) The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor- $\alpha$  gene transcription. *J Biol Chem* 269: 30445–30450.
- 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: 31427–31434.
- Youn HD, Chatila TA, Liu JO (2000) Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J* 19: 4323–4331.
- 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: 461–472.
- 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: 20914–20921.
- Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, et al. (1996) An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272: 892–895.
- Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, et al. (1996) Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4: 397–405.
- Schuh K, Kneitz B, Heyer J, Bomhardt U, Jankevics E, et al. (1998) Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *Eur J Immunol* 28: 2456–2466.
- de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, et al. (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392: 182–186.
- Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravalles EM, de la Brousse FC, et al. (1998) The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392: 186–190.
- Ranger AM, Hodge MR, Gravalles EM, Oukka M, Davidson L, et al. (1998) Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* 8: 125–134.
- 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: 7168–7181.
- Neal JW, Clipstone NA (2003) A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J Biol Chem* 278: 17246–17254.
- Teixeira LK, Fonseca BP, Vieira-de-Abreu A, Barboza BA, Robbs BK, et al. (2005) IFN- $\gamma$  production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J Immunol* 175: 5931–5939.
- 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: 4138–4145.
- 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: 28181–28186.
- 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.
- Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JP, Raghavan A, et al. (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6: 539–550.
- Kaminuma O, Kitamura F, Kitamura N, Hiroi T, Miyoshi H, et al. (2008) Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF- $\alpha$  gene expression in T cells. *J Immunol* 180: 319–326.
- Carneiro FR, Ramalho-Oliveira R, Mognol GP, Viola JP (2011) Interferon regulatory factor 2 binding protein 2 is a new NFAT1 partner and represses its transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 31: 2889–2901.
- Tamm I, Kikuchi T (1991) Activation of signal transduction pathways protects quiescent Balb/c-3T3 fibroblasts against death due to serum deprivation. *J Cell Physiol* 148: 85–95.
- Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20: 2476–2489.
- Nguyen TN, Kim IJ, Walters RD, Drullinger LF, Lively TN, et al. (2010) The C-terminal region of human NFATc2 binds cJun to synergistically activate interleukin-2 transcription. *Mol Immunol* 47: 2314–2322.
- Garcia-Rodriguez C, Rao A (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.
- 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: 281–284.
- Yu H, Kumar SM, Fang D, Acs G, Xu X (2007) Nuclear orphan receptor TR3/Nur77 mediates melanoma cell apoptosis. *Cancer Biol Ther* 6: 405–412.
- Yang H, Bushue N, Bu P, Wan YJ (2010) Induction and intracellular localization of Nur77 dictate fenretinide-induced apoptosis of human liver cancer cells. *Biochem Pharmacol* 79: 948–954.
- Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, et al. (2004) Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116: 527–540.
- 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: 466–471.
- Mariani SM, Krammer PH (1998) Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol* 28: 1492–1498.
- Ettinger R, Panka DJ, Wang JK, Stanger BZ, Ju ST, et al. (1995) Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen. *J Immunol* 154: 4302–4308.
- Holtz-Hepplmann CJ, Algeciras A, Badley AD, Paya CV (1998) Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. *J Biol Chem* 273: 4416–4423.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.
- Mancini M, Tokar A (2009) NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 9: 810–820.
- Ranger AM, Gerstenfeld LC, Wang J, Kon T, Bac H, et al. (2000) The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med* 191: 9–22.

# Eventos significativos na vida das células: ciclo celular, proliferação, e quantificação de morte

9

Gustavo P. Amarante-Mendes  
Jacqueline F. Jacysyn  
Douglas V. Faget  
Welbert O. Pereira  
Ricardo Weinlich  
João P. B. Viola

A citometria de fluxo é uma ferramenta extremamente poderosa, utilizada tanto em laboratórios clínicos e hospitais, para o diagnóstico de uma imensa variedade de doenças em seres humanos e animais, quanto em universidades e institutos ou centros de pesquisa, como instrumento imprescindível para a caracterização e quantificação de inúmeros fenômenos biológicos. Neste capítulo, descrevemos metodologias de citometria de fluxo que podem ser empregadas para analisar a proliferação celular e progressão do ciclo celular, e quantificar o processo de morte celular em diferentes amostras biológicas.

## CICLOCELULAREPROLIFERAÇÃO

### Análise do conteúdo de DNA - Proliferação

#### Descrição

A marcação do conteúdo de DNA é o método mais simples e o mais comumente

utilizado para identificar o percentual de células em cada fase do ciclo celular. Por meio desse, é possível acompanhar facilmente a progressão das células no ciclo celular. As células na fase G0/G1 possuem um conteúdo basal de DNA, que pode ser representado por uma unidade correspondente ao conjunto de cromossomos, denominada " $n$ ". Células somáticas apresentam um conteúdo igual a  $2n$ , já que existem duas cópias de cada cromossomo. Ao longo da fase S ocorre a duplicação dos cromossomos, fazendo com que o conteúdo de DNA aumente progressivamente até a fase G2/M, em que esse será o dobro do encontrado na fase G0/G1 ( $4n$ ). Através da quantificação do conteúdo de DNA de uma determinada população de células pode se inferir que a população com o maior de percentual de células nas fases S e G2/M apresenta um maior índice de proliferação.

Para a marcação do conteúdo de DNA, podem ser utilizados fluoróforos que se ligam ao DNA e emitem fluorescência quando excitados pelo comprimento de onda correspon-

dente. Entre esses podemos citar o iodeto de propídio, 7-AAD, laranja de acridina, DAPI e Hoeschst 33342. Essa revisão é focada no uso de iodeto de propídio para análise do ciclo celular, portanto serão abordados aspectos peculiares à marcação com tal fluoróforo. Os fluoróforos 7-AAD e iodeto de propídio são impermeáveis à célula. Assim, para a realização desse ensaio de ciclo celular, as células necessitam ser permeabilizadas pelo uso de um detergente (NP40, Triton X-100, por exemplo) para que o seu conteúdo de DNA possa ser marcado. O iodeto de propídio também se liga a moléculas de RNA, tornando necessário o uso de RNases na preparação das amostras. O uso de detergentes no tampão de marcação resulta, na maioria das vezes, na formação de agregados celulares que podem induzir uma interpretação errônea dos resultados, já que esses são interpretados como um único evento pelo citômetro. Por exemplo, um agregado de duas células em G0/G1 poderia ser interpretado como uma célula em G2/M, tornando necessária a sua exclusão da análise.

Para se fazer a quantificação do conteúdo de DNA de uma população de células, o primeiro passo é a exclusão dos debris e restos celulares utilizando-se os parâmetros tamanho (FSC) e complexidade (SSC) (Figura 9.1). Em seguida, é preciso descartar da análise os agregados celulares. A melhor forma é fazer uso dos subparâmetros de FL3, a saber, área e largura (FL3-A e FL3-W, respectivamente). Células não agregadas apresentam altura (FL3-H) do sinal proporcional à área (FL3-A) deste (Figura 9.1). No caso de agregados celulares, a altura do sinal deixa de ser proporcional à área, e a largura será correspondente ao diâmetro de duas ou mais células (Figura 9.1). As células ao longo do ciclo celular aumentam de tamanho, mas normalmente não chegam a apresentar o dobro do diâmetro de uma célula na fase G0/G1. Portanto, ao analisarmos a área do sinal contra a largura do mesmo, os agregados se tornam fáceis de serem visualizados e descartados da análise. Por fim, os eventos devem ser analisados por histograma do filtro

FL2-H ou FL3-H, e o primeiro pico à esquerda corresponde às fases G0/G1, o segundo pico corresponde às fases G2/M e os eventos entre esses correspondem à fase S. Eventos à esquerda do primeiro pico, considerados hipodiploides correspondem às células em apoptose (discutido a seguir).

### Protocolo básico

- Colete as células pelo seu método de escolha;
- Centrifugue as células para remoção de meio de cultura;
- Adicione o tampão de marcação contendo iodeto de propídio (Tris 3.4 mM pH 7.6; NaCl 10 mM; NP-40 0.1%; RNase A 700 U/L; Iodeto de Propídio 0.075 mM) e se necessário, ajuste a concentração de células;
- Coloque as amostras no gelo ao abrigo da luz e deixe marcar por 15 minutos;
- Analise as amostras no citômetro de fluxo, utilizando escala linear para o sensor de fluorescência.

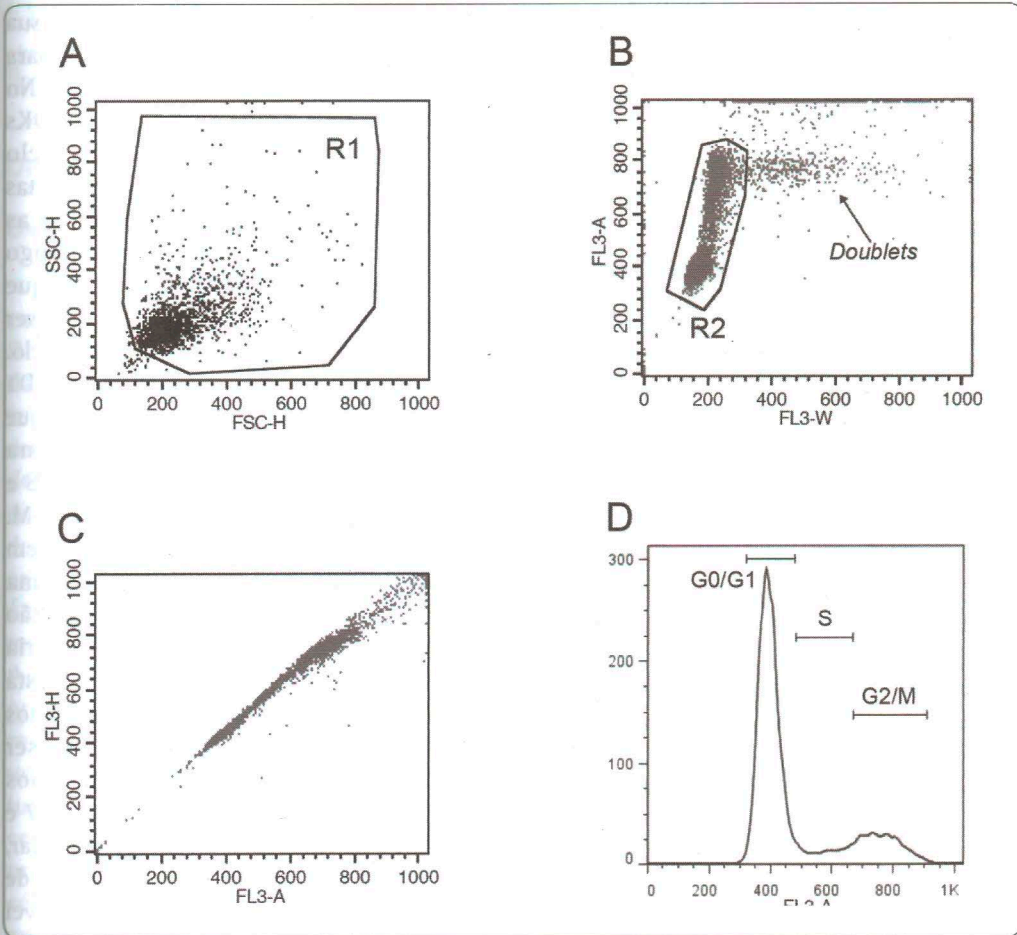
### Dicas

- Após a marcação do seu conteúdo de DNA a célula não pode ser fixada, a leitura no citômetro deve ser realizada imediatamente, devido à toxicidade do iodeto de propídio.
- Ressuspenda bem as células no tampão de marcação, a fim de minimizar os agregados celulares.

## QUANTIFICAÇÃO DA SÍNTESE DE DNA

### Descrição

Células em proliferação replicam as suas moléculas de DNA durante a fase S do ciclo celular. Por meio da citometria de fluxo, é possível acompanhar as células que estão sintetizando DNA por incorporação de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), um nucleo-



**Figura 9.1** - Análise do ciclo celular por marcação do conteúdo de DNA. **(A)** Representação da grade R1 das células a serem analisadas levando em consideração o tamanho (FSC) e granulidade (SSC) da população. **(B)** Representação da grade R2 para exclusão dos agregados (doublets) de células analisando a área do sinal (FL3-A) pela sua largura (FL3-W). **(C)** Gráfico demonstrando a correlação direta da altura do sinal (FL3-H) com a sua área na marcação do conteúdo de DNA. **(D)** Histograma de uma análise de ciclo celular com indicação das fases do ciclo celular.

sídeo sintético análogo de timidina. A análise bivariada da incorporação de BrdU contra o conteúdo de DNA é capaz de distinguir células na fase S, não somente pelo conteúdo de DNA, mas também pela quantidade de BrdU incorporado. Por meio dessa técnica, também é possível calcular a cinética do ciclo celular. Para tal, é necessário fazer pulsos de BrdU em diferentes tempos observando o percentual de células que incorporaram

BrdU e em qual fase do ciclo celular estão. A incorporação de BrdU pode ocorrer *in vitro* ou *in vivo* e posteriormente, os nucleossídeos BrdU incorporados são visualizados pela marcação com anticorpos conjugados a fluorocromos. Para tanto, é necessário que o epítipo do BrdU seja exposto, o que pode ser feito utilizando calor, DNases e mais comumente altas concentrações de ácido (HCl 2M). No entanto, se outras marcações

são desejadas, o uso de altas concentrações de ácido ou calor não é recomendado, já que a sua utilização pode danificar os epítomos de outras proteínas de interesse.

### Protocolo básico

- a. Colete as células pelo seu método de escolha;
- b. Centrifugue as células para remoção de meio de cultura;
- c. As células devem ser fixadas e lavadas com PBS após fixação;
- d. Incube as células no escuro por 20 minutos em uma solução de HCl 2M contendo um detergente;
- e. Lave as células com uma solução de 0,1M de tetraborato de sódio, em seguida lave-as com PBS;
- f. Incube as células com anticorpo anti-BrdU de escolha;
- g. Lave as células e ressuspenda-as em uma solução contendo iodeto de propídio e RNase A;
- h. Coloque as amostras no gelo ao abrigo da luz e deixe marcar por 15 minutos;
- i. Analise as amostras no citômetro de fluxo.

### Dicas

- Para a marcação do BrdU pelo anticorpo é desejado um grau de desnaturação que pode ser atingido por meio do uso de ácido, no entanto um balanço dessa desnaturação é necessário para não prejudicar a marcação do conteúdo de DNA.

## CICLINAS E OUTROS MARCADORES DE FASES DO CICLO CELULAR

### Descrição

A progressão ao longo do ciclo celular é orquestrada por fosforilações e desfosforilações de diversas proteínas intracelu-

lares. Tais fosforilações são mediadas em sua maior parte pelas CDKs e são essenciais para avançar de uma fase do ciclo para outra. No entanto, os níveis de expressão das CDKs permanecem invariáveis durante o ciclo celular. Por outro lado, os níveis de ciclinas - as proteínas responsáveis por ativar as CDKs, oscilam consistentemente ao longo das fases do ciclo celular, de maneira que a expressão de algumas ciclinas pode ser atribuída a um determinado estágio do ciclo. Dentre essas ciclinas, vale citar: a ciclina D1 que está associada à fase G1; a ciclina E que é importante na progressão da fase G1 para S; a ciclina A que é expressa nas fases S e G2 e a ciclina B1, expressa nas fases G2 e M. Além das ciclinas, outras proteínas podem ser utilizadas como marcadores para uma análise bivariada do marcador em questão contra o conteúdo de DNA por citometria de fluxo. A fosforilação da histona H3 está associada à condensação de cromossomos que ocorre apenas na fase M, e pode ser detectada por meio do uso de anticorpos específicos. A expressão da proteína Ki67 é altamente relacionada à proliferação celular, e em uma análise bivariada da marcação de Ki67 contra o conteúdo de DNA, é possível distinguir as células quiescentes em G0 das células em G1.

### Protocolo básico

- a. Colete as células pelo seu método de escolha;
- b. Centrifugue as células para remoção de meio de cultura;
- c. As células devem ser fixadas;
- d. Lave-as com PBS após fixação;
- e. Incube as células com um tampão contendo detergente;
- f. Lave as células com PBS;
- g. Incube as células com o anticorpo contra a proteína marcadora desejada;
- h. Lave as células e ressuspenda-as em uma solução contendo iodeto de propídio e RNase A;

- i. Coloque as amostras no gelo ao abrigo da luz e deixe marcar por 15 minutos;
- h. Analise as amostras no citômetro de fluxo.

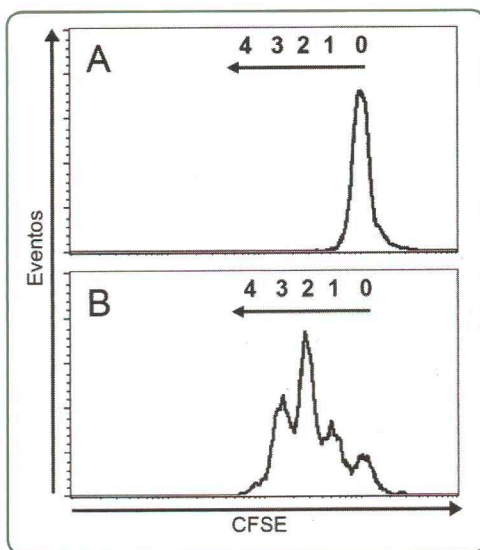
## DIVISÃO CELULAR

### Descrição

Células em proliferação ao longo do ciclo celular crescem, duplicam suas moléculas de DNA e organelas, e se dividem ao término da mitose. A proliferação celular pode ser estimada pelo número de divisões de uma determinada população celular. Na citometria de fluxo é possível observar o número de divisões celulares de uma população através do uso de succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE). O CFDA-SE é uma molécula não fluorescente, à qual a membrana plasmática é altamente permeável. Ao atravessar a membrana plasmática, é processada por esterases intracelulares que removem o grupamento acetato e o convertem em succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE), uma molécula fluorescente e capaz de se ligar covalentemente a proteínas. Após a divisão celular, o CFSE da célula-mãe é dividido de forma equivalente entre as células-filhas, fazendo com que as células-filhas tenham metade da intensidade de fluorescência da célula-mãe. É possível observar o decaimento da intensidade de fluorescência de uma população celular depois de cada divisão até aproximadamente 5-8 divisões celulares (Figura 9.2). Essa técnica permite, portanto, o cálculo não somente do percentual de células que entraram em mitose, mas também do número de divisões de cada uma das células de determinada população.

### Protocolo básico

- a. Colete as células;
- b. Lave-as com PBS (ou meio sem soro fetal bovino) e ajuste a concentração para  $1 \times 10^6$  células/ml;
- c. Centrifugue e ressuspensa em  $5\mu\text{M}$  de CFDA-SE em PBS (ou meio sem soro fetal bovino) pré-aquecido;
- d. Incube as células por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  protegidas da luz;
- e. Lave as células com cinco volumes de meio de cultura com soro fetal bovino e incube-as por mais 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  protegidas da luz;
- f. Centrifugue as células para remoção do meio;
- g. Adicione meio de cultura novo;
- h. Avalie a fluorescência de CFSE nos tempos desejados por citometria de fluxo.



**Figura 9.2** - Análise de proliferação celular utilizando CFSE. **(A)** Histograma de uma população de células logo após a marcação com CFSE. **(B)** Histograma da mesma população mostrada em (A) após 36 horas de cultura. O número de divisões celulares observadas está indicado na figura.

### Morte celular

Com o objetivo de padronizar a terminologia e unificar os critérios utilizados para a definição dos tipos de morte celular, foi criado, em 2005, o *Comitê para Nomenclatura em Morte Celular* (*Nomenclature Committee on Cell Death - NCCD*), composto por vários especialistas na

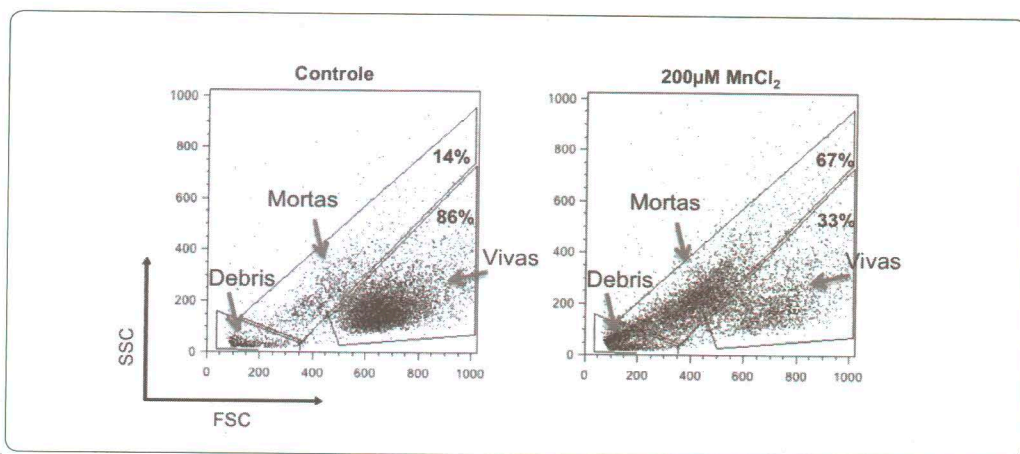
área. Desde então, esse comitê tem publicado artigos definindo e classificando as diferentes formas de morte celular, com recomendações sobre a maneira pela qual os resultados devem ser apresentados formalmente.

Em sua última publicação, o NCCD reconhece quatro principais modalidades de morte celular: *apoptose*, *necrose* (que pode ser “regulada” ou “acidental”), *morte autofágica* e *cornificação*, além de considerar a existência de modalidades alternativas, tais como, *piroptose*, *netose* e *partanatos*. Apesar das duas formas “clássicas” de morte celular, a apoptose e a necrose, terem sido definidas por análise morfológica, os critérios bioquímicos tem sido cada vez mais utilizados, pois são menos susceptíveis à subjetividade do operador. Nesse sentido, o NCDD propõe que a definição das modalidades de morte celular não seja feita somente por um único critério, mas que seja baseada em um balanço entre critérios morfológicos e bioquímicos (Tabela 9.1), que abordem, preferencialmente, aspectos distintos da morte celular. Uma vez definido o tipo de morte celular em questão, a quantificação do fenômeno em diferentes condições

experimentais pode ser, então, realizada por meio da metodologia de preferência.

Em adição, o NCDD propõe que certas expressões, tais como “porcentagem de morte celular”, “porcentagem de apoptose” ou “porcentagem de necrose”, sejam substituídas por expressões que representem com maior clareza a natureza do ensaio realizado, tais como “porcentagem de células TUNEL-positivas”, “porcentagem de núcleos hipodiploides”, “porcentagem de células anexina-V positivas” e “porcentagem de células positivas para caspase-3 ativa”.

A citometria de fluxo pode/deve ser utilizada para a avaliação e quantificação de morte celular, com claras vantagens. Dentre elas, destacam-se a rapidez, o relativo baixo custo (comparado com técnicas de microscopia confocal, por exemplo), a possibilidade de quantificar diversos parâmetros na mesma amostra, a individualização dos parâmetros ao nível celular e a ampla base instalada de equipamentos capazes de realizar essas técnicas. A seguir, serão descritos os métodos mais utilizados e aceitos na literatura especializada, com seus protocolos básicos e dicas para a otimização dos métodos.



**Figura 9.3** - Avaliação da morte celular pela mudança na complexidade e tamanho das células: A linhagem celular SKW6.4 foi cultivada por 24 horas sem tratamento (Controle) ou tratada com 200 $\mu$ M de MnCl<sub>2</sub>. É possível observar a presença de células mortas após o tratamento com MnCl<sub>2</sub>, as quais apresentam menor tamanho (FSC) e maior complexidade (SSC), formando uma população heterogênea que se posiciona diagonal no gráfico (54%). Na parte inferior direita estão localizadas as células viáveis e na parte inferior à esquerda estão os debris celulares, que devem ser excluídos da análise final.

**TABELA 9.1 TIPOS DE MORTE CELULAR, DEFINIÇÕES E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS**

Tipo de morte celular	Definição	Características morfológicas	Observações
Apoptose extrínseca (via receptores de morte)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induzida por receptores de morte, tais como TNFR1 and Fas.</li> <li>- Dependente de ativação de caspase-8/10.</li> <li>- Bloqueada por inibidores de caspase.</li> <li>- Dependente de clivagem de Bim e MOMP (células tipo II)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Redução do volume celular.</li> <li>- Condensação e fragmentação nuclear.</li> <li>- Preservação das organelas e da membrana plasmática.</li> <li>- Formação de corpos apoptóticos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Em algumas células, a inibição da caspase-8 bloqueia a apoptose extrínseca, porém permite a morte por necrose regulada (ver abaixo).</li> </ul>
Apoptose extrínseca (via receptores de sobrevivência)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induzida por ausência de sinalização via receptores de sobrevivência, p. ex. Pached.</li> <li>- Dependente de ativação de PP2A e/ou DAPK1.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Basicamente as mesmas descritas acima.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apesar de ser considerada via extrínseca, a morte por receptores de sobrevivência não depende de caspase-8 e/ou caspase-10.</li> </ul>
Apoptose intrínseca	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dependente de MOMP.</li> <li>- Dissipação irreversível do potencial de membrana mitocondrial.</li> <li>- Liberação de proteínas do espaço intermitocondrial.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Basicamente as mesmas descritas acima com variações dependentes do estímulo, tais como dano no DNA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Os membros da família Bcl-2 são os principais reguladores desta forma de morte celular.</li> </ul>
Necrose regulada	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induzida por receptores de morte ou via ripoptosmo.</li> <li>- Dependente de RIPK1 e/ou RIPK3.</li> <li>- Dependente de inibição de caspase-8 e/ou -10.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento do volume celular.</li> <li>- Ruptura da membrana plasmática.</li> <li>- Dano de organelas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tipo de morte envolvido na resistência a certas infecções virais, podendo ser também chamado de Necroptose.</li> </ul>
Necrose acidental	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Causada por estímulos extremamente tóxicos, tais como congelamento ou calor extremo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento do volume celular.</li> <li>- Rápida ruptura da membrana plasmática.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Não há regulação bioquímica. Raramente ocorre em situações fisiológicas/ patológicas.</li> </ul>
Morte autofágica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presença de número excessivo de autofagossomos.</li> <li>- Dependente de proteínas envolvidas em autofagia, tais como ATG5, ATG12 e beclin-1.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vacuolização massiva do citoplasma.</li> <li>- Ausência de condensação de cromatina.</li> <li>- Acúmulo de autofagossomos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deve-se ter o cuidado para não confundir com células em apoptose que apresentam certa atividade autofágica.</li> </ul>
Catástrofe mitótica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induzida por perturbações na maquinaria mitótica.</li> <li>- Iniciada durante a fase M do ciclo celular.</li> <li>- Certo grau de parada mitótica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Número ou forma aberrante de cromossomos.</li> <li>- Normalmente as células possuem características da fase M do ciclo celular.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apesar de ser considerada uma categoria a parte, o mecanismo e vias de morte é o mesmo utilizado durante a apoptose.</li> </ul>



## MODIFICAÇÕES NO VOLUME E GRANULOSIDADE CELULAR

### Descrição

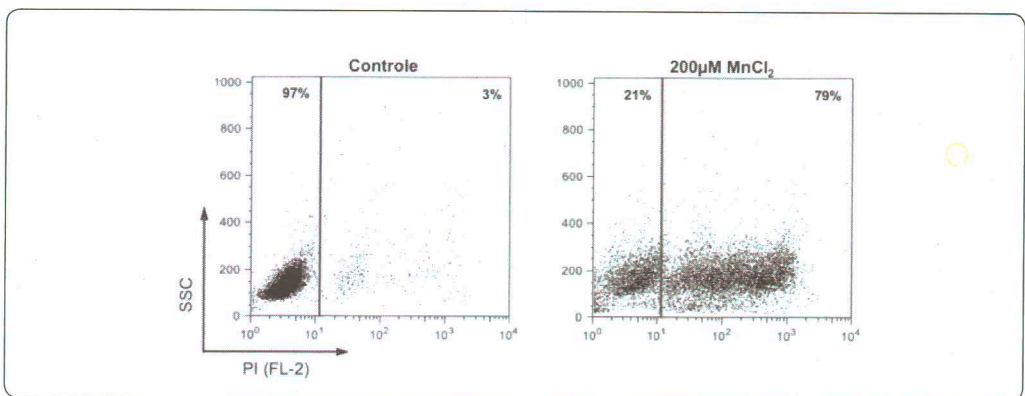
O sensor frontal do citômetro FSC (*Forward Scatter*) quantifica o tamanho das células de acordo com as dimensões da sombra feita pela passagem das células em frente ao feixe de luz. O sensor lateral SSC (*Side Scatter*) percebe a quantidade de luz dispersada pela opacidade das partículas, o que correlaciona com a granulosidade e/ou densidade celular. Células que estão morrendo, especialmente por apoptose, exibem modificações típicas em suas propriedades morfológicas e físicas, facilmente analisadas por citometria de fluxo. Normalmente, células em apoptose exibem um aumento de SSC e redução de FSC, provavelmente relacionado à condensação da cromatina e à progressiva redução de seu tamanho, respectivamente. Células em morte autofágica exibem uma grande mudança no SSC, em razão da formação de inúmeros autofagossomos. Já células em necrose sofrem, inicialmente, um aumento de FSC, pelo aumento de volume

celular, mas que rapidamente se transforma em uma queda brusca dos dois parâmetros, pois ocorre ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular, restando apenas debris (Figura 9.3).

Vale a pena ressaltar que há uma enorme variação desses parâmetros, que depende do tipo celular analisado. Em alguns casos essas mudanças são bastante evidentes, enquanto em outros não. Sendo assim, o uso desse parâmetro para avaliação de morte deve ser somente como primeiro indicativo e, como mencionado acima, deve ser combinado com outros métodos mais específicos de quantificação.

### Protocolo básico

- Colete as células pelo seu modo de preferência;
- Centrifugue-as para remoção do meio de cultura e ajuste da concentração celular;
- Opcionalmente, combine com outros métodos de quantificação de morte, como a análise de núcleos hipodiploides ou da externalização de resíduos de fosfatidilserina;
- Analise-as em citômetro de fluxo, utilizando os parâmetros FSC e SSC.



**Figura 9.4** - Avaliação de perda de integridade da membrana plasmática por incorporação de iodeto de Propídeo (PI): Células da linhagem Jurkat foram cultivadas por 24 horas sem tratamento (Controle) ou tratadas com 200µM de MnCl<sub>2</sub>. Imediatamente antes da análise no citômetro, as células foram incubadas com PI. Os quadrantes da esquerda mostram as células saudáveis, enquanto os quadrantes da direita representam as células incorporadas com PI.

## Dicas

- Reduza o estresse causado na preparação de suas amostras, principalmente com células aderentes e células primárias. O descolamento das células aderentes, seja de forma mecânica (raspagem) ou pelo uso de tripsina, pode induzir um nível basal de morte elevado. Teste qual é o método mais apropriado para cada linhagem celular. Células primárias são normalmente mais sensíveis ao descolamento e a condições de baixo nutriente. Mantenha-as no gelo, se possível, para desacelerar o dano.

## AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA/VIABILIDADE CELULAR

### Descrição

Uma importante característica de qualquer célula viva é a manutenção da permeabilidade seletiva de sua membrana plasmática. Quando uma célula morre por necrose ou encontra-se em fase tardia do processo de apoptose, sua membrana torna-se permeável a macromoléculas, permitindo a incorporação de marcadores fluorimétricos, tais como iodeto de propídeo (*propidium iodide* - PI), 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD), SYTOX e Hoechst 33342, no seu interior. Células saudáveis ou em fase precoce da apoptose mantêm a integridade da sua membrana celular e, portanto, excluem os marcadores acima (Figura 9.4).

### Protocolo básico

- Colete as células através de seu modo de preferência;
- Centrifugue-as para remoção do meio de cultura e ajuste da concentração celular;
- Acrescente o iodeto de propídeo ou o 7-AAD, não antes de 1h da análise (Não

- é necessária a lavagem das células para a remoção do excesso desses reagentes);
- d. Opcionalmente, faça uso concomitante de outros métodos de quantificação de morte celular;
- e. Imediatamente, analise as amostras em citômetro de fluxo.

### Dicas

- O iodeto de propídeo e, em menor grau o 7-AAD, são tóxicos para a maioria das células. Sendo assim, analise as amostras o mais rapidamente possível e as mantenha em gelo. No caso de um grande número de amostras, divida-as em subgrupos e acrescente o reagente aos subgrupos no decorrer da análise.
- A marcação de viabilidade por PI ou 7-AAD é um excelente complemento para análise de externalização de resíduos de fosfatidilserina (ver abaixo).
- A marcação por PI ou 7-AAD é também uma excelente ferramenta para se usar em conjunto com marcadores de proliferação, tais como o CFSE. Nesse caso, é possível quantificar a morte celular em cada um dos ciclos celulares.

## EXTERNALIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA

### Descrição

A membrana plasmática é composta por uma bicamada lipídica assimétrica em sua composição proteica e lipídica. Em células saudáveis, resíduos de fosfatidilserina (*phosphatidylserine* - PS) são ativamente mantidos na face interna da membrana, mas passam a ser externalizados já no início do processo de apoptose. Quando isso acontece, a célula apoptótica é prontamente reconhecida por fagócitos profissionais (ou até mesmo por células vizinhas), o que permite a sua rápida remoção sem perda da arquitetura e função

do tecido. No caso da morte por necrose ou da morte associada à autofagia, quando ocorre, a externalização é bem mais tardia.

A anexina V é uma proteína que tem a propriedade de se ligar especificamente aos resíduos de PS, de maneira dependente de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Por esse motivo, ela tem sido acoplada a diferentes fluorocromos e extensivamente utilizada como ferramenta para a caracterização e quantificação da morte celular. Porém, os resultados obtidos por meio desse método devem ser interpretados com cautela, por dois principais motivos. O primeiro é que células com ruptura na membrana plasmática possibilitam a entrada da anexina V no interior da célula, que passa a marcar os resíduos de PS presentes na face interna da membrana. Sendo assim, a marcação isolada com anexina V não distingue as células em apoptose das células em necrose (com dano na membrana plasmática). Para se diferenciar a marcação dos resíduos externalizados dos resíduos da face interna, é recomendada a utilização de marcadores de integridade/viabilidade celular, tais como o PI ou 7-AAD. Como descrito acima, esses reagentes só irão marcar as células com dano de membrana. Sendo assim, células positivas para anexina V e negativas para PI/7-AAD, definitivamente externalizaram resíduos de PS e, portanto, são consideradas células apoptóticas. Células positivas para ambos os marcadores possuem dano na membrana e podem tanto ser necróticas, como estarem em fase avançada de apoptose (conforme mencionado acima, em estágios tardios de apoptose, as células perdem integridade de membrana). Para diferenciar esses dois estágios, recomenda-se repetir o experimento, com diferentes tempos de incubação. O esperado é que, caso o processo de morte celular seja apoptótico, seja possível detectar marcação somente por anexina V em períodos mais curtos de incubação com os estímulos indutores de morte (Figura 9.5).

O segundo motivo de cautela é que algumas células (em particular os linfócitos T e B) podem externalizar resíduos de PS de forma transitória, como parte de seu processo

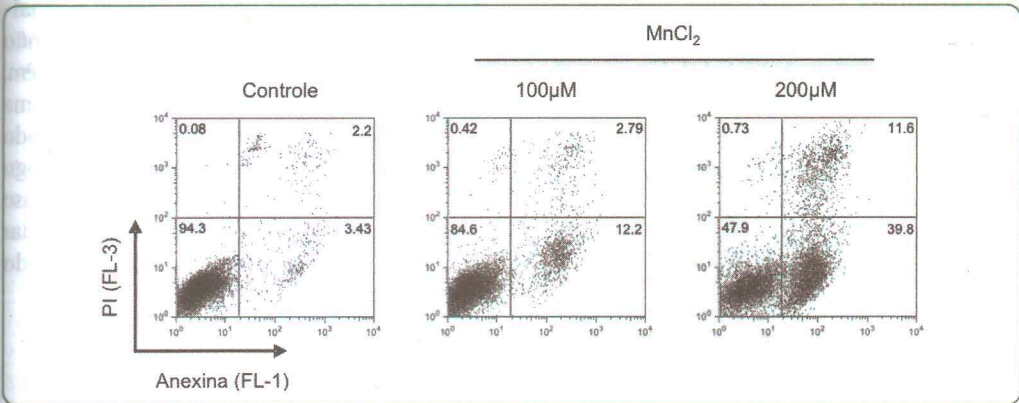
fisiológico de ativação. O nível de externalização de PS em consequência da ativação é geralmente menor, mas pode ser facilmente confundido com células em apoptose.

## Protocolo básico

- Colete as células pelo seu modo de preferência;
- Centrifugue-as para remoção do meio de cultura e ajuste da concentração celular;
- Ressuspenda as células em tampão de marcação contendo anexina V (10mM HEPES (pH=7.4), 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM  $\text{MgCl}_2$  e 1,8mM  $\text{CaCl}_2$ ) na concentração de até  $2 \times 10^6$  células/mL;
- Incube por 15-20 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz;
- Opcionalmente, adicione iodeto de propídio/7-AAD às amostras;
- Imediatamente, analise as amostras em citômetro de fluxo.

## Dicas

- Evite o uso de tripsina para o descolamento das células aderentes das placas de cultura. Atente para preparações de tripsinas que contenham EDTA ou EGTA, que são quelantes de cálcio, um íon fundamental para ligação entre a anexina V e os resíduos de PS.
- Caso seja necessária ou desejável, a fixação e permeabilização das células para marcações intracitoplasmáticas deve ser feita posteriormente à marcação por anexina V, já que a permeabilização das células impede a diferenciação entre a marcação de resíduos de PS na face interna e externa da membrana.
- É possível fazer a marcação com anexina V em conjunto com anticorpos para antígenos de superfície, desde que se mantenha o uso do tampão de marcação rico em cálcio. Nesse caso, incube as células a  $4^\circ\text{C}$  por 30-45min.
- Reduza ao máximo o número de lavagens e centrifugações. Células mortas são



**Figura 9.5** - Avaliação da morte celular por meio da análise da externalização de resíduos de fosfatidilserina: Células da linhagem HL-60 foram cultivadas por 24 horas sem tratamento (Controle), ou tratadas com 100µM ou 200µM de MnCl<sub>2</sub>. A figura mostra porcentagem de células viáveis (quadrante inferior esquerdo), células em fase precoce de apoptose (quadrante inferior direito) e células em fase tardia de apoptose ou em necrose (quadrante superior direito).

sensíveis a estresse mecânico e podem se desintegrar facilmente, o que causa a subestimação da porcentagem de morte em determinada população.

## ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA - MORTE CELULAR

### Descrição

No último estágio da cascata apoptótica, a endonuclease CAD (*Caspase-activated DNase*) é liberada após a clivagem de seu inibidor iCAD pela caspase-3. Essa enzima transloca-se para o núcleo e promove a fragmentação do DNA nas regiões entre histonas, gerando fragmentos interoligonucleossomais de aproximadamente 200pb. Esse fenômeno é um dos responsáveis pela reorganização da cromatina, que se condensa e forma o núcleo picnótico, característico da apoptose. Um outro fenômeno associado à fragmentação do DNA via CAD, é a redução do conteúdo total de DNA no núcleo da célula em apoptose, pois os pequenos fragmentos gerados atravessam os poros da membrana nuclear.

Ao aproveitar-se dos fenômenos descritos acima, a técnica de lise celular com tampão hipotônico (que rompe a membrana plasmática, mas deixa intacta a membrana nuclear), associada à marcação com iodeto de propídeo permite a fácil detecção e quantificação dos níveis de apoptose. Com livre acesso ao interior do núcleo após o rompimento da membrana plasmática pelo tampão hipotônico, o iodeto de propídeo se intercala ao DNA de forma proporcional ao conteúdo deste. Células viáveis de mamíferos em G0/G1 apresentam núcleos diploides ( $2n$ ) e, dependendo da fase de seu ciclo celular, podem apresentar até  $4n$  (G2/M) (Figura 9.6). Células em apoptose apresentam núcleos hipodiploides, ou seja, núcleos com quantidade inferior a  $2n$ , em função da perda de pequenos pedaços do DNA e da condensação da cromatina, que dificulta a intercalação do iodeto de propídeo ao DNA (Figura 9.6).

### Protocolo básico

- a. Após o ensaio de morte, recuperar todas as células da cultura, aderentes ou em suspensão, incluindo as células mortas e de debris da cultura;

- b. Centrifugue as células para remoção de meio de cultura;
  - c. Adicione o tampão hipotônico de marcação contendo iodeto de propídio (Tris 3.4 mM pH 7.6; NaCl 10 mM; NP-40 0.1%; RNase A 700 U/L; Iodeto de Propídio 0.075 mM) em concentração não superior a  $1 \times 10^6$  células/ mL;
  - d. Coloque as amostras no gelo ao abrigo da luz e deixe marcar por 15 minutos;
  - e. Analise as amostras no citômetro de fluxo.
- Células necróticas não apresentam normalmente alto nível de fragmentação, pois não ativam especificamente a enzima CAD. Porém, em algumas circunstâncias, pode ocorrer uma degradação não específica do DNA, fazendo com que as células necróticas apareçam logo à esquerda do pico G0/G1. Nesses casos, o uso de um pan-inibidor de caspases pode ajudar a discriminar se as células estão morrendo por apoptose ou por necrose.

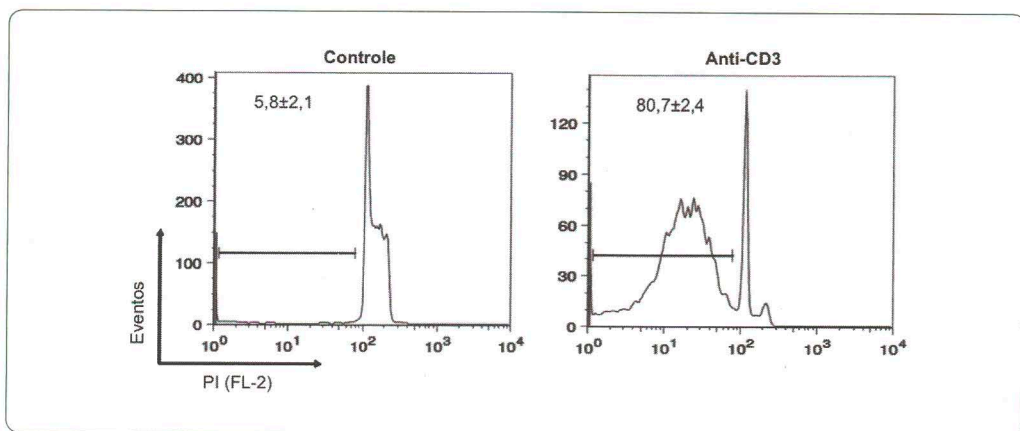
## Dicas

- Filtrar a amostra após a lise celular é fundamental para prevenir de entupimento do citômetro.
- O histograma de análise do conteúdo de DNA deve conter uma janela na região sub-G0 para quantificação dos núcleos apoptóticos. Contudo, é fundamental que essa janela não toque o eixo Y do gráfico, para excluir debris que não correspondem a núcleos celulares.
- Como há o rompimento da membrana citoplasmática, não há como distinguir diferentes subpopulações dentro da mesma amostra. Nesse caso, deve-se separar as populações previamente à marcação.

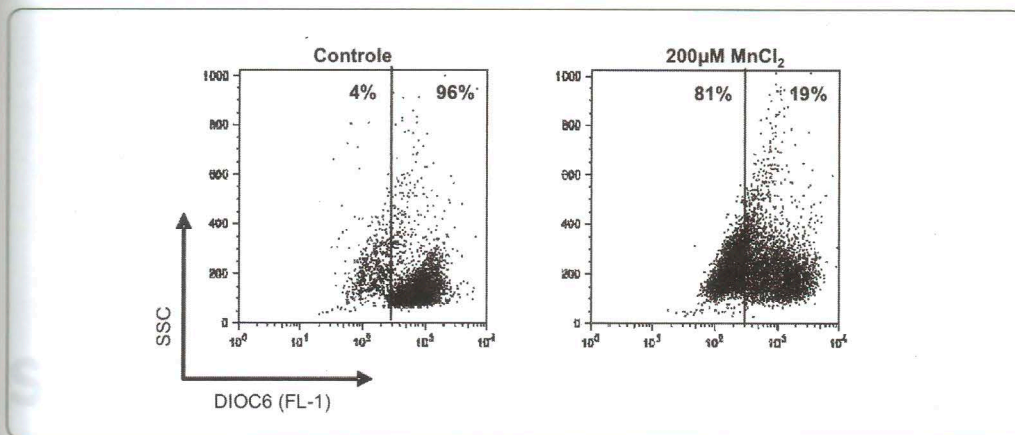
## MODIFICAÇÕES NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

### Descrição

A mitocôndria desenvolve papel central na apoptose, sofrendo alterações nas propriedades da sua membrana externa após receber os estímulos apoptóticos. Essas alterações levam a liberação de proteínas apoptogênicas confinadas no espaço intermembranar para o citosol, desencadeando assim o processo apoptótico. Esses fatores incluem o *citocromo c* que catalisa a formação de um complexo de ativação de caspases, denominado apoptossomo, formado por citocromo-c, Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor-1*), dATP e pró-caspase-9. Associado a esses eventos, ocorre uma perda



**Figura 9.6** - Avaliação da morte celular pela da análise do conteúdo de DNA. Células da linhagem DO11.10 foram tratadas ou não com  $1\mu\text{g/ml}$  de anticorpos anti-CD3 durante 18 horas. Células à esquerda do maior pico (G0-G1) apresentam conteúdo de DNA hipodiploide, sendo consideradas células em apoptose.



**Figura 9.7** - Modificações no potencial de membrana mitocondrial. Células HL-60 foram cultivadas por 24 horas sem tratamento (Controle) ou na presença de 200µM de  $MnCl_2$  e marcadas com  $DiOC_6(3)$ . Os quadrantes da direita mostram as células saudáveis, enquanto os quadrantes da esquerda representam células com potencial de membrana mitocondrial diminuído e, portanto, em processo de morte celular.

de potencial da membrana mitocondrial (PMM), o que pode ser acompanhado por citometria de fluxo, através da utilização de diferentes corantes lipofílicos, tais como a rodamina 123 e 3,3'-dihexiloxacarbocianina -  $DiOC_6(3)$ , ou a dicianina (JC-1) (Figura 9.7). Nos dois primeiros casos, observa-se uma perda da intensidade de fluorescência durante o processo de morte celular, justamente pela queda do potencial do PMM. No caso do JC-1, o processo de morte celular resulta em uma mudança no espectro de fluorescência, de vermelho para verde, que pode ser acompanhada utilizando-se os filtros FL1-H e FL2-H.

### Protocolo básico

- Colete as células por meio de seu modo de preferência (essa técnica requer um mínimo de  $5 \times 10^5$  células por amostra);
- Centrifugue-as para remoção do meio de cultura e ajuste da concentração celular;
- Ressuspenda as células em solução contendo um dos corantes. Para  $DiOC_6(3)$ , utilizar a concentração de 40 nM/100 µL por amostra, em meio de cultura sem soro;

- Incube por 20 minutos em estufa umidificada a 37°C, protegido da luz;
- Após esse período analise as amostras em citômetro de fluxo.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Darzynkiewicz Z, Bedner E Smolewski, et al. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol.* 2001;38(2):179-93.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 2009;16(8):1093-107.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma.* 1997;106(6):348-60.
- Wersto RP, Chrest FJ, Leary JF, Morris C, Stetler-Stevenson MA, Gabrielson E. Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis. *Cytometry.* 2001;46(5):296-306.
- Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.* 2011;103:55-98.