



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

PEDRO IVO LUCENA DA NOBREGA

**REGULAÇÃO DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO GÊNICA, MORTE E
TRANSFORMAÇÃO CELULAR PELAS ISOFORMAS DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO NFAT2**

Orientador: Prof. Dr. João P. B. Viola

**RIO DE JANEIRO
2017**



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

PEDRO IVO LUCENA DA NOBREGA

**REGULAÇÃO DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO GÊNICA, MORTE E
TRANSFORMAÇÃO CELULAR PELAS ISOFORMAS DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO NFAT2**

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

Orientador: Prof. Dr. João P. B. Viola

**RIO DE JANEIRO
2017**

L935r Lucena, Pedro Ivo.

Regulação diferencial de expressão gênica, morte e transformação celular pelas isoformas do fator de transcrição NFAT2 / Pedro Ivo Lucena. – Rio de Janeiro, 2017.

160 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientador: João P. B. Viola.

1. Expressão Gênica. 2. Morte Celular. 3. Fatores de Transcrição NFATC. 4. Isoformas de Proteínas. I. Viola, João P. B. (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 572.8



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Pedro Ivo Lucena da Nobrega

REGULAÇÃO DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO GÊNICA, MORTE E
TRANSFORMAÇÃO CELULAR PELAS ISOFORMAS DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO NFAT2

ORIENTADOR: Prof. Dr. João P. B. Viola

Aprovada em: 24 / 04 / 2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho – **Presidente**
Prof. Dr. Francisco Meirelles Bastos de Oliveira
Prof^a. Dr^a. Irene de Almeida Biasoli
Prof. Dr. Roger Chammas
Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz – Suplente I
Prof^a. Dr^a. Flávia Regina Souza Lima – Suplente II

RIO DE JANEIRO

2017



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

REGULAÇÃO DIFERENCIAL DE EXPRESSÃO GÊNICA, MORTE E TRANSFORMAÇÃO CELULAR PELAS ISOFORMAS DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT2

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Pedro Ivo Lucena da Nobrega

A família de fatores de transcrição NFAT (Fator Nuclear de células T Ativadas) é composta por quatro proteínas responsivas a influxo de cálcio (NFAT1-4) que apresentam diferentes isoformas já descritas. O NFAT2 foi correlacionado com alguns tipos de cânceres como linfomas e carcinomas pancreáticos, sugerindo um papel desta proteína na oncogênese. Duas isoformas do NFAT2 divergem apenas em sua porção N-terminal, apresentando 42 aminoácidos diferenciais no N-terminal da isoforma NFAT2 α , codificados pelo éxon 1 do gene e 28 aminoácidos diferenciais no NFAT2 β , codificados pelo éxon 2. Em linfócitos T e B naïve, o NFAT2 β apresenta níveis basais de expressão, enquanto os níveis de NFAT2 α são massivamente aumentados após ativação antigênica. Apesar destes perfis distintos de expressão sugerirem funções diferenciais na regulação gênica, pouco se conhece a respeito de papéis específicos destas isoformas na fisiologia celular. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o envolvimento das isoformas NFAT2 α e NFAT2 β no controle de morte e transformação celular. Para investigar os papéis diferenciais das isoformas do NFAT2, formas constitutivamente ativas (CA) destas proteínas foram expressas em fibroblastos NIH3T3 por transdução retroviral. Nossos dados mostraram que as proteínas CA-NFAT2 α e CA-NFAT2 β afetam diferencialmente a transformação e a morte celular em células NIH3T3. Células expressando CA-NFAT2 α apresentaram fenótipos de transformação celular como perda da inibição de crescimento por contato, crescimento independente de ancoragem e formação de tumores em camundongos imunodeficientes após inoculação subcutânea. Em contrapartida, CA-NFAT2 β levou a um fenótipo menos intenso de transformação celular e induziu morte celular a partir da regulação positiva da citocina TNF- α . Além disso, demonstramos que os papéis diferenciais das isoformas do NFAT2 em células NIH3T3 dependem dos domínios N-terminais alternativos. Um domínio ácido N-terminal específico do NFAT2 β é essencial para a morte celular induzida por esta isoforma, uma vez que a ablação do domínio ou mutações sítio-dirigidas de aminoácidos ácidos conservados aboliram completamente a indução de morte celular pelo CA-NFAT2 β e promoveram a transformação celular. Adicionalmente, a expressão de CA-NFAT2 β em linfócitos T CD4⁺ primários induziu morte celular e aumento de TNF- α e da proteína indutora de apoptose FasL. A análise dos níveis de mRNA das isoformas do NFAT2 em linhagens celulares tumorais e amostras de tumores humanos mostrou uma expressão aumentada da isoforma NFAT2 α em linhagem (Raji) e amostras de linfomas de Burkitt e linfomas difusos de grandes células B (DLBCL), sugerindo um papel oncogênico específico para a esta isoforma. Em conjunto, estes resultados sugerem que domínios alternativos no NFAT2 poderiam conferir mecanismos diferenciais para o controle de funções celulares, onde o NFAT2 α poderia atuar como um fator oncogênico, enquanto o NFAT2 β poderia desempenhar papéis pró-apoptóticos.



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

DIFFERENTIAL REGULATION OF GENE EXPRESSION, CELL DEATH, AND TRANSFORMATION BY NFAT2 TRANSCRIPTION FACTOR ISOFORMS

ABSTRACT

Pedro Ivo Lucena da Nobrega

NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) family of transcription factors is composed of four calcium-responsive proteins (NFAT1-4) that display different isoforms. NFAT2 were associated to the development of several cancer types such as lymphomas and pancreatic carcinomas. Two of the NFAT2 isoforms diverge only at the N terminus, which contains 42 amino acids in the NFAT2 α protein, encoded by exon 1 of the gene, or 28 differential amino acids in the NFAT2 β protein, encoded by exon 2. In naïve T and B lymphocytes, NFAT2 β has a basal expression level while NFAT2 α levels are massively increased after antigenic activation. Although distinct expression patterns suggest differential roles in gene regulation, specific roles in cell physiology for NFAT2 isoforms remain unclear. Then, the aim of this work is to analyze differential roles of NFAT2 isoforms in cell death and transformation. In order to study the roles of NFAT2 isoforms in cell physiology, non-transformed NIH3T3 fibroblasts were retrovirally transduced with vectors containing constitutively active (CA) forms of NFAT2 proteins. Our data showed that CA-NFAT2 α and CA-NFAT2 β distinctly affect cell death and transformation in NIH3T3 cells. CA-NFAT2 α -expressing cells showed cell transformation phenotypes such as loss of contact growth inhibition, anchorage-independent cell growth, and tumor formation in immunodeficient mice. In contrast, CA-NFAT2 β led to a milder cell-transformation phenotype and induced cell death through up-regulation of TNF- α cytokine. Furthermore, we demonstrated that differential roles for NFAT2 isoforms in NIH3T3 cells depend of alternative N-terminal domains. A NFAT2 β -specific N-terminal acidic domain is necessary for cell death induction, whereas its ablation or substitutions of conserved acidic amino acids completely abolish cell death and enhance cell transformation phenotype. CA-NFAT2 β expression also induces cell death and increases the levels of FasL and TNF- α in CD4⁺ T cells. The analysis of NFAT2 isoforms mRNA levels in cancer cell lines and human cancer samples showed increased expression of NFAT2 α in Burkitt lymphoma cell line (Raji) and samples, and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) samples, suggesting an isoform-specific involvement of NFAT2 in cancer development. Taken together, these data suggest that alternative domains in NFAT2 could provide differential mechanisms for control of cellular function, supporting that NFAT2 α acts as an oncogenic factor while NFAT2 β could play pro-apoptotic roles.



Este trabalho foi realizado no Programa de Biologia Celular da Coordenação de Pesquisa (CPQ) do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e recebeu auxílio financeiro do Ministério da Saúde, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para o Controle do Câncer (INCT – Câncer).

AGRADECIMENTOS

Reservo este espaço para agradecer àqueles que foram importantes ou mesmo essenciais para realização deste trabalho.

- À minha esposa, Rafaella, por todo amor, carinho, amizade e apoio incondicional. Agradeço por me fazer cada vez mais feliz e me inspirar a querer melhorar sempre. Obrigado pela vida que construímos juntos e por escolher compartilhar conquistas, planos e sonhos comigo.
- À minha família. Meus pais, Marta e Pedro, por serem essenciais na construção da pessoa que sou hoje. Muito obrigado por todo carinho que sempre me dedicaram e também por nunca terem medido esforços para me dar a melhor educação possível. Agradeço também à minha irmã, Mariana, e meus avós, que sempre se fizeram presentes em minha vida.
- Ao meu orientador, João Viola, pela orientação, ensinamentos, críticas e por tornar possível a realização deste trabalho. Obrigado pela compreensão, pelo apoio e pelas lições que levarei comigo por toda a minha vida profissional.
- A todos os amigos com quem tive o prazer de trabalhar nestes anos no Programa de Biologia Celular do INCA, Aleksandra, Amanda, Ana, André, Bárbara, Bianca, Bruno, Cris, Danielle, Deborah, Douglas, Emilia, Érika, Flávia, Giu, Karina, Leonardo, Lucas, Luiza, Marcelle, Marina, Matheus, Miriam, Paty, Possik, Rafaela, Renata, Steffi, Tati e Vanessa, pelo incrível ambiente de trabalho que proporcionam e pelas sugestões durante as nossas diversas reuniões e seminários. Obrigado a todos pelos bons momentos, pelas risadas e pelos momentos sérios também. Agradeço em especial ao Bruno, ao Douglas e à Emilia pela colaboração na parte experimental deste trabalho. Obrigado também ao pessoal do apoio técnico pelo suporte na realização deste trabalho.
- Às colaboradoras deste trabalho, Claudete Klumb e Marcela Robaina, do Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, e Mariana Boroni, do Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional.
- Às agências de fomento que tornaram este trabalho possível: Ministério da Saúde, CAPES, FAPERJ, CNPq e INCT – Câncer.

Rei: *E tu para que queres um barco, pode-se saber?*

Homem do barco: *Para ir à procura da ilha desconhecida.*

Rei (disfarçando o riso): *Que ilha desconhecida?*

Homem do barco: *A ilha desconhecida.*

Rei: *Disparate, já não há ilhas desconhecidas!*

Homem do barco: *Quem foi que te disse, rei, que já não há ilhas desconhecidas?*

Rei: *Estão todas nos mapas.*

Homem do barco: *Nos mapas só estão as ilhas conhecidas.*

Rei: *E que ilha desconhecida é essa de que queres ir à procura?*

Homem do barco: *Se eu to pudesse dizer, então não seria desconhecida.*

Rei (sério): *A quem ouviste tu falar dela?*

Homem do barco: *A ninguém.*

Rei: *Neste caso, por que teimas em dizer que ela existe?*

Homem do barco: *Simplesmente porque é impossível que não exista uma ilha desconhecida.*

(José Saramago – O Conto da Ilha Desconhecida)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Fenótipos dos camundongos deficientes para as diferentes proteínas NFAT.....	18
Tabela 1.2 – Dados correlacionando tumores humanos a alterações nas proteínas NFAT.....	25
Tabela 3.1 – Lista de primers utilizados na construção das variantes do CA-NFAT2.....	33
Tabela 3.2 – Lista de primers utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – A família NFAT de fatores de transcrição.....	2
Figura 1.2 – Domínios funcionais das proteínas NFAT.....	4
Figura 1.3 – Via de ativação das proteínas NFAT.....	7
Figura 1.4 – Regulação do ciclo celular pelas proteínas NFAT.....	20
Figura 1.5 – Regulação da apoptose pelas proteínas NFAT.....	22
Figura 1.6 – Os <i>hallmarks</i> do câncer.....	23
Figura 1.7 – Regulação transcricional das diferentes isoformas do fator de transcrição NFAT2.....	28
Figura 4.1 – Isoformas do NFAT2 utilizadas neste estudo.....	45
Figura 4.2 – Células NIH3T3 expressando CA-NFAT2 α e CA-NFAT2 β apresentam diferentes perfis de proliferação.....	47
Figura 4.3 – O CA-NFAT2 β induz morte celular em NIH3T3.....	48
Figura 4.4 – O NFAT2 induz a perda de inibição do crescimento mediada por contato.....	50
Figura 4.5 – As isoformas constitutivamente ativas do NFAT2 possibilitam crescimento na ausência de substrato sólido para adesão.....	52
Figura 4.6 – As isoformas do NFAT2 induzem a formação de tumores <i>in vivo</i>	53

Figura 4.7 –	Representação esquemática da proteína truncada CA-NFAT2- Δ N.....	55
Figura 4.8 –	O N-terminal do CA-NFAT2 β é essencial para indução de morte celular em células NIH3T3.....	56
Figura 4.9 –	A transformação celular induzida pelas isoformas do NFAT2 não depende das porções das proteínas provenientes dos éxons 1 ou 2.....	57
Figura 4.10 –	Representação esquemática das diferentes proteínas CA-NFAT2 β truncadas.....	59
Figura 4.11 –	A indução de morte celular pelo CA-NFAT2 β depende do domínio ácido N-terminal.....	60
Figura 4.12 –	A morte celular induzida pelo CA-NFAT2 β é dependente dos aminoácidos ácidos do motivo conservado N-terminal.....	62
Figura 4.13 –	A mutação do motivo ácido aumenta o potencial de transformação celular do NFAT2 β	63
Figura 4.14 –	CA-NFAT2 β induz a regulação positiva de <i>Tnf</i> , <i>Fasl</i> , <i>Pak7</i> e <i>Il10</i>	66
Figura 4.15 –	CA-NFAT2 β induz o aumento dos níveis proteicos de TNF- α	67
Figura 4.16 –	O CA-NFAT2 regula o elemento κ 3(<i>long</i>) no promotor de TNF- α	68
Figura 4.17 –	As proteínas CA-NFAT2 induzem um aumento discreto dos níveis proteicos de FasL.....	69
Figura 4.18 –	O aumento de TNF- α , mas não FasL, induz morte celular em células NIH3T3.....	70
Figura 4.19 –	Expressão das variantes do NFAT2 em linfócitos T CD4 ⁺ transduzidos.....	72
Figura 4.20 –	CA-NFAT2 β induz morte celular em linfócitos T CD4 ⁺	74
Figura 4.21 –	CA-NFAT2 β induz aumento de TNF- α em linfócitos T CD4 ⁺ tratados com PMA.....	75
Figura 4.22 –	CA-NFAT2 β induz morte celular e aumenta os níveis de FasL e TNF- α em linfócitos T CD4 ⁺	76
Figura 4.23 –	As isoformas do NFAT2 são diferencialmente expressas em linhagens tumorais humanas.....	79
Figura 4.24 –	As isoformas do NFAT2 são diferencialmente expressas em linfomas de Burkitt.....	80

Figura 4.25 – As isoformas do NFAT2 são diferencialmente expressas em DLBCL.....	81
Figura 4.26 – O nível de expressão do gene do NFAT2 em DLBCL correlaciona especificamente com a expressão da isoforma NFAT2 α	82

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D (<i>7-aminoactinomycin D</i>)
AAD	Domínio ácido de ativação (<i>activation acidic domain</i>)
ADAMTS	Desintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina (<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>)
AICD	Morte celular induzida por ativação (<i>activation-induced cell death</i>)
AIF	Fator indutor de apoptose (<i>apoptosis inducing factor</i>)
AP-1	Proteína ativadora-1 (<i>activation protein 1</i>)
APC	Aloficocianina (<i>allophycocyanin</i>)
APCs	Células apresentadoras de antígeno (<i>antigen presenting cells</i>)
ARRE-2	Elemento responsivo ao receptor de antígeno 2 (<i>antigen receptor response element 2</i>)
ATF2	Fator de transcrição ativador 2 (<i>activating transcription factor 2</i>)
Bad	Promotor de morte associado a Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated death promoter</i>)
Bak	Exterminador/antagonista homólogo a Bcl-2 (<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>)
Bax	Proteína X associada a Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl	Linfoma de células B (<i>B-cell lymphoma</i>)
BCR	Receptor de células B (<i>B-cell receptor</i>)
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (<i>brain-derived neurotrophic Factor</i>)
BH	Domínio de homologia a Bcl-2 (<i>Bcl-2 homology domain</i>)
Bid	Agonista de morte celular com domínio de interação com BH3 (<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>)
Bik	Exterminadora de interação com Bcl-2 (<i>Bcl-2-interacting killer</i>)
Bim	Mediador de morte celular de interação com Bcl-2 (<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>)
BLyS	Estimulador de linfócitos B (<i>B lymphocyte stimulator</i>)
Bmf	Fator modificador de Bcl-2 (<i>Bcl-2 modifying factor</i>)

Bok	Exterminador ovariano relacionado a Bcl-2 (<i>Bcl-2 related ovarian killer</i>)
CA	Constitutivamente ativo
CAD	DNase ativada por caspase (<i>caspase-activated DNase</i>)
CaM	Calmodulina
CBP	Proteína ligadora de CREB (<i>CREB-binding protein</i>)
CD	Cluster de diferenciação
CD40L	Ligante de CD40 (<i>CD40 ligand</i>)
CDK	Cinase dependente de ciclina (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cFLIP	Proteína inibidora semelhante a FLICE celular (<i>Cellular FLICE-inhibitory protein</i>)
CK1	Cinase de caseína 1 (<i>casein kinase 1</i>)
CKI	Inibidor de CDK (<i>CDK inhibitor</i>)
CMV	Citomegalovírus
Cot	Oncogene de câncer de tireóide de Osaka (<i>cancer Osaka thyroid oncogene</i>)
COX-2	Ciclooxigenase-2
CRAC	Canal de cálcio ativado por liberação de cálcio (<i>Calcium release-activated calcium channel</i>)
CREB	Proteína ligadora ao elemento responsivo a cAMP (<i>cAMP response element binding protein</i>)
CREBBP	Proteína ligadora de CREB (<i>CREB-binding protein</i>)
CsA	Ciclosporina A
CTLA-4	Antígeno de linfócitos T citotóxicos-4 (<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>)
DAG	Diacilglicerol
DAP12	Proteína de 12 KDa ativadora de DNAX (<i>DNAX-activating protein of 12 kDa</i>)

DBD	Domínio de ligação ao DNA (<i>DNA-binding domain</i>)
DDIAS	Proteína supressora de apoptose induzida por dano de DNA (<i>DNA damage-induced apoptosis suppressor protein</i>)
DLBCL	Linfoma difuso de grandes células B (<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>)
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
D.O.	Densidade óptica
DYRK1A	Cinase de dupla especificidade regulada e fosforilada por tirosina 1A (<i>dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A</i>)
E2F	Fator de ligação ao promotor E2 (<i>E2 promoter binding factor</i>)
EDTA	Ácido triacético diamino etileno (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGFP	Proteína fluorescente verde melhorada (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EGR	Proteína de resposta a crescimento precoce (<i>early growth response protein</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligada a enzima (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FasL	Ligante de Fas (<i>Fas ligand</i>)
Fos	Oncogene de Osteosarcoma FBJ (<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>)
FOXK2	Caixa de forquilha K2 (<i>Forkhead box K2</i>)
FPKM	Fragments por quilobase de éxon por milhão de leituras mapeadas (<i>fragments per kilobase of exon per million reads mapped</i>)
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GATA3	Proteína ligadora de GATA 3
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GSK3	Glicogênio sintase cinase 3 (<i>glycogen synthase kinase 3</i>)
GTE _x	Expressão Tecidual por Genótipo (<i>Genotype-Tissue Expression</i>)
HBS	Sais balanceados de Hank (Hank's balanced salts)

HEPES	Ácido 2-hidroxi-etil-1-piperazina-etanossulfônico (<i>2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia-1 α (<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>)
HLTF	Fator de transcrição semelhante a helicase (<i>helicase-like transcription factor</i>)
HRP	Peroxidase de raiz forte (<i>horseradish peroxidase</i>)
hTERT	Transcriptase reversa telomerase humana (<i>telomerase reverse transcriptase</i>)
IAP	Inibidor de apoptose (<i>inhibitor of apoptosis</i>)
ICAD	Inibidor de CAD (inhibitor of CAD)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILP2	Proteína semelhante a IAP 2 (<i>IAP-like protein 2</i>)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INK4	Inibidores de CDK4 (<i>inhibitors of CDK4</i>)
IP	Iodeto de propídio
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IRES	Sítio interno de entrada de ribossomos (<i>internal ribosome entry site</i>)
IRF-2BP2	Proteína ligadora 2 do fator regulador de interferon-2 (<i>interferon regulatory factor-2-binding protein 2</i>)
IRF-4	Fator regulador de interferon-4 (<i>interferon regulatory factor-4</i>)
LTR	Repetição terminal longa (<i>long terminal repeat</i>)
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
Mcl-1	Leucemia de células mieloides 1 (<i>myeloid cell leukemia 1</i>)
MCS	Sítio múltiplo de clonagem (<i>multiple cloning site</i>)
MEF2	Fator reforçador de miócito-2 (<i>myocyte enhancer factor-2</i>)
MoMuLV	Vírus da leucemia murina de Moloney (<i>Moloney murine leukemia virus</i>)

mTOR	Alvo mecanístico de rapamicina (<i>mechanistic target of rapamycin</i>)
NAIP	Proteína inibidora de apoptose neuronal (<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>)
Nek6/Nek7	Cinase relacionada a NimA 6/7 (<i>NimA-related kinase 6/7</i>)
NF- κ B	Fator nuclear κ B (<i>nuclear factor κB</i>)
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas (<i>nuclear factor of activated T-cell</i>)
NHR	Região de homologia a NFAT (<i>NFAT homology region</i>)
NK	Exterminadora natural (<i>natural killer</i>)
NLS	Sinal de localização nuclear (<i>nuclear localization signal</i>)
Nur77	Receptor nuclear órfão 77 (<i>orphan nuclear receptor 77</i>)
OSCAR	Receptor associado a osteoclastos (<i>osteoclast-associated receptor</i>)
PAGE	Eletroforese em gel de poliácridamida (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Pak7	Cinase ativada por p21 7 (<i>p21-activated kinase 7</i>)
PBMC	Célula mononuclear de sangue periférico (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Tampão fosfato de salina (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>phycoerythrin</i>)
PGK1	Fosfoglicerato cinase 1 (<i>phosphoglycerate kinase 1</i>)
PIP ₂	Fosfatidilinositol bifosfato (<i>phosphatidylinositol bisphosphate</i>)
PKC	Proteína cinase C (<i>protein kinase C</i>)
PLC	Fosfolipase C (<i>phospholipase C</i>)
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato (<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
pRb	Proteína retinoblastoma
PUMA	Modulador de apoptose regulado positivamente por p53 (<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>)
RAG	Gene ativador de recombinação (<i>recombination-activating gene</i>)

RANKL	Ligante do receptor ativador de NF- κ B (<i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)
RasGRP	Proteína de liberação de nucleotídeo guanil de Ras (<i>Ras guanyl-releasing protein</i>)
Rcf	Força centrífuga relativa (<i>relative centrifugal force</i>)
RHR	Região de homologia a Rel (<i>Rel homology region</i>)
RNA	Ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
RPTOR	Proteína associada reguladora de mTOR (<i>regulatory-associated protein of mTOR</i>)
SDS	Duodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Smac/DIABLO	Segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria/proteína ligadora de inibidor direto da apoptose com baixo pI (<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI</i>)
SP	Serina-prolina
Sp1	Proteína de especificidade 1 (<i>specificity protein 1</i>)
SRR	Região rica em serina (<i>serine-rich region</i>)
STIM	Molécula de interação estromal (<i>stromal interaction molecule</i>)
TAD	Domínio de transativação (<i>transactivation domain</i>)
TAD-C	Domínio de transativação C-terminal (<i>C-terminal transactivation domain</i>)
TAD-N	Domínio de transativação N-terminal (<i>N-terminal transactivation domain</i>)
TBP	Proteína ligadora de TATA (<i>TATA binding protein</i>)
TBS	Tampão tris salino (<i>tris-buffered saline</i>)
TCGA	O Atlas do Genoma do Câncer (<i>The Cancer Genome Atlas</i>)
TCR	Receptor de células T (<i>T-cell receptor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral α (tumor necrosis factor α)
TNFR	Receptor de TNF (<i>TNF receptor</i>)
TonE-BP	Proteína de ligação aprimorada responsiva a tonicidade (<i>tonicity-responsive enhancer binding protein</i>)
Tpl2	Locus de progressão tumoral 2 (<i>tumor progression locus 2</i>)

TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
TRAILR	Receptor de TRAIL (<i>TRAIL receptor</i>)
TRAP	Fosfatase ácida resistente a tartrato (<i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>)
Trim17	Proteína contendo motivo tripartido 17 (<i>tripartite motif-containing protein 17</i>)
TrkB	Receptor tropomiosina cinase B (<i>tropomyosin receptor kinase B</i>)
TRRAP	Proteína associada a domínio de transformação/transcrição (<i>transformation/transcription domain-associated protein</i>)
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	Receptor de VEGF (<i>VEGF receptor</i>)
XIAP	Proteína inibidora da apoptose ligada ao X (<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>)
ZBTB40	Proteína contendo domínios dedo de zinco e BTB 40 (<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 40</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A família NFAT de fatores de transcrição.....	1
1.1.1. Domínios funcionais das proteínas NFAT.....	2
1.1.2. Regulação e atividade das proteínas NFAT.....	5
1.1.3. Isoformas das proteínas NFAT e sua expressão.....	8
1.1.4. Funções fisiológicas das proteínas NFAT.....	10
1.2. Ciclo e morte celular.....	14
1.2.1. Ciclo celular.....	14
1.2.2. Morte celular.....	15
1.2.3. NFAT no controle de ciclo e morte celular.....	18
1.3. NFAT e tumorigênese.....	23
1.4. O fator de transcrição NFAT2.....	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Cultura de células.....	31
3.2. Animais.....	31
3.3. Amostras humanas.....	31
3.3.1. Doadores de sangue e amostras de PBMC.....	31
3.3.2. Pacientes e amostras de linfoma de Burkitt.....	32
3.3.3. Amostras de baço e DLBCL.....	32
3.4. Construção de plasmídeos.....	32

3.5. Purificação de células T CD4 ⁺ primárias.....	34
3.6. Transdução de células NIH3T3 com retrovírus recombinantes.....	34
3.7. Transdução de células T CD4 ⁺ com retrovírus recombinantes.....	35
3.8. <i>Western blotting</i>	36
3.9. Cinética de proliferação celular.....	37
3.10. Análise de morte celular por marcação com iodeto de propídio.....	37
3.11. Ensaio de formação de focos.....	38
3.12. Crescimento independente de ancoragem em meio semi-sólido.....	38
3.13. Formação de tumores em camundongos atímicos.....	38
3.14. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	39
3.15. PCR em tempo real.....	40
3.16. ELISA.....	40
3.17. Marcação de superfície.....	41
3.18. Ensaio de transativação.....	41
3.19. Análise de morte celular por marcação com Anexina-V.....	42
3.20. Análise de dados de RNA-Seq.....	42
3.21. Análises estatísticas.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1. As isoformas do NFAT2 afetam de maneira distinta a proliferação e a morte celular em fibroblastos NIH3T3.....	44
4.2. NFAT2 α e NFAT2 β induzem transformação celular com diferentes intensidades em células NIH3T3.....	49
4.3. O domínio ácido específico do NFAT2 β é responsável pelos papéis diferenciais das isoformas do NFAT2.....	54
4.4. O CA-NFAT2 β induz morte celular através da regulação positiva de TNF- α	64
4.5. O CA-NFAT2 β induz morte celular e aumento dos níveis de FasL e TNF- α em linfócitos T CD4 ⁺ primários.....	71

4.6. As isoformas do NFAT2 são diferencialmente expressas em linfomas de Burkitt e linfomas difusos de grandes células B.....	77
5. DISCUSSÃO.....	83
6. CONCLUSÕES.....	94
7. PERSPECTIVAS.....	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
9. ANEXOS.....	111

1. Introdução

1.1. A família NFAT de fatores de transcrição

O fator nuclear de células T ativadas (NFAT – *nuclear factor of activated T cells*) foi descrito inicialmente como um fator de transcrição essencial para ativação e diferenciação de células T (SHAW *et al.*, 1988). Apesar do nome, as proteínas da família NFAT estão presentes não apenas em células T, mas também em diversos outros tipos celulares (RAO *et al.*, 1997). A família NFAT é atualmente composta por quatro membros regulados pela sinalização cálcio/calcineurina (Fig.1.1), NFAT1 (NFATp ou NFATc2), NFAT2 (NFATc ou NFATc1), NFAT3 (NFATc4) e NFAT4 (NFATc3 ou NFATx), além de um quinto membro, NFAT5 (TonE-PB ou NFAT11), regulado por estresse hiperosmótico (MCCAFFREY *et al.*, 1993; NORTHROP *et al.*, 1994; HOEY *et al.*, 1995; MASUDA *et al.*, 1995; LOPEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 1999). Todos os membros da família regulados por cálcio já tiveram diferentes isoformas descritas (Fig.1.1) (VIHMA *et al.*, 2008). Sendo o NFAT5 um membro mais distante da família NFAT, nos ateremos a descrever os membros da família regulados pela via cálcio/calcineurina. Sempre que utilizarmos o termo NFAT neste trabalho, estaremos nos referindo aos quatro membros clássicos da família, NFAT1-4.

As proteínas da família NFAT apresentam dois domínios conservados: o domínio de ligação ao DNA (DBD – *DNA-binding domain*), que define a família NFAT, e a região de homologia a NFAT (NHR – *NFAT homology region*), responsável pela regulação da localização subcelular das proteínas NFAT (Fig. 1.1) (RAO *et al.*, 1997). O DBD e o NHR são flanqueados ainda por dois domínios de transativação a N-terminal (TAD-N) e C-terminal (TAD-C) (RAO *et al.*, 1997).

As proteínas NFAT foram caracterizadas como proteínas citosólicas presentes constitutivamente em células em repouso (RAO *et al.*, 1997). Com a estimulação de receptores ligados à mobilização de cálcio, como o TCR, BCR, receptores tirosina-cinase e receptores acoplados a proteína G, as proteínas NFAT são ativadas pela calcineurina, uma serina-treonina fosfatase que é ativada pela via cálcio/calmodulina e é alvo das drogas imunossupressoras ciclosporina A (CsA) e FK506 (RAO *et al.*, 1997). Uma vez ativados, os fatores de transcrição NFAT são translocados para o núcleo, podendo se ligar a regiões promotoras e enhancers de seus diversos genes-alvo.

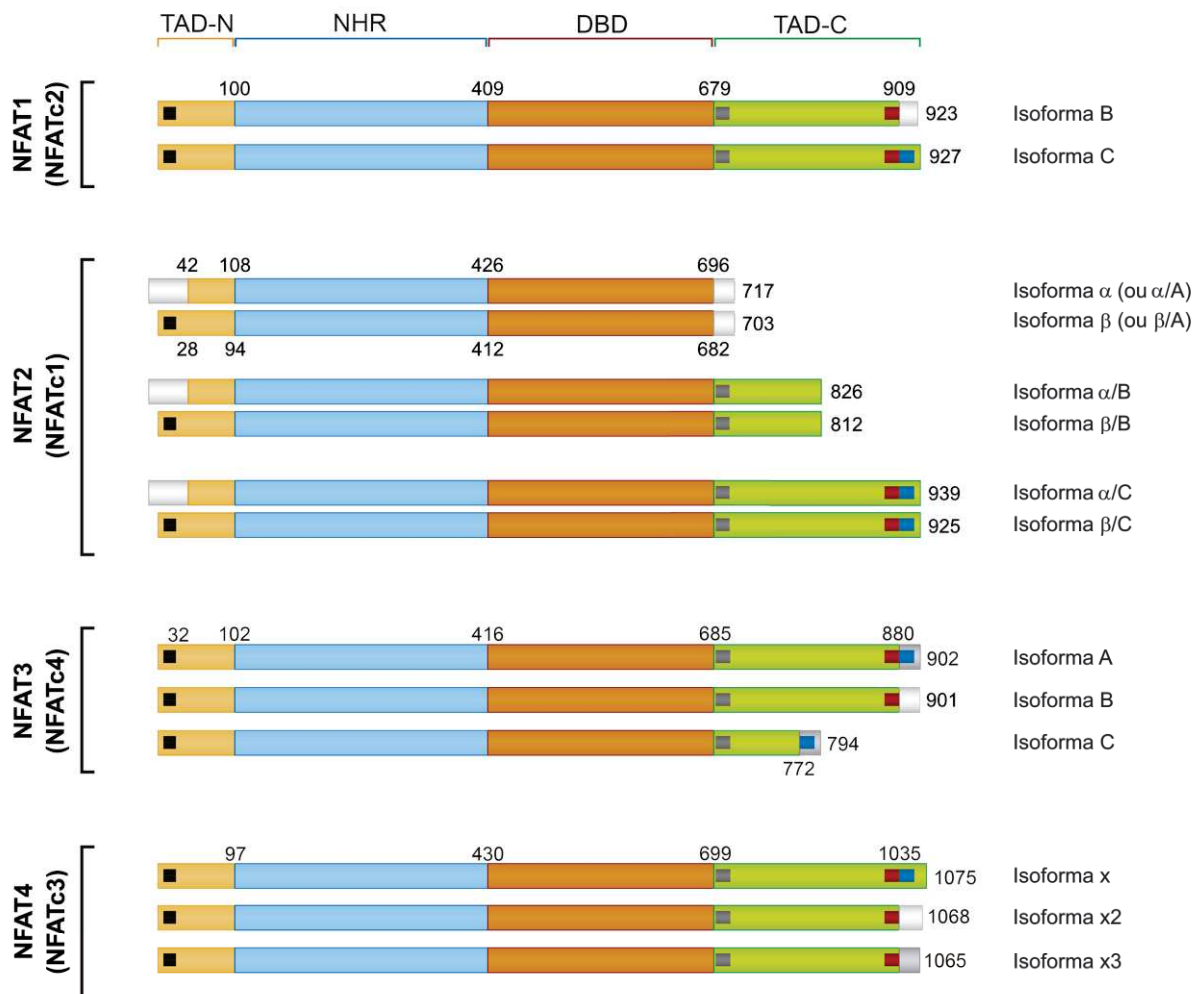


Figura 1.1. A família NFAT de fatores de transcrição. Representação esquemática dos membros da família NFAT e de suas isoformas. Estão representados no esquema o domínio de ligação ao DNA (DBD), a região de homologia a NFAT (NHR), o domínio de transativação N-terminal (TAD-N) e o domínio de transativação C-terminal (TAD-C). As caixas preta, cinza, vermelha e azul representam motivos conservados entre proteínas NFAT presentes nos domínios de transativação das proteínas NFAT. Adaptado de MOGNOL *et al.* (2016).

1.1.1. Domínios funcionais das proteínas NFAT

O DBD é o domínio que define as proteínas da família NFAT. Este é um domínio de cerca de 300 resíduos, contido entre os resíduos ~400 e ~700 das proteínas da família, sendo altamente conservado dentro da família NFAT. Este domínio também é conhecido como RHR (*Rel homology region* – região de homologia a Rel), devido a sua moderada similaridade de sequência ao domínio de ligação ao DNA das proteínas da família Rel (NOLAN, 1994; JAIN *et al.*, 1995). Este

domínio apresenta identidade de sequência de aproximadamente 65% entre os membros da família NFAT e de aproximadamente 17% entre a família NFAT e a família Rel (HOEY *et al.*, 1995). Apesar da aparentemente pequena identidade de sequência entre o DBD das proteínas da família NFAT e o das proteínas da família Rel, a sequência mínima de ligação ao DNA da proteína NFAT1 (cerca de 190 aminoácidos) possui grande similaridade com o domínio N-terminal da proteína NF- κ B p50, responsável pelo contato desta proteína com bases específicas do DNA (JAIN *et al.*, 1995; MULLER *et al.*, 1995). A alça de reconhecimento (RFRYxCEG) nas proteínas da família Rel de fatores de transcrição está representada na família NFAT pela sequência igualmente conservada RAHYETEG, cujos resíduos de aminoácido sublinhados representam pontos de contato com DNA (JAIN *et al.*, 1995; CHYTIL e VERDINE, 1996; CHEN *et al.*, 1998).

Outro domínio que possui conservação importante entre os membros da família NFAT é a região de homologia a NFAT. Este domínio de aproximadamente 300 aminoácidos está localizado a N-terminal do DBD e apresenta um menor grau de identidade de sequência se comparado ao DBD. Contudo, alguns motivos de sequência altamente conservados estão presentes no NHR e são característicos da família NFAT (HOGAN *et al.*, 2003). Este é um domínio regulatório, responsável pela interação com a fosfatase calcineurina e localização subcelular das proteínas NFAT (LUO *et al.*, 1996c). Em células em repouso, o NHR apresenta-se fosforilado em vários resíduos de serina específicos distribuídos em três motivos de repetição serina-prolina (*SP-repeat motifs*), de sequência consenso [SPxx]SPxxSPxxSPxxxx[D/E][D/E] (onde x representa aminoácidos não-conservados), em duas regiões ricas em serina, SRR-1 (*serine-rich region-1*), de sequência SPASSGSSASFISD, e SRR-2 (*serine-rich region-2*), de sequência SRSSS, e um motivo KTS (BEALS *et al.*, 1997a; OKAMURA *et al.*, 2000; HOGAN *et al.*, 2003) (Fig. 1.2). Quando ativada, a calcineurina se liga ao NHR pela sequência conservada PxlxIT (Fig. 1.2) e desfosforila as serinas dos resíduos citados acima (ARAMBURU *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 1999). A região de homologia a NFAT apresenta também uma sequência de localização nuclear (NLS – *nuclear localization signal*), de sequência KRR ou KRK (LUO *et al.*, 1996c).

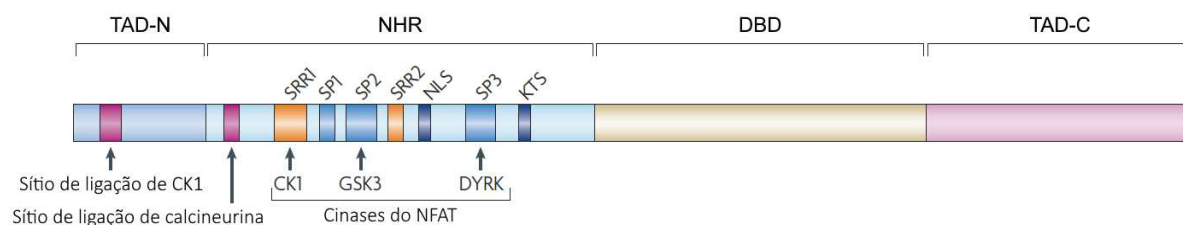


Figura 1.2. Domínios funcionais das proteínas NFAT. Esquemática dos domínios funcionais das proteínas da família NFAT. Os membros da família NFAT apresentam dois domínios altamente conservados em sua estrutura protéica: o domínio de ligação ao DNA (DBD) e a região de homologia a NFAT (NHR). As proteínas NFAT apresentam também diferentes domínios de transativação (TAD) nas regiões N- e C-terminal. No NHR estão representados a região regulatória de NFAT1 onde estão representados: as regiões ricas em serina (SRR1 e SRR2), os motivos serina-prolina (SP1, SP2 e SP3), o motivo KTS e o sinal de localização nuclear (NLS). Adaptado de MULLER e RAO (2010).

As regiões das proteínas NFAT localizadas fora do DBD e do NHR mostram relativamente pouca conservação entre os membros da família. Essas regiões são definidas como domínios de transativação (RAO *et al.*, 1997). Estes domínios compreendem os ~100 resíduos de aminoácido da porção mais N-terminal das proteínas, chamada de TAD-N e a porção C-terminal, o TAD-C, que pode variar de ~15 a ~400 resíduos de aminoácido. Já foi descrito que as regiões N-terminais do NFAT1, da isoforma β do NFAT2 e do NFAT3 são capazes de promover atividade transcricional em ensaios de único-híbrido (LUO *et al.*, 1996b; YANG *et al.*, 2001; HOCK e BROWN, 2003). O mesmo foi observado para as regiões C-terminais do NFAT1, do NFAT3, do NFAT4 e das isoformas longas do NFAT2 (LUO *et al.*, 1996b; IMAMURA *et al.*, 1998; CHUVPILO *et al.*, 1999a; YANG *et al.*, 2001). Além de seu papel direto na transativação de genes, os TADs das proteínas NFAT podem ainda ser necessários para cooperação com proteínas parceiras na regulação gênica, como o fator de transcrição MEF2 (*myocyte enhancing factor 2*) ou a proteína co-reguladora IRF-2BP2 (*interferon regulator factor-2 binding protein 2*), que interagem com o TAD-C do NFAT1, ou os co-fatores transcricionais CBP/p300, que interagem com o TAD-N do NFAT1 e do NFAT2 (GARCIA-RODRIGUEZ e RAO, 1998; AVOTS *et al.*, 1999; YOUN *et al.*, 2000; CARNEIRO *et al.*, 2011).

Os domínios de transativação podem estar completamente ausentes em algumas isoformas ou reter alguns pequenos motivos conservados entre os diferentes membros da família (Fig. 1.1). Três principais motivos conservados podem ser identificados dentro dos TADs das variantes do NFAT, um presente no TAD-N e dois no TAD-C (Fig. 1.1). O primeiro motivo, localizado no TAD-N, está presente na

maioria das proteínas NFAT (Fig. 1.1., caixa preta) e é composto por vários aminoácidos acídicos e hidrofóbicos, o que sugere que este possa atuar como um domínio ácido de ativação da transcrição (TRIEZENBERG, 1995; RAO *et al.*, 1997; HOCK e BROWN, 2003). O segundo motivo se localiza no início do TAD-C (Fig. 1.1, caixa cinza) e já foi descrito como um sítio de sumoilação nas proteínas NFAT1 e NFAT2 capaz de alterar a localização destas proteínas no núcleo, afetando sua atividade (TERUI *et al.*, 2004; NAYAK *et al.*, 2009). O terceiro motivo se localiza no fim do TAD-C (Fig. 1.1., caixas vermelha e azul) e dados da literatura sugerem que este é importante para a transativação a partir do TAD-C das proteínas NFAT (LUO *et al.*, 1996b; IMAMURA *et al.*, 1998; CHUVPILO *et al.*, 1999a; YANG *et al.*, 2001).

As proteínas NFAT apresentam isoformas que variam em suas porções N- e C-terminais, levando a um grande repertório de domínios TAD. Como essas regiões podem regular a expressão gênica, a presença ou ausência de motivos conservados nas diferentes variantes do NFAT talvez resulte em funções diferenciais. Entretanto, ainda há carência de evidências diretas que demonstrem um papel diferencial das isoformas do NFAT na fisiologia celular.

1.1.2. Regulação e atividade das proteínas NFAT

Três passos importantes foram definidos para a ação das proteínas NFAT: a desfosforilação dos resíduos de serina presentes no NHR, a translocação para o núcleo e a ligação ao DNA. Em células em repouso, o NFAT encontra-se fosforilado no citoplasma e demonstra baixa afinidade ao DNA (SHAW *et al.*, 1995). Estímulos envolvidos com a mobilização de cálcio rapidamente levam à desfosforilação das proteínas NFAT e sua translocação para o núcleo, onde se ligam ao DNA, graças à alta afinidade das proteínas NFAT desfosforiladas por este (RAO *et al.*, 1997). Uma vez ligadas ao DNA, as proteínas NFAT podem, juntamente com outros fatores, promover a expressão gênica. Com a diminuição dos níveis de cálcio intracelulares, o NFAT é novamente fosforilado e levado de volta ao citoplasma (LOH *et al.*, 1996a; LOH *et al.*, 1996b). A via de ativação do NFAT está demonstrada na Figura 1.3.

A estimulação de receptores ligados à mobilização de cálcio, como TCR, BCR, receptores acoplados a proteína G, receptores tirosina-cinase e receptores Fc γ e Fc ϵ , ativa a fosfolipase C (PLC – *phospholipase C*) (HOGAN *et al.*, 2003; MACIAN, 2005). A PLC ativada hidrolisa o fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), gerando

diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). O IP₃ se liga a seu receptor na membrana do retículo endoplasmático, levando à sua abertura e à liberação de cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma. A depleção de cálcio do retículo endoplasmático leva à ativação das proteínas STIM (*stromal interaction molecule*) que levam à abertura de canais de cálcio ativados por liberação de cálcio (CRAC – *calcium release-activated calcium channels*) presentes na membrana plasmática e estes permitem um aumento sustentado dos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺ (HOGAN *et al.*, 2010). O Ca²⁺ se liga à calmodulina (CaM) que ativa a calcineurina.

A ativação de NFAT está diretamente relacionada com a atividade da calcineurina. A fosfatase calcineurina é composta por duas subunidades: CnA, com atividade catalítica e CnB, regulatória. A ligação da calmodulina a CnB leva a ativação da subunidade catalítica CnA. Enquanto os níveis intracelulares de cálcio permanecem elevados, a calcineurina permanece ativa e o NFAT permanece ativado no núcleo. Com a inibição da calcineurina pela redução dos níveis de cálcio intracelulares ou por inibidores como ciclosporina A e FK506, as proteínas NFAT são rapidamente refosforiladas e translocadas para o citoplasma (LOH *et al.*, 1996a; LOH *et al.*, 1996b; SHIBASAKI *et al.*, 1996). A refosforilação das proteínas NFAT é feita por várias cinases nucleares, como CK1 (*casein kinase 1*), GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) e DYRK1A (*dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A*) (BEALS *et al.*, 1997b; OKAMURA *et al.*, 2004; ARRON *et al.*, 2006; GWACK *et al.*, 2006). A desfosforilação e refosforilação e as respectivas importação e exportação nuclear das proteínas NFAT podem ser repetidas inúmeras vezes, mostrando que a ativação de NFAT é regulada pela dinâmica entre a atividade da calcineurina e a de cinases nucleares que o inativam.

O mecanismo de ativação das proteínas NFAT por desfosforilação foi elucidado por análises das proteínas NFAT1 e NFAT2. Dados presentes na literatura indicam que 14 resíduos de serina localizadas nos motivos conservados da região regulatória do NFAT são fosforilados em células em repouso e, após estímulo, 13 destas serinas são desfosforiladas pela calcineurina (Fig. 1.2) (OKAMURA *et al.*, 2000; PORTER *et al.*, 2000; NEAL e CLIPSTONE, 2001). A substituição destes resíduos de serina para alanina nas proteínas NFAT1 e NFAT2 resulta em proteínas constitutivamente ativas (CA-NFAT1 e CA-NFAT2). Estas proteínas mimetizam proteínas desfosforiladas e apresentam localização permanentemente nuclear, com atividade transcrricional mesmo em células não-estimuladas ou pré-tratadas com CsA (OKAMURA *et al.*, 2000; MONTICELLI e RAO, 2002).

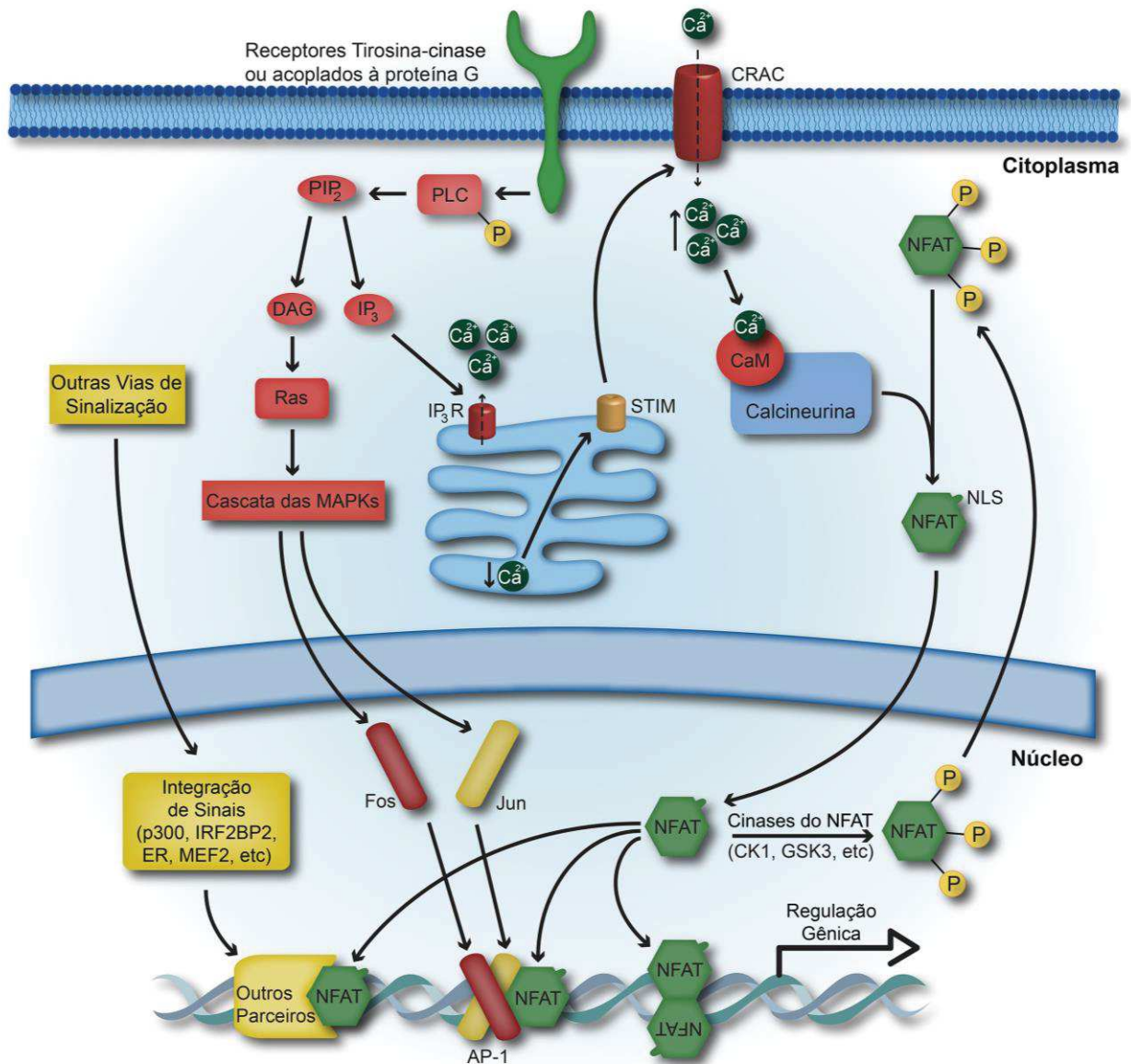


Figura 1.3. Via de ativação das proteínas NFAT. Representação esquemática das vias de ativação das proteínas NFAT. A estimulação de receptores de membrana leva ao aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e ativação da calmodulina (CaM), que, por sua vez, ativa a calcineurina. A calcineurina ativada desfosforila as proteínas NFAT que expõem um sinal de localização nuclear (NLS), sendo translocadas para o núcleo. No núcleo o NFAT interage com diversos outros fatores de transcrição, sendo o principal deles o AP-1. Proteínas cinases como CK1 e GSK3 refosforilam o NFAT, que passa a ocultar o NLS e é levado para o citoplasma. Estas e outras cinases ainda ajudam a manter o NFAT no citoplasma. O diacilglicerol (DAG) ativa a proteína cinase C (PKC) que ativa indiretamente a via de Ras/MAPKs através da fosforilação de RasGRP (*Ras guanyl-releasing protein*), que ativa Ras. Esta via leva a ativação do fator de transcrição AP-1, o principal parceiro transcrricional das proteínas NFAT. Adaptado de MOGNOL *et al.* (2016).

Sítios de ligação de NFAT ao DNA são encontrados em regiões promotoras e enhancers de diversos genes. O sítio de ligação de NFAT ao DNA é determinado pela sequência consenso 5'-(A/T)GGAAA-3' (RAO *et al.*, 1997). Uma vez ativadas e presentes no núcleo, as proteínas NFAT podem cooperar com diversos outros fatores de transcrição na regulação de seus genes-alvo. Quando descrito inicialmente na regulação da expressão de IL-2 em células T, foi sugerido que o complexo regulatório NFAT seria composto por dois sub-componentes (FLANAGAN *et al.*, 1991). O primeiro, a proteína NFAT propriamente dita, residente no citoplasma e posteriormente translocada para o núcleo, e o segundo, um componente nuclear que não seria sensível a inibição via CsA ou FK506. Posteriormente, foi observado que este sub-componente nuclear do complexo NFAT equivaleria ao já descrito fator de transcrição AP-1 (*activator protein-1*), um heterodímero composto por membros da família de proto-oncogenes Fos e Jun (JAIN *et al.*, 1992). Nas regiões promotoras de determinados genes, foi observado que os complexos NFAT:AP-1:DNA apresentavam estabilidade até 20 vezes maior se comparados a complexos NFAT:DNA, sendo a interação NFAT:AP-1 extremamente importante para a transativação de diversos genes (RAO *et al.*, 1997). Deste modo, os fatores de transcrição AP-1 são os principais e melhor estabelecidos parceiros transcripcionais das proteínas NFAT, atuando como componentes cruciais para a regulação gênica.

Além de cooperar com AP-1, as proteínas NFAT também são capazes de interagir com proteínas co-reguladoras, como IRF-2BP2 e CBP/p300, ou outros fatores de transcrição, como GATA-3, NF- κ B (*Nuclear factor κ B*), IRF-4 (*interferon regulator factor-4*), EGR (*early growth response protein*) e MEF2, o que resulta em um mecanismo cooperativo entre as vias de sinalização de cálcio e outras vias na regulação de respostas biológicas (BLAESER *et al.*, 2000; RENGARAJAN *et al.*, 2000; MACIAN *et al.*, 2001; RENGARAJAN *et al.*, 2002; HOGAN *et al.*, 2003; CARNEIRO *et al.*, 2011).

1.1.3. Isoformas das proteínas NFAT e sua expressão

Os membros da família NFAT podem apresentar diferentes isoformas, produtos de diferentes inícios de transcrição ou de *splicing* alternativo, que diferem em suas porções N- e C-terminal, conservando a região central da proteína,

composta pelo domínio de ligação ao DNA e a região de homologia a NFAT (RAO *et al.*, 1997).

O NFAT1 (NFATp ou NFATc2) apresenta 2 variantes de splicing principais, nomeadas como isoformas B e C (LUO *et al.*, 1996a). Estas isoformas diferenciam-se em sua porção C-terminal (Fig. 1.1), a partir dos aminoácidos 909 e 907 nas proteínas murinas e humanas, respectivamente. Posteriormente, foi observado que o NFAT1 pode variar em sua porção N-terminal, através de éxons de iniciação distintos. Dessa forma, foram descritas duas novas isoformas que apresentam o éxon 1 do gene como éxon de iniciação e não o éxon 2, presente nas isoformas B e C previamente descritas. O gene do NFAT1 é expresso em diversos tipos de tecidos, sendo a proteína detectada em células do músculo esquelético, do músculo liso vascular, células cartilaginosas, adipócitos, sistema nervoso central, intestino delgado, cólon, testículos, mama e diversas células do sistema imune (HO *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1995; ABBOTT *et al.*, 1998; BOSS *et al.*, 1998; HO *et al.*, 1998; RANGER *et al.*, 2000; UHLEN *et al.*, 2010; UHLEN *et al.*, 2015).

O NFAT2 (NFATc ou NFATc1) apresenta 6 isoformas descritas em células humanas e murinas, denominadas α (ou α/A), β (ou β/A), α/B , β/B , α/C e β/C (Fig. 1.1) (NORTHROP *et al.*, 1994; PARK *et al.*, 1996; PAN *et al.*, 1997; CHUVPILLO *et al.*, 1999a; CHUVPILLO *et al.*, 1999b; SHERMAN *et al.*, 1999; SERFLING *et al.*, 2006; VIHMA *et al.*, 2008). As isoformas do NFAT2 variam não só em sua porção C-terminal por splicing alternativo, mas também em seu N-terminal, devido à presença de inícios de transcrição distintos, divergindo em seu primeiro éxon, resultando em 42 aminoácidos diferenciais na região N-terminal das isoformas α , oriundos do éxon 1 e 28 aminoácidos nesta mesma região das isoformas β , referentes ao éxon 2 (SHERMAN *et al.*, 1999; CHUVPILLO *et al.*, 2002; SERFLING *et al.*, 2006). A proteína NFAT2 está presente em vários tipos celulares do sistema imune, no endocárdio, válvulas cardíacas e septo, em células do músculo liso vascular, pâncreáticas, osteoclastos e células-tronco da pele (TIMMERMAN *et al.*, 1997; BOSS *et al.*, 1998; DE LA POMPA *et al.*, 1998; RANGER *et al.*, 1998a; MATSUMOTO *et al.*, 2004; BUCHHOLZ *et al.*, 2006; HORSLEY *et al.*, 2008; UHLEN *et al.*, 2010; UHLEN *et al.*, 2015).

Durante muito tempo, a proteína NFAT3 (NFATc4) apresentou apenas uma isoforma descrita (Fig. 1.1) (HOEY *et al.*, 1995). Posteriormente, foi demonstrada a existência de RNAs codificando para outras variantes do NFAT3, contendo cinco variações possíveis para a porção N-terminal da proteína e três

variações possíveis para a porção C-terminal (VIHMA *et al.*, 2008). Este membro da família apresenta sua expressão principalmente fora do sistema imune, sendo a proteína detectada em células como neurônios, cardiomiócitos, adipócitos e células musculares (MOLKENTIN *et al.*, 1998; GRAEF *et al.*, 1999; HO *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2007). A proteína NFAT3 pode ser detectada em diversos tecidos, como, por exemplo, os principais tecidos do trato digestivo, sistemas reprodutores masculino e feminino, pulmões e brônquios (UHLEN *et al.*, 2010; UHLEN *et al.*, 2015).

O NFAT4 (NFATx ou NFATc3) apresenta 3 isoformas principais (Fig. 1.1), nomeadas como NFAT4x, NFAT4x2 e NFAT4x3 (HOEY *et al.*, 1995; MASUDA *et al.*, 1995; VIHMA *et al.*, 2008). As isoformas do NFAT4 variam em sua porção C-terminal (Fig. 1.4A). O NFAT4 é expresso no timo e em leucócitos e pode ser detectado em células de músculo esquelético, músculo cardíaco, rins, ovários, testículos, estômago, intestino delgado, cólon e cartilagens (HOEY *et al.*, 1995; MASUDA *et al.*, 1995; IMAMURA *et al.*, 1998; RANGER *et al.*, 2000; UHLEN *et al.*, 2010; UHLEN *et al.*, 2015). A isoforma x é preferencialmente expressa no timo e em leucócitos, enquanto a isoforma x2 é predominantemente expressa no músculo e nos testículos (IMAMURA *et al.*, 1998).

Como citado anteriormente, as isoformas das proteínas NFAT variam em suas regiões TAD-N e TAD-C. Uma vez que o perfil de expressão destas isoformas pode variar de acordo com o tipo de tecido ou com o estado de ativação celular, estas variações poderiam gerar proteínas NFAT capazes de regular diferencialmente a expressão gênica.

1.1.4. Funções fisiológicas das proteínas NFAT

As proteínas da família NFAT foram descritas inicialmente por seu papel crucial na regulação das respostas imunes adaptativas. As proteínas NFAT regulam diversos processos em células T, como desenvolvimento, ativação, diferenciação, anergia e exaustão (MACIAN, 2005; MULLER e RAO, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2015).

No timo, precursores de linfócitos T originados da medula óssea passam pelos processos de diferenciação e maturação (STARR *et al.*, 2003). Durante estes processos, células T passam por rearranjos gênicos que irão gerar seu TCR

específico e se diferenciarão para duas populações principais, caracterizadas pela expressão dos co-receptores CD4 ou CD8 (STARR *et al.*, 2003). Dados da literatura demonstraram que o NFAT4 é importante para a sobrevivência de células T imaturas durante seu processo de maturação no timo (OUKKA *et al.*, 1998; AMASAKI *et al.*, 2002). O nível de expressão de NFAT2 também apresentou papel importante no controle dos processos de maturação de timócitos e diferenciação para o fenótipo de células T (KLEIN-HESSLING *et al.*, 2016).

Ao saírem do timo, as células T *naïve* migram para os órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos, onde poderão ser ativadas por células apresentadoras de antígeno (APCs – *antigen presenting cells*). As proteínas da família NFAT são essenciais para a ativação de linfócitos T. A ativação celular através do complexo do TCR leva a ativação das proteínas NFAT pelos mecanismos já descritos anteriormente, e, uma vez no núcleo, NFAT pode regular a diversos genes como, por exemplo, os das citocinas IL-2, IL3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α e TGF- β , das proteínas de superfície celular CD40L, CTLA-4, Fas-L e CD25 e de outras proteínas como ciclooxigenase-2 e c-Myc (RAO *et al.*, 1997; MACIAN *et al.*, 2001; MULLER e RAO, 2010; MOGNOL *et al.*, 2012). Proteínas NFAT regulam genes importantes para a polarização de células T CD4⁺ para os fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg, atuando como reguladoras não só da ativação, mas também da diferenciação de linfócitos T (MACIAN, 2005; MULLER e RAO, 2010). A ativação de linfócitos T *naïve* depende, além da ativação do TCR (1^o sinal), da ativação de moléculas co-estimulatórias como o CD28 (2^o sinal). A ativação do TCR na ausência de co-estímulos leva a um estado conhecido como anergia (SCHWARTZ, 2003). Em células que só recebem o 1^o sinal, ocorre a ativação de NFAT, mas não de outros fatores de transcrição, como AP-1 (MACIAN, 2005). Neste contexto, foi sugerido que as proteínas NFAT poderiam cooperar com outros fatores de transcrição e regular genes que levarão ao fenótipo de anergia, entretanto, esses parceiros e genes-alvo permanecem desconhecidos (MULLER e RAO, 2010).

Além de controlar vários processos em linfócitos T, as proteínas NFAT também regulam a fisiologia de linfócitos B por mecanismos similares (SCHARENBERG *et al.*, 2007; MULLER e RAO, 2010). NFAT é ativado em linfócitos B através do BCR e regula processos como a produção de citocinas, proliferação, sobrevivência e anergia (SCHARENBERG *et al.*, 2007; MULLER e RAO, 2010; BHATTACHARYYA *et al.*, 2011). As proteínas da família NFAT controlam ainda a

fisiologia de células da imunidade inata, como células NK, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, basófilos e neutrófilos (FRIC *et al.*, 2012). A cascata de ativação de NFAT pode ser desencadeada através de diversos receptores como Fc γ R (células NK e monócitos/macrófagos), Fc ϵ RI (mastócitos e basófilos), CD14 e dectina (células dendríticas) (FRIC *et al.*, 2012).

Vários dados da literatura têm demonstrado também um papel fundamental de NFAT na embriogênese do coração. Camundongos deficientes para NFAT2 apresentam fenótipo letal, morrendo ainda na fase embrionária por defeitos na formação das válvulas cardíacas e do septo (DE LA POMPA *et al.*, 1998; RANGER *et al.*, 1998a). A estrutura embrionária que origina o coração é conhecida como tubo cardíaco e é composta por uma camada miocárdica externa e um revestimento endotelial interno. Células da camada miocárdica externa secretam VEGF que é reconhecido por receptores das células do revestimento endotelial interno e colabora para o processo de transdiferenciação endotelial-mesenquimal que inicia a formação das válvulas cardíacas (ARMSTRONG e BISCHOFF, 2004). A ativação do NFAT2 através dos receptores de VEGF em células endoteliais do tubo cardíaco é necessária para a diferenciação e proliferação destas células (CHANG *et al.*, 2004). Além disso, NFAT1, NFAT3 e NFAT4, presentes nas células da camada miocárdica externa, regulam os níveis de VEGF secretados pelos cardiomiócitos (CHANG *et al.*, 2004).

Além de seu papel em células endoteliais na embriogênese do coração, NFAT participa do processo de angiogênese. Animais deficientes para NFAT3 e NFAT4 apresentaram fenótipo letal devido a desorganizações na estrutura de vasos sanguíneos (GRAEF *et al.*, 2001). Corroborando estes dados, foi demonstrado que a ativação de NFAT induzida por VEGF leva ao aumento dos níveis de COX-2 em células endoteliais (HERNANDEZ *et al.*, 2001) e que as proteínas NFAT são capazes de regular diretamente o promotor de COX-2 (INIGUEZ *et al.*, 2000; DUQUE *et al.*, 2005). COX-2 promove angiogênese através da síntese de prostaglandina E₂, um indutor de migração e proliferação de células endoteliais (HERNANDEZ *et al.*, 2001). NFAT regula também a expressão do fator pró-angiogênico GM-CSF (COCKERILL *et al.*, 1995). Outros dados sugerem ainda que as proteínas NFAT são importantes para a regulação dos níveis de VEGFR1, um dos receptores de VEGF em células endoteliais (HERNANDEZ *et al.*, 2001; JINNIN *et al.*, 2008).

As proteínas NFAT apresentam papel importante na regulação de tecidos conjuntivos, como ossos e cartilagens (SITARA e ALIPRANTIS, 2010). O tecido ósseo é extremamente dinâmico e seu remodelamento se dá pelo balanço entre a formação de matriz extracelular pelos osteoblastos e pela reabsorção óssea pelos osteoclastos. Dados da literatura têm demonstrado que o NFAT2 é essencial para a diferenciação de osteoclastos e para a função destas células na reabsorção óssea (TAKAYANAGI, 2007; SITARA e ALIPRANTIS, 2010). A estimulação de precursores de osteoclastos via sinalização de RANKL (*receptor activator of nuclear factor κ B ligand*) induz o aumento dos níveis do NFAT2 e em conjunto com outros receptores de superfície como Fc γ R e DAP12 (*DNAX-activating protein of 12 kDa*) leva ao influxo de cálcio e ativação do NFAT2 (TAKAYANAGI, 2007). Diversos genes envolvidos na função dos osteoclastos são regulados por NFAT2, como os genes das proteínas OSCAR (*osteoclast-associated receptor*), TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*), catepsina K, integrina β 3 e o receptor de calcitonina (TAKAYANAGI, 2007; SITARA e ALIPRANTIS, 2010). Precursores de osteoclastos *Nfat2*^{-/-} são incapazes de se diferenciar *in vitro* após estímulo com RANKL, enquanto células precursoras superexpressando NFAT2 são capazes de se diferenciar mesmo na ausência de estímulo por RANKL (TAKAYANAGI *et al.*, 2002). Corroborando estes dados, estudos mostraram que animais deficientes para o NFAT2 desenvolvem osteopetrose severa com carência de osteoclastos no tecido ósseo (WINSLOW *et al.*, 2006; ALIPRANTIS *et al.*, 2008). Com relação ao tecido cartilaginoso, foi observado que animais *Nfat1*^{-/-} apresentam aumento da proliferação de condrócitos, sugerindo que o NFAT1 é um regulador negativo da condrogênese (RANGER *et al.*, 2000). Adicionalmente, cartilagens articulares destes animais apresentam redução de componentes de matriz extracelular como proteoglicanos, colágeno tipo II e agreganos e foi sugerido que esta redução é responsável por induzir o aumento da proliferação de condrócitos (WANG *et al.*, 2009). Corroborando estes dados, foi mostrado que proteínas NFAT poderiam regular a região promotora dos genes de duas agreganases da família ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), ADAMTS-4 e ADAMTS-9 (THIRUNAVUKKARASU *et al.*, 2006; YAYKASLI *et al.*, 2009).

Em neurônios, já foi descrita a ativação de proteínas NFAT após aumento de Ca²⁺ no citoplasma desencadeado pela abertura de canais do tipo VSCC (*voltage-sensitive Ca²⁺ channels*) ou pela ligação de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) ao seu receptor TrkB (*tropomyosin receptor kinase B*) (WEST *et*

al., 2001; ARAMBURU *et al.*, 2004). Dados têm sugerido a participação das proteínas NFAT no crescimento e direcionamento de axônios. Camundongos deficientes para NFAT1, NFAT3 e NFAT4 apresentam defeitos na projeção de axônios, o que leva à falha no estabelecimento de conexões nervosas (GRAEF *et al.*, 2003). Apesar das proteínas NFAT participarem do processo de desenvolvimento neuronal, pouco se sabe sobre os genes regulados por NFAT neste contexto (NGUYEN e DI GIOVANNI, 2008; MOORE e GOLDBERG, 2011).

1.2. Ciclo e Morte Celular

De maneira resumida, pode-se dizer que a homeostasia tecidual é dada por um delicado balanço entre a proliferação e a morte celular. Diversos mecanismos de sinalização irão determinar se uma determinada célula irá permanecer quiescente, proliferar ou morrer. Em tecidos normais, a proliferação celular ocorre através de uma sequência ordenada de eventos nos quais os componentes celulares são duplicados e divididos em duas novas células distintas em um processo conhecido como ciclo celular. Na contramão da proliferação celular, temos os processos de morte celular programada, onde sequências ordenadas de eventos levam a célula à morte.

1.2.1. Ciclo celular

O ciclo celular pode ser dividido em quatro fases: duas fases de intervalo ou *gaps* (fases G₁ e G₂), a fase de síntese de DNA (fase S) e a mitose (fase M) (NORBURY e NURSE, 1992). As fases S e M compreendem, respectivamente, dois eventos cruciais para o ciclo celular: a duplicação do DNA e a repartição dos componentes celulares entre duas células filhas. As fases G₁ e G₂ representam períodos de preparação para as fases S e M, respectivamente. Dependendo dos estímulos recebidos, as células podem permanecer em uma etapa de repouso conhecida como G₀.

A progressão do ciclo celular é altamente regulada por pontos de checagem, ou *checkpoints*, que só permitirão que o ciclo progrida quando todos os eventos necessários para aquela etapa estiverem concluídos (HARTWELL e

WEINERT, 1989). Os principais reguladores da progressão do ciclo celular são uma família de serina-treonina cinases conhecidas como CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) (MALUMBRES e BARBACID, 2005). As proteínas CDKs são ativadas pela ligação às ciclinas, proteínas cujos níveis são extremamente dinâmicos durante o ciclo celular. Em cada etapa do ciclo celular, um grupo diferente de ciclinas será sintetizado, levando à ativação de suas CDKs específicas e permitindo um controle fino da progressão do ciclo celular. Os complexos ciclina D/CDK4 ou ciclina D/CDK6 são importantes para a progressão da fase G₁. O complexo ciclina E/CDK2 é necessário para a entrada na fase S, enquanto o complexo ciclina A/CDK2 promove a progressão da fase S. Complexo ciclina A/CDK1 promove a entrada na fase M e o complexo ciclina B/CDK1 promove a progressão da mitose. Os complexos ciclina/CDK fosforilam progressivamente a proteína supressora de tumores pRb (proteína retinoblastoma), permitindo a liberação do fatores de transcrição E2F (*E2 promoter binding factor*). E2F regula a expressão de genes essenciais para a entrada e progressão do ciclo celular, como os genes de c-Myc, da DNA polimerase e de proteínas envolvidas com a formação do fuso mitótico (MATSUMURA *et al.*, 2003).

Enquanto as ciclinas atuam como reguladoras positivas da atividade das CDKs, existe um outro conjunto de proteínas, as CKIs (*CDK inhibitors*) que agem como reguladoras negativas da função das CDKs (SHERR e ROBERTS, 1999). Entre as principais CKIs estão p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2} que inibem principalmente a função dos complexos ciclina E/CDK2 e ciclina A/CDK2 e, portanto, a entrada e progressão da fase S do ciclo celular (SHERR e ROBERTS, 1999). A proteína p21 ainda pode inibir os complexos de CDK1, CDK4 e CDK6, atuando sobre outras etapas do ciclo celular. Adicionalmente, as CKIs da família INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}) atuam inibindo os complexos ciclina D/CDK4 e ciclina D/CDK6, promovendo arresto na fase G₁ do ciclo celular (RUAS e PETERS, 1998).

1.2.2. Morte celular

O processo de morte celular programada é fundamental para a fisiologia dos tecidos. Diversos mecanismos de morte celular programada já foram descritos, podendo destacar quatro como principais: apoptose, necrose programada (ou necroptose), morte celular autofágica e cornificação (GALLUZZI *et al.*, 2009). A

apoptose é o processo de morte celular programada melhor descrito e é essencial para a homeostasia de praticamente todos os tecidos. O processo de morte celular por apoptose foi originalmente descrito pelas características morfológicas desencadeadas como diminuição do volume celular, condensação nuclear e fragmentação celular em corpos apoptóticos (KERR *et al.*, 1972).

As principais proteínas efetoras do processo de apoptose são as proteases conhecidas como caspases. As caspases são uma família de cisteína-proteases sintetizadas como zimogênios e ativadas por clivagem após o desencadeamento de estímulos pró-apoptóticos (ASSUNÇÃO GUIMARÃES e LINDEN, 2004). Existem dois grupos principais de caspases: as caspases iniciadoras (caspase-1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 e 14), ativadas por auto-proteólise por oligomerização e as caspases efetoras (caspase-3, 6 e 7), ativadas por outras proteases, como as caspases iniciadoras ou a granzima B (ASSUNÇÃO GUIMARÃES e LINDEN, 2004). As caspases efetoras promovem a morte celular pela clivagem de mais de 280 substratos celulares (FISCHER *et al.*, 2003). As caspases efetoras são capazes de ativar a DNase ativada por caspase (CAD) através da clivagem de sua proteína inibidora, ICAD. Uma vez ativada, CAD é translocada para o núcleo, onde promove a fragmentação oligonucleossomal do DNA (LIU *et al.*, 1997; SAKAHIRA *et al.*, 1998). A atividade da caspase-3, assim como da caspase-9, pode ser inibida pelos membros da família de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), composta por diversas proteínas, como XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, NAIP e Survivina). As IAPs podem atuar inibindo diretamente a atividade enzimática de suas caspases-alvo ou induzir a sua degradação através do sistema ubiquitina-proteassoma (VAUX e SILKE, 2005; HUNTER *et al.*, 2007).

Diversos estímulos podem iniciar o processo de apoptose como, por exemplo, privação de fatores de crescimento, danos no DNA ou sinais extracelulares. A apoptose é comumente dividida em duas vias distintas, que se diferem devido à origem dos estímulos iniciadores do processo: via intrínseca (ou mitocondrial) e via extrínseca.

Na via intrínseca, estímulos intracelulares como lesões no DNA, desestruturação do citoesqueleto ou alterações no retículo endoplasmático são capazes de induzir a apoptose (TAYLOR *et al.*, 2008). A mitocôndria tem um grande papel neste processo, sendo a via intrínseca também conhecida como via mitocondrial. Os estímulos indutores da apoptose levam à liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, onde este interage com as proteínas Apaf-1 e

caspase-9, formando um complexo heptamérico conhecido como apoptossomo (SCHAFER e KORNBLUTH, 2006). Além do citocromo c, a proteína Smac/DIABLO também é liberada da mitocôndria para o citoplasma, onde atuará impedindo a inibição de caspase-9 pelas proteínas IAP. A caspase-9, por sua vez, pode ativar clivar e ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7.

A via mitocondrial de apoptose é regulada pelo balanço entre diversas proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Entre estes reguladores está a família de proteínas Bcl-2. Esta família de proteínas pode ser dividida em 3 grupos principais, sendo um anti-apoptótico e dois pró-apoptóticos (YOULE e STRASSER, 2008). O primeiro grupo apresenta função anti-apoptótica e contém os quatro domínios de homologia a Bcl-2 (BH1-4) (TAYLOR *et al.*, 2008). Como proteínas que compõem este grupo podem ser citadas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, A1 e Bcl-B. O segundo consiste em um grupo de proteínas pró-apoptóticas apresenta os domínios BH1-3, composto pelas proteínas Bax, Bak e Bok (TAYLOR *et al.*, 2008). A oligomerização de Bax e Bak é capaz de levar a permeabilização da mitocôndria e liberação de fatores apoptogênicos, como o citocromo c e a proteína Smac/DIABLO (HENGARTNER, 2000). Proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 são capazes de inibir a função de Bax e Bak. As proteínas do terceiro grupo são denominadas BH3-only por apresentarem apenas o domínio BH3. Estas proteínas são ativadas em resposta a danos celulares e podem atuar liberando Bax e Bak para exercer sua função (TAYLOR *et al.*, 2008). Alguns exemplos de BH3-only são as proteínas Bim, Bad, Bik, Bid, Noxa, PUMA, Bmf e Hrk. A mitocôndria também libera outros efetores da apoptose, como a proteína AIF (*apoptosis inducing factor*) e a endonuclease G (SUSIN *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2001).

Na via extrínseca, a apoptose é desencadeada por receptores de morte da família do TNFR (*tumoral necrosis factor receptor*), tais como TNFR-1, Fas (CD95), TRAILR-1 e TRAILR-2 (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998). Os membros dessa família apresentam um domínio intracelular de morte, capaz de recrutar proteínas adaptadores e as caspases iniciadoras 8 e 10, permitindo a autoproteólise destas (SALVESEN e DIXIT, 1999). Além de ativar as caspases efetoras (principalmente a caspase-3), as caspases 8 e 10 podem ativar também a proteína Bid que levará à liberação de fatores apoptogênicos da mitocôndria para o citoplasma, integrando as vias extrínseca e intrínseca de apoptose (HENGARTNER, 2000).

1.2.3. NFAT no controle de ciclo e morte celular

As proteínas da família NFAT foram classicamente descritas por sua atuação crucial na regulação da transcrição de genes durante as respostas imunes (RAO *et al.*, 1997). Contudo, diversas evidências passaram a surgir mostrando que o NFAT poderia não só regular respostas imunes, mas também ter um papel relevante no controle da entrada no ciclo celular. Foi demonstrado que a transição da fase G₁/S do ciclo celular poderia ser mediada pela sinalização de Ca²⁺ e que a proteína calcineurina, principal reguladora da ativação do NFAT, poderia possuir um papel fundamental no controle do ciclo celular, uma vez que seus inibidores (CsA e FK506) foram capazes de inibir a expressão de ciclina A e E, *in vitro* (TOMONO *et al.*, 1996; TOMONO *et al.*, 1998). Outras evidências que corroboram estes dados são os fenótipos dos camundongos deficientes para as proteínas NFAT1 e NFAT2 (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Fenótipos dos camundongos deficientes para as diferentes proteínas NFAT.

Proteínas NFAT	Fenótipo dos animais deficientes para NFAT	Referências
NFAT1	Hiperproliferação de linfócitos acompanhada de esplenomegalia. Aumento moderado da resposta de células T e B com uma superprodução de IL-4 e outras citocinas Th2 e diminuição da expressão de IFN- γ . Hipereosinofilia e alergia.	(HODGE <i>et al.</i> , 1996; XANTHOUDAKIS <i>et al.</i> , 1996; SCHUH <i>et al.</i> , 1998)
NFAT2	Fenótipo letal (defeito no desenvolvimento das válvulas cardíacas). No sistema de complementação de blastocisto de animais RAG ^{-/-} , células T e B apresentam redução de proliferação e moderada redução da resposta Th2, com diminuição da produção de IL-4.	(DE LA POMPA <i>et al.</i> , 1998; RANGER <i>et al.</i> , 1998a; RANGER <i>et al.</i> , 1998b; YOSHIDA <i>et al.</i> , 1998)
NFAT3	Nenhuma alteração aparente.	(GRAEF <i>et al.</i> , 2001)
NFAT4	Moderado comprometimento no desenvolvimento de células CD4 e CD8 devido a um aumento da apoptose de timócitos duplo-positivos. Moderada hiperativação de células T na periferia.	(OUKKA <i>et al.</i> , 1998)

Camundongos *Nfat1*^{-/-} com três meses de idade apresentam um moderado aumento dos órgãos linfóides, devido a uma síndrome de hiperproliferação linfocitária acompanhada por uma redução da morte celular (HODGE *et al.*, 1996; XANTHOUDAKIS *et al.*, 1996; SCHUH *et al.*, 1998). Além disso, esses camundongos apresentam um significativo retardo na involução do timo e um defeito na deleção de células T CD4⁺ ativadas, *in vivo*, o que sugere um defeito na terminação da resposta imune pelo processo de morte celular induzida por ativação (AICD) (SCHUH *et al.*, 1998). Em camundongos quiméricos, gerados a partir de blastocistos deficientes para RAG-1 ou RAG-2 complementados com células embrionárias *Nfat2*^{-/-}, observou-se redução da proliferação de células B e T quando comparava-se às células dos camundongos selvagens (RANGER *et al.*, 1998b; YOSHIDA *et al.*, 1998). Adicionalmente, camundongos *Nfat4*^{-/-} apresentam um aumento da morte celular em timócitos duplo-positivos (CD4⁺CD8⁺) que é acompanhado de uma redução nos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (OUKKA *et al.*, 1998). Estes dados sugerem que os membros da família NFAT também possuem funções não só na regulação do ciclo, mas também na morte celular.

Estudos posteriores demonstraram que o NFAT está diretamente envolvido na regulação de genes importantes na regulação do ciclo, como os genes de p21^{Cip1}, p15, CDK4, CDK6, c-Myc, ciclinas A2, D1, D3 e E (Fig. 1.4). A superexpressão de uma forma constitutivamente ativa do NFAT2 em uma linhagem celular de pré-adipócitos (3T3-L1) é capaz de induzir a proliferação celular em células privadas de fatores de crescimento exógenos, estando isto correlacionado com o aumento da expressão gênica das ciclinas D1 e D3 e de c-Myc (NEAL e CLIPSTONE, 2003). Outros trabalhos demonstraram que o NFAT2 pode regular diretamente a expressão dos genes de ciclina D1, D3 e A2 (KARPURAPU *et al.*, 2008; KARPURAPU *et al.*, 2010; KUNDUMANI-SRIDHARAN *et al.*, 2013; BAUMGART *et al.*, 2014). Estudos em células derivadas de tumores pancreáticos e linfomas difusos de grandes células B (DLBCL) mostraram que o NFAT2 é capaz de regular positivamente o proto-oncogene C-MYC (BUCHHOLZ *et al.*, 2006; PHAM *et al.*, 2010), que, por sua vez, atua como um fator de transcrição regulador de diversos genes do ciclo celular. Em conjunto, esses dados sugerem que, de maneira geral, o NFAT2 atue como um regulador positivo do ciclo celular. Entretanto, já foi mostrado em queratinócitos humanos que o NFAT2 pode induzir a transcrição de p21, uma proteína inibidora de CDKs (SANTINI *et al.*, 2001).

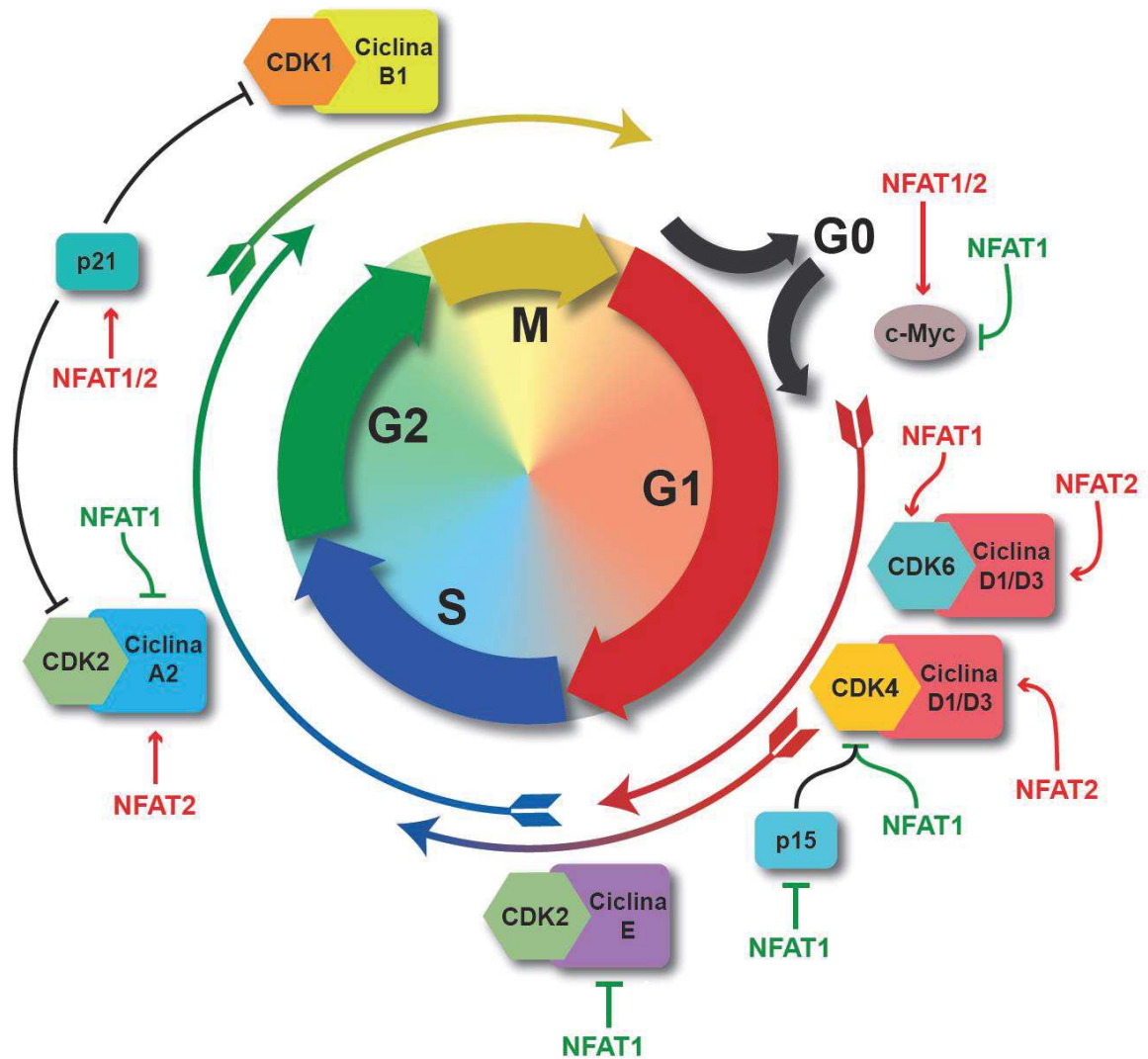


Figura 1.4. Regulação do ciclo celular pelas proteínas NFAT. Representação esquemática das proteínas envolvidas no ciclo celular cujos genes são regulados pelos fatores de transcrição da família NFAT. Estão indicadas em vermelho as regulações positivas pelas proteínas NFAT, enquanto as regulações negativas estão indicadas em verde. Adaptado de MOGNOL *et al.* (2016).

Quanto ao NFAT1, foi demonstrado que o fenótipo de hiperproliferação linfocitária de camundongos *Nfat1^{-/-}* está correlacionado com um encurtamento do tempo de divisão celular e com o aumento da expressão gênica de diversas ciclinas como A2, B1, E e F (CAETANO *et al.*, 2002). Corroborando estes dados, foi demonstrado que NFAT1 pode se ligar aos promotores dos genes das ciclinas A2 e E1 e regular negativamente sua expressão (CARVALHO *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2016). Além disso, NFAT1 pode regular positivamente a expressão de p21 (SANTINI *et al.*, 2001), que, dentre outras funções, inibe a formação do complexo CDK2/ciclina A. Estes dados apontam para o NFAT1 como um possível regulador

negativo do ciclo celular. Contudo, dados mais recentes tem mostrado que, em outros modelos celulares, o NFAT1 pode regular positivamente o ciclo celular. Experimentos em células derivadas de tumores pancreáticos mostraram que o NFAT1 pode regular positivamente o ciclo celular através do silenciamento do gene de p15 (BAUMGART *et al.*, 2012) e através da regulação positiva do gene de CDK6 (BAUMGART *et al.*, 2016). Além disso, outro estudo mostrou que o NFAT1 pode regular elementos positivos ou negativos no promotor do gene de c-Myc, sugerindo um papel dual na regulação deste proto-oncogene (MOGNOL *et al.*, 2012).

Com relação à morte celular, dados da literatura vêm demonstrando que as proteínas NFAT podem regular os genes tanto de proteínas anti-apoptóticas quanto de proteínas pró-apoptóticas (Fig. 1.5). Na via extrínseca de apoptose, as proteínas NFAT regulam positivamente os ligantes de receptores de morte celular TNF- α , FasL e TRAIL em diferentes tipos celulares, podendo contribuir, então, para o desencadeamento do processo de apoptose (MCCAFFREY *et al.*, 1994; PARK *et al.*, 1996; LATINIS *et al.*, 1997; HOLTZ-HEPPELMANN *et al.*, 1998; OUM *et al.*, 2002; CHAI *et al.*, 2007; CHAI *et al.*, 2008; KAMINUMA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011; ROBBS *et al.*, 2013). Em contrapartida, NFAT1 e NFAT2 podem regular positivamente os níveis de c-FLIP, uma proteína inibidora de caspase-8 e de caspase-10 (UEFFING *et al.*, 2008). Na via intrínseca de apoptose, as proteínas NFAT podem regular proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e A1 (KAWAMURA *et al.*, 2004; ULLERAS *et al.*, 2008) e proteínas pró-apoptóticas, como Nur77 e Trim17 (YOUN *et al.*, 2000; YOUN e LIU, 2000; LASSOT *et al.*, 2010). Além disso, NFAT regula proteínas envolvidas no aumento da sobrevivência celular, como CD40L, BlyS, BDNF e DDIAS (PHAM *et al.*, 2005; FU *et al.*, 2006; QUADRATO *et al.*, 2012; IM *et al.*, 2016).

Esses diversos estudos mostraram proteínas NFAT regulando o ciclo e a morte celular de maneira positiva ou negativa, em diferentes tipos celulares. Entretanto, os contextos celulares específicos que levam as proteínas NFAT a regular diferencialmente a proliferação celular ainda são pouco conhecidos. Possivelmente estes papéis diferenciais na regulação de ciclo e morte celular dependam do membro da família NFAT envolvido no processo e dos seus possíveis parceiros transcripcionais disponíveis nestas células.

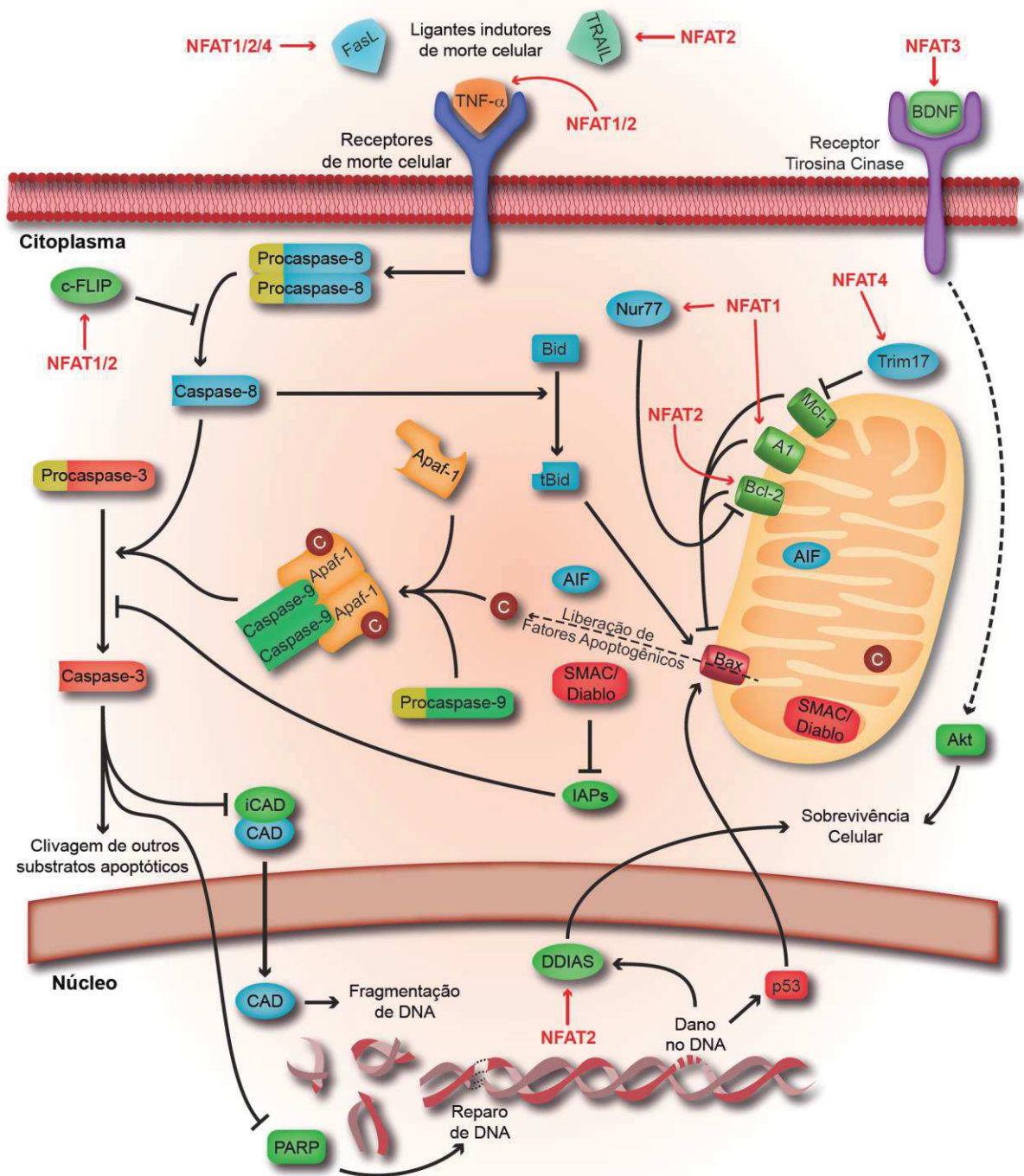


Figura 1.5. Regulação da apoptose pelas proteínas NFAT. Representação esquemática das proteínas envolvidas na morte celular por apoptose cujos genes são regulados pelos fatores de transcrição da família NFAT. Na figura estão representadas as vias extrínseca e intrínseca de apoptose. As regulações positivas ou negativas pelas proteínas NFAT estão indicadas em vermelho ou verde, respectivamente. Adaptado de MOGNOL *et al.* (2016).

1.3. NFAT e tumorigênese

O câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em um grupo de células que leva ao seu crescimento desordenado. O processo de conversão de uma célula normal em uma célula transformada depende de alterações na expressão e/ou na função de genes responsáveis pela homeostasia celular, como proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes reguladores da estabilidade genômica (VOGELSTEIN e KINZLER, 2004). Conforme acumulam alterações genéticas e epigenéticas, estas células ganham progressivamente vantagens proliferativas que permitem a formação de tumores.

Diversas capacidades precisam ser adquiridas por células para sua malignização. Mutações e instabilidade genômica associadas a geração de um microambiente inflamatório pró-tumorigênico têm sido aceitas como as principais características que permitem o desenvolvimento de tumores (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Em conjunto com essas características, oito capacidades principais são sugeridas como pilares, ou *hallmarks*, para a transformação celular: sinalização proliferativa sustentada, evasão de supressores de crescimento, escape da destruição pelo sistema imune, imortalidade replicativa, ambiente inflamatório pró-tumoral, invasão e metástase, indução de angiogênese e instabilidade genômica e mutação, resistência a morte celular e desregulação energética.



Figura 1.6. Os *hallmarks* do câncer. Principais características adquiridas pelas células tumorais durante seu processo de transformação. Adaptado de HANAHAN e WEINBERG (2011).

Alterações no ciclo celular, juntamente com a supressão da apoptose, são eventos críticos para o desenvolvimento de neoplasias (EVAN E VOUSDEN, 2001). Sendo as proteínas da família NFAT controladoras de ciclo e morte celular, é presumível sugerir que estas podem estar envolvidas no controle da homeostase celular e, portanto, participar do processo de tumorigênese quando alteradas.

A desregulação da sinalização de NFAT/calcineurina e/ou a expressão anormal de seus componentes tem sido descrita em tumores sólidos de origem epitelial, linfomas e leucemias (MEDYOUF e GHYSDAEL, 2008; QIN *et al.*, 2014), levando à ativação constitutiva e/ou superexpressão de membros da família NFAT (Tabela 1.2). Alguns dados presentes na literatura indicam um importante papel das proteínas da família NFAT no processo de transformação celular. A expressão de um mutante constitutivamente ativo de uma isoforma curta do NFAT2 (NFAT2 α) em pré-adipócitos (3T3-L1) foi capaz de induzir um claro fenótipo de transformação celular (NEAL e CLIPSTONE, 2003). Camundongos transgênicos que expressavam NFAT2 constitutivamente ativo em tecidos específicos apresentaram formação de tumores de pele, ovário e próstata (TRIPATHI, P. *et al.*, 2014; MANDA *et al.*, 2015), corroborando o potencial oncogênico dessa proteína da família NFAT. Adicionalmente, o NFAT2 foi encontrado ectopicamente expresso e altamente ativado em células de carcinoma pancreático *in vivo* e *in vitro* e o tratamento das células com ciclosporina A ou a transfecção com siRNA para NFAT2 atenuou a proliferação destas células, sugerindo um possível potencial oncogênico para o fator de transcrição NFAT2 (BUCHHOLZ *et al.*, 2006). A proteína NFAT2 também já foi encontrada no núcleo em cerca de 30% dos casos de linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) e 70% dos casos de linfoma de Burkitt (MARAFIOTI *et al.*, 2005), além de ter sido encontrado ativado e com níveis aumentados em casos de leucemia linfóide crônica (LE ROY *et al.*, 2012). A ativação do NFAT em linhagens celulares derivadas de DLBCL e leucemia linfoblástica aguda de células T foi fundamental para a progressão do ciclo celular e sobrevivência dessas células, indicando que o NFAT está envolvido em seu processo de transformação (PHAM *et al.*, 2005; MEDYOUF *et al.*, 2007). Além disso, a transdução de um mutante constitutivamente ativo da calcineurina em células leucêmicas foi capaz de aumentar a agressividade dessas células e de aumentar a progressão da leucemia *in vivo* (MEDYOUF *et al.*, 2007).

Tabela 1.2. Dados correlacionando tumores humanos a alterações nas proteínas NFAT. Adaptado de QIN *et al.* (2014).

Tipo de Câncer	Membro da família NFAT	Alterações observadas	Consequências biológicas ou clínicas	Referências bibliográficas
Leucemia de células T	Não definido	Ativação de calcineurina e translocação nuclear de NFAT	Quimiorresistência	(PHAM <i>et al.</i> , 2005; MEDYOUF <i>et al.</i> , 2007)
Linfoma difuso de grandes células B	NFAT2	Ativação constitutiva	Aumento de crescimento tumoral	(MARAFIOTI <i>et al.</i> , 2005; PHAM <i>et al.</i> , 2005; FU <i>et al.</i> , 2006; PHAM <i>et al.</i> , 2010)
Leucemia linfóide crônica	NFAT2	Superexpressão e ativação constitutiva	Aumento de progressão tumoral	(LE ROY <i>et al.</i> , 2012; PEI <i>et al.</i> , 2012)
Leucemia mieloide crônica	NFAT2	Ativação constitutiva	Quimiorresistência	(GREGORY <i>et al.</i> , 2010)
Linfoma de Burkitt	NFAT2	Ativação constitutiva	Desconhecidas	(MARAFIOTI <i>et al.</i> , 2005)
Câncer de mama	NFAT1	Superexpressão	Indução de invasão e aumento de crescimento metastático	(YOELI-LERNER <i>et al.</i> , 2005; YIU e TOKER, 2006; YOELI-LERNER <i>et al.</i> , 2009)
Câncer de cólon	NFAT1 NFAT2	Ativação constitutiva	Indução de progressão tumoral e metástase	(GERLACH <i>et al.</i> , 2012; TRIPATHI, M. K. <i>et al.</i> , 2014)
Câncer de pâncreas	NFAT2	Superexpressão e ativação constitutiva	Aumento do crescimento tumoral	(BUCHHOLZ <i>et al.</i> , 2006)
Câncer de próstata	NFAT2	Superexpressão	Aumento de proliferação tumoral	(LEHEN'KYI <i>et al.</i> , 2007; MANDA <i>et al.</i> , 2015)
Melanoma	NFAT1 NFAT2	Aumento de atividade e superexpressão	Aumento de migração e invasão, quimiorresistência, escape imune e desdiferenciação	(FLOCKHART <i>et al.</i> , 2009; LEVIN-GROMIKO <i>et al.</i> , 2014; PEROTTI <i>et al.</i> , 2015)
Câncer de pulmão	NFAT2	Superexpressão	Diminuição de sobrevivência pós-cirúrgica e quimiorresistência	(ZHANG <i>et al.</i> , 2007; CHEN <i>et al.</i> , 2011; IM <i>et al.</i> , 2016)
Glioblastoma	NFAT1	Superexpressão	Aumento de invasividade	(WU <i>et al.</i> , 2010; TIE <i>et al.</i> , 2013)

As proteínas NFAT também têm sido implicadas em vias importantes para o desenvolvimento tumoral, como no processo de angiogênese, migração e invasão celular. O NFAT foi identificado como sendo capaz de regular a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e com isso induzir o aumento do crescimento de células vasculares, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HERNANDEZ *et al.*, 2001). A expressão de COX-2 induzida pelo NFAT também influenciou positivamente a capacidade de invasão de linhagens celulares de câncer de mama, *in vitro* (YIU e TOKER, 2006). A importância do NFAT na mobilidade e potencial metastático de células de câncer de mama também foi relatada em outros estudos, onde o bloqueio da atividade do NFAT por CsA impedia essas características (JAULIAC *et al.*, 2002; YOELI-LERNER *et al.*, 2005). Em adição, foi observado que o NFAT2 leva ao aumento da invasividade e migração de células de carcinoma de cólon (TRIPATHI, M. K. *et al.*, 2014). Foi demonstrado também que HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1 α*), um importante regulador de processos como transporte de glicose, metabolismo energético e angiogênese (SEMENZA, 2000), tem sua expressão aumentada em mastócitos por uma via dependente de NFAT, com este efeito sendo bloqueado por CsA (WALCZAK-DRZEWIECKA *et al.*, 2008). Alguns dados têm relacionado as proteínas NFAT a outros processos envolvidos na tumorigênese. A ativação da expressão da telomerase é uma etapa essencial para o processo de imortalidade replicativa (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Já foi demonstrado que a expressão de hTERT (*Human telomerase reverse transcriptase*) pode ser regulada diretamente por NFAT (CHEBEL *et al.*, 2009).

Dados da literatura têm mostrado também que, em alguns contextos, as proteínas NFAT, em particular o NFAT1, podem atuar como supressores de tumor. Camundongos deficientes para *Nfat1* formaram espontaneamente condrossarcomas (RANGER *et al.*, 2000). Além disso, estes camundongos apresentam maior formação de sarcomas do que camundongos selvagens quando tratados com o carcinógeno metilcolantreno (ROBBS *et al.*, 2008). Como mostrado anteriormente, o NFAT1 é capaz de regular negativamente o ciclo celular e positivamente diversos genes pró-apoptóticos (Figs. 1.4 e 1.5), o que é compatível com um possível papel supressor tumoral.

Dessa forma, as proteínas NFAT estão relacionadas ao desenvolvimento de diversos tipos de tumores. Esses dados colocam a família NFAT como um alvo importante para o entendimento do processo de transformação celular.

1.4. O fator de transcrição NFAT2

O NFAT2 é o único membro conhecido da família NFAT a apresentar regulação a nível transcricional, sendo esta induzida por um loop autorregulatório (CHUVPILO *et al.*, 2002). A transcrição do NFAT2 é regulada por dois promotores distintos, nomeados como P1 e P2 (CHUVPILO *et al.*, 2002). O promotor P2 foi descrito como um promotor constitutivo em células T, levando à transcrição basal a partir do éxon 2 do gene, dando origem às isoformas β do NFAT2 (Fig. 1.7A) (SHERMAN *et al.*, 1999; CHUVPILO *et al.*, 2002), que apresentam o motivo N-terminal conservado (Fig. 1.1). Com a ativação celular, as diferentes proteínas NFAT presentes previamente – NFAT1 e isoformas do NFAT2 – são desfosforiladas e translocadas para o núcleo, onde se ligam ao promotor P1 do gene do NFAT2, que induz a transcrição a partir do éxon 1 com splicing para o éxon 3, levando à uma síntese massiva da isoforma NFAT2 α (Fig. 1.7A) (CHUVPILO *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2002), que não apresenta o domínio conservado N-terminal. Adicionalmente, foi mostrado que os fatores de transcrição da família NF- κ B também participam da regulação da expressão do NFAT2 α (MUHAMMAD *et al.*, 2014). O promotor P1 apresenta ainda sítios de ligação para outros fatores de transcrição como CREB, Fos e ATF2 (Fig. 1.7B), porém, não se sabe se estes fatores de transcrição são necessários para a expressão do NFAT2 α .

Embora tenha sido descrita originalmente em linfócitos T, a indução da transcrição do NFAT2 α após ativação celular foi observada também em timócitos, linfócitos B, osteoclastos, células endoteliais cardíacas embrionárias e células β pancreáticas embrionárias, onde esta indução foi mostrada como essencial para a fisiologia destas células (ZHOU *et al.*, 2005; TAKAYANAGI, 2007; BHATTACHARYYA *et al.*, 2011; GOODYER *et al.*, 2012; HOCK *et al.*, 2013; KLEIN-HESSLING *et al.*, 2016). Desse modo, o NFAT2 α é a única isoforma da família NFAT já descrita a ter a sua expressão regulada transcricionalmente, sendo essa expressão induzida por ativação celular. Esta indução parece ser fundamental para a proliferação e/ou diferenciação celular em diferentes tecidos.

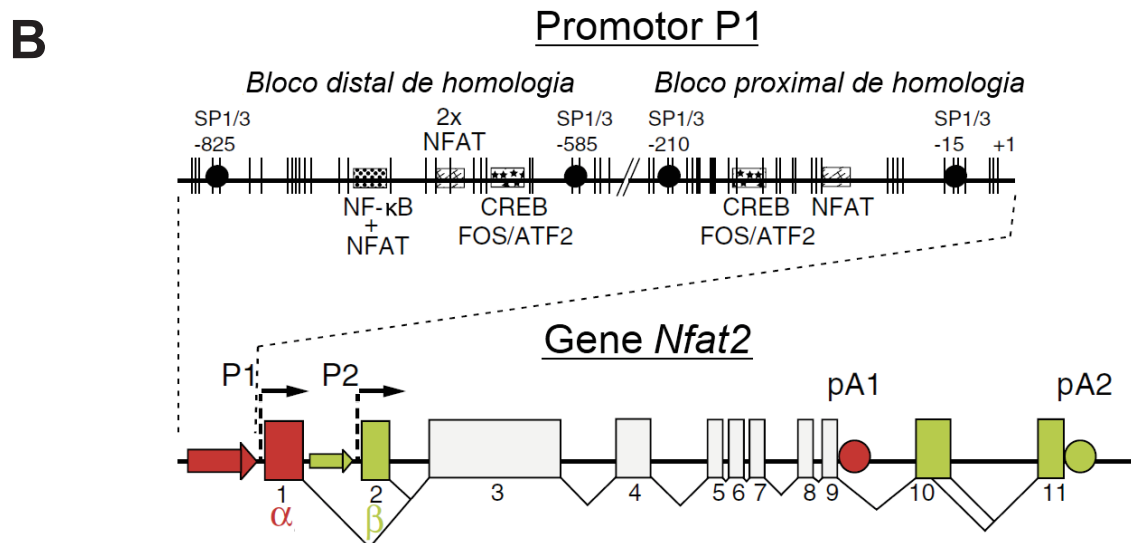
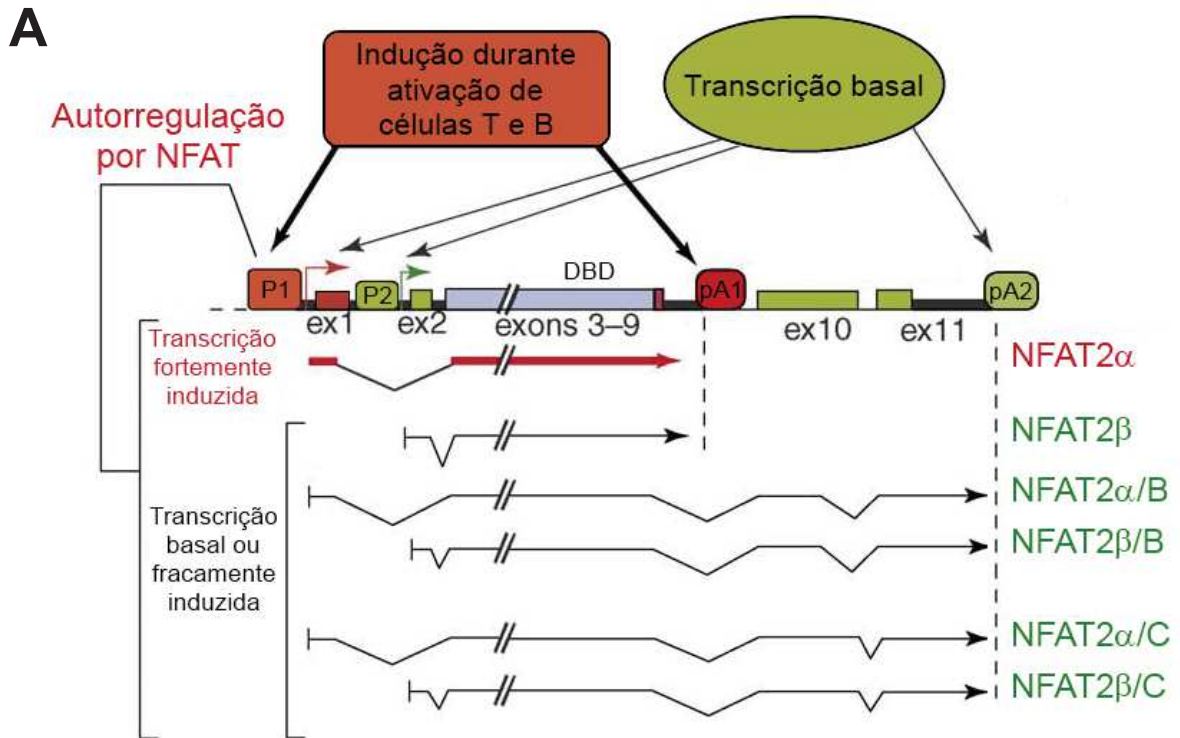


Figura 1.7. Regulação transcricional das diferentes isoformas do fator de transcrição NFAT2. A) Representação esquemática do mecanismo de regulação da expressão das isoformas do NFAT2 em células T. Dois diferentes promotores controlam a transcrição do NFAT2. O promotor P1 é induzido por ativação celular, levando principalmente à expressão da isoforma NFAT2 α , enquanto o promotor P2 é constitutivo, dando origem às isoformas β do NFAT2. O gene apresenta ainda 2 diferentes sítios de poliadenilação: pA1, envolvido na síntese das isoformas curtas do NFAT2 (NFAT2 α e NFAT2 β) e pA2, que permite a síntese das isoformas longas (NFAT2 α /B, NFAT2 β /B, NFAT2 α /C e NFAT2 β /C). Adaptado de SERFLING *et al.* (2006). B) Representação esquemática do promotor P1 do gene do NFAT2. Os círculos e as caixas indicam sítios para a ligação de fatores de transcrição e as linhas verticais indicam resíduos CpG. Adaptado de SERFLING *et al.* (2012).

Como já citado anteriormente, os diferentes membros e isoformas da família NFAT apresentam como principais diferenças estruturais os seus domínios de transativação (TAD-N e TAD-C terminal; Fig. 1.1). Algumas evidências sugerem que essa grande variabilidade nos domínios de transativação das proteínas NFAT está relacionada com o papel diferencial dessas proteínas tanto na regulação das respostas imunes quanto na tumorigênese e controle de ciclo celular e apoptose (ROBBS *et al.*, 2008; MOGNOL *et al.*, 2016). Graças à grande heterogeneidade de isoformas dos membros da família NFAT e pela já demonstrada função na regulação gênica dos diversos domínios e motivos diferencialmente presentes em cada uma dessas isoformas, é de grande interesse entender qual a função de determinados membros e isoformas das proteínas NFAT no controle da homeostasia celular.

Como já discutido, o NFAT2 apresenta variabilidade no N-terminal, com a presença ou ausência do motivo conservado N-terminal (Fig. 1.1), além de ser o único membro da família NFAT conhecido a possuir expressão induzida por ativação e também apresentar uma notável participação na regulação do ciclo celular e principalmente na tumorigênese. Por estas características, foram escolhidas as isoformas curtas do NFAT2, NFAT2 α e NFAT2 β , que divergem apenas em sua porção N-terminal (Fig. 1.1 e 1.7), para aprofundar o estudo do envolvimento da família de fatores de transcrição NFAT na proliferação, morte e transformação celular.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

Caracterizar o envolvimento das isoformas do fator de transcrição NFAT2 na regulação de proliferação, morte e transformação celular.

2.2. Objetivos específicos:

- Analisar os fenótipos celulares induzidos pela expressão do CA-NFAT2 α e do CA-NFAT2 β em fibroblastos NIH3T3;
- Caracterizar possíveis domínios funcionais no N-terminal diferencial das isoformas do NFAT2 e determinar sua importância para os processos de morte e transformação celular;
- Analisar os genes diferencialmente regulados pelas isoformas do NFAT2 nos processos de morte e transformação celular;
- Avaliar os efeitos da expressão do CA-NFAT2 α e do CA-NFAT2 β sobre a morte celular e a expressão gênica de linfócitos T CD4⁺;
- Avaliar a expressão das isoformas do NFAT2 em tumores e linhagens tumorais.

3. Material e Métodos

3.1. Cultura de células

As células NIH3T3, EcoPack2, Phoenix-Eco e T CD4⁺ primárias foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, NaHCO₃ (40 mM), NaH₂PO₄ (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), estreptomicina (100 mg/L) e penicilina (100.000 U/L) (todos Gibco). As células Jurkat, 697 e Raji foram cultivadas em meio RPMI (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino, piruvato de sódio, L-glutamina, β-mercaptoetanol, estreptomicina e penicilina. Todas as culturas foram cultivadas em estufa a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

3.2. Animais

Os camundongos BALB/c nude/nude, C57BL/6 (*Nfat2^{+/+}Cd4-cre⁻*) e *Nfat2^{fl/fl}Cd4-cre⁺* foram mantidos no biotério da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA). Os animais *Nfat2^{fl/fl} Cd4-cre⁺* possuem *background* C57BL/6 e foram gerados no laboratório da Dra. Anjana Rao (*La Jolla Institute for Allergy and Immunology*, San Diego, Califórnia, EUA) (MARTINEZ *et al.*, 2015). Em todos os experimentos foram utilizados animais de 8 a 12 semanas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INCA (Processos N° 008/13 e 003/14).

3.3. Amostras humanas

3.3.1. Doadores de sangue e amostras de PBMC

As amostras humanas de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs – *peripheral blood mononuclear cells*) foram obtidas a partir de 10 doadores

saudáveis do banco de sangue do Instituto Nacional de Câncer. Os leucócitos foram retidos em filtros de redução de leucócitos e recuperados a partir da lavagem dos filtros duas vezes com 20 mL de PBS. As PBMCs foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll (800 rcf, sem freio, por 20 minutos). Depois de isoladas, as PBMCs foram lavadas duas vezes com 10 mL de PBS e centrifugadas a 400 rcf por 5 minutos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do INCA (Processo N° 153/10).

3.3.2. Pacientes e amostras de linfoma de Burkitt

Sete casos linfomas de Burkitt pediátricos foram incluídos neste estudo e as amostras foram obtidas a partir da divisão de Patologia do INCA. Este estudo foi aprovado pelo CEP do INCA (Processo N° 018/09).

3.3.3. Amostras de baço e DLBCL

Foram incluídos neste estudo 104 amostras de tecido normal de baço obtidas através do banco de dados GTEX (*Genotype-Tissue Expression*) (GTEX-CONSORTIUM, 2013) e 48 casos de linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) obtidos a partir do banco de dados TCGA (*The Cancer Genome Atlas*).

3.4. Construção de plasmídeos

O vetor pLIRES2-EGFP foi construído através de subclonagem do cassete IRES2-EGFP do vetor pIRES2-EGFP (BD Biosciences) no vetor retroviral derivado do vírus de leucemia murina de Moloney (MoMuLV), pLEGFP-N1 (BD Biosciences), utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Os cDNAs do CA-NFAT2 α e do CA-NFAT2 β murinos, foram gentilmente cedidos, respectivamente, pela Dra. Melissa Brown e pela Dra. Anjana Rao e foram clonados no vetor retroviral pLIRES2-EGFP utilizando enzimas de restrições e posterior ligação. As construções das proteínas truncadas CA-NFAT2- Δ N, CA-NFAT2 β - Δ 1-8 e CA-NFAT2 β - Δ 1-19 foram feitas através da deleção dos resíduos de aminoácido 1-

28, 1-8 e 1-19 do CA-NFAT2 β , respectivamente, por amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase). Para a construção da proteína truncada CA-NFAT2 β - Δ 9-19 e do mutante CA-NFAT2 β -Mut-Acid, foi utilizado o sistema GeneTailor Site-Directed Mutagenesis (Invitrogen) para mutagênese sítio-dirigida do vetor pLIRE2-EGFP-CA-NFAT2 β . Essas mutagêneses foram realizadas em duas reações, onde os vetores produtos das reações com os primeiros pares de primers foram utilizados como DNA molde para a segunda reação. A proteína CA-NFAT2 β -Mut-Acid contém as seguintes substituições de aminoácidos: E9A, D11A, E17A e D19A. As sequências dos primers utilizados nas construções estão na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Lista de primers utilizados na construção das variantes do CA-NFAT2

Construção	Sequência dos primers (5' - 3')	Sítio de restrição
CA-NFAT2- Δ N	<i>Forward:</i> GCGCTCGAGATGCACTACAGTTATGTGTCC	<i>XhoI</i>
	<i>Reverse:</i> CCAGTCGACAGCATTATTCAGTGGAGACACAC	<i>Sall</i>
CA-NFAT2 β - Δ 1-8	<i>Forward:</i> CTGGAGAGATCTATGGAGTTCGACTTCGATTTCC	<i>BglII</i>
	<i>Reverse:</i> CCAGTCGACAGCATTATTCAGTGGAGACACAC	<i>Sall</i>
CA-NFAT2 β - Δ 1-19	<i>Forward:</i> ATTTCCAGATCTAGTTCGATGCAGAGCGGCG	<i>BglII</i>
	<i>Reverse:</i> CCAGTCGACAGCATTATTCAGTGGAGACACAC	<i>Sall</i>
CA-NFAT2 β - Δ 9-19	<i>Forward 1:</i> GGACCCGGAGTTCGATTCGATCAGAGCGGC	-
	<i>Reverse 1:</i> TCGAACTCCGGGTCCTGCTCCAGCC	-
	<i>Forward 2:</i> GCTGGAGCAGGACCCTCAGAGCGGCG	-
	<i>Reverse 2:</i> GGTCCTGCTCCAGCCCCGTCATGTCCG	-
CA-NFAT2 β -Mut-Acid	<i>Forward 1:</i> CGACTTCGATTTCTCTTTGCATTTGCACAGAGCGGCG	-
	<i>Reverse 1:</i> AGGAAATCGAAGTCGAACTCCGGGTCCTGCTCC	-
	<i>Forward 2:</i> CAAAGAGGAAATCGAAAGCGAATGCCGGGTCCTG	-
	<i>Reverse 2:</i> CGATTTCTCTTTGCATTTGCACAGAGCGGCGG	-

O vetor retroviral pRV-GFP foi gentilmente cedido pela Dra. Anjana Rao. Os cDNAs do CA-NFAT2 α e do CA-NFAT2 β murinos foram clonados no vetor pRV-GFP utilizando as enzimas de restrição *Sall* e *XhoI*.

O promotor TNF- α -200 pb foi sintetizado (Genscript) e subclonado no vetor pGL4.10 (Promega) utilizando as enzimas de restrição *BglII* (ligando com o sítio da enzima *BamHI* no vetor) e *HindIII*. O plasmid κ 3(long)-luciferase foi obtido a partir da Addgene (Plasmídeo 11110) (TSAI *et al.*, 1996).

Todas as construções foram confirmadas por mapeamento por enzimas de restrição e sequenciamento.

3.5. Purificação de células T CD4⁺ primárias

Linfonodos periféricos (inguinais, axilares, braquiais, cervicais e mesentéricos) de camundongos C57BL/6 (*Nfat2*^{+/+} *Cd4-cre*⁻) ou *Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ foram dissecados e macerados para obtenção das células em suspensão. As células T CD4⁺ foram purificadas por seleção negativa através do *Dynal Beads System* (Invitrogen) utilizando as recomendações do fabricante. A eficiência de purificação foi avaliada por citometria de fluxo e foi superior a 95% em todos os experimentos.

3.6. Transdução de células NIH3T3 com retrovírus recombinantes

A linhagem celular EcoPack2 ecotrófica (BD Biosciences) foi utilizada como célula empacotadora dos retrovírus. A produção retroviral foi feita a partir da transfecção transiente das células EcoPack2 por precipitação por fosfato de cálcio pelo protocolo descrito abaixo.

No primeiro dia, as células empacotadoras foram cultivadas em placas de Petri tratadas de 10 cm de diâmetro no total de 4 x 10⁶ células/placa em 10 mL de meio de cultura. No dia seguinte, estas células foram transfectadas utilizando o DNA dos vetores retrovirais purificados por colunas de Maxi-Prep (QIAGEN). A precipitação do DNA foi feita misturando-se: 20 μ g de DNA; 250 μ L de tampão salino de Hank 2x (HBS; 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES, pH7.1); 50 μ L de CaCl₂ 2,5 M e avolumando para 500 μ L com H₂O deionizada. Essa mistura foi homogeneizada avidamente por borbulhamento com

pipetador automático e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o precipitado (500 μ L) foi adicionado às células empacotadoras. No terceiro dia, as células empacotadoras transfectadas foram lavadas duas vezes com PBS e foram adicionados 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone). No quarto dia, os sobrenadantes das células empacotadoras contendo os retrovírus recombinantes foram recolhidos e centrifugados por 5 minutos a 500 rcf para retirar eventuais células soltas e fragmentos celulares.

As células NIH3T3 foram cultivadas em placas de 6 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço). No dia seguinte, essas células foram incubadas com o sobrenadante de EcoPack2 transfectadas contendo os retrovírus, junto com meio DMEM novo suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone) (1:1; v/v), suplementados com 8 μ g/mL de polibreno (Fluka Chemie). Em seguida, as placas contendo as células foram centrifugadas duas vezes a 400 rcf por 45 minutos, com intervalo de 90 minutos entre as centrifugações. Depois de 24 horas, as células foram soltas por tripsinização e o percentual de transdução foi observado por citometria de fluxo (citômetro FACSCalibur; BD Biosciences), através da análise da expressão de EGFP, sendo este momento considerado o ponto zero dos experimentos subsequentes.

3.7. Transdução de células T CD4⁺ com retrovírus recombinantes

A linhagem celular Phoenix-Eco foi utilizada como célula empacotadora dos retrovírus para transdução de linfócitos T CD4⁺. A produção retroviral foi feita a partir da transfecção transiente das células Phoenix-Eco por precipitação por fosfato de cálcio.

No primeiro dia, as células empacotadoras foram cultivadas em placas de Petri tratadas de 10 cm de diâmetro no total de 3×10^6 células/placa em 10 mL de meio de cultura. No dia seguinte, estas células foram co-transfectadas utilizando 20 μ g de DNA dos vetores retrovirais e 7,5 μ g do vetor pCL-ECO. No terceiro dia, as células empacotadoras transfectadas foram lavadas duas vezes com PBS e foram adicionados 10 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone). No quarto dia, os sobrenadantes das células empacotadoras foram recolhidos e filtrados em filtros de 0,22 μ m. Em seguida, os sobrenadantes

foram centrifugados *overnight* a 6000 rcf, a 4°C, para concentração dos retrovírus. Os retrovírus foram, então, ressuspensos em meio DMEM novo suplementado com 10% de soro fetal bovino definido, suplementado com 8 µg/mL de polibreno.

As células T CD4⁺ foram estimuladas por 48 horas com 1 µg/mL de anticorpo anti-CD3 (BD Pharmingen) e 1 µg/mL de anticorpo anti-CD28 (BD Pharmingen) em placa de 12 poços revestida com 0,3 mg/mL de anticorpo anti-IgG (MP Biomedicals). Posteriormente, o meio de cultura foi retirado e guardado a 37°C, enquanto as células foram incubadas com 1 mL do meio contendo os retrovírus concentrados e as placas foram centrifugadas a 900 rcf por 1 hora e 40 minutos. O meio de cultura condicionado pelos linfócitos foi retornado às células após a centrifugação. Depois de 24 horas, as células transduzidas foram lavadas com PBS, transferidas para placas de 6 poços e cultivadas por 24 horas com meio novo suplementado 20 U/mL de IL-2 recombinante (PeproTech). O ponto de 48 horas após a transdução foi considerado o ponto zero dos experimentos subsequentes.

3.8. Western blotting

As células NIH3T3 transduzidas (1×10^5 células) ou células T CD4⁺ (1×10^6 células) foram centrifugadas, ressuspensas e lisadas em 20 µL de tampão contendo 40 mM de Tris-Cl pH 7,5, 10 mM de EDTA, 60 mM de pirofosfato de sódio e 5% de SDS. Posteriormente, foram adicionados 5 µL de 5x loading buffer (350 mM Tris-Cl, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,01%, SDS 15%, β-Mercaptoetanol 25%, pH6,8) e as amostras foram aquecidas por 15 minutos a 100°C. Os extratos das proteínas foram separados em SDS-PAGE 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) como recomendado pelo fabricante. As membranas foram posteriormente bloqueadas com tampão Tris salina (TBS; 10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,4) com 5% de leite desnatado por uma hora. Posteriormente, foram lavadas com TBS-T (TBS mais 0,05% Tween) e incubadas nesse mesmo tampão *overnight* com o anticorpo primário (NFAT2, anticorpo monoclonal 7A6 (Santa Cruz); β-actina, anticorpo policlonal ab8227 (abcam); GAPDH, anticorpo monoclonal 6C5 (Santa Cruz)). As membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por 10 minutos e incubadas por mais uma hora com o anticorpo

secundário conjugado a peroxidase de raiz forte (HRP). Em seguida, as membranas foram lavadas seis vezes com TBS-T por 10 minutos e reveladas com o substrato da peroxidase utilizando o sistema *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific), como recomendado pelo fabricante.

3.9. Cinética de proliferação celular

Células NIH3T3 transduzidas com o vetor controle vazio ou contendo o cDNA das variantes do NFAT2 foram cultivadas em placas de 96 poços, 8×10^3 células por poço, em triplicata. Em diferentes tempos após a infecção retroviral a proliferação celular foi avaliada por marcação por cristal violeta. A marcação por cristal violeta consiste em lavar as células com tampão fosfato de salina (PBS), fixá-las com etanol absoluto por 10 minutos, corar as células fixadas com 0,05% de cristal violeta em 20% de etanol por 10 minutos, lavá-las com água destilada, ressolubilizar o cristal violeta com metanol absoluto por 5 minutos e ler a absorbância da placa em um espectrofotômetro a 595 nm. O primeiro ponto foi retirado 2 horas após o início da cultura e os demais a cada 24 horas.

3.10. Análise de morte celular por marcação com iodeto de propídio

Para análise de morte celular, as células NIH3T3 transduzidas com o vetor controle vazio ou com os vetores contendo o cDNA das variantes do NFAT2 foram cultivadas em placas de 12 poços, em confluência, totalizando 1×10^5 células por poço. Somente quando indicado, células expressando CA-NFAT2 β foram incubadas com anticorpos neutralizantes para TNF- α (MCA1488XZ; AbD Serotec) ou FasL (MFL3; BD Biosciences). Adicionalmente, quando indicado, células NIH3T3 selvagens foram incubadas com TNF- α murino recombinante. Depois de 72 h, as células foram tripsinizadas, lavadas uma vez com PBS e marcadas com iodeto de propídio (75 μ M) na presença de NP-40. A análise do conteúdo de DNA foi realizada coletando 10000 eventos por citometria de fluxo. Os dados foram analisados e o percentual de células com marcação sub-G₀ foi determinado utilizando os programas CELLQuest (BD Biosciences) e FlowJo (Tree Star Inc).

3.11. Ensaio de formação de focos

As células NIH3T3 foram transduzidas com o plasmídeo controle vazio ou com os plasmídeos contendo o cDNA das variantes do NFAT2. As células transduzidas foram diluídas 1:4 com células NIH3T3 selvagens não-transduzidas para facilitar a visualização dos focos de transformação. Essa mistura foi cultivada em placas de 6 poços a uma densidade final de 5×10^4 células/poço. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após cerca de duas semanas os focos foram visualizados por microscopia de contraste de fase e de fluorescência para a detecção da expressão de EGFP. Para a visualização dos focos, as placas foram lavadas com PBS, fixadas com etanol absoluto por 10 minutos e coradas com cristal violeta 0,05% em 20% de etanol por 10 minutos e lavadas com água destilada. Por fim, as placas foram escaneadas.

3.12. Crescimento independente de ancoragem em meio semi-sólido

Placas de seis poços foram forradas com meio suplementado com 0,8% de agarose para evitar adesão celular ao fundo do poço. Células NIH3T3 transduzidas foram tripsinizadas e 5×10^3 células foram ressuspensas em 3 mL de meio de cultura contendo 0,4% de agarose e, após a solidificação, foram adicionados 2 mL de meio de cultura, que foram trocados a cada 3 dias. As células foram cultivadas por quatro a cinco semanas. Colônias representativas foram visualizadas por microscopia de contraste de fase e de fluorescência para detecção do EGFP. O número total de colônias foi contado.

3.13. Formação de tumores em camundongos atímicos

Camundongos atímicos BALB/c nude/nude de 8 a 12 semanas foram inoculados com células NIH3T3 transduzidas com vetor vazio ou contendo o cDNA das isoformas do NFAT2. Essas células foram tripsinizadas, lavadas e ressuspensas em PBS. As inoculações foram feitas através da injeção subcutânea de 5×10^5 células no flanco direito de cada animal. Foram utilizados grupos de 7 animais para cada um dos 3 vetores (vetor vazio, CA-NFAT2 α e CA-NFAT2 β). O

volume tumoral foi avaliado a cada cinco dias usando a fórmula: $V = 0,52 \times \text{comprimento}^2 \times \text{largura}$. Os camundongos foram sacrificados 55 dias após a inoculação e fotografados no sistema IVIS Lumina XR Series III (PerkinElmer) para detecção da expressão de EGFP nos tumores.

3.14. Extração de RNA e síntese de cDNA

Células NIH3T3 transduzidas foram cultivadas em placas de 10 cm ($1,5 \times 10^6$ células/placa) e seu RNA total foi isolado após 16 horas, através o kit RNeasy Mini (QIAGEN). A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o kit RT² First Strand (SABiosciences).

Para análise da expressão das isoformas do NFAT2, células Jurkat, 697 ou Raji foram cultivadas em placas de 6 poços (3×10^6 células por poço). Quando indicado, as células tumorais humanas (Jurkat, 697 e Raji) foram estimuladas com ionomicina ($1 \mu\text{M}$) e PMA (10 nM) por 4 horas. Para extração de RNA de PBMCs foram utilizadas 1×10^7 células recentemente purificadas. Os RNAs totais foram isolados usando o reagente Trizol LS (Invitrogen). As células foram centrifugadas, ressuspendidas em 1 mL de Trizol LS e estocadas a -70°C . Posteriormente, as amostras foram descongeladas e foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de clorofórmio. As amostras foram vortexadas, incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 rcf por 15 minutos, a 4°C . A fase aquosa foi recolhida e foi adicionada de $600 \mu\text{L}$ de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v). As amostras foram vortexadas e centrifugadas a 12000 rcf por 15 minutos, a 4°C . A fase aquosa foi recolhida e adicionada de $500 \mu\text{L}$ de isopropanol. As amostras foram misturadas, incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 rcf por 15 minutos, a 4°C . Os pellets foram lavados com 1 mL de etanol 75%, seguido por centrifugação a 7500 rcf por 10 minutos, a 4°C . Os sobrenadantes foram descartados e os pellets de RNA foram ressuspendidos em DEPC 0,1%. Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit *ImProm-II Reverse Transcription* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante.

A extração de RNA das amostras de linfoma de Burkitt foi realizada através do *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Ambion) e a primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

3.15. PCR em tempo real

O SuperArray para análise de genes relacionados a apoptose foi realizado utilizando SYBR Green PCR Master Mix (SABiosciences) e o kit *PAMM-012 Mouse Apoptosis Pathway RT² Profiler PCR array* (SABiosciences). Os dados foram analisados através do software *RT² Profiler PCR Array Data Analysis* (SABiosciences). As reações de PCR em tempo real para as isoformas do NFAT2 foram realizadas utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em um sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems). As sequências dos primers utilizados nas reações estão listadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Lista de primers utilizados nas reações de PCR em tempo real

Alvo	Sequência dos primers (5' - 3')
NFAT2 α <i>Homo sapiens</i>	<i>Forward:</i> TCGGGAGAGGAGAACTTTGG
	<i>Reverse:</i> GCTGACGTTGGAGGATGC
NFAT2 β <i>Homo sapiens</i>	<i>Forward:</i> AGGAGTTCGACTTCGAGTTCC
	<i>Reverse:</i> GCTGACGTTGGAGGATGC
PGK1 <i>Homo sapiens</i>	<i>Forward:</i> CAAGCTGGACGTTAAAGGGA
	<i>Reverse:</i> CTTGGGACAGCAGCCTTAAT
TBP <i>Homo sapiens</i>	<i>Forward:</i> ACAACAGCCTGCCACCTTAC
	<i>Reverse:</i> GTTCTGAATAGGCTGTGGGG

3.16. ELISA

As células NIH3T3 transduzidas foram cultivadas em confluência em placas de 12 poços (1 x 10⁵ células por poço) por 24, 48 ou 72 horas. As células T CD4⁺ foram cultivadas em placas de 24 poços (1 x 10⁶ células por poço) na presença ou ausência de PMA (10 nM) por 6 horas. Após os tempos indicados, os

meios de cultura foram coletados, centrifugados e os sobrenadantes livres de células foram recolhidos para análise dos níveis de TNF- α . Os níveis de TNF- α foram avaliados utilizando o kit *Murine TNF- α ELISA Development* (PeproTech) de acordo com as instruções do fabricante.

3.17. Marcação de superfície

Células NIH3T3 transduzidas com vetor vazio ou expressando as variantes do CA-NFAT2 foram cultivadas em confluência (1×10^5 células por poço) em placas de 12 poços. Após 24 h, as células foram soltas utilizando solução de PBS com EDTA (2 mM), centrifugadas, ressuspensas em PBS, marcadas com anticorpo anti-FasL-PE (eBiosciences) e analisadas por citometria de fluxo. De maneira similar, células T CD4⁺ transduzidas foram cultivadas em placas de 24 poços (1×10^6 células por poço) na presença ou ausência de PMA (10 nM) por 6 horas. Posteriormente, as células foram coletadas, centrifugadas, ressuspensas em PBS, marcadas com anticorpo anti-FasL-PE e analisadas por citometria de fluxo. Para análise, foram coletados 10000 eventos dentro do *gate* de células EGFP⁺.

3.18. Ensaios de transativação

As células NIH3T3 (5×10^4 células em placas de 6 poços) foram co-transfectadas através do *SuperFect Transfection Reagent* (QIAGEN) com plasmídeo codificando a luciferase *firefly* (pGL4.10-TNF- α (-200 pb) ou $\kappa 3$ (long)-luciferase) e plasmídeo codificando a luciferase renilla (pRL-TK). Após 48 horas, as células transfectadas foram transduzidas com vetor vazio ou contendo o cDNA das variantes do CA-NFAT2. No dia seguinte à transdução, 1×10^5 células foram cultivadas em placas de 12 poços e lisadas após 16 horas com o *Passive Lysis Buffer* (Promega). A atividade das luciferases *firefly* e renilla foi avaliada através do sistema *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega). Os valores da luciferase *firefly* foram normalizados pela atividade de renilla.

3.19. Análise de morte celular por marcação com Anexina V

Células T CD4⁺ transduzidas foram cultivadas em placas de 24 poços (1 x 10⁶ células por poço) na presença ou ausência de PMA (10 nM) por 6 horas. Posteriormente, as células foram coletadas, centrifugadas, lavadas com PBS, ressuspensas em tampão de ligação de Anexina V (0,1M HEPES, pH 7,4; 1,4M NaCl e 25 mM CaCl₂), marcadas com Anexina V-APC (eBiosciences) e 7-AAD (BD Biosciences) e analisadas por citometria de fluxo. Para análise, foram coletados 10000 eventos dentro do *gate* de células EGFP⁺.

3.20. Análise de dados de RNA-Seq

Os dados compilados contendo a expressão de genes e éxons e a quantificação de junções de éxons foram obtidos a partir de *download* do banco de dados *FireBrowse* ou diretamente do TCGA utilizando o software R com o pacote *TCGABiolinks*, para as amostras tumorais de DLBCL, e a partir de *download* do banco de dados GTEx, para as amostras de normais de baço.

A expressão do gene do NFAT2 foi avaliada pelo valor de FPKM (*Fragments per kilobase of exon per million reads mapped*). Para estimar o nível de expressão das isoformas NFAT2 α e NFAT2 β , foram utilizadas, respectivamente, as contagens das junções exón 1 – éxon 3 e exón 2 – éxon 3 do gene do NFAT2. As contagens das junções foram normalizadas pela profundidade da biblioteca de cada amostra. Nove amostras que apresentaram contagens iguais a zero para as duas junções foram excluídas das análises. Para geração de dados em escala logarítmica em base 2, foi gerada uma pseudocontagem somando-se uma constante igual a 1 a todas as contagens.

3.21. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da comparação entre os grupos por teste *t* de *Student* não-pareado. O teste *U* de Mann-Whitney foi utilizado apenas para análise das amostras de PBMCs de doadores, amostras de linfomas de Burkitt e contagens das junções de éxons do NFAT2 nos dados de RNA-Seq. Para

as análises de correlação foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1. As isoformas do NFAT2 afetam de maneira distinta a proliferação e a morte celular em fibroblastos NIH3T3

Para avaliar o papel das diferentes isoformas do NFAT2 na proliferação celular, utilizamos como modelo experimental a linhagem não-transformada imortalizada de fibroblastos murinos NIH3T3. A linhagem NIH3T3 foi escolhida por ser um modelo clássico para estudos de proliferação e transformação celular. Além disso, células NIH3T3 não apresentam níveis detectáveis de nenhuma isoforma do NFAT2, servindo como um bom modelo para análise de variantes específicas do NFAT2. Nestas células, levamos a uma expressão contínua das construções contendo formas constitutivamente ativas (CA) das isoformas NFAT2 α ou NFAT2 β através da transdução retroviral. As proteínas CA-NFAT2 já foram previamente caracterizadas por se localizarem constitutivamente no núcleo, se ligarem com alta afinidade ao DNA e transativarem genes responsivos a NFAT (MONTICELLI e RAO, 2002; ROBBS *et al.*, 2008). As proteínas NFAT2 α ou NFAT2 β divergem apenas em seu N-terminal, com 42 resíduos de aminoácido diferenciais para o NFAT2 α , oriundos do éxon 1 do gene, e 28 resíduos de aminoácido diferenciais para o NFAT2 β , provenientes do éxon 2 (Fig. 4.1A e 4.1B).

A eficiência da transdução retroviral foi analisada por citometria de fluxo para detecção da proteína EGFP, codificada pelo mRNA bicistrônico contendo a sequência para síntese das isoformas do NFAT2, onde foi observado 85-90% de células positivas para EGFP. A análise por *western blotting* mostrou ainda que a transdução retroviral permitiu a expressão de níveis similares das isoformas do NFAT2 em células NIH3T3 (Fig. 4.1C).

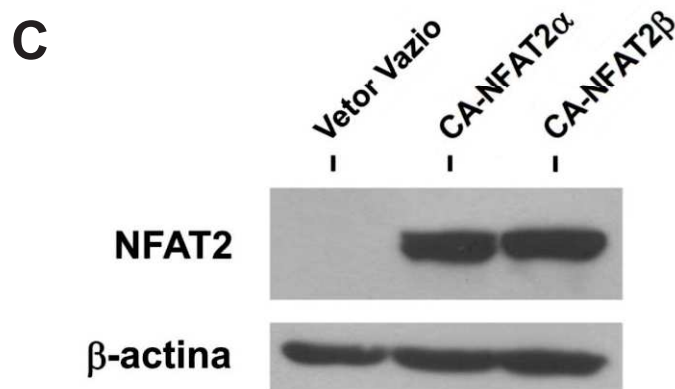
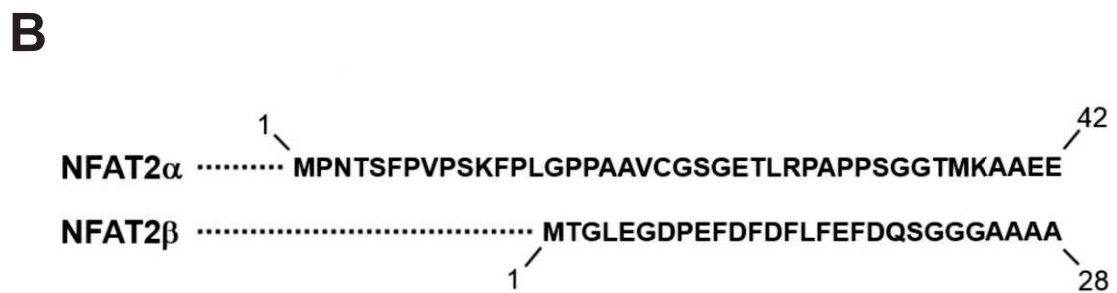
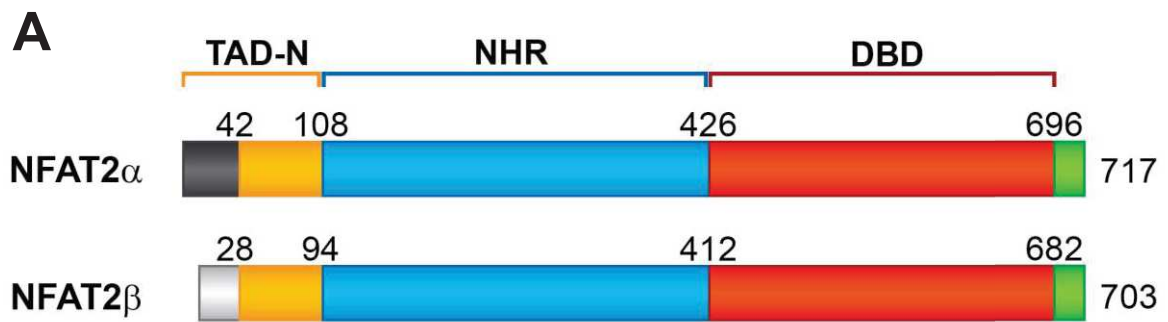


Figura 4.1. Isoformas do NFAT2 utilizadas neste estudo. A) Alinhamento esquemático das proteínas NFAT2 α e NFAT2 β . DBD, domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain*); NHR, região de homologia ao NFAT (*NFAT homology region*); TAD-N, domínio de transativação N-terminal (*N-terminal transactivation domain*). B) Representação dos aminoácidos diferenciais no N-terminal das isoformas NFAT2. O número dos aminoácidos está indicado na figura. C) Análise por *western blotting* dos níveis proteicos das isoformas do NFAT2 em células NIH3T3 transduzidas.

No intuito de analisar o efeito das diferentes isoformas do NFAT2 na proliferação das células NIH3T3, células transduzidas com vetor vazio ou contendo cDNA das isoformas constitutivamente ativas do NFAT2 tiveram seu perfil proliferativo analisado por marcação por cristal violeta, que fornece informação sobre número de células na cultura. Neste ensaio observou-se que as células transduzidas com o vetor vazio proliferavam e ao atingirem a confluência paravam de proliferar (Fig. 4.2). Surpreendentemente, enquanto as células transduzidas com o vetor contendo o cDNA do CA-NFAT2 α continuavam a proliferar mesmo depois de atingida a confluência, era observado uma grande redução no número de células quando estas eram infectadas com o vetor contendo o cDNA do CA-NFAT2 β (Fig. 4.2). Esses dados sugerem que as proteínas NFAT2 α e NFAT2 β afetam diferencialmente a proliferação celular em fibroblastos NIH3T3, uma vez que a isoforma α parece estar induzindo a perda da inibição de crescimento mediada por contato, um indicativo primário de transformação celular, enquanto a isoforma β poderia estar induzindo morte celular.

Para determinar se a expressão do CA-NFAT2 β poderia, de fato, induzir morte celular, analisamos a presença de conteúdo sub-G₀ de DNA, um indicador de células em processo de morte celular por apoptose. Analisando a fragmentação de DNA nuclear pela marcação com iodeto de propídio (IP) 72 h depois do início da cultura, observamos que células do controle ou expressando CA-NFAT2 α apresentaram um baixo percentual de conteúdo sub-G₀ de DNA (Fig. 4.3). Enquanto isso, células expressando CA-NFAT2 β demonstraram elevado percentual de fragmentação de DNA, onde cerca de 23,8% apresentavam conteúdo de DNA sub-G₀ (Fig. 4.3). Em conjunto, nossos dados sugerem um papel diferencial para essas duas isoformas do NFAT2 no controle da proliferação e morte celular, com a isoforma NFAT2 β sendo capaz de induzir a morte celular, enquanto a isoforma α não induz morte e aumenta o potencial proliferativo das células NIH3T3.

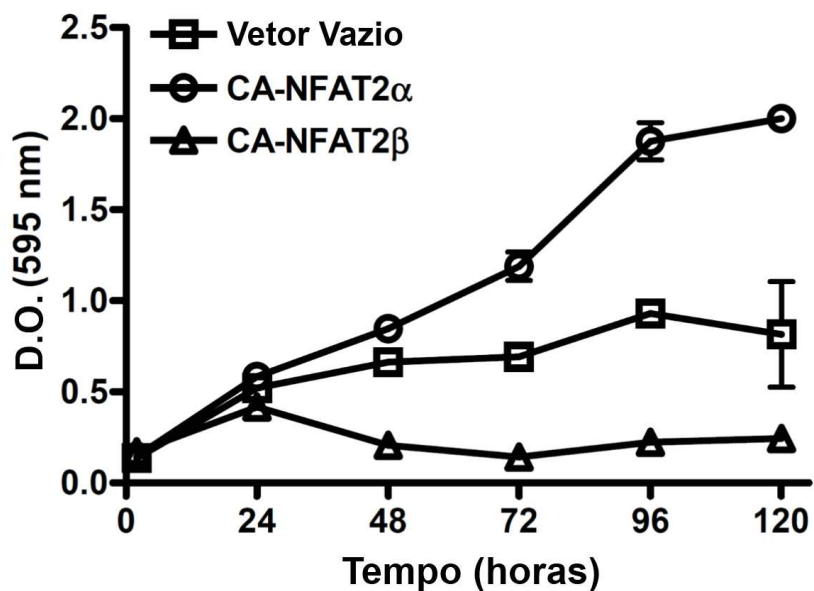


Figura 4.2. Células NIH3T3 expressando CA-NFAT2 α e CA-NFAT2 β apresentam diferentes perfis de proliferação. Ensaio de proliferação por marcação com cristal violeta. As células transduzidas com vetor vazio ou vetores contendo CA-NFAT2 α ou CA-NFAT2 β foram cultivadas em placas de 96 poços, 8×10^3 células por poço, em triplicata. O tempo inicial corresponde ao início da cultura, 24 h após a transdução. As barras indicam o desvio padrão dentro de um experimento. D.O., densidade óptica. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

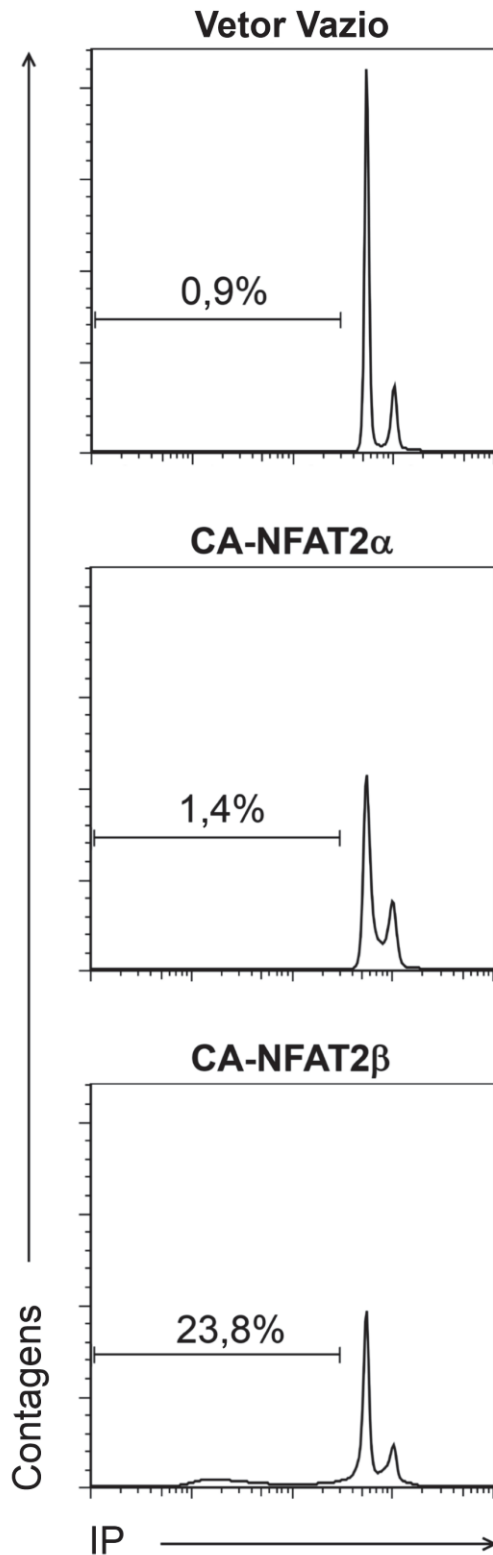


Figura 4.3. O CA-NFAT2 β induz morte celular em NIH3T3. Análise de morte celular em células NIH3T3 transduzidas com retrovírus recombinantes. As células foram cultivadas em confluência (1×10^5 células em placas de 12 poços) e 72 horas após o início da cultura foram marcadas com iodeto de propídio (IP). A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. O percentual de conteúdo sub-G₀ de DNA está indicado na figura. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

4.2. NFAT2 α e NFAT2 β induzem transformação celular com diferentes intensidades em células NIH3T3

Nos experimentos de proliferação foi observado que as células expressando CA-NFAT2 α eram capazes de proliferar acima da confluência, (Fig. 4.2), sugerindo que essas células poderiam estar passando por um processo de transformação celular. Sendo assim, avaliamos se a expressão das isoformas CA-NFAT2 α e CA-NFAT2 β poderia levar a diferentes fenótipos em relação à transformação celular. Para isso, analisamos três características de transformação celular: perda de inibição de crescimento induzido por contato célula-célula, crescimento na ausência de substrato sólido para adesão e capacidade de formação de tumores *in vivo*.

Primeiramente, analisamos se as células expressando as diferentes isoformas do NFAT2 eram capazes de superar a inibição do crescimento por contato. Células transduzidas foram co-cultivadas com células NIH3T3 selvagens em uma proporção de 1:4 (v:v) e foi observada sua capacidade de formação de focos de transformação em cultura. Enquanto a expressão do vetor vazio não foi capaz de induzir a formação de focos em cultura, as células que expressavam CA-NFAT2 α formaram grande número de focos (Fig. 4.4A). As células expressando CA-NFAT2 β também formaram focos, mas em menor número do que as células expressando CA-NFAT2 α (Fig. 4.4A). Isto indica que estas duas isoformas do NFAT2 são capazes de levar as células NIH3T3 à perda da inibição de crescimento por contato, embora a expressão do NFAT2 α leve a um número maior de focos do que a expressão do NFAT2 β . Por microscopia de fluorescência foi observado que a maior parte dos focos formados na cultura contendo as células expressando o vetor vazio eram negativos para EGFP, mostrando que estes eram formados por células NIH3T3 selvagens, o que indicou que a formação de focos nessa cultura era proveniente de transformações espontâneas das células NIH3T3 e não foram causadas pela transdução retroviral (Fig. 4.4B). Enquanto isso, a grande maioria dos focos observados nas culturas contendo células expressando CA-NFAT2 α ou CA-NFAT2 β eram positivos para EGFP, indicando que, de fato, o fenótipo transformado das células desta cultura são induzidos pela expressão das isoformas do NFAT2 (Fig. 4.4B).

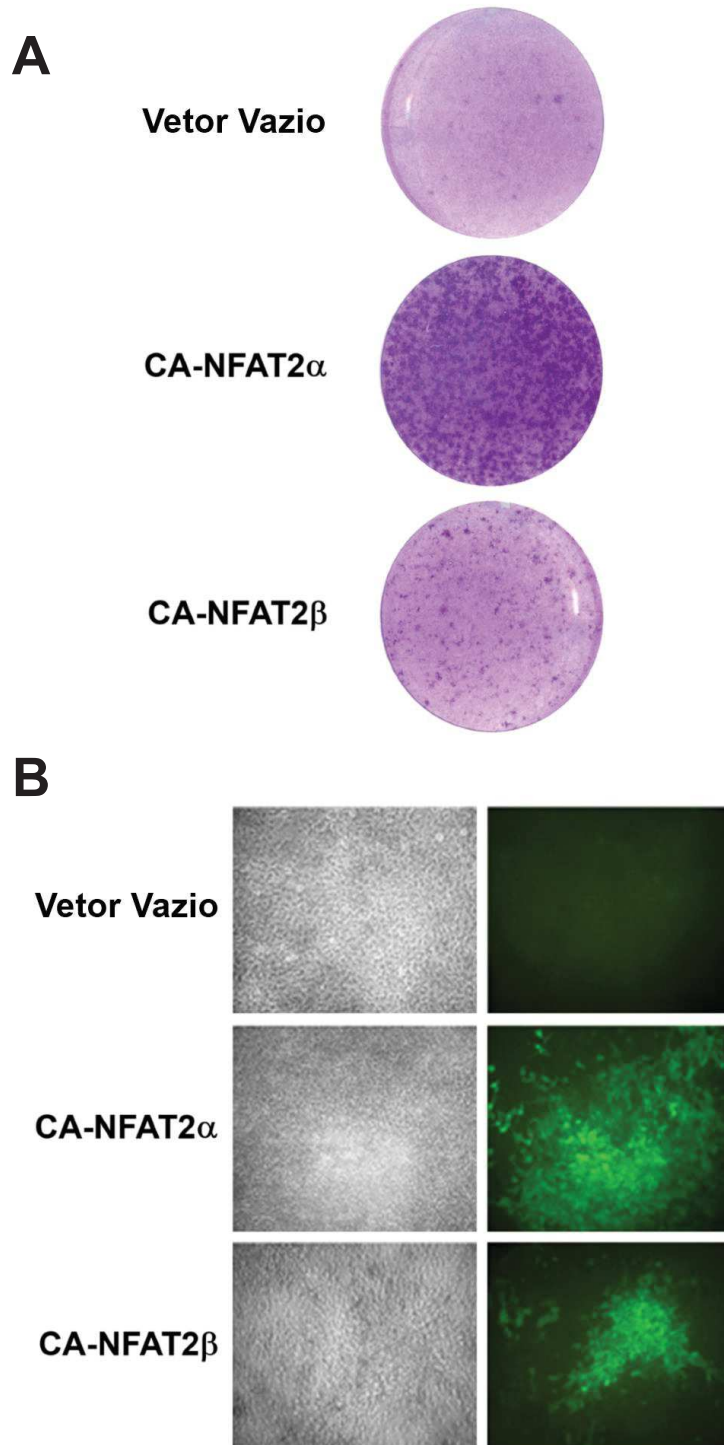


Figura 4.4. O NFAT2 induz a perda de inibição do crescimento mediada por contato. Ensaio de formação de focos. As células NIH3T3 transduzidas com o vetor vazio ou com os vetores contendo o cDNA das isoformas do NFAT2 foram misturadas em uma proporção 1:4 com células NIH3T3 selvagens não-transduzidas e mantidas em cultura por aproximadamente 2 semanas. A) Marcação dos focos com cristal violeta. B) Análise de focos representativos da cultura por microscopia de contraste de fase (painel esquerdo) e microscopia de fluorescência (painel direito). Estes resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

Posteriormente, analisamos se as células NIH3T3 transduzidas eram capazes de crescer na ausência de substrato sólido para adesão. As células NIH3T3 foram cultivadas em meio semi-sólido de agarose e a formação de colônias foi analisada por microscopia de contraste de fase e de fluorescência. Células transduzidas com o vetor vazio formaram um baixo número de colônias de pequeno volume (Fig. 4.5). Em contrapartida, células expressando CA-NFAT2 α demonstraram capacidade de formar um grande número de colônias com volume bastante aumentado (Fig. 4.5). Já as células expressando CA-NFAT2 β formaram um número baixo de colônias (similar ao controle), mas com volume aumentado, apesar de menores do que as formadas pelas células expressando CA-NFAT2 α (Fig. 4.5).

Por fim, o último aspecto de transformação celular a ser analisado foi a capacidade de formação de tumores *in vivo*. Para isso, células NIH3T3 expressando o vetor vazio ou as isoformas constitutivamente ativas do NFAT2 foram inoculadas no flanco de camundongos BALB/c nude e os animais foram monitorados para a formação de tumores. Células transduzidas com o vetor vazio não levaram a formação de nenhum tumor detectável durante os 55 dias de experimento (Fig. 4.6A e 4.6B). Enquanto isso, os camundongos inoculados com as células expressando o CA-NFAT2 α apresentaram grandes tumores, com um crescimento contínuo durante todo o experimento (Fig. 4.6). Já os animais inoculados com as células expressando CA-NFAT2 β apresentaram tumores menores e de crescimento mais lento (Fig 4.6). Esses dados corroboram as observações anteriores, onde tanto o CA-NFAT2 α quanto o CA-NFAT2 β são capazes de transformar as células NIH3T3, porém com um fenótipo de transformação mais acentuado em células expressando a isoforma CA-NFAT2 α .

Em conjunto, estes dados demonstram que a transformação celular induzida pelo NFAT2 pode ser diferencialmente regulada pelas isoformas envolvidas no processo. Apesar de ambas as isoformas induzirem transformação em células NIH3T3, células expressando CA-NFAT2 β apresentam menor potencial oncogênico do que as expressando CA-NFAT2 α , sendo isto possivelmente influenciado de forma negativa pela morte celular induzida pela isoforma β do NFAT2.

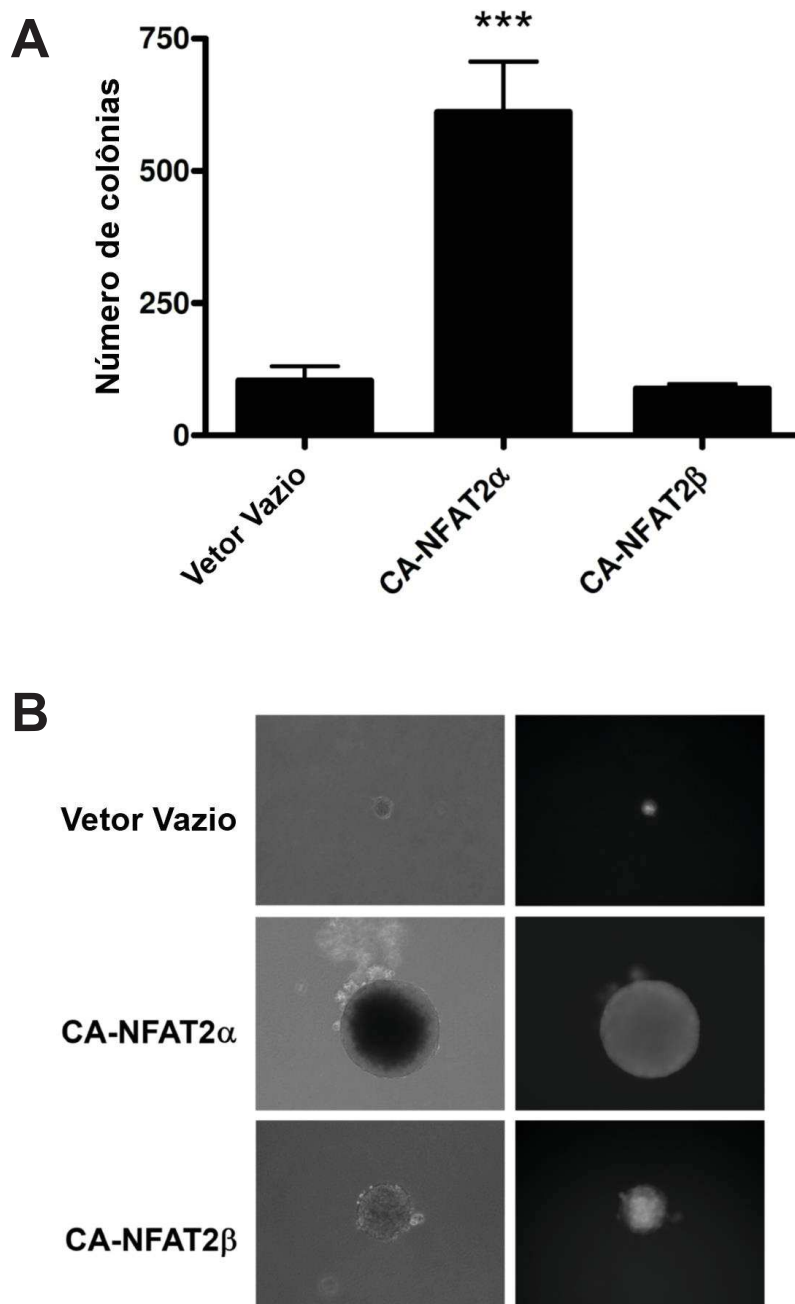


Figura 4.5. As isoformas constitutivamente ativas do NFAT2 possibilitam crescimento na ausência de substrato sólido para adesão. Ensaio de formação de colônias em meio semi-sólido. As células NIH3T3 transduzidas com o vetor vazio ou com os vetores contendo o cDNA das isoformas do NFAT2 (5×10^3 células) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 0,4% de agarose. As células foram mantidas em culturas por quatro a cinco semanas. A) Quantificação por contagem das colônias. Média de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão entre os experimentos. *** indica $p < 0,001$. B) Microscopia de contraste de fase (painel esquerdo) ou de fluorescência para a expressão de EGFP (painel direito) de colônias representativas de pelo menos 3 experimentos independentes.

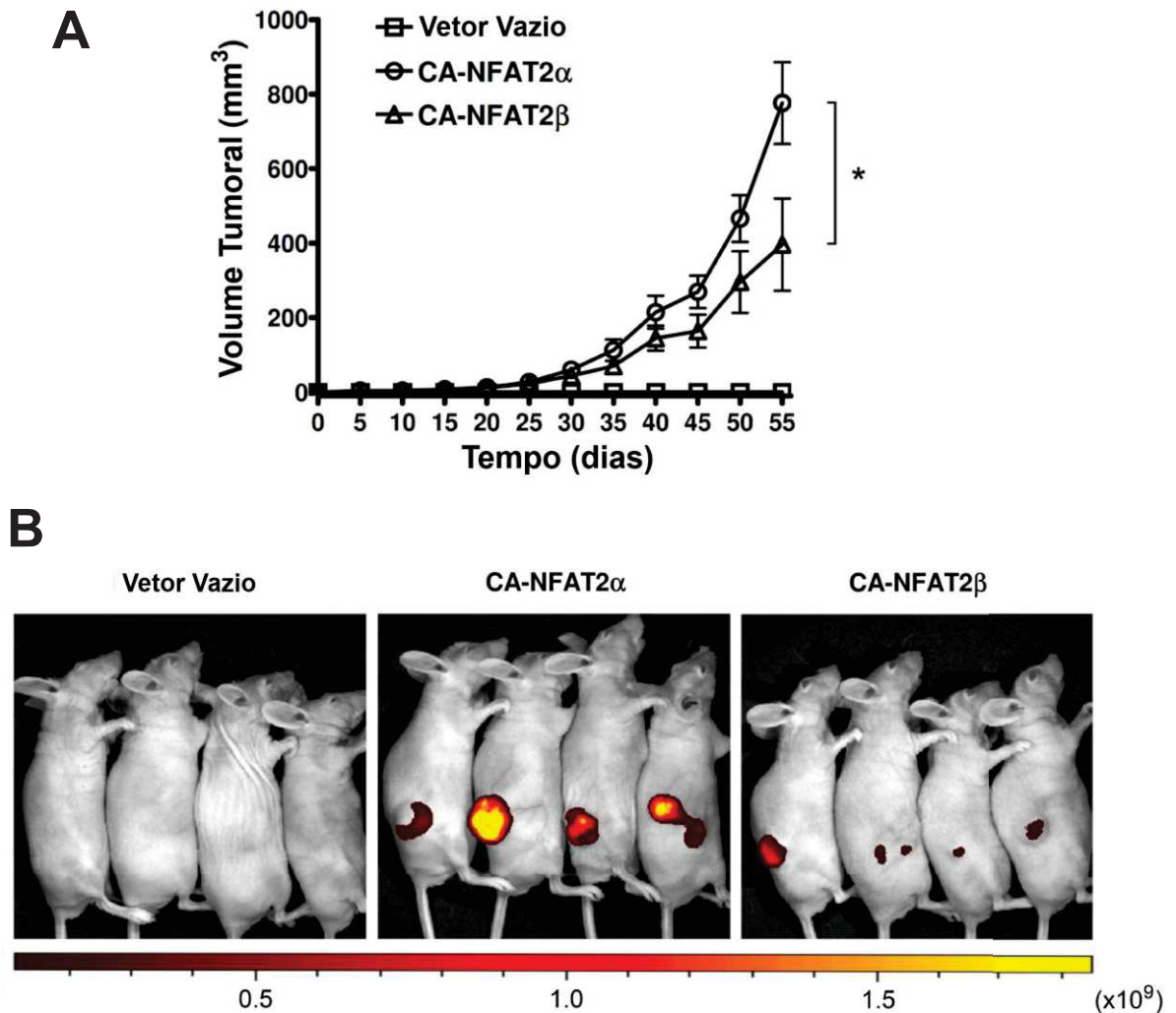


Figura 4.6. As isoformas do NFAT2 induzem a formação de tumores *in vivo*. Formação de tumores em camundongos nude. Células transduzidas (5×10^5 células) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos atímicos BALB/c nude/nude ($n=7$). A) O volume tumoral foi medido a cada 5 dias através da fórmula: $V=0,52 \times \text{comprimento}^2 \times \text{largura}$. As barras indicam o erro padrão da média dentro de um experimento. * indica $p < 0,05$. B) Visualização de tumores por *in vivo imaging* para expressão de EGFP em quatro camundongos representativos, 55 dias após inoculação.

4.3. O domínio ácido específico do NFAT2 β é responsável pelos papéis diferenciais das isoformas do NFAT2

Como citado anteriormente, as proteínas NFAT2 α e NFAT2 β divergem apenas em seu N-terminal (Fig. 4.1), devido à presença de diferentes inícios de transcrição no gene do NFAT2 (Fig. 1.7). Com o intuito de avaliar a função dos domínios N-terminais diferenciais dessas isoformas na proliferação, morte e transformação celular, construímos a proteína truncada CA-NFAT2- Δ N, que não possui as porções variantes do N-terminal do NFAT2, isto é, os aminoácidos oriundos dos éxons 1 e 2 do gene, apresentando, portanto, apenas a porção do NFAT2 comuns às isoformas NFAT2 α e NFAT2 β (Fig. 4.7A). Esta proteína foi construída a partir da deleção dos 28 primeiros aminoácidos do CA-NFAT2 β . A proteína CA-NFAT2- Δ N foi expressa em células NIH3T3 (Fig. 4.7B) e o fenótipo celular induzido por ela foi analisado.

Primeiramente, em ensaios de morte celular por análise de conteúdo de DNA sub-G₀, observamos que a proteína CA-NFAT2- Δ N não é capaz de induzir morte celular em fibroblastos NIH3T3, demonstrando que a ablação dos 28 primeiros resíduos de aminoácido do CA-NFAT2 β é suficiente para abolir completamente a morte celular induzida por esta isoforma (Fig. 4.8A). Corroborando este dado, em cinéticas de proliferação por marcação com cristal violeta, foi observado que as células expressando CA-NFAT2- Δ N, diferentemente das expressando CA-NFAT2 β , não mostram redução no número de células na cultura, mas apresentam perfil semelhante às células expressando CA-NFAT2 α , proliferando acima da confluência (Fig. 4.8B). Adicionalmente, foi observado que as células expressando CA-NFAT2- Δ N apresentavam um fenótipo de transformação celular, formando grande quantidade de focos em cultura (Fig. 4.9A) e também um grande número de colônias de grande volume em meio semi-sólido de ágar (Fig. 4.9B e 4.9C). Estes resultados sugerem que o papel diferencial das isoformas do NFAT2 na morte celular está ligado aos aminoácidos diferenciais destas isoformas, sendo os 28 primeiros resíduos de aminoácido do CA-NFAT2 β essenciais para indução de morte celular em NIH3T3. Além disso, a transformação celular induzida pelas isoformas do NFAT2 não é dependente das porções da proteína provenientes dos éxons 1 ou 2 do gene, uma vez que a ablação destas regiões das isoformas não impede a indução de transformação celular.

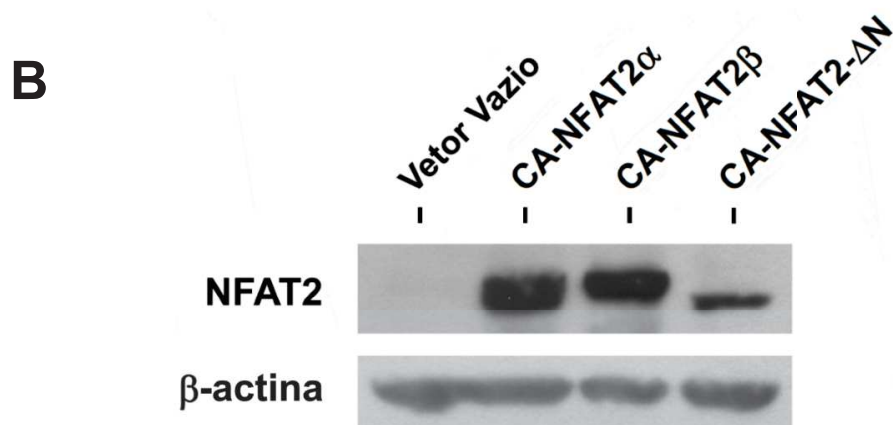
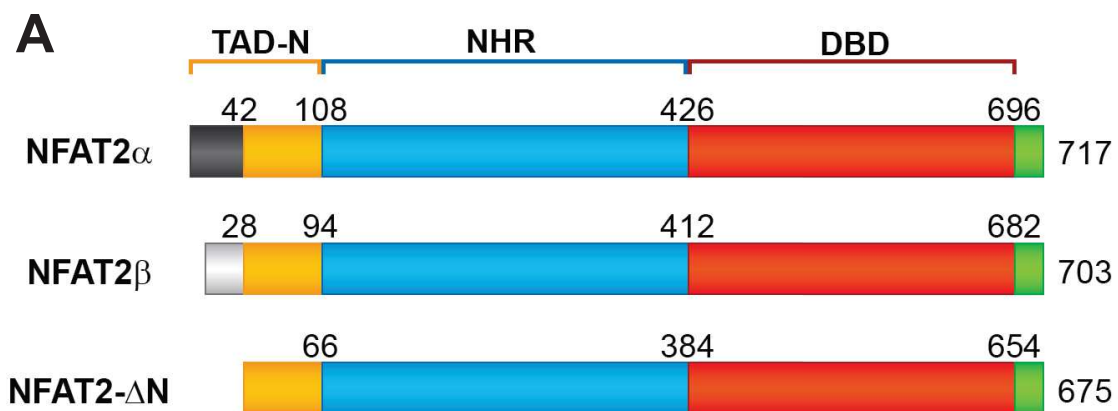


Figura 4.7. Representação esquemática da proteína truncada CA-NFAT2- Δ N. A) Alinhamento esquemático das variantes do NFAT2. A proteína CA-NFAT2- Δ N foi construída a partir da deleção dos 28 primeiros aminoácidos do CA-NFAT2 β e apresenta apenas os aminoácidos comuns às duas isoformas curtas do NFAT2. B) Análise por *western blotting* dos níveis proteicos das variantes do NFAT2 em células NIH3T3 transduzidas.

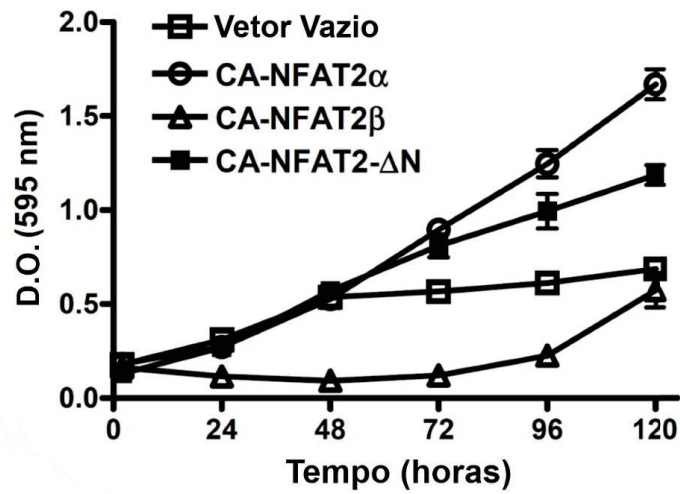
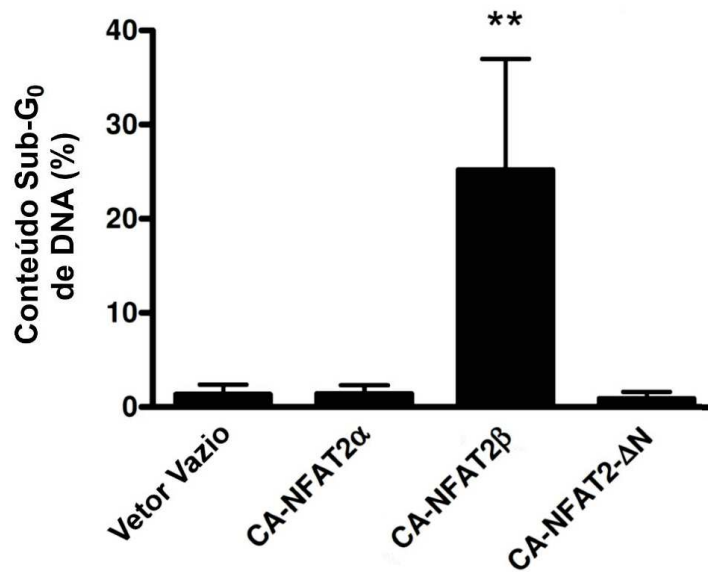
A**B**

Figura 4.8. O N-terminal do CA-NFAT2 β é essencial para indução de morte celular em células NIH3T3. As células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou vetores contendo as variantes do NFAT2. A) Cinética de proliferação por marcação com cristal violeta. D.O., densidade ótica. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão dentro de um experimento. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. B) Análise de conteúdo sub-G₀ de DNA por marcação com iodeto de propídeo. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. ** indica $p < 0,01$.

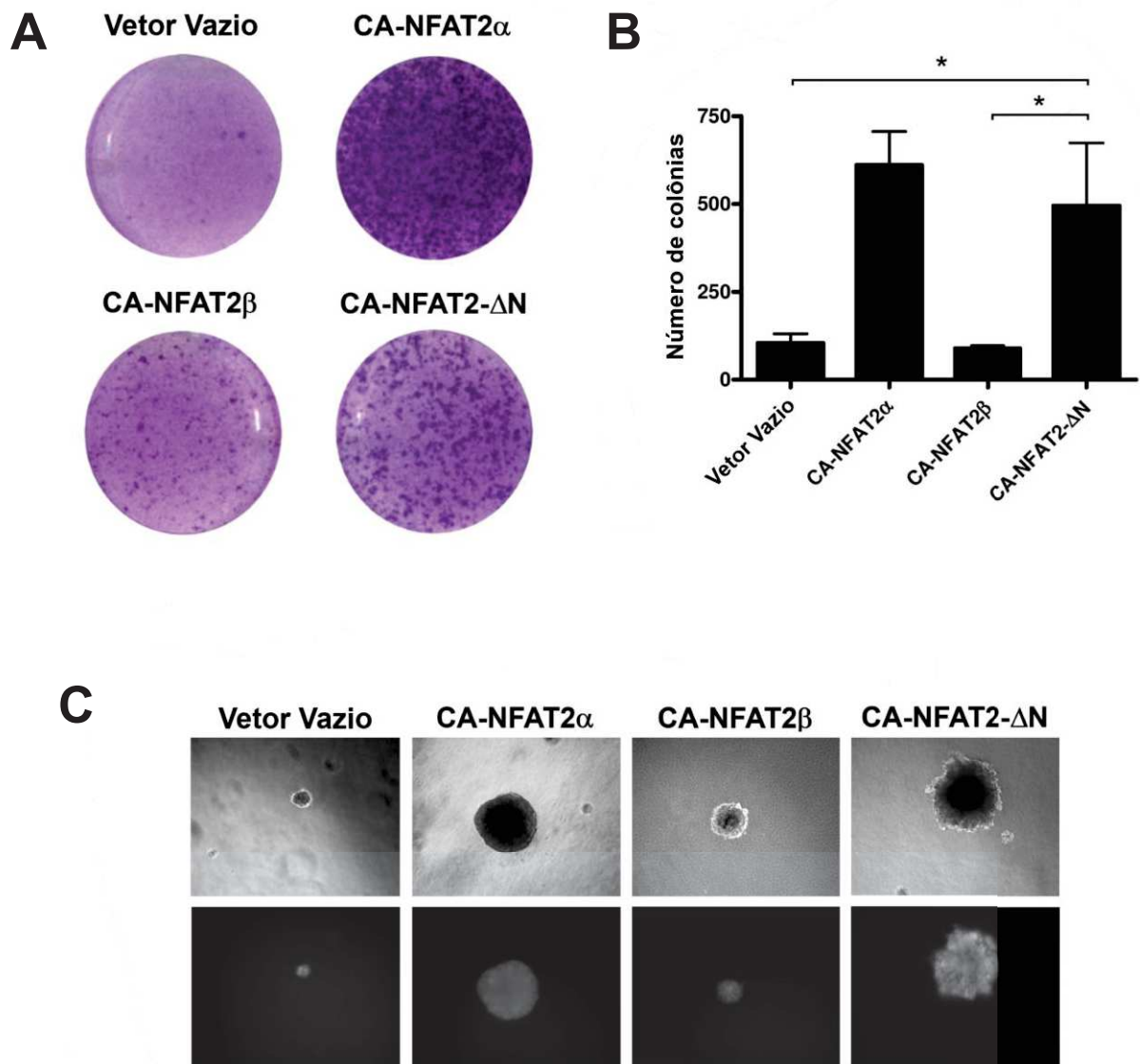


Figura 4.9. A transformação celular induzida pelas isoformas do NFAT2 não depende das porções das proteínas provenientes dos éxons 1 ou 2. As células foram transduzidas com o vetor vazio ou contendo as variantes do CA-NFAT2. A) Formação de focos. As células transduzidas foram cultivadas e marcadas por cristal violeta como na Figura 4.4. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. B) Formação de colônias em meio semi-sólido. Quantificação por contagem das colônias. Os dados são mostrados como média de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio-padrão entre os experimentos. * indica $p < 0,05$. C) Microscopia de contraste de fase (painel superior) ou de fluorescência para a expressão de EGFP (painel inferior) de colônias representativas.

Uma vez que a deleção dos 28 primeiros aminoácidos do CA-NFAT2 β aboliu a indução de morte celular, investigamos quais aminoácidos nesta região seriam responsáveis pelo fenótipo de morte celular. A porção N-terminal específica do NFAT2 β contém 7 resíduos ácidos (Asp/Glu) intercalados por resíduos hidrofóbicos, um padrão conservado em diversos domínios ácidos de ativação da transcrição (AADs – *activation acidic domains*) (TRIEZENBERG, 1995). Um alinhamento entre o N-terminal do NFAT2 β e outros três membros da família NFAT (NFAT1, NFAT3 e NFAT4) mostra a conservação de alguns resíduos ácidos e resíduos hidrofóbicos (Fig. 4.10A). Estes resíduos conservados não estão presentes no N-terminal do NFAT2 α (Fig. 4.10A). Para estudar a importância deste domínio conservado na indução de morte celular, construímos três proteínas truncadas que perdem os resíduos de aminoácido 1-8, 1-19 ou 9-19, nomeadas respectivamente como CA-NFAT2 β - Δ 1-8, CA-NFAT2 β - Δ 1-19 e CA-NFAT2 β - Δ 9-19 (Fig. 4.10B). Estas proteínas foram produzidas em células NIH3T3 (Fig. 4.10C) e observamos se a perda do domínio ácido conservado afetaria a indução de morte celular. A análise de conteúdo sub-G₀ demonstrou que as proteínas truncadas que perdem o domínio ácido (CA-NFAT2 β - Δ 1-19 e CA-NFAT2 β - Δ 9-19) não são capazes de induzir morte celular em fibroblastos NIH3T3 (Fig. 4.11). No entanto, corroborando a importância do domínio ácido para indução da morte celular, a deleção dos 8 primeiros resíduos de aminoácido, que não compreendem o domínio conservado, não foi suficiente para abolir a morte celular (Fig. 4.11). Esses dados mostraram que o domínio ácido N-terminal do NFAT2 β é essencial para indução de morte celular.

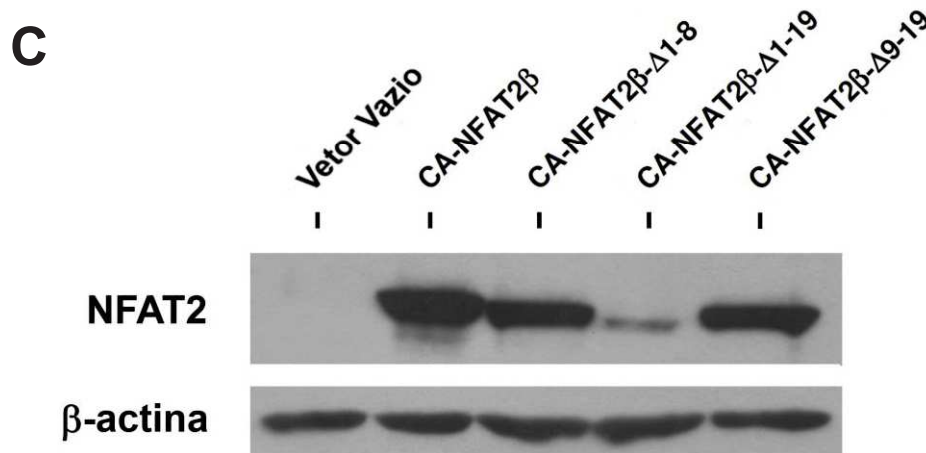
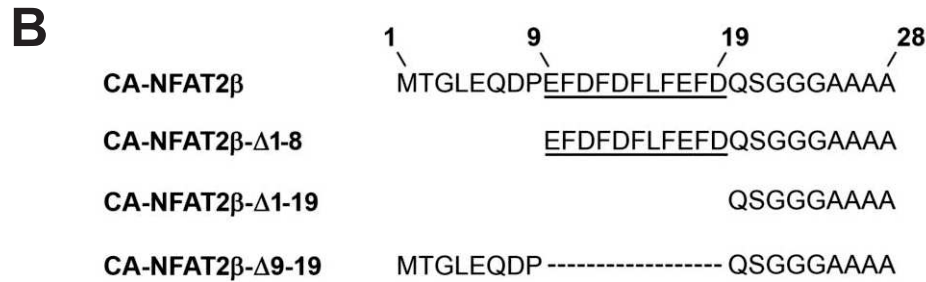
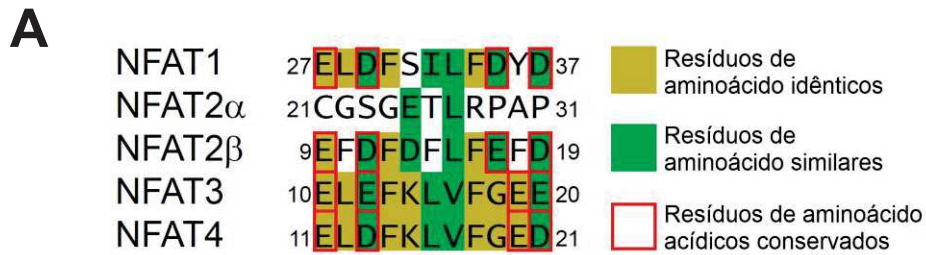


Figura 4.10. Representação esquemática das diferentes proteínas CA-NFAT2 β truncadas. A) Alinhamento entre as regiões N-terminais das proteínas NFAT. Os aminoácidos codificados pelo primeiro exón de cada gene da família NFAT foram alinhados usando o *software* ClustalW. Na figura está mostrado o domínio ácido que apresenta conservação entre NFAT2 β , NFAT1, NFAT3 e NFAT4, mas não está presente no NFAT2 α . As posições dos aminoácidos estão indicadas. B) Representação da sequência do N-terminal das variantes truncadas do CA-NFAT2 β . O domínio ácido está sublinhado. C) *Western blotting* para análise dos níveis das proteínas CA-NFAT2 em células NIH3T3 transduzidas.

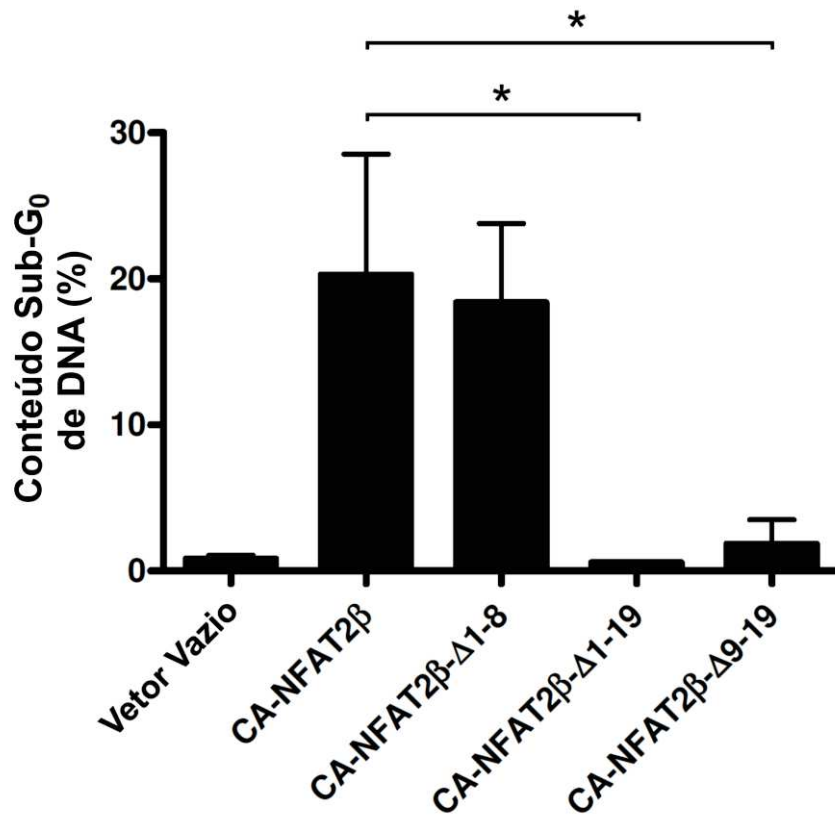


Figura 4.11. A indução de morte celular pelo CA-NFAT2 β depende do domínio ácido N-terminal. Análise de morte celular em células NIH3T3 expressando as diferentes proteínas CA-NFAT2. A análise do conteúdo sub-G₀ de DNA foi realizada como na Figura 4.3. Os dados são mostrados como média de 3 experimentos independentes e as barras indicam o desvio-padrão entre os experimentos. * indica $p < 0,05$.

A função e a estrutura de domínios ácidos de ativação da transcrição foram previamente descritos em ensaios de único-híbrido com um domínio ácido artificial (GINIGER e PTASHNE, 1987). Nestes estudos foi descrito que resíduos de aminoácido ácidos intercalados com resíduos hidrofóbicos são importantes para a formação de uma alfa-hélice anfipática e ativação da transcrição. Para elucidar se resíduos de aminoácido específicos do domínio ácido do CA-NFAT2 β seriam essenciais para a função deste domínio, quatro resíduos ácidos conservados entre proteínas NFAT (Fig 4.10A) foram mutados para alanina (Glu⁹, Asp¹¹, Glu¹⁷ e Asp¹⁹; CA-NFAT2 β -Mut-Acid), um resíduo de aminoácido não-carregado (Fig. 4.12A). A proteína CA-NFAT2 β -Mut-Acid foi produzida em células NIH3T3 (Fig. 4.12B) e o fenótipo induzido por ela foi avaliado. A comparação entre células expressando as isoformas do NFAT2 ou o CA-NFAT2 β -Mut-Acid mostrou que a mutação de apenas quatro resíduos de aminoácido do domínio ácido aboliu completamente a morte celular induzida pelo CA-NFAT2 β , como observado pela análise do conteúdo sub-G₀ (Fig. 4.12C). Adicionalmente, estas mutações aumentaram o acúmulo de células em cinéticas de proliferação, levando as células NIH3T3 a proliferar acima da confluência (Fig. 4.12D), sugerindo que, além abolir a morte celular, a mutação do domínio ácido também levaria ao aumento da transformação celular induzida pelo NFAT2. Análises de transformação celular demonstraram que o CA-NFAT2 β -Mut-Acid permite a formação de um número maior de focos em cultura se comparado ao fenótipo induzido pelo CA-NFAT2 β (Fig. 4.13A). O CA-NFAT2 β -Mut-Acid levou ainda à formação de um elevado número de colônias de grande volume em meio semi-sólido (Figs. 4.13B e 4.13C). Em conjunto, estes dados sugerem que os aminoácidos ácidos conservados no N-terminal diferencial do NFAT2 β são necessários para indução de morte celular e sua ablação aprimora o potencial oncogênico da proteína NFAT2 β .

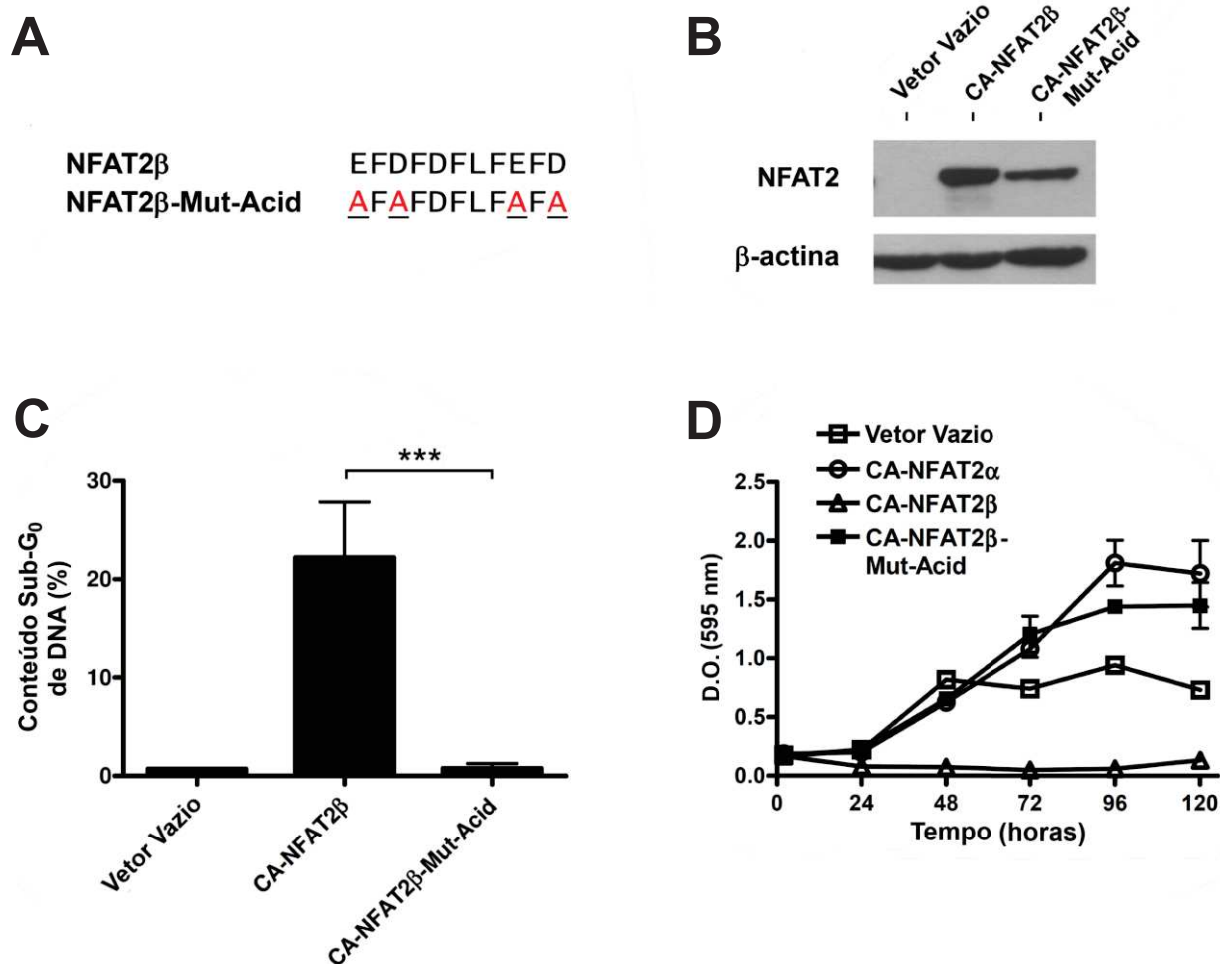


Figura 4.12. A morte celular induzida pelo CA-NFAT2 β é dependente dos aminoácidos ácidos do motivo conservado N-terminal. A) Representação dos resíduos de aminoácido mutados para construção da proteína CA-NFAT2 β -Mut-Acid. B) *Western blotting* para análise dos níveis proteicos das variantes do NFAT2 em células NIH3T3 transduzidas. C) Análise de morte celular. O conteúdo sub-G₀ foi analisado como na Figura 4.3. Média de 3 experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão entre os experimentos. *** indica $p < 0,001$. D) Ensaio de proliferação por marcação por cristal violeta. As células transduzidas foram cultivadas e marcadas por cristal violeta como na Figura 4.2. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

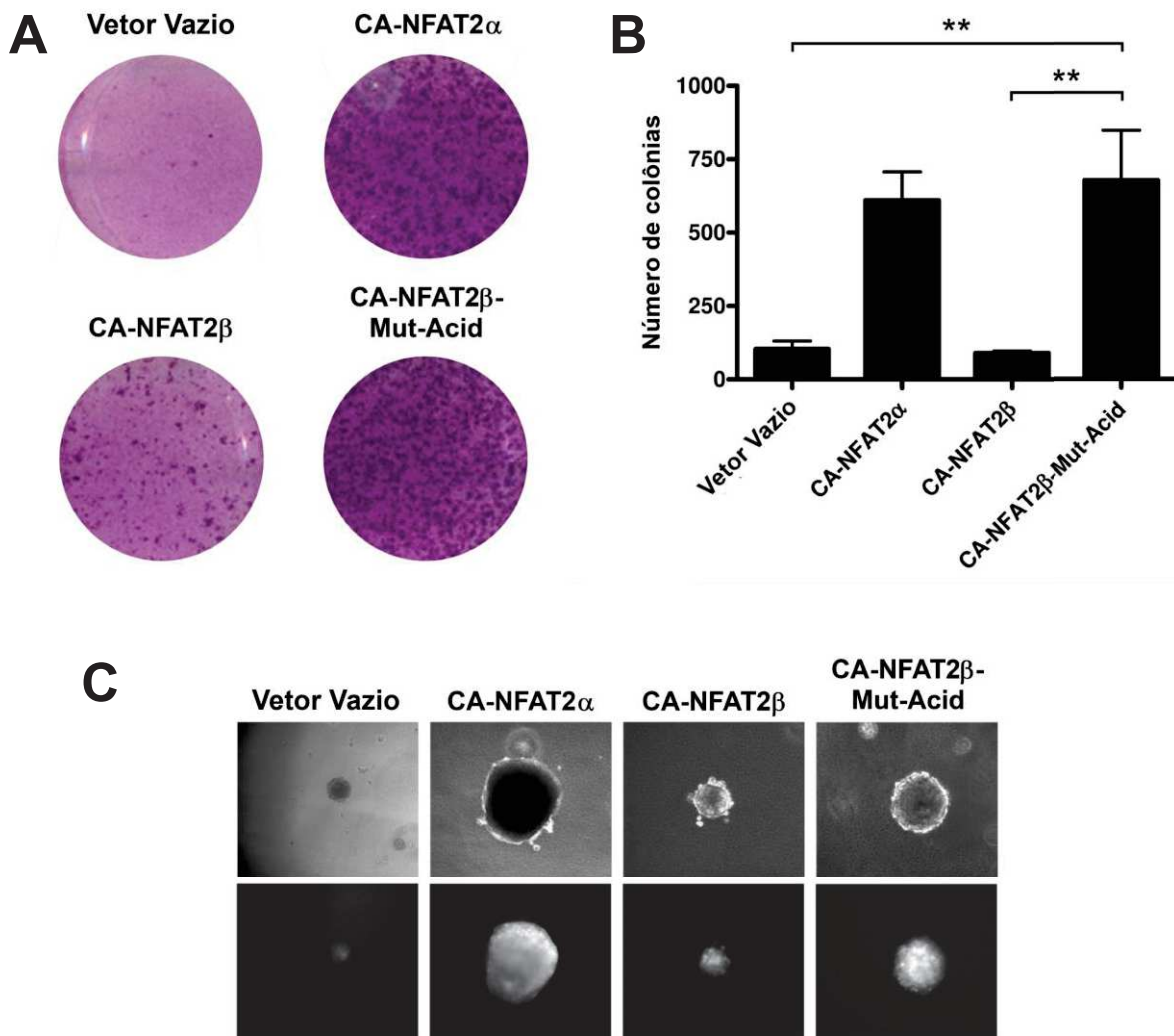


Figura 4.13. A mutação do motivo ácido aumenta o potencial de transformação celular do NFAT2 β . As células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou vetores contendo as variantes do NFAT2. A) Formação de focos. As células transduzidas foram cultivadas e marcadas por cristal violeta como na Figura 4.4. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. B) Formação de colônias em meio semi-sólido. As células transduzidas foram cultivadas como na Figura 4.5 e as colônias formadas foram contadas. Média de 3 experimentos independentes com as barras indicando o desvio-padrão entre os experimentos. ** indica $p < 0,01$. C) Microscopia de contraste de fase (painel superior) e microscopia de fluorescência (painel inferior) para visualização de colônias representativas.

4.4. O CA-NFAT2 β induz morte celular através da regulação positiva de TNF- α

Nossos dados mostraram que um domínio ácido específico do NFAT2 β era responsável pela indução de morte celular e pelos fenótipos distintos resultantes da expressão das diferentes isoformas do NFAT2. Dessa forma, nosso próximo questionamento foi sobre quais vias celulares poderiam estar sendo reguladas pelo CA-NFAT2 β para indução de morte celular. Para isso, realizamos um *screening* por PCR em tempo real para 81 genes relacionados à apoptose. Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio controle ou vetores contendo as variantes do NFAT2 e o RNA total destas células foi isolado. Uma vez que a morte celular intensa induzida pelo CA-NFAT2 β na cultura poderia interferir nos níveis totais de RNA, os RNAs foram isolados após 16h de cultivo, pois neste ponto ainda não era possível observar morte celular. Células expressando CA-NFAT2 α apresentaram aumento na expressão de nove genes avaliados (*Bcl2l10*, *Naip1*, *Fasl*, *Il10*, *Pak7*, *Tnf*, *Cd40*, *Tnfsf10* e *Cd70*) e redução na expressão de um gene (*Tnfrsf11b*), enquanto células expressando CA-NFAT2 β apresentaram aumento na expressão de sete genes (*Fasl*, *Il10*, *Pak7*, *Tnf*, *Cd40*, *Cd70* e *Trp73*) e redução na expressão de cinco genes (*Casp1*, *Casp12*, *Casp14*, *Tnfrsf11b* e *Trp63*) (Fig. 4.14A). A expressão de *Dapk1* e *Cd40lg* não foi detectada nas amostras. Dentre as alterações observadas, as principais foram nos genes *Tnf*, *Fasl*, *Pak7* e *Il10*, que codificam para as proteínas TNF- α , FasL, Pak7 e IL-10, respectivamente. Além disso, a expressão do CA-NFAT2 β levou a um aumento maior nos mRNAs de TNF- α (781 vezes), FasL (120 vezes), Pak7 (440 vezes) e IL-10 (64 vezes) do que a expressão do CA-NFAT2 α (147, 9, 66 e 45 vezes, respectivamente) (Fig. 4.14B).

As proteínas TNF- α e FasL atuam como indutores diretos de morte celular por apoptose e o aumento de seus níveis poderia explicar a indução de morte celular em fibroblastos NIH3T3. Dessa forma, avaliamos se o aumento dos níveis de TNF- α e FasL também poderia ser observado a nível proteico. Para isso, avaliamos os níveis da proteína TNF- α no meio de cultura por ELISA e da proteína FasL por marcação de superfície e citometria de fluxo. Corroborando o aumento nos níveis de mRNA, células expressando CA-NFAT2 β apresentaram um grande acúmulo de TNF- α no meio quando comparadas a células expressando CA-NFAT2 α e CA-NFAT2 β -Mut-Acid (Fig. 4.15). O promotor do gene *Tnf* apresenta vários sítios para ligação de NFAT, incluindo o elemento $\kappa 3(long)$, descrito como um sítio importante

para regulação de TNF- α por proteínas da família NFAT (TSAI *et al.*, 1996; FALVO *et al.*, 2010). Para avaliar a capacidade das variantes do NFAT2 de transativar o promotor do gene *Tnf*, utilizamos o sistema de gene repórter baseado em luciferase com a expressão controlada pelo promotor -200 pb de *Tnf* ou pelo elemento $\kappa 3$ (*long*) (Fig. 16A). O CA-NFAT2 β foi capaz de aumentar discretamente a transativação do promotor -200 pb quando comparado ao CA-NFAT2 α e CA-NFAT2 β -Mut-Acid (Fig. 16B), enquanto levou a uma grande indução do elemento $\kappa 3$ (*long*) do promotor (Fig. 16C). Com relação à proteína FasL, a marcação de superfície com anticorpo anti-FasL-PE mostrou um pequeno aumento dos níveis de FasL em células expressando as variantes do NFAT2, sendo este aumento ligeiramente maior em células expressando CA-NFAT2 β (Fig. 4.17). Para analisar se TNF- α ou FasL eram responsáveis pelo indução de morte celular em células NIH3T3, realizamos um ensaio de neutralização com anticorpos anti-TNF- α e/ou anti-FasL. Observamos que a neutralização de TNF- α inibiu em até 70% a morte celular induzida pelo CA-NFAT2 β de maneira dose-dependente (Fig. 4.18A). Em contrapartida, a neutralização de FasL não afetou a morte celular, indicando que esta não é induzida por FasL (Fig. 4.18A). Para corroborar a participação de TNF- α na indução de morte celular em células NIH3T3, incubamos células NIH3T3 selvagens com níveis crescentes de TNF- α murino recombinante. Foi observado que TNF- α foi capaz de induzir intensa morte celular em células NIH3T3 de maneira dose-dependente (Fig. 4.18B). Em conjunto, nossos dados sugerem que o CA-NFAT2 β é capaz de induzir morte celular através do aumento dos níveis da proteína pró-apoptótica TNF- α .

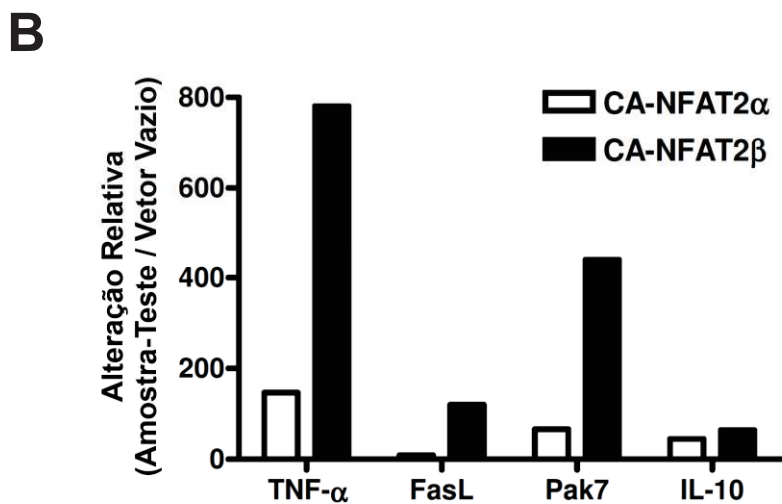
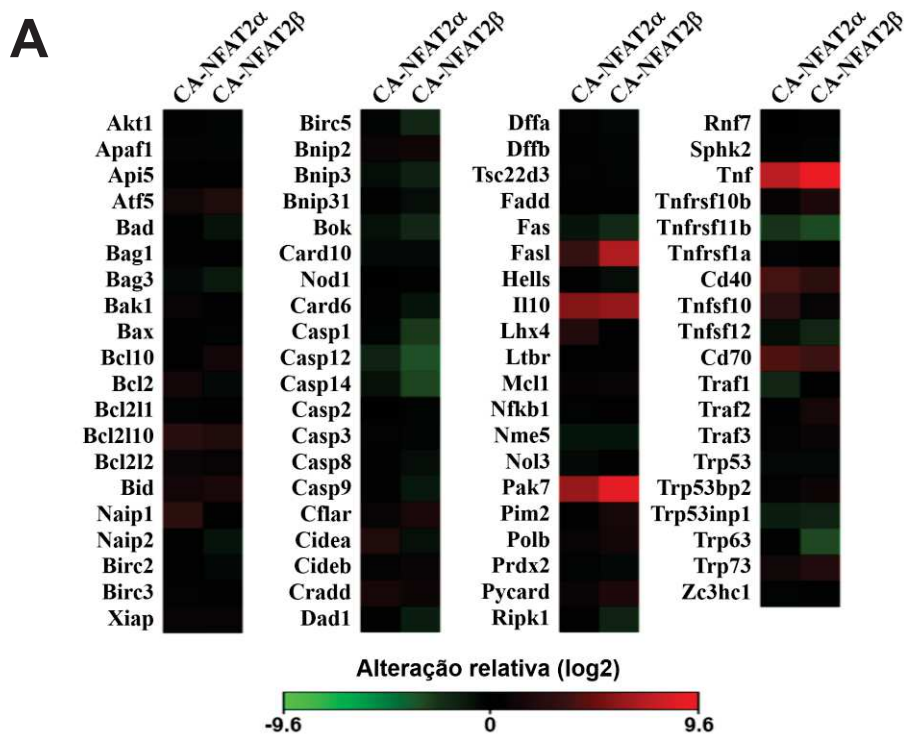


Figura 4.14. CA-NFAT2 β induz a regulação positiva de *Tnf*, *Fasl*, *Pak7* e *Il10*. *Real-time reverse transcriptase SuperArray*. Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou vetores contendo CA-NFAT2 α ou CA-NFAT2 β e os níveis de mRNA para 81 genes relacionados à apoptose foram avaliados. Os valores de indução indicados no gráfico são relativos às células transduzidas com o vetor vazio. A) *Heat map* para os 79 genes cujos níveis de mRNA foram detectados. B) Regulação relativa dos genes com as maiores alterações observadas.

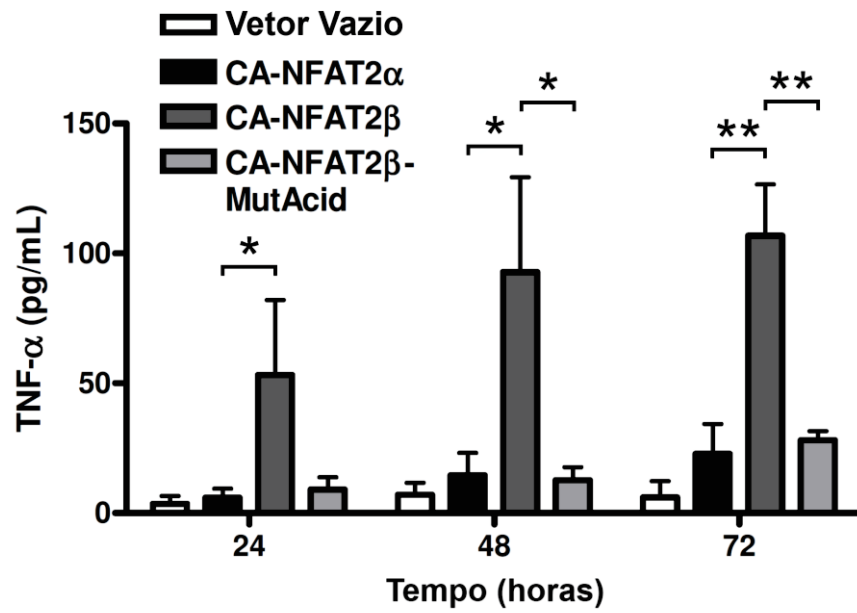


Figura 4.15. CA-NFAT2 β induz o aumento dos níveis proteicos de TNF- α . ELISA para detecção de TNF- α . Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou vetores contendo CA-NFAT2 α , CA-NFAT2 β ou CA-NFAT2 β -MutAcid. As células foram cultivadas em confluência e os níveis da proteína TNF- α no sobrenadante foram avaliados por ELISA nos tempos indicados. Os dados são mostrados como média \pm desvio-padrão de 3 experimentos independentes. * indica $p < 0,05$ e ** indica $P < 0,01$.

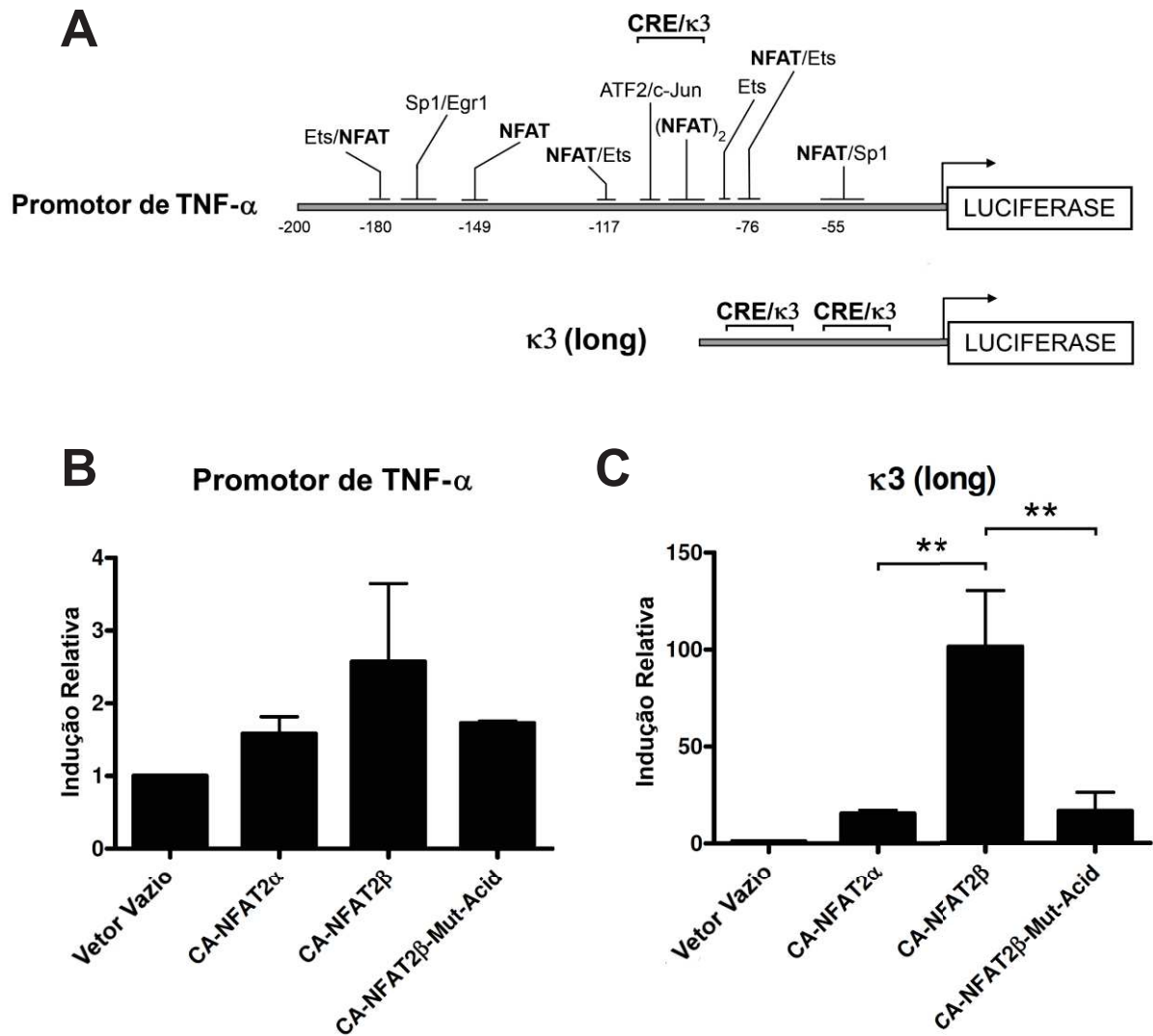


Figura 4.16. O CA-NFAT2 regula o elemento $\kappa 3$ (long) no promotor de TNF- α . Células NIH3T3 foram co-transfectadas com o respectivo plasmídeo de luciferase *firefly* e o pRL-TK (plasmídeo de renilla). Em seguida, essas células foram transduzidas com os vetores retrovirais. A) Representação esquemática do promotor de TNF- α . Os possíveis sítios de ligação de NFAT são indicados. B) Regulação do promotor de TNF- α (-200 pb). C) Regulação do elemento $\kappa 3$ (long) do promotor de TNF- α . A atividade de luciferase foi normalizada pela atividade de renilla. Os valores são relativos ao vetor vazio. Os dados são mostrados como média \pm desvio-padrão de 3 experimentos independentes. ** indica $p < 0,01$.

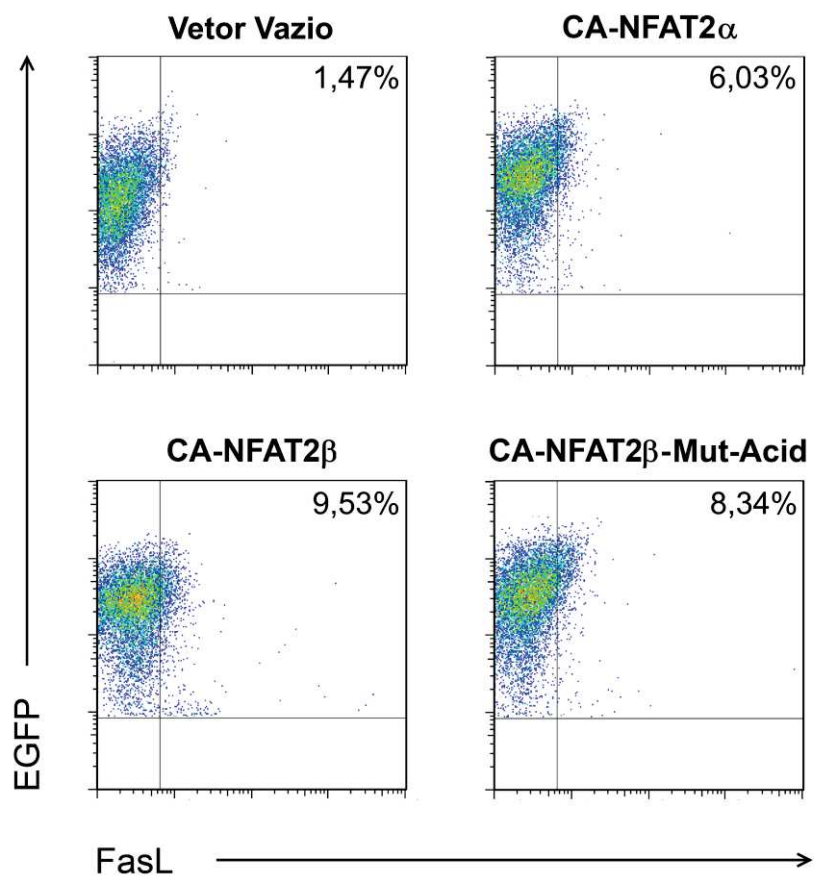


Figura 4.17. As proteínas CA-NFAT2 induzem um aumento discreto dos níveis proteicos de FasL. Marcação para FasL. Células NIH3T3 foram transduzidas com vetor vazio ou contendo as variantes do CA-NFAT2. As células transduzidas foram cultivadas em confluência e marcadas com anticorpo anti-FasL-PE após 24 h. Os níveis de FasL foram avaliados por citometria de fluxo. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

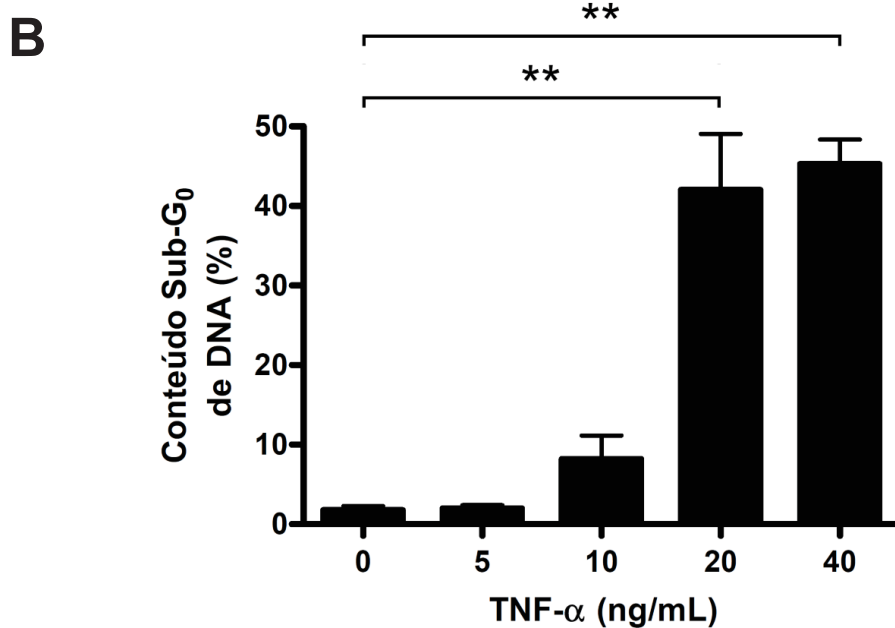
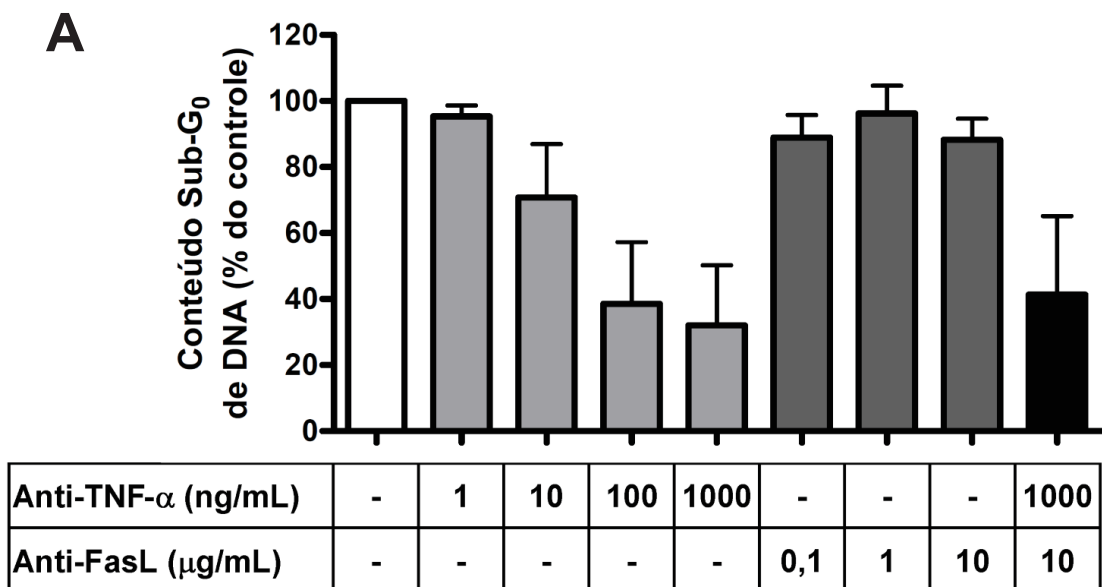


Figura 4.18. O aumento de TNF- α , mas não FasL, induz morte celular em células NIH3T3. A) Ensaio de neutralização. Células NIH3T3 transduzidas com o vetor pLIRE2-CA-NFAT2 β foram cultivadas na presença de anticorpos neutralizantes para TNF- α e/ou FasL. Os dados foram normalizados e expressos como o percentual relativo ao conteúdo sub-G₀ de DNA de células cultivadas na ausência dos anticorpos neutralizantes. Os dados são representados como média \pm desvio-padrão de 5 experimentos independentes. B) Análise de morte celular em células NIH3T3 selvagens incubadas com concentrações crescentes de TNF- α murino recombinante. Os dados são representados como média \pm desvio-padrão de 3 experimentos independentes. ** indica $p < 0,01$.

4.5. O CA-NFAT2 β induz morte celular e aumento dos níveis de FasL e TNF- α em linfócitos T CD4 $^+$ primários

Estudos anteriores demonstraram padrões de expressão específicos para as isoformas do NFAT2 (CHUVPILO *et al.*, 2002; VIHMA *et al.*, 2008; HOCK *et al.*, 2013), que sugeriam papéis diferenciais para estas proteínas. Em linfócitos não-ativados, a isoforma NFAT2 β (assim como suas variantes β/B e β/C) é predominantemente expressa, enquanto o NFAT2 α tem sua expressão aumentada após ativação celular (SHERMAN *et al.*, 1999; CHUVPILO *et al.*, 2002; SERFLING *et al.*, 2006; HOCK *et al.*, 2013). O aumento dos níveis da isoforma NFAT2 α foi associada a entrada dos linfócitos no ciclo celular e a sobrevivência celular (CHUVPILO *et al.*, 2002; HOCK *et al.*, 2013). Nossos dados em células NIH3T3 sugerem um papel pró-proliferativo para o NFAT2 α e um papel antiproliferativo e pró-apoptótico para o NFAT2 β que seriam compatíveis com os dados presentes na literatura sobre a função e o perfil de expressão das isoformas do NFAT2 em linfócitos.

Nosso modelo experimental em fibroblastos NIH3T3 mostrou funções diferenciais para as isoformas do NFAT2. Contudo, uma vez que células NIH3T3 não expressam NFAT2 de maneira endógena, avaliamos os papéis diferenciais das isoformas em outro modelo, a fim de corroborar nossos resultados. Dessa forma, utilizamos como modelo experimental linfócitos T CD4 $^+$, um modelo clássico para estudo de proteínas da família NFAT. Células T CD4 $^+$ primárias foram isoladas de camundongos C57BL/6 (*Nfat2* $^{+/+}$ *Cd4-cre* $^{-}$) ou *Nfat2* $^{fl/fl}$ *Cd4-cre* $^{+}$. Os camundongos *Nfat2* $^{fl/fl}$ *Cd4-cre* $^{+}$ são um modelo que apresenta células T deficientes para o gene *Nfat2* (VAETH *et al.*, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2015), permitindo o estudo de isoformas específicas do NFAT2 através de transdução retroviral. As células T CD4 $^+$ primárias foram transduzidas com o vetor pRV-GFP vazio ou contendo o CA-NFAT2 α ou CA-NFAT2 β (Fig. 4.19). O vetor pRV-GFP foi utilizado nos experimentos por possuir como promotor o 5' LTR (*long terminal repeat*), que é mais ativo em linfócitos do que o promotor CMV, presente no vetor pLIREs-EGFP. De maneira similar ao pLIREs-EGFP, o vetor pRV-GFP também codifica um mRNA bicistrônico contendo a sequência para o CA-NFAT2 e para o repórter EGFP.

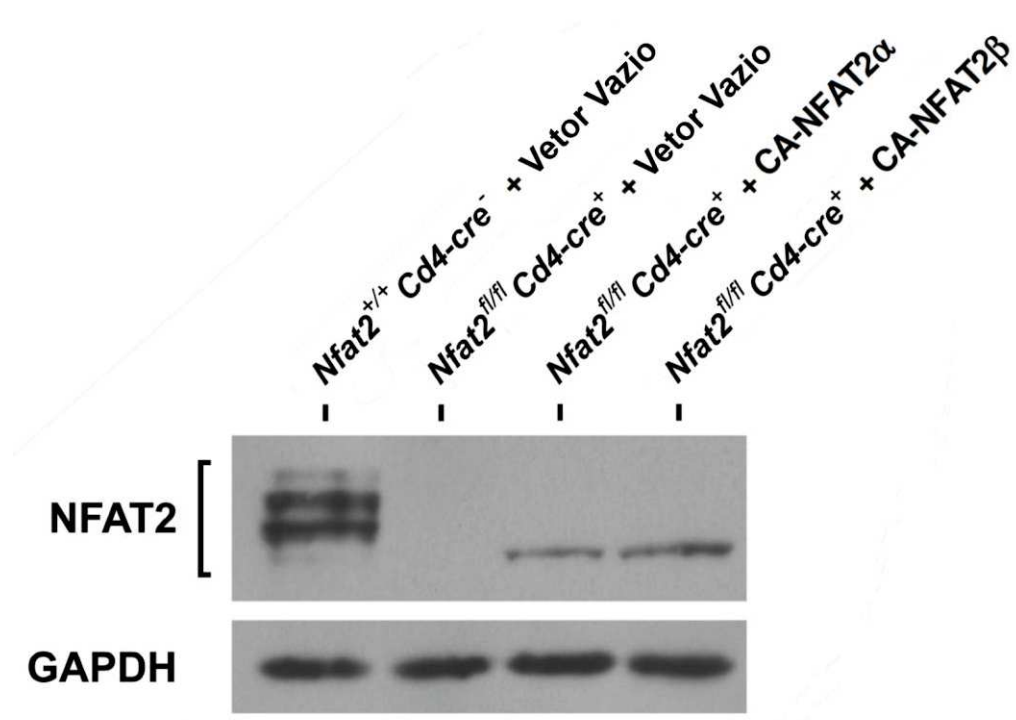


Figura 4.19. Expressão das variantes do NFAT2 em linfócitos T CD4⁺ transduzidos. *Western blotting* de células T CD4⁺ transduzidas. Células T CD4⁺ primárias foram purificadas a partir de camundongos *Nfat2*^{+/+} *Cd4-cre*⁻ (células selvagens) ou *Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ (células *Nfat2*^{-/-}) e foram transduzidas com vetor vazio ou contendo CA-NFAT2 α ou CA-NFAT2 β .

Inicialmente, o efeito das isoformas específicas do NFAT2 sobre a morte celular em linfócitos T CD4⁺ foi avaliado através da marcação com anexina-V. Enquanto células controle e células expressando CA-NFAT2 α apresentaram baixa proporção de células apoptóticas, células expressando CA-NFAT2 β mostraram um aumento da morte celular, com cerca de 39% de células apoptóticas (Fig. 4.20). A estimulação de vias de parceiros transcricionais do NFAT (como AP-1 e NF- κ B) utilizando PMA aumentou a morte celular em células expressando tanto CA-NFAT2 α quanto CA-NFAT2 β , porém células expressando CA-NFAT2 β continuaram apresentando um maior percentual de morte celular do que células CA-NFAT2 α (Fig. 4.20). Estes dados mostram que o CA-NFAT2 β também é capaz de induzir morte celular em linfócitos T CD4⁺.

Adicionalmente, analisamos se a expressão de TNF- α poderia explicar a morte celular induzida pelo CA-NFAT2 β em linfócitos T de maneira similar ao observado em fibroblastos NIH3T3. Em células T estimuladas com PMA foi observado um aumento nos níveis de TNF- α (Fig. 4.21), que poderia explicar parcialmente o aumento da morte observado após o tratamento com PMA. Contudo, não observamos níveis detectáveis de TNF- α na ausência de PMA (Fig. 4.21), indicando que TNF- α não é suficiente para explicar a morte celular observada em células T CD4⁺ não-estimuladas. Em contrapartida, células expressando CA-NFAT2 β apresentaram níveis aumentados de FasL (Fig. 4.22), que poderiam explicar a indução de morte celular em linfócitos T CD4⁺. O estímulo com PMA levou ainda a um aumento adicional nos níveis de FasL (Fig. 4.22). Estes dados sugerem que as isoformas do NFAT2 possuem papéis distintos na morte celular em linfócitos T CD4⁺, onde o CA-NFAT2 β induz um aumento da morte celular que correlaciona com regulação positiva de FasL e TNF- α .

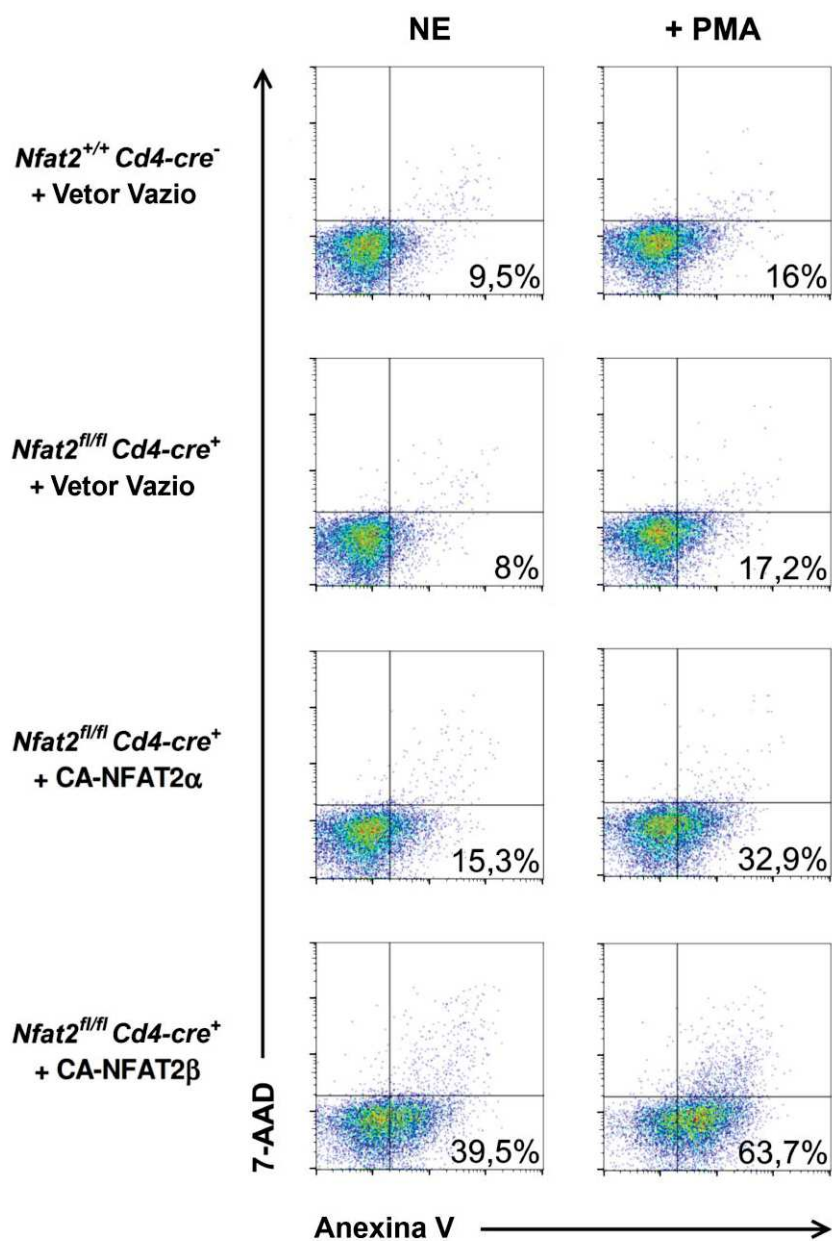


Figura 4.20. CA-NFAT2 β induz morte celular em linfócitos T CD4⁺. Análise de morte celular por marcação com anexina V e 7-AAD. Células T CD4⁺ primárias foram transduzidas com vetor vazio ou contendo CA-NFAT2 α ou CA-NFAT2 β . As células foram cultivadas na ausência (não-estimuladas, NE) ou presença de 10 nM de PMA. Depois de 6 h, a exposição de fosfatidilserina foi acompanhada por marcação com anexina V e análise por citometria de fluxo. A análise foi realizada dentro da população transduzida (EGFP⁺). O percentual de células positivas para anexina V e negativas para 7-AAD está indicado na figura. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

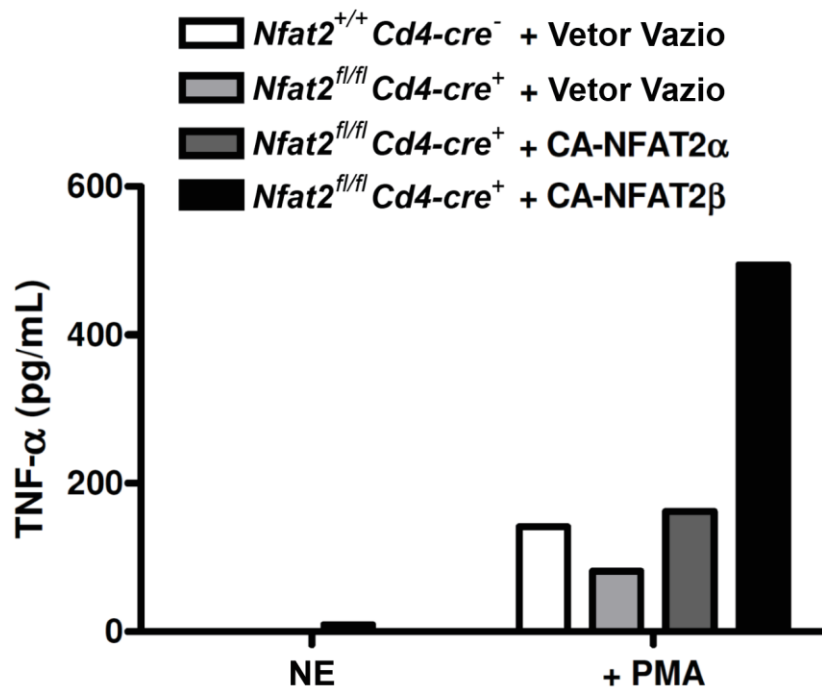


Figura 4.21. CA-NFAT2β induz aumento de TNF-α em linfócitos T CD4⁺ tratados com PMA. ELISA para TNF-α. As células transduzidas foram cultivadas por 6 h na ausência (não-estimuladas, NE) ou presença de 10 nM de PMA e o sobrenadante livre de células foi analisado para os níveis proteicos de TNF-α por ELISA. Os dados são mostrados como média de dois experimentos independentes.

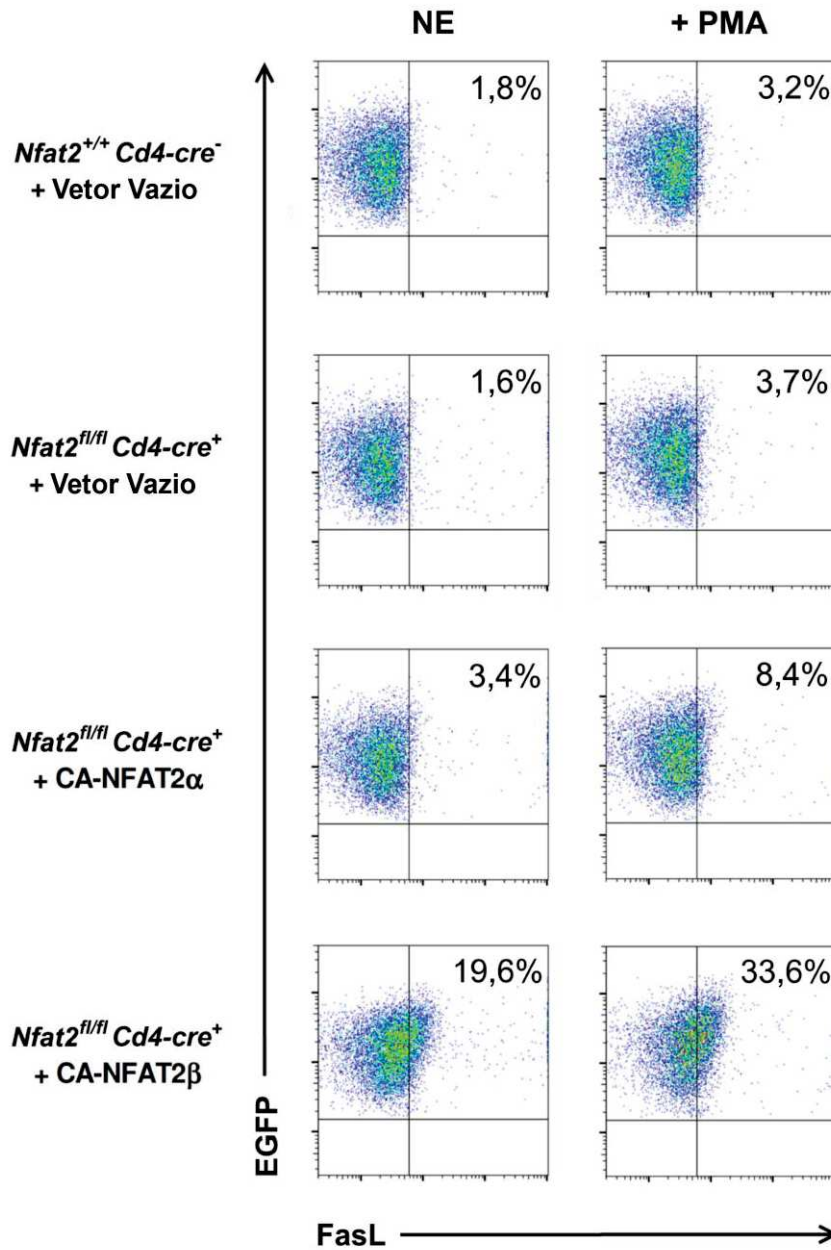


Figure 4.22. CA-NFAT2 β aumenta os níveis de FasL em linfócitos T CD4⁺. Marcação para FasL. Células T CD4⁺ primárias foram transduzidas com vetor vazio ou contendo CA-NFAT2 α ou CA-NFAT2 β . As células foram cultivadas na ausência (não-estimuladas, NE) ou presença de 10 nM de PMA por 6 h. As células foram, então, marcadas com anticorpo anti-FasL-PE e avaliadas por citometria de fluxo. A análise dos níveis de FasL foi realizada dentro da população transduzida (EGFP⁺). O percentual de células positivas para FasL está indicado na figura. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

4.6. As isoformas do NFAT2 são diferencialmente expressas em linfomas de Burkitt e linfomas difusos de grandes células B

Diversos estudos já indicaram a participação do NFAT2 na carcinogênese de tumores hematológicos (MARAFIOTI *et al.*, 2005; MEDYOUF e GHYSDAEL, 2008; PHAM *et al.*, 2010; LE ROY *et al.*, 2012). Uma vez que nossos dados sugerem papéis diferenciais para as isoformas do NFAT2 na transformação e na morte em células NIH3T3 e na morte em células T CD4⁺, investigamos os perfis de expressão destas isoformas em linhagens celulares tumorais e tumores humanos a fim de reforçar um papel específico das isoformas do NFAT2 na tumorigênese. Para isso, analisamos inicialmente três linhagens tumorais hematológicas: Jurkat (leucemia de células T), 697 (leucemia de células pré-B) e Raji (linfoma de Burkitt).

Células Jurkat e 697 apresentaram níveis similares de mRNA para as isoformas NFAT2 α e NFAT2 β , enquanto células Raji mostraram níveis aumentados de NFAT2 α quando comparados aos níveis de NFAT2 β (Fig. 4.23A). A estimulação com ionomicina e PMA levou ao aumento de NFAT2 α nas três linhagens analisadas (Fig. 4.23B). Uma vez que observamos níveis aumentados de NFAT2 α em células Raji, avaliamos se isto se refletia no tipo tumoral do qual estas células foram isoladas. Sendo assim, analisamos o perfil de expressão das isoformas do NFAT2 em linfomas de Burkitt obtidos a partir de pacientes. Todas as sete amostras de linfomas de Burkitt analisadas mostraram altos níveis de NFAT2 α quando comparados aos níveis de NFAT2 β na mesma amostra (Fig. 4.24). Este perfil é bastante distinto do perfil observado em células mononucleares de sangue periférico obtidas a partir de dez doadores saudáveis, onde observamos menores níveis de NFAT2 α do que de NFAT2 β (Fig. 4.24). Estes dados apontam para um aumento específico da isoforma NFAT2 α em linfomas de Burkitt, o que é compatível com o possível papel pró-tumorigênico desta isoforma.

Com objetivo de corroborar os resultados observados em linfomas de Burkitt, analisamos também dados de RNA-Seq de 48 amostras de linfoma difuso de grandes células B disponíveis no banco de dados TCGA. Para comparação com tecidos normais, foram utilizados dados de RNA-Seq de 104 amostras normais de baço disponíveis no banco de dados GTEx (GTEx-CONSORTIUM, 2013). Nossas análises mostraram que as amostras de DLBCL apresentam níveis aumentados de NFAT2 quando comparadas a amostras normais de baço (Fig. 4.25A). Para avaliar a

expressão específica das isoformas NFAT2 α e NFAT2 β utilizamos a contagem de fragmentos alinhados nas junções éxon 1 – éxon 3 (NFAT2 α) e éxon 2 – éxon 3 (NFAT2 β) do gene do NFAT2. Amostras de baço apresentaram contagens menores da junção éxon 1 – éxon 3 do que da junção éxon 2 – éxon 3, sugerindo menores níveis de NFAT2 α em relação ao NFAT2 β (Fig. 4.25B). Em contrapartida, as amostras de DLBCL apresentaram um aumento na contagem da junção éxon 1 – éxon 3 (Fig. 4.25B), sugerindo um aumento dos níveis de NFAT2 α em relação às amostras normais de baço e em relação aos níveis do NFAT2 β . Além disso, a comparação entre os níveis totais de NFAT2 e os níveis das isoformas mostrou que ambas as isoformas apresentam fraca correlação com os níveis de expressão do gene em amostras de baço (Figs. 4.26A e 4.26B). Porém, esta mesma comparação em amostras de DLBCL mostrou forte correlação entre os níveis de expressão do NFAT2 e os níveis de NFAT2 α , mas não de NFAT2 β (Figs. 4.26C e 4.26D), sugerindo que o aumento na expressão de NFAT2 em DLBCL se dá especificamente pelo aumento da expressão da isoforma NFAT2 α . Em conjunto, estes dados sugerem que a isoforma pró-tumorigênica NFAT2 α poderia participar do processo de carcinogênese de linfomas de Burkitt e de DLBCL.

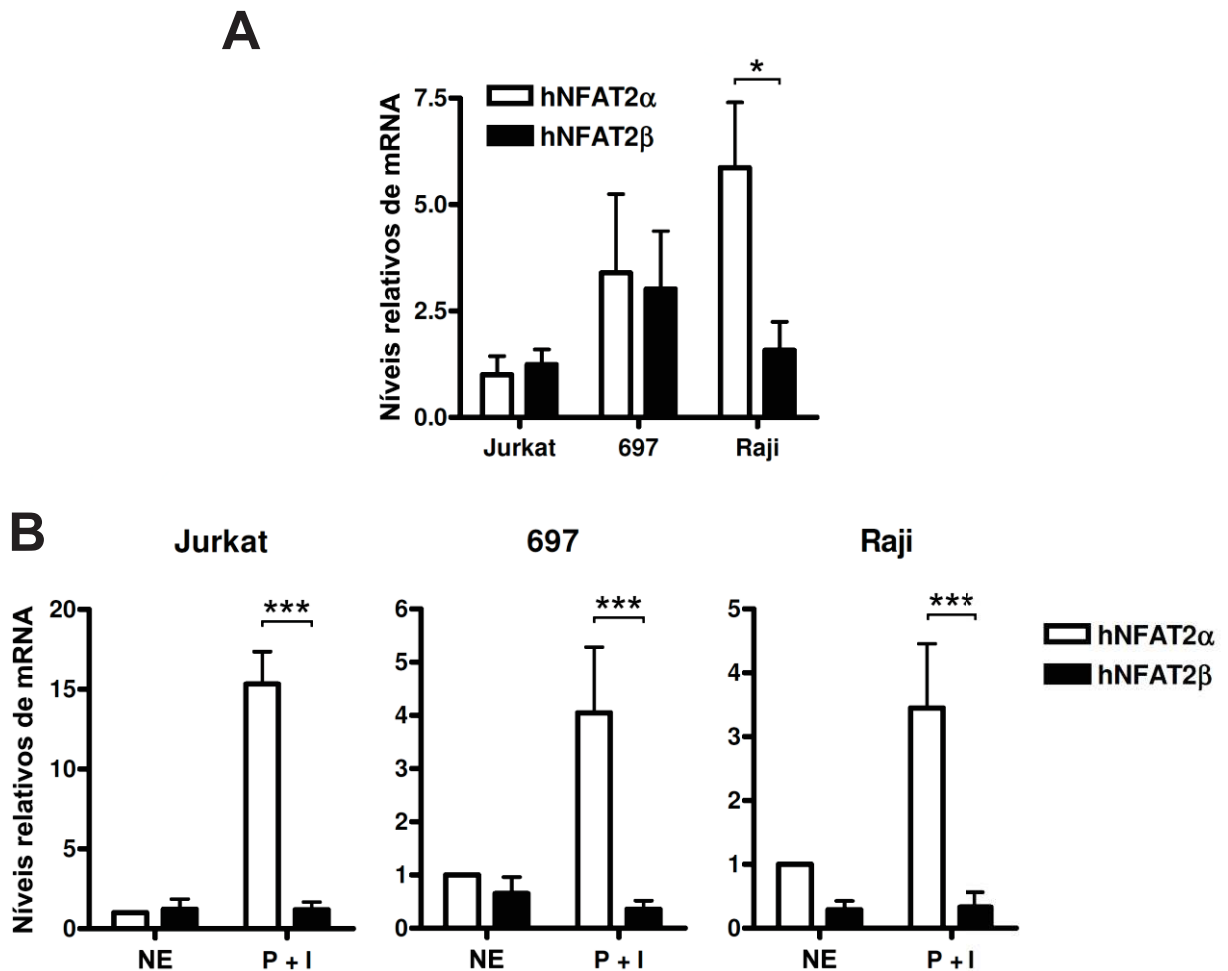


Figura 4.23. As isoformas do NFAT2 são diferencialmente expressas em linhagens tumorais humanas. Os RNAs totais das linhagens tumorais (3×10^6 células) foram isolados e os níveis de expressão das isoformas do NFAT2 humano (hNFAT2) foram avaliados por RT-PCR em tempo real usando *SYBR green master mix*. Os valores foram normalizados pelos níveis de mRNA dos genes *housekeeping* PGK1 e TBP. A) Comparação entre os níveis das isoformas do NFAT2 em diferentes linhagens tumorais. Os valores são relativos aos níveis de hNFAT2 α em células Jurkat. As barras indicam o desvio padrão entre pelo menos 3 experimentos independentes. * indica $p < 0,05$. B) Análise dos níveis de NFAT2 após estímulo. As linhagens celulares foram tratadas com PMA (10 nM) mais ionomicina (1 μ M) por 4 h (P + I). Os valores são relativos aos níveis de hNFAT2 α em células não-estimuladas (NE). Os dados são mostrados como média \pm desvio-padrão de quatro experimentos independentes. *** indica $p < 0,001$.

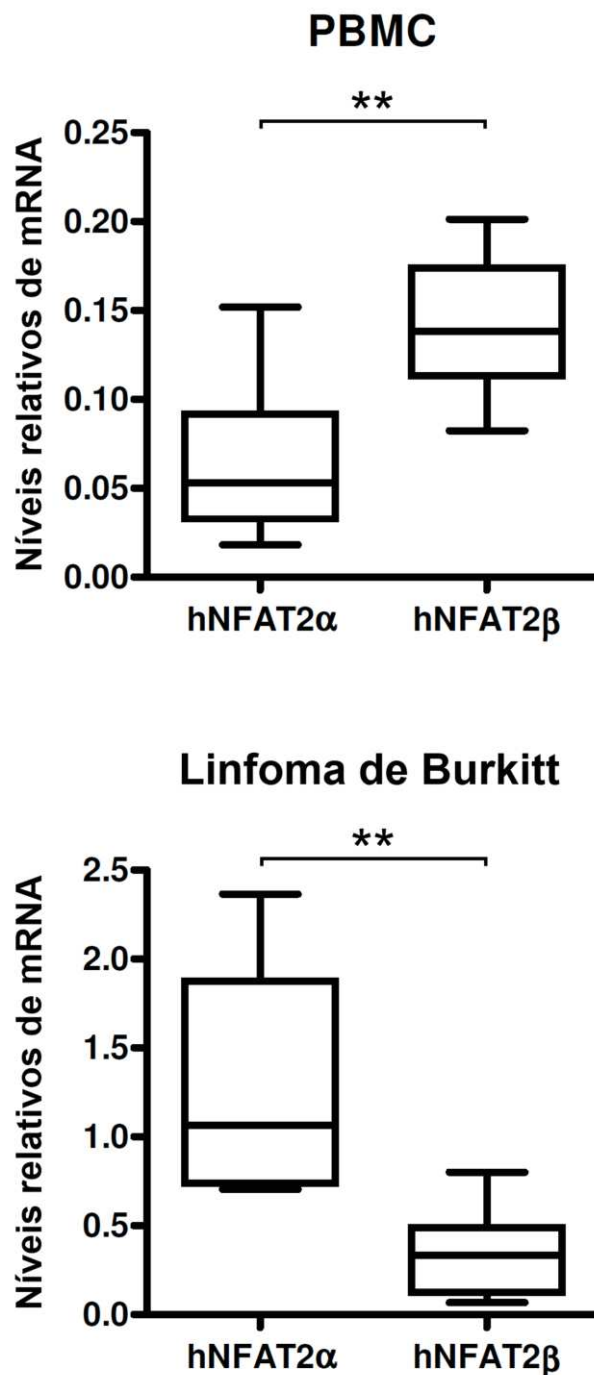


Figura 4.24. As isoformas do NFAT2 são diferencialmente expressas em linfomas de Burkitt. Os RNAs totais de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) ou amostras de linfoma de Burkitt extraída de blocos de parafina foram isolados. Os níveis de expressão das isoformas do NFAT2 humano (hNFAT2) foram avaliados por RT-PCR em tempo real usando *SYBR green master mix*. Foram comparados os níveis de expressão de NFAT2 α e NFAT2 β em PBMCs de doadores saudáveis (n=10) ou em amostras de linfoma de Burkitt (n=7). Os valores são relativos aos níveis dos mRNAs dos genes *housekeeping* (PGK1 and TBP). ** indica $p < 0,01$.

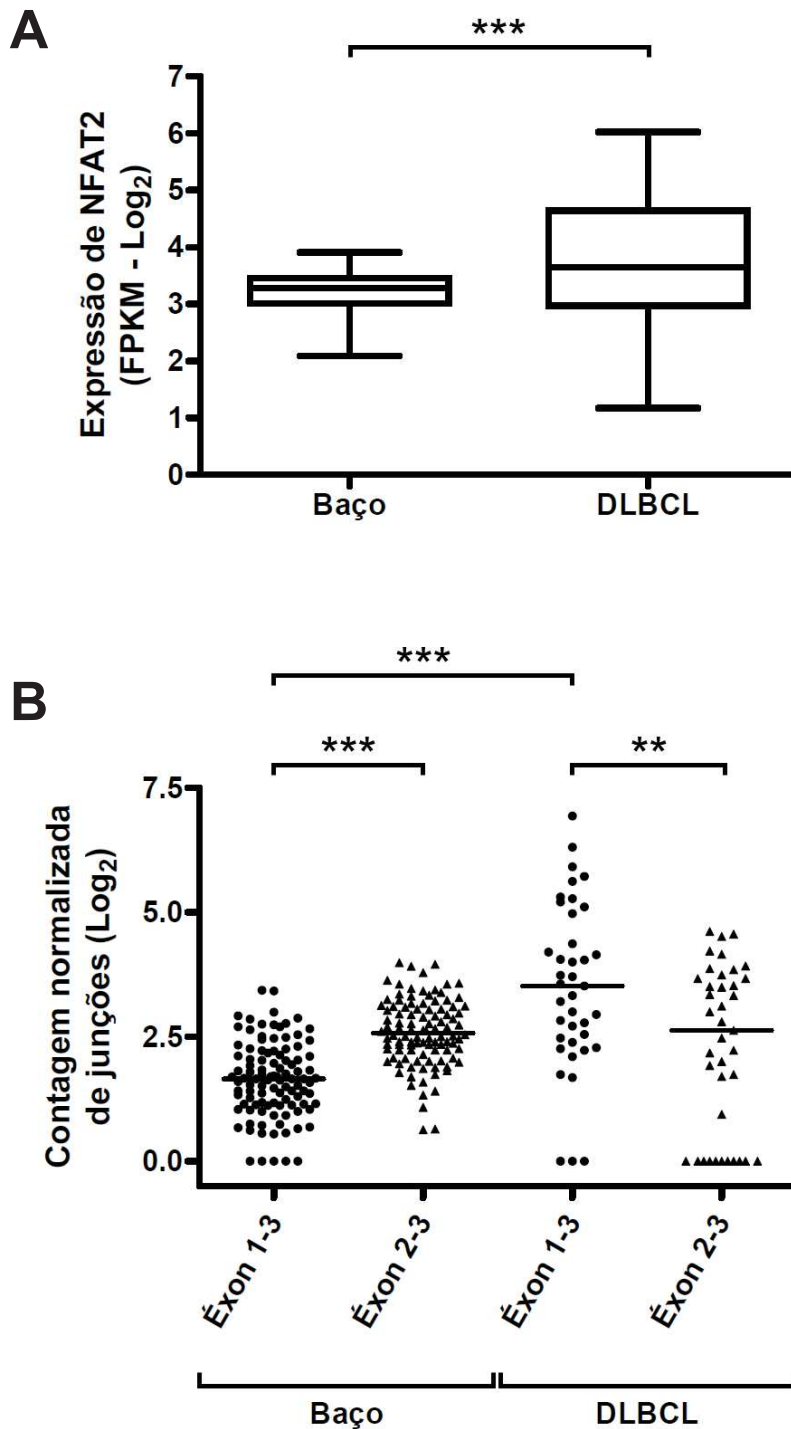


Figura 4.25. As isoformas do NFAT2 são diferencialmente expressas em DLBCL. Dados de RNA-Seq de amostras normais de baço e de linfomas difusos de grandes células B (DLBCL) foram obtidos a partir dos bancos de dados GTEx e TCGA, respectivamente. A) Expressão gênica de NFAT2 nas amostras de baço (n=104) e de DLBCL (n=48) pela análise do valor de FPKM (*fragments per kilobase of exon per million reads mapped*). *** indica $p < 0,001$. B) A quantificação das junções éxon 1 – éxon 3 e éxon 2 – éxon 3 foi usada para avaliar, respectivamente, o nível de expressão das isoformas NFAT2 α e NFAT2 β nas amostras de baço (n=104) e de DLBCL (n=39). As barras horizontais indicam a mediana de cada grupo. ** indica $p < 0,01$ e *** indica $p < 0,001$.

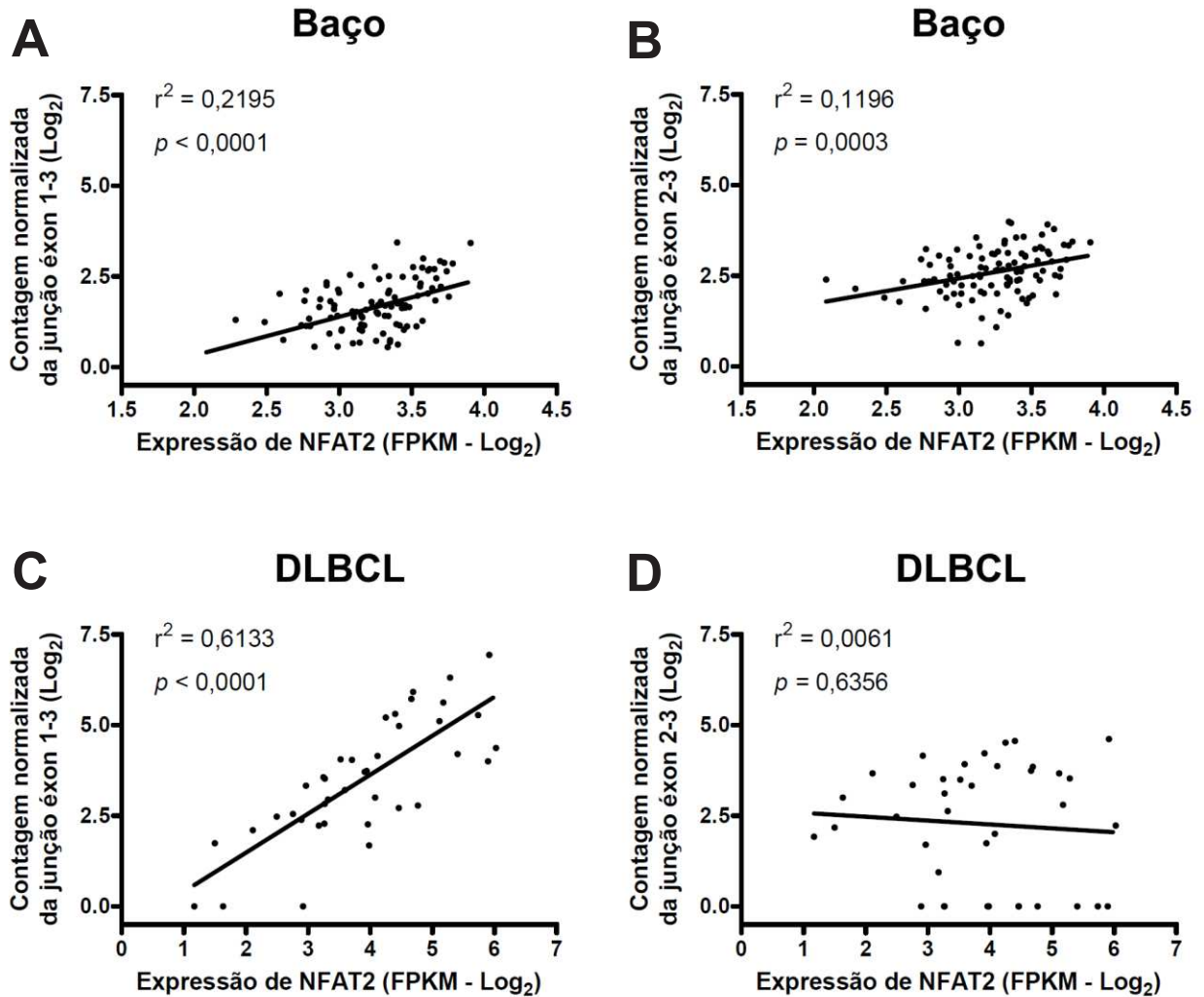


Figura 4.26. O nível de expressão do gene do NFAT2 em DLBCL correlaciona especificamente com a expressão da isoforma NFAT2 α . Dados de RNA-Seq de amostras normais de baço e de linfomas difusos de grandes células B (DLBCL) foram obtidos a partir dos bancos de dados GTEx e TCGA, respectivamente. Os níveis de expressão do NFAT2 foram comparados aos níveis de cada isoforma. A e B) Correlação entre os níveis totais de NFAT2 e os níveis das isoformas NFAT2 α (contagem da junção éxon 1-3) e NFAT2 β (contagem da junção éxon 2-3) em amostras normais de baço (n=104). C e D) Correlação entre os níveis totais de NFAT2 e os níveis das isoformas NFAT2 α (contagem da junção éxon 1-3) e NFAT2 β (contagem da junção éxon 2-3) em amostras de DLBCL (n=39).

5. Discussão

O câncer é uma patologia originada a partir de defeitos nos mecanismos regulatórios que controlam a homeostasia celular (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado a importância das proteínas da família NFAT no processo de tumorigênese (VIOLA *et al.*, 2005; MANCINI e TOKER, 2009; MULLER e RAO, 2010; MOGNOL *et al.*, 2016). Neste trabalho foi mostrado que as isoformas curtas do fator de transcrição NFAT2, NFAT2 α e NFAT2 β , regulam diferencialmente morte e transformação celular. As isoformas do NFAT2 utilizadas neste estudo divergem apenas em sua porção N-terminal devido a presença inícios de transcrição distintos no gene do NFAT2 (Fig. 1.7).

Fibroblastos NIH3T3 expressando CA-NFAT2 α ou CA-NFAT2 β apresentaram fenótipos distintos de crescimento celular, com o CA-NFAT2 α levando as células a proliferar acima da confluência, enquanto o CA-NFAT2 β levou a uma grande redução no acúmulo de células em cultura (Fig. 4.2) pela indução de morte celular através da regulação positiva de TNF- α (Figs. 4.3, 4.14-16 e 4.18). Ambas as isoformas foram capazes de induzir transformação celular, contudo, o CA-NFAT2 α apresentou maior potencial oncogênico do que o CA-NFAT2 β , conforme observado pela perda da inibição de crescimento mediada por contato, crescimento independente de ancoragem e formação de tumores em camundongos atímicos (Figs. 4.4-6). Uma vez que a isoforma CA-NFAT2 β é capaz de induzir intensa morte celular em fibroblastos NIH3T3, isso poderia explicar estas diferentes intensidades de transformação celular, estando a morte influenciando negativamente no processo de transformação. Portanto, provavelmente, a expressão do CA-NFAT2 β levaria a grande maioria da cultura à morte celular por apoptose, ao passo que o pequeno percentual de células sobreviventes seria composto por células transformadas. A análise da expressão de EGFP em tumores formados por células expressando CA-NFAT2 β mostra baixos níveis de EGFP se comparado aos tumores formados por células expressando CA-NFAT2 α (Fig. 4.6), sugerindo que estes tumores apresentam também baixos níveis de CA-NFAT2 β . Possivelmente, as células que apresentavam maiores níveis de CA-NFAT2 β sofriam morte celular, enquanto menores níveis de CA-NFAT2 β não induziam morte celular, mas eram suficientes para induzir a transformação.

Os fenótipos celulares induzidos pela proteína truncada CA-NFAT2- Δ N sugeriram que o domínio responsável pela indução de morte celular pelo CA-NFAT2 β está contido em seu N-terminal, em seus 28 primeiros resíduos de aminoácido. A deleção destes 28 resíduos foi suficiente para abolir completamente a morte celular induzida pela isoforma CA-NFAT2 β (Fig. 4.8). Dentre esta região de 28 aminoácidos está contido um domínio ácido conservado entre outros membros da família NFAT, porém ausente no NFAT2 α (Fig. 4.10). A construção das proteínas truncadas CA-NFAT2 β - Δ 1-8, CA-NFAT2 β - Δ 1-19 e CA-NFAT2 β - Δ 9-19 mostrou que o domínio ácido N-terminal conservado é necessário para indução de morte celular pelo NFAT2 β (Fig. 4.11). Adicionalmente, nossos dados demonstraram que os aminoácidos ácidos no domínio N-terminal são fundamentais para sua função na morte celular, uma vez que a mutação de apenas quatro destes resíduos é suficiente para abolir este fenótipo em células NIH3T3 (Fig. 4.12). As mutações no domínio ácido ainda aumentaram o potencial oncogênico do CA-NFAT2 β , intensificando o fenótipo de transformação em células NIH3T3 (Fig. 4.13). Os resíduos de aminoácido provenientes dos éxons 1 e 2 do gene do NFAT2 não se mostraram essenciais para a atividade oncogênica do NFAT2, já que a proteína CA-NFAT2- Δ N também foi capaz de induzir um fenótipo de transformação celular (Fig. 4.9). Dessa forma, a capacidade do NFAT2 de levar à transformação celular é conferida pela região comum entre as isoformas NFAT2 α e NFAT2 β .

Corroborando os dados observados em fibroblastos NIH3T3, as isoformas do NFAT2 apresentaram papéis diferenciais na morte celular em linfócitos T CD4⁺ primários, onde o CA-NFAT2 β também foi capaz de induzir um aumento da morte celular (Fig. 4.20). Este aumento da morte celular foi correlacionado com um aumento dos níveis da proteína pró-apoptótica FasL (Fig. 4.22). O CA-NFAT2 β também foi capaz de levar a uma regulação positiva de TNF- α , porém somente em células estimuladas com PMA (Fig. 4.21), o que sugere que a regulação de TNF- α pelo NFAT2 β em linfócitos pode depender da cooperação com outros fatores de transcrição (como AP-1 e NF- κ B).

Por fim, mostramos que linfomas de Burkitt e DLBCL apresentam níveis aumentados de NFAT2 α (Figs. 4.23-26). Este perfil de expressão das isoformas do NFAT2 difere do observado em células normais e é compatível com o possível papel pró-proliferativo do NFAT2 α .

Atualmente, papéis diferenciais de isoformas das proteínas NFAT são pouco conhecidos. Dentre os estudos presentes na literatura, poucos avaliaram papéis diferenciais entre membros da família NFAT e, menos ainda, entre isoformas de um mesmo membro. Entretanto, a expressão diferencial das isoformas do NFAT2 em tecidos humanos e murinos (VIHMA *et al.*, 2008) e os diferentes mecanismos de regulação da expressão do gene do NFAT2 sugerem funções distintas para estas isoformas no controle de processos celulares.

Os mecanismos de regulação do gene do NFAT2 foram bem descritos em linfócitos T e B. Em linfócitos em repouso, o NFAT2 β (assim como as isoformas longas β/B e β/C) é expresso a nível basal e permanece fosforilado no citoplasma. Com a ativação celular via TCR (em células T) ou BCR (em células B), estas isoformas são ativadas e, através de um *loop* autoregulatório no gene, levam a um grande aumento da expressão da isoforma α (CHUVPILO *et al.*, 2002; BHATTACHARYYA *et al.*, 2011; HOCK *et al.*, 2013). O aumento dos níveis de NFAT2 α foi associado à entrada no ciclo celular e à proteção contra AICD em linfócitos T e B (CHUVPILO *et al.*, 2002; BHATTACHARYYA *et al.*, 2011; HOCK *et al.*, 2013). Uma vez que, segundo nossos dados, o NFAT2 α não é capaz de induzir morte celular, é possível que o NFAT2 α possa regular genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular, porém sem ativar genes indutores de morte celular. Outra possibilidade é que, uma vez que as isoformas do NFAT2 apresentam o mesmo domínio de ligação ao DNA, o grande aumento dos níveis de NFAT2 α leve esta isoforma a ocupar regiões promotoras de genes indutores de morte celular, impedindo a ligação do NFAT2 β e, conseqüentemente, a ativação da expressão destes genes, o que poderia evitar um processo de AICD precoce durante as respostas imunes. Com o término da resposta celular em linfócitos, ocorre a redução dos níveis do NFAT2 α e as células sofrem um processo de AICD, onde já foi descrita uma grande participação do fator NFAT1 (CHUVPILO *et al.*, 2002; HOCK *et al.*, 2013). A proteína FasL tem papel fundamental na indução de AICD em linfócitos (GREEN *et al.*, 2003) e nossos dados mostraram uma correlação entre a morte celular induzida por CA-NFAT2 β em linfócitos T CD4⁺ e o aumento de FasL. Sendo assim, é possível que o NFAT2 β participe do processo de AICD através da regulação positiva de FasL.

Conforme observado em nossos resultados, o efeito diferencial mais claro das isoformas do NFAT2 analisadas ocorre na indução da morte celular em células

NIH3T3 e linfócitos T CD4⁺ (Figs., 4.3 e 4.20). As proteínas NFAT já foram descritas regulando diferentes genes relacionados com o processo de morte celular por apoptose (Fig. 1.6). Entre as diversas proteínas envolvidas na apoptose reguladas por NFAT, estão ligantes de receptores de morte celular, como TNF- α , FasL e TRAIL (Fig. 1.6). Nossos dados mostraram que o CA-NFAT2 β pode regular positivamente os níveis de TNF- α e FasL (Figs. 4.14-18, 4.21 e 4.22).

Estudos já mostraram que o fator de transcrição NFAT1 é capaz de se ligar ao promotor de TNF- α e induzir a transativação do gene, enquanto o NFAT2 não foi capaz (OUM *et al.*, 2002; KAMINUMA *et al.*, 2008). Contudo, estes trabalhos avaliaram apenas a isoforma NFAT2 α , que, segundo nossos resultados, não é capaz de induzir morte celular nem aumento significativo dos níveis proteicos de TNF- α . Ensaio de único-híbrido mostraram que o TAD-C do NFAT1 contém um forte motivo de ativação da transcrição (LUO *et al.*, 1996b). O TAD-C do NFAT1 é necessário para a transativação do gene de TNF- α e sua fusão NFAT2 α permitiu a essa isoforma transativar o gene de TNF- α em células Jurkat (KAMINUMA *et al.*, 2008) e induzir morte celular em células NIH3T3 (FAGET *et al.*, 2012). Nossos dados mostraram que o aumento dos níveis de TNF- α induzido pelo NFAT2 β é dependente do domínio ácido (Fig. 4.15). Reforçando o possível papel do NFAT2 β na regulação de TNF- α , estudos mostraram que o NFAT2 é importante para expressão de TNF- α em mastócitos (KLEIN *et al.*, 2006) e que a isoforma NFAT2 β tem seus níveis aumentados nestas células após ativação (SHERMAN *et al.*, 1999), o que sugere o NFAT2 β como a isoforma do NFAT2 responsável pela regulação de TNF- α em mastócitos. Em conjunto, estes dados indicam que a regulação de TNF- α pelas proteínas NFAT depende de elementos potentes de transativação, como o domínio TAD-C do NFAT1 (e talvez das isoformas longas do NFAT2) ou o domínio ácido presente no TAD-N do NFAT2 β .

Estudos também demonstram que as proteínas NFAT são capazes de regular a expressão de FasL de maneira direta, ligando-se ao promotor do gene e induzindo sua transativação (LATINIS *et al.*, 1997; HOLTZ-HEPPELMANN *et al.*, 1998), ou de maneira indireta, através da regulação do fator de transcrição EGR3 (RENGARAJAN *et al.*, 2000). Também já foi descrito que o NFAT2 está envolvido na expressão de FasL induzida por corticosterona em células de Leydig de rato e células tumorais de Leydig de camundongo (CHAI *et al.*, 2007; CHAI *et al.*, 2008). Contudo, nenhum destes estudos analisou isoformas específicas do NFAT2. Nossos

resultados mostraram que o CA-NFAT2 β leva ao aumento dos níveis de FasL em fibroblastos NIH3T3 (Fig. 4.17) e linfócitos T CD4⁺ (Fig. 4.22). O aumento de FasL não parece estar envolvido na morte celular em células NIH3T3 (Fig. 4.18), porém é essencial para a AICD em células T (GREEN *et al.*, 2003). Estes dados demonstram que o NFAT2 β regula ao menos dois indutores de morte celular: TNF- α e FasL. No entanto, apesar de vários dados da literatura já terem mostrado que as proteínas NFAT podem regular diretamente os genes *Tnf* e *Fasl*, ainda é necessário confirmar se o NFAT2 β possui esta capacidade.

Também foi demonstrado, em ensaios de transativação por expressão de repórter, que NFAT regula a expressão de TRAIL, um membro da família TNF de fatores pró-apoptóticos (WANG *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2006). Além disso, foi observado que o NFAT2 regula indiretamente a expressão de TRAIL (WANG *et al.*, 2011). Este trabalho mostrou que Sp1 regula negativamente o gene de TRAIL e que o NFAT2 regula positivamente a expressão gênica ao competir com Sp1 na ligação a sítios no promotor do gene em células intestinais humanas (WANG *et al.*, 2011). Uma vez que o NFAT2 pode se ligar ao promotor de TRAIL, talvez o NFAT2 β possa também aumentar a expressão do gene transativando-o diretamente a partir de seu domínio ácido.

Como citado anteriormente, a atividade do TAD-N poderia explicar os fenótipos diferenciais induzidos pelas isoformas NFAT2 α e NFAT2 β . A transativação através do N-terminal foi observada em alguns membros da família NFAT que contém o domínio ácido conservado. Foi demonstrado por ensaios de único-híbrido que os resíduos de aminoácido 5-19 do NFAT2 β , que compreendem o domínio ácido conservado, são suficientes para induzir forte transativação (HOCK e BROWN, 2003). De maneira similar, as regiões de aminoácidos 1-144 e 1-217 do NFAT1 e do NFAT3, respectivamente, mostraram alta atividade de transativação (LUO *et al.*, 1996b; YANG *et al.*, 2001). Em contrapartida, os fragmentos 1-44 e 1-106 do NFAT2 α , que não contém o domínio ácido N-terminal, foram incapazes de induzir a transativação (CHUVPILO *et al.*, 1999a; HOCK e BROWN, 2003). Além disso, foi mostrado que o N-terminal diferencial das proteínas pode ser importante para regulação da expressão de IL-4. Quando analisada a regulação do promotor do gene de IL-4 por expressão de gene repórter, o NFAT2 β foi capaz de induzir uma maior transativação deste promotor quando comparado ao NFAT2 α (HOCK e BROWN, 2003). Nossos dados mostraram que o NFAT2 β pode induzir maior

expressão do que o NFAT2 α em pelo menos quatro outros genes (*Tnf*, *Fasl*, *Pak7* e *I110*; Fig. 4.14). Em conjunto, estes dados sugerem uma relevância funcional para as diferentes isoformas do NFAT2, onde isoformas que mantenham o domínio ácido conservado poderiam induzir maior transativação a partir de seu TAD-N.

É possível também que o domínio ácido seja o responsável pela interação com outras proteínas que cooperem com o NFAT2 β , mas não com o NFAT2 α , na regulação de genes que desencadeiam o processo de apoptose. Já foi descrito que diferentes proteínas cinases podem cooperar com o N-terminal das proteínas NFAT na transativação de genes alvo (DE GREGORIO *et al.*, 2001; RAINIO *et al.*, 2002; GOMEZ-CASERO *et al.*, 2007). As cinases PKC ζ e Cot/Tpl2 são necessárias para a fosforilação de resíduos de serina específicos em um motivo de sequência SSPS da proteína NFAT1, sendo esta fosforilação essencial para a ativação da transcrição pelo TAD-N do NFAT1 (OKAMURA *et al.*, 2000; GOMEZ-CASERO *et al.*, 2007). Com relação ao NFAT2, já foi descrito que a cinase Pim1 é capaz de levar ao aumento da transativação pelo TAD-N do NFAT2 (RAINIO *et al.*, 2002). Recentemente foi mostrado ainda que as cinases Chk1 e Nek6/Nek7 (*NimA-related kinase 6/7*) e a proteína RPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*), uma adaptora da cinase mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), podem interagir com NFAT1 e NFAT2 β /C, mas não com o NFAT2 α (GABRIEL *et al.*, 2016). Um alinhamento entre as regiões N-terminais do NFAT1 e do NFAT2 mostra que o motivo SSPS do NFAT1 apresenta alinhamento com uma sequência SPS no NFAT2, sugerindo que essa sequência também possa ser alvo de fosforilação no NFAT2. O domínio ácido presente no N-terminal do NFAT1 é necessário para a interação com a proteína CK1, necessária para a refosforilação do NFAT ao término da resposta celular (OKAMURA *et al.*, 2004). Isso demonstra que o domínio ácido é capaz de levar a interação com outras proteínas. Então, elaborando um paralelo com o NFAT2 β , podemos propor a hipótese de que o domínio ácido N-terminal poderia ser necessário para a interação com alguma proteína cinase e que esta poderia estar fosforilando o motivo SPS conservado, permitindo ao NFAT2 levar a ativação da transcrição de genes envolvidos na morte celular por apoptose.

Além disso, o domínio ácido poderia interagir diretamente com outros fatores de transcrição ou co-fatores que auxiliem no recrutamento de maquinaria de transcrição ou promovam modificações epigenéticas nos genes alvo. Um estudo recente mostrou que a isoforma NFAT2 β /C, e não a isoforma NFAT2 α , é capaz de interagir com diversos fatores ou co-fatores de transcrição, como jun-B, p300,

ZBTB40 (*Zinc finger and BTB domain-containing protein 40*), FOXK2 (*forkhead box K2*), CREBBP (*CREB-binding protein*), HLTF (*helicase-like transcription factor*) e TRRAP (*transformation/transcription domain-associated protein*) (GABRIEL *et al.*, 2016). No entanto, uma vez que a proteína NFAT2 β /C utilizada nos ensaios possui um domínio TAD-C longo que está ausente no NFAT2 α , não é possível concluir se as proteínas encontradas interagem com o N-terminal diferencial do NFAT2 β ou com seu domínio TAD-C longo presente na isoforma NFAT2 β /C. O mapeamento dos aminoácidos necessários para indução de morte em fibroblastos NIH3T3 (Figs. 4.10-13) permite a busca por possíveis parceiros do NFAT2 β na regulação da expressão gênica. Utilizando os N-terminais selvagem ou mutado no domínio ácido do NFAT2 β como isca em ensaios de interação, como TAP (*Tandem Affinity Purification*) ou sistemas de duplo-híbrido, podemos buscar possíveis proteínas parceiras do NFAT2 β na indução da transativação de genes, com enfoque nos indutores de morte celular.

Em relação à transformação celular, dados da literatura já sugeriam um relevante papel da família NFAT de fatores de transcrição no processo de tumorigênese (VIOLA *et al.*, 2005; MANCINI e TOKER, 2009; MULLER e RAO, 2010; MOGNOL *et al.*, 2016). Contudo, apesar de diversos estudos apontarem para um papel do NFAT2 na transformação celular, nenhum destes investigou como as diferentes isoformas desse fator de transcrição poderiam estar regulando diferencialmente este processo.

Nossos dados mostram que, apesar de ambas as isoformas do NFAT2 induzirem transformação celular, o NFAT2 α é capaz de induzir um fenótipo mais robusto de transformação celular. Corroborando estes dados, alguns estudos mostraram que a expressão ectópica do NFAT2 α é capaz de induzir a tumorigênese em diferentes modelos experimentais. A expressão do CA-NFAT2 α foi capaz de transformar uma linhagem celular de pré-adipócitos (NEAL e CLIPSTONE, 2003) e levar ao surgimento de tumores de ovário, pele e próstata em animais transgênicos (TRIPATHI, P. *et al.*, 2014; MANDA *et al.*, 2015). Estes dados reforçam a ideia de que o NFAT2 (principalmente o NFAT2 α) atue como um oncogene, podendo participar do processo de iniciação tumoral.

Em tumores humanos, o NFAT2 já foi encontrado no núcleo em alguns em carcinomas pancreáticos, linfomas de Burkitt e DLBCL (MARAFIOTI *et al.*, 2005; BUCHHOLZ *et al.*, 2006) e ativado e com níveis aumentados em leucemias

linfocíticas crônicas (LE ROY *et al.*, 2012). Também foi observado que a ativação do NFAT2 em linhagens celulares derivadas de DLBCL e leucemia linfoblástica aguda de células T é necessária para proliferação e sobrevivência destas células (PHAM *et al.*, 2005; MEDYOUF *et al.*, 2007; PHAM *et al.*, 2010). A ativação do NFAT2 também já foi relacionada com diversos fatores que atuam no ciclo e na sobrevivência celular. Já foi demonstrado que a superexpressão do NFAT2 α é capaz de regular positivamente os genes de c-Myc e das ciclinas D1 e D2, fatores que podem contribuir para o desenvolvimento tumoral (NEAL e CLIPSTONE, 2003; BUCHHOLZ *et al.*, 2006). Adicionalmente, já foi observado que o NFAT2 também é capaz de regular outros genes que contribuem para a sobrevivência celular como CD40L, BlyS, c-FLIP e DDIAS (FU *et al.*, 2006; UEFFING *et al.*, 2008; PHAM *et al.*, 2010; IM *et al.*, 2016). Um estudo demonstrou que o NFAT2 é capaz de regular a expressão de c-Myc, CD40L e BlyS através de modificações epigenéticas em células derivadas de DLBCL (PHAM *et al.*, 2010). Estes dados mostram que o NFAT2 não só está ativado e/ou regulado positivamente em diversos tipos de tumores, como também pode regular diretamente genes fundamentais para a progressão tumoral.

Nossos resultados sugerem que o N-terminal diferencial das isoformas α e β do NFAT2 não é essencial para indução do fenótipo de transformação celular, já que a proteína CA-NFAT2- Δ N, que só apresenta os aminoácidos comuns entre essas isoformas, também foi capaz de induzir este fenótipo (Fig. 4.9). Estes dados podem ser explicados pelo domínio NHR do NFAT2, que é comum entre as isoformas utilizadas neste estudo, também ser capaz de induzir a transativação de promotores gênicos. Já foi demonstrado que os resíduos de aminoácido 113-205 do NFAT2, contidos no domínio NHR, foi capaz de induzir ativação da transcrição em ensaios de único-híbrido (AVOTS *et al.*, 1999; CHUVPILO *et al.*, 1999a). Este possível domínio de transativação presente no NHR do NFAT2 poderia ser responsável pela ativação da transcrição de genes envolvidos no processo de tumorigênese ou pela interação com proteínas parceiras que induzam a ativação da transcrição. Outra possibilidade é que o DBD do NFAT2 interaja com outros parceiros transcripcionais, como o AP-1, na regulação de genes pró-tumorigênicos. Dessa forma, aparentemente, ambas as isoformas do NFAT2 são capazes de regular proteínas envolvidas no desenvolvimento do câncer, contudo, a capacidade do NFAT2 β de regular indutores de morte celular através de seu domínio ácido N-terminal poderia restringir o potencial tumorigênico dessa isoforma.

É importante notar que isoformas do NFAT2 de expressão constitutiva (NFAT2 β , β /B e β /C), assim como o NFAT1, apresentam a capacidade de regular positivamente genes indutores de morte celular. Uma vez que as proteínas NFAT podem induzir genes pró-tumorigênicos, a regulação de genes pró-apoptóticos poderia ser importante para prevenir tumores provenientes da desregulação das proteínas da família NFAT. A existência de domínios nas proteínas da família NFAT que induzem fenótipos pró- e antitumorigênicos está de acordo com o sugerido mecanismo intrínseco de supressão tumoral, onde proto-oncogenes possuiriam sua própria maquinaria de supressão, a fim de evitar o desenvolvimento de tumores (LOWE *et al.*, 2004). Dessa forma, a presença do domínio ácido ou de domínios de transativação C-terminais nas proteínas NFAT poderiam atuar restringindo o potencial tumorigênico destas proteínas. Já a regulação transcricional do NFAT2 α poderia possuir duas funções principais. A primeira seria a possibilidade de conferir altos níveis de um membro da família NFAT em eventos fisiológicos como a proliferação de linfócitos durante as respostas imunes, formação das válvulas cardíacas, maturação de células β pancreáticas embrionárias ou diferenciação de osteoclastos e de timócitos (ZHOU *et al.*, 2005; TAKAYANAGI, 2007; GOODYER *et al.*, 2012; SERFLING *et al.*, 2012; KLEIN-HESSLING *et al.*, 2016), sem que este fator seja capaz de induzir morte celular. A segunda seria a capacidade de restringir a expressão do NFAT2 α , um fator potencialmente oncogênico, apenas aos contextos celulares necessários para sua atuação.

Como citado anteriormente, diversos estudos mostram tumores cujo NFAT2 apresenta papel importante em sua biologia, como cânceres de pâncreas, ovário, pele, cólon, próstata e pulmão (BUCHHOLZ *et al.*, 2006; TRIPATHI, M. K. *et al.*, 2014; TRIPATHI, P. *et al.*, 2014; MANDA *et al.*, 2015; IM *et al.*, 2016). Porém, dados de estudos em larga escala mostram que a proteína NFAT2 não foi detectada nos tecidos normais dos quais esses em tumores são originados (UHLEN *et al.*, 2010; UHLEN *et al.*, 2015), sugerindo que a expressão do gene do NFAT2 pode ser uma característica adquirida por estes tumores. Levando em consideração que o NFAT2 α é a isoforma do NFAT2 regulada a nível transcricional, essa poderia ser a isoforma predominantemente expressa durante o desenvolvimento destes tumores. Apesar do *loop* autorregulatório do NFAT2 ser fundamental para expressão do NFAT2 α em condições fisiológicas (SERFLING *et al.*, 2012), já foi mostrado que outros fatores de transcrição podem regular diretamente a expressão desta isoforma, como NF- κ B1/p50 e c-Rel (MUHAMMAD *et al.*, 2014). Uma vez que os

fatores de transcrição NF- κ B possuem sua atividade aumentada em diversos tumores (BAUD e KARIN, 2009; PERKINS, 2012), uma possibilidade é que esses fatores de transcrição possam induzir a expressão de NFAT2 α em tumores provenientes de tecidos que normalmente não apresentam a proteína NFAT2. O promotor P1 do gene do NFAT2 apresenta ainda sítios de ligação para os fatores de transcrição CREB, Fos e ATF2 (SERFLING *et al.*, 2012), fatores de transcrição cuja desregulação já foi associada à tumorigênese (KINJO *et al.*, 2005; MILDE-LANGOSCH, 2005; VLAHOPOULOS *et al.*, 2008).

Neste trabalho, avaliamos a expressão das isoformas do NFAT2 em linfomas de Burkitt e DLBCL, onde observamos a desregulação do perfil de expressão das isoformas do NFAT2, com um aumento dos níveis de NFAT2 α (Fig. 4.24-26). Esses resultados indicam um possível envolvimento do NFAT2 α na formação de tumores em humanos. Embora nosso estudo esteja limitado por um número pequeno de amostras, ele pode servir como direcionamento para estudos futuros com um número maior de pacientes onde sejam comparados os perfis de expressão das isoformas do NFAT2 com dados clínicos como estadiamento e invasividade do tumor, respostas aos tratamentos e sobrevida dos pacientes. Além disso, essas comparações também poderiam ser realizadas em outros tumores nos quais a participação do NFAT2 já foi descrita, como carcinomas pancreáticos (BUCHHOLZ *et al.*, 2006). Atualmente, com o crescimento dos estudos utilizando técnicas de análise de expressão gênica em larga escala, como RNA-seq, é possível avaliar os perfis de expressão das isoformas do NFAT2 em bancos de dados públicos, como o TCGA, a fim de buscar outros cânceres que apresentem aumento nos níveis de NFAT2 α e/ou redução dos níveis de NFAT2 β . Estas análises poderiam ajudar a identificar novos tumores onde o NFAT2 tenha um papel fundamental para a carcinogênese e avaliar o potencial das isoformas do NFAT2 como biomarcadores em câncer. Além disso, análises de transcriptomas permitem a correlação da expressão do NFAT2 e de suas isoformas a outros genes, a fim de investigar possíveis genes que regulem ou sejam regulados pelo NFAT2 em tumores.

Os resultados descritos neste trabalho apontam para um notável papel diferencial das isoformas do fator de transcrição NFAT2 no controle da homeostasia celular. Mostramos neste trabalho que diferentes isoformas do NFAT2 podem induzir fenótipos distintos e que os éxons alternativos de iniciação da transcrição são fundamentais para estas diferenças. Dados da literatura têm descrito que o NFAT2 pode regular morte e transformação celular, sugerindo papéis tanto pró- quanto

antiproliferativos para este fator de transcrição, gerando dados aparentemente conflitantes. Nossos dados sugerem uma possível explicação para estas funções ambíguas do NFAT2, sugerindo que o NFAT2 poderia afetar a proliferação celular de maneira positiva ou negativa de acordo com a isoforma do NFAT2 envolvida em determinado contexto celular. O papel do NFAT2 β na indução de morte celular poderia indicar ainda um possível papel supressor de tumor para esta isoforma, mas para confirmar esta hipótese são necessários experimentos adicionais onde seja observada a atuação do NFAT2 β na prevenção da iniciação tumoral ou na reversão de fenótipos de transformação celular. O entendimento de mecanismos tumorigênicos ou supressores de tumor do NFAT2 pode permitir o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas onde seja inibido o eixo tumorigênico do NFAT2 sem afetar sua contraparte antiproliferativa.

6. Conclusões

- As isoformas do NFAT2 induzem transformação celular em fibroblastos NIH3T3 com potenciais distintos;
- O CA-NFAT2 β induz morte celular em células NIH3T3 através do aumento dos níveis de TNF- α ;
- A morte celular induzida pelo CA-NFAT2 β depende de um domínio ácido presente no N-terminal;
- O CA-NFAT2 β induz morte celular e leva ao aumento dos níveis de FasL e TNF- α em linfócitos T CD4⁺ primários;
- A isoforma NFAT2 α apresenta-se em níveis aumentados em linfomas de Burkitt e linfomas difusos de grandes células B.

7. Perspectivas

- Identificar possíveis parceiros transcripcionais do NFAT2 β que interajam com seu N-terminal na regulação de genes de indução de morte celular em células NIH3T3 e analisar funcionalmente a importância desta interação;
- Clonar as isoformas longas do NFAT2 (α/B , α/C , β/B e β/C) e observar os fenótipos induzidos por estas isoformas, analisando a participação de seu domínio de transativação C-terminal neste processo;
- Analisar os perfis de expressão das isoformas do NFAT2 em outros tumores humanos e compará-los com dados clínicos dos pacientes;
- Identificar os genes que possam regular e ser regulados pelas isoformas do NFAT2 em tumores humanos.

8. Referências Bibliográficas

ABBOTT, K. L. *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.

ALIPRANTIS, A. O. *et al.* NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. **J Clin Invest**, v. 118, n. 11, p. 3775-89, Nov 2008.

AMASAKI, Y. *et al.* A constitutively nuclear form of NFATx shows efficient transactivation activity and induces differentiation of CD4(+)CD8(+) T cells. **J Biol Chem**, v. 277, n. 28, p. 25640-8, Jul 12 2002.

ARAMBURU, J. *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.

ARAMBURU, J.; HEITMAN, J.; CRABTREE, G. R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. **EMBO Rep**, v. 5, n. 4, p. 343-8, Apr 2004.

ARMSTRONG, E. J.; BISCHOFF, J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. **Circ Res**, v. 95, n. 5, p. 459-70, Sep 3 2004.

ARRON, J. R. *et al.* NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. **Nature**, v. 441, n. 7093, p. 595-600, Jun 1 2006.

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

AVOTS, A. *et al.* CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. **Immunity**, v. 10, n. 5, p. 515-24, May 1999.

BAUD, V.; KARIN, M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 1, p. 33-40, Jan 2009.

BAUMGART, S. *et al.* Inflammation-induced NFATc1-STAT3 transcription complex promotes pancreatic cancer initiation by KrasG12D. **Cancer Discov**, v. 4, n. 6, p. 688-701, Jun 2014.

BAUMGART, S. *et al.* GSK-3beta Governs Inflammation-Induced NFATc2 Signaling Hubs to Promote Pancreatic Cancer Progression. **Mol Cancer Ther**, v. 15, n. 3, p. 491-502, Mar 2016.

BAUMGART, S. *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.

BEALS, C. R. *et al.* Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. **Genes Dev**, v. 11, n. 7, p. 824-34, Apr 1 1997a.

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

BHATTACHARYYA, S. *et al.* NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin--NFAT signaling network. **J Exp Med**, v. 208, n. 4, p. 823-39, Apr 11 2011.

BLAESER, F. *et al.* Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. **J Biol Chem**, v. 275, n. 1, p. 197-209, Jan 7 2000.

BOSS, V. *et al.* The cyclosporin A-sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells. Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT-mediated transcription by phospholipase C-coupled cell surface receptors. **J Biol Chem**, v. 273, n. 31, p. 19664-71, Jul 31 1998.

BUCHHOLZ, M. *et al.* Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. **EMBO J**, v. 25, n. 15, p. 3714-24, Aug 9 2006.

CAETANO, M. S. *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.

CARNEIRO, F. R. *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. *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.

CHAI, W. R. *et al.* Mechanism of nuclear factor of activated T-cells mediated FasL expression in corticosterone -treated mouse Leydig tumor cells. **BMC Cell Biol**, v. 9, p. 31, 2008.

CHAI, W. R.; WANG, Q.; GAO, H. B. NFAT2 is implicated in corticosterone-induced rat Leydig cell apoptosis. **Asian J Androl**, v. 9, n. 5, p. 623-33, Sep 2007.

CHANG, C. P. *et al.* A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. **Cell**, v. 118, n. 5, p. 649-63, Sep 3 2004.

CHEBEL, A. *et al.* Transcriptional activation of hTERT, the human telomerase reverse transcriptase, by nuclear factor of activated T cells. **J Biol Chem**, v. 284, n. 51, p. 35725-34, Dec 18 2009.

CHEN, L. *et al.* Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. **Nature**, v. 392, n. 6671, p. 42-8, Mar 5 1998.

CHEN, Z. L. *et al.* Expression and unique functions of four nuclear factor of activated T cells isoforms in non-small cell lung cancer. **Chin J Cancer**, v. 30, n. 1, p. 62-8, Jan 2011.

CHUVPILO, S. *et al.* Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. **J Immunol**, v. 162, n. 12, p. 7294-301, Jun 15 1999a.

CHUVPILO, S. *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. *et al.* Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. **Immunity**, v. 10, n. 2, p. 261-9, Feb 1999b.

CHYTIL, M.; VERDINE, G. L. The Rel family of eukaryotic transcription factors. **Curr Opin Struct Biol**, v. 6, n. 1, p. 91-100, Feb 1996.

COCKERILL, G. W. *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.

DE GREGORIO, R. *et al.* Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 29, p. 27003-9, Jul 20 2001.

DE LA POMPA, J. L. *et al.* Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. **Nature**, v. 392, n. 6672, p. 182-6, Mar 12 1998.

DUQUE, J.; FRESNO, M.; INIGUEZ, M. A. Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. **J Biol Chem**, v. 280, n. 10, p. 8686-93, Mar 11 2005.

FAGET, D. V. *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.; TSYTSYKOVA, A. V.; GOLDFELD, A. E. Transcriptional control of the TNF gene. **Curr Dir Autoimmun**, v. 11, p. 27-60, 2010.

FISCHER, U.; JANICKE, R. U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 1, p. 76-100, Jan 2003.

FLANAGAN, W. M. *et al.* Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. **Nature**, v. 352, n. 6338, p. 803-7, Aug 29 1991.

FLOCKHART, R. J. *et al.* NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. **Br J Cancer**, v. 101, n. 8, p. 1448-55, Oct 20 2009.

FRIC, J. *et al.* NFAT control of innate immunity. **Blood**, v. 120, n. 7, p. 1380-9, Aug 16 2012.

FU, L. *et al.* Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BlyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4540-8, Jun 1 2006.

GABRIEL, C. H. *et al.* Identification of Novel Nuclear Factor of Activated T Cell (NFAT)-associated Proteins in T Cells. **J Biol Chem**, v. 291, n. 46, p. 24172-24187, Nov 11 2016.

GALLUZZI, L. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 8, p. 1093-107, Aug 2009.

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. *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.

GINIGER, E.; PTASHNE, M. Transcription in yeast activated by a putative amphipathic alpha helix linked to a DNA binding unit. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 670-2, Dec 17-23 1987.

GOMEZ-CASERO, E. *et al.* Cot/Tpl2 and PKGzeta cooperate in the regulation of the transcriptional activity of NFATc2 through the phosphorylation of its amino-terminal domain. **Cell Signal**, v. 19, n. 8, p. 1652-61, Aug 2007.

GOODYER, W. R. *et al.* Neonatal beta cell development in mice and humans is regulated by calcineurin/NFAT. **Dev Cell**, v. 23, n. 1, p. 21-34, Jul 17 2012.

GRAEF, I. A. *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.

GRAEF, I. A. *et al.* Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 657-70, May 30 2003.

GREEN, D. R.; DROIN, N.; PINKOSKI, M. Activation-induced cell death in T cells. **Immunol Rev**, v. 193, p. 70-81, Jun 2003.

GREGORY, M. A. *et al.* Wnt/Ca2+/NFAT signaling maintains survival of Ph+ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. **Cancer Cell**, v. 18, n. 1, p. 74-87, Jul 13 2010.

GTEX-CONSORTIUM. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nat Genet**, v. 45, n. 6, p. 580-5, Jun 2013.

GWACK, Y. *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.

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

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

- HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 629-34, Nov 3 1989.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, Oct 12 2000.
- HERNANDEZ, G. L. *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. *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. *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.
- HOCK, M. *et al.* NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes. **J Immunol**, v. 190, n. 5, p. 2345-53, Mar 1 2013.
- HOCK, M. B.; BROWN, M. A. Nuclear factor of activated T cells 2 transactivation in mast cells: a novel isoform-specific transactivation domain confers unique FcepsilonRI responsiveness. **J Biol Chem**, v. 278, n. 29, p. 26695-703, Jul 18 2003.
- HODGE, M. R. *et al.* Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. **Immunity**, v. 4, n. 4, p. 397-405, Apr 1996.
- HOEY, T. *et al.* Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. **Immunity**, v. 2, n. 5, p. 461-72, May 1995.
- HOGAN, P. G. *et al.* Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. **Genes Dev**, v. 17, n. 18, p. 2205-32, Sep 15 2003.
- HOGAN, P. G.; LEWIS, R. S.; RAO, A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 491-533, 2010.
- HOLTZ-HEPPELMANN, C. J. *et al.* Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. **J Biol Chem**, v. 273, n. 8, p. 4416-23, Feb 20 1998.
- HORSLEY, V. *et al.* NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. **Cell**, v. 132, n. 2, p. 299-310, Jan 25 2008.
- HUNTER, A. M.; LACASSE, E. C.; KORNELUK, R. G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. **Apoptosis**, v. 12, n. 9, p. 1543-68, Sep 2007.
- IM, J. Y. *et al.* DNA damage-induced apoptosis suppressor (DDIAS), a novel target of NFATc1, is associated with cisplatin resistance in lung cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 1, p. 40-9, Jan 2016.

IMAMURA, R. *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.

INIGUEZ, M. A. *et al.* An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. **J Biol Chem**, v. 275, n. 31, p. 23627-35, Aug 4 2000.

JAIN, J. *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.

JAIN, J. *et al.* The AP-1 site at -150 bp, but not the NF-kappa B site, is likely to represent the major target of protein kinase C in the interleukin 2 promoter. **J Exp Med**, v. 175, n. 3, p. 853-62, Mar 1 1992.

JAULIAC, S. *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.

JINNIN, M. *et al.* Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. **Nat Med**, v. 14, n. 11, p. 1236-46, Nov 2008.

KAMINUMA, O. *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.

KARPURAPU, M. *et al.* NFATc1 targets cyclin A in the regulation of vascular smooth muscle cell multiplication during restenosis. **J Biol Chem**, v. 283, n. 39, p. 26577-90, Sep 26 2008.

KARPURAPU, M. *et al.* Cyclin D1 is a bona fide target gene of NFATc1 and is sufficient in the mediation of injury-induced vascular wall remodeling. **J Biol Chem**, v. 285, n. 5, p. 3510-23, Jan 29 2010.

KAWAMURA, T. *et al.* Endothelin-1-dependent nuclear factor of activated T lymphocyte signaling associates with transcriptional coactivator p300 in the activation of the B cell leukemia-2 promoter in cardiac myocytes. **Circ Res**, v. 94, n. 11, p. 1492-9, Jun 11 2004.

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.

KINJO, K. *et al.* The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis. **Cell Cycle**, v. 4, n. 9, p. 1134-5, Sep 2005.

KLEIN-HESSLING, S. *et al.* A threshold level of NFATc1 activity facilitates thymocyte differentiation and opposes notch-driven leukaemia development. **Nat Commun**, v. 7, p. 11841, Jun 17 2016.

KLEIN, M. *et al.* Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 6667-74, Nov 15 2006.

KUNDUMANI-SRIDHARAN, V. *et al.* Nuclear factor of activated T cells c1 mediates p21-activated kinase 1 activation in the modulation of chemokine-induced human aortic smooth muscle cell F-actin stress fiber formation, migration, and proliferation and injury-induced vascular wall remodeling. **J Biol Chem**, v. 288, n. 30, p. 22150-62, Jul 26 2013.

LASSOT, I. *et al.* Trim17, a novel E3 ubiquitin-ligase, initiates neuronal apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 12, p. 1928-41, Dec 2010.

LATINIS, K. M. *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.

LE ROY, C. *et al.* The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 120, n. 2, p. 356-65, Jul 12 2012.

LEHEN'KYI, V. *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.

LEVIN-GROMIKO, U. *et al.* Amplified lipid rafts of malignant cells constitute a target for inhibition of aberrantly active NFAT and melanoma tumor growth by the aminobisphosphonate zoledronic acid. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 11, p. 2555-66, Nov 2014.

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.

LIU, J. *et al.* Two independent calcineurin-binding regions in the N-terminal domain of murine NF-ATx1 recruit calcineurin to murine NF-ATx1. **J Immunol**, v. 162, n. 8, p. 4755-61, Apr 15 1999.

LIU, X. *et al.* DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 175-84, Apr 18 1997.

LIU, Y. *et al.* Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling. **Oncogene**, v. 25, n. 41, p. 5640-7, Sep 14 2006.

LOH, C. *et al.* T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 7, p. 3945-54, Jul 1996a.

LOH, C. *et al.* Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. **J Biol Chem**, v. 271, n. 18, p. 10884-91, May 3 1996b.

LOPEZ-RODRIGUEZ, C. *et al.* NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 13, p. 7214-9, Jun 22 1999.

- LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 307-15, Nov 18 2004.
- LUO, C. *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.
- LUO, C. *et al.* Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 17, p. 8907-12, Aug 20 1996c.
- 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.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends Biochem Sci**, v. 30, n. 11, p. 630-41, Nov 2005.
- MANCINI, M.; TOKER, A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 11, p. 810-20, Nov 2009.
- MANDA, K. R. *et al.* NFATc1 promotes prostate tumorigenesis and overcomes PTEN loss-induced senescence. **Oncogene**, Oct 19 2015.
- MARAFIOTI, T. *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.
- MARTINEZ, G. J. *et al.* The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 265-78, Feb 17 2015.
- MASUDA, E. S. *et al.* NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 5, p. 2697-706, May 1995.
- MATSUMOTO, M. *et al.* Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 44, p. 45969-79, Oct 29 2004.
- MATSUMURA, I.; TANAKA, H.; KANAKURA, Y. E2F1 and c-Myc in cell growth and death. **Cell Cycle**, v. 2, n. 4, p. 333-8, Jul-Aug 2003.
- 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. *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.

MEDYOUF, H. *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.

MILDE-LANGOSCH, K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 16, p. 2449-61, Nov 2005.

MOGNOL, G. P. *et al.* Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. **Cell Death Dis**, v. 7, p. e2199, 2016.

MOGNOL, G. P. *et al.* Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements. **Cell Cycle**, v. 11, n. 5, p. 1014-28, Mar 1 2012.

MONTICELLI, S.; RAO, A. NFAT1 and NFAT2 are positive regulators of IL-4 gene transcription. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 10, p. 2971-8, Oct 2002.

MOORE, D. L.; GOLDBERG, J. L. Multiple transcription factor families regulate axon growth and regeneration. **Dev Neurobiol**, v. 71, n. 12, p. 1186-211, Dec 2011.

MUHAMMAD, K. *et al.* NF-kappaB factors control the induction of NFATc1 in B lymphocytes. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 11, p. 3392-402, Nov 2014.

MULLER, C. W. *et al.* Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. **Nature**, v. 373, n. 6512, p. 311-7, Jan 26 1995.

MULLER, M. R.; RAO, A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 9, p. 645-56, Sep 2010.

NAYAK, A. *et al.* Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. **J Biol Chem**, v. 284, n. 16, p. 10935-46, Apr 17 2009.

NEAL, J. W.; CLIPSTONE, N. A. Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. **J Biol Chem**, v. 276, n. 5, p. 3666-73, Feb 2 2001.

_____. 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.; DI GIOVANNI, S. NFAT signaling in neural development and axon growth. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 2, p. 141-5, Apr 2008.

NOLAN, G. P. NF-AT-AP-1 and Rel-bZIP: hybrid vigor and binding under the influence. **Cell**, v. 77, n. 6, p. 795-8, Jun 17 1994.

- NORBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annu Rev Biochem**, v. 61, p. 441-70, 1992.
- NORTHROP, J. P. *et al.* NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. **Nature**, v. 369, n. 6480, p. 497-502, Jun 9 1994.
- OKAMURA, H. *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.
- OKAMURA, H. *et al.* A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 10, p. 4184-95, May 2004.
- OUKKA, M. *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. *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.
- PAN, S. *et al.* Molecular cloning and functional characterization of murine cDNA encoding transcription factor NFATc. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 240, n. 2, p. 314-23, Nov 17 1997.
- PARK, J.; TAKEUCHI, A.; SHARMA, S. Characterization of a new isoform of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) gene family member NFATc. **J Biol Chem**, v. 271, n. 34, p. 20914-21, Aug 23 1996.
- PEI, L. *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis reveals novel epigenetic changes in chronic lymphocytic leukemia. **Epigenetics**, v. 7, n. 6, p. 567-78, Jun 1 2012.
- PERKINS, N. D. The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 2, p. 121-32, Feb 2012.
- PEROTTI, V. *et al.* NFATc2 is an intrinsic regulator of melanoma dedifferentiation. **Oncogene**, Sep 21 2015.
- PHAM, L. V. *et al.* An epigenetic chromatin remodeling role for NFATc1 in transcriptional regulation of growth and survival genes in diffuse large B-cell lymphomas. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3899-906, Nov 11 2010.
- PHAM, L. V. *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.
- PORTER, C. M.; HAVENS, M. A.; CLIPSTONE, N. A. Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. **J Biol Chem**, v. 275, n. 5, p. 3543-51, Feb 4 2000.
- QIN, J. J. *et al.* NFAT as cancer target: Mission possible? **Biochim Biophys Acta**, v. 1846, n. 2, p. 297-311, Jul 26 2014.

QUADRATO, G. *et al.* Nuclear factor of activated T cells (NFATc4) is required for BDNF-dependent survival of adult-born neurons and spatial memory formation in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 23, p. E1499-508, Jun 5 2012.

RAINIO, E. M.; SANDHOLM, J.; KOSKINEN, P. J. Cutting edge: Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. **J Immunol**, v. 168, n. 4, p. 1524-7, Feb 15 2002.

RANGER, A. M. *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.

RANGER, A. M. *et al.* The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. **Nature**, v. 392, n. 6672, p. 186-90, Mar 12 1998a.

RANGER, A. M. *et al.* Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. **Immunity**, v. 8, n. 1, p. 125-34, Jan 1998b.

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.

RENGARAJAN, J. *et al.* Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. **Immunity**, v. 12, n. 3, p. 293-300, Mar 2000.

RENGARAJAN, J. *et al.* Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. **J Exp Med**, v. 195, n. 8, p. 1003-12, Apr 15 2002.

ROBBS, B. K. *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.

RUAS, M.; PETERS, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. **Biochim Biophys Acta**, v. 1378, n. 2, p. F115-77, Oct 14 1998.

SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 96-9, Jan 1 1998.

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.

SANTINI, M. P. *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.

SCHAFFER, Z. T.; KORNBLUTH, S. The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. **Dev Cell**, v. 10, n. 5, p. 549-61, May 2006.

- SCHARENBERG, A. M.; HUMPHRIES, L. A.; RAWLINGS, D. J. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 10, p. 778-89, Oct 2007.
- SCHUH, K. *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.
- SCHULZE-OSTHOFF, K. *et al.* Apoptosis signaling by death receptors. **Eur J Biochem**, v. 254, n. 3, p. 439-59, Jun 15 1998.
- SCHWARTZ, R. H. T cell anergy. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 305-34, 2003.
- SEMENZA, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **J Appl Physiol**, v. 88, n. 4, p. 1474-80, Apr 2000.
- SERFLING, E. *et al.* NFATc1/alphaA: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes. **Cell Commun Signal**, v. 10, n. 1, p. 16, 2012.
- SERFLING, E. *et al.* NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. **Trends Immunol**, v. 27, n. 10, p. 461-9, Oct 2006.
- SHAW, J. P. *et al.* Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. **Science**, v. 241, n. 4862, p. 202-5, Jul 8 1988.
- SHAW, K. T. *et al.* Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 24, p. 11205-9, Nov 21 1995.
- SHERMAN, M. A. *et al.* NF-ATc isoforms are differentially expressed and regulated in murine T and mast cells. **J Immunol**, v. 162, n. 5, p. 2820-8, Mar 1 1999.
- SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev**, v. 13, n. 12, p. 1501-12, Jun 15 1999.
- SHIBASAKI, F. *et al.* Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. **Nature**, v. 382, n. 6589, p. 370-3, Jul 25 1996.
- SITARA, D.; ALIPRANTIS, A. O. Transcriptional regulation of bone and joint remodeling by NFAT. **Immunol Rev**, v. 233, n. 1, p. 286-300, Jan 2010.
- STARR, T. K.; JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A. Positive and negative selection of T cells. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 139-76, 2003.
- SUSIN, S. A. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441-6, Feb 4 1999.
- TAKAYANAGI, H. The role of NFAT in osteoclast formation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1116, p. 227-37, Nov 2007.

- TAKAYANAGI, H. *et al.* Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. **Dev Cell**, v. 3, n. 6, p. 889-901, Dec 2002.
- TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 231-41, Mar 2008.
- TEIXEIRA, L. K. *et al.* NFAT1 transcription factor regulates cell cycle progression and cyclin E expression in B lymphocytes. **Cell Cycle**, v. 15, n. 17, p. 2346-59, Sep 2016.
- TEIXEIRA, L. K. *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. *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.
- THIRUNAVUKKARASU, K. *et al.* Regulation of the human ADAMTS-4 promoter by transcription factors and cytokines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 345, n. 1, p. 197-204, Jun 23 2006.
- TIE, X. *et al.* NFAT1 is highly expressed in, and regulates the invasion of, glioblastoma multiforme cells. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66008, 2013.
- TIMMERMAN, L. A. *et al.* Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members. **J Immunol**, v. 159, n. 6, p. 2735-40, Sep 15 1997.
- TOMONO, M. *et al.* Calcineurin is essential for DNA synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts. **Biochem J**, v. 317 (Pt 3), p. 675-80, Aug 1 1996.
- TOMONO, M. *et al.* Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. **Arch Biochem Biophys**, v. 353, n. 2, p. 374-8, May 15 1998.
- TRIEZENBERG, S. J. Structure and function of transcriptional activation domains. **Curr Opin Genet Dev**, v. 5, n. 2, p. 190-6, Apr 1995.
- TRIPATHI, M. K. *et al.* Nuclear Factor of Activated T-cell Activity Is Associated with Metastatic Capacity in Colon Cancer. **Cancer Res**, Oct 15 2014.
- TRIPATHI, P. *et al.* Activation of NFAT signaling establishes a tumorigenic microenvironment through cell autonomous and non-cell autonomous mechanisms. **Oncogene**, v. 33, n. 14, p. 1840-9, Apr 3 2014.
- TSAI, E. Y. *et al.* Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 2, p. 459-67, Feb 1996.
- UEFFING, N. *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.

UHLÉN, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 1260419, Jan 23 2015.

UHLÉN, M. *et al.* Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 12, p. 1248-50, Dec 2010.

ULLERAS, E. *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.

VAETH, M. *et al.* Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 40, p. 16258-63, Oct 2 2012.

VAUX, D. L.; SILKE, J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 4, p. 287-97, Apr 2005.

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.

VIOLA, J. P. *et al.* NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 3, p. 335-44, Mar 2005.

VLAHOPOULOS, S. A. *et al.* The role of ATF-2 in oncogenesis. **Bioessays**, v. 30, n. 4, p. 314-27, Apr 2008.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med**, v. 10, n. 8, p. 789-99, Aug 2004.

WALCZAK-DRZEWIECKA, A. *et al.* HIF-1alpha is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT. **J Immunol**, v. 181, n. 3, p. 1665-72, Aug 1 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, J. *et al.* Transcription factor Nfat1 deficiency causes osteoarthritis through dysfunction of adult articular chondrocytes. **J Pathol**, v. 219, n. 2, p. 163-72, Oct 2009.

WANG, Q. *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.

WANG, Q. *et al.* NFATc1 regulation of TRAIL expression in human intestinal cells. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19882, 2011.

WEST, A. E. *et al.* Calcium regulation of neuronal gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 20, p. 11024-31, Sep 25 2001.

- WINSLOW, M. M. *et al.* Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. **Dev Cell**, v. 10, n. 6, p. 771-82, Jun 2006.
- WU, A. *et al.* NFAT and AP1 are essential for the expression of a glioblastoma multiforme related IL-13Ra2 transcript. **Cell Oncol**, v. 32, n. 5-6, p. 313-29, 2010.
- XANTHOUDAKIS, S. *et al.* An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. **Science**, v. 272, n. 5263, p. 892-5, May 10 1996.
- YANG, T.; DAVIS, R. J.; CHOW, C. W. Requirement of two NFATc4 transactivation domains for CBP potentiation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 43, p. 39569-76, Oct 26 2001.
- YAYKASLI, K. O. *et al.* ADAMTS9 activation by interleukin 1 beta via NFATc1 in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes. **Mol Cell Biochem**, v. 323, n. 1-2, p. 69-79, Mar 2009.
- 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. *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. *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.
- YOSHIDA, H. *et al.* The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. **Immunity**, v. 8, n. 1, p. 115-24, Jan 1998.
- YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 1, p. 47-59, Jan 2008.
- 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.
- YOUN, H. D.; LIU, J. O. Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. **Immunity**, v. 13, n. 1, p. 85-94, Jul 2000.
- ZHANG, K. *et al.* High expression of nuclear factor of activated T cells in Chinese primary non-small cell lung cancer tissues. **Int J Biol Markers**, v. 22, n. 3, p. 221-5, Jul-Sep 2007.
- ZHOU, B. *et al.* Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2. **J Biol Chem**, v. 277, n. 12, p. 10704-11, Mar 22 2002.
- ZHOU, B. *et al.* Characterization of Nfatc1 regulation identifies an enhancer required for gene expression that is specific to pro-valve endocardial cells in the developing heart. **Development**, v. 132, n. 5, p. 1137-46, Mar 2005.

9. Anexos

Anexo I - 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.

Anexo II - LUCENA, P. I. *et al.* NFAT2 Isoforms Differentially Regulate Gene Expression, Cell Death, and Transformation through Alternative N-Terminal Domains. **Mol Cell Biol**, v. 36, n. 1, p. 119-31, Jan 2016.

ANEXO I



The transcription factor NFAT1 induces apoptosis through cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK pathway and upregulation of TNF- α expression

Bruno K. Robbs, Pedro I. Lucena, João P.B. Viola*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2012

Received in revised form 20 March 2013

Accepted 2 April 2013

Available online 10 April 2013

Keywords:

NFAT
Cell death
Ras
ERK
TNF- α
Tumor suppressor

ABSTRACT

Nuclear factor of activated T cells (NFAT) was described as an activation and differentiation factor in T cells. NFAT1 protein is expressed in several cell types and has been implicated in the control of the cell cycle, death and migration. Overexpression or activation of NFAT1 has been demonstrated to induce cell death in different cell types, such as T lymphocytes, Burkitt's lymphoma, and fibroblasts. Although these findings indicate a role for NFAT1 transcription factor in control of cell death, the precise mechanisms involved in this process regulated by NFAT1 are still poorly understood. The Ras/Raf/MEK/ERK pathway is activated by many growth factors and cytokines that are important in driving proliferation and preventing apoptosis and is widely implicated in cell transformation and cancer development. We show that NFAT1 protein can cooperate with Ras/Raf/MEK/ERK, but not with the JNK, p38 or NF κ B pathways in cell death induction. NFAT1 can induce a cell death pathway consistent with apoptosis, which can be shifted to programmed necrosis by caspase inhibitors. Finally, through screening genes involved in cell death regulation, although we determined that TNF- α , TRAIL and PAK7 genes were up-regulated, only TNF- α expression was responsible for cell death in this context. These data suggest that NFAT1 protein activation can shift oncogenic Ras/Raf/MEK/ERK signaling to acting as a tumor suppressor pathway. These data support a potential role for regulating NFAT1 expression in gene therapy in tumors that display an activated Ras pathway, which could lead to more specific, target-directed TNF- α expression and, thus, tumor suppression.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The nuclear factor of activated T cells (NFAT) family of transcription factors includes four closely related proteins, designated NFAT1–4, that are regulated by the Ca²⁺/calcineurin pathway [1,2]. NFAT proteins have been shown to regulate the expression of a wide range of genes involved in immune system responses and vertebrate development and have more recently been implicated in cancer development [1,3,4]. An increase in intracellular calcium activates calcineurin, a calcium/calmodulin-dependent serine/threonine phosphatase, which directly dephosphorylates the NFAT regulatory domain, allowing NFAT to translocate to the nucleus and increasing its DNA affinity [5]. The immunosuppressive drugs cyclosporin A (CsA) and FK506, which are well-known inhibitors of calcineurin, inhibit NFAT activity by blocking its dephosphorylation [6]. Once located in the nucleus, NFAT proteins can bind to their target promoter elements and activate the transcription of specific responsive genes, either alone or in combination with other nuclear partners [2]. One of the main partners of NFAT activity is the synthesis and activation of

the Fos and c-Jun proteins, which are components of the AP-1 family of transcription factors that can be activated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) [7].

NFAT1 is the prevalent NFAT isoform expressed in peripheral T lymphocytes. Upon T cell receptor stimulation, NFAT induces changes in the expression of a number of cytokine genes, including IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 and IFN- γ . However, NFAT also regulates other responsive genes, such as c-myc, p21^{Waf1}, CD40 ligand, FasL, CDK4 and Nur77, indicating that these transcription factors may also be involved in the control of the cell cycle and apoptosis [8–10]. Indeed, three-month-old NFAT1 deficient (NFAT1^{-/-}) mice develop a lymphocyte hyperproliferative phenotype, reflected by a slight size increase in peripheral lymphoid organs, accompanied by a reduction in cell death and an increased cell cycle rate [11–14]. NFAT1^{-/-} mice also exhibit neoplastic transformation of cartilage cells, which resemble chondrosarcomas and display an increased propensity for chemical carcinogen-induced tumor formation [15,16].

The phenotype of NFAT1-deficient mice suggests that this family of transcription factors is likely to play a much broader role in the regulation of cell death than previously described and might be involved in tumorigenesis. Overexpression or activation of NFAT1 protein has been demonstrated to induce cell death in different cell types, such as T lymphocytes, Burkitt's lymphomas, and fibroblasts [16–20]. Recently, our group demonstrated that NFAT1 protein can induce cell

* Corresponding author at: Programa de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rua André Cavalcanti, 37, Centro, Rio de Janeiro, RJ 20231-050, Brazil. Tel.: +55 21 3207 6530; fax: +55 21 3207 6587.

E-mail address: jpviola@inca.gov.br (J.P.B. Viola).

death in NIH3T3 fibroblasts transformed with the H-rasV12 oncogene and can act as a tumor suppressor gene that reduces tumor formation in mice [16]. Although these data propose a role for the NFAT1 transcription factor in the control of cell death, the precise genetic mechanisms involved in this process regulated by NFAT1 are still poorly described.

The Ras/Raf/MEK/ERK pathway is activated by many growth factors and cytokines that are important in driving proliferation and preventing apoptosis [21–23]. This signaling pathway is found to be mutationally activated or overexpressed in several human cancers, such as melanomas, colorectal, pancreatic, papillary-thyroid and serous ovarian carcinomas and lung cancers [24–28]. Furthermore, studies using genetic or pharmacologic approaches have shown that MEK (MAPK/ERK kinase) and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein activities are required for the transforming activities of Ras [29], thus supporting an oncogenic role for this pathway.

In this study, we aimed to determine the signaling pathways that can cooperate with NFAT1, the mechanism of cell death, and the critical genes that are regulated by NFAT1 protein in the induction of cell death. We show that the activation of NFAT1 can induce cell death in NIH3T3 fibroblasts only in cooperation with the oncogenic Ras pathway. Furthermore, NFAT1 cooperates with the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in the induction of cell death, but not with other pathways downstream of Ras, such as the JNK (c-Jun N-terminal kinase) or p38 kinase pathway. NFAT1 induces a cell death phenotype characterized as apoptosis that can be shifted to programmed necrosis in the presence of caspase inhibitors. Finally, a PCR array analysis of genes involved in apoptosis showed that TNF- α (tumor necrosis factor alpha) presented the most abundant mRNA up-regulation in response to NFAT1 activation, leading to massive TNF- α protein production that was directly implicated in the induction of cell death. Collectively, these data suggest that NFAT1 protein can induce cell death through the regulation of TNF- α expression and that this phenotype is dependent on the activation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway.

2. Experimental procedures

2.1. Cell culture and reagents

NIH3T3 cell cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were cultured in a humidified environment containing 5% CO₂ at 37 °C. Inhibitors of p38 kinase (SB-203580), MEK1/2 (U0126 and PD98059) and JNK (SP600125) were all purchased from ENZO Life Science, while 4-hydroxytamoxifen (OHT) was obtained from Invitrogen. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was obtained from Calbiochem. Recombinant mouse TNF- α (T7539) was acquired from Sigma. Phycoerythrin-conjugated Annexin-V, 7-AAD, and Ac-DEVD-AFC were obtained from BD Biosciences. Pan and Caspase-3 inhibitors (Z-VAD-FMK and Z-DEVD-FMK respectively), and necrostatin-1 were obtained from R&D Systems. The NFAT1 polyclonal antibody anti-67.1 was a gift from Dr. Anjana Rao [30]. GAPDH (6C5) and pan-Ras (sc-32) were obtained from Santa Cruz Biotechnology; total-(#9102) and phospho-ERK1/2 (#9106) were obtained from Cell Signaling, and a TNF- α neutralizing antibody (MCA1488XZ) was obtained from AbD Serotec.

2.2. Plasmid constructs

CA-NFAT1 murine cDNA has previously been described [31] and was a gift from Dr. Anjana Rao. The plasmid pLIREs-EGFP-CA-NFAT1 was constructed by subcloning CA-NFAT1 cDNA into the pLIREs-EGFP backbone retroviral plasmid [32]. To construct a plasmid containing NFAT1 protein responsive to the synthetic steroid 4-hydroxytamoxifen (OHT), designated pLIREs-EGFP-CA-NFAT1-ER, a SalI restriction site was introduced immediately after the CA-NFAT1 C-terminus at the

original stop codon using the GeneTailor Site-Directed Mutagenesis system (Invitrogen). The original CA-NFAT1 construct contains an SV40 nuclear localization signal (NLS) at its C-terminus adjacent to its stop codon; in pLIREs-EGFP-CA-NFAT1-ER, the NLS was excluded. The N-terminally truncated G525R estrogen receptor responsive to tamoxifen (ERTM) was PCR amplified from pBabe-c-mycERTM, a gift from Dr. Gerard Evan, and subcloned at the SalI site to create pLIREs-EGFP-CA-NFAT1-ER [33]. The retroviral plasmids pBabe-H-rasV12, pBabe-I κ B α -mut (Addgene plasmid 15291) and pBabe-MEK1^{DD} (Addgene plasmid 15268) were described previously [34,35] and were a gift from Dr. Scott Lowe or acquired from Addgene. The luciferase reporter construct 3 \times NFAT-Luc (pGL4.30; Promega), which contains three copies of the distal NFAT-AP1 site of the IL-2 promoter [36], and 6 \times NF κ B, containing six copies of the NF κ B responsive element [37], were constructed as described previously. All constructs were confirmed by restriction enzyme mapping and DNA sequencing.

2.3. Production of recombinant retroviruses and infection of NIH3T3 cells

The BD EcoPack2 ecotropic packaging cell line (BD-Biosciences) was transiently transfected with a retroviral vector via calcium phosphate precipitation for 24 h. Cell-free virus-containing supernatant was collected 48 h after transfection, mixed 1:1 with fresh medium, supplemented with 8 μ g/ml polybrene (FLUKA Chemie, Buchs, Switzerland), and immediately used for spin-infection (2 \times 45 min at 420 g, room temperature) of 2.5 \times 10⁴ NIH3T3 cells. Infected cells were incubated at 37 °C for an additional 24 h, trypsinized, and used as indicated. To ensure reproducibility, each experiment was repeated using cells derived from independent viral infections.

2.4. NIH3T3 cells expressing CA-NFAT1-ER, H-rasV12, MEK1^{DD} and I κ B α -mut construction

NIH3T3-CA-NFAT1-ER or -Empty-Vector cells were generated by transducing NIH3T3 wild-type cells with the pLIREs-EGFP-CA-NFAT1-ER retroviral vector or Empty Vector following selection for G418 (Invitrogen) resistance (1000 μ g/ml) for 14 days. NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells expressing H-rasV12, MEK1^{DD} or I κ B α -mut were generated by transducing the cells with the pBabe-H-rasV12, -MEK1^{DD} or -I κ B α -mut retroviral vector following selection for puromycin (Sigma) resistance (15 μ g/ml) for at least 5 days.

2.5. Cell proliferation studies

NIH3T3-Empty-Vector or -CA-NFAT1-ER cells infected with H-rasV12 when indicated were plated in triplicate into 96-well microtiter plates at a density of 8 \times 10³ cells per well and treated with 100 nM OHT and 20 nM PMA. When indicated, the cells were pre-treated with U0126 2 h prior to OHT addition. Cell proliferation was analyzed at the indicated times by a Crystal Violet assay, which involves fixing the cells with ethanol for 10 min, followed by staining with 0.05% Crystal Violet in 20% ethanol for 10 min and solubilization with methanol. The plate was read on a spectrometer at 595 nm.

2.6. Sub-G₀ and cell permeabilization analyses

Twelve microtiter plates were inoculated with 1 \times 10⁵ cells and treated with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) or with mouse recombinant TNF- α as indicated. When indicated, the cells were treated with SB-203580 (1 to 80 μ M), U0126 (1–80 μ M), SP600125 (20–100 μ M), Z-VAD-FMK (20 μ M), necrostatin-1 (20 μ M) or the TNF- α neutralizing antibody (0.5 to 4 μ g/ml) 2 h prior to OHT or TNF- α addition. On the indicated day, the cells were trypsinized, and the supernatant was collected and washed once with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were then stained with propidium iodide (75 μ M) in the presence of NP-40 for Sub-G₀ analysis, or with saline

PBS with propidium iodide (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for permeabilization analysis. Analyses of DNA content and PI-positive cells were conducted by collecting 20,000 events using a FACScalibur flow cytometer and CELLQuest software (BD Biosciences).

2.7. Annexin-V staining

NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were plated at a density of 1.5×10^6 cells/10 cm dish and treated with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) when indicated. At different time-points, the cells were trypsinized, and the supernatant was collected, washed with PBS, stained with Annexin V-PE and 7-AAD, and analyzed by flow cytometry.

2.8. Transactivation assay

NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells infected with pBabe-Empty or pBabe-l κ B α -mut when indicated were plated at 2.5×10^5 cells/10 cm dish. After 24 h, the cells were cotransfected via calcium phosphate precipitation with the 3 \times NFAT-Luc (10 μg) or the 6 \times NF κ B-Luc (10 μg) reporter plasmid and a *Renilla* luciferase expression plasmid (pRL-TK) for normalization (1 μg). After 24 h, the cells were trypsinized, and 1×10^5 cells were plated in a 24-well plate, followed by the addition of OHT (100 nM) or PMA (20 nM) 2 h later. At the indicated times, cells were harvested and lysed with 40 μl of lysis reagent (Promega). Crude extracts were analyzed in a Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems) using a dual-luciferase reporter assay system (Promega) as directed by the manufacturer. The firefly luciferase reporter gene was normalized with the *Renilla* vector pRL-TK. Luciferase activities were expressed as relative light units (RLU).

2.9. Western blotting

NIH3T3 cells infected with Empty Vector or NFAT1 WT, CA-NFAT1, CA-NFAT1-ER, H-rasV12 or MEK1^{DD} were treated when indicated with OHT (100 nM), PMA (20 nM) or U0126 (1–20 μM). Total protein was obtained from 3.5×10^5 cells by cell 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 via SDS-PAGE, and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Antibodies against pan-Ras, NFAT1, total- and phospho-ERK, and GAPD were used as indicated in the *Cell culture and reagents* section and in the figure legends. Immunodetection was performed with an ECL Western blotting detection kit (GE Healthcare).

2.10. NFAT immunolocalization and pyknotic nuclei analyses

NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were treated with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) when indicated and fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for 15 min. The cells were permeabilized, and nonspecific sites were blocked with 1 \times PBS containing 0.5% NP-40 and 5% FBS in several 5 min washes. For NFAT1 immunolocalization, cells were incubated for 1 h at room temperature with an NFAT1 polyclonal antibody in 1 \times PBS containing 0.5% NP-40 and 5% FBS. Then, the cells were washed again prior to incubation with rhodamine-labeled anti-rabbit IgG (KPL) for 30 min. For nuclear staining and to examine the formation of pyknotic nuclei, the cells were incubated with DAPI (300 nM) for 1 min. The cells were viewed under an Olympus FluoView FV10i confocal fluorescence microscope. NFAT1 subcellular localization was quantified by counting at least 100 randomly chosen DAPI stained cells and determination of NFAT1 localization.

2.11. ELISA against TNF- α

NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells or cells expressing Empty Vector, H-rasV12 or MEK1^{DD} were treated with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) as indicated. When indicated, cells were treated with U0126 (20 μM) 2 h prior to OHT and PMA. At different time-points, cell-free supernatant was assessed for TNF- α protein levels using the Murine TNF- α ELISA Development kit (PeproTech) according to the manufacturer's instructions.

2.12. Enzymatic assay for caspase-3 activity

Caspase-3 activity was measured using the fluorogenic enzyme substrate Ac-DEVD-AFC. Cells were plated (1.5×10^6 cells/10 cm plate) and treated with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) as indicated. After 24 h, the cells were collected as a pellet and resuspended in 50 μl of cell lysis buffer, then incubated on ice for 30 min. The cells were then centrifuged at 3000 g for 5 min, and the supernatant was transferred to a 96-well plate, to which 50 μl of reaction buffer (20 mM PIPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 10% Sucrose, 10 mM DTT, 100 mM NaCl₂) containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the substrate was added. As a control, the caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-FMK (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added when indicated. The plate was incubated at 37 °C for 1 h, and the samples were read in a fluorometer equipped with a 400 nm excitation filter and a 505 nm emission filter or in a spectrum with emissions varying between 480 and 520 nm. The protein content was measured using Bradford Folin's reagent method (Bio-Rad Laboratories) and used to normalize enzyme activity, which was expressed as a % relative to cells treated with PMA alone.

2.13. Real-time reverse transcriptase (SYBR Green) SuperArray assay

NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were treated with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) as indicated for 24 h, and total mRNA was isolated from cells using RNeasy Mini Spin Columns (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. The purity and quantity of total RNA were determined using a Nanodrop UV-visible spectrophotometer (Nano-Drop Technologies), and RNA integrity was assessed based on the 28S and 18S ribosomal mRNA bands via agarose gel electrophoresis. First-strand DNA was synthesized using the RT2 First Strand kit (SABiosciences Corporation) as recommended by the manufacturer. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using STBR Green PCR Master Mix (SABiosciences) in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The quality of the primers was tested via the analysis of the melting curve. We used the PAMM-012 Mouse Apoptosis Pathway RT Profiler PCR array (SABiosciences), which profiles the expression of 84 genes involved in apoptosis-related signaling.

3. Results

3.1. Both NFAT1 activation and PMA stimulation are required for the induction of cell death in fibroblasts

Although several recent studies suggest that NFAT1 protein can induce cell death when overexpressed or activated in different cell types, the precise cell death machinery involved in this process is still not well characterized [16–20]. To address this question, we constructed a conditional NFAT1 protein responsive to the synthetic steroid 4-hydroxytamoxifen (OHT) by fusing the previously characterized constitutively active NFAT1 protein (CA-NFAT1) [16,31] to the N-terminally truncated G525R estrogen receptor (ERTM), which is only responsive to OHT (CA-NFAT1-ER; Fig. 1A) [33]. CA-NFAT1-ER cDNA was cloned into the retroviral vector pLIRE-EGFP, which was then used to transduce NIH3T3 cells, and these cells were subsequently stabilized via antibiotic resistance (NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells). The use of a conditioned

NFAT1 protein allows temporal control and synchronization of NFAT activation and, thus, a more detailed analysis of [1] the pathways that can cooperate with NFAT [2], the gene expression profile mediated by this factor [3], and cell death kinetics. Furthermore, this construct bypasses the need for a Ca^{2+} influx to activate NFAT1 protein and therefore allows the reduction of the background generated by the induction of other Ca^{2+} -responsive transcription factors, such as CREB and MEF2 [38–40]. Subsequent expression analysis in NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells of the encoded CA-NFAT1-ER construct demonstrated that the protein functioned properly and exhibited all of the expected characteristics. The CA-NFAT1-ER protein presented the expected apparent molecular weight compared to wild-type or constitutively active NFAT1 protein (Fig. 1B), was restricted to the cytoplasm (>95% of total cells) and completely translocated to the nucleus (>95% of total cells) when treated with OHT (Fig. 1C), and showed the ability to transactivate an NFAT-responsive reporter luciferase construct (pGL4.30) in a time-dependent manner, reaching a plateau in 24 h, only in the presence of OHT (Fig. 1D).

Next, we analyzed the role of the NFAT1 protein in the control of cell proliferation and death (Fig. 2). The growth capacity of NIH3T3 cells expressing CA-NFAT1-ER was assessed in a proliferation kinetics assay, accompanied by crystal violet incorporation, which correlates with total cell numbers, while cell death kinetics were accompanied by sub- G_0 DNA content, which is indicative of cells undergoing apoptosis. There was no difference between empty vector- and CA-NFAT1-ER-expressing cells in their proliferation (Fig. 2A) and apoptosis profiles (Fig. 2B), with the activation of the CA-NFAT1-ER protein observed only following OHT application. However, the addition of the phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induced a strong decrease in cell accumulation rate (Fig. 2C) accompanied by cell death (Fig. 2D) only in cells expressing and showing activated CA-NFAT1-ER following treatment with OHT. The profile of cells undergoing cell death exhibiting a sub- G_0 DNA content

can be further visualized from the results of the two representative flow cytometric analysis (Fig. 2E and F). Furthermore, NIH3T3 cells showing activated CA-NFAT1-ER in the presence of PMA displayed time-dependent cell death induction, culminating with massive cell death at 72 h after NFAT1 activation (Fig. 2D). Altogether, these data demonstrate that while OHT and PMA do not alter proliferation and death in empty vector-expressing cells, they do induce a strong cell death phenotype in NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells, supporting the idea that cell death is caused by NFAT1 activation and that it depends on cooperation with a pathway activated downstream of PMA.

3.2. NFAT1 cooperates with the oncogenic Ras/Raf/MEK/ERK pathway in the induction of cell death, but not with the NF κ B pathway

To further investigate the pathways that can cooperate with NFAT1 in the induction of cell death, we analyzed the two main downstream PMA-activated pathways: the NF κ B and Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathways. To examine whether the NF κ B transcription factor can cooperate with NFAT1 in the induction of cell death in fibroblasts, NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were transduced with an empty vector or with a plasmid encoding a dominant-negative mutated I κ B α (I κ B α -Mut) protein [35]. As expected, NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells carrying the empty vector underwent cell death 72 h after treatment with OHT and PMA (Fig. 3A). However, the inhibition of NF κ B activation via overexpression of I κ B α -Mut did not prevent the induction of cell death by NFAT1 activation in cells treated with OHT and PMA (Fig. 3A). The dominant-negative I κ B α protein was functioning properly, as it was able to completely block PMA induction of NF κ B transactivation of an NF κ B-responsive luciferase promoter (Fig. 3B). These data support the idea that the NF κ B signaling pathway is not essential for NFAT1 induction of cell death.

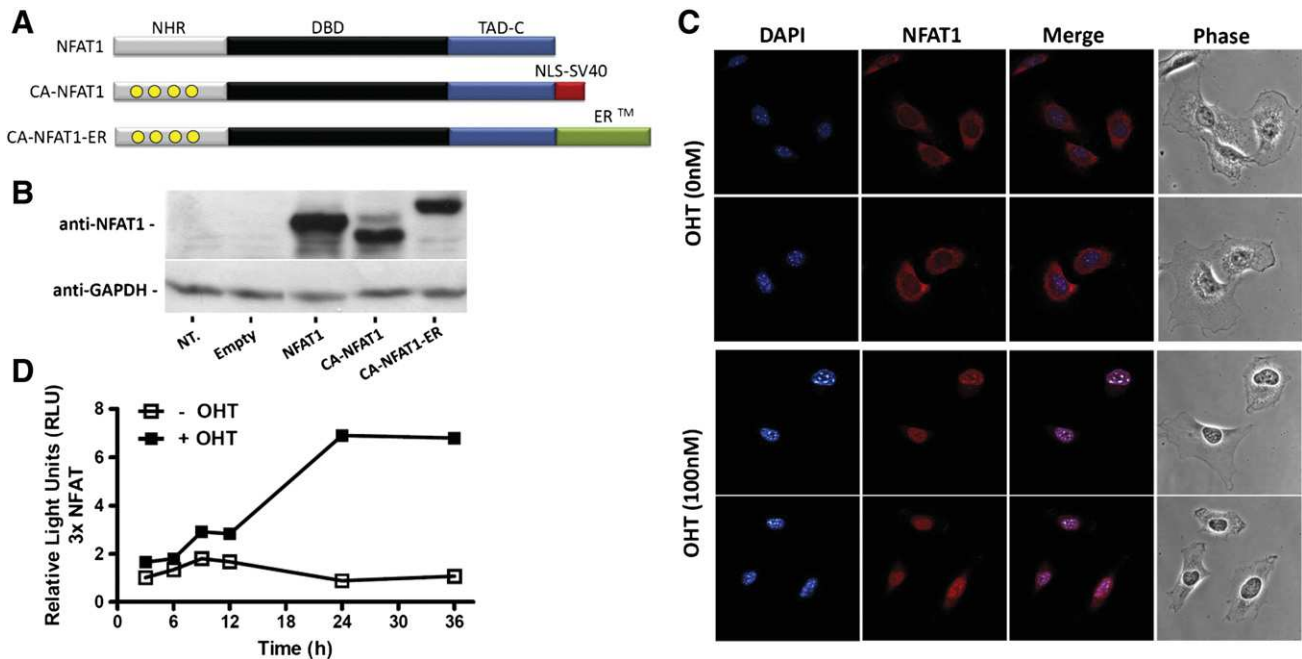


Fig. 1. Construction and validation of 4-hydroxytamoxifen responsive NFAT1 protein (CA-NFAT1-ER). A) Schematic alignment of the NFAT1 protein and constructs. Abbreviations and schematic conventions: serine to alanine CA-NFAT1 mutations (yellow circles), DNA-binding domain (DBD, dark bars), C-terminal transactivation domains (TAD-C, blue bars), NFAT homology region (NHR, gray bars), nuclear localization signal from the SV40 virus (NLS-SV40, red bar) and N-terminally truncated G525R estrogen receptor (ERTM, green bar). Identical shading patterns represent identical sequences. CA-NFAT1-ER was constructed by deleting the NLS-SV40 signal from the CA-NFAT1 protein, followed by fusion with the truncated estrogen receptor responsive to 4-hydroxytamoxifen (OHT), as described. B) NFAT1 protein expression determined by western blotting analysis of NIH3T3 cells retrovirally transduced with the indicated construct. GAPDH levels were used as a loading control. Non-transduced cells (ND). C) The subcellular localization of NFAT1 protein in NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells was determined by fluorescence microscopy in the presence of 0 or 100 nM OHT for 24 h. Cells were stained with DAPI and anti-NFAT1-PE Abs. and visualized by fluorescence and phase contrast microscopy. D) NFAT transactivation assay. NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were transfected with pGL4.30 (NFAT responsive vector) and pRL-TK (Renilla normalization vector). After 24 h, they were treated with OHT (100 nM) when indicated. Luciferase activity was measured as described at the specified times and was expressed as light units relative to the first time point in cells without OHT. All results are representative of at least 3 independent experiments.

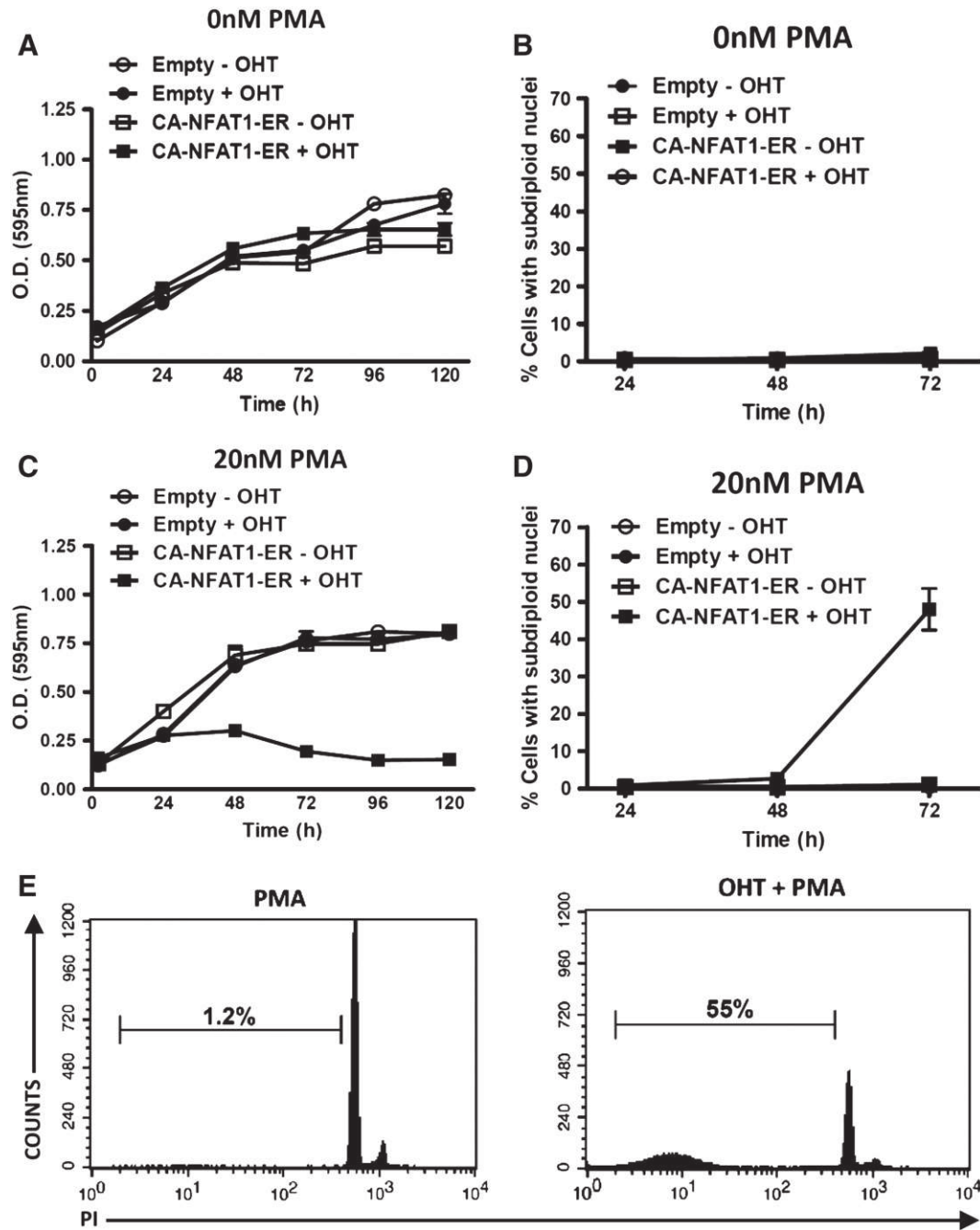


Fig. 2. NFAT1 induces cell death and reduces proliferation only in cooperation with a PMA-activated pathway. NIH3T3-Empty-Vector or -CA-NFAT1-ER cells were plated and analyzed for cell growth and death as indicated below. A and C) Analysis of proliferation kinetics based on Crystal Violet staining. Cells were plated in the absence (A) or presence (C) of 20 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and in the presence of OHT (100 nM) when specified. The results are representative of at least 3 independent experiments. B and D) Cell death analysis based on the formation of subdiploid nuclei (Sub-G₀). Cells were plated in the absence (B) or presence (D) of 20 nM PMA and in the presence of OHT (100 nM) when indicated. Cells were stained with PI and analyzed by flow cytometry to determine their DNA content at the specified time. SD values indicate the variance of at least three independent experiments. E) Representative Sub-G₀ cell death analysis histograms from NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells treated with PMA (20 nM) (left panel) and OHT (100 nM) (right panel) for 72 h, extracted from Fig. 2D. The percentage of cell death (Sub-G₀) is indicated.

Stimulation of cells with PMA is also known to activate the Ras/MAPK pathway directly through the activation of RasGRPs (Ras guanyl nucleotide-releasing proteins) or indirectly through the activation of PKC protein [41,42]. To investigate whether the Ras/MAPK pathway is involved in the induction of cell death by NFAT1, NIH3T3-CA-NFAT1-ER-expressing cells were transduced with an empty vector or with a plasmid encoding the constitutively active H-rasV12 protein. H-ras protein expression was analyzed by western blotting to confirm the overexpression of this oncogene (Fig. 3C). As expected, only low levels of cell death were visualized when assessed at an early time point, 48 h

after treatment with OHT and PMA, in the NIH3T3-CA-NFAT1-ER plus empty-vector-expressing cells (Fig. 3D). However, the activation of NFAT1 protein by OHT treatment in NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells expressing the H-rasV12 oncogene was sufficient to induce massive cell death at this time point (Fig. 3D; OHT). These data suggest that H-rasV12 expression can induce cell death in cooperation with NFAT1 at an earlier time point (48 h) when compared to cells treated only with OHT and PMA (72 h; Fig. 2D). The H-rasV12 overexpression may accelerate the cell death induced by NFAT1 when compared with PMA stimulation. In fact, this phenotype can be readily visualized at cell proliferation analysis

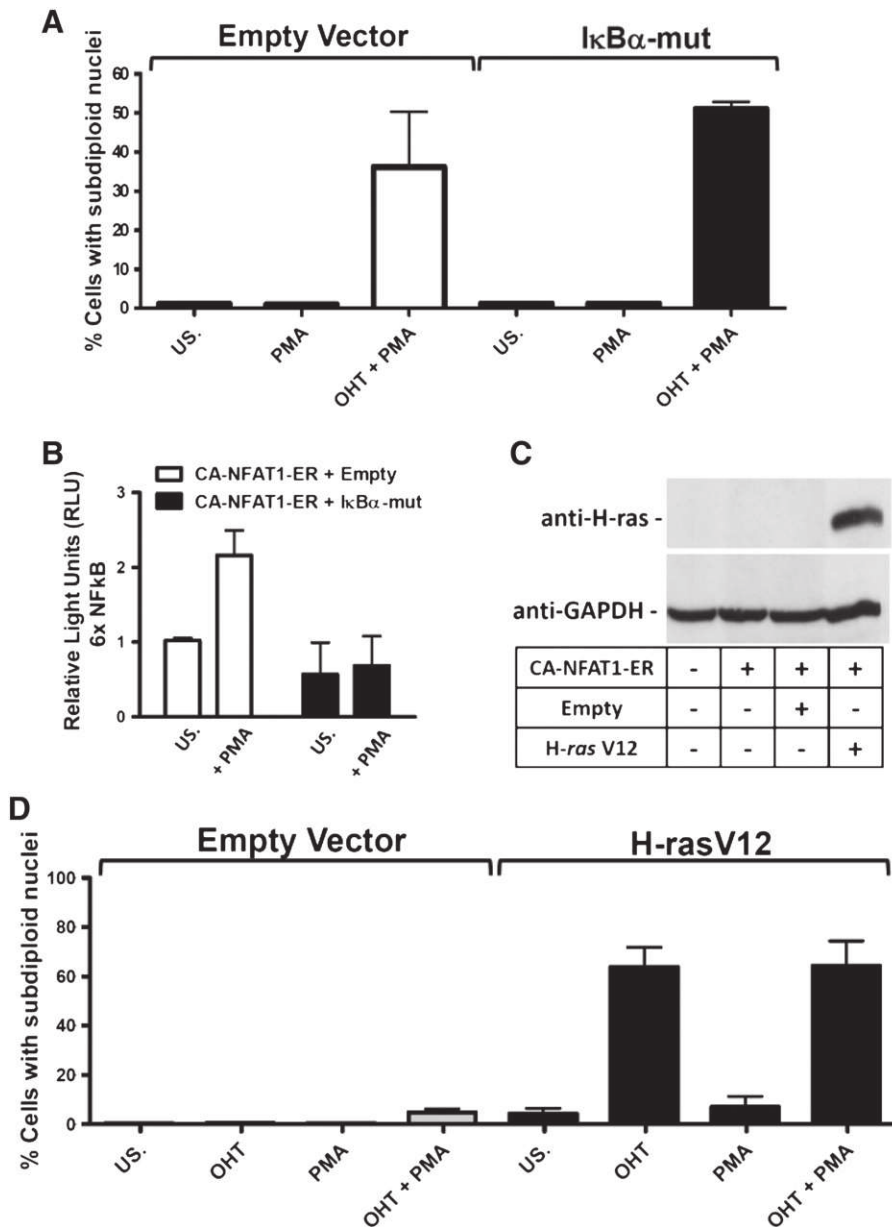


Fig. 3. The *H-ras*, but not the NF κ B pathway cooperates with the induction of cell death by NFAT1. A and D) Cell death analysis based on the formation of subdiploid nuclei (Sub-G₀). NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were transduced with the indicated vector (pBabe-Empty; -IκBα-mut or -H-rasV12) as described. Cells were plated, treated with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) as specified and cultured for 72 h (A) or 48 h (D). Cells were stained with PI and analyzed by flow cytometry for DNA content. B) NF κ B transactivation assay. NIH3T3-CA-NFAT1-ER-expressing cells were transduced with the Empty or IκBα-mut construct as described. Then, the cells were transfected with pGL3-6 \times NF κ B (NF κ B responsive vector) and pRL-TK (*Renilla* normalization vector). On the next day, the cells were treated with PMA (20 nM) for 6 h. Luciferase activity was measured as described and was expressed as relative light units (RLU) compared to the first graphic column. SD values indicate the variance of three independent experiments. C) *H-rasV12* protein expression. Western blotting analysis of NIH3T3 cells retrovirally transduced with the indicated plasmids for *H-ras* protein expression. GAPDH levels were used as a loading control. The results are representative of at least 3 independent experiments. US. denotes unstimulated cells in all experiments.

comparing Figs. 2C and 4H. Furthermore, stimulation with PMA did not result in a cooperative effect to further increase cell death in cells expressing *H-rasV12* treated with OHT (Fig. 3D; OHT + PMA). Altogether, these data demonstrate that *H-rasV12* overexpression is sufficient to bypass the need for PMA in the induction of cell death by NFAT1, supporting the idea that NFAT1 can cooperate with pathways downstream of Ras/MAPK.

Activation of Ras protein through the induction of a phosphorylation cascade involving several downstream MAPKKK pathways culminates the induction of three main families of MAPKs, ERK1/2, JNK1/2/3, and p38 α / β / γ / δ kinases [29,43]. However, the JNK and p38 pathways appear not to be involved in the induction of cell death by NFAT1 because the use of JNK- and p38-specific inhibitors (SP600125 and SB203580) to produce a dose-response curve, at concentrations ranging from 1 μ M up

to 80 μ M, did not inhibit the induction of cell death by NFAT1 (Fig. 4A). On the other hand, the Ras/Raf/MEK/ERK pathway appears to be fundamental for the induction of cell death by NFAT1 (Fig. 4B–H). MEK1/2 is the MAPKK upstream of ERK1/2, and their inhibition by the drug U0126 is used to evaluate ERK-mediated events. To examine whether the Ras/Raf/MEK/ERK pathway is involved in the induction of cell death by NFAT1, NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were transduced with *H-rasV12* and treated with U0126 to obtain a dose-response curve (Fig. 4B). MEK1/2 inhibition led to a reduction of the cell death induced by NFAT1 activation (OHT) in a concentration-dependent manner in which inhibition with U0126 at 5 μ M was sufficient to reduce total cell death by 50% and 20 μ M by approximately 90% (Fig. 4B). Inhibition of MEK1/2 by U0126 was correlated with the reduction of ERK1/2

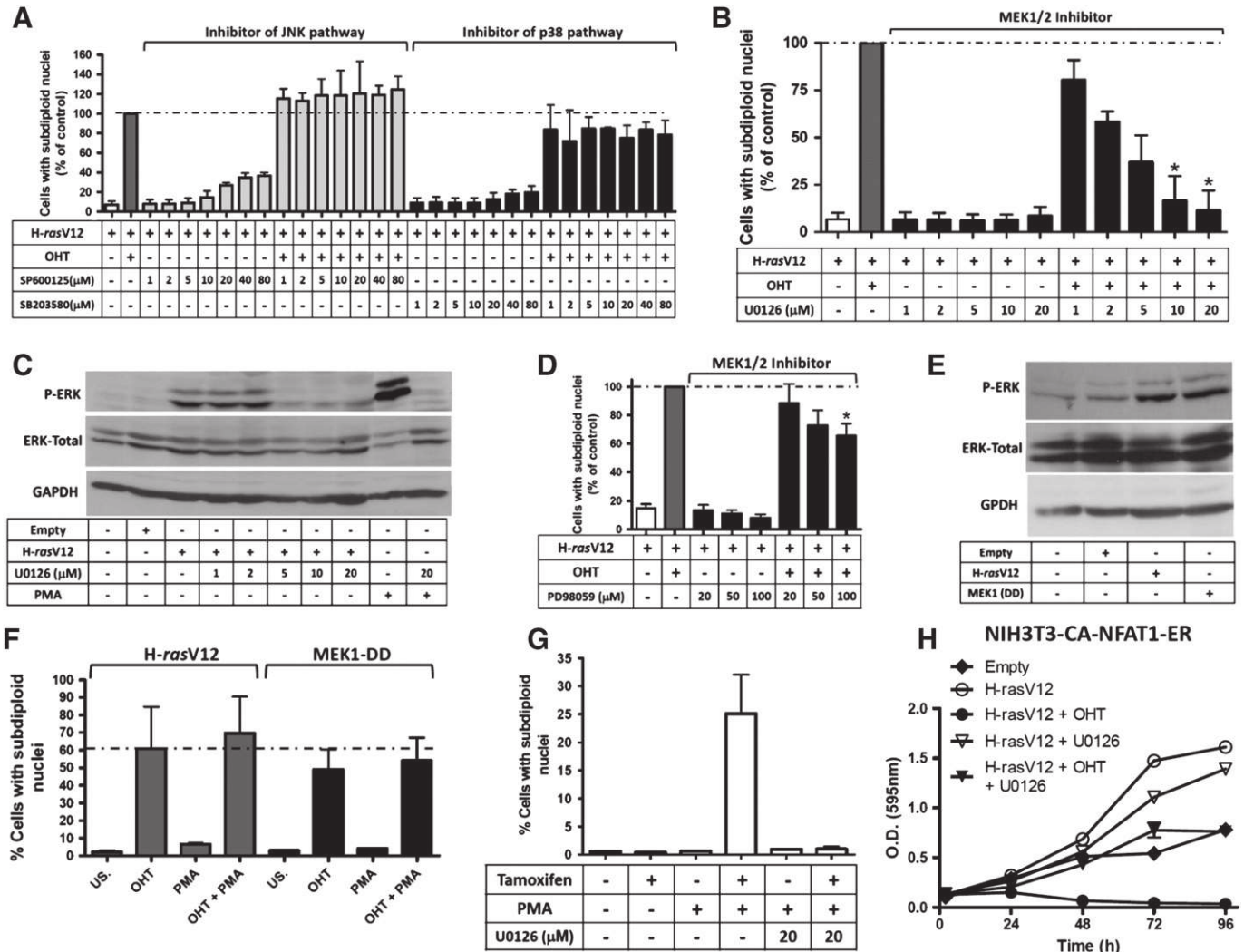


Fig. 4. The Ras/Raf/MEK/ERK pathway, but not p38 or JNK cooperates with the induction of cell death by NFAT1. A, B, D, F and G) Cell death analysis based on the formation of subdiploid nuclei (Sub-G₀). NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were transfected with the indicated vectors (pBabe-H-rasV12; MEK1-DD) as described. When specified, cells were pre-treated with variable concentrations of SP600125 (JNK inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor), U0126 or PD98059 (MEK1/2 inhibitors) 2 h prior to stimulation. Cells were treated with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) when indicated and cultured for 48 h (A, B, D and F) or 72 h (G) before being stained with PI and analyzed by flow cytometry to determine their DNA content. SD values indicate the variance of at least three independent experiments, and (*) indicates $p \leq 0.001$. C and E) Western blotting analysis of the ERK1/2 phosphorylation state. NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were retrovirally transduced with the specified plasmid (pBabe-Empty; -H-rasV12 or -MEK1^{DD}) as described. When indicated, cells were pre-treated for 2 h with variable concentrations of U0126 prior to the addition of PMA (20 nM). The cells were harvested and analyzed as described 24 h after PMA stimulation. GAPDH and total-ERK were used as loading controls. C) The two last lanes of the gel represent an upshift that can be seen in all conditions (p-ERK; ERK-Total and GAPDH). A nonspecific band can be seen only at the last lane of p-ERK under the low-intensity-specific p-ERK1/2 bands. H) Analysis of proliferation kinetics based on Crystal Violet staining. NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were retrovirally transduced with the specified plasmid (pBabe-Empty or -H-rasV12) as described. When indicated, cells were pre-treated with U0126 (20 μM) 2 h prior to stimulation. Cells were treated with OHT (100 nM) when specified and cultured for the specified time. The results are representative of at least 3 independent experiments. US. denotes unstimulated cells in all experiments.

phosphorylation induced by H-rasV12 and by PMA stimulation (Fig. 4C), supporting the idea that U0126 inhibition of cell death was occurring through an ERK1/2-dependent pathway. Corroborating these data, another MEK1/2 inhibitor, PD98059, was also able to reduce cell death induced by NFAT1 and H-rasV12 activation in a dose-response manner (Fig. 4D). Although PD98059 is a selective inhibitor of MEK1/2, it has approximately 100-fold less affinity for MEK1/2 than does U0126 [44]. This could explain the lower level of cell death inhibition (30%) by PD98059 when compared to U0126 (90%; Fig. 4B and D).

To exclude the possibility that H-rasV12 could be cooperating with NFAT1 through pathways other than Raf/MEK, and to circumvent any possible nonspecificity of the drugs U0126 and PD98059, we used a constitutively active MEK1 protein (MEK1^{DD}) [35]. Transduction of NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells with the plasmid encoding MEK1^{DD} led to the phosphorylation of ERK1/2 at the same level as observed following

H-rasV12 overexpression (Fig. 4E). Furthermore, MEK1^{DD} expression was sufficient to bypass the need for H-rasV12 expression or PMA in the induction of cell death led by NFAT1 (Fig. 4F). Cells expressing CA-NFAT1-ER and MEK1^{DD} underwent cell death at levels comparable to those in cells expressing H-rasV12, solely in response to the activation of NFAT1 by OHT. PMA stimulation did not increase the cell death induced by NFAT1 activation and MEK1^{DD} expression, suggesting that the PMA-activated-pathway that cooperates with NFAT1 is, in fact, the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Fig. 4F). To exclude other possible roles of PMA-activated pathways in the induction of cell death, CA-NFAT1-ER-expressing cells were treated with PMA and OHT, and the MEK/ERK pathway was inhibited using U0126 (Fig. 4G). As shown previously, the activation of NFAT1 by OHT and stimulation by PMA strongly induced cell death. However, the inhibition of the ERK1/2 pathway completely blocked cell death in these cells (Fig. 4G).

Finally, we have previously shown that H-rasV12 expression in NIH3T3 cells is capable of inducing all the hallmarks of cell transformation including loss of contact-induced growth inhibition [16,45]. To visualize the transformation phenotype induced by H-rasV12, NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were infected with the plasmid encoding this oncogene or with an empty vector, and the proliferation kinetics were examined (Fig. 4H). Unlike control cells, which stopped growing once they reached confluence, the H-rasV12-expressing cells overgrew the monolayer and continued to proliferate beyond confluence. However, activation of NFAT1 by treatment with OHT in cells expressing CA-NFAT1-ER and H-rasV12 led to a complete repression of cell accumulation, which resulted in a large decrease in cell numbers (Fig. 4H). Surprisingly, unlike H-rasV12-expressing cells treated with the inhibitor U0126, which only displayed a small reduction in their cell proliferation profile, the MEK1/2 inhibitor apparently partially blocked the induction of cell death by NFAT1. However, these cells did not overgrow the monolayer and reached the level of cells expressing H-rasV12 in the absence of NFAT1 activation, as one might expect. This might be explained by two possible reasons: first, that the inhibitor U0126 might not completely block cell death induced by NFAT1 and H-rasV12, which is in agreement with Fig. 4B, where it inhibits only around 90% of cell death; or second, that NFAT1 signaling independent of MEK1/2 cooperation might influence cell proliferation (e.g. cell cycle entry) in confluent cell culture, inhibiting the monolayer overgrowth. In fact, we have previously shown that NFAT1 expression can induce cell cycle arrest in cultures [16]. However further experiments are needed to investigate this phenomenon. Altogether, these results demonstrate the need for an active Ras/Raf/MEK/ERK pathway for cooperation with the induction of cell death by NFAT1.

3.3. NFAT1 induces an apoptotic cell death phenotype that can be shifted to programmed-necrosis-like cell death by caspase inhibitors

NFAT1 activation clearly induces DNA fragmentation and the accumulation of a Sub-G₀ DNA content, which is indicative of cells undergoing apoptosis. We next asked whether NFAT1 could induce other phenotype characteristic of cells undergoing cell death by apoptosis. When NFAT1 was activated (OHT) in NIH3T3 cells in the presence of PMA, we observed increased phosphatidylserine exposition compared to controls, as analyzed by annexin V staining (Fig. 5A). The increase of annexin V positive cells was followed by cell permeabilization, as shown by 7-AAD incorporation, which is indicative of cells undergoing apoptosis followed by late necrosis cell membrane destabilization (Fig. 5A). To further analyze whether NFAT protein can induce apoptosis in NIH3T3 cells, caspase-3 activity was accessed. NFAT1 activation in cooperation with the Ras pathway led to a seven-fold induction of caspase-3 activity, which could be completely blocked by caspase-3 inhibitor, DEVD-fmk (Fig. 5B). A representative spectrum of the caspase-3 assay is shown for better visualization (Fig. 5C). Next, we examined the morphological characteristics of NIH3T3 cells dying under NFAT1 regulation. Accordingly, NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were treated with PMA alone or in the presence of OHT, and cellular morphology was visualized via phase contrast microscopy, while nuclear size and DNA condensation were analyzed by fluorescence microscopy of DAPI-stained DNA. Whereas cells treated with PMA alone displayed a normal fibroblastic appearance, made cell–cell contact and exhibited a normal nuclear size and no pyknotic nuclei, cells with activated NFAT1 were released from cell–cell contacts, had suffered cell shrinkage and exhibited the formation of pyknotic nuclei at 48 h (Arrows, Fig. 5D). These phenotypes increased at 72 h, when more cells displayed these characteristics when NFAT1 was activated, as represented by the formation of pyknotic nuclei observed at a lower magnification (Wide view; Fig. 5D).

To further investigate the apoptotic cell death induced by NFAT1, we checked whether the pan-caspase inhibitor ZVAD-fmk could

abolish the cell death induced by this factor. For this purpose, NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were treated with OHT to activate NFAT1 and with PMA when indicated, and cell death was analyzed based on a Sub-G₀ DNA profile and propidium iodide staining in permeable cells. As expected, only a very small number of cells had undergone DNA fragmentation 24 h after stimulation with OHT and PMA in the presence or absence of ZVAD-fmk (Fig. 5E; left panel). Furthermore, ZVAD-fmk alone or in single combination with OHT or PMA did not induce significant cell death, demonstrating that this caspase inhibitor is not by itself responsible for the induction of cell death (Fig. 5E). However, surprisingly, approximately 90% of the cells treated with OHT and PMA in the presence of ZVAD-fmk were permeable at 24 h, as shown by propidium iodide staining (Fig. 5E; right panel). The incorporation of propidium iodide was not through passive incorporation and reflected cell death since control cells did not stain for PI and all cells from ZVAD-fmk treated wells in the presence of OHT and PMA were loose and did not re-adhere to plate after treatment removal (data not shown). Because almost all of the cells treated with OHT and PMA had died in the presence of ZVAD-fmk at 24 h but lacked DNA fragmentation, we assumed that this outcome might not be due to apoptosis but ZVAD-fmk might have shifted to another cell death modality as programmed necrosis. One of the best-studied and fundamental biochemical pathways involved in programmed necrosis is regulated by RIP1 kinase, and the inhibition of this kinase by necrostatin-1 can block this cell death modality [46]. As shown in Fig. 5E, the addition of necrostatin-1 completely blocked cell death induced by OHT and PMA in the presence of ZVAD-fmk, supporting the idea that NFAT1 can induce apoptotic cell death which can be shifted most likely to programmed necrosis by caspase inhibitors (Fig. 5E; right panel).

3.4. TNF- α expression regulated by NFAT1 and the Ras/MAPK pathway is responsible for the induction of cell death

To determine which gene involved in cell death regulation is being induced by NFAT1 in cooperation with the Ras/MAPK pathway, we performed a screening of apoptosis-related genes using a real-time PCR assay (RT² Profiler PCR array). mRNA from NIH3T3-CA-NFAT1-ER-expressing cells was isolated 24 h after stimulation with PMA alone or in the presence of OHT, since 24 h is the NFAT1 transactivation peak and there is no apparent cell death at that time. NFAT1 activation, in cooperation with PMA, led to a 5656-fold up-regulation of TNF- α mRNA levels and more discrete increases in TRAF-1 (223 fold), TRAIL (47 fold), Pak-7 (25 fold) and Fas receptor (7 fold) (Fig. 6A). The expression of the other 79 genes showed changes of less than 2 fold, which is a good indication that the experiment was conducted correctly and that NFAT1 actually only regulates the mentioned genes in this model. Because TNF- α was the most up-regulated gene and is a direct inducer of cell death through apoptosis, we next analyzed protein production for this cytokine. NIH3T3-CA-NFAT1-ER-expressing cells were stimulated by OHT and/or PMA or left unstimulated, and TNF- α accumulation was analyzed by ELISA (Fig. 6B). While stimulation with OHT or PMA alone did not induce TNF- α production at any time point checked, activation of NFAT1 and the Ras/MAPK pathway by PMA led to the accumulation of TNF- α at 24 h after stimulation, with a production peak at 48 h (Fig. 6B), which correlates with the cell death data shown above. TNF- α production is completely dependent on the activation of both NFAT1 and the Ras/Raf/MEK/ERK pathway as demonstrated in Fig. 6C. While TNF- α production induced by NFAT1 (OHT) was completely dependent on the PMA activated pathway, it could be recapitulated by H-rasV12 or MEK1^{DD} but not by Empty Vector expression (Fig. 6C), suggesting that Ras/Raf/MEK/ERK pathway is sufficient to cooperate with NFAT1 to the production of TNF- α . Furthermore, the inhibition of MEK1/2 by U0126 completely abolished TNF- α production induced by NFAT1 in cooperation with PMA or H-rasV12,

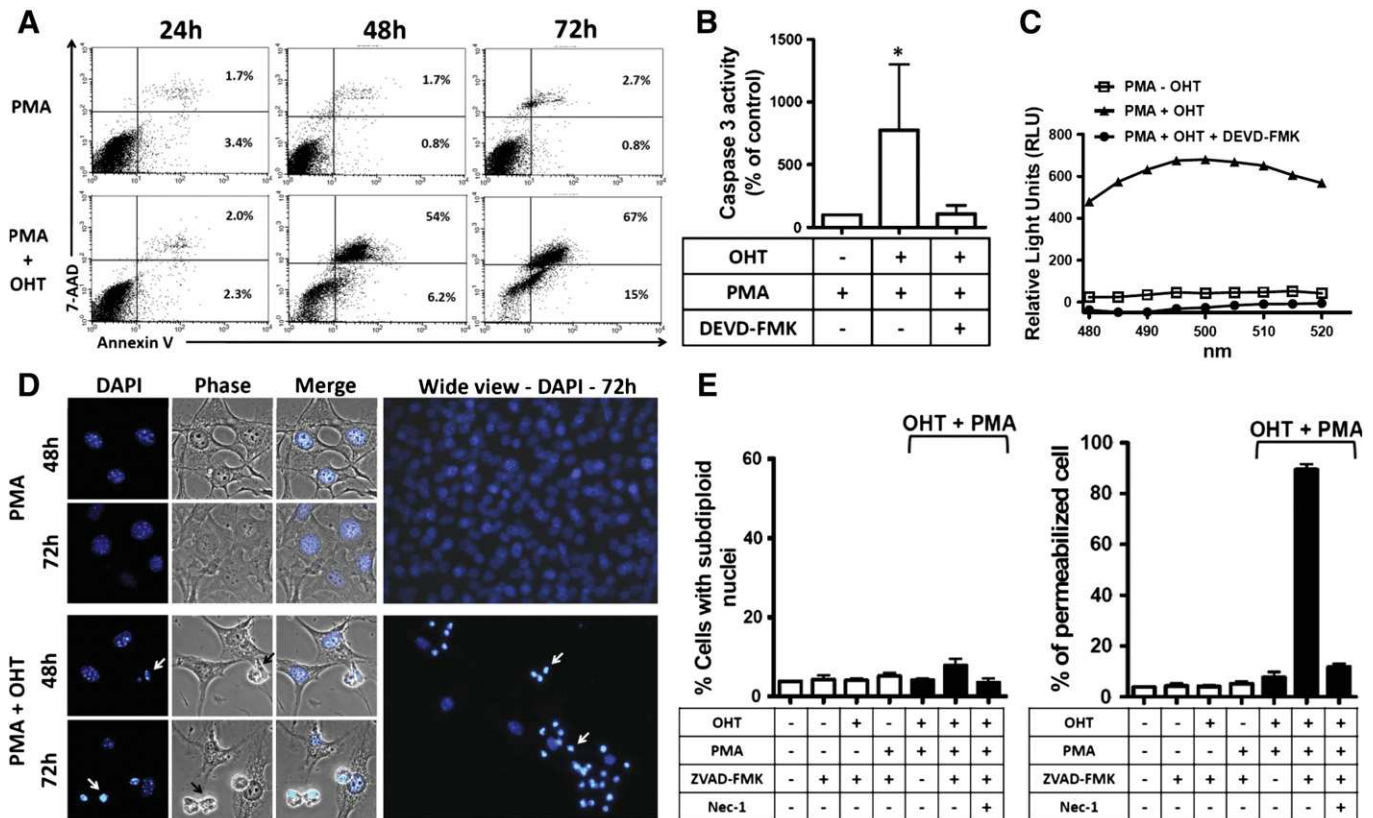


Fig. 5. NFAT1 induces an apoptotic cell death phenotype that can be shifted to programmed-necrosis-like cell death by caspase inhibitors. NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were used for all experiments. **A)** Apoptotic cell death accompanied by phosphatidylserine exposition. Cells were plated and treated with PMA (20 nM) and OHT (100 nM) when indicated. At the specified time, cells were harvested and stained with Annexin-V and 7-AAD. Cells were analyzed via flow cytometry to detect phosphatidylserine exposition and cell permeabilization. **B and C)** Caspase-3 activity assay. Cells were plated, treated with PMA (20 nM) and OHT (100 nM) when indicated and harvested 48 h later. Caspase-3 activity was assessed, and as a control, the caspase-3 inhibitor DEVD-FMK was used as described. The fluorescence of cell extracts was analyzed with excitation at 400 nm and emission at 505 nm (B) or by excitation at 480 nm and with a screening emission of 480 to 520 nm (C). **B)** Caspase-3 activity was normalized and expressed as a % relative to cells treated only with PMA. SD values indicate the variance of at least three independent experiments, and (*) indicates $p \leq 0.001$. **C)** Representative spectrum from (B). **D)** Analysis of the formation of pyknotic nuclei and cell morphology. Cells were plated and treated 24 h later with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) as indicated. At the specified time, cells were stained with DAPI and analyzed by fluorescence or phase contrast microscopy. Cells undergoing the formation of pyknotic nuclei (white arrows) and displaying apoptotic morphology (black arrows) are indicated. **E)** Cell death analysis based on the formation of subdiploid nuclei (Sub- G_0 ; left panel) and cell permeabilization (right panel). Cells were pre-treated when indicated with 20 μ M Pan caspase inhibitor (ZVAD-FMK) and 20 μ M necrostatin-1 (Nec1) for 2 h prior to treatment with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) and cultured for 24 h. Cells were then stained with PI and analyzed by flow cytometry for DNA content and cell permeabilization, as described. SD values indicate the variance of at least three independent experiments.

suggesting that the Ras/Raf/MEK/ERK pathway is necessary to cooperate with NFAT1 for the production of TNF- α . To investigate whether TNF- α is directly implicated in cell death induction in NIH3T3 cells, we stimulated these cells with OHT and PMA and tested whether TNF- α neutralization could prevent cell death. While control cells underwent cell death as expected, pre-treatment of these cells with the neutralizing TNF- α antibody reduced cell death in a dose-response manner, with the maximum reduction reaching approximately 80% (Fig. 6D). These data support a direct involvement of TNF- α accumulation in the induction of cell death in NIH3T3 cells. However, since TNF- α , when bound to its receptor, TNFR1, can activate three main pathways, an inflammatory, an apoptotic or a necrotic pathway, we next evaluated whether TNF- α was directly and solely responsible for the phenotypes induced by NFAT1. To examine whether TNF- α is capable to induce cell death by apoptosis, NIH3T3 wild type cells were treated with recombinant mouse TNF- α to obtain a concentration-response curve (Fig. 6E). TNF- α addition led to an induction of the cell death in a concentration-dependent manner leading to massive subdiploid nuclei formation accompanied by cell permeabilization at 72 h (Fig. 6E). Furthermore, the addition of recombinant TNF- α to NIH3T3 cells completely recapitulated the cell death phenotype induced by NFAT1 and PMA in the presence of

pan-caspase inhibitor, ZVAD-fmk (Figs. 5E and 6F). While TNF- α or ZVAD-fmk alone did not induce significant cell death at an early time point (24 h) when evaluated by subdiploid nuclei formation or by cell permeabilization (Fig. 6F), they promptly induced cell death in combination (TNF- α plus ZVAD-fmk; Fig. 6F). Cells treated with TNF- α and ZVAD-fmk displayed high level of cell permeabilization but no significant level of cells with DNA fragmentation, an indicative of cells undergoing programmed necrosis (Fig. 6F). Corroborating these data, the process of cell death was almost completely blocked by necrostatin-1 (Fig. 6F, right panel). These data support a mechanism where TNF- α can activate a primary apoptotic pathway in NIH3T3 cells that can be shifted to a programmed necrotic pathway when caspases are blocked. Altogether, these data support the idea that NFAT1 activation, in cooperation with the Ras/Raf/MEK/ERK pathway, is able to induce TNF- α production and accumulation, and that this phenomenon is directly implicated in the induction of cell death in NIH3T3 cells.

4. Discussion

Although the function of NFAT proteins is better characterized in the regulation of the immune response, recent works have postulated

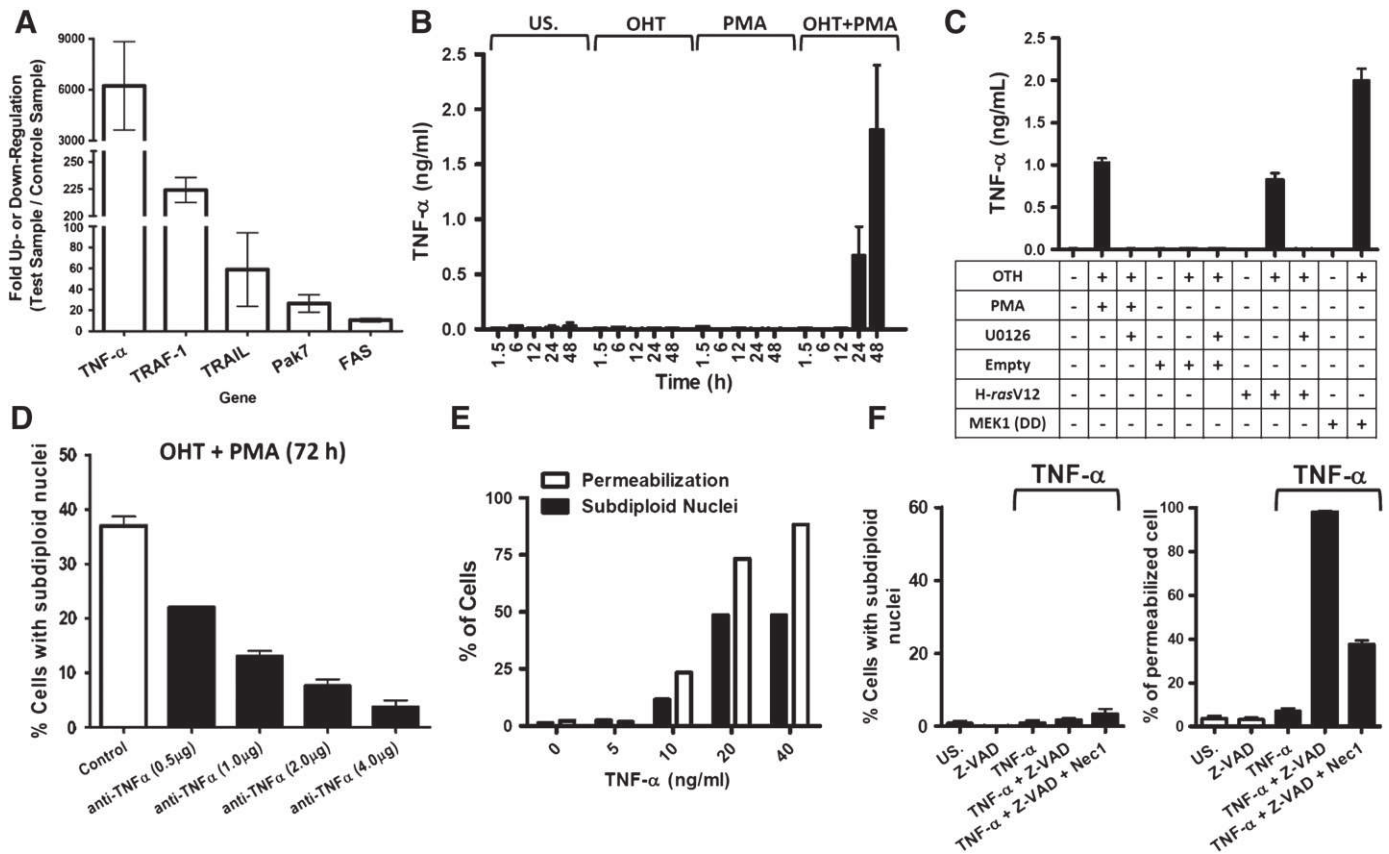


Fig. 6. NFAT1 induces cell death through up-regulation of TNF- α expression in cooperation with the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. NIH3T3-CA-NFAT1-ER-expressing cells were used for all experiments. A) SuperArray analysis of gene expression regulated by NFAT1. Cells were plated and treated with PMA (20 nM) alone (Control Sample) or PMA (20 nM) with OHT (100 nM) (Test Sample). After 24 h, mRNA was extracted and used for real-time SuperArray analysis, as described. The fold change values are relative to the Control Sample. Bars indicate the range of two independent experiments. B and C) Analysis of TNF- α protein levels. NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells non-transduced (B) or transduced with Empty-, H-rasV12- or MEK1^{DD}-expressing vectors (C) were plated and treated with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) as indicated, and the cell-free supernatant was assessed for TNF- α protein levels by ELISA at the indicated time, as described, or at 48 h in Figure C. When indicated, cells were pre-treated with U0126 (20 μ M) 2 h prior to stimulation. US. denotes unstimulated cells. D and E) Cell death analyzed based on the formation of subdiploid nuclei (Sub-G₀). D) NIH3T3-CA-NFAT1-ER cells were pre-treated when indicated with variable amounts of a TNF- α neutralizing antibody (anti-TNF- α) for 2 h prior to treatment with OHT (100 nM) and PMA (20 nM) and cultured for 72 h. Cells were stained with PI and analyzed by flow cytometry to determine their DNA content at the specified time. E) NIH3T3 *wild type* cells were treated with variable amounts recombinant murine TNF- α and cultured for 72 h. Cells were stained with PI and analyzed by flow cytometry to determine their DNA content and cell permeabilization. F) Cell death analysis based on the formation of subdiploid nuclei (Fig. 6F, left panel) and cell permeabilization (Fig. 6F, right panel). Cells were pre-treated when indicated with 20 μ M Pan caspase inhibitor (ZVAD-FMK) and 20 μ M necrostatin-1 (Nec1) for 2 h prior to treatment with recombinant murine TNF- α (20 ng) and cultured for 24 h. Cells were then stained with PI and analyzed by flow cytometry for DNA content and cell permeabilization, as described. B, C, D, E and F) SD values indicate the variance of at least three independent experiments.

a major involvement of this family of transcription factors in tumor development and progression [4]. We, and others, have previously proposed that NFAT1 can function as a tumor suppressor gene, possibly through the induction of cell death in transformed cells [15,16]. However, the mechanism by which NFAT1 might exert this role is still elusive. Here, we have shown that NFAT1 protein can induce cell death in NIH3T3 fibroblasts, in cooperation with the oncogenic H-ras pathway (Figs. 2 and 3). It has been demonstrated that NF κ B can cooperate with NFAT in the induction of cell death in aggressive B-cell lymphomas through the induction of B-lymphocyte stimulator (Blys) [47]. Despite the activation of NF κ B by PMA, this pathway was not found to cooperate in the induction of cell death by NFAT1 (Fig. 3). Furthermore, we determined that the activation of the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 pathway is fundamental for the induction of cell death by NFAT1, whereas JNK and p38 MAPK activation is dispensable (Fig. 4). NFAT1 can induce a mixed mode of cell death consisting predominantly of apoptotic phenotype cell death that can be shifted for a programmed necrotic cell death pathway in the presence of caspase inhibitors (Fig. 5). Finally, NFAT1, in cooperation with the H-ras pathway, induces cell death through the up-regulation of TNF- α gene and protein production, which can be almost completely abolished by

neutralization of TNF- α (Fig. 6). These data support the idea that cooperation between NFAT1 and the Ras/Raf/MEK/ERK pathway is involved in the induction of cell death through TNF- α production and possibly in tumor suppression initiated by this transcription factor.

The Ras/Raf/MEK/ERK pathway is most often associated with the induction of cell transformation and tumor progression, being activated in over 90% of pancreatic cancers, 66% of all melanomas and 50% of most types of carcinoma [48]. Activated ERK1/2 phosphorylates and regulates the activities of an ever growing roster of substrates that are estimated to compromise over 160 proteins, including several kinases, phosphatases, transcription factors and cytoskeletal proteins [49]. Furthermore, depending on the particular cell type involved, ERK signaling can regulate processes involved in cell transformation, such as proliferation, differentiation, survival, migration, angiogenesis and chromatin remodeling [48]. However, recent works have postulated that ERK signaling can also induce the cell death machinery directly via the up-regulation of the pro-apoptotic proteins Bax and p53, or indirectly by sensitizing tumor cells through the up-regulation of TRAIL death receptor 4 [50–53]. These data support a dual role for ERK signaling, which might exert a pro- or anti-tumorigenic effect depending on the presence of other still not well-characterized pathways. Our data support the idea

that the NFAT1 pathway can cooperate with ERK1/2 signaling in the induction of cell death and, thus, in accord with our previously published data, possibly cooperate in the induction of a tumor suppression phenotype [16].

Apoptosis operates in adult organisms to maintain normal cellular homeostasis. Violation of this cellular process can result in cancer, autoimmunity, and other diseases. The apoptotic pathway is morphologically characterized by rounding-up of cells, reduction of the cellular volume, and chromatin condensation and fragmentation, while biochemically, it involves caspase activation, culminating in caspase-3 activation, and exposition of phosphatidylserine [54]. As demonstrated here, NFAT1 can induce all of these characteristics in NIH3T3 fibroblasts. It was previously proposed that NFAT proteins can induce apoptosis in different models and cell types, such as in T-lymphocytes, fibroblasts, and neurons, though the mechanism underlying this function is still controversial [16,17,55,56]. NFAT1 is highly expressed in peripheral T cells involved in controlling the termination of the immune response by inducing apoptosis. Activation-induced cell death (AICD) is a particular form of apoptosis that is important for the maintenance of immune system homeostasis. One important route of AICD is the activation of so-called death receptors by their ligands, particularly, FasL, TNF- α , and, more recently, TRAIL. Here, we show that in coordination with ERK1/2 signaling, NFAT1 proteins can robustly up-regulate TNF- α gene expression and, more discretely, that of the TRAIL gene, whereas no effect on FasL expression was detected, in NIH3T3 cells. Moreover, TNF- α protein expression was associated with at least 80% of the total cell death observed, supporting a key role for this cytokine in the induction of apoptosis in this model. NFAT1 activation also led to the up-regulation of other genes involved in cell death, such as TRAF-1 and the FAS receptor (Fig. 6A). Although transcriptional regulation of TRAF-1 by NFAT1 has not been described, this up-regulation could represent indirect regulation via NF- κ B activation through the ligation of TNF- α to its receptor [57]. Furthermore, although the up-regulation of the FAS receptor through NFAT1 activation could be involved in the induction of cell death in NIH3T3 cells, there was no significant detection of FasL mRNA that could explain this phenomenon (data not shown). NFAT1 was apparently able to induce different cell death pathways consisting mainly of apoptosis but with a contribution of programmed necrotic cell death in the presence of inhibited caspases. Recent pharmacological and genetic evidence suggests that necrosis can occur in a tightly regulated fashion and mediate programmed cell death, in which signaling through RIP1 kinase appears to be essential [58]. Although this hypothesis is still controversial, programmed necrosis might have large implications in cancer development and, possibly, treatment because several cancer cell lines are sensitive to this death modality when treated with DNA damaging compounds or with death receptor ligands, such as TRAIL and TNF- α [59]. Programmed necrosis generally only occurs in cells where the apoptotic protein caspase-8 is inhibited by a caspase inhibitor, such as Z-VAD-fmk, or in cells that overexpress the caspase-8 inhibitor FLICE-inhibitory protein short isoform (FLIPs) [60]. Our data clearly show that NFAT1 can induce cell death through programmed necrosis in the presence of Z-VAD-fmk, as characterized by the observation of cell permeabilization without nuclear fragmentation and by the dependency of the activity of RIP1 kinase, as shown using its inhibitor necrostatin-1 (Fig. 5E). In vivo, the inhibition of programmed necrosis by necrostatin-1 was shown to delay ischemic brain injury in mice, inhibit myocardial cell death, and reduce infarct size [61]. One interesting correlation is that TNF- α is one of the main molecules involved in this pathology and that NFAT1 protein is expressed in both the brain and myocardial cells. Altogether, these data support a possible mechanism through which NFAT1 could regulate the induction of cell death via apoptosis and, in the presence of inhibited caspases as in cells that overexpress FLICE protein, could induce programmed necrosis, contributing to further understanding the involvement of this transcription factor in cancer, immune response termination and, possibly, brain and heart injuries.

The regulation of TNF- α expression by NFAT1 could account for both the apoptotic and the programmed necrotic cell death observed in NIH3T3 cells. Ligation of TNF- α to its receptor, TNFR1, can activate three main pathways: (1) NF- κ B, leading to a pro-inflammatory and anti-apoptotic response; (2) caspases, leading to apoptosis; and (3) RIP1 and RIP3, in the absence of caspase-8 activity, which leads to necrotic cell death [61]. TNF- α transcription can be activated in the immune system by a diverse group of well-described stimuli depending on the cell type involved, such as through toll-like receptor activation (TLR), T- and B-cell receptor antigen ligation, and stimulation by cytokines such as IL-1, IFN- γ and TNF- α itself [62]. The TNF- α proximal promoter displays a highly conserved region of approximately 200 nucleotides in mammals that contains binding motifs that can be recognized by transcription factors activated downstream of these stimuli [62]. Six NFAT binding sites have been identified in the TNF- α promoter, in addition to four Ets/Elk, two Sp1, and one ATF-2/c-Jun binding sites [62–64]. It has previously been demonstrated that NFAT signaling can cooperate with downstream pathways activated by JNK and p38 kinases in the transactivation of the TNF- α gene, possibly through the activation of and cooperation with the ATF-2 and c-Jun transcription factors [65–67]. Here, we have shown that in H-rasV12-transformed fibroblasts, both the NFAT1 and ERK1/2 signaling pathways are fundamental for the transcriptional up-regulation of the TNF- α gene, while JNK and p38 signaling are dispensable. Mechanistically, ERK1/2 kinases could augment the DNA binding activity of NFAT directly by phosphorylating its N- and C-termini, which would culminate in increased binding of NFAT to the TNF- α promoter and, thus, increased expression [68]. However, ERK1/2 signaling can also activate the Elk-1, SP-1, ATF-2 and c-Jun transcription factors, which could bind to the TNF- α promoter and cooperate with NFAT1 to induce TNF- α expression [49]. Although our data clearly show cooperation between NFAT1 and ERK1/2 in TNF- α gene regulation, further experiments are needed to specify which signal downstream of ERK is responsible for this phenomenon.

While the major obstacle to the therapeutic exploitation of TNF- α for cancer treatment is its ability to elicit a systemic inflammatory response syndrome, the expression of NFAT1 proteins in tumors exhibiting an activated Ras/Raf/MEK/ERK pathway could lead to massive local production of TNF- α and, thus, induce tumor suppression with a lower systemic inflammatory effect. Furthermore, the Ras/Raf/MEK/ERK oncogenic pathway might sensitize transformed cells to NFAT1-induced cell death, and thus, NFAT1 could convert a well-characterized oncogenic pathway to become a tumor suppressor pathway. NFAT1 overexpression could be a potential mechanism to be exploited in gene therapy for cancers that exhibit the over-activation of the MEK/ERK pathway, leading to more-specific, targeted treatment.

Acknowledgements

We are especially grateful to Dr. A. Rao for kindly providing the NFAT reagents and to Dr. B.L. Diaz for providing the MAPK reagents. We are grateful to M.A. Rajão for confocal microscope technical support, Dr. G. Evan for the pBabe-c-mycERTM plasmid, Dr. S. Lowe for the pBabe-H-rasV12 and pBabe-I κ B α -mut plasmids, and Dr. W. Hahn for the pBabe-MEK1^{DD} plasmid. This work was supported by grants to J.P.B.V. from the ICGEB (CRP/BRA09-01), CNPq (478780/2010-9), FAPERJ (102.357/2009) and INCT-Cancer (573806/2008-0 and 170.026/2008). B.K.R. was supported by a CAPES fellowship and P.I.L. was supported by a Brazilian Ministry of Health fellowship.

References

- [1] A. Rao, C. Luo, P.G. Hogan, Transcription factors of the NFAT family: regulation and function, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 707–747.
- [2] F. Macian, NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 472–484.
- [3] I.A. Graef, F. Chen, G.R. Crabtree, NFAT signaling in vertebrate development, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11 (2001) 505–512.

- [4] M. Mancini, A. Toker, NFAT proteins: emerging roles in cancer progression, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 810–820.
- [5] N.A. Clipstone, G.R. Crabtree, Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation, *Nature* 357 (1992) 695–697.
- [6] J. Park, N.R. Yaseen, P.G. Hogan, A. Rao, S. Sharma, Phosphorylation of the transcription factor NFATp inhibits its DNA binding activity in cyclosporin A-treated human B and T cells, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20653–20659.
- [7] J. Jain, C. Loh, A. Rao, Transcriptional regulation of the IL-2 gene, *Curr. Opin. Immunol.* 7 (1995) 333–342.
- [8] H.D. Youn, T.A. Chatila, J.O. Liu, Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis, *EMBO J.* 19 (2000) 4323–4331.
- [9] J.P. Viola, L.D. Carvalho, B.P. Fonseca, L.K. Teixeira, NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38 (2005) 335–344.
- [10] G.P. Mogno, P.S. de Araujo-Souza, B.K. Robbs, L.K. Teixeira, J.P. Viola, Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements, *Cell Cycle* 11 (2012) 1014–1028.
- [11] M.R. Hodge, A.M. Ranger, F. Charles de la Brousse, T. Hoey, M.J. Grusby, L.H. Glimcher, Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice, *Immunity* 4 (1996) 397–405.
- [12] S. Xanthoudakis, J.P. Viola, K.T. Shaw, C. Luo, J.D. Wallace, P.T. Bozza, D.C. Luk, T. Curran, A. Rao, An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1, *Science* 272 (1996) 892–895.
- [13] K. Schuh, B. Kneitz, J. Heyer, U. Bommhardt, E. Jankevics, F. Berberich-Siebelt, K. Pfeffer, H.K. Muller-Hermelink, A. Schimpl, E. Serfling, Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 2456–2466.
- [14] M.S. Caetano, A. Vieira-de-Abreu, L.K. Teixeira, M.B. Werneck, M.A. Barcinski, J.P. Viola, NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression, *FASEB J.* 16 (2002) 1940–1942.
- [15] A.M. Ranger, L.C. Gerstenfeld, J. Wang, T. Kon, H. Bae, E.M. Gravalles, M.J. Glimcher, L.H. Glimcher, The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 9–22.
- [16] B.K. Robbs, A.L. Cruz, M.B. Werneck, G.P. Mogno, J.P. Viola, Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 7168–7181.
- [17] S. Chuvpilo, E. Jankevics, D. Tyrins, A. Akimzhanov, D. Moroz, M.K. Jha, J. Schulze-Luehmann, B. Santner-Nanan, E. Feoktistova, T. Konig, A. Avots, E. Schmitt, F. Berberich-Siebelt, A. Schimpl, E. Serfling, Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis, *Immunity* 16 (2002) 881–895.
- [18] E. Kondo, A. Harashima, T. Takabatake, H. Takahashi, Y. Matsuo, T. Yoshino, K. Orita, T. Akagi, NF-ATc2 induces apoptosis in Burkitt's lymphoma cells through signaling via the B cell antigen receptor, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 1–11.
- [19] A.M. Pedrosa, R. Weinlich, G.P. Mogno, B.K. Robbs, J.P. Viola, A. Campa, G.P. Amarante-Mendes, Melatonin protects CD4+ T cells from activation-induced cell death by blocking NFAT-mediated CD95 ligand upregulation, *J. Immunol.* 184 (2010) 3487–3494.
- [20] D.V. Faget, P.I. Lucena, B.K. Robbs, J.P. Viola, NFAT1 C-terminal domains are necessary but not sufficient for inducing cell death, *PLoS One* 7 (2012).
- [21] W.L. Blalock, C. Weinstein-Oppenheimer, F. Chang, P.E. Hoyle, X.Y. Wang, P.A. Algate, R.A. Franklin, S.M. Oberhaus, L.S. Steelman, J.A. McCubrey, Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs, *Leukemia* 13 (1999) 1109–1166.
- [22] J.A. McCubrey, L.S. Steelman, W.H. Chappell, S.L. Abrams, E.W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D.M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A.M. Martelli, R.A. Franklin, Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 1263–1284.
- [23] L.S. Steelman, S.C. Pohnert, J.G. Shelton, R.A. Franklin, F.E. Bertrand, J.A. McCubrey, JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis, *Leukemia* 18 (2004) 189–218.
- [24] H. Rajagopalan, A. Bardelli, C. Lengauer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status, *Nature* 418 (2002) 934.
- [25] K.E. Mercer, C.A. Pritchard, Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target, *Biochim. Biophys. Acta* 1653 (2003) 25–40.
- [26] G. Singer, R. Oldt III, Y. Cohen, B.G. Wang, D. Sidransky, R.J. Kurman, M. Shih Ie, Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 484–486.
- [27] M.D. Vos, A. Martinez, C.A. Ellis, T. Vallecora, G.J. Clark, The pro-apoptotic Ras effector Nore1 may serve as a Ras-regulated tumor suppressor in the lung, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 21938–21943.
- [28] N.L. Sieben, P. Macropoulos, G.M. Roemen, S.M. Kolkman-Uljee, G. Jan Fleuren, R. Houmadi, T. Diss, B. Warren, M. Al Adnani, A.P. De Goeij, T. Krausz, A.M. Flanagan, In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours, *J. Pathol.* 202 (2004) 336–340.
- [29] P.J. Roberts, C.J. Der, Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer, *Oncogene* 26 (2007) 3291–3310.
- [30] C. Loh, J.A. Carew, J. Kim, P.G. Hogan, A. Rao, T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 3945–3954.
- [31] H. Okamura, J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J.P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiliani, X. Zhang, J. Qin, P.G. Hogan, A. Rao, Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity, *Mol. Cell* 6 (2000) 539–550.
- [32] L.K. Teixeira, B.P. Fonseca, A. Vieira-de-Abreu, B.A. Barboza, B.K. Robbs, P.T. Bozza, J.P. Viola, IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation, *J. Immunol.* 175 (2005) 5931–5939.
- [33] T.D. Littlewood, D.C. Hancock, P.S. Danielian, M.G. Parker, G.I. Evan, A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 1686–1690.
- [34] M. Serrano, A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, S.W. Lowe, Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a, *Cell* 88 (1997) 593–602.
- [35] J.S. Boehm, J.J. Zhao, J. Yao, S.Y. Kim, R. Firestein, I.F. Dunn, S.K. Sjöström, L.A. Garraway, S. Weremowicz, A.L. Richardson, H. Greulich, C.J. Stewart, L.A. Mulvey, R.R. Shen, L. Ambrogio, T. Hirozane-Kishikawa, D.E. Hill, M. Vidal, M. Meyerson, J.K. Grenier, G. Hinkle, D.E. Root, T.M. Roberts, E.S. Lander, K. Polyak, W.C. Hahn, Integrative genomic approaches identify IKKBE as a breast cancer oncogene, *Cell* 129 (2007) 1065–1079.
- [36] K.E. Hedin, M.P. Bell, K.R. Kalli, C.J. Huntoon, B.M. Sharp, D.J. McKean, Delta-opioid receptors expressed by Jurkat T cells enhance IL-2 secretion by increasing AP-1 complexes and activity of the NF-AT/AP-1-binding promoter element, *J. Immunol.* 159 (1997) 5431–5440.
- [37] H.L. Pahl, P.A. Baeuerle, A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B, *EMBO J.* 14 (1995) 2580–2588.
- [38] A.J. Shaywitz, M.E. Greenberg, CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 821–861.
- [39] T.A. McKinsey, C.L. Zhang, E.N. Olson, MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 40–47.
- [40] R.R. Ahangarani, W. Janssens, V. Carlier, L. Vanderelst, T. Vandendriessche, M. Chuah, M. Jacquemin, J.M. Saint-Remy, Retroviral vectors induce epigenetic chromatin modifications and IL-10 production in transduced B cells via activation of toll-like receptor 2, *Mol. Ther.* 19 (2011) 711–722.
- [41] J.P. Roose, M. Mollenauer, V.A. Gupta, J. Stone, A. Weiss, A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 4426–4441.
- [42] B. Ko, L.M. Joshi, L.L. Cooke, N. Vazquez, M.W. Musch, S.C. Hebert, G. Gamba, R.S. Hoover, Phorbol ester stimulation of RasGRP1 regulates the sodium-chloride cotransporter by a PKC-independent pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 20120–20125.
- [43] J.Y. Byun, C.H. Yoon, S. An, I.C. Park, C.M. Kang, M.J. Kim, S.J. Lee, The Rac1/MKK7/JNK pathway signals upregulation of Atg5 and subsequent autophagic cell death in response to oncogenic Ras, *Carcinogenesis* 30 (2009) 1880–1888.
- [44] M.F. Favata, K.Y. Horiuchi, E.J. Manos, A.J. Daulerio, D.A. Stradley, W.S. Feeser, D.E. Van Dyk, W.J. Pitts, R.A. Earl, F. Hobbs, R.A. Copeland, R.L. Magolda, P.A. Scherle, J.M. Trzaskos, Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18623–18632.
- [45] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [46] D. Moquin, F.K. Chan, The molecular regulation of programmed necrotic cell injury, *Trends Biochem. Sci.* 35 (2010) 434–441.
- [47] L. Fu, Y.C. Lin-Lee, L.V. Pham, A. Tamayo, L. Yoshimura, R.J. Ford, Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BlyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas, *Blood* 107 (2006) 4540–4548.
- [48] A.S. Dhillion, S. Hagan, O. Rath, W. Kolch, MAP kinase signalling pathways in cancer, *Oncogene* 26 (2007) 3279–3290.
- [49] S. Yoon, R. Seger, The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions, *Growth Factors* 24 (2006) 21–44.
- [50] K.G. Drosopoulos, M.L. Roberts, L. Cermak, T. Sasazuki, S. Shirasawa, L. Anders, A. Pintzas, Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 22856–22867.
- [51] Y.K. Kim, H.J. Kim, C.H. Kwon, J.H. Kim, J.S. Woo, J.S. Jung, J.M. Kim, Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells, *J. Appl. Toxicol.* 25 (2005) 374–382.
- [52] B.G. Park, C.I. Yoo, H.T. Kim, C.H. Kwon, Y.K. Kim, Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells, *Toxicology* 215 (2005) 115–125.
- [53] D.W. Li, J.P. Liu, Y.W. Mao, H. Xiang, J. Wang, W.Y. Ma, Z. Dong, H.M. Pike, R.E. Brown, J.C. Reed, Calcium-activated Raf/MEK/ERK signaling pathway mediates p53-dependent apoptosis and is abrogated by alpha B-crystallin through inhibition of RAS activation, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 4437–4453.
- [54] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Picentini, B. Zhivotovskiy, G. Melino, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 3–11.
- [55] K. Yao, Y.Y. Cho, H.R. Bergen III, B.J. Madden, B.Y. Choi, W.Y. Ma, A.M. Bode, Z. Dong, Nuclear factor of activated T3 is a negative regulator of Ras-JNK1/2-AP-1 induced cell transformation, *Cancer Res.* 67 (2007) 8725–8735.
- [56] S. Alvarez, A. Blanco, M. Fresno, M.A. Munoz-Fernandez, TNF-alpha contributes to caspase-3 independent apoptosis in neuroblastoma cells: role of NFAT, *PLoS One* 6 (2011) e16100.

- [57] H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich, Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 45–65.
- [58] D.R. Green, A. Oberst, C.P. Dillon, R. Weinlich, G.S. Salvesen, RIPK-dependent necrosis and its regulation by caspases: a mystery in five acts, *Mol. Cell* 44 (2011) 9–16.
- [59] P. Kreuzaler, C.J. Watson, Killing a cancer: what are the alternatives? *Nat. Rev. Cancer* 12 (2012) 411–424.
- [60] R. Weinlich, C.P. Dillon, D.R. Green, Ripped to death, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) 630–637.
- [61] F. Van Herreweghe, N. Festjens, W. Declercq, P. Vandenabeele, Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 1567–1579.
- [62] J.V. Falvo, A.V. Tsytsykova, A.E. Goldfeld, Transcriptional control of the TNF gene, *Curr. Dir. Autoimmun.* 11 (2010) 27–60.
- [63] A.E. Goldfeld, P.G. McCaffrey, J.L. Strominger, A. Rao, Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 1365–1379.
- [64] E.Y. Tsai, J. Jain, P.A. Pesavento, A. Rao, A.E. Goldfeld, Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 459–467.
- [65] E.Y. Tsai, J. Yie, D. Thanos, A.E. Goldfeld, 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.* 16 (1996) 5232–5244.
- [66] T. Ishizuka, N. Terada, P. Gerwins, E. Hamelmann, A. Oshiba, G.R. Fanger, G.L. Johnson, E.W. Gelfand, Mast cell tumor necrosis factor alpha production is regulated by MEK kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 6358–6363.
- [67] M.C. Lawrence, B. Naziruddin, M.F. Levy, A. Jackson, K. McGlynn, Calcineurin/nuclear factor of activated T cells and MAPK signaling induce TNF- α gene expression in pancreatic islet endocrine cells, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 1025–1036.
- [68] B. Sanna, O.F. Bueno, Y.S. Dai, B.J. Wilkins, J.D. Molkenin, Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 865–878.

ANEXO II

NFAT2 Isoforms Differentially Regulate Gene Expression, Cell Death, and Transformation through Alternative N-Terminal Domains

Pedro I. Lucena,^a Douglas V. Faget,^a Emilia Pachulec,^a Marcela C. Robaina,^b Claudete E. Klumb,^b Bruno K. Robbs,^{a*}
 João P. B. Viola^a

Program of Cellular Biology, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil^a; Program of Molecular Hemato-Oncology, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil^b

The NFAT (nuclear factor of activated T cells) family of transcription factors is composed of four calcium-responsive proteins (NFAT1 to -4). The NFAT2 (also called NFATc1) gene encodes the isoforms NFAT2 α and NFAT2 β that result mainly from alternative initiation exons that provide two different N-terminal transactivation domains. However, the specific roles of the NFAT2 isoforms in cell physiology remain unclear. Because previous studies have shown oncogenic potential for NFAT2, this study emphasized the role of the NFAT2 isoforms in cell transformation. Here, we show that a constitutively active form of NFAT2 α (CA-NFAT2 α) and CA-NFAT2 β distinctly control death and transformation in NIH 3T3 cells. While CA-NFAT2 α strongly induces cell transformation, CA-NFAT2 β leads to reduced cell proliferation and intense cell death through the upregulation of tumor necrosis factor alpha (TNF- α). CA-NFAT2 β also increases cell death and upregulates Fas ligand (FasL) and TNF- α in CD4⁺ T cells. Furthermore, we demonstrate that differential roles of NFAT2 isoforms in NIH 3T3 cells depend on the N-terminal domain, where the NFAT2 β -specific N-terminal acidic motif is necessary to induce cell death. Interestingly, the NFAT2 α isoform is upregulated in Burkitt lymphomas, suggesting an isoform-specific involvement of NFAT2 in cancer development. Finally, our data suggest that alternative N-terminal domains of NFAT2 could provide differential mechanisms for the control of cellular functions.

Nuclear factor of activated T cells (NFAT) was originally described as an essential transcription factor for T cell activation and differentiation (1). The NFAT family is composed of four calcium-responsive proteins, named NFAT1 (also called NFATc2/NFATp), NFAT2 (NFATc1/NFATc), NFAT3 (NFATc4), and NFAT4 (NFATc3/NFATx) (2–5), each displaying several splice variants (6, 7). These NFAT proteins have two conserved domains: the DNA-binding domain (DBD), which is the hallmark family domain, and the calcium-responsive N-terminal regulatory domain, denominated the NFAT homology region (NHR) (6).

Despite the conservation of the DBD and NHR, divergent phenotypes of NFAT-deficient mice suggest that different members of this family display nonredundant roles in cellular homeostasis (8). Apparently, NFAT1 and NFAT2 proteins have distinct roles in cell transformation, acting as a tumor suppressor and an oncogene, respectively (9). The tissue-restricted expression of the NFAT family members and isoforms supports the idea that these proteins might have cell-specific and/or gene-specific activities (7). The DBD and NHR conserved domains are flanked by the amino- and carboxy-terminal transactivation domains (TAD-N and TAD-C, respectively). These domains are highly variable regions between the NFAT family members and isoforms (6, 7). One hypothesis is that the differences between the TADs could be relevant for nonredundant functions of these transcription factors through the direct initiation of transcription or by cooperation with isoform-specific protein partners.

NFAT was described as an important regulator of genes involved in the control of the cell cycle and cell death, such as those for p21^{WAF1/Cip1}, cyclin-dependent kinase 4, c-myc, cyclin A2, Fas ligand (FasL), Nur77, c-FLIP, and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (10–17). Additionally, deregulation of calcineurin/NFAT signaling and abnormal expression of its components have been reported for several solid tumors, lymphomas, and leuke-

mias (18, 19). Several studies have suggested the oncogenic potential of the NFAT family member NFAT2. NFAT2 was fundamental for pancreatic cancer progression and contributed to the survival of melanoma cells and the metastatic potential of colorectal cancer cells (11, 20, 21). Furthermore, NFAT2 was activated in 70% of Burkitt lymphoma cases and in ~30% of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cases and was overexpressed and activated in cases of chronic lymphocytic leukemia (CLL) (22, 23).

The NFAT2 gene encodes the isoforms NFAT2 α and NFAT2 β that result mainly from the alternative 5' initiation exons that provide two different TAD-Ns (24). While it has been demonstrated that different NFAT2 isoforms can be specifically regulated and expressed in T and B lymphocytes and mast cells, exhibiting differential roles in the regulation of cytokine expression (24–28), little is known about the specific roles of these isoforms in the regulation of cell death and tumor formation. Because NFAT2 displays important roles in tumorigenesis, we hypothesized that NFAT2 isoforms that diverge in the TAD-N may display differential functions in cellular transformation. To address this hypoth-

Received 13 May 2015 Returned for modification 5 July 2015

Accepted 8 October 2015

Accepted manuscript posted online 19 October 2015

Citation Lucena PI, Faget DV, Pachulec E, Robaina MC, Klumb CE, Robbs BK, Viola JPB. 2016. NFAT2 isoforms differentially regulate gene expression, cell death, and transformation through alternative N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 36:119–131. doi:10.1128/MCB.00501-15.

Address correspondence to Bruno K. Robbs, brunokr@id.uff.br, or João P. B. Viola, jpvioala@inca.gov.br.

* Present address: Bruno K. Robbs, Department of Basic Sciences, Fluminense Federal University (UFF), Nova Friburgo, RJ, Brazil.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

esis, two constitutively active short NFAT2 isoforms (CA-NFAT2 α and CA-NFAT2 β) that diverge only in their N-terminal portions were overexpressed in nontransformed NIH 3T3 fibroblasts, and their role in cell transformation was analyzed. Surprisingly, while CA-NFAT2 α acts as a positive regulator of cell proliferation in NIH 3T3 cells, inducing several hallmarks of transformation, CA-NFAT2 β -expressing cells showed reduced cell proliferation and intense cell death through an increase in TNF- α cytokine expression levels. We demonstrated that an acidic activation domain (AAD) present in the TAD-N of CA-NFAT2 β is essential for cell death induction by this isoform, such that substitutions of acidic amino acids within this domain completely abolish cell death and promote transformation. Furthermore, CA-NFAT2 β was able to increase FasL and TNF- α levels and to induce cell death in CD4⁺ T lymphocytes. Finally, a Burkitt lymphoma-derived cell line and human Burkitt lymphoma samples showed increased expression of the NFAT2 α isoform, supporting the idea that this isoform contributes to cell transformation in cancer development. Taken together, these results suggest that NFAT2 isoforms have different roles in the control of cellular functions and that the transactivation domains may act as important regulators of nonredundant functions of the NFAT family members.

MATERIALS AND METHODS

Donors, patients, and Burkitt lymphoma samples. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from 10 healthy blood donors at the blood bank of the Brazilian National Cancer Institute after written informed consent was obtained. The leukocytes were harvested from white blood cell reduction filters, and PBMCs were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll. After written informed consent was obtained from each guardian, samples from seven cases of pediatric Burkitt lymphoma were included in this study. The samples were obtained from the Division of Pathology of the Brazilian National Cancer Institute. This study was approved by the Human Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute (CEP process no. 018/09).

Cell culture. NIH 3T3, EcoPack2, Phoenix-ECO, and murine primary CD4⁺ T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with NaHCO₃ (40 mM), NaH₂PO₄ (1 mM), sodium pyruvate (1 mM), minimum essential medium (MEM) vitamin solution (1 \times), MEM essential and nonessential amino acid solutions (1 \times), penicillin (100,000 U/liter), streptomycin (10 mg/liter), HEPES (10 mM), L-glutamine (2 mM), and β -mercaptoethanol (55 μ M) (all from Gibco). Jurkat, 697, and Raji cells were cultured in RPMI medium supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100,000 U/liter), streptomycin (10 mg/liter), L-glutamine (2 mM), and β -mercaptoethanol (55 μ M). All cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum and incubated in a humidified environment containing 5% CO₂ at 37°C.

Animals. Athymic BALB/c nude, *Nfat2*^{+/+} *Cd4-cre*⁻, and *Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ mice were maintained at the Brazilian National Cancer Institute animal facility. *Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ mice were generated in Anjana Rao's laboratory (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA) (29). Eight- to twelve-week-old mice were used in all experiments, which were performed in accordance with the Brazilian Government's ethical and animal experiment regulations. The experiments were approved by and conducted according to animal welfare guidelines of the Ethics Committee of Animal Experimentation of the Brazilian National Cancer Institute (CEUA process no. 008/13 and 003/14).

CD4⁺ T cell isolation. CD4⁺ T cells were isolated from peripheral lymph nodes of *Nfat2*^{+/+} *Cd4-cre*⁻ or *Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ mice by negative selection using the Dynal Beads system (Invitrogen). CD4⁺ cell purity was assessed by flow cytometry after isolation and was >95%.

Plasmid construction. The pLIREs-EGFP and pLIREs-EGFP-CA-NFAT2 α vectors were constructed as previously described (9, 30). Murine CA-NFAT2 β cDNA was a gift from Anjana Rao (31). Plasmid pLIREs-EGFP-CA-NFAT2 β was constructed by subcloning CA-NFAT2 β cDNA into the pLIREs-EGFP retroviral backbone plasmid using the restriction enzyme XhoI. The truncated CA-NFAT2- Δ N, CA-NFAT2 β - Δ 1-8, and CA-NFAT2 β - Δ 1-19 proteins were constructed by PCR amplification of the respective fragments of CA-NFAT2 β cDNA followed by subcloning into the pLIREs-EGFP retroviral backbone. Plasmids pLIREs-EGFP-CA-NFAT2 β - Δ 9-19 and CA-NFAT2 β -Mut-Acid were constructed by using the GeneTailor site-directed mutagenesis system (Invitrogen). CA-NFAT2 β -Mut-Acid comprises the following amino acid substitutions: E9A, D11A, E17A, and D19A. The pRV-GFP vector was a gift from Anjana Rao. Plasmids pRV-GFP-CA-NFAT2 α and pRV-GFP-CA-NFAT2 β were constructed by subcloning CA-NFAT2 α and CA-NFAT2 β cDNAs, respectively, into the pRV-GFP retroviral backbone using the restriction enzymes Sall and XhoI. The bp -200 TNF- α promoter was synthesized (Genscript) and subcloned into the pGL4.10 vector (Promega). Plasmid κ 3(long)-luciferase was acquired from Addgene (plasmid 11110) (32). The sequences of the primers used for plasmid construction are available upon request. All constructs were confirmed by DNA sequencing.

Production of recombinant retroviruses and infection of target cells. BD EcoPack2 ecotropic packaging cells (BD Biosciences) were transiently transfected with retroviral vectors by calcium phosphate precipitation for 24 h. The next day, the virus-containing supernatant was collected, mixed 1:1 (vol/vol) with fresh medium, supplemented with 8 μ g/ml Polybrene (Fluka Chemie), and immediately used for spin infection of 2.5×10^4 NIH 3T3 cells in a six-well plate. After 24 h, the infected cells were trypsinized, and the efficiency of transduction was assessed by enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression, which routinely revealed >85% virus-infected cells by flow cytometry. The time point of 24 h after transduction was defined as the starting point for all experiments using transduced NIH 3T3 cells. For transduction of primary CD4⁺ T cells, Phoenix-ECO packaging cells were transiently transfected with retroviral vectors by calcium phosphate precipitation for 24 h. The next day, the virus-containing supernatant was collected and concentrated by centrifugation overnight at a relative centrifugal force (RCF) of 6,000 at 4°C. After concentration, the retroviruses were resuspended in fresh medium and supplemented with 8 μ g/ml Polybrene. Primary CD4⁺ T cells were stimulated with 1 μ g/ml of anti-CD3 and 1 μ g/ml of anti-CD28 (both from BD Pharmingen) in a 12-well plate coated with 0.3 mg/ml of goat anti-mouse IgG (MP Biomedicals). After 48 h, the culture medium was replaced with medium containing concentrated retrovirus, and CD4⁺ T cells were spin infected. The conditioned lymphocyte medium was collected prior to the addition of virus, stored at 37°C, and added to the cells after spin infection. After 24 h, transduced cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), transferred to a six-well plate, and cultured with fresh medium supplemented with 20 U/ml of recombinant interleukin-2 (IL-2) (PeproTech) for 24 h. The time point of 48 h after transduction was defined as the starting point for experiments using transduced CD4⁺ T cells. To ensure reproducibility, each experiment was repeated by using cells derived from independent virus infections.

Western blotting. Whole-protein extracts from transduced NIH 3T3 cells (1×10^5 cells) or CD4⁺ T cells (1×10^6 cells) were obtained by cell 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, followed by transfer onto a nitrocellulose membrane. Immunodetection of NFAT2 variants, β -actin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was performed by using anti-NFATc1 monoclonal antibody 7A6 (Santa Cruz Biotechnology), anti- β -actin polyclonal antibody (Abcam), and anti-GAPDH monoclonal antibody 6C5 (Santa Cruz Biotechnology), respectively, and visualized by using the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (ThermoFisher Scientific).

Cell proliferation studies. NIH 3T3 cells were plated in triplicate into 96-well microtiter plates at a density of 8×10^3 cells/well. Cell proliferation was analyzed at the indicated times by crystal violet staining. The cells were fixed with ethanol, stained with 0.05% crystal violet in 20% ethanol, washed with distilled water, and solubilized with methanol. The optical density at 595 nm was read on a spectrophotometer.

Sub-G₀ analyses. NIH 3T3 cells were plated into a 12-well plate (1×10^5 cells/well). After 72 h, the cells were trypsinized and stained with propidium iodide (75 μ M) in the presence of NP-40. Where indicated, CA-NFAT2 β -expressing cells were treated with a TNF- α neutralizing antibody at a concentration of 1 to 1,000 ng/ml (catalog no. MCA1488XZ; AbD Serotec). DNA content was analyzed by collecting 10,000 events using a FACScalibur flow cytometer. Data were analyzed with CellQuest (BD Biosciences) and FlowJo (Tree Star Inc.) software.

Focus-forming assay and growth in semisolid medium. In the focus-forming assay, transduced NIH 3T3 cells were diluted 1:4 with uninfected wild-type NIH 3T3 cells and plated into a six-well plate at a final density of 5×10^4 cells/well. Growth medium was changed every 2 days. After 10 to 14 days, the cells were visualized by phase-contrast microscopy, and EGFP expression was detected by fluorescence microscopy. For visualization of foci, NIH 3T3 cells were fixed with ethanol and stained with 0.05% crystal violet in 20% ethanol. For growth in semisolid medium, transduced cells were resuspended in 0.4% agarose-supplemented growth medium and plated into six-well plates (5×10^3 cells/well) previously coated with 0.8% agarose-supplemented growth medium. After solidification, growth medium was added to each well, and the medium was changed every 3 days. After 4 to 5 weeks, the total number of colonies was determined by counting. Representative colonies were visualized by phase-contrast microscopy, and EGFP expression was detected by fluorescence microscopy.

Tumor formation. NIH 3T3 cells transduced with either control plasmid pLIREs-EGFP or pLIREs-EGFP-CA-NFAT2 were trypsinized and resuspended in PBS. Athymic 8- to 12-week-old BALB/c nude mice were injected subcutaneously in the right flank with 5×10^5 cells. Tumor volumes (*V*) were analyzed every 5 days by using the following formula: $V = 0.52 \times (\text{length}^2 \times \text{width})$. Mice were sacrificed, and photographs were taken 55 days after injection by using the Ivis Lumina XR Series III system (PerkinElmer) for the detection of EGFP expression in the tumors.

RNA extractions and real-time RT-PCR assays. Transduced NIH 3T3 cells were plated into 10-cm plates (1.5×10^6 cells/plate). After 16 h, total RNA was isolated by using RNeasy Mini Spin columns (Qiagen). First-strand DNA synthesis was performed by using the RT² first-strand kit (SABiosciences Corporation), and real-time PCR was performed by using SYBR green PCR master mix (SABiosciences). The PAMM-012 mouse apoptosis pathway RT² Profiler PCR array (SABiosciences) was used for expression analysis of 81 apoptosis-related genes, and the data were analyzed by using RT² Profiler PCR Array Data Analysis software (SABiosciences). For NFAT2 transcript analysis, primary CD4⁺ T cells from C57BL/6 mice were cultured in six-well plates (3×10^6 cells/well) and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 (both at 1 μ g/ml) for 1, 3, 24, and 48 h. Human cancer cell lines (Jurkat, 697, or Raji) were cultured in six-well plates (3×10^6 cells/well) and, when indicated, stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) (10 nM) plus ionomycin (1 μ M) for 4 h. For NFAT2 analysis using PBMCs from healthy donors, 1×10^7 freshly purified cells were used. Total RNA was isolated by using TRIzol LS reagent (Invitrogen), and first-strand cDNA was synthesized by using the ImProm-II reverse transcription (RT) system (Promega). Total RNA from paraffin-embedded tissue sections from seven cases of Burkitt lymphoma was isolated by using the RecoverAll total nucleic acid isolation kit for formalin- or paraformalin-fixed, paraffin-embedded tissues (Ambion), and first-strand cDNA was synthesized by using the High-Capacity cDNA reverse transcription (RT) kit (Applied Biosystems). Real-time PCR assays were performed by using SYBR green master mix (Applied Biosystems). The sequences of primers used for real-time PCR are available upon request. All procedures were performed according to the manufacturers' instructions.

ELISA. NIH 3T3 cells were plated into a 12-well plate at 1×10^5 cells/well, and CD4⁺ T cells were cultured in a 24-well plate at 1×10^6 cells/well. The cell-free supernatant was collected after the indicated times, and TNF- α protein levels were assessed by using the murine TNF- α enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) development kit (Pepro-Tech) according to the manufacturer's instructions.

Luciferase reporter assays. NIH 3T3 cells (5×10^4 cells/well in a six-well plate) were cotransfected with plasmid pGL4.10-TNF- α -promoter or κ 3(long)-luciferase and a renilla plasmid (pRL-TK) by using the SuperFect transfection reagent (Qiagen). After 48 h, transfected cells were transduced with the indicated plasmid. On the following day, cells were plated into 12-well plates at a density of 1×10^5 cells/well. After 16 h, the cells were lysed with passive lysis buffer (Promega), and luciferase activity was analyzed by using a Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) with a Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems). The firefly luciferase reporter gene activity was normalized to renilla activity.

Annexin V staining. Transduced CD4⁺ T cells were cultured in a 24-well plate at 1×10^6 cells/well and stimulated with PMA (10 nM) when indicated. After 6 h, the cells were collected, washed with PBS, resuspended in annexin V binding buffer (0.1 M HEPES [pH 7.4], 1.4 M NaCl, and 25 mM CaCl₂), and stained with annexin V-allophycocyanin (APC) (eBioscience) and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (BD Biosciences). Phosphatidylserine exposure was analyzed by collecting 10,000 EGFP-positive (EGFP⁺) events by using a FACScalibur flow cytometer. Data were analyzed with CellQuest and FlowJo software.

FasL staining. Transduced CD4⁺ T cells were cultured in a 24-well plate at 1×10^6 cells/well and stimulated with PMA (1 nM) when indicated. After 6 h, the cells were collected, washed with PBS, and stained with anti-FasL-phycoerythrin (PE) antibody (eBioscience). FasL levels were analyzed by collecting 10,000 EGFP⁺ events using a BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed with BD Accuri C6 and FlowJo software.

Statistical analyses. Statistical analysis of values from control and treated groups was performed by using an unpaired Student *t* test for single comparisons or analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. The Mann-Whitney U test was used only when indicated for donor PBMC samples and patient Burkitt lymphoma samples. *P* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

NFAT2 isoforms induce distinct phenotypes in NIH 3T3 cells. In order to characterize the roles of the NFAT transcription factors in cellular proliferation, we used previously described CA-NFAT2 mutants, which are known to be constitutively localized in the nucleus, to bind DNA with high affinity, and to activate endogenous NFAT target genes (9, 31). The use of constitutively active proteins allows the analysis of NFAT2 functions in the absence of external stimuli for NFAT activation that could activate other cellular pathways and mask NFAT-specific functions. Furthermore, the NIH 3T3 cell line was chosen because it is a classical model for studies of cell proliferation and transformation. Moreover, NIH 3T3 cells do not express NFAT2, providing a model for the analysis of specific NFAT2 variants. A schematic alignment of the NFAT2 α and NFAT2 β proteins is shown in Fig. 1A.

Initially, NIH 3T3 cells were infected with either an empty vector or a vector containing the cDNAs of the CA-NFAT2 isoforms (Fig. 1B), and the proliferation patterns were observed by a proliferation kinetic assay accompanied by a crystal violet incorporation assay. While control cells stopped growing once they reached confluence, CA-NFAT2 α -expressing cells overgrew the monolayer and continued to proliferate beyond confluence (Fig. 1C). In contrast, CA-NFAT2 β -expressing cells showed reduced

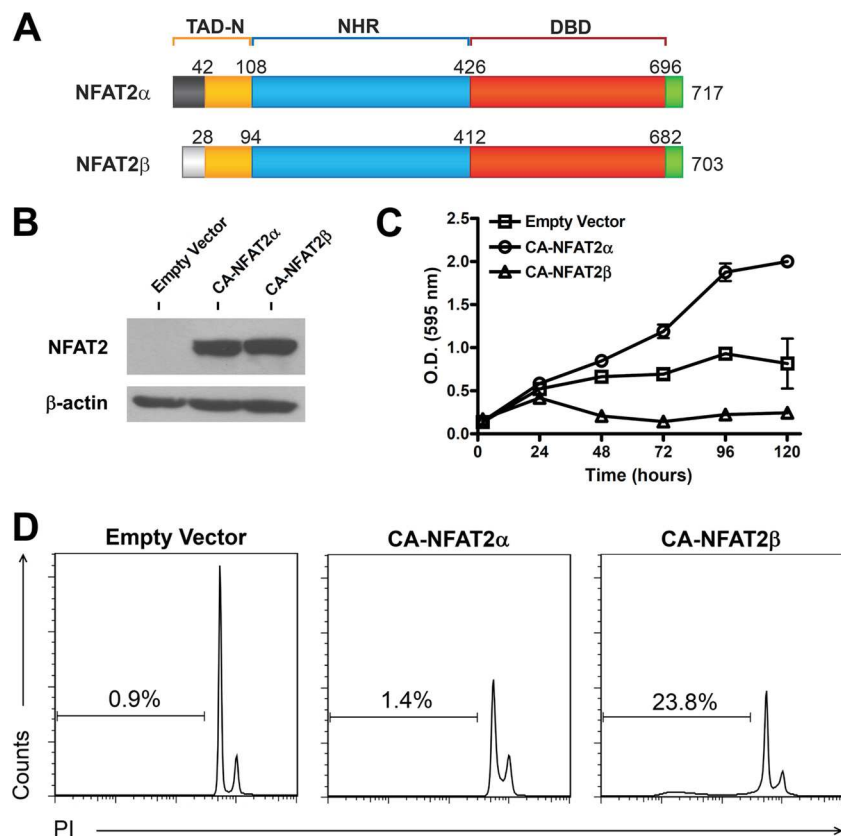


FIG 1 NFAT2 isoforms play different roles in cell proliferation and death in NIH 3T3 fibroblasts. NIH 3T3 cells were infected with either the control pLIREs-EGFP vector (empty vector) or the pLIREs-EGFP-CA-NFAT2 vector. (A) Schematic alignment of the NFAT2 short isoforms. The NFAT2 α and NFAT2 β proteins differ only at the N terminus, which contains 42 amino acids in the NFAT2 α protein, encoded by exon 1 of the gene, or 28 differential amino acids in the NFAT2 β protein, encoded by exon 2. The identical shading patterns represent identical sequences. The numbers indicate the amino acid positions in the murine proteins. DBD, DNA-binding domain; NHR, NFAT homology region; TAD-N, N-terminal transactivation domain. (B) Western blotting of transduced NIH 3T3 cells. (C) Proliferation kinetic assay by crystal violet staining. The data are presented as means \pm standard deviations of results from one representative experiment. O.D., optical density. (D) Cell death analysis by propidium iodide (PI) staining 72 h after plating at confluence. The percentage of cell death (sub-G₀ DNA content) is indicated. All results are representative of data from at least three independent experiments.

cell accumulation and maintained a low-proliferation profile (Fig. 1C). To assess the cell death phenotype, sub-G₀ DNA content was analyzed. As shown by flow cytometry, ~20% of cells expressing CA-NFAT2 β underwent apoptosis at 72 h postinfection, while cells expressing the control vector or CA-NFAT2 α exhibited a low proportion of cell death (Fig. 1D). These results indicate that the NFAT2 short isoforms display distinct roles in controlling cell proliferation.

The observation that CA-NFAT2 α leads to proliferation beyond confluence led to the question of whether the NFAT2 isoforms might exhibit distinct functions in cell transformation. The loss of contact-mediated growth inhibition was analyzed by a focus-forming assay in which transduced cells were mixed with an excess of uninfected wild-type NIH 3T3 cells. Whereas cells infected with the empty vector gave rise to a small number of foci, CA-NFAT2 α -expressing cells formed a large number of foci (Fig. 2A). CA-NFAT2 β -expressing cells also formed foci but induced less focus formation than did CA-NFAT2 α -expressing cells (Fig. 2A). Analysis of EGFP expression showed that foci that formed in mixed cultures with either CA-NFAT2 α - or CA-NFAT2 β -expressing cells were composed of transduced cells (Fig. 2B). Furthermore, we tested whether the NFAT2 isoforms were able to

induce the growth of NIH 3T3 cells in the absence of a solid substratum for adhesion. While control cells formed only small numbers of small colonies, CA-NFAT2 α -expressing cells promptly formed many large colonies (Fig. 2C and D). Interestingly, although CA-NFAT2 β expression in NIH 3T3 cells led to the formation of the same number of colonies as control cells, these colonies were larger (Fig. 2C and D). These results support the idea that while CA-NFAT2 β expression can induce cell death in NIH 3T3 cells, those cells that survive its expression may acquire a transformed phenotype. Finally, cell transformation induced by NFAT2 isoforms was tested *in vivo*. Athymic mice receiving cells transduced with the empty vector did not give rise to any detectable tumor (Fig. 2E and F). However, CA-NFAT2 α -infected cells promptly formed large tumors with a high growth rate in the flank of inoculated mice, while CA-NFAT2 β -expressing cells formed only smaller and moderate-growing tumors (Fig. 2E and F). Additionally, tumors formed by CA-NFAT2 β -expressing cells showed lower expression levels of EGFP than did CA-NFAT2 α -expressing tumors (Fig. 2F), suggesting that they were composed of cells with lower CA-NFAT2 β expression levels. Taken together, these results demonstrate that despite only a slight difference in the primary amino acid sequences between NFAT2 α and NFAT2 β , the

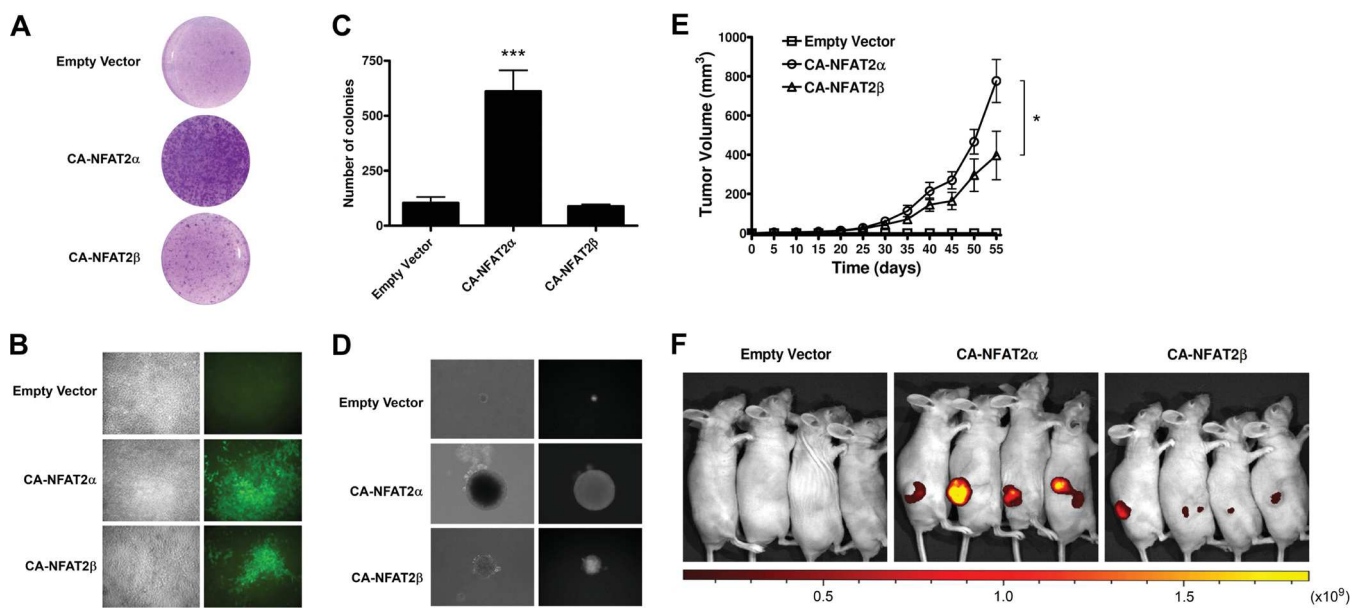


FIG 2 CA-NFAT2 α and CA-NFAT2 β induce cell transformation with distinct intensities in NIH 3T3 cells. Cells were transduced with the empty vector or vectors containing cDNAs of NFAT2 isoforms. (A) Focus-forming assay. Transduced cells were mixed 1:4 with uninfected wild-type NIH 3T3 cells and grown for 10 to 14 days. For visualization of foci, the cells were stained with crystal violet. (B) Phase-contrast microscopy (left) and optical fluorescence microscopy for EGFP expression (right) of representative foci. The results are representative of data from at least three independent experiments. (C) Growth in semisolid medium. Transduced NIH 3T3 cells were grown in semisolid agarose medium, and colonies were counted 4 to 5 weeks after plating. Data are shown as means \pm standard deviations of results from three independent experiments. *** indicates a P value of ≤ 0.001 . (D) Phase-contrast microscopy (left) and optical fluorescence microscopy for EGFP expression (right) of representative colonies. (E) Tumor formation in nude mice. NIH 3T3 cells (5×10^5 cells) were inoculated subcutaneously in the right flank of athymic BALB/c nude mice ($n = 7$). Tumor volumes were measured every 5 days, and the data are shown as means \pm standard errors of the means. * indicates a P value of ≤ 0.05 . (F) *In vivo* imaging of tumors from four representative mice 55 days after inoculation for EGFP expression. The color scale represents the fluorescence signal in radiance and ranges from red (minimum of 1.11×10^8 photons/s/cm²/sr) to yellow (maximum of 1.85×10^9 photons/s/cm²/sr).

expression of the alternative NFAT2 isoforms induces different phenotypes in NIH 3T3 cells. While NFAT2 α positively controls cell proliferation and induces cell transformation, NFAT2 β is able to induce cell death and a milder cell transformation phenotype.

The NFAT2 N-terminal differential domain enables cell death induction but is not necessary for transformation. As shown in Fig. 1A, NFAT2 α and NFAT2 β diverge only within the first amino acids of the TAD-N. In order to elucidate the role of the N termini of the NFAT2 isoforms in cell death and transformation, a truncated protein (CA-NFAT2- Δ N) that lacks only the amino acid residues that differ between the NFAT2 α and NFAT2 β isoforms was constructed (Fig. 3A) and expressed in NIH 3T3 cells (Fig. 3B). Strikingly, CA-NFAT2- Δ N-expressing NIH 3T3 cells showed a proliferation profile similar to that of CA-NFAT2 α -expressing cells, leading to proliferation beyond confluence (Fig. 3C). Moreover, CA-NFAT2- Δ N-expressing cells showed a low proportion of cells undergoing apoptosis (Fig. 3D). Taken together, these results demonstrate that the differential 28-amino-acid (aa)-long N terminus of CA-NFAT2 β is essential for the isoform-specific induction of cell death.

CA-NFAT2- Δ N-expressing cells induced a CA-NFAT2 α -like cell transformation phenotype. CA-NFAT2- Δ N was able to promote the loss of contact-mediated growth inhibition, inducing the formation of numerous foci in the culture (Fig. 3E), and to promote anchorage-independent cell growth in semisolid medium (Fig. 3F and G). These data suggest that the differential TAD-N regions of the NFAT2 isoforms are not essential for cell transformation induced by NFAT2.

Conserved acidic amino acids in the N terminus of the NFAT2 β protein are fundamental for induction of cell death.

We have shown that the deletion of the first 28 aa of CA-NFAT2 β completely abolished the induction of death in NIH 3T3 cells. The NFAT2 β -specific amino terminus contains 7 acidic residues (Asp/Glu) interspersed with a number of hydrophobic residues, a pattern conserved in many acidic activation domains (AADs) (33). An alignment of the N termini of NFAT2 β and the other NFAT family members revealed the conservation of several acidic/hydrophobic residues (Fig. 4A). In order to understand the importance of this domain for cell death, we constructed three truncated proteins that lacked amino acid residues 1 to 8, 1 to 19, and 9 to 19, termed CA-NFAT2 β - Δ 1-8, CA-NFAT2 β - Δ 1-19, and CA-NFAT2 β - Δ 9-19, respectively (Fig. 4B), and these constructs were expressed in NIH 3T3 cells (Fig. 4C). Surprisingly, only truncated proteins that lacked the acidic domain (CA-NFAT2 β - Δ 1-19 and CA-NFAT2 β - Δ 9-19) were unable to induce death in NIH 3T3 cells, while the deletion of the first 8 aa that do not encompass the conserved acidic domain did not abrogate cell death (Fig. 4D). These data demonstrate that the conserved acidic activation domain within the CA-NFAT2 β N terminus is fundamental to CA-NFAT2 β -induced cell death.

Previous studies of *Saccharomyces cerevisiae* showed that acidic amino acid residues interspersed with hydrophobic residues are important for the formation of an amphipathic α helix and for the activation of transcription (34). To elucidate the role of specific amino acid residues in the AAD of CA-NFAT2 β , 4 acidic amino acid residues within this domain that are conserved be-

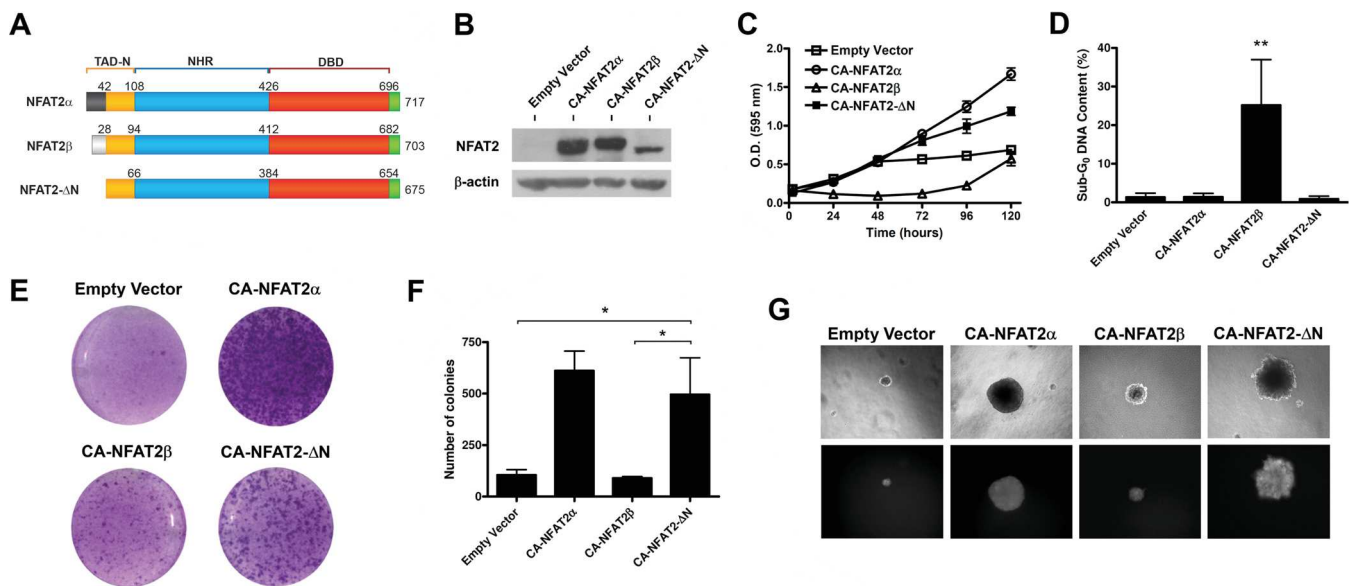


FIG 3 Cell death induction, but not cell transformation, is dependent on the NFAT2 N-terminal differential domain. NIH 3T3 cells were infected with either the empty vector or vectors containing cDNAs of the CA-NFAT2 variants. (A) Schematic alignment of the NFAT2 short isoforms and the truncated CA-NFAT2- Δ N protein. CA-NFAT2- Δ N lacks only the amino acid residues that differ between the NFAT2 α and NFAT2 β isoforms. (B) Western blotting of transduced NIH 3T3 cells. (C) Proliferation kinetic assay by crystal violet staining. O.D., optical density. The data are presented as means \pm standard deviations of results from one representative experiment. (D) Cell death analysis by PI staining 72 h after plating at confluence. Standard deviation values indicate the variance of data from four independent experiments, and ** indicates a *P* value of ≤ 0.01 . (E) Focus-forming assay. See the legend to Fig. 2A for details. (F and G) Growth in semisolid medium. Cells were cultured in semisolid agarose medium, and anchorage-independent cell growth was analyzed described in the legend to Fig. 2C and D. * indicates a *P* value of ≤ 0.05 .

tween the NFAT proteins (Glu⁹, Asp¹¹, Glu¹⁷, and Asp¹⁹) were mutated to noncharged alanine residues (CA-NFAT2 β -Mut-Acid) (Fig. 5A). Comparison of the phenotypes induced by the CA-NFAT2 isoforms and CA-NFAT2 β -Mut-Acid showed that mutations of only 4 amino acid residues of the AAD were sufficient to completely abolish CA-NFAT2 β -induced cell death (Fig. 5B) and to increase cell accumulation (Fig. 5C). Cell transformation analyses demonstrated that CA-NFAT2 β -Mut-Acid was able to induce increases in the numbers and sizes of the foci in culture and in colonies in semisolid medium (Fig. 5D to F). Taken together, these results suggest that the conserved acidic amino acids present in the NFAT2 β -specific N-terminal domain are fundamental for the induction of cell death and that their ablation enhances the oncogenic potential of the NFAT2 β protein.

CA-NFAT2 β induces death of NIH 3T3 cells through up-regulation of TNF- α . In order to determine which genes are regulated by CA-NFAT2 β during cell death induction, we screened 81 apoptosis-related genes using a real-time PCR assay. Total RNA of NIH 3T3 cells was isolated 16 h after transduction with the different NFAT2 isoforms. This time point was chosen based on the lack of detectable cell death induced by CA-NFAT2 β that could interfere with mRNA levels. Compared to control cells, CA-NFAT2 α -expressing cells showed upregulation of 9 genes (*Bcl2l10*, *Naip1*, *FasL*, *Il10*, *Pak7*, *Tnf*, *Cd40*, *Tnfsf10*, and *Cd70*) and down-regulation of 1 gene (*Tnfrsf11b*), while CA-NFAT2 β -expressing cells showed upregulation of 7 genes (*FasL*, *Il10*, *Pak7*, *Tnf*, *Cd40*, *Cd70*, and *Trp73*) and downregulation of 5 genes (*Casp1*, *Casp12*, *Casp14*, *Tnfrsf11b*, and *Trp63*) (Fig. 6A). *Dapk1* and *Cd40lg* expression was undetectable in the samples. The overexpression of CA-NFAT2 isoforms affected mainly the expression of *Tnf*, *FasL*, *Pak7*, and *Il10* (Fig. 6A). In addition, CA-NFAT2 β expression led

to greater increases in TNF- α (781-fold), FasL (120-fold), Pak7 (440-fold), and IL-10 (64-fold) mRNA levels than did CA-NFAT2 α expression (147-, 9-, 66-, and 45-fold, respectively) (Fig. 6B). Because TNF- α and FasL are direct inducers of cell death through apoptosis, these proteins could account for cell death induction. Furthermore, previous work from our group showed that the accumulation of TNF- α can induce apoptosis in NIH 3T3 cells (17). Corroborating the increased mRNA levels, CA-NFAT2 β led to a greater accumulation of TNF- α protein than did CA-NFAT2 α and CA-NFAT2 β -Mut-Acid (Fig. 6C), indicating that the N-terminal domain of NFAT2 β is important for the up-regulation of TNF- α . The TNF- α promoter contains several NFAT-binding sites (35), including a well-described $\kappa 3$ (long) element (Fig. 6D) (32). CA-NFAT2 β was able to increase the trans-activation of both the bp -200 TNF- α promoter and the $\kappa 3$ (long) element more than CA-NFAT2 α and CA-NFAT2 β -Mut-Acid (Fig. 6E). To analyze the importance of TNF- α expression for cell death induced by CA-NFAT2 β , a neutralization assay was performed. TNF- α neutralization inhibited death in CA-NFAT2 β -expressing cells in a dose-dependent manner to a maximum of ~70% inhibition (Fig. 6F). On other hand, CA-NFAT2 α , CA-NFAT2 β , and CA-NFAT2 β -Mut-Acid induced slight increases in FasL protein levels, and FasL neutralization did not affect cell death induced by CA-NFAT2 β (data not shown), indicating that FasL is not involved in CA-NFAT2 β -induced death in NIH 3T3 cells. Taken together, these data suggest that CA-NFAT2 β induces death in NIH 3T3 cells through the upregulation of TNF- α .

CA-NFAT2 β induces cell death and upregulation of TNF- α and FasL in CD4⁺ T cells. Previous studies demonstrated distinct expression patterns of NFAT2 isoforms (7, 24, 27). NFAT2 β (short and long isoforms) is predominant in nonactivated lym-

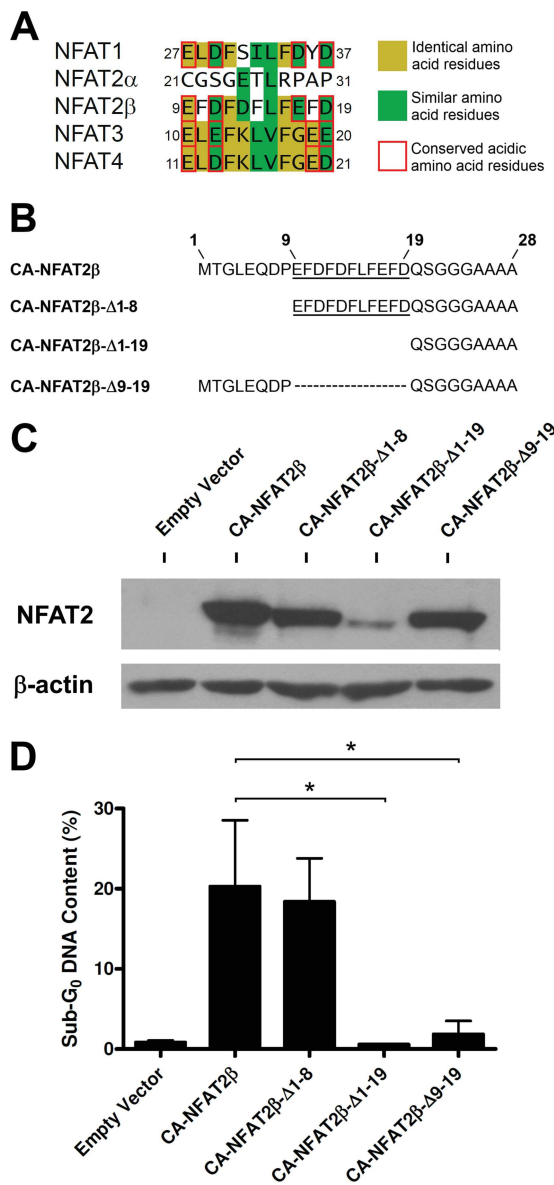


FIG 4 An acidic activation domain is fundamental for cell death induction by CA-NFAT2 β . (A) Alignment of the N-terminal regions of the NFAT proteins. Amino acids encoded by the first exon of each NFAT gene were aligned by using the ClustalW tool. Shown is an acidic domain that displays sequence conservation between NFAT2 β , NFAT1, NFAT3, and NFAT4 but not NFAT2 α . The amino acid positions are indicated. (B) Schematic representation of the truncated variants of CA-NFAT2 β . The conserved acidic domain is underlined. (C) Western blotting of transduced NIH 3T3 cells. (D) NIH 3T3 cells were transduced with either the empty vector or vectors containing full-length CA-NFAT2 β or truncated CA-NFAT2 β constructs. Cell death was analyzed by PI staining 72 h after plating at confluence. Standard deviation values indicate the variance of data from three independent experiments, and * indicates a *P* value of ≤ 0.05 .

phocytes, while NFAT2 α (mainly the short isoform) is upregulated after cell stimulation (Fig. 7A and B) (24, 25, 27). The increase in the NFAT2 α level was associated with the entry of lymphocytes into the cell cycle without inducing cell death (24, 27). These data are compatible with our results with NIH 3T3 cells that suggest positive regulation of cell proliferation by NFAT2 α ,

while NFAT2 β negatively regulates cell proliferation and induces intense cell death.

In order to corroborate the differential roles of NFAT2 isoforms, we verified isoform-specific effects in CD4⁺ T cells. *Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ mice are a T cell-specific *Nfat2* knockout model (29, 36) enabling the study of a role of the single NFAT2 isoform by reconstitution of CD4⁺ T cells with the NFAT2-specific isoform. Primary CD4⁺ T cells were purified from *Nfat2*^{+/+} *Cd4-cre*⁻ mice (wild-type cells) or *Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ mice (*Nfat2*^{-/-} cells) and transduced with either plasmid pRV-GFP (empty vector), pRV-GFP-CA-NFAT2 α , or pRV-GFP-CA-NFAT2 β (Fig. 7C), and cell death profiles were analyzed by annexin V staining. While control cells (*Nfat2*^{+/+} *Cd4-cre*⁻ or *Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ CD4⁺ T cells transduced with the empty vector) and CA-NFAT2 α -expressing CD4⁺ T cells (*Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ cells expressing CA-NFAT2 α) showed a low proportion of apoptotic cells, CA-NFAT2 β -expressing CD4⁺ T cells (*Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ cells expressing CA-NFAT2 β) showed increased cell death (~39% apoptotic cells) (Fig. 7D). The stimulation of NFAT transcriptional partner pathways (AP-1 and NF- κ B) with PMA increased cell death induced by both NFAT2 isoforms (Fig. 7D) and led to the accumulation of the cytokine TNF- α (Fig. 7E). However, NFAT2 isoforms did not induce TNF- α production in the absence of PMA (Fig. 7E), suggesting that TNF- α is not sufficient to explain the differential roles of these isoforms in nonstimulated CD4⁺ T cells. Furthermore, CA-NFAT2 β -expressing cells showed increased FasL levels (Fig. 7F), which could account for the differences between the NFAT2 isoforms in cell death induction. These data suggest that NFAT2 isoforms have distinct roles in cell death in CD4⁺ T lymphocytes, where CA-NFAT2 β leads to a cell death phenotype that correlates with FasL and TNF- α upregulation.

NFAT2 isoforms are differentially expressed in Burkitt lymphomas. Some studies have indicated an involvement of NFAT2 in several hematological malignancies (18, 22, 23). As our data indicated distinct roles of the NFAT2 isoforms in the cellular transformation process in NIH 3T3 cells, we investigated the expression of the isoforms in cancer cell lines and tumors in order to reinforce an isoform-specific role in cancer development in alternative models. Three cancer cell lines were analyzed: Jurkat (T cell leukemia), 697 (pre-B cell leukemia), and Raji (Burkitt lymphoma). Similar levels of NFAT2 α and NFAT2 β mRNAs were observed in Jurkat and 697 cells, whereas Raji cells showed increased levels of the NFAT2 α isoform compared to NFAT2 β (Fig. 8A). All three cell lines showed an increase in NFAT2 α expression after PMA and ionomycin stimulation (Fig. 8B). In addition, Burkitt lymphoma samples from patients showed high levels of NFAT2 α , which were correlated with low levels of NFAT2 β in the same sample, while peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from health donors showed lower levels of NFAT2 α than of NFAT2 β (Fig. 8C). Taken together, these data suggest a protumorigenic role of NFAT2 α in Burkitt lymphomas.

DISCUSSION

Only a few studies have analyzed the phenotypic differences between the distinct NFAT isoforms. The NFAT2 isoforms display cell- and activation-specific expression patterns, suggesting different functions for these proteins. NFAT2 variants have alternative initiation exons that result in a change of the transcription start site from exon 2 to exon 1 to form the NFAT2 β

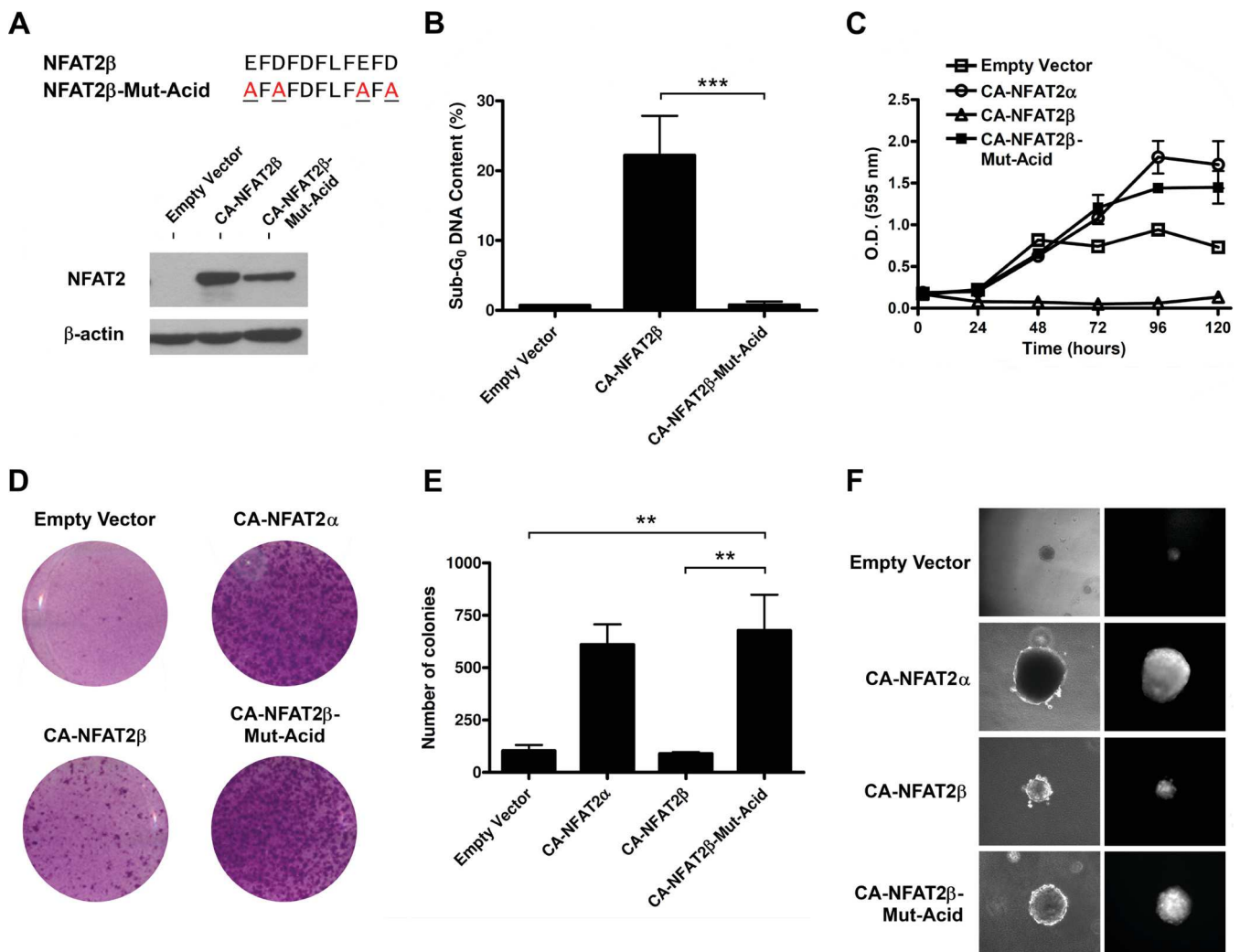


FIG 5 Substitution of the conserved acidic amino acids in the NFAT2β acidic activation domain completely abolishes cell death and enhances the cell transformation phenotype. NIH 3T3 cells were retrovirally transduced with the indicated vectors. (A, top) CA-NFAT2β-Mut-Acid was constructed by substitution of 4 acidic amino acid residues, E9A, D11A, E17A, and D19A. (Bottom) Expression levels of the CA-NFAT2 constructs were analyzed by Western blotting. (B) Cell death was assessed by sub-G₀ DNA content analysis as described in the legend to Fig. 3D. *** indicates a *P* value of ≤ 0.001 . (C and D) Proliferation kinetics assays (C) and focus-forming assays (D) were performed as described in the legend to Fig. 1C and 2A, respectively. (E and F) Growth in semisolid medium was assessed as described in the legend to Fig. 2C and D. ** indicates a *P* value of ≤ 0.01 . All results are representative of data from at least three independent experiments.

or NFAT2α protein, respectively (7, 24). These variants may also display different C termini by alternative splicing (3, 7, 37, 38). The regulatory mechanisms of NFAT2 isoform expression are well described for lymphocytes. NFAT2 transcription is controlled by two promoters, P1 and P2 (24). In T lymphocytes, only P1 is an NFAT-dependent inducible promoter, while P2 regulates the constitutive basal expression of NFAT2. NFAT binding to the P1 promoter induces transcription from exon 1 and splicing to exon 3, leading to the massive synthesis of the NFAT2α isoform (24, 38, 39). In contrast, the P2 promoter controls basal transcription of NFAT2β from exon 2 (24, 25). Interestingly, NFAT2 is the only inducible NFAT family gene regulated at the transcriptional level through an autoregulatory loop. Upon T cell receptor (TCR) engagement and NFAT protein activation, the autoregulatory loop leads to the massive expression of NFAT2α, exceeding the expression levels

of the NFAT2β isoform several times (24). The regulation of the NFAT2 isoforms is similar in B cells upon anti-IgM stimulation (26, 27). The presence of the NFAT2 autoregulatory loop and NFAT2α upregulation protect both T and B cells from activation-induced cell death (AICD) (24, 26). NFAT2α might work as an important regulator of genes involved in cell survival and proliferation without efficiently affecting cell death genes. Alternatively, NFAT2α could compete with NFAT2β for the promoter regions of cell death genes, preventing premature death in activated T or B cells. Once the NFAT2α levels decrease after stimulus reduction, NFAT2β could contribute to AICD through the upregulation of cell death genes such as the FasL and TNF-α genes.

The transactivation activity of the TAD-N could explain the different phenotypes induced by the NFAT2 isoforms. N-terminal transactivation activity was observed for several NFAT family

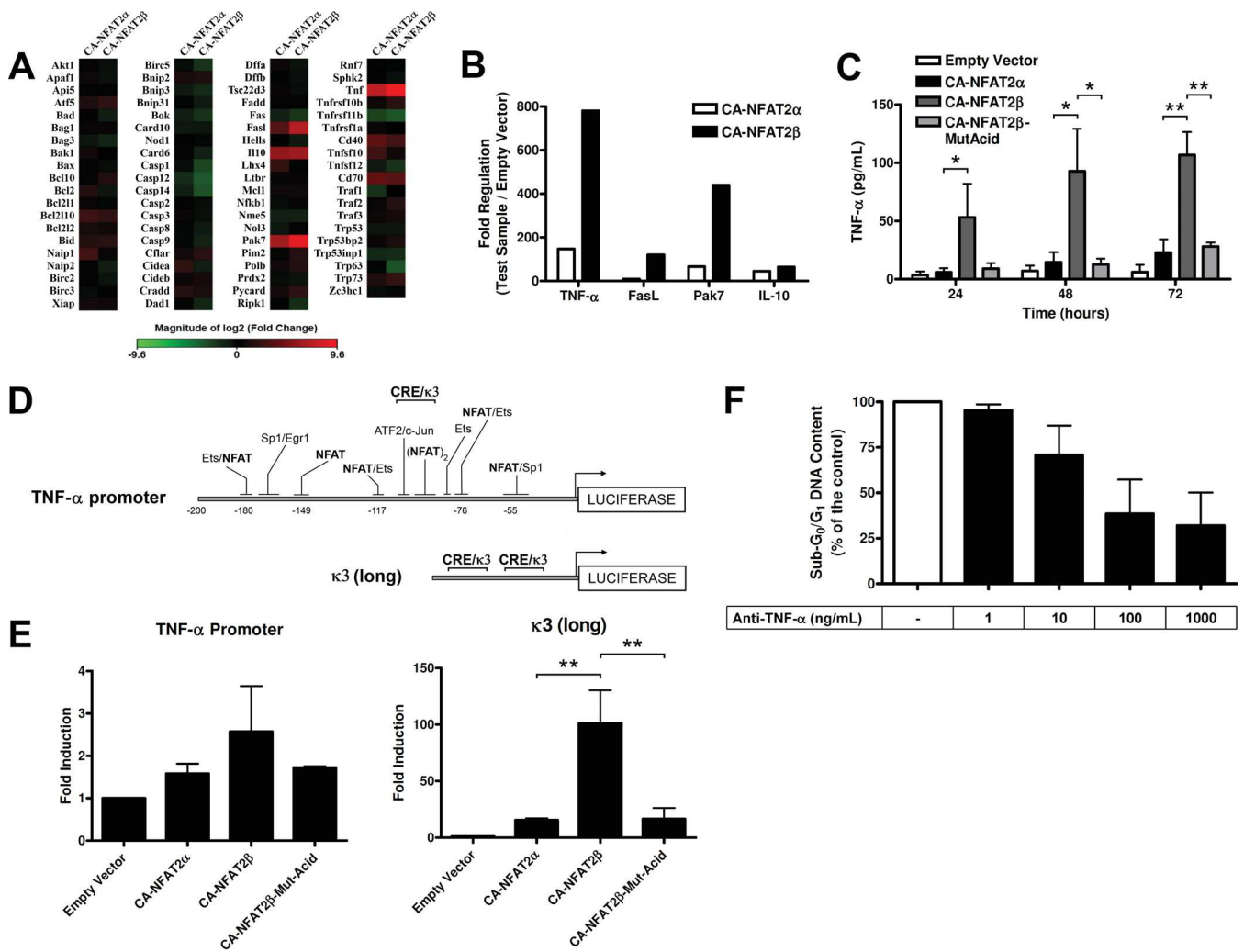


FIG 6 CA-NFAT2 β induces death in NIH 3T3 cells by upregulation of TNF- α . NIH 3T3 cells were transduced with the empty vector or vectors containing CA-NFAT2 α , CA-NFAT2 β , or CA-NFAT2 β -Mut-Acid. (A and B) A real-time reverse transcriptase (SYBR green) SuperArray assay was performed to screen 81 apoptosis-related genes. The fold change values are relative to the values for cells transduced with the empty vector. (C) TNF- α ELISA. Transduced cells were plated, and the cell-free supernatant was assessed for TNF- α protein levels by an ELISA at the indicated times. Data are shown as means \pm standard deviations of results from three independent experiments. (D) Schematic representation of luciferase reporter vectors. Transcription factor-binding sites are indicated. (E) NIH 3T3 cells were transfected with the luciferase reporter plasmids and pRL-TK (renilla plasmid) and transduced with retroviral vectors. Transduced cells were plated at confluence and lysed after 16 h. Luciferase activity was normalized to the activity of the renilla vector. The fold induction values are relative to the values for cells transduced with the empty vector. Data are shown as the means \pm standard deviations of data from three independent experiments. ** indicates a *P* value of ≤ 0.01 . (F) Neutralization assay. NIH 3T3 cells were infected with the pLIREs-CA-NFAT2 β vector and plated with a TNF- α neutralizing antibody. After 72 h, cell death was analyzed by PI staining. Data were normalized and expressed as a percentage relative to the sub-G₀ DNA content of nontreated cells. Standard deviation values indicate the variance of data from five independent experiments.

members that contain the N-terminal acidic domain. One-hybrid assays have shown that the region spanning aa 1 to 30 of NFAT2 β containing the acidic domain is necessary and sufficient for eliciting a high activation signal (28). Similarly, the regions spanning aa 1 to 144 and aa 1 to 217 of NFAT1 and NFAT3, respectively, showed high transactivation activity (40, 41). Accordingly, the NFAT2 α fragments spanning aa 1 to 44 and aa 1 to 106 that do not contain the N-terminal acidic domain were unable to induce transcription (28, 37). Moreover, it was shown previously that NFAT2 β is able to induce greater IL-4 transactivation than NFAT2 α (28), suggesting that the different N termini of the NFAT2 proteins might be important for IL-4 regulation. Our data demonstrate that NFAT2 β can induce greater expression of several genes than NFAT2 α (Fig. 6).

Taken together, these data suggest a functional relevance for the different isoforms and alternative NFAT exon usage, where isoforms that maintain the conserved AAD could activate transcription through their TAD-Ns.

Furthermore, our data suggest a remarkably differential role of the NFAT2 isoforms in the regulation of cell death through the upregulation of TNF- α (Fig. 1, 6, and 7E). Previous studies have shown the differential regulation of TNF- α by NFAT proteins. Whereas the NFAT1 protein was able to bind to and transactivate the TNF- α promoter, leading to increased expression of this proapoptotic protein, the NFAT2 protein was unable to transactivate the TNF- α promoter (42, 43). However, in both studies, only the NFAT2 α isoform was analyzed. One-hybrid assays have shown

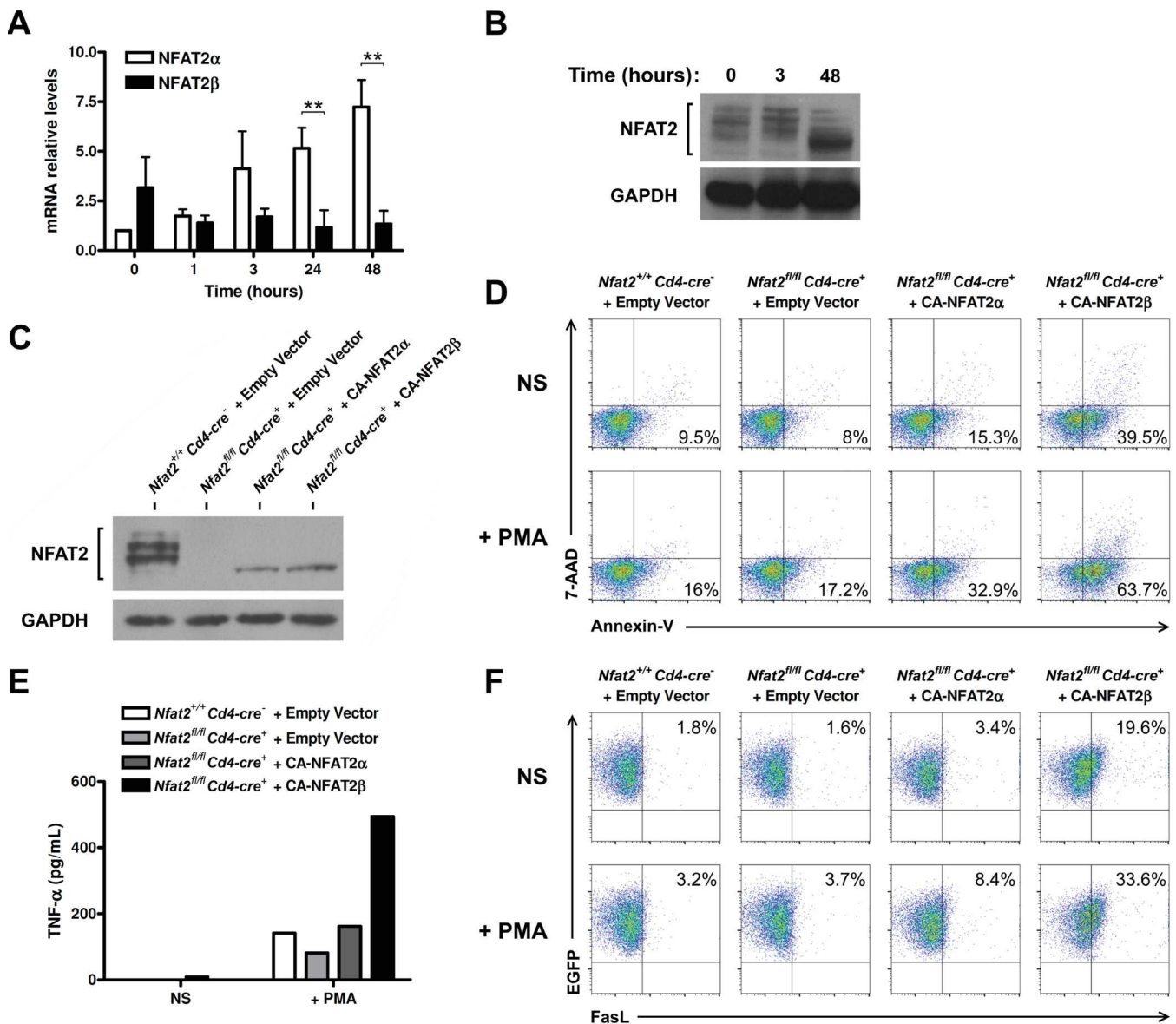


FIG 7 CA-NFAT2β induces cell death and increases FasL and TNF-α levels in CD4⁺ T lymphocytes. (A) Analysis of mRNA levels of NFAT2 isoforms in primary CD4⁺ T cells. Cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 (both at 1 μg/ml) for the indicated times, and mRNA levels of NFAT2 isoforms were analyzed by a real-time RT-PCR assay using SYBR green master mix. The data were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase levels. The fold change values are relative to the NFAT2α levels at the starting point (0 h). Data are shown as means ± standard deviations of results from three independent experiments. ** indicates a *P* value of ≤0.01. (B) Western blotting for NFAT2 and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) levels in CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 for the indicated times. (C) Western blotting of transduced CD4⁺ T cells. CD4⁺ T cells were purified from *Nfat2*^{+/+} *Cd4-cre*⁻ (wild-type cells) or *Nfat2*^{fl/fl} *Cd4-cre*⁺ (*Nfat2*^{-/-} cells) mice and transduced with the empty vector or vectors containing CA-NFAT2α or CA-NFAT2β. (D) Cell death analysis by annexin V and 7-AAD staining. Cells were plated in the absence (nonstimulated [NS]) or presence of 10 nM PMA. After 6 h, phosphatidylserine exposure was accompanied by annexin V staining. The data are representative of results from two independent experiments. (E) TNF-α ELISA. Transduced CD4⁺ T cells were plated, and the cell-free supernatant was assessed for TNF-α protein levels by an ELISA after 6 h. Data are shown as means of results from two independent experiments. (F) FasL staining. Cells were plated in the absence or presence of 10 nM PMA for 6 h and stained with anti-FasL-PE antibody. The data are representative of results from two independent experiments.

that the TAD-C of NFAT1 contains a strong transcription activation domain (44), and its fusion to NFAT2α allowed this isoform to transactivate the TNF-α gene in Jurkat cells (43) and to induce death in NIH 3T3 cells (45). Here, we suggest that NFAT2 requires a transactivation domain to regulate TNF-α expression. Mechanistically, the use of exon 2 in NFAT2β may enable this isoform to induce TNF-α expression because it contains a potent transacti-

vation element. Similarly, our data show that CA-NFAT2β can increase FasL levels in both NIH 3T3 fibroblasts (data not shown) and CD4⁺ T lymphocytes (Fig. 7F). The upregulation of FasL was not sufficient for cell death induction in NIH 3T3 cells (data not shown) but is fundamental for AICD of T cells (46). Together, our results indicate that NFAT2β can regulate cell death in different cell types through two apoptosis inducers, suggesting a relevant

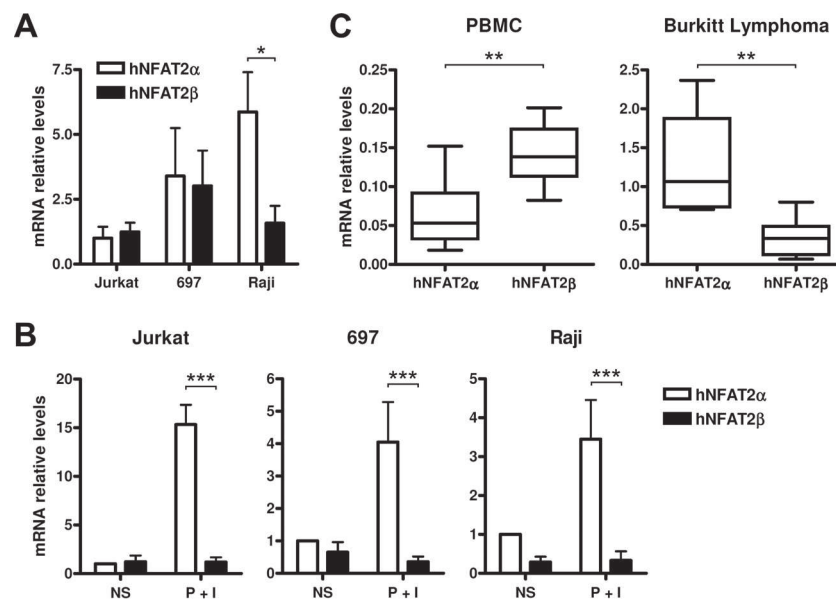


FIG 8 NFAT2 isoforms are differentially expressed in human cancer cell lines and Burkitt lymphoma samples. Total RNAs from the cancer cell lines Jurkat (T cell leukemia), 697 (pre-B cell leukemia), and Raji (Burkitt lymphoma); peripheral blood mononuclear cells (PBMC); or Burkitt lymphoma samples were isolated, and mRNA levels of human NFAT2 (hNFAT2) isoforms were analyzed by a real-time RT-PCR assay using SYBR green master mix. The data were normalized to phosphoglycerate kinase 1 and TATA-binding protein levels. (A) Comparison of levels of the NFAT2 isoforms in cultured cell lines. The fold change values are relative to the levels of human NFAT2 α in Jurkat cells. Standard deviation values indicate the variance of data from five independent experiments. * indicates a P value of ≤ 0.05 . (B) Analysis of NFAT2 levels after stimulation. Cell lines were treated with PMA (10 nM) plus ionomycin (1 μ M) (P + I) for 4 h. The fold change values are relative to levels of human NFAT2 α in nonstimulated (NS) cells. Data are shown as means \pm standard deviations of results from at least four independent experiments. *** indicates a P value of ≤ 0.001 . (C) Evaluation of NFAT2 mRNA levels in PBMCs ($n = 10$) or Burkitt lymphoma samples ($n = 7$). The mRNA levels are relative to the mRNA levels of housekeeping genes (phosphoglycerate kinase 1 and TATA-binding protein genes). ** indicates a P value of ≤ 0.01 (as determined by a Mann-Whitney U test).

proapoptotic role. Interestingly, an autoregulatory loop also was suggested for NFAT3 in nonimmune cells (47), and it was shown that NFAT3 has an antioncogenic role in NIH 3T3 cells (48). Therefore, the possible upregulation of NFAT3 by CA-NFAT2 β could contribute to distinct oncogenic roles of NFAT2 isoforms in NIH 3T3 cells.

Since NFAT2 β can regulate proapoptotic genes, this isoform may act as an antioncogenic factor, displaying a possible tumor suppressor role. However, several studies indicate an important role of NFAT2 in cell transformation. It has been demonstrated that the sustained activity of NFAT2 is able to induce transformation hallmarks (Fig. 2) (9, 49) and is linked to some malignant transformations, such as Burkitt lymphoma, DLBCL, T-cell acute lymphoblastic leukemia ((T-ALL), CLL, melanoma, and pancreatic and colorectal carcinomas (11, 20–23, 50). NFAT2 also regulates genes important for tumorigenesis and tumor development, including those for c-myc, BlyS, and Cox-2 (11, 51–53). These apparently controversial data might be explained by the lack of data showing the differential expression of NFAT2 α and NFAT2 β in these tumors.

Our data showed that NFAT2 α expression was increased in comparison to NFAT2 β expression in Burkitt lymphoma cells (Fig. 8), suggesting that this specific isoform could be involved in tumor formation. Although our study is limited by its small sample size, it gives support to future studies with large numbers of patients where the relationship between the differential expression of the NFAT2 isoforms and the different aspects of cancer development, including the stage, invasiveness, and outcome, could be addressed. Since NFAT2 α and NFAT2 β

may play differential roles in cellular functions, deregulation of isoform expression could contribute to tumorigenesis. During cell lineage differentiation, some transcription factors can employ positive autoregulatory mechanisms of one specific isoform to guarantee high levels of the protein to enable the maintenance of a differentiated state (54). This mechanism might account for the establishment of a lymphocyte activation-committed state through the overexpression of the NFAT2 α protein and might also be exploited by tumor cells to induce a transformed commitment state. Taken together, our results suggest a novel regulation of the NFAT proteins through the alternative usage of initiation exons and define the NFAT2 transcription factors as dual regulators of cell transformation. These findings suggest that NFAT2 α expression may be a potential therapeutic target. Since the NFAT2 signaling pathway seems to be important in several tumors, specific inhibition of the tumorigenic part of NFAT2 signaling while maintaining its tumor-suppressive abilities may be a good strategy for the treatment of cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

We are especially grateful to A. Rao for kindly providing the NFAT reagents and *Nfat2^{fl/fl} Cd4-cre⁺* mice.

This work was supported by grants to J.P.B.V. from the CNPq (307296/2011-3 and 476314/2012-7), FAPERJ (112.056/2012, 102.308/2013, 110.794/2013, and 101.147/2013), and INCT-Cancer (573806/2008-0 and 170.026/2008). P.I.L. and D.V.F. were supported by a FAPERJ fellowship, M.C.R. was supported by a CAPES fellowship, and E.P. was supported by a CNPq fellowship.

FUNDING INFORMATION

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) provided funding to Joao P. B. Viola under grant numbers 307296/2011-3 and 476314/2012-7. Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) provided funding to Joao P. B. Viola under grant numbers 112.056/2012, 102.308/2013, 110.794/2013, and 101.147/2013. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para o Controle do Câncer (INCT-Cancer) provided funding to Joao P. B. Viola under grant numbers 573806/2008-0 and 170.026/2008.

REFERENCES

- Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241:202–205. <http://dx.doi.org/10.1126/science.3260404>.
- McCaffrey PG, Perrino BA, Soderling TR, Rao A. 1993. NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J Biol Chem* 268:3747–3752.
- Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR. 1994. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369:497–502. <http://dx.doi.org/10.1038/369497a0>.
- 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. [http://dx.doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90027-6](http://dx.doi.org/10.1016/1074-7613(95)90027-6).
- Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannum C, Arai K, Arai N. 1995. NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol* 15:2697–2706. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.15.5.2697>.
- Rao A, Luo C, Hogan PG. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707–747. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.707>.
- Vihma H, Pruunsild P, Timmusk T. 2008. Alternative splicing and expression of human and mouse NFAT genes. *Genomics* 92:279–291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.06.011>.
- Macian F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5:472–484. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1632>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00256-08>.
- Viola JP, Carvalho LD, Fonseca BP, Teixeira LK. 2005. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res* 38:335–344. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2005000300003>.
- Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V. 2006. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J* 25:3714–3724. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601246>.
- Mognol GP, de Araujo-Souza PS, Robbs BK, Teixeira LK, Viola JP. 2012. Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements. *Cell Cycle* 11:1014–1028. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.5.19518>.
- Carvalho LD, Teixeira LK, Carrossini N, Caldeira AT, Ansel KM, Rao A, Viola JP. 2007. The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. *Cell Cycle* 6:1789–1795. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.6.14.4473>.
- Pedrosa AM, Weinlich R, Mognol GP, Robbs BK, Viola JP, Campa A, Amarante-Mendes GP. 2010. Melatonin protects CD4⁺ T cells from activation-induced cell death by blocking NFAT-mediated CD95 ligand upregulation. *J Immunol* 184:3487–3494. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0902961>.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.16.4323>.
- Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleul S, Nelius T, Volpert OV. 2004. Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* 199:1513–1522. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20040474>.
- Robbs BK, Lucena PI, Viola JP. 2013. The transcription factor NFAT1 induces apoptosis through cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK pathway and upregulation of TNF-alpha expression. *Biochim Biophys Acta* 1833:2016–2028. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.003>.
- Medyouf H, Ghysdael J. 2008. The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle* 7:297–303. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.7.3.5357>.
- Qin JJ, Nag S, Wang W, Zhou J, Zhang WD, Wang H, Zhang R. 2014. NFAT as cancer target: mission possible? *Biochim Biophys Acta* 1846:297–311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.07.009>.
- Levin-Gromiko U, Koshelev V, Kushnir P, Fedida-Metula S, Voronov E, Fishman D. 2014. Amplified lipid rafts of malignant cells constitute a target for inhibition of aberrantly active NFAT and melanoma tumor growth by the aminobisphosphonate zoledronic acid. *Carcinogenesis* 35:2555–2566. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgu178>.
- Tripathi MK, Deane NG, Zhu J, An H, Mima S, Wang X, Padmanabhan S, Shi Z, Prodduturi N, Ciombor KK, Chen X, Washington MK, Zhang B, Beauchamp RD. 2014. Nuclear factor of activated T-cell activity is associated with metastatic capacity in colon cancer. *Cancer Res* 74:6947–6957. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1592>.
- Marafioti T, Pozzobon M, Hansmann ML, Ventura R, Pileri SA, Robertson H, Gesk S, Gaulard P, Barth TF, Du MQ, Leoncini L, Moller P, Natkunam Y, Siebert R, Mason DY. 2005. The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br J Haematol* 128:333–342. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05313.x>.
- Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, Boubaya M, Letestu R, Levy V, Ajchenbaum-Cymbalista F, Varin-Blank N. 2012. The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 120:356–365. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-12-397158>.
- Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrnsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, Schulze-Luehrmann J, Santner-Nanan B, Feoktistova E, Konig T, Avots A, Schmitt E, Berberich-Siebelt F, Schimpl A, Serfling E. 2002. Auto-regulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 16:881–895. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00329-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00329-1).
- Sherman MA, Powell DR, Weiss DL, Brown MA. 1999. NF-ATc isoforms are differentially expressed and regulated in murine T and mast cells. *J Immunol* 162:2820–2828.
- Bhattacharyya S, Deb J, Patra AK, Thuy Pham DA, Chen W, Vaeth M, Berberich-Siebelt F, Klein-Hessling S, Lamperti ED, Reifenberg K, Jellusova J, Schweizer A, Nitschke L, Leich E, Rosenwald A, Brunner C, Engelmann S, Bommhardt U, Avots A, Muller MR, Kondo E, Serfling E. 2011. NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin-NFAT signaling network. *J Exp Med* 208:823–839. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20100945>.
- Hock M, Vaeth M, Rudolf R, Patra AK, Pham DA, Muhammad K, Pusch T, Bopp T, Schmitt E, Rost R, Berberich-Siebelt F, Tyrnsin D, Chuvpilo S, Avots A, Serfling E, Klein-Hessling S. 2013. NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes. *J Immunol* 190:2345–2353. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1201591>.
- Hock MB, Brown MA. 2003. Nuclear factor of activated T cells 2 transactivation in mast cells: a novel isoform-specific transactivation domain confers unique FcεpsilonRI responsiveness. *J Biol Chem* 278:26695–26703. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M301007200>.
- Martinez GJ, Pereira RM, Aijo T, Kim EY, Marangoni F, Pipkin ME, Togher S, Heissmeyer V, Zhang YC, Crotty S, Lamperti ED, Ansel KM, Mempel TR, Lahdesmaki H, Hogan PG, Rao A. 2015. The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. *Immunity* 42:265–278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.006>.
- Teixeira LK, Fonseca BP, Vieira-de-Abreu A, Barboza BA, Robbs BK, Bozza PT, Viola JP. 2005. IFN-gamma production by CD8⁺ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. *J Immunol* 175:5931–5939. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5931>.
- Monticelli S, Rao A. 2002. NFAT1 and NFAT2 are positive regulators of IL-4 gene transcription. *Eur J Immunol* 32:2971–2978. [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141\(200210\)32:10<2971::AID-IMMU2971>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141(200210)32:10<2971::AID-IMMU2971>3.0.CO;2-G).
- Tsai EY, Jain J, Pesavento PA, Rao A, Goldfeld AE. 1996. Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Mol Cell Biol* 16:459–467. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.16.2.459>.
- Triezenberg SJ. 1995. Structure and function of transcriptional activation

- domains. *Curr Opin Genet Dev* 5:190–196. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-437X\(95\)80007-7](http://dx.doi.org/10.1016/0959-437X(95)80007-7).
34. Giniger E, Ptashne M. 1987. Transcription in yeast activated by a putative amphipathic alpha helix linked to a DNA binding unit. *Nature* 330:670–672. <http://dx.doi.org/10.1038/330670a0>.
 35. Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. 2010. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun* 11:27–60. <http://dx.doi.org/10.1159/000289196>.
 36. Vaeth M, Schliesser U, Muller G, Reissig S, Satoh K, Tuettenberg A, Jonuleit H, Waisman A, Muller MR, Serfling E, Sawitzki BS, Berberich-Siebelt F. 2012. Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:16258–16263. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1203870109>.
 37. Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, Glockner J, Fischer C, Kerstan A, Escher C, Inashkina I, Hlubek F, Jankevics E, Brabletz T, Serfling E. 1999. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* 162:7294–7301.
 38. Chuvpilo S, Zimmer M, Kerstan A, Glockner J, Avots A, Escher C, Fischer C, Inashkina I, Jankevics E, Berberich-Siebelt F, Schmitt E, Serfling E. 1999. Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* 10:261–269. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80026-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80026-6).
 39. Zhou B, Cron RQ, Wu B, Genin A, Wang Z, Liu S, Robson P, Baldwin HS. 2002. Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2. *J Biol Chem* 277:10704–10711. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M107068200>.
 40. Luo C, Burgeon E, Rao A. 1996. Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1. *J Exp Med* 184:141–147. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.184.1.141>.
 41. Yang T, Davis RJ, Chow CW. 2001. Requirement of two NFATc4 transactivation domains for CBP potentiation. *J Biol Chem* 276:39569–39576. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M102961200>.
 42. Oum JH, Han J, Myung H, Hleb M, Sharma S, Park J. 2002. Molecular mechanism of NFAT family proteins for differential regulation of the IL-2 and TNF-alpha promoters. *Mol Cells* 13:77–84.
 43. Kaminuma O, Kitamura F, Kitamura N, Hiroi T, Miyoshi H, Miyawaki A, Miyatake S. 2008. Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF-alpha gene expression in T cells. *J Immunol* 180:319–326. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.319>.
 44. Luo C, Burgeon E, Carew JA, McCaffrey PG, Badalian TM, Lane WS, Hogan PG, Rao A. 1996. Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol Cell Biol* 16:3955–3966. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.16.7.3955>.
 45. Faget DV, Lucena PI, Robbs BK, Viola JP. 2012. NFAT1 C-terminal domains are necessary but not sufficient for inducing cell death. *PLoS One* 7:e47868. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047868>.
 46. Green DR, Droin N, Pinkoski M. 2003. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193:70–81. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00051.x>.
 47. Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR. 2006. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441:595–600. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04678>.
 48. Yao K, Cho YY, Bergen HR, III, Madden BJ, Choi BY, Ma WY, Bode AM, Dong Z. 2007. Nuclear factor of activated T3 is a negative regulator of Ras-JNK1/2-AP-1 induced cell transformation. *Cancer Res* 67:8725–8735. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4788>.
 49. Neal JW, Clipstone NA. 2003. A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J Biol Chem* 278:17246–17254. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M300528200>.
 50. Medyouf H, Alcalde H, Berthier C, Guillemin MC, dos Santos NR, Janin A, Decaudin D, de The H, Ghysdael J. 2007. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 13:736–741. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1588>.
 51. Pham LV, Tamayo AT, Li C, Bueso-Ramos C, Ford RJ. 2010. An epigenetic chromatin remodeling role for NFATc1 in transcriptional regulation of growth and survival genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 116:3899–3906. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-12-257378>.
 52. Fu L, Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo A, Yoshimura L, Ford RJ. 2006. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BlyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 107:4540–4548. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-10-4042>.
 53. Duque J, Fresno M, Iniguez MA. 2005. Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 280:8686–8693. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M413076200>.
 54. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205–2232. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1102703>.