

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



**Papel diferencial de NFATc1 y NFATc3 en la regulación
de genes implicados en la activación de linfocitos T y
en angiogénesis.**

Katia Urso

Madrid 2012

Memoria De Tesis Doctoral



Papel diferencial de NFATc1 y NFATc3 en la regulación de genes implicados en la activación de linfocitos T y en angiogénesis.

Katia Urso

Madrid 2012

Dirigida por:

Dr. Juan Miguel Redondo Moya

Dr. Antonio Rodriguez Marquez

Este trabajo se ha realizado en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), bajo la dirección del Dr. Antonio Rodríguez Marqués y el Dr. Juan Miguel Redondo Moya, con ayuda de una beca de Formación de Investigación del Instituto de Salud Carlos III y la ayuda predoctoral del CNIC.

Abreviaturas	1
Summary	6
Introducción	7
1 La ruta de señalización CN/NFAT	8
2 Familia de factores de transcripción NFAT	9
2.1 Isoformas de NFAT	9
2.2 Estructura molecular de NFAT	11
2.2.1 Región de Homología a NFAT (NHR)	11
2.2.2 Dominio de unión a DNA (DBD)	11
2.2.3 Dominios de transactivación (TAD)	13
3 Regulación de la ruta de CN/NFAT	14
3.1 Regulación de Calcineurina	15
3.1.1 Autoregulación de Calcineurina	15
3.1.2 Proteínas que interaccionan y regulan CN	17
3.1.3 Inhibición de CN por CsA y FK506	20
3.2 Regulación de NFAT	21

3.2.1 Modificaciones post traduccionales de NFAT	21
3.2.2 Regulación de NFAT mediante microRNA o interacción con proteínas	24
4 Funciones de NFAT	25
4.1 Función de NFAT en el sistema inmune	26
4.1.1 Ratones deficientes en NFATc1 (NFATc1 ^{-/-})	29
4.1.1 Ratones deficientes en NFATc2 (NFATc2 ^{-/-})	29
4.1.1 Ratones deficientes en NFATc3 (NFATc3 ^{-/-})	30
4.1.4 Doble deleción de miembros NFAT	30
4.2 Papel de CN/NFAT en el sistema cardiovascular y angiogénesis	31
4.3 Papel de NFAT en ciclo celular	32
4.4 Otros procesos biológicos regulados por NFAT	33
Objetivos	35
Materiales y Métodos	37
1 Cultivos celulares y reactivos	38
2 Diseño de secuencias shRNA	39
3 Generación de lentivirus e infección	41
4 Extractos celulares de proteína e inmunoblotting	42
5 Extractos de proteínas nucleares y EMSA	43

6 Plásmidos de expresión	44
7 Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa	45
8 Extractos de RNA, PCR y tarjetas microfluidicas	46
9 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	46
10 Extractos de DNA genómico y CHIP	47
11 Citometría de flujo para la detección de COX2 en PBLs	48
12 Ensayos de proliferación celular	49
13 Ensayos de migración y angiogénesis	49
15 Ensayos de matrigel	50
16 Análisis estadístico	50
Resultados	52
1 Diseño y construcción de lentivirus para el silenciamiento de los diferentes miembros de la familia NFAT	53
2 Genes regulados por NFAT: RCAN	56
3 Genes de la activación de linfocitos T regulados por NFATc1 y NFATc3	60
3.1 Regulación diferencial de Interleuquina 2 por NFATc1 y NFATc3	61
3.2 Regulación de la Ciclooxygenasa 2 por NFATc3 en las células JK y linfocitos T primarios	66
3.3 Papel de NFATc1 y NFATc3 en la regulación de la expresión de IL2 y COX2 y de la proliferación en linfoblastos	72

4 Función de NFATc1 y NFATc3 en los procesos de migración, proliferación y angiogénesis de HUVEC	75
Discusión	86
Conclusiones	98
Bibliografía	100
Anexo I: Artículo	113
Anexo II : DVD	

Abreviaturas

ADAMTS1	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs 1</i>
ADP	<i>Adenosine DiPhosphate</i>
Akt or PKB	<i>Protein Kinase B</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AP1	<i>Activator Protein 1</i>
APC	<i>Aloficocianina (AlloPhycoCyanin)</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
ARRE II	<i>Antigen Receptor Response Element II</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cMAF	<i>Musculoaponeurotic Fibrosarcoma</i>
C-term	<i>Carboxi-terminal</i>
Cabin	<i>Calcineurin Binding Protein</i>
CaM	<i>Calmodulina</i>
C1	<i>NFATc1</i>
C3	<i>NFATc3</i>
C3R	<i>NFATc3 resistente al RNA de interferencia</i>
CD28RE	<i>CD28 Response Element</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHP	<i>Calcineurin Homologous Protein</i>
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
cMAF	<i>Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) AS42 oncogene homolog</i>
CN	<i>Calcineurina</i>
CnA	<i>Subunidad A de calcineurina</i>
CnB	<i>Subunidad B de calcineurina</i>
COX2	<i>Ciclooxigenasa 2 (Cyclo-oxygenase 2)</i>
CsA	<i>Ciclosporina A</i>

Abreviaturas

CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DBB	<i>DNA Binding Buffer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DN	<i>Double Negative</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	<i>Double Positive</i>
DTT	<i>Ditiotreitol</i>
DYRKs	<i>Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase</i>
ECGF	<i>Endothelial Cell Growth Factor</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ácido etilen-diaminotetra-acético</i>
EGR	<i>Early Growth response</i>
EGTA	<i>Ácido etilen-glycoltetraacético</i>
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
Etox	<i>Etoricoxib</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FKBP	<i>FK506 Binding protein</i>
GATA	<i>GATA binding protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glu	<i>Ácido glutámico</i>
Grg4	<i>Groucho-related gene 4</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
HDM2	<i>Human homologue of murine mdm2)</i>
HEK-293	<i>Human embryonic kidney cells</i>

HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HMBS	<i>Hydroxymethylbilane synthase</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial cells</i>
IL	Interleuquina
IFNγ	Interferon gamma
IgG	Inmunoglobulina G
iRNA	RNA de interferencia
Io	Ionóforo de calcio
JK	Células Jurkat
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KD	<i>Knock Down</i>
KD-c1	<i>NFATc1 Knock Down</i>
KD-c3	<i>NFATc3 Knock Down</i>
KDR	<i>Kinase insert domain receptor</i>
KDSc	<i>Scrambled sequence Knock Down</i>
KO	<i>Knock Out</i>
KPNB1	<i>Karyopherin (importin) beta 1</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MEKK1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility complex</i>
MMLV-RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NES	<i>Nuclear Export Sequence</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>

NFATc^{-/-}	Ratones deficientes del gen NFATc
NFKB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHR	<i>NFAT Homology Region</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NP40	Nonidet P40
NRON	<i>Non-coding RNA Repressor Of NFAT</i>
N-term	Amino-terminal
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>
PBLs	<i>Peripheral Blood Lymphocytes</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PE	<i>Phycoerytrin</i>
PHA	<i>Phytohaemagglutinin</i>
Pim1	<i>Proviral Integration site of Moloney murine leukemia virus</i>
PKA, B, C	<i>Protein Kinase A, B, C</i>
PLCγ	<i>Phospholipase C γ</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PML	<i>Promyelocytic leukemia nuclear bodies</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PSF	<i>Polypyrimidine tract-binding protein associated Splicing Factor</i>
Q-PCR	<i>Quantitative PCR</i>
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
RAG1, 2^{-/-}	<i>RAG1, 2 Knock Out</i>
RCAN1	<i>Regulator of Calcineurin 1</i>
RCAN1^{-/-}	<i>RCAN1 Knock Out</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
rRNA 18S	Ribosomal RNA18S
Runx	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEB	<i>Staphylococcal enterotoxin B</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP	<i>Single positive cells</i>
SP	<i>Serine-prolin reach domain</i>
SRR	<i>Serin-reach repeats</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
TAD	<i>Transactivation Domain</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TBS-T	<i>Tween-containing Tris-Buffered Saline</i>
T_c	Células T citotóxicas
TCR	<i>T cell receptor</i>
TFRC	<i>Transferrin Receptor</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β 1</i>
T_h	<i>T cell helper</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetrametil-benzinide
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Summary

The NFAT family of transcription factors consists of four members regulated by the Ca^{2+} -calmodulin dependent phosphatase Calcineurin (CN). These transcription factors play important roles in many biological processes, including the development and function of the immune and vascular systems. Cells usually express more than one NFAT member, raising the question of whether NFATs play overlapping roles or if each member has selective functions. Many studies tried to address this issue by generating knock out mice (KO) and the relatively mild impact of gene deletion of single NFAT members has been interpreted as indicating functional redundancy among NFAT proteins.

One of the limitations of studies with knock out mice is compensation of the role of the deficient gene by related genes, masking the true impact of a gene deletion. To avoid this limitation, we knocked down NFATc3 and NFATc1 individually and compared the effects on the transcriptional regulation of known NFAT target genes, obtaining novel findings not previously observed in knockout studies. NFATc3 knockdown blocks IL2 and COX2 gene expression in human T cells and prevents their activation, while NFATc1 knockdown upregulates the expression of IL2 and several other inflammatory modulators. Furthermore, NFAT member-dependent regulation is not restricted to this cell type, since in primary endothelial cells VEGF-induced expression of COX2, proliferation, migration and in vivo angiogenesis are also NFATc3 dependent. Here we show that NFATc3 specifically regulates IL2 and COX2 gene expression in transformed and primary T cells. Similarly, NFATc3 controls COX2 expression in endothelial cells and is required for endothelial cell migration, proliferation and angiogenesis in vivo.

Our results show that short term suppression by mRNA knockdown reveals specific functions for individual NFAT members. NFATc3, previously considered not to play an important role in T cell activation and inflammation, is specifically required for the transcriptional up-regulation of the important inflammatory factors IL2 and COX2. NFATc3-dependent COX2 regulation moreover plays an important role in endothelial cell migration and angiogenesis. These results strongly suggest that individual NFAT members have differential effects on the transcription of target genes that are likely masked by compensatory effects in KO studies.

Introducción

Introducción

1 La ruta de señalización CN/NFAT

La familia de factores de transcripción NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) se compone de 5 miembros (NFATc1-c4, NFAT5), cuatro de los cuales (NFATc1-c4) están regulados por la fosfatasa Calcineurina (CN). En células en reposo NFATc1-c4 se encuentran altamente fosforilados en el citoplasma. Estímulos que provocan un aumento del calcio intracelular, vía activación de la fosfolipasa C γ (PLC γ) y subsiguiente liberación de iones calcio (Ca²⁺) del retículo endoplásmico, activan la fosfatasa CN que desfosforila serinas (en un total de 13) presentes en la región reguladora de NFAT (NHR) (Okamura et al., 2000). La desfosforilación de estos residuos provoca la exposición de una secuencia de localización nuclear (NLS) así como el enmascaramiento de una secuencia de exportación nuclear (NES). Como consecuencia, NFAT se transloca al núcleo donde, mediante su dominio de unión a DNA (DBD), interacciona con secuencias de DNA específicas regulando la actividad transcripcional de sus genes diana. Cuando la señal de activación cesa, debido a un descenso de la concentración de Ca²⁺ en el citosol, varias quinasas nucleares fosforilan de nuevo la región NHR provocando la exportación de NFAT al citoplasma (Fig. 1) (Hogan et al., 2003; Macian, 2005).

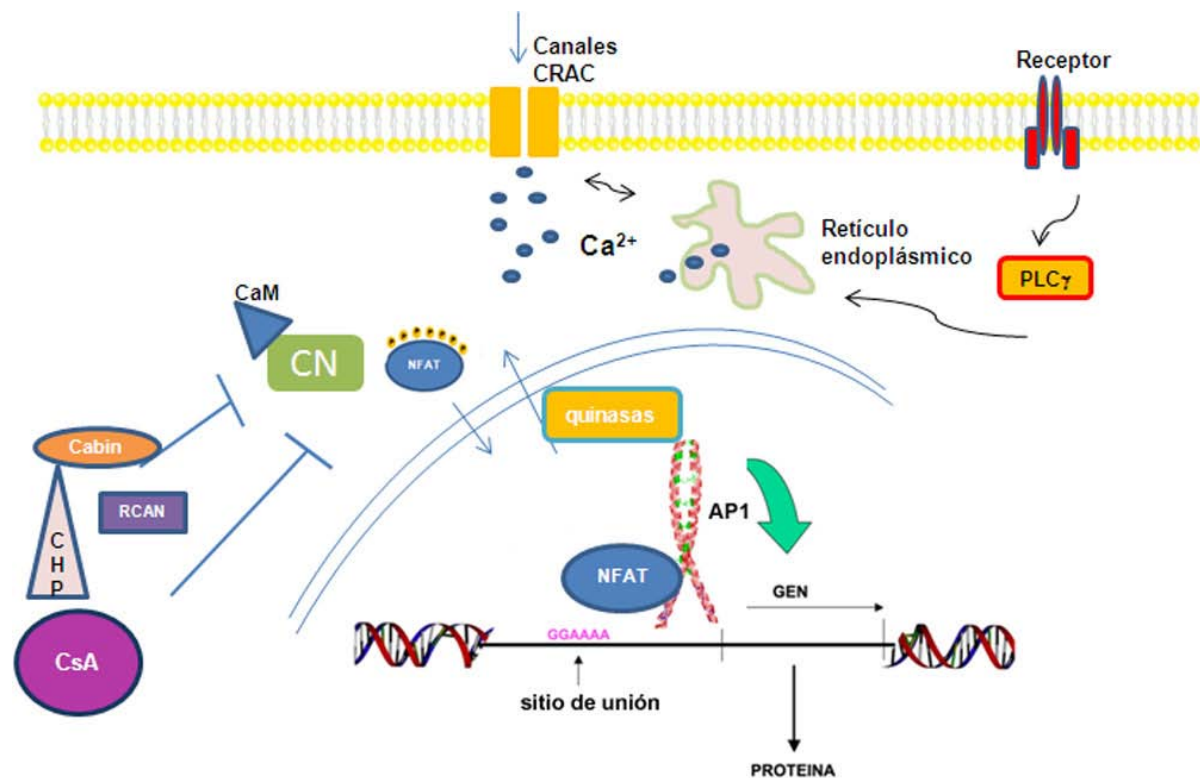


Figura 1 Esquema básico de la ruta de señalización CN/NFAT. Los receptores de tipo tirosín-quinasa y, en linfocitos T, el receptor de la respuesta inmune TCR activan la fosfolipasa Cy ($PLC\gamma$) que provoca la liberación de iones de calcio (Ca^{2+}) del retículo endoplásmico; como consecuencia de esta ligera subida en los niveles de Ca^{2+} se abren los canales CRAC de la membrana plasmática, dando como resultado un elevado aumento de la concentración de los iones Ca^{2+} en el citosol. Los iones Ca^{2+} se unen a la Calmodulina (CaM) permitiendo que ésta interaccione con la fosfatasa Calcineurina (CN). Esta interacción causa un cambio conformacional en CN que conlleva su activación. En estado de reposo los factores NFAT se encuentran en estado hiperfosforilado en el citosol. La CN activada desfosforila a NFAT provocando la exposición de su secuencia NLS necesaria para su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, NFAT interacciona con su secuencia consenso (GGAAAA) presente en los promotores de sus genes diana. Para ejercer su función como factor de transcripción, NFAT suele necesitar la colaboración de otros factores de transcripción, como AP1 o GATA, que estabilizan su unión al DNA. Cuando la señal cesa (los niveles de Ca^{2+} intracelular vuelven a valores normales), las quinasas nucleares fosforilan a NFAT permitiendo su exportación al citoplasma. En este compartimento otras quinasas se ocupan de mantener NFAT en estado fosforilado e inactivo. La actividad de la CN está regulada por varios inhibidores endógenos (RCAN1, Cabin, CHP) y se puede inhibir de forma exógena mediante la administración de fármacos como la ciclosporina A (CsA) y FK506.

2 Familia de factores de transcripción NFAT

2.1 Isoformas de NFAT

Los genes de cada miembro NFAT humano expresan varias isoformas. (Fig. 2). Las isoformas de los genes NFATc2-c4 son constitutivas, es decir, se detectan

todas ellas en las células en reposo (Imamura et al., 1998; Luo et al., 1996a; Vihma et al., 2008). Por otro lado el gen NFATc1 produce 6 isoformas, 3 de ellas (β A-C) se expresan de forma constitutiva mientras que el resto (α A-C) son inducibles; su transcripción está regulada por un promotor alternativo (P1) dependiente de CN/NFATc2; estas formas inducibles además utilizan un sitio alternativo de poliadenilación (Chuvpilo et al., 1999b). De las 4 isoformas de NFATc3, la isoforma 1 es la más abundante en timo y en células T, mientras que la isoforma 2 es la mayoritaria en músculo esquelético. La isoforma 4 se traduce en una proteína no funcional (Imamura et al., 1998). Aunque se han descrito muchas variantes de los RNA mensajeros de los miembros NFAT, en particular de NFATc4 (hasta un total de 15), aún no se han detectado todas las proteínas correspondientes (Vihma et al., 2008).

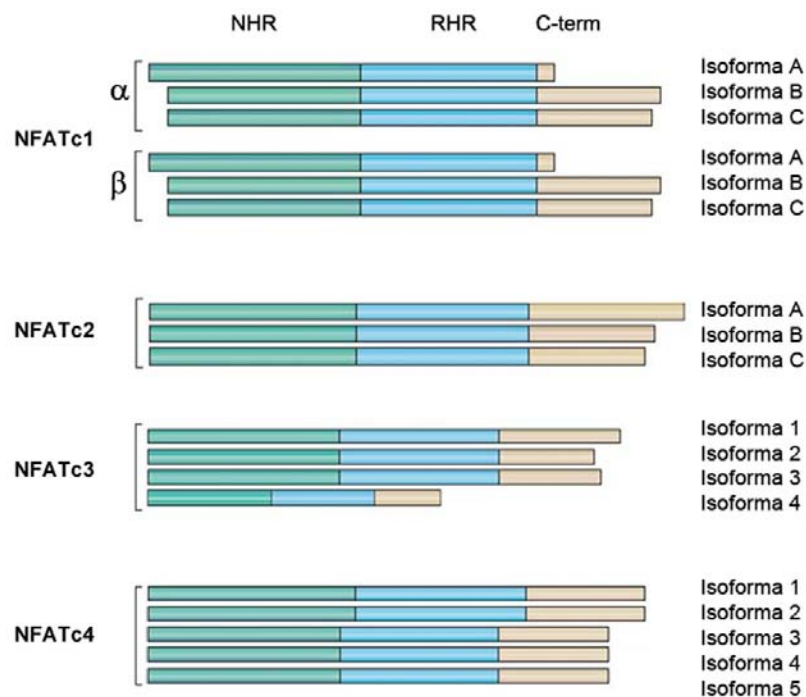


Figura 2 Isoformas de las proteínas NFATs humanas (adaptada de Macian *et al*, 2005). Los genes humanos de los miembros NFAT codifican para varias isoformas. *NFATc1* codifica 6 isoformas; las 3 isoformas α están reguladas por el promotor P1, inducible de manera dependiente de CN/NFAT, y utilizan el sitio de poliadenilación pA1. Las 3 isoformas β son constitutivas y están reguladas por el promotor P2 y usan el sitio de poliadenilación pA2. Los genes *NFATc2* y *NFATc3* producen 3 isoformas constitutivas (la isoforma 4 del c3 no produce una proteína funcional). El gen *NFATc4* produce al menos 15 transcritos de los cuales sólo 5 se traducen en proteína.

2.2 Estructura molecular de NFAT

Las secuencias NFAT descritas contienen una serie de dominios que presentan diferentes grados de homología entre sus miembros (Fig. 2 y 3). Las regiones descritas son:

2.2.1 Región de Homología a NFAT (NHR)

La región reguladora o dominio NHR (Región de Homología a NFAT), se ubica en el amino-terminal (N-term) y contiene las secuencias de interacción con CN descritas, PxlIT y LxVP (Aramburu et al., 1998; Martínez-Martínez et al., 2006). En ella se encuentran además las serinas diana de la fosfatasa CN, agrupados en regiones denominadas SP (Serina-Prolina) y regiones SRR (Serina-Arginina-Arginina). En este dominio también se encuentran las secuencias NLS y NES, por lo que esta región es responsable tanto de la interacción con CN como de la translocación al núcleo de NFAT. Además, dado que el tratamiento de extractos celulares con CN aumenta la interacción de NFATc2 con el DNA (Park et al., 1995), se considera que la desfosforilación es también necesaria para el correcto posicionamiento de este factor de transcripción en el DNA. Por lo tanto, la región NHR participaría en al menos cuatro pasos fundamentales en la regulación de NFAT, como son la interacción con CN, la translocación al núcleo, la unión al DNA y su exportación desde el núcleo al citoplasma.

2.2.2 Dominio de unión a DNA (DBD)

El dominio de unión a DNA o DBD (*DNA Binding Domain*), ubicado en el extremo carboxi-terminal (C-term) de la proteína, interacciona con el DNA en una secuencia cuyo núcleo central es 'GGAAAA'. El DBD contiene una secuencia altamente conservada y con alto grado de homología entre los miembros NFAT; su estructura tridimensional es muy parecida al dominio de interacción a DNA de los factores de transcripción pertenecientes a la familia Rel (NFkB), por lo que también se conoce este dominio como RHR (*Rel Homology Region*). En este dominio se distinguen dos regiones funcionales: el extremo N-term (RHR-N) que contacta con el DNA y el extremo C-term (RHR-C) implicado en la formación de

dímeros (Huxford et al., 1998; Jacobs and Harrison, 1998). NFAT5 presenta la mayor homología estructural con las proteínas de la familia Rel y, al igual que éstas, interacciona con el DNA formando homodímeros (Kultz and Csonka, 1999; Miyakawa et al., 1999). El resto de los miembros de la familia NFAT no suele formar homodímeros, sino que se une de forma monomérica al DNA (Stroud and Chen, 2003). Además suelen necesitar de la cooperación con otros factores como AP1, GATA, cMAF, Runx y EGR para regular la transcripción de sus genes diana (Decker et al., 2003). La ampliamente caracterizada cooperación de NFAT con AP1 (cJun, cFos) (Rao, 1994) es capaz de potenciar la activación del promotor diana, ya que la interacción conjunta de ambos factores es mucho más estable que la de cada uno de ellos por separado. Se han descrito sitios de unión al complejo NFAT-AP1 en promotores y enhancers de numerosas citoquinas, como por ejemplo IL2, IL4, IFN γ (Rao, 1994). La posición de cada secuencia de reconocimiento en el DNA es invariable, con el sitio NFAT situado en el extremo 5' seguido por el sitio de unión a AP1. El intercambio de posición de los dos sitios anula la cooperación entre los dos factores (Rao et al., 1997).

Algunos estudios anteriores sugieren que, en determinadas condiciones, NFATc2 es capaz de formar dímeros al interactuar con el DNA. Esta situación tiene lugar cuando el sitio de unión contiene una secuencia palindrómica. Claros ejemplos son el promotor de la IL8 o las repeticiones terminales (LTR) del DNA proveniente del virus HIV (Giffin et al., 2003; Jin et al., 2003). Además, los NFAT son capaces de interactuar con secuencias de DNA diferentes a las canónicas, como los sitios *kB-like*, cuya secuencia es mucho más similar a las secuencias consenso del factor de transcripción NFkB (Rao et al., 1997).

En los promotores de los genes diana de NFAT es frecuente detectar múltiples sitios de unión a NFAT, sugiriendo que la concentración o el número de factores NFAT presentes en el núcleo puede ser determinante para una completa activación del promotor del gen diana.

2.2.3 Dominios de transactivación (TAD)

La homología entre los extremos N- y C-term de los diferentes miembros NFAT es muy baja, sin embargo son ricos en aminoácidos ácidos y prolina por lo que se han propuesto como dominios de transactivación o TAD (Rao et al., 1997).

Todas las isoformas de NFATc1 comparten un potente TAD en el N-term (TAD A); las isoformas B y C además disponen de un TAD en el C-term (TAD B). Sin embargo, en el caso de NFATc1/B el TAD presenta actividad represora en lugar de transactivadora (Chuvpilo et al., 1999a). Asimismo, el TAD B de las isoformas NFATc1/C es sumoilable, modificación que le confiere actividad represora como se describirá más adelante. En NFATc2 se han identificado dos TAD funcionales: uno localizado en los primeros 100 aminoácidos del extremo N-term, y el otro en los últimos 200 aminoácidos del extremo C-term (Luo et al., 1996b). La isoforma 1 de NFATc3 presenta en su C-term un TAD de 15 aminoácidos, confiriéndole una capacidad transactivadora mayor que las otras isoformas que tienen un extremo C-term más corto (Imamura et al., 1998).

En general, las regiones TAD están muy poco conservadas entre los miembros y son objeto de importantes modificaciones post-traduccionales. Por ello estas regiones se consideran buenas candidatas para conferir cierta especificidad de función a cada miembro NFAT.

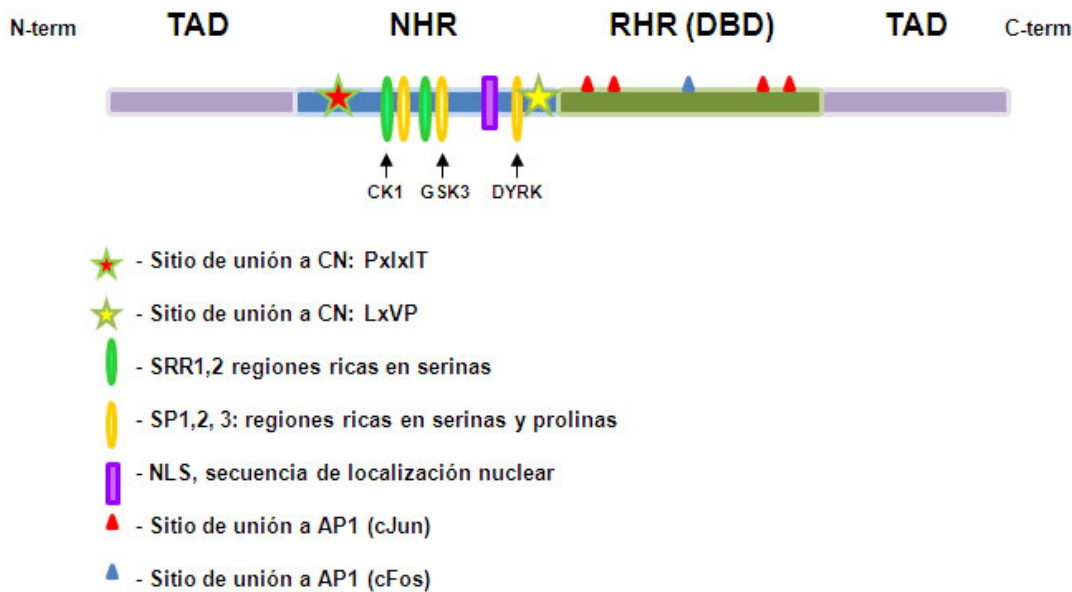


Figura 3 Esquema básico de las proteínas NFAT reguladas por Calcineurina. La estructura primaria de las proteínas NFAT presenta varios dominios comunes. El dominio de homología a Rel (RHR) o dominio de interacción a DNA (DBD) es el más conservado entre los miembros. Además de la unión con el DNA, este dominio también es responsable de la interacción con el factor AP1 (c-Jun/c-Fos). La región reguladora (NHR) contiene los sitios de unión con CN (PxlIT y LxVP) y las regiones ricas en serinas (SP, SRR) diana tanto de CN como de las quinasas (CK1, GSK3, DYRKs). En los extremos N- y C-term se encuentran los dominios transactivadores (TAD), que son las regiones menos conservadas y donde tienen lugar las modificaciones post-traduccionales detectadas en algunos miembros.

3 Regulación de la ruta de CN/NFAT

La actividad de NFAT está regulada por muchas proteínas y procesos que intervienen a varios niveles en esta ruta de señalización. Entre estas proteínas destaca la propia fosfatasa celular CN cuya actividad está regulada a su vez por otras proteínas celulares como RCAN y Cabin. Además las proteínas NFAT están sometidas a otras modificaciones que regulan la localización intracelular, las interacciones con otras proteínas, la actividad transcripcional y la vida media.

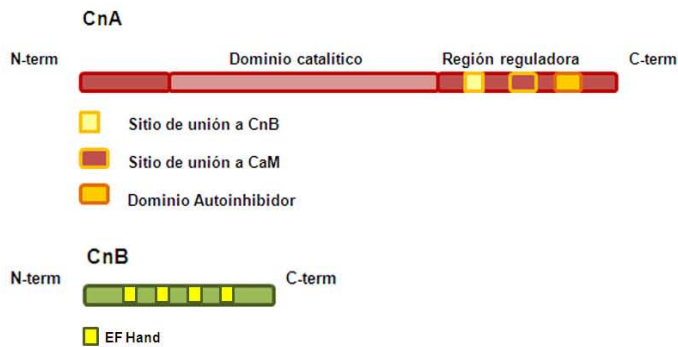
3.1 Regulación de Calcineurina

3.1.1 Autoregulación de Calcineurina

La Calcineurina (CN) es una serín-treonín fosfatasa de estructura heterodimérica formada por una subunidad catalítica, CnA, y una reguladora, CnB, codificadas por genes independientes (Aramburu et al., 2000; Rusnak and Mertz, 2000). En la secuencia de CnA se distingue un dominio catalítico, responsable de la actividad fosfatasa, y una región reguladora que, a su vez, contiene un dominio de interacción a CnB, un dominio de unión a Calmodulina (CaM) y un dominio autoinhibidor (Fig. 4).

En células en reposo la actividad fosfatasa está inhibida debido a la ocupación del centro activo por el dominio autoinhibidor, localizado en el extremo C-term de la subunidad CnA. Cuando un estímulo incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular, la Calmodulina (CaM) se une al heterodímero CN, provocando un cambio conformacional que desplaza el dominio autoinhibidor dejando accesible el centro activo y permitiendo la desfosforilación de las proteínas diana de CN, entre las que se encuentra NFAT. Cuando los niveles de calcio intracelular vuelven a valores normales, CaM deja de estar unida a la región reguladora de CnA, provocando que el dominio autoinhibidor vuelva a ocupar el centro activo. Como consecuencia, la actividad fosfatasa CN cesa, permitiendo la fosforilación del dominio NHR de NFAT que, a su vez, disminuye la unión de este factor al DNA y permite su exportación al citosol (Li et al., 2011).

A



B

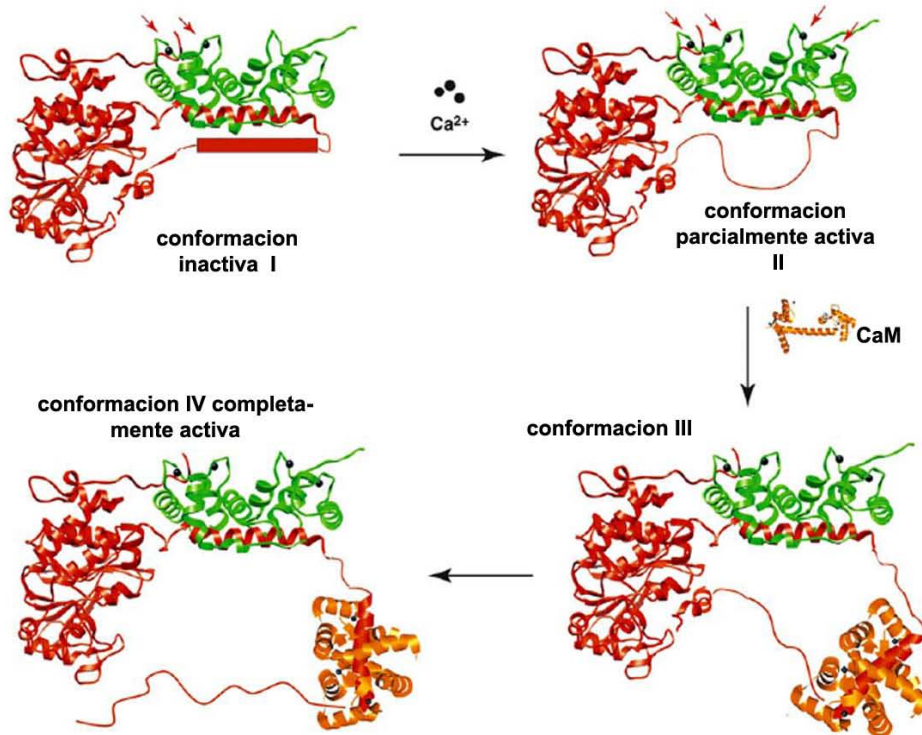


Figura 4 Activación y cambios conformacionales de Calcineurina (adaptada de Li H, 2011, 21) (A) Esquema de los dominios descritos en las subunidades Calcineurina A (CnA; en rojo) y Calcineurina B (CnB; en verde). En el extremo C-term de CnA se ubica la región reguladora que contiene el sitio de unión a CaM y a la subunidad reguladora CnB y el dominio autoinhibidor. En la región central se encuentra el sitio catalítico de la enzima. Estructura primaria de la subunidad B con los dominios de unión a iones Ca^{2+} en amarillo (*EF hand*). (B) Modelo del proceso de activación de la calcineurina. En las células en reposo en el heterodímero CnA+CnB (CN) el dominio autoinhibidor de la CnA ocupa el sitio catalítico, manteniendo la enzima en estado inactivo. CN se activa parcialmente con el aumento del Ca^{2+} citosólico que se une a la CnB y facilita la sucesiva unión de CaM a la CnA. Esta interacción provoca el desplazamiento del dominio autoinhibidor del dominio catalítico y la completa activación de la CN.

3.1.2 Proteínas que interaccionan y regulan CN

RCAN

RCAN (*Regulator of Calcineurin*) es una familia de proteínas formada por 3 miembros (RCAN1-3), que regulan la actividad de CN. La regulación se lleva a cabo mediante dos mecanismos: por competición con otros sustratos de CN por la interacción con su centro activo y por inhibición directa de la actividad fosfatasa (Martinez-Martinez et al., 2009).

RCAN1 es el miembro más abundante y mejor caracterizado hasta el momento. El gen *RCAN1* contiene siete exones y puede transcribir 4 isoformas diferentes (RCAN1.1-4), gracias al uso alternativo como primer exón de los exones 1 y 4 (Fuentes et al., 1997). La transcripción de las isoformas RCAN1.1-3 está controlada por el mismo promotor localizado en el extremo 5' del gen; sin embargo, la transcripción de la isoforma RCAN1.4 está controlada por un promotor interno localizado en el intrón 3. A nivel de proteína, se han detectado y estudiado las isoformas RCAN1.1 y RCAN1.4. RCAN1.1 es una proteína de expresión constitutiva, mientras que RCAN1.4 es una proteína inducible cuyo promotor está regulado por CN, ya que contiene al menos 15 sitios de unión a NFAT (Yang et al., 2000). Por lo tanto, la expresión de RCAN1.4 supondría un mecanismo de auto-regulación (*feedback* negativo) de la ruta de señalización CN/NFAT donde la activación de CN provoca un aumento de la expresión de su regulador RCAN1.4. En la actualidad existe un debate sobre el papel inhibitor o activador de RCAN debido a que existen datos experimentales que describen su participación tanto en la inhibición como en la activación de la ruta CN/NFAT. Estos estudios se comentarán más adelante en la introducción.

CABIN 1

Cabin1 (*Calcineurin binding protein 1*), es una proteína de peso molecular relativamente alto (> 2.200 aminoácidos) de expresión ubicua. En células Jurkat (JK), Cabin 1 se encuentra principalmente en el núcleo, lo que es consistente con la presencia de 3 posibles secuencias de localización nuclear. En linfocitos T, la sobreexpresión de Cabin 1 provoca la inhibición de la activación

transcripcional del promotor de la IL2 tras el tratamiento con un éster de forbol e ionóforo de calcio (PMA+Io) (Sun et al., 1998). La interacción entre Cabin1 y CN en células T requiere la señalización de calcio y la activación de la vía PKC, componentes esenciales de la respuesta intracelular tras la activación del receptor de las célula T (TCR). Cabin1 es una fosfoproteína que se encuentra hipo-fosforilada en células T en reposo. En respuesta a la activación de la PKC, Cabin1 se hiperfosforila, aumentando su afinidad por CN. Por lo tanto, Cabin1 puede generar un bucle de regulación negativa que inhibe la actividad de CN durante la activación de las células T.

Cabin 1 contiene 2 regiones de interacción con CN, una localizada en los últimos 77 aminoácidos del extremo C-term y la otra ubicada en la parte central de la proteína (entre los aminoácidos 701-900). Cada una de estas regiones, que interacciona con una zona diferente de CN, es capaz de inhibir su actividad fosfatasa y, por lo tanto, la ruta de señalización de NFAT (Jang et al., 2007).

CHP

La proteína homóloga de CnB, CHP, fue inicialmente identificada como una proteína de unión de la isoforma NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ , esencial para la actividad de intercambio de cationes (Lin and Barber, 1996; Pang et al., 2001). Al realizar una comparativa de secuencias de proteínas se observó que existe una identidad significativa entre CHP, CnB y CaM. Esta observación llevó a estudiar si CHP afectaba a la actividad de CN. Se pudo observar que CHP inhibe tanto la translocación al núcleo de NFAT como la activación transcripcional dependiente de él en respuesta a estímulos (PMA+Io) en diferentes tipos celulares (Lin et al., 1999). Además, CHP es capaz de inhibir la actividad fosfatasa de CN in vitro de manera dosis dependiente. Estos resultados sugieren que CHP podría ser otro inhibidor endógeno de CN. No se conoce aún el mecanismo preciso por el cual CHP inhibe a CN. El alto grado de homología con CnB y CaM, permite pensar en varias formas de inhibición de CN. CHP podría competir con la subunidad B por la unión con la CnA, generando un heterodímero inactivo CHP-CnA. Otra posibilidad es que CHP funcione como un antagonista de CaM, uniéndose al dominio de interacción con CaM presente en

la CnA. En este caso, la unión de CHP a la CnA debería mantener el dominio autoinhibidor en el centro activo para ejercer su efecto inhibitor. Aunque se ha observado que la presencia de CHP disminuye la interacción de CN con CaM se necesitan más evidencias para confirmar este modelo de inhibición (Lin et al., 1999).

La expresión de CHP parece estar regulada, al menos en parte, por CN. En células JK, la estimulación (PMA+I_o) produce una disminución progresiva de los niveles de CHP (Lin et al., 1999). Así, es posible pensar que su expresión sirva para asegurar la completa inhibición de CN en las células T en reposo. Tras la activación, los niveles de CHP disminuyen permitiendo una completa activación de CN. Aún queda por confirmar si esta regulación de la expresión de CHP observada en JK tiene lugar también en células T primarias y definir cómo CN regula su expresión. La disminución de CHP podría ocurrir tanto por una inhibición de su transcripción y/o traducción como por una aceleración de su degradación.

Carabin

En la búsqueda de nuevos inhibidores endógenos de CN se aisló una proteína denominada Carabin que contiene un dominio Ras/Rab GAP (*GTPase-Activating Protein*) en la región N-term mientras que en el extremo C-term se ubica la región de interacción con CN. Carabin inhibe tanto la actividad fosfatasa de CN de manera dosis-dependiente, como la desfosforilación y translocación al núcleo de NFAT (Pan et al., 2007). Carabin es una proteína que se induce tras la estimulación de células T con anti-CD3/anti-CD28 y su expresión se regula por la ruta de CN/NFAT debido a la presencia de varios sitios de unión a NFAT en su promotor. Además, este inhibidor de CN también se une a Ras inhibiendo la ruta de activación de las quinasas ERKs. Por lo tanto, Carabin se puede definir como otro componente de *feedback* negativo que afecta a las rutas de CN/NFAT y de Ras (Pan et al., 2007). Dado que ambas participan en la activación en la señalización mediada por el TCR, el aumento de expresión de Carabin serviría para atenuar la activación de las células T.

3.1.3 Inhibición de CN por CsA y FK506

Ciclosporina A (CsA) y Tacrolimus (FK506) son fármacos inmunosupresores que inhiben CN. Estas dos moléculas al penetrar en las células forman complejos con proteínas celulares de la familia de las inmunofilinas (Ciclofilina y FKBP respectivamente). Estos grandes complejos fármaco-inmunofilina interaccionan con CN bloqueando la desfosforilación del sustrato; estos complejos además ocupan la zona de CN implicada en la interacción con las secuencias LxVP, presente en sustratos de CN como NFAT (Rodríguez et al., 2009). Por lo tanto el pretratamiento de las células con estos compuestos impide la translocación de NFAT al núcleo y la transcripción de genes NFAT-dependientes, entre los que se encuentran citoquinas esenciales para la respuesta inmune. Por ello estos dos fármacos se utilizan hoy en día como tratamiento post-transplante para inhibir el sistema inmune y así prevenir el rechazo del órgano transplantado. Sin embargo, el tratamiento prolongado produce muchos efectos secundarios, como neurotoxicidad, enfermedades cardiovasculares, disfunción renal y neoplasias (Kiani et al., 2000). Aunque se desconoce el origen de estos efectos secundarios, hay que tener en cuenta que, además de NFAT, CN regula directa e indirectamente otros factores de transcripción como NFκB, Elk1 o CREB. Además el tratamiento con CsA y FK506 provoca un aumento de la producción de TGFβ, citoquina que se considera, al menos en parte, responsable de la nefrotoxicidad causada por el tratamiento con estos fármacos; este último sería un mecanismo probablemente independiente de CN/NFAT. No se descarta la existencia de otras vías independientes de CN/NFAT que contribuyan a los efectos no deseados asociados al tratamiento farmacológico con CsA y FK506 (Kiani et al., 2000). Para evitar estos efectos secundarios, se están buscando y diseñando nuevos agentes (fármacos, péptidos, etc.) capaces de interferir selectivamente con la ruta de señalización CN/NFAT e inhibir la respuesta inmune, minimizando los posibles efectos adversos (Kaminuma, 2008).

3.2 Regulación de NFAT

NFAT es diana de una serie de modificaciones post-traduccionales que afectan de forma diferente a su actividad transcripcional, vida media, localización intracelular, etc. Todos estos mecanismos cooperan en la modulación de la actividad transcripcional de NFAT ejerciendo su efecto de manera distinta en el espacio y en el tiempo. De este modo la función de NFAT dependerá del entorno celular, resultado de la combinación de las diferentes modificaciones implicadas en su regulación.

3.2.1 Modificaciones post traduccionales de NFAT

Fosforilación

Cuando la señal que activa NFAT cesa, quinasas presentes en el núcleo vuelven a fosforilar la región reguladora (NHR). De este modo, mediante la exposición de una secuencia de exportación nuclear (NES) y el enmascaramiento de NLS, NFAT se transloca al citosol, cesando su actividad transcripcional. Se han descrito muchas quinasas que participan en este proceso; entre ellas destacan miembros de la familia de las MAPK, GSK3, PKA y MEKK1 (Hogan et al., 2003).

Distintos estudios han mostrado cierta especificidad de interacción entre las quinasas y los sitios SRR o SP de NFAT (Fig. 2). De hecho CK1 fosforila la región SRR1 (Okamura et al., 2004) y GSK3 la región SP2 de NFATc2 y las regiones SP2 y SP3 de NFATc1. Además, se ha demostrado que SRR1 es la región que controla directamente la exposición y enmascaramiento de la NLS (Okamura et al., 2000), y los sitios SP2 y SP3 participan en potenciar la afinidad de NFAT por el DNA (Neal and Clipstone, 2001). También se han descrito quinasas citosólicas encargadas del mantenimiento de NFAT en estado altamente fosforilado en este compartimento celular, entre las que se encuentra CK1.

Más recientemente se han descrito que las quinasas DYRKs pueden regular la localización subcelular de los NFATs (Gwack et al., 2006). Esta familia está

formada por miembros tanto nucleares, DYRK1A y 1B, como citosólicos, DYRK2 y 4. De esta manera pueden cumplir una doble función: DYRK1A estaría implicada en la exportación al citosol de NFAT y DYRK2 en su retención en el citosol (Gwack et al., 2006). Además se ha demostrado que interaccionan con el sitio SP3 de NFAT y que la fosforilación de este sitio es necesaria para que CK1 y GSK3 puedan posteriormente fosforilar NFAT en las regiones SRR1 y SP2, respectivamente (Beals et al., 1997).

La fosforilación de NFAT es una modificación que no solo regula su localización celular sino también, en algunos casos, su actividad. De hecho se ha demostrado que las quinasas Pim1 y JNK, entre otras, fosforilan NFAT potenciando su actividad transcripcional (Ortega-Perez et al., 2005). En células tumorales también se ha observado que GSK3 β fosforila la región SP2 de NFATc2, estabilizando y prolongando su vida media. De esta forma NFATc2 se protege de la ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Yoeli-Lerner et al., 2009).

Ubiquitinación

La ubiquitinación es un proceso de modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente de varias copias de la proteína ubiquitina a lisinas de la proteína diana, que constituye una marca o señal que provoca su degradación por el proteasoma (Glickman and Ciechanover, 2002). Entre los miembros NFAT, NFATc2 es el único descrito hasta ahora como susceptible a ubiquitinación. Se ha observado que NFATc2 es diana de HDM2, el homólogo humano de la oncoproteína murina "ligasa de ubiquitina E3" (MDM2), que se activa por Akt e induce la degradación de NFATc2 (Yoeli-Lerner et al., 2005). Mediante otro mecanismo paralelo, Akt es capaz de inactivar la quinasa GSK3 β anulando de este modo la fosforilación de la región SP2 que evita la degradación de NFATc2 por medio del proteasoma (Yoeli-Lerner et al., 2009).

Sumoilación

Como se ha mencionado anteriormente, la sumoilación es otro mecanismo post-traducciona que regula a NFAT. Se trata de un proceso,

parecido a la ubiquitinación, que consiste en añadir copias de proteínas SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) a una proteína diana. Pero, a diferencia de la ubiquitinación, en este caso la proteína modificada no se degrada sino que sigue un destino diferente respecto a las proteínas no modificadas. De hecho la sumoilación puede regular la localización y el transporte subcelular, puede competir con la ubiquitinación y además modificar la función de factores de transcripción (Hay, 2005). En la mayoría de los casos el efecto de esta modificación es la represión de factores de transcripción con función activadora (Gill, 2004).

Un claro ejemplo es el caso de NFATc1; de las seis isoformas, NFATc1 α C y NFATc1 β C poseen un extremo C-term que contiene sitios sumoilables. Esta modificación post-traducciona hace que estas isoformas de NFATc1 se localicen en PML (promyelocytic leukemia nuclear bodies) y recluten deacetilasas de histonas que inhiben la transcripción del promotor de la Interleuquina 2 (IL2) (Nayak et al., 2009).

Por otro lado, la sumoilación de NFATc2 favorece tanto su retención en el núcleo (sumoilación en la lisina 897) como su actividad transcripcional (lisina 684) (Terui et al., 2004).

ADP-ribosilación

La poli-ADP-ribosilación consiste en añadir moléculas de ADP-ribosa a residuos de arginina, glutámico o aspártico (Hassa et al., 2006). Las enzimas responsables de este tipo de reacción son las PARPs. En particular PARP-1 interacciona con el DBD de NFAT durante su activación, añadiendo moléculas de ADP a un glutámico (Glu) conservado en todos los miembros NFAT (Glu⁴⁰⁸ de NFATc2, Glu⁴²⁷ de NFATc1, Glu⁴³² de NFATc3 y Glu⁴¹⁸ del NFATc4). Este aminoácido se encuentra en una posición del DBD accesible para su modificación durante la activación transcripcional. Se ha demostrado que la poli-ADP-ribosilación estabiliza la formación del complejo de NFAT con el DNA y sus

cooperadores y es necesaria para la correcta activación de sus genes diana (Olabisi et al., 2008).

3.2.2 Regulación de NFAT mediante microRNA o interacción con proteínas

MicroRNA

El análisis funcional a gran escala de RNAs no codificantes mediante su inhibición mediada por RNA de interferencia ha permitido identificar un microRNA inhibidor de la actividad NFAT denominado NRON (represor de NFAT no codificante). La inhibición de NRON causa un aumento de la actividad del gen indicador Luciferasa cuando se expresa bajo un promotor dependiente de NFAT. NRON forma parte de un complejo de proteínas que incluye la importina-beta (KPNB1) que parece inhibir el tráfico nuclear de las proteínas NFAT. Hasta el momento no se han detectado diferencias de afinidad entre NRON y los diferentes miembros NFAT (Willingham et al., 2005).

HOMER

La familia de proteínas citoplasmáticas Homer (Homer 1-3) sirven de anclaje a otras proteínas y se encuentran en la mayoría de tejidos y células, incluyendo el sistema inmune. Además de su participación en la sinapsis neuronal, se ha observado que los miembros Homer 2 y 3 actúan como reguladores negativos de la activación de las células T mediante la inhibición de la ruta CN/NFAT (Huang et al., 2008). En experimentos *in vitro* se ha demostrado que los diferentes miembros de esta familia interactúan selectivamente con otros de la familia NFAT; en concreto Homer 1 sólo interactúa con NFATc4, mientras que Homer 2 y 3 pueden unirse a NFATc1 y c2, no habiéndose descrito aún la interacción Homer-NFATc3 (Huang et al., 2008). La especificidad por los diferentes miembros de NFAT viene dada por una serie de aminoácidos localizados en el extremo N-term de Homer. En el caso de Homer 3 se ha demostrado que interactúa con el dominio NHR de NFATc2, solapando con los sitios de interacción con CN por lo que impide la unión entre NFAT y CN (Huang et al., 2008).

Caspasa 3

Las Caspasas son una familia de proteasas que a través de un residuo catalítico de cisteína cortan las proteínas diana a nivel de un residuo de aspartato. Estas proteasas forman parte de la ruta que regula los procesos de iniciación de la apoptosis. Recientemente se ha descubierto que la Caspasa 3 es otro inhibidor de la actividad de NFAT que proteoliza la proteína inhibiendo su actividad. NFATc2 es el único miembro sensible a esta regulación; en su TAD del N-term se han detectado dos sitios de corte reconocidos por la Caspasa 3. Se ha demostrado que en células T tanto en apoptosis como en fase de activación se induce la Caspasa 3 que proteoliza a NFATc2. El resultado es la inactivación del factor y de su actividad transcripcional (Wu et al., 2006a).

4 Funciones de NFAT

Aunque inicialmente se describió en células T activadas, los miembros de la familia NFAT se encuentran en la mayoría de los tipos celulares analizados y su función también se ha investigado fuera del sistema inmune. Además, considerando que la expresión relativa de los miembros NFATc1-c4 varía de un tipo celular a otro y que existen diferencias estructurales entre ellos, se ha postulado que los diferentes miembros NFAT podrían ejercer funciones específicas en la regulación de los diferentes procesos biológicos estudiados. Para intentar estudiar qué papel ejerce cada miembro, se han generado ratones deficientes (KO) para cada uno de ellos que han resaltado la importancia de algunos miembros NFAT en determinados procesos biológicos. Sin embargo, ha resultado llamativo que, excepto en el caso de NFATc1, la ausencia de un solo miembro de la familia NFAT no tenga un efecto severo; estos resultados llevaron a pensar que existe redundancia en el papel que ejerce cada miembro NFAT y el ciclo celular.

4.1 Función de NFAT en el sistema inmune

La familia NFAT se describió inicialmente en células T activadas a través del TCR (Shaw et al., 1988). Desde entonces estas proteínas se han relacionado con la activación de la respuesta inmune ya que regula la transcripción de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores, como por ejemplo IL2, IL4, IL8, IFN γ (Rao et al., 1997). Además la ruta CN/NFAT regula procesos de proliferación y maduración de los linfocitos. En el timo (Fig. 5) las células T sufren un proceso de maduración constituido por varias fases que convierten las células precursoras en células maduras presentando en la membrana el marcador de superficie CD4 o CD8 (SP, *single positive*). Las células precursoras se caracterizan por la ausencia en su membrana de estos marcadores (DN, *double negative*); durante el proceso de maduración varía la expresión de los marcadores CD44 y CD25 en la superficie de las células precursoras. Finalmente, los timocitos, que se encuentran en el estadio DN4, se convierten en doble positivos por la expresión en su membrana de los marcadores CD4 y CD8 (DP, *double positive*). A continuación, en la última fase de maduración en el timo, las células DP sufren una selección negativa que tiene lugar cuando los timocitos entran en contacto con antígenos endógenos (propios del organismo) o una selección positiva basada en su capacidad de interactuar correctamente con las moléculas presentadoras de antígeno propias (MHC). El resultado de la última fase son dos poblaciones de células maduras, que expresan CD8 o CD4 en su membrana citoplasmática, que migran a los diferentes órganos del individuo (von Boehmer et al., 2003). En el ámbito de estos procesos, la pérdida de actividad CN afecta a la generación de linfocitos maduros. En concreto, la eliminación del gen que codifica para la subunidad CnB produce una disminución del número de timocitos maduros (SP) lo que implica a la ruta CN/NFAT en el proceso de selección positiva (Neilson et al., 2004).

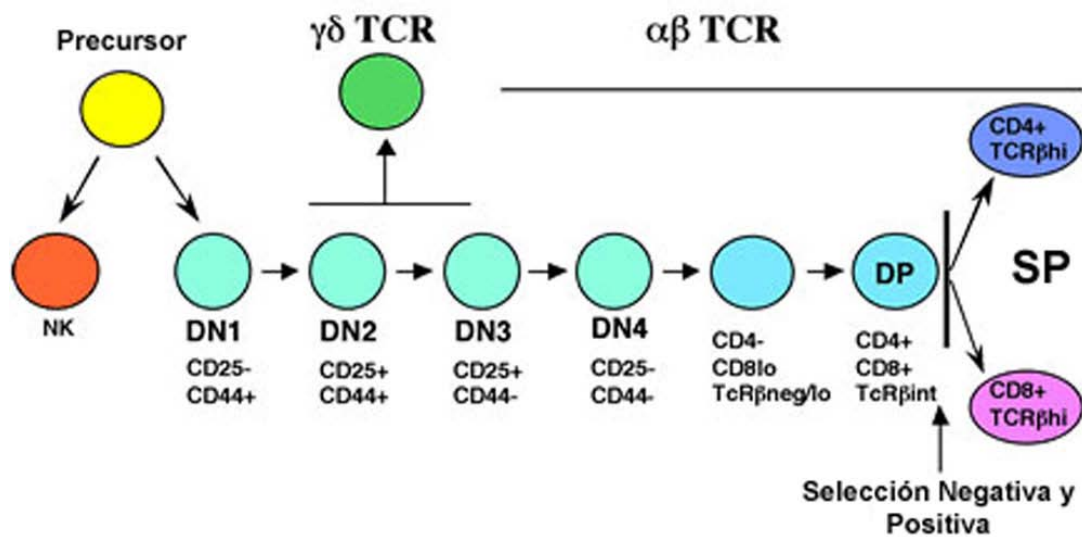


Figura 5 Proceso de diferenciación y maduración de las células T en el timo. Los progenitores de la línea linfóide T migran desde la médula ósea al timo para completar su diferenciación. En este órgano tiene lugar la maduración de los precusores, En la fase final de la maduración los timocitos “doble positivos” (DP) sufren un proceso de selección positiva cuando las células capaces de reconocer el complejo MHC propio (*self*) sobreviven; en caso contrario mueren por apoptosis. Las células que reconocen el MHC de clase I se convierten en CD8 positivas ($CD8^+ CD4^-$), mientras que las que reconocen el MHC II serán las CD4 positivas ($CD4^+ CD8^-$). Los timocitos sufren también un proceso de selección negativa: si los timocitos inmaduros reaccionan contra los péptidos propios entraran en apoptosis. Las células que sobreviven a ambos procesos de selección, las células $CD4^+$ y $CD8^+$ maduras, se liberan al torrente sanguíneo y migran a los órganos linfáticos periféricos.

Las células T CD8 positivas ($CD8^+$) se clasifican como citotóxicas (T_c) mientras que las $CD4^+$ se definen como helper o colaboradoras (T_h). Las células $CD4^+$ tras una primera estimulación se diferencian principalmente en tres subpoblaciones conocidas como T_{h1} , T_{h2} y T_{h17} . T_{h1} y T_{h2} son las poblaciones mayoritarias y se distinguen por las citoquinas que producen. Las células T_{h1} secretan $IFN\gamma$ y son responsables de la respuesta ~~ógena~~ pat intracelulares mientras que las células T_{h2} secretan IL4, IL5 e IL13 y actúan contra patógenos extracelulares (Abbas et al., 1996) (Fig. 6). Dado que la ruta CN/NFAT regula la transcripción de las citoquinas implicadas en estos procesos de diferenciación, cambios en la expresión de los miembros NFAT podrían alterar dichos procesos produciendo descompensación en las diferentes subpoblaciones.

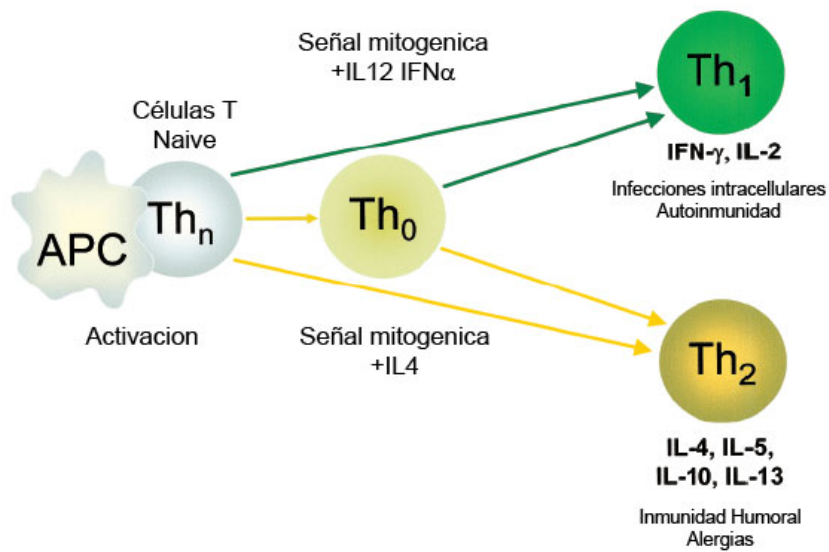


Figura 6 Diferenciación de células T CD4⁺ en T_h1 y T_h2. Las células CD4⁺ naïve (sin contacto previo) interaccionan con células presentadoras de antígeno (APC). La interacción provoca la activación, proliferación y diferenciación para convertirse en células helper o colaboradoras, principalmente de tipo 1 (T_h1) o de tipo 2 (T_h2). La diferenciación depende del tipo de estímulo que reciba la célula naïve ya que cada población está especializada en funciones específicas. Las T_h1 producen IFN γ , activan los macrófagos y se diferencian durante procesos de infección. Las T_h2 producen IL4, IL5, IL10 e IL13 activando las células B.

Además de los procesos de activación y de diferenciación, las señales dependientes de la concentración de calcio, que afectan a la ruta CN/NFAT, resultan determinantes en la inducción de la tolerancia inmunológica por anergia. Esta situación tiene lugar cuando los linfocitos T se activan por estimulación del TCR en ausencia de moléculas co-estimuladoras que activen CD28-CD80/CD86. La anergia conduce a la muerte celular programada vía apoptosis, ya que en estas condiciones se activa NFAT en ausencia de AP1, por lo que se regula un patrón de genes diferente entre los que se encuentran genes pro-apoptóticos como caspasa 3, Ikaros y Grg4 (Serfling et al., 2006b).

Dado que NFATc4 no se expresa en células T (Lyakh et al., 1997), el estudio del papel de NFAT en los linfocitos T se ha centrado en los miembros NFATc1-c3. Así, para estudiar el papel individual de cada uno de ellos se han generado ratones deficientes (KO) para cada miembro, analizando el efecto sobre la diferenciación y activación de las células T.

4.1.1 Ratones deficientes en NFATc1 (NFATc1^{-/-})

Dado que la ausencia de NFATc1 (c1 KO ó NFATc1^{-/-}) causa letalidad embrionaria debido a fallos cardiacos, el estudio de este gen en células T y B se llevó a cabo mediante complementación de blastocistos de ratones RAG1^{-/-} o RAG2^{-/-} (que carecen de linfocitos T y B) con células embrionarias homocigotas de ratones NFATc1^{-/-}. Como resultado, las células T y B de los ratones adultos proceden de los animales deficientes para NFATc1. La ausencia de NFATc1 en estos animales disminuye la capacidad proliferativa en ambas poblaciones (Ranger et al., 1998b; Yoshida et al., 1998). Además se ha estudiado el papel de NFATc1 en la diferenciación de las células CD4⁺ maduras a las subpoblaciones T_{h1} y T_{h2}. Tras estimular a las células de los ratones KO vía CD3, no se ha observado ningún efecto en la diferenciación de tipo T_{h1}; sin embargo, se ha detectado una disminución en la producción de IL4, sugiriendo la participación de NFATc1 en la diferenciación a T_{h2} (Ranger et al., 1998b; Yoshida et al., 1998).

4.1.2 Ratones deficientes en NFATc2 (NFATc2^{-/-})

La eliminación del gen *NFATc2* (c2 KO ó NFATc2^{-/-}) no genera un fenotipo muy alterado y sólo es detectable un aumento en la respuesta inflamatoria debido a un incremento de la proliferación de las células de bazo y nódulos linfáticos (Xanthoudakis et al., 1996). Además, en los animales NFATc2^{-/-} hay una mayor y constante producción de IL4 lo que sugiere un papel represor de la diferenciación a T_{h2}, favoreciendo de este modo la respuesta de tipo T_{h1} (Hodge et al., 1996; Kiani et al., 1997; Viola et al., 1998).

Los resultados obtenidos sobre las subpoblaciones T_{h1} y T_{h2} al eliminar NFATc1 ó NFATc2 sugieren que estos miembros podrían tener funciones opuestas a la hora de dirigir la diferenciación de las células CD4⁺ hacia las subpoblaciones T_{h1} y T_{h2}. Sin embargo, hasta el momento, no se han definido los mecanismos moleculares que sostengan esta hipótesis.

4.1.3 Ratones deficientes en NFATc3 (NFATc3^{-/-})

NFATc3 es el miembro más abundante en las células del timo o timocitos. Su ausencia causa una fuerte disminución en el número de células doble positivas (CD4⁺CD8⁺; DP), que corresponde al estadio que precede la completa maduración en el timo de las células DP a SP (Fig. 6). Este efecto se debe probablemente a una mayor expresión del ligando de Fas lo que conduciría a un aumento de la apoptosis. Sin embargo, no se ha descrito ningún desequilibrio entre los niveles de citoquinas producidas por las células T maduras (Oukka et al., 1998). Estos estudios no implicaron a NFATc3 en la regulación de la activación linfocitaria y de la diferenciación de las células T maduras.

4.1.4 Doble delección de miembros NFAT

A pesar de los grandes esfuerzos realizados para elucidar las funciones de los diferentes miembros NFAT en el desarrollo y activación de los linfocitos T, los datos obtenidos con el uso de ratones deficientes no han conseguido aclarar si estos miembros ejercen funciones independientes o redundantes. Como hemos resumido la eliminación individual de cada miembro NFAT no produce alteraciones inmunológicas severas. Sin embargo, la ausencia simultánea de dos miembros NFAT provoca una alteración importante en el sistema inmune de estos animales. La eliminación de los miembros NFATc1 y c2 (c1/c2 KO), provoca una fuerte inhibición de la producción de las citoquinas IL2, IL4, IFN γ e IL5, sin afectar ni a la proliferación ni a la expresión de marcadores de activación (Peng et al., 2001). Según estos estudios NFATc1 y NFATc2 parecen contribuir a la regulación de la función de los linfocitos T maduros T_h1 y T_h2.

En ratones deficientes para NFATc2 y NFATc3, se observa que las células T CD4⁺ se diferencian espontáneamente a T_h2 y aumenta además su capacidad de proliferación (Rengarajan et al., 2002). Por lo tanto, estos resultados muestran que estos dos miembros son importantes para la diferenciación de tipo T_h1/T_h2 y regulan la capacidad proliferativa de la subpoblación T_h2.

4.2 Papel de CN/NFAT en el sistema cardiovascular y angiogénesis

La ruta CN/NFAT es muy importante en la regulación del sistema cardiovascular. Un ejemplo es su papel en hipertrofia cardiaca; ratones transgénicos que sobrepresan CN constitutivamente activa manifiestan un marcado aumento del tamaño del corazón con desorganización del tejido y alto nivel de fibrosis. Por otro lado ratones deficientes en CN (Bueno et al., 2002) o en NFATc2 (Bourajaj et al., 2008) y NFATc3 (Wilkins et al., 2002) son resistentes a la hipertrofia inducida por hipertensión (Kehat and Molkenin, 2010). NFAT también es importante durante el desarrollo del sistema cardiovascular: la eliminación del gen de NFATc1 causa la muerte del feto en el útero debido a fallos en el desarrollo de las válvulas cardiacas y del septo interventricular (de la Pompa et al., 1998; Ranger et al., 1998a). La falta conjunta de NFATc3 y NFATc4 es letal debido a defectos en la organización de los vasos durante la vasculogénesis en el embrión (Graef et al., 2001).

NFAT se considera un factor determinante en la organización de vasos sanguíneos no sólo durante el desarrollo si no también en el adulto. La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de pre-existentes, requiere la activación ordenada de procesos de migración y proliferación celular (Folkman, 2006). En adultos, la angiogénesis tiene lugar en condiciones fisiológicas (cicatrización de heridas, menstruación) y patológicas, como crecimiento tumoral y en enfermedades inflamatorias crónicas o retinopatía isquémica. Entre los factores de crecimiento que inducen la angiogénesis destaca VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Este factor, producido por células tumorales o endoteliales, activa a las células endoteliales induciendo su proliferación y diferenciación, pasos necesarios para el proceso de angiogénesis (Carmeliet and Jain, 2011). En este contexto, VEGF induce la expresión de la Ciclooxygenasa 2 (COX2), enzima que participa en angiogénesis mediante la producción de prostanoïdes (Alfranca et al., 2006). En 2001 nuestro grupo demostró que, en la célula endotelial, el aumento de expresión de COX2, inducida por VEGF, requiere de la activación de la ruta CN/NFAT, demostrando así un nuevo papel de NFAT en angiogénesis (Hernandez et al., 2001).

NFAT no sólo participa en la angiogénesis a través de COX2, sino que también lo hace a través de la regulación de la expresión de RCAN1. Existen datos contradictorios sobre el efecto de RCAN1 en angiogénesis. Por un lado, se ha observado que la sobreexpresión de RCAN1 en células endoteliales humanas (HUVEC) inhibe la angiogénesis (Minami et al., 2004). Sin embargo, se ha descrito que en células microvasculares el silenciamiento de RCAN1.4 (mediante siRNA) disminuye la migración celular e impide la formación de microtúbulos (Holmes et al., 2010). Los resultados *in vivo* también son contradictorios. Así, se ha descrito que en los ratones deficientes en RCAN1 (RCAN1^{-/-}) CN está hiperactivada y las células endoteliales sufren una apoptosis precoz, impidiéndose la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Ryeom et al., 2008). Sin embargo, también se ha descrito que un ligero aumento en los niveles de expresión de RCAN1.4 disminuye el crecimiento tumoral debido a un defecto en la angiogénesis, consecuencia de la inhibición de la ruta CN/NFAT (Baek et al., 2009). La discrepancia en los resultados obtenidos podría deberse a funciones reguladoras de RCAN1 todavía desconocidas o a diferencias entre las dos isoformas RCAN1.1 y 1.4; de hecho, algunos investigadores, mediante ensayos de sobreexpresión y silenciamiento selectivo, han propuesto que la isoforma RCAN1.1 induce la angiogénesis mientras que la isoforma RCAN1.4, inducible y dependiente de NFAT, la inhibe (Qin et al., 2006). La discrepancia también podría deberse a un comportamiento diferencial de RCAN activando o inhibiendo la CN dependiendo de la concentración intracelular de la proteína (Shin et al., 2011).

4.3 Papel de NFAT en ciclo celular

Las ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK) se han implicado en la regulación del ciclo celular. Las ciclinas, cuya expresión se regula por ciclos de transcripción y degradación, interaccionan con sus CDKs correspondientes y activan la respuesta adecuada en cada fase del ciclo. Los primeros estudios sobre NFAT en ciclo celular mostraron que NFATc2 reprime la activación de los promotores de la CDK4 y de la ciclina A2, ambas proteínas mediadoras de la fase G1 del ciclo celular (Baksh et al., 2002; Carvalho et al., 2007). También se

ha descrito que NFATc1 induce la transcripción de CDK4, CDK6 y ciclina D, promoviendo el ciclo celular (Neal and Clipstone, 2003). Asimismo se ha demostrado que los miembros NFATc1 y NFATc2 también controlan la expresión del oncogen c-myc (Buchholz et al., 2006; König et al., 2010). Estos datos han despertado mucho interés dado el posible papel de las proteínas NFAT como factores claves en el desarrollo de tumores. En este sentido se ha detectado una forma de NFATc2 constitutivamente activa tanto en líneas celulares como en biopsias de cáncer de mama humano (Mancini and Toker, 2009). Asimismo la expresión de NFATc1 está fuertemente incrementada en varios tipos de linfomas (Muller and Rao, 2010). También se ha descrito un papel fundamental de la familia NFAT en el desarrollo de carcinomas (Jauliac et al., 2002) y más recientemente se ha propuesto a NFATc2 como represor del ciclo celular (oncosupresor) y a NFATc1 (isoforma corta) como regulador positivo de la proliferación y negativo de la muerte celular (oncogen) en fibroblastos (Robbs et al., 2008). Todos estos estudios apuntan a NFAT como un factor determinante para la homeostasis celular y cuya regulación es importante en el desarrollo de tumores.

4.4 Otros procesos biológicos regulados por NFAT.

En los últimos años el estudio de las funciones de NFAT se ha extendido a otras áreas de investigación confirmando su participación en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. De hecho se ha observado por ejemplo que la ausencia simultánea de NFATc2 y NFATc3 inhibe la obesidad favoreciendo la sensibilidad a insulina (Yang et al., 2006). NFATc1 parece jugar un papel central en la regulación de la osteoclastogénesis (Sitara and Aliprantis, 2010); en el caso de ratones adultos deficientes de NFATc2, éstos acumulan cartílago indicando que este factor regula negativamente el proceso de condrogénesis (Ranger et al., 2000). Se ha descrito que NFATc3 participa en el desarrollo muscular (Kegley et al., 2001) y pulmonar (Dave et al., 2006) durante la embriogénesis e impide la regeneración hepática (Pierre et al., 2009). NFATc4 sigue siendo el miembro menos caracterizado y hasta el momento no se ha descrito ningún

fenotipo severo en los animales deficientes únicamente para este miembro de la familia.

TABLA 1 Estudios del papel de los miembros NFAT en ratones knock out.

Genotipo	Sistema	Defecto	Referencia
NFATc1^{-/-}	Cardiovascular	Fallo en el desarrollo de las válvulas cardiacas y del septo interventricular	De la pompa, 1998 Ranger, 392
NFATc1^{-/-}	Músculo- Esquelético	Osteoclastogénesis	Aliprantis, 2008 Sitara, 2010
NFATc1^{-/-}	Inmune	Inhibición de la proliferación Inhibición de IL4 y de la respuesta Th2	Ranger, 1998 Yoshida, 1998
NFATc2^{-/-}	Músculo- Esquelético	Condrogénesis	Ranger, 2000
NFATc2^{-/-}	Inmune	Aumento de la proliferación Aumento de IL4 y de la respuesta Th2	Xanthoudakis, 1996 Hodge, 1996 Kiani, 1997 Viola, 1998
NFATc2^{-/-}	Cardiovascular	Resistencia a hipertrofia cardiaca	Bourajjaj, 2008
NFATc3^{-/-}	Músculo- Esquelético	Miogénesis	Kegley, 2001
NFATc3^{-/-}	Digestivo	Regeneración de hígado	Pierre, 2009
NFATc3^{-/-}	Inmune	Disminución de timocitos DP por apoptosis (Fas ligando)	Oukka, 1998
NFATc3^{-/-}	Cardiovascular	Resistencia a hipertrofia cardiaca	Wilkins, 2002
c1^{-/-}/c2^{-/-}	Inmune	Inhibición de IL2, IL4, IFN γ , IL5	Peng, 2005
c2^{-/-}/c3^{-/-}	Inmune	Aumento de la proliferación Diferenciación espontanea en T _h 2	Rengarajan, 2001
c2^{-/-}/c4^{-/-}	Digestivo	Resistencia a obesidad y sensibilidad a insulina	Yang, 2006
c3^{-/-}/c4^{-/-}	Cardiovascular	Falta de organización durante la vasculogénesis Predisposición a infarto miocárdico	Graef, 2001 Bushdid, 2003

Objetivos

A pesar de los esfuerzos realizados para elucidar las funciones de los diferentes miembros de la familia NFAT mediante la generación de ratones KO, los datos obtenidos no han conseguido aclarar si ejercen funciones independientes o redundantes en la regulación del sistema inmune y vascular.

En este trabajo estudiamos las funciones de los miembros NFATc1 y NFATc3 en la regulación de la activación de linfocitos T y de células endoteliales. Para ello hemos silenciado selectivamente cada uno de estos miembros NFAT mediante el empleo de vectores lentivirales que codifican secuencias de RNA de interferencia específicos. Con ello hemos abordado los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto del silenciamiento de NFATc1 y NFATc3 sobre la regulación de la expresión de genes diana de NFAT y caracterizar los mecanismos moleculares responsables de la regulación selectiva.
- Analizar el papel de NFATc1 y NFATc3 en el proceso de activación de las células T.
- Estudiar la contribución selectiva de NFATc1 y NFATc3 en los procesos de proliferación y migración de células endoteliales así como en la angiogénesis mediada por VEGF.

Materiales y Métodos

1 Cultivos celulares y reactivos

Todas las células se cultivaron a 37°C con un atmosfera CO₂ al 5%. Las células HEK-293 (ATCC CRL-1573) se cultivaron en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco Invitrogen) con antibióticos (100 unidades/ml penicilina + 100 µg/ml streptomina), L glutamina (2mM) y 10% de suero bovino (FBS). Las células Jurkat (JK, clone E6-1, ATCC TIB-153) se cultivaron en RPMI 1640 con antibióticos, glutamina y 10% de FBS (medio completo). Tras 16 horas en condiciones de reposo (0,5% de FBS), las células JK se estimularon con 20ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) y 1µM de Ionoforo de Calcio A23187 (Io, Sigma). El pretratamiento con Ciclosporina A (CsA, Sandoz; 200ng/ml) se realizó durante 30 minutos.

Las células T CH7C17 (suministrada por el Dr. Sanchez-Madrid) y las células B Raji (ATCC CCL-86) se cultivaron en RPMI completo. Las células Raji se pre-incubaron con superantígeno B (SEB, Toxin Technologies) a 0,5µg/ml durante 30 min a 37°C. Las células Raji, estimuladas o no con SEB, se co-cultivaron posteriormente con células CH7C17 (proporción 1:3) durante 6 horas.

Los linfocitos primarios de sangre periférica (PBLs) se aislaron a partir de la fracción leuco-plaquetaria obtenida tras un gradiente de sedimentación de la sangre (*Buffy-coat*) por centrifugación en colchón de Ficoll Paque (GE Healthcare). Para eliminar las células adherentes (principalmente macrófagos), los PBLs se incubaron 30min a 37°C en placas de cultivo para, posteriormente, recuperar el sobrenadante con las células en suspensión. A continuación los PBLs se estimularon con PHA (phytohemaglutinina) (5µg/ml) e IL2 (50U/ml) induciendo su proliferación y su diferenciación a linfoblastos. Después de 12 días de cultivo en medio completo con IL2 (50U/ml), los blastos se transfirieron a un medio sin IL2. Dos días después se estimularon con anti-CD3 (OKT3; 1µg/ml) unido a plástico solo o combinado con anti-CD28 (1µg/ml).

Las células endoteliales humanas (HUVEC) se aislaron mediante el tratamiento de la vena umbilical con colagenasa (1%) a 37°C. Las HUVEC se cultivaron

sobre gelatina (0,5%) en medio 199 suplementado con 20% FCS, 50µg/ml de ECGF (extracto de cerebro bovino) y 100µg/µL de Heparina. Para la estimulación con VEGF, las HUVEC se incubaron durante los tiempos indicados en presencia de 50ng/ml de VEGF (Peprotech). El pretratamiento con Etoricoxib (Amirall Prodesfarma; 10 µM) se realizó durante 30min.

2 Diseño de secuencias shRNA

Las secuencias de para el silenciamiento de los diferentes miembros de NFAT se diseñaron utilizando el programa informático Oligoengine Workstation 2 (<http://www.oligoengine.com/index.html>). Las secuencias de mRNA que codifican para las isoformas de cada miembro NFAT se alinearon para localizar las regiones idénticas. Dichas regiones se emplearon para diseñar las secuencias de interferencia según los criterios de Elbashir et al (Elbashir et al., 2001). Las secuencias diseñadas contienen una secuencia complementaria a la secuencia del RNA diana (*cursiva, negrita y mayúscula*), de 6 a 9 nucleótidos espaciadores (*en minúscula*), y la secuencia complementaria a la anterior (*cursiva, negrita y mayúscula*). De este modo, después de la transcripción, el RNA resultante forma una estructura secundaria en forma de horquilla (shRNA, *small hairpin RNA*), que es diana de la enzima DICER; la acción de esta enzima genera las secuencias siRNA de doble hebra que se incorporan en el complejo de proteínas RISC. Las secuencias siRNA sirven de guía para reconocer el RNA diana; la interacción iRNA/mRNA diana provoca la degradación del mRNA, si el anillamiento es perfecto, o el bloqueo de su traducción, si alguna base no es complementaria a la secuencia diana. (Fig. 7).

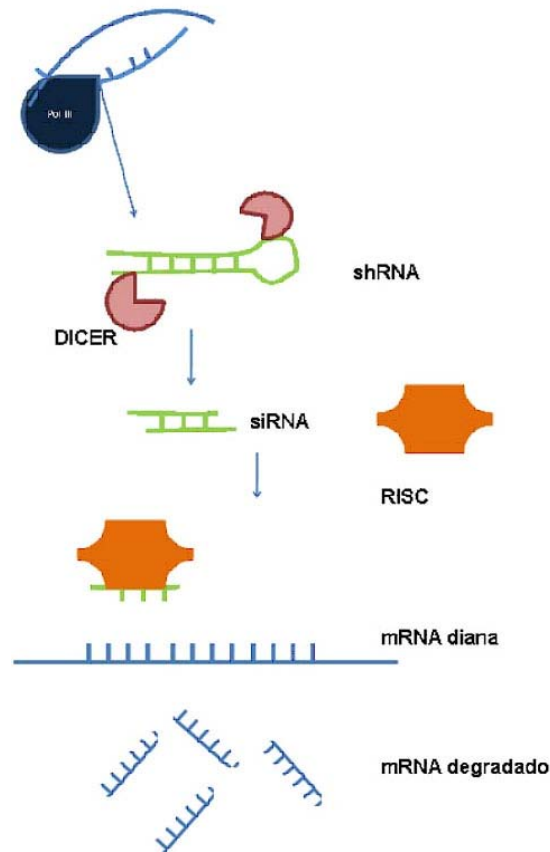


Figura 7 Diseño esquemático de la maquinaria de RNA de interferencia. La polimerasa III (pol III) transcribe cortas secuencias de RNA no codificantes que adquieren una estructura secundaria en forma de horquilla. Esta estructura es diana de la enzima DICER que las corta generando secuencias de doble hebra con 2 bases protuberantes en los extremos (siRNA). El complejo RISC reconoce los siRNA e incorpora una de las dos hebras. Mediante este sistema RISC reconoce y degrada el mRNA diana cuya secuencia corresponda al siRNA incorporado.

Se diseñaron al menos tres secuencias para cada miembro NFAT y se clonaron en el vector pSuperRetro (Oligoengine) donde los shRNA se expresan bajo la actividad del promotor H1, dependiente de la RNA polimerasa III. Tras ensayar la eficacia de silenciamiento en cultivos celulares, se seleccionaron las secuencias indicadas en la tabla 2. Posteriormente se clonaron estas secuencias junto con el promotor H1 en los vectores lentivirales pHRsin-DUAL-GFP para generar las partículas lentivirales empleadas en este trabajo.

Tabla 2 Secuencias de shRNA seleccionadas y clonadas en el vector pSupeRetro. En la tabla se indican las secuencias empleadas para el silenciamiento de NFATc1 y NFATc3 y la nomenclatura adoptada. Las secuencias complementarias aparecen en **negrita y cursiva** y en minúsculas la secuencia espaciadora (etc.)

Nombre	Gen	Secuencia 5'-3'
KDSc	-	GATCCGG CAACAAGATGAAGAGCACCAA actcgag TTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTTTTGTTTAAACGC
KD-c1	NFATc1	GATCCCC GCCAGTACCAGCGTTTCAC tcaagaga GAGTGAAACGCTGGTACTGGCTTTTTGGAAC
KD-c3	NFATc3	GATCCCC CATTGACTGCGCGGGAATC tcaagaga GATTCCCGGCAGTCAATGTTTTTGAAC

3 Generación de lentivirus e infección

Las secuencias que codifican para los shRNA se clonaron en el vector lentiviral pHRsinDUAL-GFP generando los vectores KD-Sc (control), KD-c1 y KD-c3 que expresan a la vez el correspondiente shRNA bajo el promotor H1 y la molécula fluorescente GFP bajo el promotor eucariota de Ubiquitina 1. Para producir partículas lentivirales se transfectaron células HEK-293 mediante el método de fosfato cálcico con 30 µg total de DNA en HBS1X (HEPES, NaCl, Dextrosa, KCl, Na₂HPO₄, pH7.1) y CaCl₂ 150mM por placa de 10cm de diámetro. El DNA transfectado contiene los plásmidos auxiliares 8.9, que expresa los genes necesarios para la replicación y la generación de la estructura del virus, y pMD2-G, que codifica para la glicoproteína de envuelta VSV-G. También contiene el vector KD correspondiente con la secuencia shRNA y el cDNA que codifica para GFP ambas flanqueadas por las regiones LTR (*Long Terminal Repeat*) virales. Las partículas lentivirales que se liberan en el sobrenadante, se recogieron 48h y 72h post-transfección y se concentraron mediante ultracentrifugación (12.1986xg, 2h, 4°C). Para calcular el número de partículas virales infectivas (TU=*Transducing Units*) se infectaron células Jurkat (JK) con diluciones seriadas de las partículas lentivirales y se analizaron mediante citometría de flujo.

Las líneas de células T (JK y CH7C17) y las células endoteliales HUVEC se infectaron durante 4 horas (MOI de 5 y 6, respectivamente). Los PBLs y los blastos se infectaron con lentivirus (MOI de 10) durante 48 horas.

4 Extractos celulares de proteína y immunoblotting

Las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS 1X) frío y se lisaron con un tampón de lisis C (Hepes 20mM pH7,6, NaCl 400mM, EDTA1mM, EGTA 3mM, DTT 1 μ M, PMSF 1mM, Na₂MoO₄ 10mM, benzamidina 100 μ M, pepstatina, aprotinina y leupeptina (1 μ g/ml); Triton X-100 1%). El extracto celular se incubó en agitación a 4°C durante 15 min. A continuación se centrifugaron (14.000xg) a 4°C durante 15 min. La fracción soluble (sobrenadante) se transfirió a un nuevo tubo, se le añadió tampón Laemmli (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol) y la muestra se incubó durante 10 min a 100°C. Los extractos obtenidos se sometieron a una electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las proteínas presentes en estos geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un corriente eléctrica continua en presencia del tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%). Las membranas se lavaron con tampón Tris-HCl pH7,5 con el detergente Tween 20 al 0,05% (TBT-T) y se incubaron durante 30 min con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T. A continuación, tras 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios preparados en TBS-T, BSA 1% y 0,1% de azida sódica. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (anti-ratón o anti-conejo, Pierce) durante 1h. Por último las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con el reactivo ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, Amersham) para detectar las proteínas reconocidas por los anticuerpos. Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron anti-NFATc1 [7A6, Alexis Biochemicals], anti-NFATc3 [M75, Santa Cruz], anti-COX2 [Alexis Biochemicals], anti-PSF (*PTB-associated splicing factor*) (Sigma), anti- α -tubulina (Sigma), anti-myc (9E10), anti-NFATc2 (suero 672) y anti-RCAN1 (suero 765).

5 Extractos de proteínas nucleares y EMSA

Las células JK, control o estimuladas con PMA (20ng/ml) e I α (1 μ M), se resuspendieron en tampón A (Hepes 10mM pH 6, KCl 10mM, EDTA 0,1mM, EGTA 0,1mM, spermidina 0,75mM, spermina 0,15 mM, Na₂MoO₄ 10mM, DTT 1 μ M, PMSF 0,5mM, benzamidina 100 μ M, pepstatina, aprotinina, leupeptina (1 μ g/ml), se incubaron 15 min a 4°C, y se añadió 0,6% (v/v) de Nonidet P-40 y se incubaron posteriormente 10 min a 4°C. A continuación las muestras se centrifugaron durante 20 min para sedimentar los núcleos que posteriormente se lisaron con tampón C durante 15 min a 4°C. Una vez lisados los núcleos, estas muestras se centrifugaron para eliminar los restos de membranas nucleares. El contenido proteico del sobrenadante (extracto nuclear) se cuantificó mediante colorimetría (método Bradford). De cada extracto nuclear se prepararon alícuotas que se conservaron a -80°C.

Los extractos nucleares (3-5 μ g) se incubaron 10 min a 4°C con 1mg/ml de poly [I: C] en tampón DBB (polivinyl etanol 2% (w/v), glicerol 2,5% (v/v), Tris 10 mM pH 8, EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM). Después se incubaron con un anticuerpo anti-NFAT (anti NFATc1 676, anti NFATc2 672, anti NFATc3 696 o M75, anti NFATc4 H74, anti cRel 1136, anti p65 1207) o con su correspondiente anticuerpo control (pre-inmunes o IgG correspondientes, según los casos). A continuación se añadió la sonda de DNA de doble banda marcada radiactivamente (³²P; actividad 100000cpm) y se incubaron las muestras durante 40 min a temperatura ambiente. Las secuencias utilizadas como sondas se indican en la tabla 3.

Tabla 3 Secuencias correspondientes a regiones pertenecientes a los promotores de IL2 o COX2 que contienen los sitios de unión a NFAT utilizados para los ensayos de EMSA.

Nombre	Gen	Secuencia	Detalles
ARRE II	IL2	gatcGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT	Sitio distal NFAT-AP1
CD28RE	IL2	gatcGTTAAAGAAATTCCAAAGAGTCATCAG	Sitio <i>kB like</i>
NFAT-COX2 prox	COX2	tcgaCAAGGGGAGAGGAGGGAAAAATTTGTGGC	Sitio proximal NFAT
NFAT-COX2 dist	COX2	tcgaCAAAAGGCGGAAAGAAACAGTCATTTTC	Sitio distal NFAT-AP1

6 Plásmidos de expresión

El plásmido de expresión pcDNA3.1-NFATc1 α -Myc se generó mediante la amplificación por PCR del cDNA de NFATc1 α humano a partir del vector pSH107c-NFATc1 (enviado por el Dr. G. Crabtree) y posteriormente se clonó en fase de lectura en el vector pcDNA3.1myc-His (Invitrogen). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la reacción de PCR fueron:

c1fw (5'-3'): GGGGGATCCAGGATGCCAAGCACCAGCTTTCCA;

c1rv (5'-3'): GGGTCTCTAGACTGAAAAAGCACCCCACGCGCTC.

El cDNA correspondiente a NFATc3 humano (isoformas 1) se amplificó mediante PCR sobre el vector pECE-NFATc3 (enviado por el Dr. L. de Windt). El producto de PCR se clonó en el vector pcDNA3.1 myc/His. Con el fin de generar una proteína NFATc3 resistente al RNA de interferencia (c3R), la secuencia de NFATc3 se modificó mediante mutagénesis dirigida (QuickChange Site Directed Mutagenesis; Stratagene). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR fueron las siguientes:

c3 fw(5'-3'):

CATCGAATCACTGGGAAGACAGTgGCaACaGCtAGCCAAGAGATAATAATTG

c3 rv(5'-3'):

CAATTATTATCTCTTGGCTaGCtGTtGCcACTGTCTTCCCGTGATTGATG.

El cDNA de la COX2 humana se amplificó a partir del vector pSG5-COX2 (Bambai et al., 2004) por PCR y se clonó en el pHRsin lentivector. Los oligonucleótidos empleados para amplificarlo fueron:

Cox2-BamHI fw (5'-3'): CGCGGATCCGCGGTGAGAACCGTTTAC;

Cox2 rv (5'-3'): GCGAGGAAGCGGAAGAGTCTAGAGTCGACC.

7 Transfecciones transitorias y ensayos de luciferasa

Las células HEK se transfectaron por el método de fosfato cálcico (Rodriguez and Flemington, 1999). Para seleccionar las secuencias shRNA más eficientes (tabla 2) se transfectaron los vectores pSupereRetro-shRNA junto con los vectores de expresión de NFATc1 (pcDNA3.1 c1Myc) o de c3 (pcDNA3.1 c3Myc).

Para los experimentos de regulación transcripcional del gen reportero luciferasa, las células JK y CH7C17 se transfectaron durante 4h con Lipofectamina-PLUS (Invitrogen) y con 1 µg total de DNA que contenía el vector RCAN1.4-luc (Minami et al., 2004), o IL2-luc o COX2-luc (Iniguez et al., 2000) más el vector pECFP-C1 (Clontech) en una proporción 1:1. Tras la transfección (16h) las células se estimularon (PMA+Io o Raji+SEB) durante 5h y se lisaron con tampón de lisis (Promega). La actividad luciferasa se midió usando el kit Luciferase Assay System (Promega) en un luminómetro Sirius (Berthold Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para el estudio del efecto de la sobreexpresión de NFATc1 o NFATc3 sobre la actividad del promotor de COX2, las células JK se transfectaron con el vector reportero COX2-luc junto con 250ng de pcDNA3.1 (*vehicle*), pcDNA3.1 c1-Myc, pcDNA3.1 c3-Myc o pcDNA3.1 c3R-Myc.

8 Extractos de RNA, PCR y tarjetas microfluidicas

El RNA total se obtuvo con el reactivo Tripure (Roche) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Para generar el cDNA a partir del RNA (2µg) se utilizó la enzima retrotranscriptasa MMLV-RT (Invitrogen) en presencia de *random primers* siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de PCR a tiempo real o cuantitativas (Q-PCR) se llevaron a cabo con 100ng de cDNA usando sondas Taqman (Applied Biosystems) en un termociclador ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Las sondas taqman utilizadas fueron *COX2* (cat #Hs00153133_m1), *IL2* (cat #Hs00174117_m1) *RCAN1.4* (hDSCR1.4-E4_5 cat#4331348), *IL8* (cat# Hs00174103_m1), *VEGF* (cat#Hs00173626_m1), *TGFβ* cat# (Hs99999918_m1), *ADAMTS1* (cat# Hs00199608_m1), *KDR* (cat# Hs00911700_m1). Como controles endógenos se emplearon las siguientes sondas: *HMBS* (cat#Hs00609293_g1), *TBP* (cat #Hs99999910_m1), *TFRC* (cat #4333770F) and 18S rRNA (cat#4319413E).

Los resultados que se muestran en la tabla 4 se obtuvieron analizando el cDNA en tarjetas microfluídicas *Human Immune panel Taqman Low Density Array* de la casa comercial Applied Biosystems.

9 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Las células JK (10^6 células) se estimularon con PMA+I α durante 8h y la cantidad de IL2 liberada en el sobrenadante se cuantificó con un kit de ELISA específico (Diaclone). Las células HUVEC (4×10^4 células) tras 16 horas de cultivos en condiciones subóptimas de suero FCS (0,5%) se estimularon con VEGF (50ng/ml) durante 8h. El pre-tratamiento con Etoricoxib a 10µM se llevó a cabo durante 30 min antes del tratamiento. La prostaciclina presente en los sobrenadantes se cuantificó mediante el kit EIA de Cayman.

10 Extractos de DNA genómico y CHIP

Las células JK (40×10^6 células) se estimularon con PMA+I α durante 30 min y se fijaron con formaldehído al 1% durante 5 min a temperatura ambiente. Pasados los 5 min se añadió Glicina 0,125M y las células fijadas se lavaron 3 veces con PBS para posteriormente lissarlas con tampón de lisis #1 (Tris HCl 50 mM pH 8, EDTA 2 mM, NP40 0,1%, e inhibidores de proteasas) durante 5 min a 4°C. Los núcleos celulares se incubaron con el tampón de lisis #2 (50 mM Tris HCl pH8, 5 mM EDTA, 1% SDS), y se trataron con ultrasonidos (sonicación) con el Bioruptor Sonicator (Diagenode). La cromatina obtenida se diluyó 1:10 en el tampón Tris HCl 50 mM pH8, EDTA 5 mM, NP40 0,5%, NaCl 200 nM. Posteriormente se incubó con proteína A o G unida a un polímero polisacárido (Sefarosa; GE Healthcare Lifesciences) que previamente se había incubado con DNA de esperma de salmón sonicado y BSA (30 min a 4°C); el 1% de las muestras se utilizó como control de la cantidad de DNA de cromatina empleado en los ensayos (Input).

Para la inmunoprecipitación se incubaron los extractos durante 30 min a 4°C con proteína A o G unida a sefarosa que previamente se había incubado durante 16 h a 4°C con 6 μ g del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios empleados fueron: IgG de conejo (Thermo Scientific PA1-27414), anti-acetyl-histone H3 (Millipore), IgG1 (ebiosciences 16-4714), anti-NFATc1 7A6 (Santa Cruz sc-7294) o anti-NFATc3 F1 (Santa Cruz sc-8405). Posteriormente, la sefarosa que contenía el inmunoprecipitado se lavó 6 veces con el tampón #3 (Tris HCl 20 mM pH8, EDTA 2 mM, SDS 0,1%, NP40 1%, NaCl 500 nM) y se incubó con la solución #4 (10 mM Tris HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 2% SDS) para eluir los complejos inmunoprecipitados. La separación del DNA de las proteínas (de-crosslinking) se consiguió mediante la incubación durante al menos 4 h en presencia de 200 nM de NaCl a 65°C. Tras un tratamiento con proteinasa K (Sigma-Aldrich p4850) durante 1 h a 50°C, el DNA de las muestras inmunoprecipitadas se aisló mediante extracción fenólica, se precipitó con etanol y se resuspendió en agua. Una dilución 1/10 de cada muestra se utilizó para el

análisis por Q-PCR en presencia de *SYBR-Green*. Las secuencias de los oligonucleótidos usados se detallan a continuación:

hCox2 prom

fw (5'-3'): GAGGGAGGGATCAGACAGGAGAG

rv (5'-3'): GACTGAAAACCAAGCCCATGTGACG

hIL2 prom

fw (5'-3'): CTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCC

rv (5'-3'): CATTGTGGCAGGAGTTGAGGTTAC

Neg (control)

fw (5'-3'): ATGGTTGCCACTGGGGATCT

rv (5'-3'): TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA

Los datos representados se corresponden con el porcentaje de enriquecimiento en DNA respecto al input y normalizado frente a los valores obtenidos con los anticuerpos control (IgG) correspondientes.

11 Citometría de flujo para la detección de COX2 en PBLs

Las células T primarias e infectadas se incubaron con un anticuerpo conjugado anti-CD4-ficoeritina (PE), se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 5 min. Posteriormente las células fijadas se permeabilizaron con saponina al 0.1 % durante 5 min y se incubaron con el anticuerpo anti-COX2 (S.Cruz 1745) durante 30 min a 4°C. Tras varios lavados con PBS 1X, las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado anti-goat-alofitocianina (APC) durante 20 min a 4°C. Las muestras se analizaron en un citómetro FACSCanto III con la ayuda del programa informático BD FACSDiva. Los datos se analizaron con el programa FlowJo (www.flowjo.com). Las gráficas muestran la expresión de COX2 (visible con APC) en la población de células CD4⁺ e infectadas (PE⁺ GFP⁺).

12 Ensayos de proliferación celular

Los blastos infectados se incubaron con el kit CellTrace™ Violet Cell Proliferation (Molecular Probes, Invitrogen) que contiene un fluoróforo que penetra al interior celular y se puede detectar por citometría de flujo. Posteriormente las células marcadas con CellTrace se estimularon sucesivamente con anti-CD3 (1-2 µg/ml) y CD28 (1-2 µg/ml) unidos a plástico durante 4-6 días. La disminución de la señal del CellTrace™ Violet por proliferación de las células se analizó por citometría de flujo en las células vivas a día 0, 1, 4 y 6 de estimulación. Los datos se analizaron con el programa informático FlowJo.

Las células HUVEC infectadas se sembraron a un 20% de confluencia y se crecieron en un medio con un contenido bajo de suero FCS (0,5%) durante 16h. A continuación se estimularon con VEGF (50ng/ml) durante 48h, añadiendo al mismo tiempo al medio ³H-Timidina (1µCi/ml). Tras las 48h, las células se lavaron con PBS y el DNA, marcado con ³H-Timidina, se aisló mediante la incubación con ácido tricloroacético al 5% seguido de otra incubación con NaOH al 0,5 N. La cantidad ³H-Timidina incorporada se midió en un contador de centelleo (LS 6500 multi-purpose Scintillator Counter).

13 Ensayos de migración y angiogénesis

Las HUVEC transducidas se sembraron a un 90% de confluencia y, tras 24h de incubación, se trazó una línea (herida) sobre la región central de la monocapa de células mediante el uso de una punta de micropipeta p200. Las células se lavaron 2 veces con PBS 1x y se estimularon con VEGF (100ng/ml) en medio con 1% de FCS y en ausencia de factores de crecimiento. El pretratamiento con Etoricoxib 1µM tuvo lugar durante 30 min antes del tratamiento. La capacidad de migración de las células, que equivale a la ocupación del espacio libre (cierre de la herida o *wound healing*), se observó durante 24h con un microscopio invertido (Time Lapse NIKON Ti-Eclipse; con aumento de la lente de objetivo 4x). Las imágenes se adquirieron con el

programa Nikon Nd2 Viewer y el área de migración se cuantificó con el programa informático Image J.

14 Ensayos de matrigel

Las HUVEC KDS_c o KD-c3 (2.5×10^5 células/implante) se mezclaron con la matriz (Matrigel; BD Bioscience) y VEGF (500 ng/ml) más heparina (376 µg/ml). Esta mezcla se implantó (300 µl/animal) en ratones inmunodeprimidos *nude* hembras de 4 semanas de edad (Harlan, *Athymic Nude Mouse*). Después de 10 días los animales se sometieron a eutanasia y se recuperaron los implantes. Cada implante se dividió en dos fracciones: una fracción se utilizó para medir el contenido de hemoglobina y la otra para inmunohistoquímica. La cuantificación de la hemoglobina se llevó a cabo mediante el uso del reactivo TMB (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de las medidas de absorbancia a 605 nm de las muestras. La fracción para inmunohistoquímica se incluyó en parafina, para, posteriormente, cortarla y teñirla con hematoxilina/eosina o incubarla en presencia de anticuerpo anti-GFP (Invitrogen, A11122). El número de vasos sanguíneos presentes en las diferentes secciones o cortes se calculó a partir de micrografías capturadas con el objetivo de aumento 20X. Algunos implantes se fijaron con una disolución de formaldehído al 10% y se incubaron con el anticuerpo anti-GFP utilizando la técnica conocida como 'whole mount' que permite obtener una tinción integral de la muestra. Las imágenes tridimensionales se adquirieron con el escáner Biotronics 3001 OPT y se analizaron con el programa informático Skyscan 3001.

15 Análisis estadístico

Los datos representados se corresponden con las medias aritméticas \pm la desviación estándar correspondientes a un mínimo de 3 experimentos. El estudio estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (*one- o two-way ANOVA*) seguido del test de Bonferroni. En el caso de los experimentos de cuantificación de hemoglobina el análisis se llevó a cabo mediante test de la t de Student (Student *t*-test). Las diferencias se consideraron significativas a partir de $p < 0,05$ (** $p < 0.001$; * $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Resultados

1 Diseño y construcción de lentivirus para el silenciamiento de los diferentes miembros de la familia NFAT

Para estudiar las funciones específicas de cada miembro NFAT se decidió utilizar la técnica del RNA de interferencia (iRNA). Este sistema es muy útil a la hora de estudiar la función de una proteína impidiendo su traducción y analizando los efectos de la pérdida de su expresión. Nuestro primer objetivo fue estudiar el papel de cada miembro de NFAT en linfocitos T, donde sólo se han detectado NFATc1, c2 y c3 (Lyakh et al., 1997) (Fig. 8). En condiciones basales los tres miembros se expresan constitutivamente. Estímulos que provocan un aumento de calcio intracelular, como el tratamiento con Ionóforo de calcio (Io), activan la fosfatasa celular Calcineurina (CN) que desfosforila a NFAT; la desfosforilación provoca un cambio en su movilidad eletroforética (Fig. 8). Además, tras la estimulación se observa un aumento de la expresión de algunas de las diferentes isoformas de NFATc1 (Fig.8, panel superior). En estos experimentos realizados se co-estimularon las células con PMA (*Phorbol Myristate Acetate*), un éster de forbol que activa los factores de transcripción que cooperan con NFAT, como por ejemplo AP1 (Rao et al., 1997). De este modo se imita farmacológicamente el efecto que fisiológicamente se desencadena tras la estimulación del linfocito a través del receptor de la célula T (TCR).

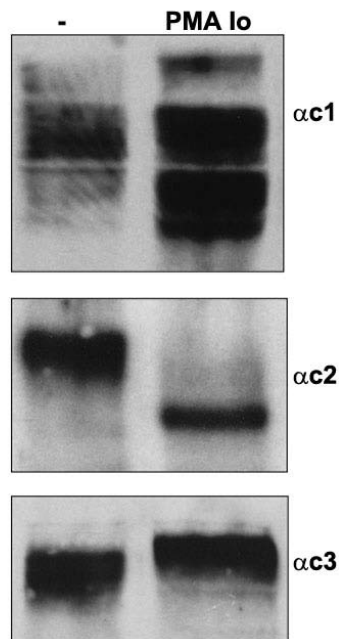


Figura 8 Expresión de los miembros de la familia NFAT en células Jurkat. Immunoblotting representativo de la expresión de NFATc1, c2 y c3 en células JK en reposo y estimuladas con PMA+I0. Los extractos totales de células Jurkat (JK), estimuladas o no, se sometieron a una electroforesis en gel de poli-acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), para, posteriormente, transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con (arriba) anti-NFATc1, (centro) anti-NFATc2 o (abajo) anti-NFATc3 para la detección de los niveles de expresión del miembro NFAT correspondiente.

Teniendo en cuenta que NFATc2 regula la expresión de NFATc1 (Zhou et al., 2002), su silenciamiento no sólo tendría efecto sobre NFATc2 sino que además, de modo indirecto, afectaría a la expresión de NFATc1, impidiendo el análisis individual de este miembro NFAT. Por ello, nuestro trabajo se ha centrado en los dos miembros que se pueden silenciar de forma independiente: NFATc1 y NFATc3.

Con este fin diseñamos varias secuencias shRNA candidatas, alineando todas las isoformas de cada miembro diana, NFATc1 y NFATc3. Además se diseñó una secuencia control (denominada scrambled o Sc) que no reconociera ningún mRNA humano. El diseño se basó en los parámetros indicados por Elbashir et al (Elbashir et al., 2001). Las distintas secuencias se seleccionaron mediante el programa Oligoengine Workstation 2 y se clonaron inicialmente en el vector pSupeRetro para que su transcripción estuviese controlada por el promotor H1.

Este promotor es específico de la polimerasa III (RNA pol III), enzima que fisiológicamente cataliza la producción de RNA no codificantes en células eucariotas (Myslinski et al., 2001). Las secuencias clonadas (tres shRNA para cada miembro NFATs) se expresaron en la línea celular humana HEK, donde no se detecta la presencia de miembros de la familia NFAT. Para llevar a cabo el ensayo se co-transfectó cada vector pSuperRetro-shRNA con un plásmido de expresión para la proteína NFAT diana correspondiente. De este modo se escogieron las secuencias # 3 y #2 para silenciar NFATc1 y NFATc3, respectivamente (Fig. 9A).

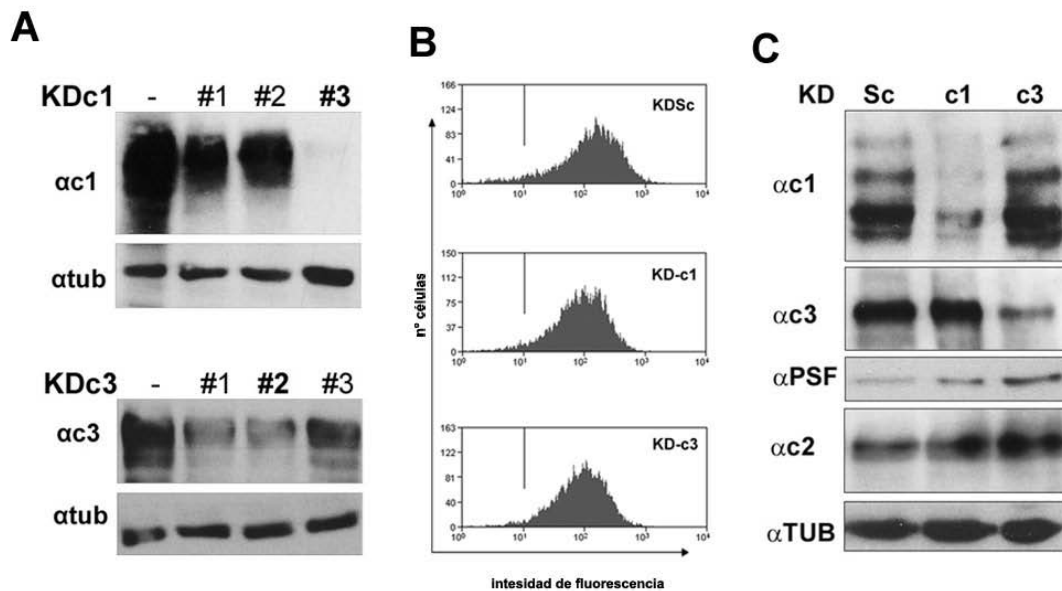


Figura 9. Silenciamiento de NFATc1 y c3 en células Jurkat. (A) Selección de secuencias de interferencia para el silenciamiento (Knock Down=KD) de NFATc1 y NFATc3. Las células HEK se transfectaron con vectores de expresión para NFATc1 (arriba) o NFATc3 (abajo). Para cada uno de ellos se diseñaron y clonaron tres secuencias shRNA que se co-transfectaron con el miembro NFAT diana en células HEK. Posteriormente, los extractos celulares se analizaron por inmunoblotting con un anticuerpo específico para NFATc1 (arriba) ó NFATc3 (abajo). Como control de carga se analizaron los niveles de Tubulina en cada muestra. Se seleccionaron la #3 para el c1 y la #2 para el c3. (B) Expresión de GFP de las células Jurkat infectadas con los lentivirus KDSc, KD-c1, KD-c3. (C) Expresión de NFATc1 (α c1; arriba), NFATc3 (α c3; centro) y NFATc2 (α c2; abajo) en células Jurkat infectadas con el lentivirus que expresa la secuencia Knock Down (KD) control (Sc), para NFATc1 (c1) o para NFATc3 (c3). Como control de carga se analizaron los niveles de PSF y Tubulina.

Las secuencias seleccionadas (Tabla 2) junto con el promotor H1 se subclonaron en el vector lentiviral pHRsin-Dual-GFP; este vector expresa la proteína

fluorescente GFP bajo un promotor eucariota independiente (promotor de la Ubiquitina), permitiendo monitorizar la eficiencia de infección por citometría de flujo. Las partículas lentivirales generadas se utilizaron para infectar células de la línea linfoide humana Jurkat (JK). Tras comprobar la eficiencia de infección mediante citometría de flujo (Fig. 9B), analizamos la expresión de los distintos NFAT comprobando que las secuencias seleccionadas silencian de manera específica a cada miembro, NFATc1 y NFATc3, sin afectar al miembro NFATc2 (Fig. 9C).

2 Genes regulados por NFAT: RCAN

RCAN (*Regulators of Calcineurin*) es una familia de proteínas que actúan regulando la ruta de señalización CN/NFAT. A su vez, NFAT regula la expresión de RCAN: en concreto en el promotor de la isoforma inducible RCAN1.4 se han detectado al menos 15 sitios de unión a NFAT (Yang et al., 2000). De hecho el aumento de calcio intracelular provocado por tratamiento con Ionóforo (Io) induce la transcripción de RCAN1.4. Esta inducción se inhibe con un pretratamiento con Ciclosporina A (CsA), inhibidor farmacológico de CN (Canellada et al., 2008) (Fig. 10A).

RCAN1.4 es por tanto una excelente diana de NFAT para estudiar la posible contribución selectiva de NFATc1 y NFATc3 en su regulación. Para ello se infectaron células JK con las diferentes partículas lentivirales que expresaban los shRNA correspondientes, y tras la estimulación (PMA+Io) se analizó la expresión del RNA mensajero y proteína de RCAN1.4. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento del NFATc3 (KD-c3) reduce significativamente la inducción de la transcripción del mensajero de RCAN1.4 (2 horas) y la producción de su proteína (24 horas) (Fig.10 B-C). Por el contrario en células en las que la expresión de NFATc1 está silenciada (KD-c1) no se aprecia ninguna anomalía en la expresión de RCAN1.4. Estos experimentos sugieren que los diferentes miembros de NFAT pueden ejercer papeles diferentes e independientes en la regulación de los genes diana.

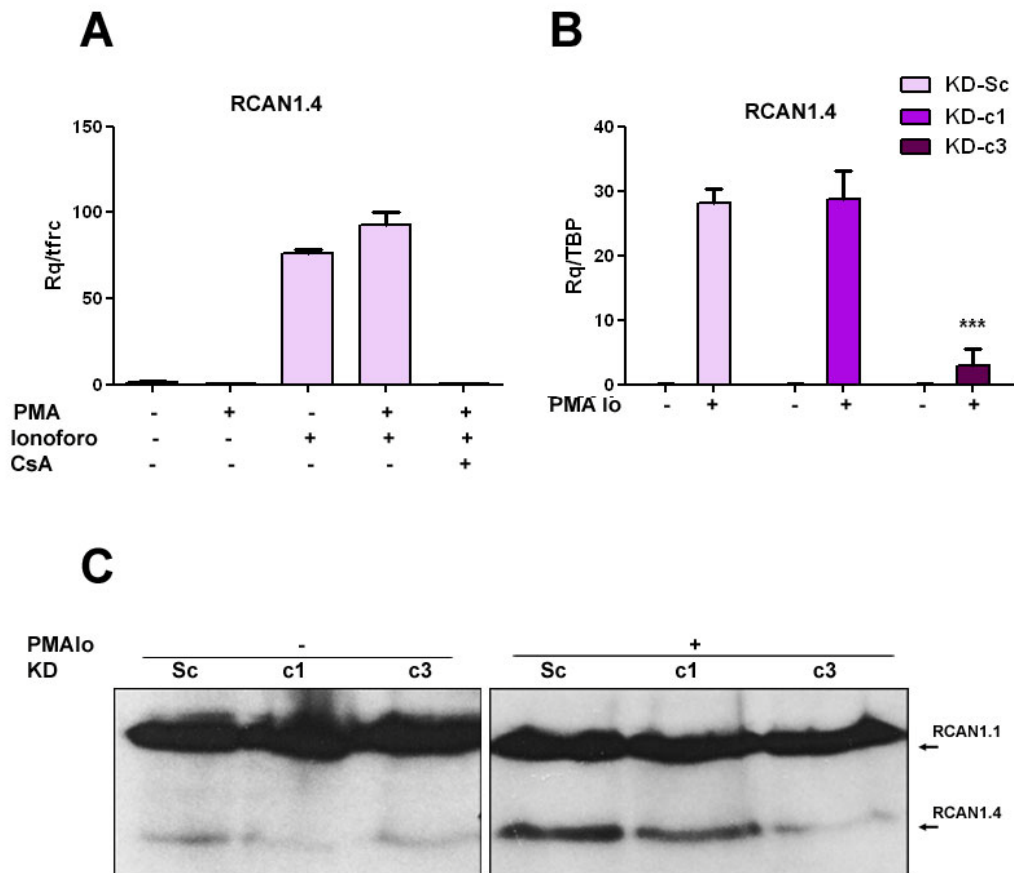


Figura 10 Regulación de RCAN1.4 en células JK. (A) Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de RCAN1.4 en células JK estimuladas durante 2h con PMA, Io, o PMA+Io, pretratadas o no con ciclosporina A (CsA). (B) PCR cuantitativa del mRNA de RCAN1.4 en JK que tienen silenciado NFATc1 (KDc1), NFATc3 (KDc3) o infectadas con la secuencia control (KD-Sc) y estimuladas durante 2h con PMA+Io. El TBP se usó como control endógeno en el análisis por PCR cuantitativa. (C) Nivel de expresión de RCAN1.1 y RCAN1.4 en células Knock Down (KD) para c1 (c1), para c3 (c3) o control (Sc). Los extractos de células JK KD, estimuladas o no durante 24h con PMA+Io, se analizaron mediante inmunoblotting con un anticuerpo que reconoce las dos isoformas de RCAN1. La isoforma constitutiva RCAN1.1 se utilizó como control de carga.

Para estudiar si la regulación transcripcional de RCAN1.4 observada tenía lugar directamente en el promotor utilizamos un plásmido que contiene el gen indicador Luciferasa (luc) bajo el control transcripcional del promotor humano de *RCAN1.4* (-1664/+83 pares de bases). En estos experimentos, las células JK infectadas con las diferentes secuencias silenciadoras o *Knock-Down* (KD) (KDSc, KD-c1 y KD-c3) se transfectaron con el plásmido *RCAN1.4-luc* y se estimularon con PMA+Io durante 4 horas. Como se observa en la figura 11A, en

KD-c3, y no en el caso de KD-c1, se inhibe la actividad luciferasa, por lo que demuestra que NFATc3 regula la activación del promotor de *RCAN1.4*.

Dado que la estimulación farmacológica empleada (PMA + Io) puede sobrepasar la amplitud de una respuesta celular fisiológica, decidimos analizar de nuevo la regulación del promotor de *RCAN1.4* utilizando un estímulo fisiológico. Para ello las células T Ch7C17 infectadas (KDSc, KD-c1 y KD-c3) se pusieron en contacto con células B humanas Raji en presencia del super-antígeno B (SEB) (Fig. 11B). El efecto producido por esta estimulación, muy parecida a la interacción entre linfocito T y célula presentadora de antígeno (APC) (Fraser, 1989; Kappler et al., 1989), fue un aumento de la actividad del promotor de *RCAN1.4* que se encuentra limitada en células KD-c3 (Fig. 11C). Estos resultados demuestran que NFATc3, y no NFATc1, participa en la regulación de la actividad transcripcional del promotor de *RCAN1.4* en células T activadas.

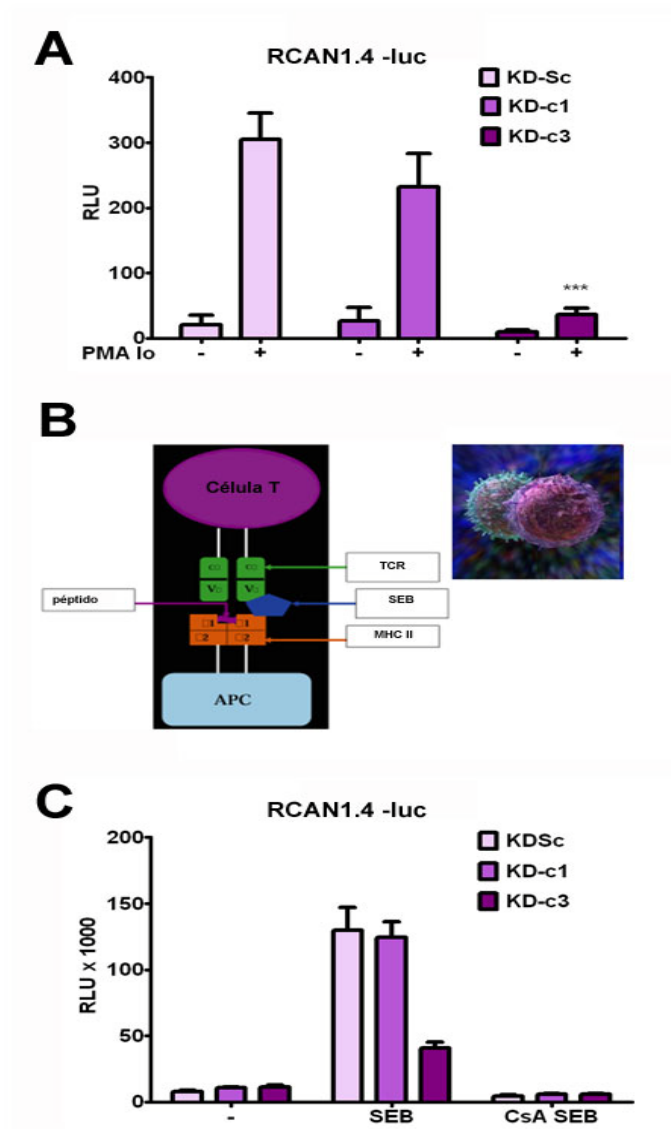


Figura 11. Regulación del promotor de RCAN1.4. (A) Ensayos de luciferasa con células JK KD estimuladas 4h con PMA+Io. Las células JK Knock Down para NFATc1 (KD-c1), NFATc3 (KD-c3) o control (KDSc) se transfectaron con un plásmido de expresión que contiene el gen indicador luciferasa bajo el control del promotor de RCAN1.4. Tras 4h de estimulación (PMA+Io) se analizaron los niveles de expresión de luciferasa. (B) Interacción entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno (APC) en presencia del superantígenos B. (Izquierda) Esquema de la interacción entre la célula T y la célula APC. La célula T interactúa a través del TCR y en presencia del superantígenos B con la molécula de MHC de clase II de la célula APC. (Derecha) Micrografía que ilustra la interacción entre ambos tipos celulares. (C) Ensayos de luciferasa con CH7C17 KD estimuladas con células Raji acoplejadas con SEB durante 4h. Las células se analizaron como en (A).

3 Genes de la activación de linfocitos T regulados por NFATc1 y NFATc3

Con el propósito de investigar el papel específico de NFATc1 y NFATc3 en la activación de genes implicados en la activación de linfocitos T, decidimos

estudiar el impacto de la inhibición selectiva de cada miembro en la expresión de RNA mensajero de genes implicados en la respuesta inmune. Para ello el RNA total de células JK infectadas (KDSc, KD-c1 y KD-c3) y activadas se analizó en un array de baja densidad de genes implicados en inflamación (*Taqman Low Density Array, TLDA*) mediante PCR cuantitativa. El análisis de los resultados mostró que el silenciamiento de NFATc1 produce un incremento de la transcripción de varias citoquinas y quimioquinas (Tabla 4). También observamos que la inhibición de NFATc3, a diferencia de NFATc1, inhibe la transcripción de Interleuquina 2 (IL2) y Ciclooxygenasa 2 (COX2) (Tabla 4).

Tabla 4 Expresión de genes de la respuesta inmune tras el silenciamiento de NFATc1 y NFATc3. Las células Jurkat se infectaron con los lentivirus KDSc, KD-c1 y KD-c3 y posteriormente se estimularon con PMA+I ω durante 4 horas. El RNA total se analizó mediante PCR cuantitativa en un array de baja densidad Taqman. Los datos indicados se refieren a la inducción de los genes seleccionados (media \pm error estándar) en comparación con la inducción de los mismos en células control KDSc.

Gen Diana	Símbolo	KD-c1		KD-c3
Interleuquina 2	IL2	3.42 \pm 0.15		0.45 \pm 0.03
Interleuquina 3	IL3	3.55 \pm 0.33		0.98 \pm 0.20
<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>	CCL3	2.94 \pm 0.39		0.76 \pm 0.11
Ciclooxygenasa 2	COX2	1.75 \pm 0.34		0.29 \pm 0.06
<i>Colony-stimulating factor 2</i>	CSF2	3.1 \pm 0.00		1.09 \pm 0.15
Perforina 1	PRF1	0.84 \pm 0.08		0.74 \pm 0.02
FAS	FAS	1.22 \pm 0.03		0.78 \pm 0.18
Ligando de FAS	FASLG	1.89 \pm 0.00		0.47 \pm 0.09
Receptor de la Transferrina**	TFRC	1.10 \pm 0.00		1.05 \pm 0.30
Beta-Glucuronidasa**	GUSB	1.07 \pm 0.01		0.82 \pm 0.09

** Controles endógenos

3.1 Regulación diferencial de Interleuquina 2 por NFATc1 y NFATc3

Interleuquina 2 (IL2) es uno de los principales mediadores de la respuesta inmune (Bachmann and Kopf, 2002); su expresión, inducida por la estimulación del TCR ejerce una función como factor de crecimiento autócrino y parácrino que ha sido ampliamente estudiada y descrita (Hoyer et al., 2008). Nuestros datos sugieren que la actividad transcripcional de esta citoquina está regulada negativamente por NFATc1 y positivamente por NFATc3 (Tabla 4). Para corroborar los resultados de las arrays de baja densidad, realizamos ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) individuales, pudiendo validar la diferencia entre la regulación transcripcional ejercida por NFATc1 y NFATc3 sobre el gen de la IL2 (Fig. 12A). Con el objeto de estudiar si el efecto transcripcional observado se reflejaba en los niveles de proteína, medimos la cantidad de citoquina presente en el sobrenadante de las células JK infectadas y estimuladas a distintos tiempos (Fig.12 B-C). Nuestros resultados muestran que, a tiempos de estimulación temprana (8h), el silenciamiento de NFATc3 disminuye la cantidad de IL2 liberada al medio; sin embargo, esta diferencia parece compensarse y no es detectable tras 24h de estimulación. Por otro lado, tanto a 8h como a 24h, se observa un aumento de IL2 en ausencia de NFATc1, si bien este no es proporcional al aumento observado en el RNA mensajero.

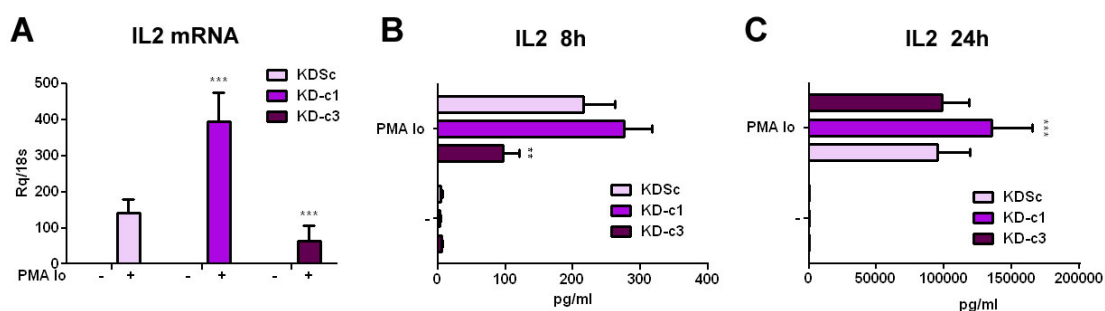


Figura 12. Expresión de IL2 en JK KD para NFATc1 o NFATc3. (A) Los niveles de mRNA para IL2 se analizaron mediante PCR cuantitativa en células JK KD para NFATc1 (KD-c1), para NFATc3 (KD-c3) o control (KDSc) tras la estimulación con PMA+lo durante 4h. (B, C) Niveles de proteína IL2 presente en el sobrenadante de las células JK KD indicadas en (A) y estimuladas durante 8h (B) y 24h (C) con PMA+lo. La cantidad de IL2 se cuantificó mediante ELISA.

El promotor de la IL2 ha sido el modelo más utilizado para estudiar la cooperación entre NFAT y otros factores de transcripción como AP1 (Rao et al., 1997) o FoxP3 (Wu et al., 2006b). De hecho se ha caracterizado una región mínima necesaria para activar la transcripción del gen (300pb) que contiene 5 sitios de reconocimiento para NFAT (NRE) (Rooney et al., 1995)(Fig. 14A).

Al igual que en el caso del gen RCAN1.4, estudiamos si la regulación de la expresión del gen de IL2 observada se reflejaba también en la actividad de supromotor. Para ello utilizamos un plásmido que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor humano de IL2. En estos experimentos, se analizó la actividad luciferasa en extractos de células JK y transfectadas con el plásmido *IL2-luc*. El resultado muestra que en células activadas el silenciamiento de NFATc1 aumenta la actividad del promotor mientras que el silenciamiento de NFATc3 la disminuye (Fig.13A).

Dado que tanto NFATc1 como NFATc3 regulan la actividad del promotor, investigamos si ambos factores de transcripción interaccionaban directa y físicamente con el promotor de la IL2 *in vivo*. Para ello llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) a partir de células JK estimuladas, usando anticuerpos anti-NFATc1 y anti-NFATc3. Mediante estos ensayos comprobamos que tras la activación celular existe interacción *in vivo* tanto de NFATc1 como de NFATc3 con el promotor de IL2 en el núcleo de células JK (Fig. 13B).

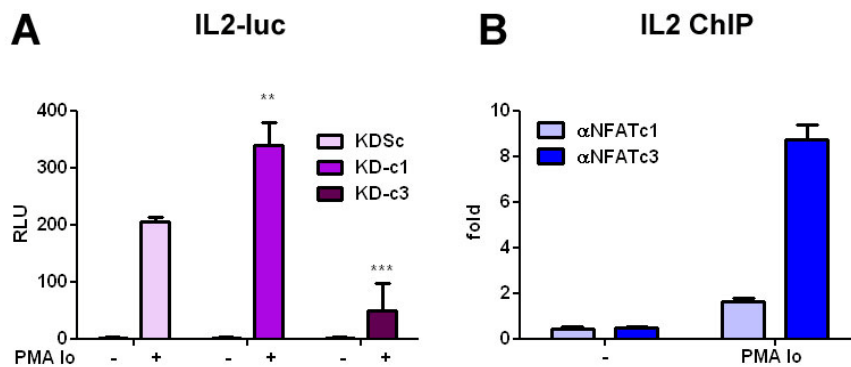


Figura 13. Regulación del promotor de la IL2. (A) Ensayo de actividad luciferasa con el promotor IL2-luc en JK KD para NFATc1 (KD-c1), NFATc3 (KD-c3) o la secuencia control (KDSc) estimuladas durante 4 horas con PMA+Io. El gráfico representa los valores obtenidos (media \pm desviación estándar) de al menos 3 experimentos. (B) Ensayo de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-NFATc1 y anti-NFATc3 de la cromatina de células JK estimuladas o no con PMA+Io durante 30 min. El gráfico, que corresponde a un experimento representativo, muestra el aumento en los niveles de DNA inmunoprecipitado con un anticuerpo que reconoce NFATc1 (α NFATc1) o NFATc3 (α NFATc3).

Una de las posibles explicaciones para el aumento de la actividad transcripcional de IL2 en ausencia de NFATc1 es que, dado que la estructura terciaria del DBD de este miembro es muy parecida a la del DBD de NFkB (Wolfe et al., 1997; Zhou et al., 1998), ambos factores podrían competir por el mismo sitio de unión en el promotor de IL2. Ello hacía que NFATc1 interfiriese con la función activadora de NFkB. De hecho se ha descrito que NFAT en algunos casos es capaz de interactuar con el CD28RE (elemento de respuesta a CD28) del promotor de la IL2 (Fig. 7A). Este sitio se define como *kB-like* por su similitud con las secuencias de interacción con NFkB (Rao et al., 1997). En tal caso NFATc1 funcionaría como efector de un *feedback* negativo donde la isoforma inducible NFATc1 α contribuiría a regular negativamente la señal de activación celular.

Para comprobar esta hipótesis, llevamos a cabo ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) de la región CD28RE empleando extractos nucleares de células JK activadas (Fig. 14B). Pudimos comprobar que el tratamiento con PMA+Io provoca la formación de un complejo de proteínas con

esta región del promotor claramente visible tras 2h de estimulación, y que sugería la participación de varios factores de transcripción.

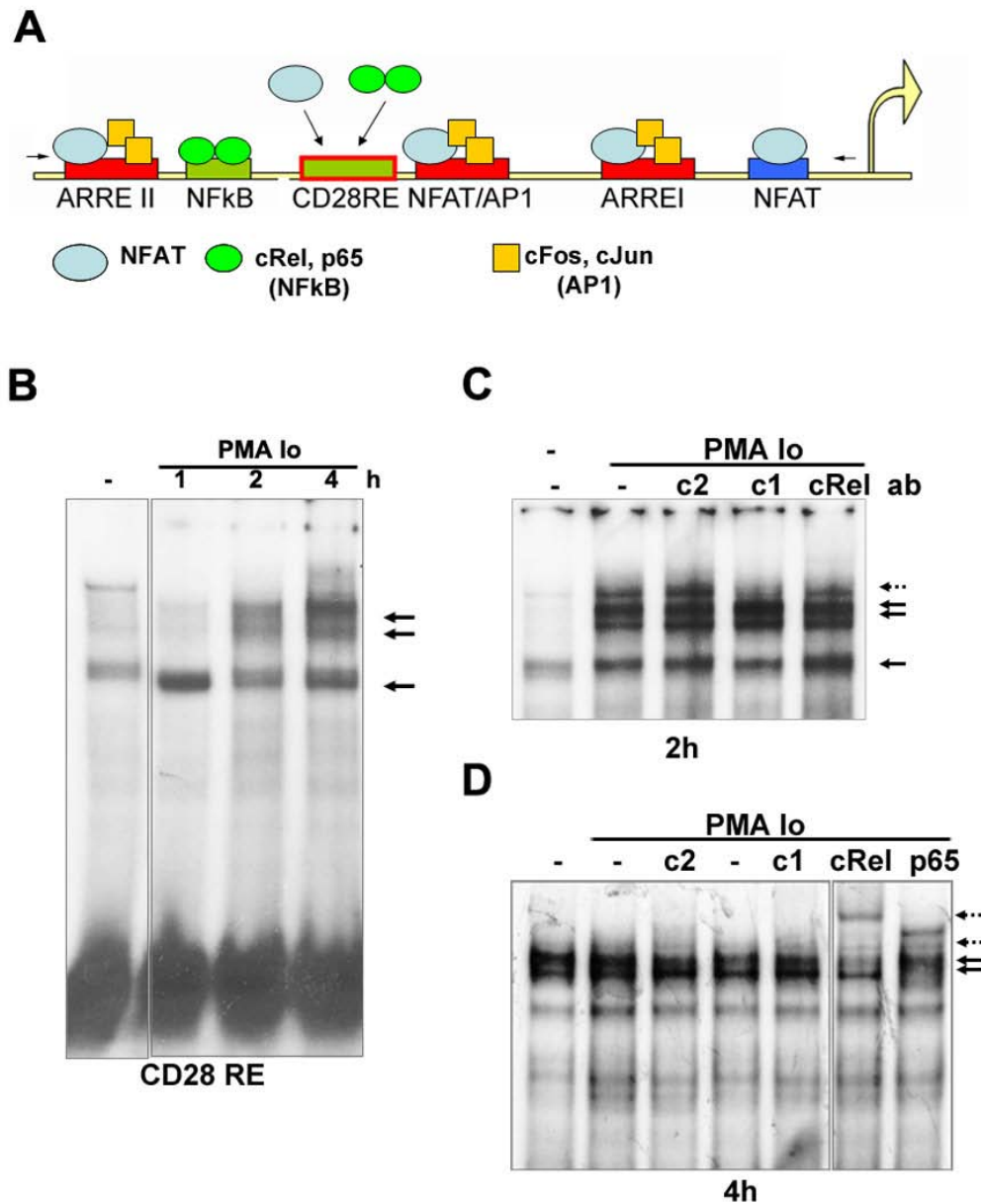


Figura 14. Estudio de la interacción de NFAT con el promotor de IL2. (A) Esquema de la estructura del promotor de la IL2 humana indicando los sitios de unión a NFAT/AP1/NFkB descritos. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos (*primers*) utilizados en el ensayo de ChIP (B) Estudio de la movilidad electroforética de las sondas CD28RE incubadas con extractos nucleares de JK estimuladas 1, 2 y 4 horas con PMA+lo. Los extractos de JK estimuladas (C) 2h o (D) 4h con PMA+lo se preincubaron con un anticuerpo control, anti-cRel, anti-NFATc1 (676), anti-NFATc2 (672), anti-p65 y posteriormente se incubaron con la sonda CD28RE marcada radiactivamente. Las muestras se sometieron a electroforesis y los complejos formados (DNA+proteína) se detectaron mediante auto-radiografía.

Para identificar las proteínas contenidas en el complejo observado (Fig. 14B), realizamos ensayos de *supershift* usando anticuerpos anti-NFATc1, anti-NFATc2, y anti-NFkB (cRel y p65). Nuestros resultados indican que NFATc1 forma parte del complejo tras 2 horas de estimulación (Fig. 14C); sin embargo, tras 4h de tratamiento el complejo está formado principalmente por cRel y p65 (Fig. 14D). Estos experimentos nos llevaron a descartar la hipótesis inicial ya que NFATc1 no parece formar parte del complejo a tiempos largos de estimulación (4h).

Otra posible explicación al aumento de la actividad transcripcional de IL2 en células KD-c1 sería que, puesto que hay un aumento en los niveles de proteínas NFATc1 α tras la estimulación, estos “represores” pudieran desplazar otros miembros de la familia NFAT “activadores” de la actividad transcripcional de IL2. Para ello analizamos mediante EMSA la composición de los complejos que se forman con la sonda ARRE II que interacciona con el complejo formado por AP1 y NFAT (Fig. 14A, 15A) (Rooney et al., 1995). En estos ensayos detectamos que tanto NFATc1 como NFATc2 interaccionan con el sitio ARRE II tras 2 y 4 horas de estimulación (Fig. 15 B-C). En cuanto a NFATc3, no se detectó ninguna interacción con el sitio ARRE II. Estos resultados no nos permitieron concluir que existieran diferencias selectivas en la ocupación por parte de los NFAT del sitio ARREII.

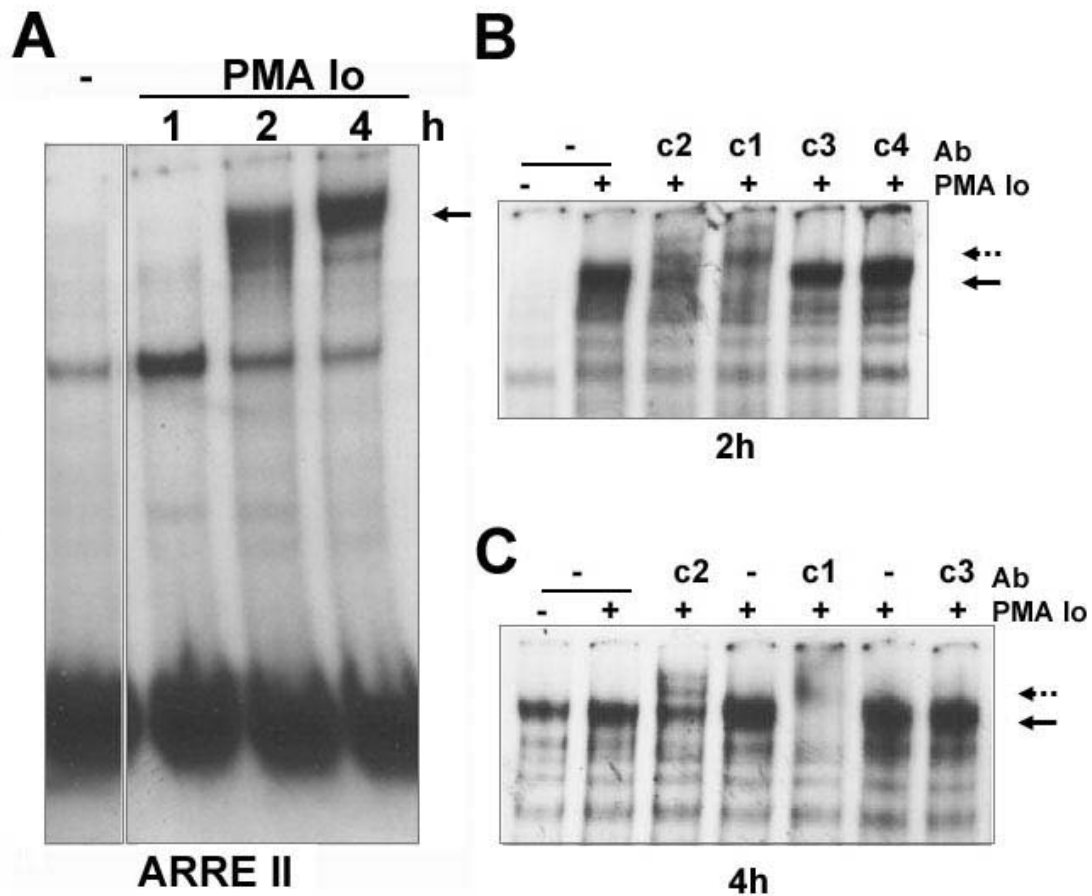


Figura 15. Ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética de las sondas CD28RE y ARRE II. (A) Estudio de la movilidad electroforética de las sondas ARRE II incubadas con extractos nucleares de JK estimuladas 1, 2 y 4 horas con PMA+lo. Los extractos de JK estimuladas (B) 2h o (C) 4h se preincubaron con anticuerpos control, anti-NFATc1, anti-NFATc2, anti-NFATc3 o anti-NFATc4. A continuación se incubaron con la sonda ARRE II marcada radiactivamente. Las muestras se sometieron a electroforesis y los complejos formados (DNA+proteína) se detectaron mediante auto-radiografía. Las flechas indican los complejos formados por interacción con la sonda. La flecha con línea de puntos indica el *supershift*.

3.2 Regulación de la Ciclo-oxigenasa 2 por NFATc3 en las células JK y linfocitos T primarios

Los datos mostrados en la Tabla 4 indican que el silenciamiento de NFATc3 reduce en un 80% la transcripción del gen de la Ciclo-oxigenasa 2 (COX2) mientras que la ausencia de NFATc1 no tiene ningún efecto notable. COX2 es, junto con COX1, la enzima responsable de la conversión del ácido araquidónico en PGH₂, substrato de las sintasas de prostanoïdes (Vane et al.,

1998). Estas moléculas son importantes mediadores de varios procesos, como por ejemplo la respuesta inflamatoria. COX2, a diferencia de COX1, es inducible y su transcripción es regulada parcialmente por NFAT (Hernandez et al., 2001).

Para validar los datos de los array de baja densidad (Tabla 4), realizamos los ensayos de PCR cuantitativa pudiendo confirmar los resultados obtenidos (Fig. 16A). Además comprobamos que la bajada en los niveles de mRNA de COX2 se correspondía con una disminución drástica de los niveles de expresión de la proteína inducida (Fig. 16B). Por lo tanto, estos resultados sugieren que NFATc3, y no NFATc1, se requiere para la activación de la expresión génica de COX2.

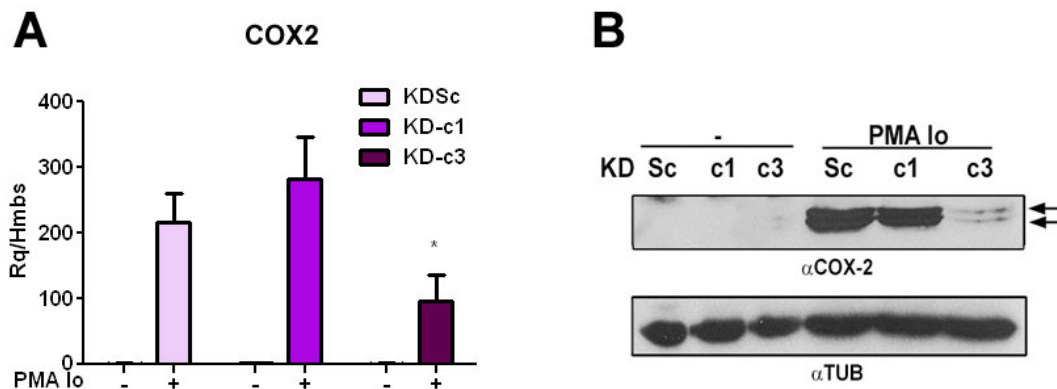


Figura 16. Expresión de COX2 en células JK Knock Down para NFAT. Células JK Knock Down control (KDSc), para NFATc1 (KD-c1) o para NFATc3 (KD-c3) se utilizaron para estudiar la inducibilidad de COX2 tras la estimulación con PMA+lo tanto (A) a nivel de mRNA como (B) a nivel de proteína. (A) El RNA de las diferentes células JK KD estimuladas o no durante 2h con PMA+lo se analizó mediante qPCR para medir los niveles de mRNA de COX2. La sonda Hmbs se utilizó como control endógeno. (B) Experimento representativo de los niveles de expresión de la proteína COX2 en las diferentes células JK KD. Los extractos totales de las diferentes células JK KD estimuladas o no con PMA+lo durante 24h se analizaron mediante inmunoblotting utilizando un anticuerpo anti-COX2. Tubulina (TUB) se utilizó como control de carga.

Para determinar si la regulación del gen de COX2 mediada por NFATc3 reside en el promotor (Fig.17 A) se realizaron ensayos de transfección transitoria en células infectadas (KDSc, KD-c1 y KD-c3) utilizando un plásmido que contiene el gen de la Luciferasa bajo el control transcripcional del promotor de la COX2 (Fig. 17B). Los resultados indican que el silenciamiento de NFATc3, y no de NFATc1,

disminuye la actividad transcripcional del promotor de COX2 en células T activadas, indicando que NFATc3 es claramente un regulador positivo de COX2. Para demostrar que la inhibición observada en el promotor de COX2 es dependiente del silenciamiento de NFATc3, cotransfectamos JK infectadas control (KDSc) con el promotor COX2-luc y con un vector de expresión de NFATc1 o de NFATc3. Pudimos comprobar que NFATc3 es un potente transactivador del promotor de la COX2. También pudimos observar un ligero aumento en la actividad transcripcional mediada por la sobreexpresión de NFATc1 (Fig. 17D).

Finalmente, generamos un vector de NFATc3 resistente al silenciamiento para recuperar la actividad transcripcional detectada en presencia de NFATc3. La expresión de la construcción resistente al silenciamiento (c3Res) no se vio afectada por la expresión de KD-c3 (Fig. 17C) y se utilizó para intentar recuperar la pérdida de actividad del promotor COX2-luc tras el silenciamiento. Para ello se transfectaron células JK KDc3 con el vector de expresión de NFATc1, de NFATc3 y de c3Res, pudiéndose comprobar que, sólo cuando se expresaba c3Res, se recuperaba parcialmente la actividad transcripcional del promotor de COX2 (Fig. 17D).

Todos estos experimentos indican que NFATc3 regula selectivamente la activación del promotor de COX2 en células JK activadas.

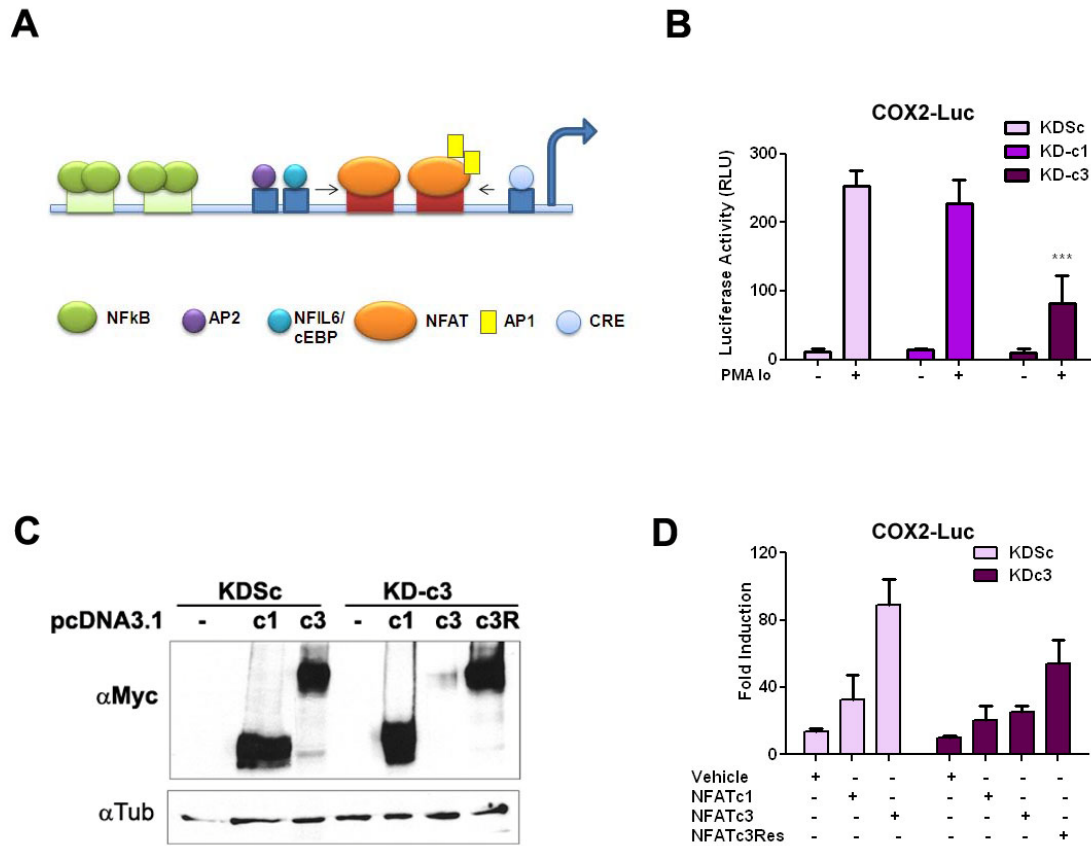


Figura 17. Análisis funcional del efecto del silenciamiento de NFAT sobre el promotor de COX2. (A) Esquema del promotor de COX2. Las flechas indican los *primers* utilizados en el ChIP (B) Ensayo de luciferasa con células JK KD control (KDSc), para NFATc1 (KD-c1) y para NFATc3 (KD-c3) transfectadas con el vector COX2-luc y posteriormente (16h) estimuladas con PMA+lo durante 5h. El gráfico muestra los valores relativos de luciferasa (media \pm desviación estándar) de al menos 3 experimentos. *** $p < 0,001$. (C) Expresión de las proteínas NFATc1, NFATc3 y c3Res tras la transfección transitoria de células HEK con el plásmido correspondiente. Las células HEK fueron previamente infectadas con los lentivirus KDSc y KD-c3. (D) Las células JK KDSc y KD-c3 transfectadas con los vectores de expresión de NFATc1, NFATc3 y c3Res se estimularon durante 5h con PMA+lo. La gráfica muestra las veces de inducción de actividad luciferasa relativa a la actividad de células sin estimular de un experimento representativo.

El promotor de la *COX2* contiene dos sitios de unión a NFAT que se conocen como proximal y distal (Fig.17A). Para estudiar si había alguna diferencia en la capacidad de unión de los NFAT con cada uno de estos sitios realizamos ensayos de *supershift* en EMSAs (Fig.18A y B). Los resultados indicaron que NFATc3 interacciona indistintamente con los sitios analizados; sin embargo, NFATc1 sólo puede participar de una forma clara en la formación del complejo generado con la secuencia proximal.

La interacción física de NFATc1 y NFATc3 *in vivo* se analizó mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Con ello determinamos que, no sólo NFATc3, sino también NFATc1 interaccionaba físicamente con el promotor de *COX2* en células activadas (Fig. 18 C).

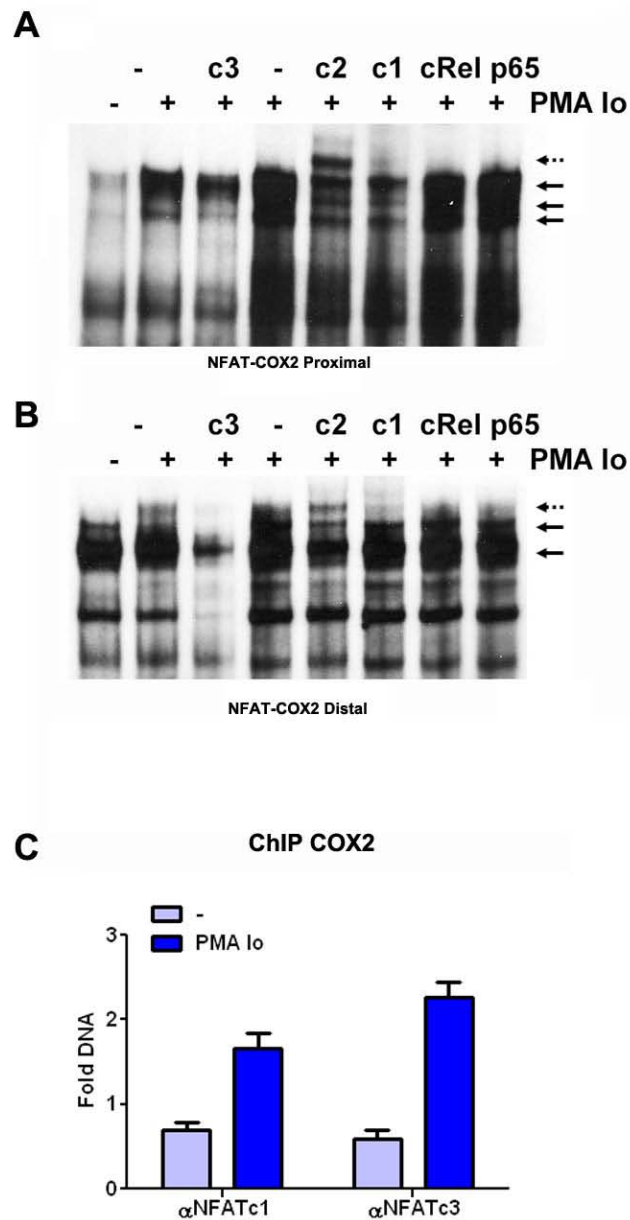


Figura 18 Interacción de los miembros NFAT con el promotor de la COX2. (A y B) Ensayo de retardo de la movilidad electroforética con dos sondas correspondientes al sitio proximal (A) y distal (B) del promotor de COX2. Los extractos de células JK estimuladas o no con PMA+lo durante 4 horas se incubaron previamente con anticuerpos control (-), anti-NFATc1, anti-NFATc2, anti-NFATc3, anti-cRel y anti-p65. Posteriormente se añadió la sonda indicada marcada radiativamente y las muestras se sometieron a electroforesis. Los complejos formados (DNA+proteína) se detectaron mediante auto-radiografía. Las flechas indican los complejos formados por interacción con la sonda. La flecha con línea de puntos indica el *supershift*. (C) Ensayo de inmunoprecipitación con cromatina de células JK estimuladas durante 30min con PMA+lo. La gráfica muestra el enriquecimiento de cromatina de las muestras precipitadas con anticuerpos anti-NFATc1 y anti-NFATc3 normalizado frente a su correspondiente anticuerpo control o IgG.

Dada la relevancia potencial de los resultados obtenidos en la línea celular JK, decidimos extender nuestro estudio a cultivos primarios de células T. Inicialmente analizamos las células T primarias humanas, pero su infección resultó extremadamente complicada ya que son células muy resistentes a la infección con lentivirus pseudotipados con la envuelta VSV-G. De hecho tan sólo conseguimos un silenciamiento parcial de la expresión de NFATc3 en estos cultivos (Fig. 19A). A pesar de estas limitaciones técnicas conseguimos observar en células CD4⁺ infectadas con lentivirus KD-c3 (GFP⁺) una inhibición de COX2 similar a la que se obtiene tras el tratamiento con el inhibidor farmacológico de CN, CsA (Fig. 19B).

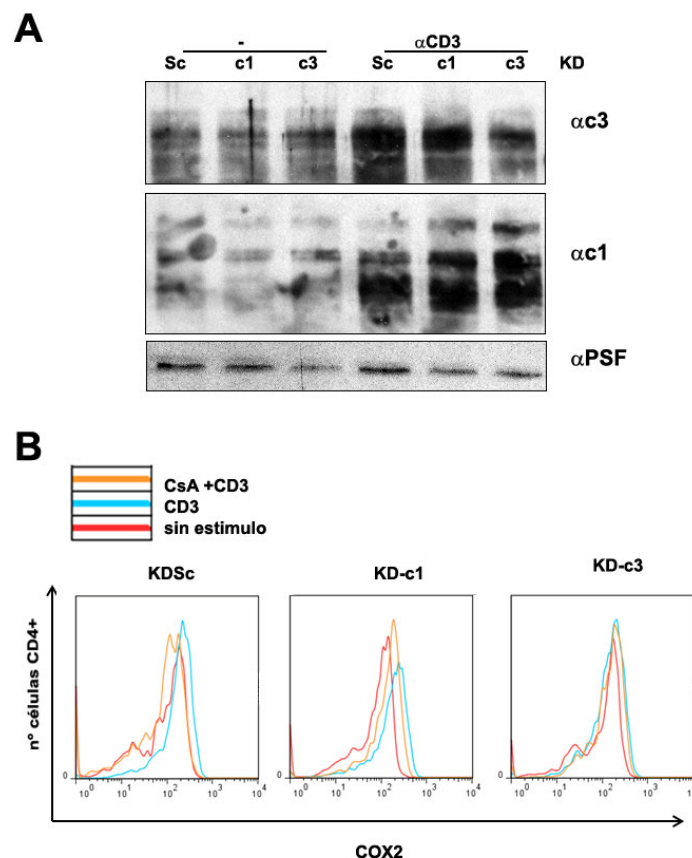


Figura 19 Infección de linfocitos T primarios. Linfocitos T de sangre periférica recién aislados se infectaron durante 48 h y se estimularon o no con anti-CD3 durante 16h. Donde se indica las células se pre-trataron con Ciclosporina (CsA) durante 1h. (A) Expresión de NFATc1 y NFATc3 en células T infectadas con KDSc, KD-c1 y KD-c3. PSF se utilizó como control de carga. (B) Las células marcadas con anticuerpo anti-CD4-PE, se fijaron con FA, permeabilizaron con saponina e incubaron con un anticuerpo primario anti-COX2 seguido del anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo (APC). En la población de células CD4⁺ (PE⁺) infectadas (GFP⁺) se analizó la expresión de COX2 (APC) por citometría de flujo.

3.3 Papel de NFATc1 y NFATc3 en la regulación de la expresión de IL2 y COX2 y de la proliferación en linfoblastos

Dada la dificultad para infectar linfocitos T primarios, nos planteamos la posibilidad de llevar a cabo el estudio en linfoblastos o blastos derivados de las células T (Katzen et al., 1985). Los blastos se infectaron en el día 9 de su fase proliferativa y 5 días más tarde se estimularon con anti-CD3 durante 2h. A pesar de no obtener un 100% de eficiencia de infección (células GFP⁺) (Fig. 20A), conseguimos silenciar eficientemente la expresión de NFATc1 y NFATc3. Sin embargo, a diferencia de lo observado en las células JK, el silenciamiento de NFATc3 también disminuyó los niveles de expresión de NFATc1 (Fig. 20B). En estas condiciones experimentales comparamos la expresión transcripcional de *IL2* y *COX2* (Fig. 20 C y D), pudiendo comprobar que el KD-c3 inhibe la actividad transcripcional de ambos genes. Estos experimentos implican a NFATc3 en la regulación de estos genes no sólo en células JK sino también en blastos T. Con respecto a NFATc1, su silenciamiento no afecta significativamente a la expresión transcripcional de ninguno de los dos genes analizados.

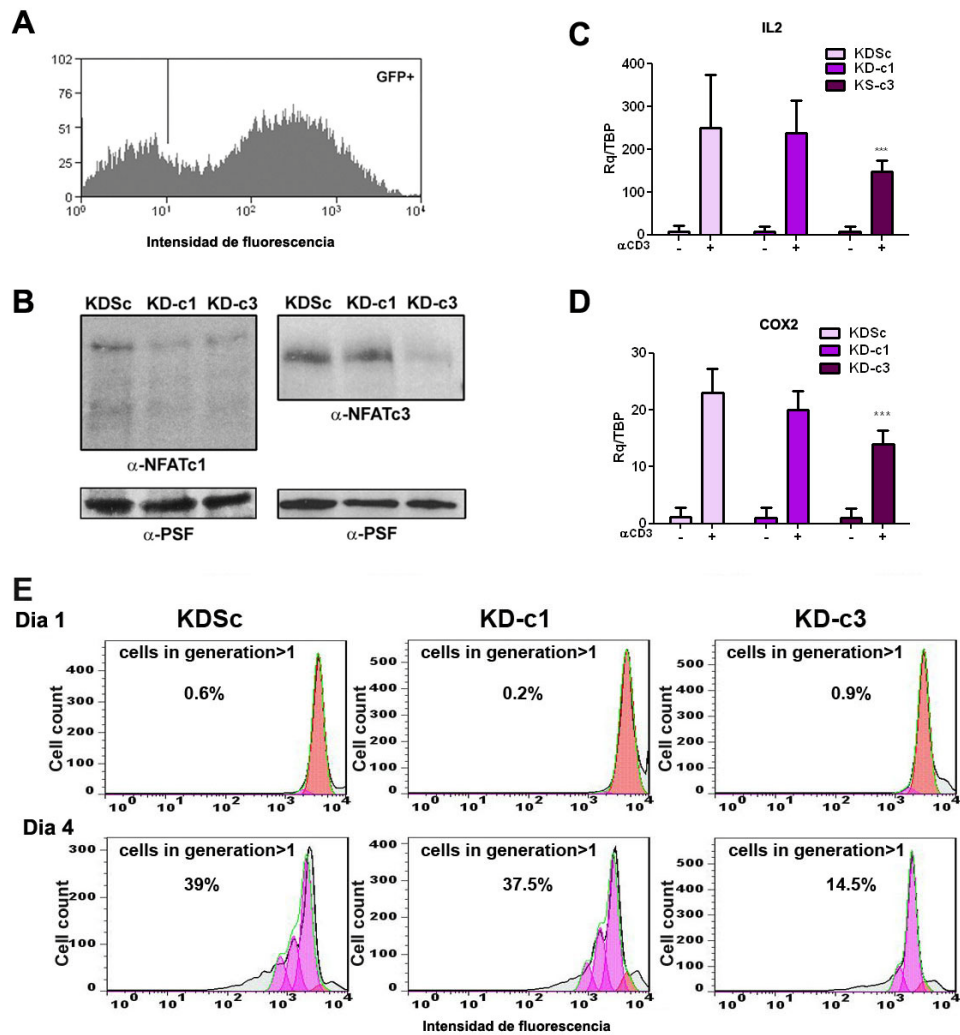


Figura 20 Silenciamiento de NFATc1 y NFATc3 en blastos. Los linfocitos T se activaron con PHA y se mantuvieron en medio con IL2. Los blastos obtenidos se infectaron en el día 9 de su fase proliferativa. En el día 14, tras 2 días sin IL2, se estimularon durante 2h con anti-CD3. (A) Eficiencia de infección analizada mediante la expresión de GFP por citometría de flujo. (B) Expresión y silenciamiento de NFATc1 y NFATc3 analizado mediante inmunoblotting en extractos totales de blastos infectados. PSF se utilizó como control de carga. (C, D) PCR cuantitativa de IL2 (C) y COX2 (D). Los datos muestran la medias \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos. *** $p < 0,001$ (E) Estudio de la proliferación de blastos tras el silenciamiento de NFAT. Los blastos KD (KDSc, KD-c1 o KD-c3) se analizaron mediante citometría de flujo tras 1 y 4 días de estimulación con anti-CD3/CD28 calculando el porcentaje de células que se han dividido más de 1 vez.

Dado el papel de IL2 y de COX2 en proliferación celular (Lipkowitz et al., 1984) (Iniguez et al., 1999), decidimos investigar la relevancia del silenciamiento de NFATc3 en la proliferación de estas células. Para ello los blastos infectados con las diferentes partículas lentivirales (KDSc, KD-c1 y KD-c3) se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 y, tras 4 días en cultivo, medimos la proliferación celular

(número de generaciones) mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 20E, el silenciamiento de NFATc3 disminuye la proliferación de los blastos tras la estimulación. Este resultado demuestra que NFATc3 es un importante modulador de la proliferación de las células T.

Por otro lado pudimos observar que NFATc3 regula la expresión de IL2 en las CD8⁺ y de COX2 en las CD4⁺ (Fig. 21A, C). No obstante, el KD-c3 también le afecta a la expresión de IL2 y COX2 en células CD4⁺ y CD8⁺ respectivamente (Fig. 21 B-D).

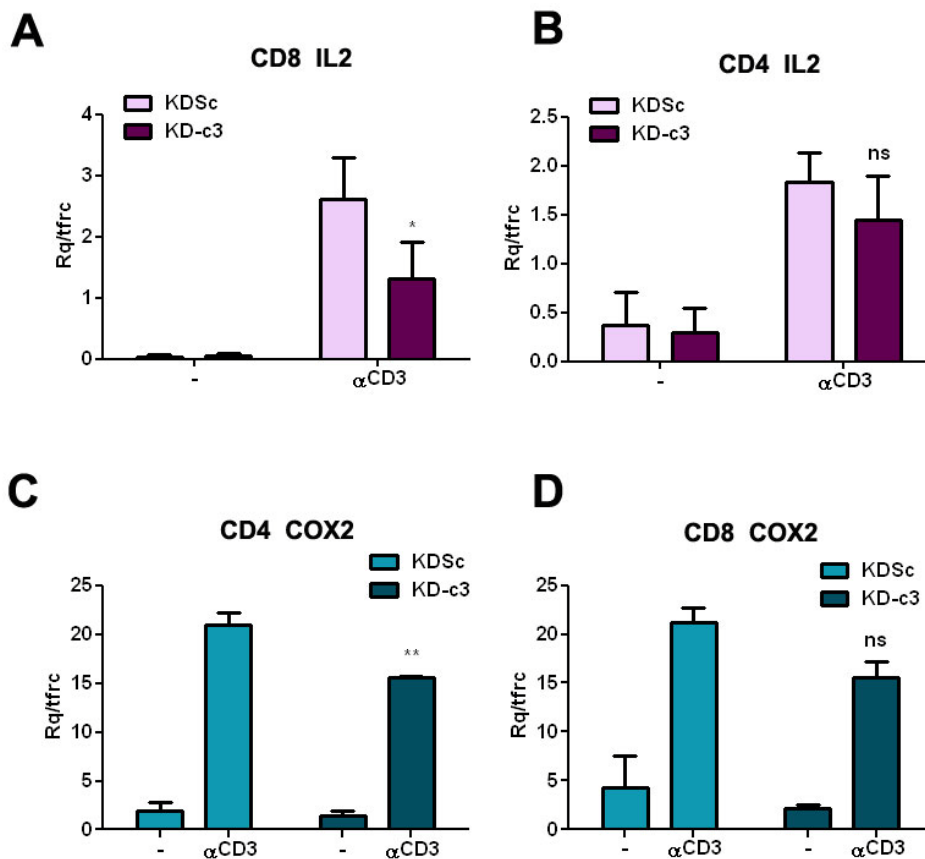


Figura 21 Expresión de IL2 y COX2 en subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ tras el silenciamiento de NFATc3. Las células CD4⁺ y CD8⁺ se aislaron a partir de blastos infectados previamente con lentivirus KDSc o KS-c3. La separación se efectuó mediante selección positiva después de una estimulación con anti-CD3 durante 2h. La expresión del mRNA de la IL2 (A y B) así como de la COX2 en (C y D) se analizó mediante PCR cuantitativa. Los datos muestran la medias \pm desviación estándar de al menos tres experimentos. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns=no significativo.

4 Función de NFATc1 y NFATc3 en los procesos de migración, proliferación y angiogénesis de HUVEC

Para estudiar si la especificidad de funciones descrita para los miembros NFAT en linfocitos tiene lugar en otros tipos celulares, decidimos llevar a cabo los experimentos de silenciamiento en cultivos primarios de células endoteliales. Nuestro grupo ha demostrado que la estimulación de células endoteliales humanas (HUVEC) con el factor proangiogénico VEGF activa la expresión de COX2 a través de la ruta CN/NFAT (Hernandez et al., 2001). COX2 es a su vez un importante modulador de la angiogénesis (Hernandez et al., 2001) proceso que requiere la activación del endotelio. Inicialmente infectamos las HUVEC con las partículas lentivirales KDS_c, KD-c1 y KD-c3, obteniendo un eficiente silenciamiento de NFATc1 y NFATc3 (Fig. 22 A-B).

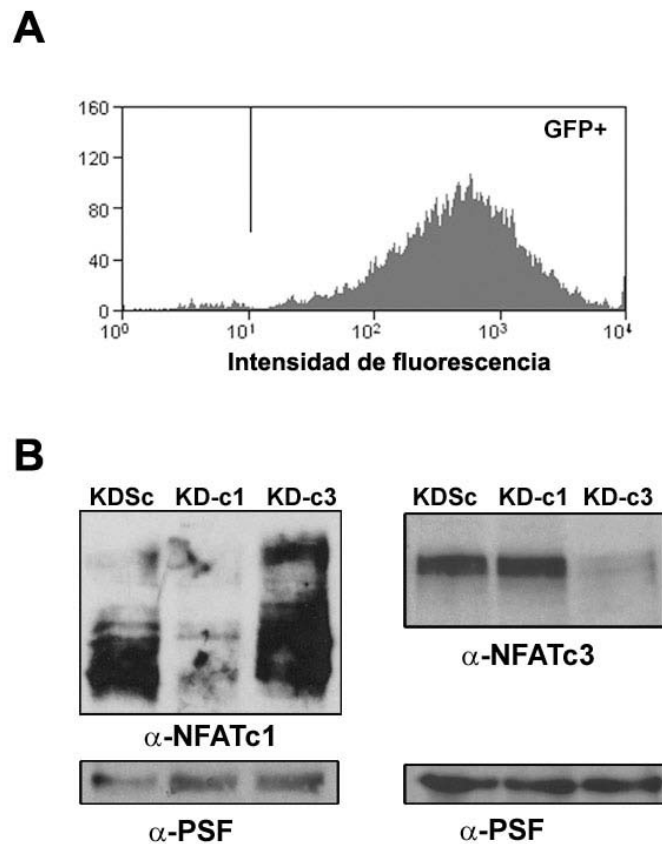


Figura 22 Silenciamiento de NFATc1 y NFATc3 en HUVEC. Las células HUVEC infectadas con los diferentes lentivirus KD (KDSc, KD-c1 o KD-c3). (A) Análisis por citometría de flujo de las células HUVEC KD. Las células infectadas se analizaron mediante citometría de flujo para calcular el porcentaje de células infectadas (GFP⁺) obteniendo una alta eficiencia de infección todas las partículas lentivirales. El gráfico muestra un resultado representativo tras la infección. (B) Análisis mediante inmunoblotting de la expresión de NFATc1 (izda) y NFATc3 (dcha) tras la infección con las partículas lentivirales KDSc, KD-c1 o KD-c3. PSF se utilizó como control de carga

El análisis de la expresión del RNA y proteína de COX2 en respuesta a estimulación con VEGF muestra que en células endoteliales NFATc3, y no NFATc1, es relevante para la regulación COX2 (Fig. 23A, B). Dado que la activación de COX2 por VEGF induce la producción de prostanoideos (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) y considerando que el KD-c3 afecta a la expresión de COX2, estudiamos si la disminución en los niveles de esta enzima provocada por KD-c3 se reflejaba también en la producción de prostaciclina. Para ello medimos la cantidad de este prostanoides liberado en el sobrenadante de células endoteliales estimuladas con VEGF. Como control de inhibición de la actividad de COX2 utilizamos el inhibidor selectivo Etoricoxib,

(Salvado et al., 2009). El ensayo enzimático (EIA) confirmó que el silenciamiento de NFATc3 reduce la producción de prostaciclina en células estimuladas con VEGF de manera similar a la que produce el Etoricoxib (Fig.23C). En estos experimentos también pudimos observar que el silenciamiento de NFATc3 afecta a la producción basal de prostaciclina. Esta disminución en los niveles basales de prostaciclina se debe probablemente a la inhibición de la actividad basal de COX2 previamente descrita (Salvado et al., 2009).

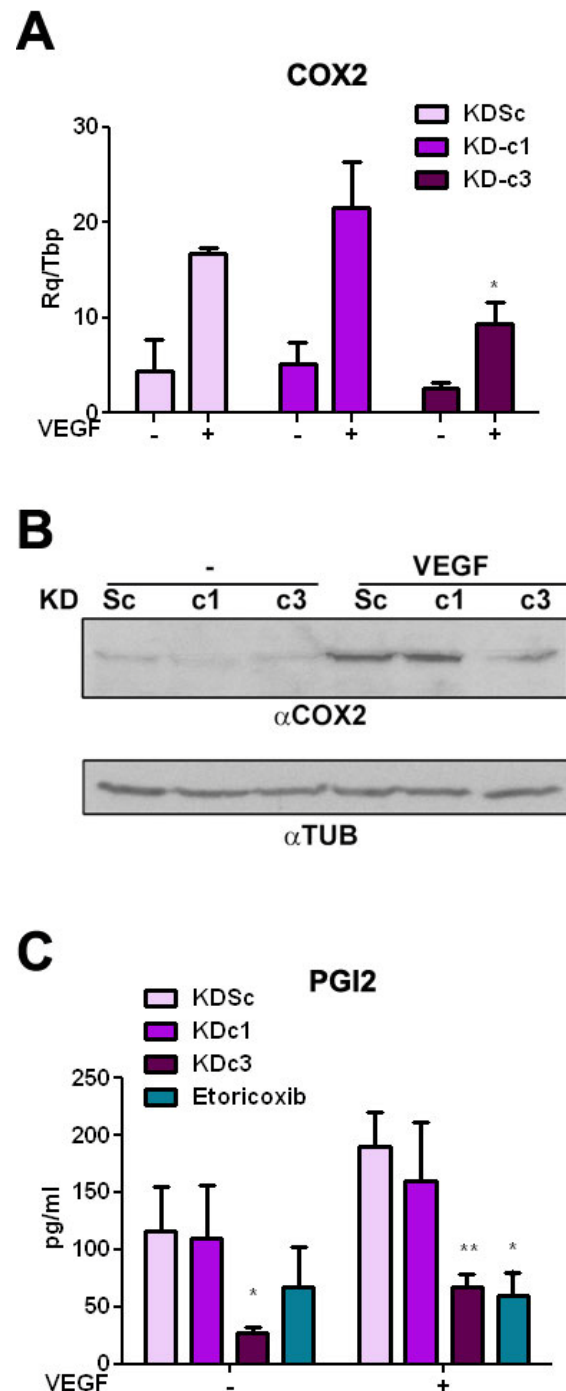


Figura 23 Expresión y actividad de COX2 en HUVEC tras el silenciamiento de NFAT. Las HUVEC infectadas con las diferentes partículas lentivirales (KDSc, KD-c1 y KD-c3) se estimularon con VEGF (50ng/ml). (A) Análisis del mRNA de COX2 en las células infectadas y estimuladas, o no, durante 2h). (B) Análisis de la expresión de proteína de COX2 tras una estimulación de 4 h. La Tubulina (TUB) se utilizó como control de carga. (C) Actividad de COX2 medida como liberación de prostaciclina en el medio de cultivos producida en el sobrenadante de HUVEC infectadas y estimuladas durante 8h. Donde se indica las HUVEC se pretrataron con Etoricoxib (10 μ M) utilizado como control positivo de inhibición. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (n=3)

COX2 y los prostanoïdes se han descrito como moléculas claves en la regulación de la angiogénesis. Este proceso requiere la activación de la proliferación y migración endotelial y la formación de tubos (Ferrara et al., 2003). Teniendo en cuenta nuestros resultados previos, decidimos analizar los efectos funcionales de la inhibición de NFATc3 en estos procesos. Para ello realizamos experimentos de reparación de herida o *wound healing* en cultivos de HUVEC KD-c3 (Fig. 24 A-C). El cierre de la herida de las células KD-c3 resultó fuertemente inhibido, sugiriendo la existencia de un defecto en la capacidad migratoria. El efecto inhibitor es superior al observado tras el pre-tratamiento con Etoricoxib (Fig. 24 D). Por el contrario constatamos que el silenciamiento de NFATc1 no tiene el mismo efecto (Fig. 25A).

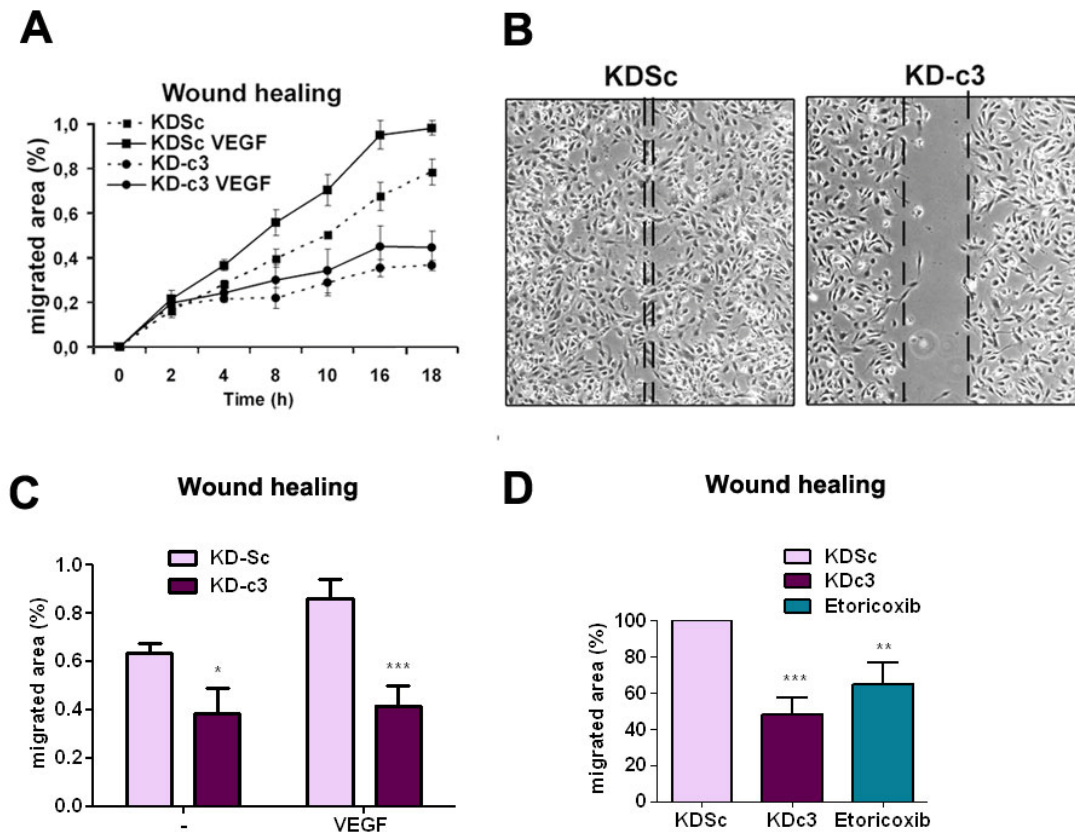


Figura 24 Efecto del silenciamiento de NFATc3 en la migración de las células endoteliales. (A) Cinética de la migración de células HUVEC KD (KDSc y KD-c3) en un experimento de cicatrización de herida inducida por VEGF (*wound healing*). El área de migración se midió a partir de imágenes captadas a diferentes tiempos. El gráfico muestra un experimento representativo de tres realizados. (B) Microfotografía de campos de visión representativos tras 14 h de estimulación. Las líneas discontinuas marcan los límites de la zona sin células. (C) Cuantificación del área de migración (proporción del área invadida por las células) a las 14 h (media \pm desviación estándar, $n = 3$). (D) Ensayo de cicatrización de la herida con células HUVEC KDSc, KD-c3 o KDSc en presencia del inhibidor de COX2, Etoricoxib. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs KDSc.

Nuestros resultados indicaban que, al menos en parte, el efecto del KD-c3 podía deberse a la inhibición de COX2. Para comprobarlo intentamos rescatar la capacidad migratoria de las células endoteliales KD-c3 mediante la sobreexpresión de COX2 exógena. Para ello, generamos un vector lentiviral que expresaba COX2 y lo utilizamos para infectar células endoteliales KD-c3. La sobreexpresión de COX2 recuperó significativamente aunque no totalmente la capacidad migratoria de las HUVEC KD-c3 en ensayos de *wound healing* (Fig.

25B). Este resultado sugiere que, si bien COX2 participa en el proceso, existen otras dianas de NFATc3 que también participan en la migración endotelial. Para identificar estos genes analizamos el impacto del silenciamiento de NFATc3 en la transcripción de otros genes implicados en la migración endotelial y la angiogénesis (Fig. 25C). Estos ensayos permitieron identificar otros genes pro-angiogénicos potencialmente regulados por NFATc3: RCAN1.4 e IL8. La inhibición de estos factores contribuiría a la generación del fenotipo defectuoso de las HUVEC KD-c3. Por lo tanto, este resultado sería consistente con la recuperación parcial de la migración tras la sobreexpresión de COX2 en células KD-c3.

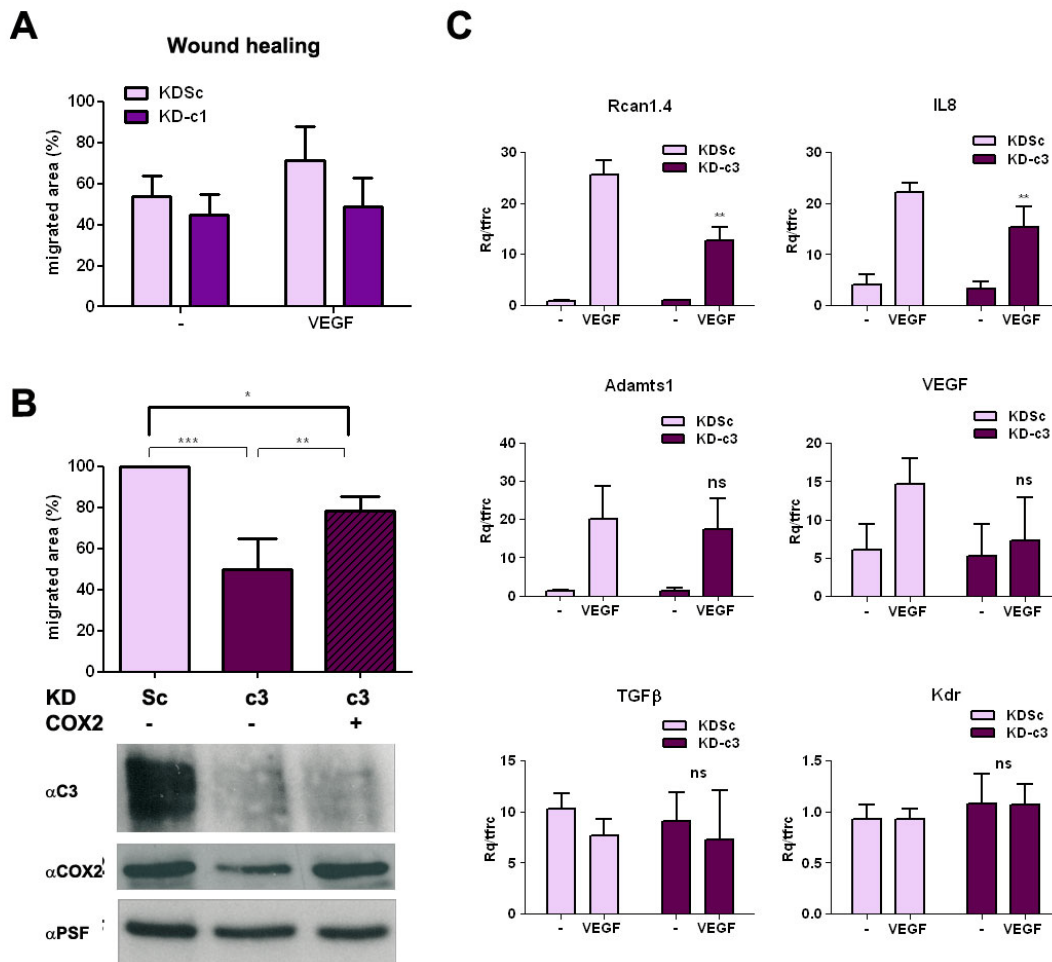


Figura 25 Búsqueda de otras dianas transcripcionales de NFATc3 implicadas en la migración endotelial. (A,B) Ensayos de *wound healing* con HUVEC KD para (A) NFATc1 o (B) NFATc3. (A) Cuantificación del área de migración (proporción del área invadida por las células; media \pm desviación estándar, $n = 3$) en presencia o en ausencia de VEGF de células HUVEC KD-c1. (B) Cuantificación del área de migración a las 14 h (media \pm desviación estándar, $n = 3$) de HUVEC KD-NFATc3 o control (KDSc) re-infectadas o no con partículas lentivirales que expresan la COX2 humana. El panel inferior muestra la expresión de NFATc3 y de COX2 a nivel de proteína. (C) Análisis mediante qPCR en células HUVEC KDc3 y KDSc del mRNA de genes implicados en la migración de las células endoteliales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs KDSc.

Los procesos de migración y proliferación endotelial también son necesarios durante el programa angiogenético. Teniendo en cuenta que el silenciamiento de NFATc3 en linfocitos T inhibe la proliferación celular (Fig. 20E), decidimos analizar la función de NFATc3 en la proliferación de las células endoteliales KD-c3 por marcaje con timidina triada. Como se muestra en la figura 26A, el

silenciamiento de de NFATc3 disminuye la proliferación de las células endoteliales activadas con VEGF.

Puesto que COX2 es una diana de NFATc3, comprobamos si la sobreexpresión de esta enzima recuperaba la proliferación de las células endoteliales KD-c3. A diferencia de lo observado en migración, los resultados indican que la expresión COX2 exógeno no rescata la capacidad proliferativa de las células endoteliales KD-c3 (Fig. 26B). Estos resultados sugieren que COX2 no participa en el proceso de proliferación y que otras dianas de NFATc3 deben participar en la proliferación de las células endoteliales activadas con VEGF.

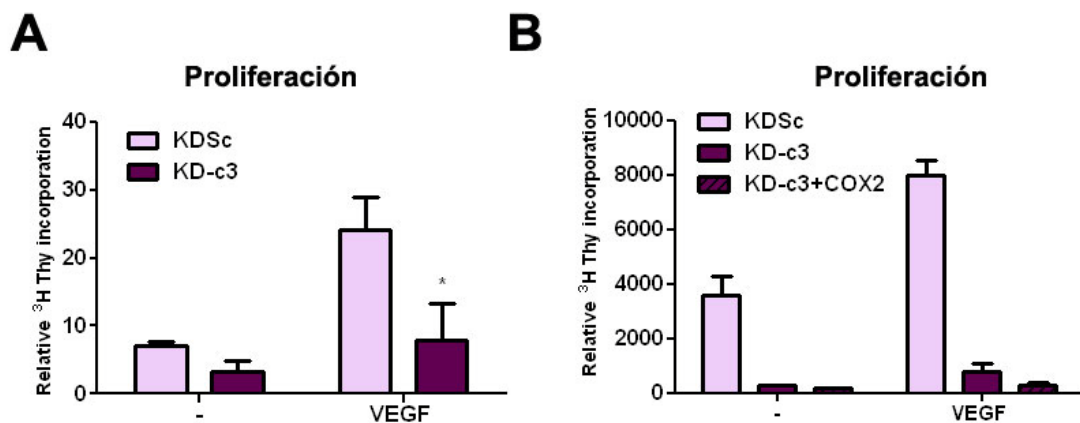


Figura 26 Proliferación de HUVEC. Las células HUVEC infectadas (KDSc y KD-c3) se incubaron con VEGF (50 ng/ml) y ³H-timidina (1μCi/ml) durante 48h. (A) Los valores de ³H-timidina incorporados se normalizaron con los valores internos (media interna) de cada experimento.. (media ± desviación estándar; n=3).. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001. (B) Las células KDSc y KD-c3 se re-infectaron con lentivirus control o de expresión de COX2 humana. Experimento representativo del efecto de la re-expresión de COX2 en células KD-c3 en experimentos de proliferación por incorporación de ³H-timidina.

Dado que la migración y la proliferación de las células endoteliales KD-c3 resultaban severamente afectadas, decidimos estudiar su impacto en ensayos de angiogénesis in vivo. El modelo empleado fue el de matrigel subcutáneo en animales inmunodeficientes (*nude*), implantando células endoteliales humanas (KDSc y KD-c3) embebidas en matrigel en presencia de VEGF. Los resultados mostraron que el silenciamiento de NFATc3 reduce tanto el contenido de

hemoglobina como el número de vasos sanguíneos presente en el matrigel (Fig. 27A, B). Para identificar la procedencia de las células endoteliales (humanas o murinas), las preparaciones histológicas se incubaron con anticuerpos anti-GFP con el objeto de identificar las células implantadas (GFP⁺). Los resultados confirmaron que las estructuras tubulares identificadas en el matrigel se formaron a partir de las células humanas implantadas (Fig. 27C, D). Para completar este estudio, parte de los matriges extraídos se utilizaron para visualizar, mediante la técnica de *whole mount*, la vascularización en el matrigel en tres dimensiones. La tinción con el anticuerpo anti-GFP mostró como las células KDSc son capaces de formar pequeñas estructuras tubulares, mientras que las células KD-c3 permanecen aisladas (Video, anexo II). Todos estos resultados indican que NFATc3 juega un papel esencial en angiogénesis in vivo.

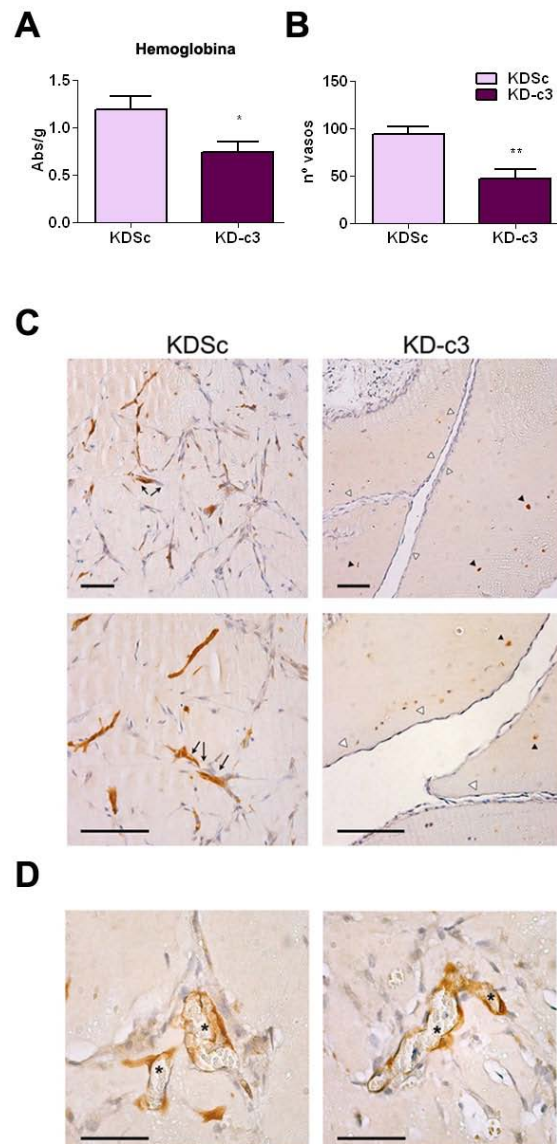


Figura 27 Efecto del silenciamiento de NFATc3 en el proceso de angiogénesis in vivo. Las células HUVEC KDSc ó KD-c3 ($2,5 \times 10^5$ células/animal) embebidas en matrigel con VEGF (500 ng / ml) se implantaron en ratones atímicos y 10 días más tarde se extrajeron los implantes para su análisis. (A) La hemoglobina se midió por espectrofotometría a 605 nm. La gráfica muestra los valores obtenidos (media + SD) de tres experimentos independientes. (B) Los implantes de matrigel extraídos de los animales se incluyeron en parafina para cortar y realizar tinciones que permitieron contar el número de vasos por área. El gráfico muestra el número de vasos contados en los cortes teñidos con hematoxilina/eosina (media \pm SD, n = 3). (C) Microfotografías de secciones de parafina de matrigel que contienen células HUVEC KDSc o KD-c3 teñidas con anticuerpos anti-GFP. (Izda) Imágenes de las estructuras tubulares formadas por las células HUVEC KDSc (flechas). (Dcha) Imagen de las células HUVEC KD-c3, incapaces de formar las estructuras tubulares (puntas de flecha); las estructuras tubulares observadas en estas muestras están formadas principalmente de células GFP-negativas procedentes del animal huésped (puntas de flecha blanca). Escala=100 μ m. (D) Detalle de los vasos formados por el endotelio (izquierda) con un lumen evidente que en su interior contiene células de la sangre (asteriscos). Escala= 50 micras. * p <0,05 y p ** <0,01 vs KDSc en todos los casos.

Discusión

En este trabajo demostramos, mediante el uso de RNA de interferencia, que los miembros NFATc1 y NFATc3 desempeñan papeles reguladores diferentes e independientes sobre varios de sus genes dianas que hemos analizado. De hecho hemos podido observar que pueden regular de manera diferente un mismo gen, como en el caso de la IL2, o de manera selectiva y específica, como en el caso del gen COX2. Además, este tipo de regulación sucede en distintos tipos celulares (células T o endoteliales) y en respuesta a diferentes estímulos (como anti-CD3 o VEGF, entre otros).

Knock out versus Knock down

A pesar del esfuerzo realizado por numerosos grupos de investigación en la generación de ratones deficientes (KO) para cada uno de los miembros de la familia NFAT, los resultados obtenidos no han permitido definir, de manera concluyente, las funciones específicas de cada uno de ellos. En general no se ha elucidado si algunas de las funciones asociadas a los distintos miembros se deben a funciones específicas propias del miembro analizado o a su expresión regulada de una forma espacio-temporal propia (como, por ejemplo, en el caso de la osteoclastogénesis). Una posible explicación a estos resultados es que, dado que los miembros NFAT son proteínas con alta homología en el DBD y en el NHR, cuando se suprime completamente uno de ellos se desencadena un sistema de compensación que durante el desarrollo embrionario, o en el adulto, se reorganiza e intenta recuperar las funciones perdidas. En algunos casos esta compensación, por diferentes motivos, no ocurre o no es suficiente, como en el caso de NFATc1, cuya deficiencia tiene efectos letales (de la Pompa et al., 1998; Ranger et al., 1998a). Cuando se suprime más de un miembro NFAT la situación es más compleja, provocando defectos mucho más drásticos (Peng et al., 2001; Rengarajan et al., 2002). La delección de dos miembros NFAT a la vez debe provocar una situación anómala y complicada que probablemente no refleje las funciones reales de los miembros NFAT delecionados.

Durante los últimos años se han desarrollado sistemas que permiten delecionar un gen en un determinado tejido u órgano, sin afectar su expresión en el resto del organismo. Estos sistemas se han combinado además con promotores inducibles que permiten eliminar el gen tras la administración externa de determinados compuestos o fármacos. Gracias a estos métodos es posible abolir la expresión de un gen en un determinado tipo celular o tejido y en un momento adecuado para su estudio. El sistema más conocido es el basado en la recombinasa Cre expresada bajo un promotor específico de tejido e inducible. Durante este trabajo hemos utilizado células de un ratón transgénico en el que la recombinasa Cre se expresa bajo un promotor (Mx) ubicuo e inducible mediante la administración de poly [I:C] que permite delecionar el gen de NFATc1 y analizar su efecto tras una semana después del tratamiento. De este modo se evita un posible efecto de compensación por parte del resto de miembros de la familia NFAT que se siguen expresando en las células carentes de NFATc1. Creemos que sería extremadamente interesante realizar experimentos con modelos murino donde la expresión de NFATc1 sea inducible y limitada a linfocitos T CD4⁺. Este abordaje podría contribuir a profundizar el estudio de las funciones de este miembro y sus isoformas en modelos experimentales *in vivo*.

Como alternativa a la generación de ratones KO, decidimos utilizar el método de silenciamiento mediante la expresión de RNA de interferencia (iRNA), técnica empleada para estudiar los efectos de la pérdida de función de genes específicos. Esta técnica (también conocida como *Knock Down*) presenta varias ventajas frente a la eliminación del gen (*Knock Out*). En primer lugar no suprime totalmente la expresión de la proteína en estudio, situación que en muchos casos evita efectos deletéreos, como la muerte celular, u otros posibles efectos indirectos asociados a la ausencia completa de expresión de un gen. Otra ventaja es que permite estudiar el efecto de la inhibición temprana de la expresión de la proteína diana; el silenciamiento tiene lugar varias horas tras la expresión del iRNA y permite analizar su efecto en el momento en que se produce, evitando, en estos tiempos tempranos, los eventuales mecanismos de compensación.

Regulación del gen de la IL2 por NFATc1

Nuestro abordaje experimental nos ha permitido observar que el silenciamiento de todas las isoformas de NFATc1 inhibe algunas funciones represoras provocando el aumento de la expresión de citoquinas y quimioquinas, entre ellas IL2 (Tabla 4). Sin embargo, en los estudios previos con ratones deficientes en NFATc1 no se detectó ningún aumento en la expresión de esta citoquina. Considerando que las isoformas α se inducen tras la activación de la célula T, pensamos que éstas pudieran funcionar como moduladores negativos de la respuesta inmune, limitando la activación. Según esta hipótesis, el aumento de la concentración de proteínas NFATc1 α en el núcleo podría provocar un desplazamiento de otro factor transactivador, ocupando así su sitio de unión a DNA y reprimiendo la transcripción de la IL2. El hipotético factor transactivador podría ser otro miembro NFAT o bien NFkB, dada la homología de la estructura terciaria de los dominios de unión a DNA de ambas proteínas (Wolfe et al., 1997; Zhou et al., 1998).

Considerando nuestra hipótesis decidimos realizar los ensayos *in vitro* (EMSA) con la intención de identificar qué factores de transcripción estaban interaccionando con el promotor de la IL2 tras 2h-4h de estimulación. Primero utilizamos una sonda correspondiente al sitio *kB like* CD28RE para investigar una posible ocupación alternativa de este sitio. En estudios anteriores se había observado que tras 2 horas de estimulación con PMA+I ω el elemento CD28RE puede interaccionar con NFATc2, cRel (Gonzalez et al., 2001), RelB, p65/p50, AP1 (Rooney et al., 1995) y, tras estimulación con PHA +PMA + anti-CD28, también con p50/RelA (Maggirwar et al., 1997). Además, en células tratadas durante 4 horas, CD28RE interacciona junB y fos (PMA+I ω) (Gonzalez et al., 2001) y con cRel/cRel pero no con NFATc2 (PHA +PMA + anti-CD28) (Maggirwar et al., 1997). En nuestros ensayos no observamos ningún cambio en la ocupación del sitio CD28RE, al menos a los tiempos de estimulación estudiados. Posteriormente analizamos la secuencia ARRE II, que es un sitio compuesto NFAT/AP1. Esta última se empleó porque se ha demostrado que también es diana del complejo NFAT/FoxP3 (Wu et al., 2006b) y que la

sobreexpresión de FoxP3 en JK causa la inhibición de IL2 (Bettelli et al., 2005). En este caso, quisimos comprobar si NFATc1 α , interaccionando con FoxP3 pudiera generar un complejo represor (NFATc1 α +FoxP3) capaz de desplazar al complejo activador NFATc2-c3+AP1. En estos ensayos tampoco obtuvimos evidencias de una prevalencia de NFATc1 respecto a NFATc2 o NFATc3 en la ocupación del sitio ARRE II tras 2h-4h de estimulación. Por lo tanto, este trabajo experimental no nos ha permitido dilucidar el mecanismo por el cual NFATc1 inhibe la expresión transcripcional de la IL2.

Durante la ejecución de estos experimentos aparecieron resultados publicados por el grupo del Dr. Serfling que podrían explicar el efecto represor de NFATc1. En estudios previos habían caracterizado las 6 isoformas producidas por el gen NFATc1, a partir de dos promotores (P1 y P2). Los tres grupos de isoformas (A, B y C) utilizan dos sitios de poliadenilación (pA1 y pA2) alternativos que determinan la secuencia del C-term de las 6 proteínas. Las isoformas A utilizan el sitio pA1 y son más cortas con un C-ter de 19aa; las isoformas B y C utilizan el pA2 y se traducen en proteínas más largas ya que contienen en su C-ter 128 y 246 aminoácidos, respectivamente. Recientemente este grupo de investigación demostró que las isoformas largas NFATc1/C contienen sitios de sumoilación en su C-term que provoca su localización en los pml (*Promyelocytic leukemia nuclear bodies*) donde reclutan histonas deacetilasas e inhiben la actividad del promotor de la IL2. Asimismo, en este trabajo se demuestra que la sobreexpresión de NFATc1 α A provoca un aumento de la producción de IL2 (Nayak et al., 2009; Serfling et al., 2006a). En su conjunto estos datos podrían justificar el efecto supresor de NFATc1 que mostramos en nuestros resultados.

NFATc3 juega un papel en la activación de linfocitos T

Un aspecto de nuestro trabajo que consideramos de potencial interés y novedad es el relacionado con el papel de NFATc3 en la activación de linfocitos T. Aunque considerado clave en el desarrollo de los timocitos, NFATc3 no se había implicado en la activación de linfocitos T maduros. Nuestros datos

sugieren que este miembro es un importante regulador de la expresión de IL2 y COX2, ambos implicados en el programa de activación linfocitaria. Los experimentos de luciferasa y de CHIP demuestran que NFATc3 regula IL2 y COX2 e interacciona física y funcionalmente con sus promotores. Además, en el caso de IL2, los datos indican que NFATc3 regula la expresión temprana de la proteína (Fig. 12C). En fases posteriores o tardías es probable que otros factores compensen la ausencia de NFATc3 permitiendo restablecer los niveles normales de IL2, así como creemos que sucede en el caso de los ratones KO.

La importancia de NFATc3 en la activación de linfocitos es aún más patente si se considera que es necesario para la proliferación de linfocitos. Por otro lado se ha de destacar que su silenciamiento reduce la expresión de las formas inducibles de NFATc1. Esta inhibición no parece deberse a un efecto inespecífico del shRNA ya que en los otros tipos celulares silenciados (HUVEC y Jurkat) la inhibición de NFATc3 no afecta a los niveles de NFATc1. Por el contrario estos datos sugieren que, en células T primarias, NFATc3, al igual que se ha descrito para NFATc2 (Zhou et al., 2002), participa en la regulación del promotor de NFATc1.

Regulación de COX2 por NFATc3

El silenciamiento de NFATc1 no afecta la expresión de COX2. Tanto en linfocitos como en células endoteliales, NFATc1 parece no participar en su regulación o, al menos, su expresión no es imprescindible. No obstante, en el ensayo de CHIP también detectamos unión de NFATc1 al promotor de COX2. Teniendo en cuenta los datos del estudio de la actividad del promotor (actividad luciferasa) así como de los niveles de mRNA endógeno (PCR cuantitativa), la interacción observada en el CHIP no sería funcional. Este tipo de unión aparentemente no funcional ya se ha observado en otros promotores (Hollenhorst et al., 2007; Li and Johnston, 2001; Li et al., 2008; Martone et al., 2003).

El papel desempeñado por NFATc3 en la regulación de COX2 también tiene lugar en células endoteliales donde su silenciamiento afecta a la producción de prostanoïdes mediada por las COXs. El efecto del *Knock Down* de NFATc3 es comparable al observado tras el tratamiento con el inhibidor específico de la COX2, Etoricoxib. Estos datos sugieren que la disminución en la producción de prostaciclina se debe principalmente a la inhibición de la expresión de COX2 dependiente de NFATc3.

NFATc3 en migración endotelial y angiogénesis

La COX2 y los prostanoïdes son mediadores importantes de la migración y la angiogénesis y, sin duda, gran parte del efecto que hemos observado en nuestros ensayos tras el silenciamiento de NFATc3 estaría justificado por la inhibición de la expresión de COX2 y de los niveles de prostanoïdes. No obstante, el efecto en la migración no se revierte totalmente con la sobreexpresión de COX2. Esto es probablemente debido a la ausencia de la expresión de otros genes regulados por NFATc3, entre los cuales se encontrarían IL8 y RCAN1.4, que también participan en la migración de las células endoteliales. En el caso de IL8, su papel está bastante definido como promotor de la migración y angiogénesis. Por el contrario, los resultados sobre el papel de RCAN1 son controvertidos. Se ha descrito que en ratones deficientes para RCAN1 (RCAN1^{-/-}) hay una disminución de la migración de las células endoteliales (Holmes et al., 2010; Ryeom et al., 2008). Sin embargo otros grupos postulan un papel opuesto, atribuyéndole una función anti-angiogénica por ser un inhibidor de CN (Minami et al., 2004). A la vista de nuestros resultados preliminares, no podemos descartar que RCAN1.4 pueda funcionar como factor pro-angiogénico junto con COX2 e IL8.

La ruta CN/NFAT también regula la expresión de otras moléculas que participan en el proceso de migración como las integrinas. De hecho CN favorece la interacción de $\alpha 5\beta 1$ con fibronectina (Pomies, P, 1995, 34) y, probablemente a través de RCAN1.4, también regula la función de la integrina $\alpha v\beta 3$ (Iizuka et al.,

2004). En particular NFAT controla la actividad del promotor de la $\alpha 6\beta 4$ (Jauliac et al., 2002) y la expresión de la autotaxina, una enzima con actividad fosfodiesterasa y lisofosfolipasa cuyo producto final, el ácido lisofosfatídico (LPA), es un importante regulador de movilidad y supervivencia celular (Muller and Rao, 2010). Por lo tanto sería interesante profundizar en los mecanismos que vinculan NFATc3 a los procesos de migración y angiogénesis estudiando más en detalle el fenotipo de las células modificadas y silenciadas (KD-c3) frente a las células control.

A la vista de nuestros resultados, considerando posibles procesos de compensación y que los ratones KO de NFATc3 no presentan ningún fenotipo defectuoso en angiogénesis, sería de gran interés estudiar el efecto de un KO inducible de NFATc3 en células endoteliales, con el fin de realizar ensayos de angiogénesis *in vivo*.

NFATc3 en proliferación

Al igual que en linfocitos, NFATc3 también es necesario para la proliferación de las HUVEC inducida por VEGF. La inhibición de la proliferación mediada por el silenciamiento de NFATc3 no se revierte con la expresión exógena de COX2, indicando que otras dianas de NFATc3 deben participar en este proceso. El papel de la ruta CN/NFAT en proliferación se ha investigado principalmente con el fin de determinar su relevancia en el desarrollo del cáncer. De hecho algunos estudios han puesto de manifiesto el papel de los miembros NFATc1 y NFATc2 como activador y represor del ciclo celular, respectivamente, en células tumorales (Robbs et al., 2008).

Sin embargo no existe mucha información sobre el papel de NFATc3 en proliferación y los únicos datos se remiten a los estudios en ratones KO donde NFATc3 parece comportarse como protector de apoptosis durante el desarrollo de los timocitos. Se ha observado que en el timo, las células DP (*double positive*) de ratones NFATc3 KO son más propensas a apoptosis que las células DP de ratones control. Este efecto se relacionó con el aumento de la expresión del

ligando de Fas en los timocitos NFATc3 KO (Oukka et al., 1998). Estos resultados llegaron a proponer a NFATc3 como regulador negativo del ligando de Fas y, como consecuencia, un factor protector de apoptosis en timocitos DP. Por el contrario, nosotros hemos observado una disminución de la expresión del mRNA del ligando de Fas tras el silenciamiento de NFATc3 células JK (Tabla 4). Ello sugiere que este miembro podría comportarse como un regulador positivo de la transcripción de este gen. No obstante, no disponemos de datos suficientes para afirmar que NFATc3 sea el responsable directo y/o único de la regulación del ligando de Fas y de la ruta de apoptosis.

Trabajos previos realizados con ratones doble KO para NFATc2 y NFATc3 han mostrado que en ausencia de estos dos miembros se produce un notable aumento de la proliferación de células T, tanto CD4⁺ naïve así como de las subpoblaciones T_h1 y T_h2 (Rengarajan et al., 2002). Nuestros resultados, sin embargo, indican que NFATc3 es un regulador positivo de la proliferación celular tanto en células T activadas vía TCR, como en células HUVEC, tratadas con VEGF. Estos resultados sirven de ejemplo para constatar las diferencias que se obtienen en estudios de pérdida de función inherente al uso de ratones KO respecto al silenciamiento via iRNA. No obstante, queda aún por definir los mecanismos por los que NFATc3 estaría regulando la proliferación en ambos tipos celulares. En el futuro sería interesante analizar el efecto del silenciamiento del NFATc3 sobre el ciclo celular y sobre la expresión de elementos implicados en su regulación como las ciclinas y CDKs. Asimismo sería importante clarificar el papel de NFATc3 en la regulación del ligando de Fas.

NFATs: Posibles mecanismos de regulación selectiva

En este trabajo demostramos que los diferentes miembros de la familia NFAT pueden desempeñar diferentes funciones y regular selectivamente genes diana. Sin embargo, queda por definir qué mecanismos determinan las diferencias funcionales de los distintos miembros NFAT.

Una de las causas podría ser la afinidad por CN de cada uno de los miembros. NFAT interacciona con CN a través de dos puntos de anclaje, las secuencias PxlxIT y LxVP. Nuestro grupo demostró que la unión de CN al LxVP de NFATc2 es mucho más débil que la interacción con el resto de secuencias LxVP (Martinez-Martinez et al., 2006). Esta menor capacidad de interacción con CN podría regular la traslocación selectiva de un determinado NFAT al núcleo, que la concentración de Ca^{2+} intracelular alcanzadas sean diferentes dependiendo de la estimulación y, por lo tanto, permitan la translocación selectiva de determinados miembros de NFAT al núcleo.

Asimismo, la interacción selectiva con las proteínas Homers con los NFAT también podría afectar a la concentración relativa de los miembros en el núcleo. En concreto, Homer 1 interacciona preferentemente con NFATc4, y Homer 2 y 3 con NFATc1 y c2 (Huang et al., 2008). Como ya se ha comentado, la interacción de estas proteínas con el dominio NHR de NFAT impide la interacción con CN y, como consecuencia, su translocación al núcleo.

La localización citosólica y nuclear de NFAT también se ve afectada por la actividad de las quinasas que provocan su re-fosforilación y translocación al citosol o que lo retienen en el citosol en estado hiper-fosforilado. Algunas de estas quinasas de hecho tienen diferente afinidad por los miembros de NFAT, como es el caso de GSK3 β que tiene mayor afinidad por los miembros NFATc2 y NFATc1 (Muller and Rao, 2010).

Otro factor a tener en cuenta es la interacción con el DNA. Aunque la secuencia central del sitio de unión es común a toda la familia (GGAAAA), existen diferencias en la afinidad de cada NFAT por los sitios de unión a DNA descritos. Un ejemplo es la secuencia ARRE II del promotor de la IL2. Se ha demostrado que en presencia del cooperador AP1 todos los miembros NFAT interaccionan de manera indistinguible con esta secuencia diana; sin embargo, en ausencia de AP1 la afinidad de cada miembro por el sitio ARREII es diferente (NFATc2 > NFATc1 > NFATc3) (Rao et al., 1997). Otro ejemplo es el promotor de la IL4, en el que se ha descrito que el orden de afinidad de unión es NFATc2 > NFATc3 > NFATc1 (Rao et al., 1997).

Además de la capacidad de unión intrínseca de cada miembro con los sitios de unión al DNA, otro parámetro quizás importante es la afinidad por los factores con los que cooperan para regular la actividad transcripcional. En la mayoría de los casos NFAT necesita la colaboración de otros factores para formar complejos estables y funcionales transcripcionalmente. La afinidad relativa de cada miembro por el factor de transcripción cooperador daría preferencia a la unión de un miembro u otro con el promotor.

A estas diferencias en afinidad podrían contribuir los TADs, secuencias muy poco conservadas entre los miembros de la familia NFAT. De hecho un estudio reciente ha demostrado que, en linfocitos T, el promotor de TNF α se regulaba vía NFATc2, y no vía NFATc1, a través del dominio transactivador TAD2 de NFATc2 (Kaminuma et al., 2008). Los TADs pueden contribuir a tal especificidad porque pueden contener tanto secuencias diana de modificaciones post-traduccionales (como la sumoilación) así como sitios de unión a los diferentes factores cooperadores de NFAT. Ejemplos de estos tipos de regulación se producen con las isoformas NFATc1C, cuyo extremo C-term (TAD-B) se sumoila. Esta modificación le convierte en un represor de IL2 (Nayak et al., 2009). Además de la sumoilación, existen otras modificaciones y otros factores que podrían contribuir a las diferencias funcionales observadas. En relación con el caso en que las diferencias entre los NFAT puedan depender de los factores cooperadores, recientemente se ha demostrado que en mastocitos NFATc2, y no NFATc1, interacciona con el promotor de la IL13. Puesto que el factor GATA coopera con NFAT en la regulación de este promotor, los autores plantearon que la unión del NFATc2 a GATA es más estable que la correspondiente NFATc1-GATA. Aunque in vitro no consiguieron detectar ninguna interacción preferencial de los dos miembros con el factor GATA, los autores propusieron que algún otro factor, perteneciente al entorno molecular propio de mastocitos, podría ser el responsable de la mayor estabilidad del complejo NFATc2-GATA respecto al NFATc1-GATA (Monticelli et al., 2004). Es muy posible que existan numerosos ejemplos adicionales de estas interacciones específicas con factores que aún no se han caracterizado o identificado.

Perspectivas futuras: Inhibidores selectivos para cada miembro NFAT

Existen muchas diferencias entre las secuencias de los miembros NFAT que podrían contribuir a la especificidad funcional de cada uno. La participación selectiva y diferencial en procesos biológicos como la inflamación y la angiogénesis hacen de esta área de investigación una posible fuente de diseño y búsqueda de fármacos con capacidad anti-inflamatoria y anti-angiogénica. Los fármacos Ciclosporina A (CsA) y FK506, inhibidores de CN, se utilizan para el tratamiento post-transplante y también podrían ser buenos candidatos para el tratamiento de otras patologías como las enfermedades autoinmunes o el cáncer. Sin embargo el tratamiento con estos fármacos provoca graves efectos secundarios, destacando la nefrotoxicidad, neurotoxicidad y la alteración del metabolismo lipídico (Kaminuma, 2008; Kiani et al., 2000).

El conocimiento de las bases moleculares que definen el comportamiento diferencial entre los miembros NFAT permitirían el diseño y la búsqueda de nuevos fármacos selectivos para cada miembro, permitiendo así inhibir o bloquear la actividad de un miembro sin afectar ni al resto de los NFAT ni a otras dianas de CN. Si además el fármaco no requiriera de la interacción con otras proteínas celulares para ejercer su efecto (algo que sí ocurre en el caso de CsA y FK506 y que podría contribuir a los efectos secundarios), disminuiría el estrés celular asociado al tratamiento. El diseño racional de fármacos dirigidos específicamente a una diana NFAT apropiada se presenta como un futuro prometedor para el tratamiento de patologías donde la activación del sistema inmune y la angiogénesis juegan un papel importante, como son las enfermedades autoinmunes y el cáncer.

Conclusiones

La conclusión principal de esta tesis es que los miembros NFAT pueden ejercer funciones específicas que dependen probablemente de características propias de cada miembro. De este modo cada uno de ellos puede ser responsable de la regulación, negativa o positiva, de un selecto grupo de genes o un determinado proceso fisiológico.

Nuestro trabajo también reseña que la metodología de los ratones KO no siempre es la más adecuada para estudiar la función de un gen, sobretodo si pertenece a una familia cuyos miembros se coexpresan espacio-temporalmente. Esta conclusión no pretende minimizar los estudios con ratones KO, sino remarcar la importancia de los procesos de compensación que se pueden producir en ratones deficientes.

Estas conclusiones se apoyan en los siguientes resultados:

- NFATc1 ejerce un papel de regulador negativo de la transcripción de IL2 y varias citoquinas y quimioquinas necesarias durante la activación de los linfocitos T (como IL3, CCL3, CSF2).
- NFATc3 es un factor clave en la regulación de la expresión de los genes RCAN1.4, IL2 y COX2 y participa en la proliferación de las células T. Al contrario que NFATc1, NFATc3 ejerce una función activadora interaccionando directamente con los promotores de IL2 y COX2.
- NFATc3 es un factor esencial para la angiogénesis. En endotelio, la expresión de NFATc3 es necesaria para la inducción de COX2 y la consiguiente producción de prostanoïdes. NFATc3 participa en el proceso de proliferación endotelial y regula la expresión de RCAN1.4 e IL8, moléculas que, junto con COX2, están implicadas en la activación de la migración de las células endoteliales. Por ello, NFATc3 puede ser una diana terapéutica para el diseño y desarrollo de fármacos que interfieran con la angiogénesis patológica.

Bibliografía

Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Alfranca, A., Iniguez, M.A., Fresno, M., and Redondo, J.M. (2006). Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 70, 446-456.

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

Aramburu, J., Rao, A., and Klee, C.B. (2000). Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul* 36, 237-295.

Bachmann, M.F., and Kopf, M. (2002). Balancing protective immunity and immunopathology. *Curr Opin Immunol* 14, 413-419.

Baek, K.H., Zaslavsky, A., Lynch, R.C., Britt, C., Okada, Y., Siarey, R.J., Lensch, M.W., Park, I.H., Yoon, S.S., Minami, T., et al. (2009). Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 459, 1126-1130.

Baksh, S., Widlund, H.R., Frazer-Abel, A.A., Du, J., Fosmire, S., Fisher, D.E., DeCaprio, J.A., Modiano, J.F., and Burakoff, S.J. (2002). NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* 10, 1071-1081.

Bambai, B., Rogge, C.E., Stec, B., and Kulmacz, R.J. (2004). Role of Asn-382 and Thr-383 in activation and inactivation of human prostaglandin H synthase cyclooxygenase catalysis. *J Biol Chem* 279, 4084-4092.

Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., and Crabtree, G.R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930-1934.

Bettelli, E., Dastrange, M., and Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5138-5143.

Bourajjaj, M., Armand, A.S., da Costa Martins, P.A., Weijts, B., van der Nagel, R., Heeneman, S., Wehrens, X.H., and De Windt, L.J. (2008). NFATc2 is a necessary mediator of calcineurin-dependent cardiac hypertrophy and heart failure. *J Biol Chem* 283, 22295-22303.

Buchholz, M., Schatz, A., Wagner, M., Michl, P., Linhart, T., Adler, G., Gress, T.M., and 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.

Bueno, O.F., Wilkins, B.J., Tymitz, K.M., Glascock, B.J., Kimball, T.F., Lorenz, J.N., and Molkentin, J.D. (2002). Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4586-4591.

Canellada, A., Ramirez, B.G., Minami, T., Redondo, J.M., and Cano, E. (2008). Calcium/calcineurin signaling in primary cortical astrocyte cultures: Rcan1-4 and cyclooxygenase-2 as NFAT target genes. *Glia* 56, 709-722.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.

Carvalho, L.D., Teixeira, L.K., Carrossini, N., Caldeira, A.T., Ansel, K.M., Rao, A., and Viola, J.P. (2007). The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. *Cell Cycle* 6, 1789-1795.

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

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

Dave, V., Childs, T., Xu, Y., Ikegami, M., Besnard, V., Maeda, Y., Wert, S.E., Neilson, J.R., Crabtree, G.R., and Whitsett, J.A. (2006). Calcineurin/Nfat signaling is required for perinatal lung maturation and function. *J Clin Invest* 116, 2597-2609.

de la Pompa, J.L., Timmerman, L.A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A.J., Samper, E., Potter, J., Wakeham, A., Marengere, L., Langille, B.L., et al. (1998). Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392, 182-186.

Decker, E.L., Nehmann, N., Kampen, E., Eibel, H., Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2003). Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res* 31, 911-921.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med* 57, 1-18.

Fraser, J.D. (1989). High-affinity binding of staphylococcal enterotoxins A and B to HLA-DR. *Nature* 339, 221-223.

Fuentes, J.J., Pritchard, M.A., and Estivill, X. (1997). Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics* 44, 358-361.

Giffin, M.J., Stroud, J.C., Bates, D.L., von Koenig, K.D., Hardin, J., and Chen, L. (2003). Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nat Struct Biol* 10, 800-806.

Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18, 2046-2059.

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.

Gonzalez, E., Punzon, C., Gonzalez, M., and Fresno, M. (2001). HIV-1 Tat inhibits IL-2 gene transcription through qualitative and quantitative alterations of the cooperative Rel/AP1 complex bound to the CD28RE/AP1 composite element of the IL-2 promoter. *J Immunol* 166, 4560-4569.

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

Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Okamura, H., Bolton, D., Feske, S., Hogan, P.G., et al. (2006). A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441, 646-650.

Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 789-829.

Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.

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

Hodge, M.R., Ranger, A.M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M.J., and Glimcher, L.H. (1996). Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4, 397-405.

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

Holmes, K., Chapman, E., See, V., and Cross, M.J. (2010). VEGF stimulates RCAN1.4 expression in endothelial cells via a pathway requiring Ca²⁺/calcineurin and protein kinase C-delta. *PLoS One* 5, e11435.

Hollenhorst, P.C., Shah, A.A., Hopkins, C., and Graves, B.J. (2007). Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev* 21, 1882-1894.

Hoyer, K.K., Doms, H., Barron, L., and Abbas, A.K. (2008). Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* 226, 19-28.

Huang, G.N., Huso, D.L., Bouyain, S., Tu, J., McCorkell, K.A., May, M.J., Zhu, Y., Lutz, M., Collins, S., Dehoff, M., et al. (2008). NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins. *Science* 319, 476-481.

Huxford, T., Huang, D.B., Malek, S., and Ghosh, G. (1998). The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell* 95, 759-770.

Iizuka, M., Abe, M., Shiiba, K., Sasaki, I., and Sato, Y. (2004). Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *J Vasc Res* 41, 334-344.

Imamura, R., Masuda, E.S., Naito, Y., Imai, S., Fujino, T., Takano, T., Arai, K., and Arai, N. (1998). Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *J Immunol* 161, 3455-3463.

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

Iniguez, M.A., Punzon, C., and Fresno, M. (1999). Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Immunol* 163, 111-119.

Jacobs, M.D., and Harrison, S.C. (1998). Structure of an I κ B α /NF- κ B complex. *Cell* 95, 749-758.

Jang, H., Cho, E.J., and Youn, H.D. (2007). A new calcineurin inhibition domain in Cabin1. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 129-135.

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

Jin, L., Sliz, P., Chen, L., Macian, F., Rao, A., Hogan, P.G., and Harrison, S.C. (2003). An asymmetric NFAT1 dimer on a pseudo-palindromic kappa B-like DNA site. *Nat Struct Biol* 10, 807-811.

Kaminuma, O. (2008). Selective inhibitors of nuclear factor of activated T cells: potential therapeutic drugs for the treatment of immunological and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 7, 35-40.

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

Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E.W., Bigler, R.D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D.N., Choi, Y., and Marrack, P. (1989). V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 244, 811-813.

Katzen, D., Chu, E., Terhost, C., Leung, D.Y., Gesner, M., Miller, R.A., and Geha, R.S. (1985). Mechanisms of human T cell response to mitogens: IL 2 induces IL 2 receptor expression and proliferation but not IL 2 synthesis in PHA-stimulated T cells. *J Immunol* 135, 1840-1845.

Kegley, K.M., Gephart, J., Warren, G.L., and Pavlath, G.K. (2001). Altered primary myogenesis in NFATC3(-/-) mice leads to decreased muscle size in the adult. *Dev Biol* 232, 115-126.

Kehat, I., and Molkenkin, J.D. (2010). Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* 122, 2727-2735.

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

Kiani, A., Viola, J.P., Lichtman, A.H., and Rao, A. (1997). Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* 7, 849-860.

Konig, A., Fernandez-Zapico, M.E., and Ellenrieder, V. (2010). Primers on molecular pathways--the NFAT transcription pathway in pancreatic cancer. *Pancreatology* 10, 416-422.

Kultz, D., and Csonka, L. (1999). What sets the TonE during osmotic stress? *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1814-1816.

Li, H., Rao, A., and Hogan, P.G. (2011). Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* 21, 91-103.

Li, Q., and Johnston, S.A. (2001). Are all DNA binding and transcription regulation by an activator physiologically relevant? *Mol Cell Biol* 21, 2467-2474.

Li, X.Y., MacArthur, S., Bourgon, R., Nix, D., Pollard, D.A., Iyer, V.N., Hechmer, A., Simirenko, L., Stapleton, M., Luengo Hendriks, C.L., et al. (2008). Transcription factors bind thousands of active and inactive regions in the *Drosophila* blastoderm. *PLoS Biol* 6, e27.

Lin, X., and Barber, D.L. (1996). A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12631-12636.

Lin, X., Sikkink, R.A., Rusnak, F., and Barber, D.L. (1999). Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *J Biol Chem* 274, 36125-36131.

Lipkowitz, S., Greene, W.C., Rubin, A.L., Novogrodsky, A., and Stenzel, K.H. (1984). Expression of receptors for interleukin 2: Role in the commitment of T lymphocytes to proliferate. *J Immunol* 132, 31-37.

Luo, C., Burgeon, E., Carew, J.A., McCaffrey, P.G., Badalian, T.M., Lane, W.S., Hogan, P.G., and Rao, A. (1996a). Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol Cell Biol* 16, 3955-3966.

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

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

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

Maggirwar, S.B., Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (1997). Regulation of the interleukin-2 CD28-responsive element by NF-ATp and various NF-kappaB/Rel transcription factors. *Mol Cell Biol* 17, 2605-2614.

Mancini, M., and Toker, A. (2009). NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 9, 810-820.

Martinez-Martinez, S., Genesca, L., Rodriguez, A., Raya, A., Salichs, E., Were, F., Lopez-Maderuelo, M.D., Redondo, J.M., and de la Luna, S. (2009). The RCAN carboxyl end mediates calcineurin docking-dependent inhibition via a site that dictates binding to substrates and regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6117-6122.

Martinez-Martinez, S., Rodriguez, A., Lopez-Maderuelo, M.D., Ortega-Perez, I., Vazquez, J., and Redondo, J.M. (2006). Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J Biol Chem* 281, 6227-6235.

Martone, R., Euskirchen, G., Bertone, P., Hartman, S., Royce, T.E., Luscombe, N.M., Rinn, J.L., Nelson, F.K., Miller, P., Gerstein, M., et al. (2003). Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12247-12252.

Minami, T., Horiuchi, K., Miura, M., Abid, M.R., Takabe, W., Noguchi, N., Kohro, T., Ge, X., Aburatani, H., Hamakubo, T., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J Biol Chem* 279, 50537-50554.

Miyakawa, H., Woo, S.K., Dahl, S.C., Handler, J.S., and Kwon, H.M. (1999). Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2538-2542.

Monticelli, S., Solymar, D.C., and Rao, A. (2004). Role of NFAT proteins in IL13 gene transcription in mast cells. *J Biol Chem* 279, 36210-36218.

Muller, M.R., and Rao, A. (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10, 645-656.

Myslinski, E., Ame, J.C., Krol, A., and Carbon, P. (2001). An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res* 29, 2502-2509.

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

Neal, J.W., and Clipstone, N.A. (2001). Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. *J Biol Chem* 276, 3666-3673.

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

Neilson, J.R., Winslow, M.M., Hur, E.M., and Crabtree, G.R. (2004). Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity* 20, 255-266.

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

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

Olabisi, O.A., Soto-Nieves, N., Nieves, E., Yang, T.T., Yang, X., Yu, R.Y., Suk, H.Y., Macian, F., and Chow, C.W. (2008). Regulation of transcription factor NFAT by ADP-ribosylation. *Mol Cell Biol* 28, 2860-2871.

Ortega-Perez, I., Cano, E., Were, F., Villar, M., Vazquez, J., and Redondo, J.M. (2005). c-Jun N-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain. *J Biol Chem* 280, 20867-20878.

Oukka, M., Ho, I.C., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M.J., and Glimcher, L.H. (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* 9, 295-304.

Pan, F., Sun, L., Kardian, D.B., Whartenby, K.A., Pardoll, D.M., and Liu, J.O. (2007). Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin. *Nature* 445, 433-436.

Pang, T., Su, X., Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. (2001). Calcineurin homologous protein as an essential cofactor for Na⁺/H⁺ exchangers. *J Biol Chem* 276, 17367-17372.

Park, J., Yaseen, N.R., Hogan, P.G., Rao, A., and Sharma, S. (1995). Phosphorylation of the transcription factor NFATp inhibits its DNA binding activity in cyclosporin A-treated human B and T cells. *J Biol Chem* 270, 20653-20659.

Peng, S.L., Gerth, A.J., Ranger, A.M., and Glimcher, L.H. (2001). NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 14, 13-20.

Pierre, K.B., Jones, C.M., Pierce, J.M., Nicoud, I.B., Earl, T.M., and Chari, R.S. (2009). NFAT4 deficiency results in incomplete liver regeneration following partial hepatectomy. *J Surg Res* 154, 226-233.

Qin, L., Zhao, D., Liu, X., Nagy, J.A., Hoang, M.V., Brown, L.F., Dvorak, H.F., and Zeng, H. (2006). Down syndrome candidate region 1 isoform 1 mediates angiogenesis through the calcineurin-NFAT pathway. *Mol Cancer Res* 4, 811-820.

Ranger, A.M., Gerstenfeld, L.C., Wang, J., Kon, T., Bae, H., Gravallesse, E.M., Glimcher, M.J., and Glimcher, L.H. (2000). The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med* 191, 9-22.

Ranger, A.M., Grusby, M.J., Hodge, M.R., Gravallesse, E.M., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Mickanin, C., Baldwin, H.S., and Glimcher, L.H. (1998a). The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392, 186-190.

Ranger, A.M., Oukka, M., Rengarajan, J., and Glimcher, L.H. (1998b). Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 9, 627-635.

Rao, A. (1994). NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 15, 274-281.

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

Rengarajan, J., Tang, B., and Glimcher, L.H. (2002). NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H) cells. *Nat Immunol* 3, 48-54.

Robbs, B.K., Cruz, A.L., Werneck, M.B., Mognol, G.P., and Viola, J.P. (2008). Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol* 28, 7168-7181.

Rodriguez, A., and Flemington, E.K. (1999). Transfection-mediated cell-cycle signaling: considerations for transient transfection-based cell-cycle studies. *Anal Biochem* 272, 171-181.

Rodriguez, A., Roy, J., Martinez-Martinez, S., Lopez-Maderuelo, M.D., Nino-Moreno, P., Orti, L., Pantoja-Uceda, D., Pineda-Lucena, A., Cyert, M.S., and Redondo, J.M. (2009). A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Mol Cell* 33, 616-626.

Rooney, J.W., Sun, Y.L., Glimcher, L.H., and Hoey, T. (1995). Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 15, 6299-6310.

Rusnak, F., and Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80, 1483-1521.

Ryeom, S., Baek, K.H., Rioth, M.J., Lynch, R.C., Zaslavsky, A., Birsner, A., Yoon, S.S., and McKeon, F. (2008). Targeted deletion of the calcineurin inhibitor DSCR1 suppresses tumor growth. *Cancer Cell* 13, 420-431.

- Salvado, M.D., Alfranca, A., Escolano, A., Haeggstrom, J.Z., and Redondo, J.M. (2009). COX-2 limits prostanoid production in activated HUVECs and is a source of PGH₂ for transcellular metabolism to PGE₂ by tumor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1131-1137.
- Serfling, E., Chuvpilo, S., Liu, J., Hofer, T., and Palmetshofer, A. (2006a). NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol* 27, 461-469.
- Serfling, E., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Bopp, T., Stassen, M., and Schmitt, E. (2006b). NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol* 36, 2837-2843.
- Shaw, J.P., Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J.J., Emmel, E.A., and Crabtree, G.R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241, 202-205.
- Shin, S.Y., Yang, H.W., Kim, J.R., Do Heo, W., and Cho, K.H. (2011). A hidden incoherent switch regulates RCAN1 in the calcineurin-NFAT signaling network. *J Cell Sci* 124, 82-90.
- Sitara, D., and Aliprantis, A.O. (2010). Transcriptional regulation of bone and joint remodeling by NFAT. *Immunol Rev* 233, 286-300.
- Stroud, J.C., and Chen, L. (2003). Structure of NFAT bound to DNA as a monomer. *J Mol Biol* 334, 1009-1022.
- Sun, L., Youn, H.D., Loh, C., Stolow, M., He, W., and Liu, J.O. (1998). Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* 8, 703-711.
- Terui, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F., and Yuan, J. (2004). Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem* 279, 28257-28265.
- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., and Botting, R.M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 97-120.
- Vihma, H., Pruunsild, P., and Timmusk, T. (2008). Alternative splicing and expression of human and mouse NFAT genes. *Genomics* 92, 279-291.
- Viola, J.P., Kiani, A., Bozza, P.T., and Rao, A. (1998). Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* 91, 2223-2230.
- von Boehmer, H., Aifantis, I., Gounari, F., Azogui, O., Haughn, L., Apostolou, I., Jaeckel, E., Grassi, F., and Klein, L. (2003). Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev* 191, 62-78.

- Wilkins, B.J., De Windt, L.J., Bueno, O.F., Braz, J.C., Glascock, B.J., Kimball, T.F., and Molkenin, J.D. (2002). Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol* 22, 7603-7613.
- Willingham, A.T., Orth, A.P., Batalov, S., Peters, E.C., Wen, B.G., Aza-Blanc, P., Hogenesch, J.B., and Schultz, P.G. (2005). A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science* 309, 1570-1573.
- Wolfe, S.A., Zhou, P., Dotsch, V., Chen, L., You, A., Ho, S.N., Crabtree, G.R., Wagner, G., and Verdine, G.L. (1997). Unusual Rel-like architecture in the DNA-binding domain of the transcription factor NFATc. *Nature* 385, 172-176.
- Wu, W., Misra, R.S., Russell, J.Q., Flavell, R.A., Rincon, M., and Budd, R.C. (2006a). Proteolytic regulation of nuclear factor of activated T (NFAT) c2 cells and NFAT activity by caspase-3. *J Biol Chem* 281, 10682-10690.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., et al. (2006b). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126, 375-387.
- Xanthoudakis, S., Viola, J.P., Shaw, K.T., Luo, C., Wallace, J.D., Bozza, P.T., Luk, D.C., Curran, T., and Rao, A. (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272, 892-895.
- Yang, J., Rothermel, B., Vega, R.B., Frey, N., McKinsey, T.A., Olson, E.N., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2000). Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87, E61-68.
- Yang, T.T., Suk, H.Y., Yang, X., Olabisi, O., Yu, R.Y., Durand, J., Jelicks, L.A., Kim, J.Y., Scherer, P.E., Wang, Y., et al. (2006). Role of transcription factor NFAT in glucose and insulin homeostasis. *Mol Cell Biol* 26, 7372-7387.
- Yoeli-Lerner, M., Chin, Y.R., Hansen, C.K., and Toker, A. (2009). Akt/protein kinase b and glycogen synthase kinase-3beta signaling pathway regulates cell migration through the NFAT1 transcription factor. *Mol Cancer Res* 7, 425-432.
- Yoeli-Lerner, M., Yiu, G.K., Rabinovitz, I., Erhardt, P., Jauliac, S., and Toker, A. (2005). Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* 20, 539-550.
- Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengere, L.E., Wakeham, A.C., Bouchard, D., Kong, Y.Y., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., et al. (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 8, 115-124.

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

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

