

Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pesquisa

**PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
NFAT1 NA REGULAÇÃO DO CICLO
CELULAR E NA EXPRESSÃO DE CICLINAS**

NINA CARROSSINI BASTOS

Rio de Janeiro

Março de 2008

Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pesquisa
2008

NINA CARROSSINI BASTOS

**PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFAT1 NA REGULAÇÃO
DO CICLO CELULAR E NA EXPRESSÃO DE CICLINAS**

Tese de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia,
Instituto Nacional de Câncer (INCA), como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientador: Dr. João Paulo de Biaso Viola

Rio de Janeiro

Março de 2008

Ficha Catalográfica

B324p Bastos, Nina Carrossini

Papel do fator de transcrição NFAT1 na regulação do ciclo celular e na expressão de ciclinas/ Nina Carrossini Bastos – Rio de Janeiro: INCA,2008.

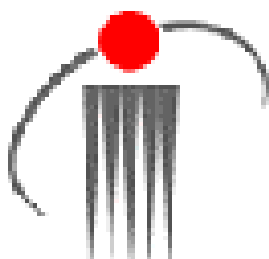
Xv.126p.il.color.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Oncologia-Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2008.

Orientador: Dr. João Paulo de Biaso Viola.

1. Linfócitos B 2. Ciclo Celular 3. Fator de Transcrição NFAT1 4. Ciclinas. I. Viola, João Paulo de Biaso II. Instituto Nacional de Câncer III. Título.

CDD 616.0792



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

Aos meus pais e meu irmão.

Agradecimentos

À minha família querida que me apoiou durante toda a minha formação e sempre acreditou no meu potencial. Sem vocês nada teria graça. Adoro vocês.

Ao meu orientador João Viola pela oportunidade de realizar minha tese de mestrado em seu laboratório, pelo tempo que me foi dedicado e também pela sua grande paciência. Também, por todas as coisas que me ensinou e por ter sido um amigo durante esses quatro anos que estou no laboratório. Obrigada!

Ao Leonardo Teixeira que além de ter sido um grande professor na bancada no início da minha formação e amigo, esteve sempre presente com boas idéias e palavras estimuladoras que com certeza fizeram toda diferença.

À Lílian grande amiga e tutora que me ensinou todos os “bizus” da bancada. Obrigada pela paciência e pela oportunidade de ter trabalhado junto com você durante a minha iniciação. Aprendi muito mais que protocolos com você, muito obrigada.

Aos meus companheiros de laboratório: André, Bianca, Giu, Patrícia e Flávia por em algum momento durante a minha tese terem se disponibilizado a me ajudar.

Um agradecimento especial ao André que sempre esteve disponível para me ajudar em alguns experimentos onde duas mãos não eram suficientes, e também por ter proporcionado muitos momentos de diversão dançantes no laboratório.

Aos ex-integrantes da Divisão de Biologia Celular do INCA: Ana Paula, Bruno Dias, Bruno Piva, Luis Gustavo, Luciana por terem proporcionado um excelente ambiente de trabalho e terem sido grandes amigos.

Aos mais novos integrantes da Divisão de Biologia Celular a Dr. Cinthya Sternberg e o Dr. Gustavo Amarante-Mendes, e seus alunos Érika e Gabriel, que ajudaram durante a tese dando diferentes sugestões e proporcionando um excelente ambiente para discussões.

Aos alunos novos de iniciação científica da divisão de biologia celular, que trouxeram o caos, mas ainda assim acrescentaram muito ao laboratório.

Ao Bruno Aguiar, essencial no dia-a-dia do laboratório e também um grande amigo que proporcionou um excelente ambiente de trabalho. E que também me ajudou muito durante a minha tese.

À grande equipe da Biologia Celular, Alexsandra, Marlon e Bianca, por todo suporte durante esses dois anos. Com certeza muito importante. E também pelos divertidos almoços.

Ao grupo de Medicina Experimental pelas excelentes discussões nos seminários.

Às minhas amigas: Carol, Érika, Maíra e Tatiana por terem me acompanhado durante a minha formação e serem as amigas mais gracinhas e queridas.

Ao Marcelo, mais novo grande amigo e companheiro durante este momento final da tese tão estressante. Ajudou-me em diversos momentos, obrigada.

A todos os funcionários da CPQ/INCA por terem garantido a qualidade do ambiente em que tive oportunidade de trabalhar.

À Patrícia Bozza e seus alunos, em especial Patrícia Pacheco e Clarissa por tudo que tive a oportunidade de aprender e pelo trabalho que tive a chance de participar com vocês.

À Maria Tereza com quem tive a chance de trabalhar e que durante a minha tese se disponibilizou a me ajudar e no final se tornou uma grande amiga.

Aos pesquisadores do INCA que formaram a pós-graduação na qual realizei a minha tese, com excelentes aulas e seminários.

Ao pessoal da farmacologia do INCA, pessoal muito divertido.

As grandes e também as mais novas amigas que foram muito importantes nesses dois últimos anos: Mary, Aninha, Julia, Cíntia, Carol, Natalie, Isabel....

Lista de Abreviaturas

AP-1	- proteína ativadora 1
APC	- célula apresentadora de antígeno
Bcl-2	- leucemia e linfoma de célula B
BCR	- receptor de células B
°C	- graus Celsius
Ca ²⁺	- íon divalente de cálcio
CD	- grupos de diferenciação
CD40L	- ligante de CD40
CDK	- cinase dependente de ciclina
cDNA	- DNA complementar
CHO	- célula de ovário de hamster chinês
c-Myc	- oncogene do vírus da mielocitomatose aviária
CK-1	- caseína cinase 1
CO ₂	- gás carbônico
COX-2	- ciclo-oxigenase 2
CsA	- ciclosporina A
CTLA-4	- antígeno 4 de linfócito T citotóxico
DMEM	- Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	- ácido deoxiribonucleico
EDTA	-ácido etileno diamino tetracético
EGR	- proteína de resposta ao crescimento prematuro
FasL	- ligante de Faz
g	- grama
G ₀	- fase de quiescência
G	- fase de intervalo
GAPDH	- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GM-CSF	- fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
GSK-3	- cinase glicogênio sintase 3
HEPES	- ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico
HRP	- peroxidase de <i>Ammoracia rústica</i> (<i>horseradish peroxidase</i>)
IFN	- interferon
Ig	- imunoglobulina
IL	- interleucina
IRF	- fator regulador de interferon
ITAM	- motivo imunoreceptor de ativação baseado em tirosina
JNK	- cinase de região terminal NH ₂ de c-Jun
L	- litro
LPS	- lipopolisacarídeo
M	- fase de mitose
mA	- miliamper
mg	- miligrama
mL	- mililitro
mM	- milimolar
MHC	- complexo maior de histocompatibilidade
MyD88	- fator de diferenciação mielóide 88

NFAT	- fator nuclear de células T ativadas
NF κ B	- fator nuclear κ B
ng	- nanograma
NK	- célula assassinas naturais
nM	- nanomolar
OVA	- ovalbumina
PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	- pares de base
PBS	- salina fosfatada tamponada
PCR	- reação em cadeia da polimerase
pH	- potencial hidrogeniônico
PI	- iodeto de propídeo
PKA	- proteína cinase A
PKB	- proteína cinase B
PKC	- proteína cinase C
PMA	-forbol miristato acetato
Rag-2	- gene ativador de recombinação 2
Rb	- proteína retinoblastoma
RNA	- ácido ribonucleico
RPA	- ensaio de proteção a RNase
S	- fase de síntese
SDS	- duodecil sulfato de sódio
SFB	- soro fetal bovino
STAT	- ativador transcricional e transdutor de sinal
TBS	- tampão tris salina
TCR	- receptor de células T
Th	- células T auxiliaadoras (T helper)
TLR	- receptores <i>Toll-Like</i>
TNF	- fator de necrose tumoral
U	- unidade
V	- volts
VEGF	- fator de crescimento do endotélio vascular
μ Ci	- microcurie
μ F	- microfaraday
3 H	- trítio

Resumo

A família de fatores de transcrição NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) apresenta um papel central na regulação de diversos genes relacionados com a resposta imune e recentemente foram implicados na proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares. Nossos resultados mostram que os linfócitos B deficientes para NFAT1, quando estimulados pelo BCR, proliferavam mais, apresentavam um aumento do número de células na fase G₁ do ciclo celular e um aumento na expressão dos genes das ciclinas A2, E1 e E2. Além disso, o silenciamento do NFAT1 aumentou a proliferação de uma linhagem celular de células B. Análises adicionais demonstraram que a expressão ectópica de NFAT1 em células CHO inibiu a proliferação celular, a expressão das ciclinas A2, E1 e E2, a formação de colônias *in vitro* e o crescimento tumoral *in vivo*. Juntos estes resultados indicam que o NFAT1 apresenta um papel de regulador negativo do ciclo celular.

Abstract

The NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) family of transcription factors plays a central role in the regulation of several genes related to the immune response and has been recently implicated in the proliferation and differentiation of numerous cell types. Our results show that NFAT1-deficient B-lymphocytes stimulated through BCR proliferate more, present an increase in the number of cells in the G₁ phase of the cell cycle and an up regulated expression of cyclins A2, E1 and E2 when compared to wild type. Also, silencing of NFAT1 increased the proliferation rate of a B cell line. Further analyses demonstrated that ectopic expression of NFAT1 in CHO cells inhibited cellular proliferation, cyclins A2, E1 and E2 expression, colony formation *in vitro* and tumor growth *in vivo*. Together, these results indicate NFAT1 as a negative regulator of the cell cycle.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação esquemática das proteínas NFAT.....	3
Figura 2: Esquema da via de ativação das proteínas NFAT1-4.....	5
Figura 3: Diferentes estágios do desenvolvimento de células B.....	10
Figura 4: Interações entre as células B e T na resposta a um antígeno proteico.....	15
Figura 5: As fases do ciclo celular.....	19
Figura 6: NFAT1 regula a proliferação de linfócitos B <i>naïve</i>	43
Figura 7: NFAT1 regula a progressão do ciclo celular em linfócitos B <i>naïve</i>	44
Figura 8: A ausência de NFAT1 induz a morte celular em linfócitos B.....	46
Figura 9: NFAT1 inibe a expressão de ciclinas em linfócitos B.....	49
Figura 10: NFAT1 inibe a expressão de ciclina E em linfócitos B.....	50
Figura 11: Silenciamento da proteína NFAT1 na linhagem 697 de linfócito B humano.....	52
Figura 12: O silenciamento do NFAT1 induz o aumento da proliferação na linhagem celular 697.....	53
Figura 13: Doxíciclina induz a expressão de NFAT1 na linhagem celular CHO-NFAT1.....	56
Figura 14: Doxíciclina não afeta a proliferação da linhagem celular CHO-LacZeo.....	59
Figura 15: Sincronização da linhagem celular CHO-NFAT1 em meio RPMI 0,5%SFB.....	60
Figura 16: NFAT1 induz a diminuição da proliferação na linhagem celular CHO-NFAT1.....	61
Figura 17: Expressão de NFAT1 leva a parada do ciclo celular na linhagem CHO-NFAT1.....	62
Figura 18: NFAT1 não induz morte celular na linhagem celular CHO-NFAT1.....	65

Figura 19: NFAT1 inibe a expressão de ciclinas na linhagem celular CHO-NFAT1.....	66
Figura 20: NFAT1 inibe o crescimento independente de ancoragem <i>in vitro</i> na linhagem celular CHO-NFAT1.....	68
Figura 21: NFAT1 inibe o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	70
Figura 22: NFAT1 inibe a expressão de ciclinas em tumores <i>in vivo</i> da linhagem celular CHO-NFAT1.....	71

Sumário

1. Introdução	1
1.1 A família de fatores de transcrição NFAT (<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>)	1
1.2 O sistema imune e o linfócito B	8
1.3 Ativação do linfócito B	12
1.4 NFAT e linfócito B	16
1.5 Ciclo celular e câncer	18
1.6 NFAT, ciclo celular e câncer	23
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1 Linhagens celulares	29
3.2 Cultura de linhagem celular	29
3.3 Cultura de células primárias	30
3.4 Animais	30
3.5 Purificação de linfócitos de camundongos	30
3.6 Transfecção estável da linhagem celular CHO utilizando o Sistema Flp-In™ T-Rex™ (Invitrogen)	31
3.7 Indução de expressão gênica com doxíciclina	32
3.8 Análise por <i>western blott</i>	33
3.9 Análise do ciclo celular	34
3.10 Ensaio de proliferação celular	35
3.11 Ensaio de cristal violeta	36
3.12 RT-PCR	36
3.13 Inoculação em camundongos BALB/c nude	38
3.14 Ensaio de proteção a RNase (RPA)	39
3.15 Ensaio de crescimento em suspensão de agarose	39
3.16 Silenciamento da expressão de NFAT1 por siRNA	40

4. Resultados.....	41
4.1 NFAT1 regula a proliferação de linfócitos B <i>naive</i>	41
4.2 A ausência de NFAT1 induz a morte celular de linfócitos B estimulados.....	45
4.3 O NFAT inibe a expressão de ciclinas em linfócitos B.....	47
4.4 O silenciamento da proteína NFAT1 numa linhagem celular leva ao aumento da proliferação.....	51
4.5 NFAT1 inibe a proliferação celular na linhagem CHO-NFAT1.....	54
4.5.1 Construção e caracterização da linhagem celular CHO-NFAT1.....	54
4.5.2 Análise da proliferação celular na linhagem CHO-NFAT1.....	57
4.6 NFAT1 inibe a proliferação celular da linhagem CHO-NFAT1 através da repressão de ciclinas e não pelo aumento da morte celular.....	63
4.7 NFAT1 inibe o crescimento independente de ancoragem <i>in vitro</i> da linhagem celular CHO-NFAT1.....	67
4.8 NFAT1 inibe o crescimento tumoral e a expressão de ciclinas <i>in vivo</i> ..	69
5. Discussão.....	72
6. Conclusões.....	83
7. Referências Bibliográficas.....	84
8. Anexo.....	104
8.1 Carvalho LDS, Teixeira LK, Carrossini N, Caldeira ATN, Ansel KM, Rao A & Viola JPB (2007). The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. <i>Cell Cycle</i> 6:1789-1795.....	104
8.2 Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, Kaufmann C, Morgado-Diaz JA, Bozza PT, Viola JPB (2008). Lipid Bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E ₂ synthesis in colon cancer cells. <i>Cancer Research</i> 68: in press.....	112

1. Introdução

1.1 A família de fatores de transcrição NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*).

O NFAT foi originalmente descrito como um fator nuclear em linfócitos T, que se ligava a região promotora do gene de IL-2 e levava a sua transcrição. Os fatores de transcrição da família NFAT são compostos por cinco membros. Os membros desta família compreendem as proteínas: NFAT1 (também chamado NFATp ou NFATc2), NFAT2 (NFATc ou NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx ou NFATc3) e o NFAT5 (TonEBP ou NFATz) (Lopez-Rodrigues *et al.*, 1999; Macián *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 1997).

Apesar de terem sido primeiramente descritos em células T, os fatores de transcrição da família NFAT são encontrados em outros tipos de células do sistema imune e em células fora do sistema imune (Rao *et al.*, 1997; Hogan *et al.*, 2003; Graef *et al.*; 2001; Crabtree *et al.*, 2002). Os fatores de transcrição NFAT1 e NFAT2 são expressos em células T periféricas e em diversas linhagens de células T, sendo o NFAT1 também expresso em linfócitos B, mastócitos, células NK, monócitos e macrófagos (Ho *et al.*, 1994; Aramburu *et al.*, 1995; Ruff e Leach, 1995; Wang *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1996). A expressão do NFAT2 encontra-se aumentada em linfócitos T ativados e células NK (Rao *et al.*, 1997). O NFAT4 é expresso em altos níveis em timócitos (Hoey *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995) e o NFAT3 é expresso preferencialmente em células fora do sistema

imune (Hoey *et al.*, 1995). Diversos trabalhos já demonstraram a presença de membros da família NFAT em células endoteliais, células musculares lisas e esqueléticas, células do sistema nervoso central, do tecido cartilaginoso e do sistema cardíaco (Horsley e Pavlath, 2002; Lipskaia e Lompré, 2004).

Estas proteínas regulam a expressão de diversos genes relacionados com a resposta imune, como genes de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF) e moléculas de superfície (CD40L, CTLA-4 e FasL) (Rao *et al.*, 1997; Kiane *et al.*, 2000; Macian *et al.*, 2001). Contudo, membros desta família foram identificados posteriormente com a capacidade de regular fenômenos biológicos variados em diversos tipos celulares, como a proliferação e a morte celular (Rao *et al.*, 1997; Horsley e Pavlath, 2002; Macián, 2005).

Estruturalmente, todas as proteínas da família NFAT apresentam o domínio altamente conservado de ligação ao DNA (DBD, *DNA Binding Domain*) que confere uma ligação ao DNA comum aos diferentes membros. O sítio de ligação do NFAT no DNA é composto por nove pares de base e possui a seguinte seqüência consenso de nucleotídeos: (A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001).

Além dessa região, os membros da família também compartilham a região moderadamente conservada de homologia NFAT (NHR, *NFAT homology region*). Esta região apresenta 300 aminoácidos e se localiza na região N-terminal da proteína (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003). É encontrado na região NHR o sítio para ligação da enzima calcineurina (PXIXIT, onde X representa qualquer resíduo de aminoácido), a seqüência de localização nuclear

(NLS, *Nuclear Localization Signal*), a sequência de exportação nuclear (NES, *Nuclear Export Signal*), três motivos SP (*Serine Proline-Repeat Motif*), e um motivo SRR (*Serine-Rich Region*), ricos em resíduos de serina e prolina (Rao *et al.*, 1997). Estes resíduos se encontram fosforilados em células não estimuladas e são desfosforilados durante a ativação do NFAT (Shaw *et al.*, 1995; Beals *et al.*, 1997; Okamura *et al.*, 2000) (Figura 1).

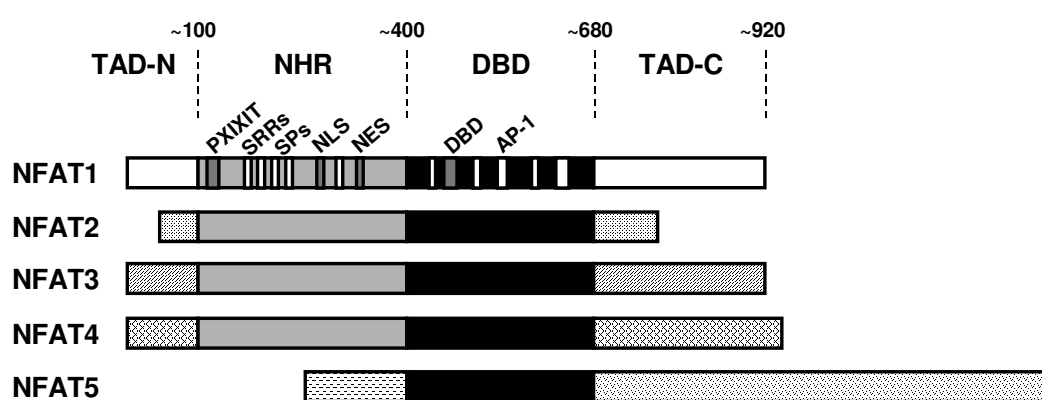


Figura 1: Representação esquemática das proteínas NFAT. Os membros da família NFAT apresentam dois domínios altamente conservados em sua estrutura protéica: a região de homologia NFAT (NHR) e um domínio de ligação ao DNA (DBD). Na região regulatória NHR, encontra-se o sítio de ligação para a calcineurina (PXIXIT), a sequência de localização nuclear (NLS), a sequência de exportação nuclear (NES) e diversas regiões ricas em resíduos de serina e prolina. No domínio DBD, encontra-se a sequência de ligação ao DNA e regiões de interação com o fator de transcrição AP-1 (*Activated Protein 1*). As proteínas NFAT apresentam ainda domínios de transativação (TAD) diferentes nas regiões N e C terminal. (Adaptado de Macián, 2005).

As regiões localizadas fora desses dois domínios (DBD e NHR) apresentam baixa homologia entre os membros da família. Entre elas, a mais importante é o domínio de transativação (TAD) localizado no N- e C-terminal de cada proteína (Rao *et al.*, 1997; Serfling *et al.*, 2000) (Figura 1).

Além dessas características estruturais, as proteínas da família NFAT apresentam algumas isoformas codificadas por formas alternativas de *splicing*, que resultam na variação no N-terminal e C-terminal da proteína, mas que mantém a região central intacta (Luo *et al.*, 1996; Imanura *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1996; Chupvilo *et al.*, 1999).

Os fatores de transcrição NFAT são constitutivamente expressos no citoplasma de células não ativadas, apresentando sua forma fosforilada que possui baixa afinidade ao DNA (Rao *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 1995). A ativação das proteínas NFAT ocorre após o estímulo de receptores acoplados à mobilização de Ca^{2+} , como receptores antigênicos de células B e T ou receptores Fc presentes em monócitos, mastócitos e células NK (Rao *et al.*, 1997). A estimulação destes receptores leva a mobilização do Ca^{2+} presente em reservatórios citoplasmáticos, como o retículo endoplasmático. O aumento do nível intracelular de Ca^{2+} induz a ativação da enzima dependente de calmodulina, a calcineurina (Lewis, 2001). A calcineurina é uma serina/treonina fosfatase que tem a capacidade de desfosforilar resíduos de serina encontrados em proteínas da família NFAT (Loh *et al.*, 1996; Okamura *et al.*, 2000). Esta desfosforilação expõe a sequência de localização nuclear (NLS) e esconde a sequência de exportação nuclear (NES), permitindo a translocação do NFAT para o núcleo, onde ocorre a transativação de diversos genes-alvos (Figura 2). Dentre os cinco membros da família NFAT, apenas os membros NFAT1-4 são regulados pela via de Ca^{2+} /calcineurina, o membro NFAT5 é regulado por stress osmótico (Rao *et al.*, 1997; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003).

O retorno das proteínas NFAT para o citoplasma ocorre após o término da sinalização por cálcio e é dependente da fosforilação nos mesmos resíduos de aminoácidos (Loh *et al.*, 1996). Estas fosforilações são mediadas pela proteína cinase GSK-3 (*Glycogen Synthase Kinase-3*) (Beals *et al.*, 1997). A movimentação de NFAT entre o núcleo e o citoplasma é extremamente rápida e dinâmica, e além da GSK-3 outras diversas proteínas cinases regulam esta movimentação (PKA, JNK, CK-1, p38, Pim-1, PKC) (Beals *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Gomez del Arco *et al.*, 2000; Rainio *et al.*, 2002; San-Antonio *et al.*, 2002; Mácian, 2005).

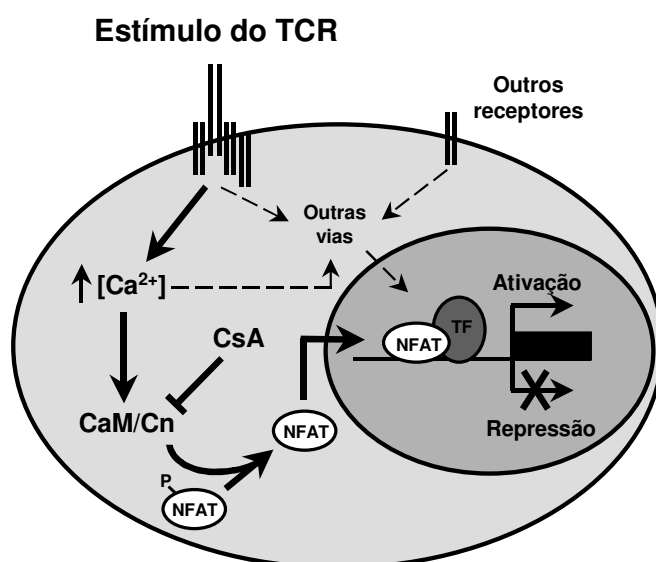


Figura 2: Esquema da via de ativação das proteínas NFAT1-4. Através da estimulação de receptores capazes de ativar a via de Ca^{2+} ocorre um aumento do nível intracelular de Ca^{2+} que induz a ativação da fosfatase calcineurina que é capaz de desfosforilar proteínas da família NFAT presentes do citoplasma, permitindo sua translocação nuclear. No núcleo, as proteínas NFAT regulam a expressão de diversos genes-alvo em colaboração com outros fatores de transcrição. TCR, Receptor de célula T; Ca^{2+} , cálcio; CaM, Calmodulina; Cn, Calcineurina; NFAT, Fator nuclear de células T ativadas; CsA, Ciclosporina A; TF, Fator de transcrição. (Adaptado Caetano *et al.*, 2002)

Alguns agentes farmacológicos podem mimetizar a ativação dos fatores de transcrição NFAT *in vitro*. O ionóforo de cálcio ionomicina induz um aumento do nível intracelular de cálcio e, portanto pode ser usado como um ativador de vias dependentes de calcineurina/NFAT. Da mesma forma, o éster de forbol PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) pode ser usado como um ativador de vias dependentes de PKC. Por outro lado, as drogas imunossupressoras Ciclosporina A (CsA) e FK506 bloqueiam diretamente a fosfatase calcineurina e podem ser usadas como inibidores das proteínas NFAT (Rao *et al.*, 1997; Kiani *et al.*, 2000) (Figura 2).

Os NFATs podem interagir com diferentes fatores de transcrição no núcleo. O principal e melhor caracterizado parceiro transcricional da família NFAT é o AP-1 (*Activated Protein 1*), composto por dímeros de Fos e Jun (Jain *et al.*, 1992a; Jain *et al.*, 1993a; Jain *et al.*, 1993b). Eles interagem com proteínas NFAT na região DBD (Figura 1) e com o DNA em sítios compostos NFAT-AP1 (Macian *et al.*, 2005). Sítios NFAT-AP1 estão presentes em promotores de diversos genes induzidos durante a ativação de linfócitos. A cooperação entre NFAT e AP-1 integra duas principais vias de sinalização que ocorrem em resposta à estimulação de linfócitos a via de cálcio, responsável pela ativação de NFAT e a via RAS-MAPK, que induz a expressão e ativação de Fos e Jun (Macian *et al.*, 2005).

Além de cooperar com a proteína AP-1, os fatores de transcrição da família NFAT também são capazes de interagir com outros fatores de transcrição como GATA-3, NF κ B, IRF-4 (*Interferon Responsive Factor 4*), EGR (*Early Growth*

Response protein), entre outros (Decker *et al.*, 1998; Rengarajan *et al.*, 2000a; Rengarajan *et al.*, 2002a; Macián *et al.*, 2001; Hogan *et al.*, 2003).

A semelhança da região NHR e da sequência de ligação ao DNA entre os membros da família NFAT confere certa redundância aos membros da família, porém as proteínas NFAT são funcionalmente distintas (Macián *et al.*, 2005). Alguns destes aspectos foram mais bem esclarecidos com a geração de camundongos deficientes para as diferentes proteínas NFAT, onde foi possível elucidar os papéis específicos destas proteínas. O camundongo deficiente para NFAT1, o membro majoritário da família NFAT, sendo responsável por quase 90% do conteúdo total de NFAT em linfócitos T (Lyakh *et al.*, 1997; Kiani *et al.*, 2000; Macián, 2005), foi gerado e analisado (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Hogde *et al.*, 1996). Estes animais se desenvolveram normalmente, mas apresentavam um aumento da resposta imune, acompanhada por linfomegalia e esplenomegalia (Hogde *et al.*, 1996; Xanthoudakis *et al.*, 1996). As células do baço e linfonodo de camundongos NFAT1^{-/-} estimuladas *in vitro* exibiram uma resposta do tipo Th2 aumentada, que foi evidenciada pelo aumento nos níveis de produção de IL-4, IL-5, IL-13 e também hiperproliferavam *in vitro* perante uma variedade de estímulos (Hodge *et al.*, 1996; Kiane *et al.*, 1997; Viola *et al.*, 1998; Xanthoudakis *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem um papel negativo para o fator de transcrição NFAT1 na regulação da proliferação de linfócitos e na expressão de citocinas Th2. Por outro lado, animais deficientes para NFAT2, eram letais durante a embriogênese devido a uma falha no desenvolvimento da válvula cardíaca (Ranger *et al.*, 1998a). Então, o estudo do papel do gene do NFAT2 foi realizado através da complementação de células ES NFAT2^{-/-} em blastocistos Rag2^{-/-}. A

análise destes animais mostrou uma deficiência na resposta do tipo Th2 (baixos níveis de IL-4) e uma redução da capacidade proliferativa dos linfócitos comparados com animais normais, demonstrando um papel positivo do NFAT2 na regulação das citocinas Th2 (Ranger *et al.*, 1998b; Yoshida *et al.*, 1998). Já animais deficientes para o membro NFAT4 apresentam falha na geração de timócitos simples positivos para as moléculas de CD4 e CD8, devido a um aumento na apoptose dos timócitos duplo positivos, e ainda apresentam um aumento na ativação dos linfócitos T periféricos, demonstrando a importância deste fator no desenvolvimento de células T no timo (Oukka *et al.*, 1998). Animais deficientes para o fator NFAT5 apresentaram diminuição na celularidade do timo e baço, e também uma falha nas funções dos linfócitos T perante condições hiperosmóticas (Go *et al.*, 2004). Estes trabalhos demonstram a especificidade destes membros da família NFAT durante a geração da resposta imune (Rao *et al.*, 1997; Hogan *et al.*, 2003; Macián, 2005).

1.2 O sistema imune e o linfócito B.

A função do sistema imune é a proteção do organismo contra qualquer tipo de agente infeccioso e a manutenção do próprio. Esta defesa é realizada por diferentes células e moléculas. Uma primeira resposta contra o patógeno é mediada de forma rápida e pouco específica, pela chamada resposta imune inata. Esta por sua vez passará à resposta imune adaptativa as informações e estimulações necessárias para que ocorra a eliminação completa do patógeno de modo específico e eficiente. Este processo final é dependente de células

especializadas, os linfócitos B e T. A perda do controle da resposta imune em uma destas etapas pode levar ao aparecimento de alergias, inflamações, doenças auto-imunes e câncer (Janeway, 2001).

As células do sistema imune são produzidas na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas, que podem dar origem aos precursores mielóides e linfóides. Os precursores mielóides são capazes de se diferenciar na medula óssea em monócitos, neutrófilos, eritrócitos, eosinófilos e outros granulócitos. Já os precursores linfóides se diferenciam em linfócitos T, B e células NK (*Natural Killer*) nos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) (Kondo *et al.*, 2001).

Os linfócitos B são responsáveis pela resposta imune humoral, que é mediada pela secreção de anticorpos. Estes têm a função de se ligarem a antígenos de forma específica e então desencadear a sua eliminação (MacConmara & Lederer, 2005). A molécula de anticorpo tem uma estrutura simétrica composta por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas, também idênticas. Cada cadeia leve é covalentemente associada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto e as duas cadeias pesadas são ligadas entre si igualmente por uma ligação dissulfeto. Ambas as cadeias são formadas por uma região variável que participa no reconhecimento do antígeno, e uma região constante. A região constante da cadeia pesada irá definir o isotipo de imunoglobulina e é responsável pelo ancoramento das moléculas de anticorpo na membrana do linfócito B.

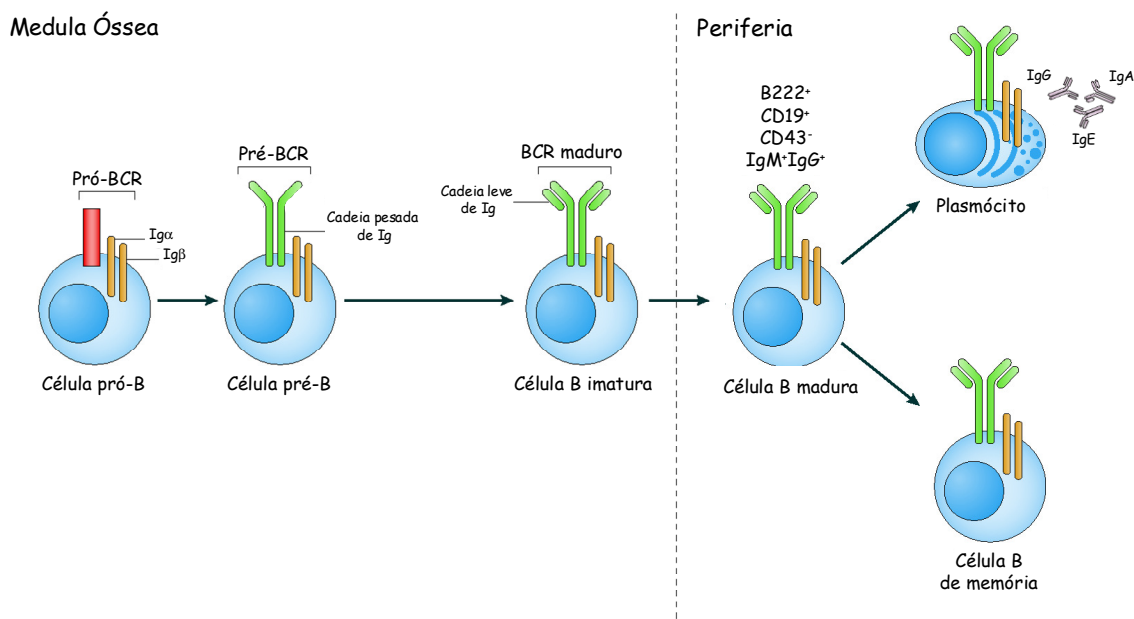


Figura 3: Diferentes estágios do desenvolvimento de células B. O desenvolvimento de linfócitos B começa na medula óssea onde as células progridem pelos estágios: pró-B, onde a cadeia pesada de imunoglobulina está sendo rearranjada, pré-B, a cadeia pesada já está exposta na membrana da célula que passa a rearranjar a cadeia leve de imunoglobulina, e finalmente o estágio de célula B imatura, onde as duas cadeias se agrupam na membrana para formar o BCR maduro, que é capaz de reconhecer um antígeno. Antes de sair da medula óssea ocorre a seleção negativa de clone auto-reativos. Células que tiverem alcançado esse estágio com sucesso deixam a medula e vão para um órgão linfóide periférico onde irão terminar o processo de maturação. Nesse momento as células adquirem a maturação e passam a expressar na sua membrana diferentes marcadores específicos e também passam a ser IgM⁺IgG⁺. Quando encontrar um antígeno estas células podem se diferenciar em células de memória ou células efetora (plasmócitos), que secretam grandes quantidades de anticorpos (Adaptado de Cambier *et al.*, 2007).

O comprometimento dos progenitores linfóides com a linhagem B é regulado por uma série de eventos genéticos que ocorrem na medula óssea. O primeiro precursor de linfócitos B, chamado de pró-B, deve rearranjar os genes da cadeia pesada de imunoglobulina, que irá posteriormente formar o BCR (*B Cell Receptor*), para prosseguir no caminho da maturação. O próximo passo no desenvolvimento de um linfócito B é o rearranjo da cadeia leve de imunoglobulina,

nesse momento a célula é chamada de pré-B (Sagaert & De Wolf-Peeters, 2003) (Figura 3). Os rearranjos das cadeias leve e pesada de imunoglobulina são dependentes da ativação dos genes RAG-1 e RAG-2 (*Recombination Activating Genes*) (Knecht *et.al.*, 1994). Uma vez prontas, as cadeias se associam pra formar a imunoglobulina M (IgM), que fará parte do complexo BCR. As células passam então a expressar moléculas de IgM na superfície celular e são denominadas agora linfócitos B imaturos (Sagaert & De Wolf-Peeters, 2003) (Figura 3). Antes da saída das células B imaturas da medula óssea há uma seleção negativa de células que reagem contra antígenos próprios, esse processo é conhecido como tolerização, que continua também quando as células atingem a periferia. Nesse momento os linfócitos B ainda não são capazes de responder a estímulos antigênicos, caso ocorra uma ligação ao BCR, este acarretará num estímulo à morte (Healy *et al.*, 1997; Healy & Goodnow, 1998).

Os linfócitos B imaturos migram agora para o baço, um órgão linfóide periférico, onde irão terminar o processo de maturação. Nesse momento ocorre um *splincing* alternativo no mRNA do gene de imunoglobulina que levará a formação de dois tipos de imunoglobulinas: a IgG e a IgM (Figura 3). A diferença entre estas duas imunoglobulinas está na parte constante da cadeia pesada, que lhes garantem funções diferentes durante a resposta imune, porém apresentam a mesma especificidade ao antígeno, ou seja, mesma região variável. Uma vez que a transição para células B maduras IgM^+/IgG^+ é alcançada, o reconhecimento do antígeno leva a proliferação e diferenciação, e proteção a apoptose (Sagaert & De Wolf-Peeters, 2003).

1.3 Ativação do Linfócito B

A ativação de um linfócito B específico é um processo central na resposta imune adaptativa e é iniciada pela ligação do antígeno a imunoglobulinas de membrana (BCR). A IgM e a IgG apresentam caudas citoplasmáticas pequenas, por isso precisam de moléculas auxiliaadoras para levar a transdução do sinal, são estas as Ig α e Ig β , que formam assim o complexo BCR. O reconhecimento do antígeno induz o agrupamento de diversas moléculas de BCR na superfície dos linfócitos B, estas não possuem atividade de tirosina cinase e por isso precisam recrutar cinases para que dessa forma se propague a cascata de sinalização. A cinase recrutada é a tirosina cinase Src, que leva a fosforilação dos motivos ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif*) encontrados nas porções citoplasmáticas das moléculas de Ig α e Ig β , ativando o complexo BCR. Uma vez fosforilados, estes ITAMs se tornam sítios de recrutamento para outras proteínas cinases de tirosinas. Dessa forma uma cascata de sinalizações se propaga dentro da célula ativando algumas vias que são fundamentais para a ativação dos linfócitos B como a via de cálcio, a via de PKC e das proteínas Ras-MAP. Somadas, estas vias disparam processos bioquímicos intracelulares que culminam com a indução de diversos fatores de transcrição, como NFAT, NF κ B e AP-1. Uma vez ativados, estes fatores de transcrição são translocados para o núcleo, onde participam da regulação da expressão de uma série de genes (Birkeland & Monroe, 1997; De Franco, 1997; Reth & Wienlands, 1997). O sinal resultante induzido pela ligação do antígeno ao BCR pode ser mimetizado *in vitro*

utilizando moléculas anti-IgM e pelos equivalentes farmacológicos forbol ester e ionóforo de cálcio (Venkataraman *et al.*, 1994).

Após o encontro com o antígeno a resposta do linfócito B pode ser dividida em dois tipos: dependente da ajuda de células T e independente de células T. Numa resposta independente, os linfócitos B irão desencadear a eliminação de antígenos lipídicos, polisacarídicos e também, RNA dupla fita, nucleotídeos CpG não metilados, entre outros (McHeyzer-Williams, 2003). Nesse tipo de resposta além do BCR, outros receptores importantes nos linfócitos B irão reconhecer e participar da eliminação do antígeno. Estes são os receptores *Toll-like* (TLR) formados por uma família com 10 membros em mamíferos. Todos os TLR, com exceção do TLR3, são acoplados a molécula adaptadora MyD88 (*Myeloid Differentiation Factor 88*) e são capazes de ativar o fator nuclear NF κ B para a indução de inúmeros genes dependentes deste fator. Os TLR3 e TLR4 também são acoplados ao TRIF (*TIR domain-containing adapter-inducing INF- β*) que induz a produção de interferon tipo I. Em alguns tipos celulares os receptores *Toll-like* induzem outros tipos de sinalizações como a cascata de MAP cinases, que leva a ativação do fator de transcrição AP-1. Genes que são expressos em resposta a sinalização via TLRs incluem as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-12, moléculas de adesão endotelial, como a selectina E, e proteínas envolvidas no mecanismo de morte do patógeno, como a óxido nítrico sintase. Em linfócitos B a ativação destes receptores leva à divisão celular e a troca de isotipo de imunoglobulina. (Gerondakis *et al.*, 2007; Lanzavecchia & Sallusto, 2007).

Uma resposta a antígenos proteicos requer o reconhecimento do antígeno pela célula T e a cooperação entre o linfócito B e T específicos para aquele antígeno. Neste tipo de resposta então, os linfócitos B precisam do auxílio de células T CD4⁺ ativadas, que através da produção de citocinas e da expressão de receptores de membrana irão induzir diversos processos importantes nos linfócitos B como a expansão clonal, a troca do isotipo de imunoglobulina, a maturação da afinidade do anticorpo e a diferenciação em células de memória (McHeyzer-Williams *et al.*, 2001) (Figura 3). Os linfócitos B, após encontrarem o antígeno, serão ativados, e também, através do processo de endocitose irão internalizar o antígeno, processá-lo e então apresentá-lo no contexto do MHC de classe II. Nesse momento o linfócito B precisa entrar em contato com o linfócito T CD4⁺ ativado para que continue no caminho da diferenciação em células efetoras. Essa cooperação necessita de contato entre as células e para que isso ocorra ambas as células devem migrar para o sítio de interseção da região de linfócitos T e B nos órgãos linfóides periféricos. Nesse momento os linfócitos B irão apresentar o antígeno para as células T ativadas no contexto do MHC de classe II (Germain, 1994). Esta apresentação será essencial para a diferenciação das células T CD4⁺ em diferentes subtipos de células, conhecidas como Th1 e Th2 (*T helper cell*), que são caracterizadas por padrões específicos de produção de citocinas (Abbas *et al.*, 1996; Constant & Botomlly, 1997). Além da interação entre o TCR e o MHC-II, outras moléculas apresentam importantes papéis nesse processo de interação como a CD40L/CD40 e a CD28/CD80-86 (Bishop & Hostager, 2001; Lenschow *et al.*, 1996; Quezada *et al.*, 2004). Além disso, citocinas secretadas pelos linfócitos T CD4⁺ serão reconhecidas pelos seus respectivos receptores em linfócitos B, onde

ativarão diversas modificações importantes, mencionadas anteriormente (McHeyzer-Williams, 2003; MacConmara & Lederer, 2005) (Figura 4).

Dessa forma há a formação de plasmócitos, células B que secretam anticorpos, e assim a resposta imune humoral contra antígenos proteicos será desencadeada. Um encontro posterior com o mesmo antígeno levará a uma resposta mais rápida e eficiente devido à presença de células de memória geradas no primeiro encontro com o antígeno (McHeyzer-Williams, 2003; Sagaert & De Wolf-Peeters, 2003).

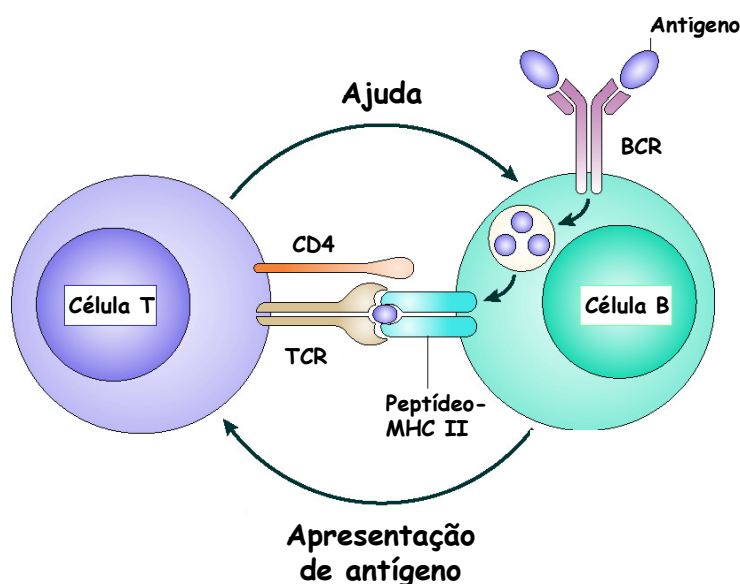


Figura 4: Interações entre as células B e T na resposta a um antígeno proteico. Linfócitos B reconhecem o antígeno através da imunoglobulina de membrana (BCR) e endocitam este antígeno, que será processado e apresentado no contexto do MHC de classe II. Nesse momento, eles migram para região de interseção entre as áreas de linfócitos T e B, à procura do linfócito T ativado. O contato é realizado não só entre o TCR e o MHC II, outras moléculas também estão envolvidas. Ao reconhecer o peptídeo, os linfócitos T secretam diversas citocinas que serão responsáveis por diversas modificações nos linfócitos B. Já os linfócitos B, ao apresentarem o antígeno para o linfócito T CD4⁺, irão induzir a diferenciação destas células em subtipos conhecidos como Th1 e Th2 (Adaptado Edwards & Cambridge, 2007).

1.4 NFAT e linfócito B.

Os fatores de transcrição NFAT1, 2 e 4 são expressos em diversas células linfóides, onde regulam a expressão de citocinas (Rao *et al.*, 1997). Tanto em linfócitos T quanto em linfócitos B o aumento intracelular de cálcio e da atividade da calcineurina em resposta a estímulos via TCR e BCR, respectivamente, leva à rápida ativação e translocação nuclear dos fatores da família NFAT (Antony *et al.*, 2003; Engeke *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 1997). Em linfócitos B, além da via BCR, as proteínas da família NFAT podem ser ativadas através da ligação ao CD40 (Choi *et al.*, 1994; Venkataraman *et al.*, 1994).

Comparado com o bem estudado papel do NFAT nos linfócitos T, pouco se sabe a respeito da função destes fatores em linfócitos B, apesar de já ter sido mostrado que o NFAT é expresso de forma semelhante em linfócitos B e em linfócitos T (Brabletz *et al.*, 1991).

O único gene alvo do NFAT caracterizado específico de linfócitos B é o gene CD5. O NFAT é capaz de se ligar ao *enhancer* deste gene e promover assim a sua transcrição (Berland & Wortis, 1998). O CD5 é uma glicoproteína de membrana envolvida na regulação da sinalização mediada pelo BCR. Este gene é induzido em linfócitos B do baço, e constitutivamente expresso em linfócito T e em um subtipo de linfócitos B, os B-1a (Bandyopadhyay *et al.*, 1995; Teutsch *et al.*, 1995).

Diferentes estudos com animais deficientes para alguns membros da família NFAT foram realizados, onde foi possível verificar alguns efeitos desses fatores na fisiologia das células B. Foi visto um papel importante para o NFAT2 na geração

de um tipo específico de linfócitos B, os linfócitos B-1a, que estão envolvidos com a resposta independente de linfócitos T (Berland & Wortis, 2003). Também, linfócitos B de animais deficientes para NFAT2 apresentavam uma resposta diminuída quando ativados via BCR ou CD40 e uma redução nos níveis de IgG1 e IgE quando comparados aos animais selvagens (Yoshida *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998b). Trabalhos recentes relacionaram este fator de transcrição com a regulação de genes importantes para a sobrevivência dos linfócitos B. Foi visto que o NFAT2, em dois tipos de linfomas B, era capaz de se ligar à região promotora e ativar a transcrição dos genes de CD40L e BLyS, importantes fatores envolvidos com a sobrevivência dos linfócitos B. Sendo que a administração de FK506, um inibidor da calcineurina, era capaz de reduzir a proliferação destes linfomas através da inibição do NFAT2 e consequentemente da diminuição de CD40L e BLyS (Pham *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2006).

Pouco se sabe sobre o papel do membro NFAT1 em linfócitos B. Foi visto, em animais deficientes para esse fator de transcrição, um aumento do tamanho do baço e também um acúmulo de linfócitos B na periferia, em animais velhos (Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1998). O único processo biológico em linfócitos B que o NFAT1 foi descrito estar envolvido é a tolerização a antígenos próprios (Healy *et al.*, 1997; Barrington *et al.*, 2006). Entretanto, mesmo a regulação deste processo pelo NFAT1 apresenta certa divergência, já que um outro trabalho utilizando animais deficientes para calcineurina em linfócitos B, mostrou que os fatores de transcrição da família NFAT são importantes para a ativação das repostas imunogênicas, sendo requisitados para a produção de

anticorpos, para a total diferenciação em plasmócitos, porém não sendo necessários para as repostas tolerigênicas (Winslow *et al.*, 2006).

Os estudos com os animais deficientes para os diferentes membros da família NFAT trouxe resultados importantes para melhor esclarecer a participação desses fatores no desenvolvimento, ativação e diferenciação de diversos tipos celulares. Porém, o papel dos fatores de transcrição NFAT em linfócitos B ainda requer vasto estudo.

1.5 Ciclo celular e câncer.

A proliferação celular envolve a replicação do DNA, seguida pela divisão nuclear e a divisão citoplasmática para assim gerar duas células filhas. A regulação desse processo é realizada de forma controlada e seqüencial, onde as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDK) orquestram de forma específica todo este processo (Sherr, 1996; Nurse, 2000).

O ciclo celular pode ser dividido em diferentes etapas: a fase S, momento em que as células replicam o seu DNA e a fase M, onde há a segregação dos cromossomos de forma igual e a célula efetivamente se divide em duas células filhas. Estas duas são intercaladas por outras duas etapas: a G_1 e a G_2 , onde ocorrem atividades metabólicas intensas de preparação para as fases S e M, respectivamente. Além dessas, há ainda a fase G_0 , onde as células permanecem num estado de quiescência que é mantido até que sinais mitogênicos estimulem a célula a progredir por G_1 (Sherr, 1996; Nurse, 2000; Evan & Vousden, 2001) (Figura 5).

A passagem pelo ciclo celular é controlada por complexos com atividade cinase. Estes complexos contêm tanto uma subunidade regulatória, composta pelas ciclinas e uma subunidade catalítica, as CDKs, que juntas irão fosforilar diversos substratos. A regulação das ciclinas é realizada durante o ciclo celular através da transcrição gênica e ocorre de forma coordenada ditando a formação de distintos complexos ciclinas-CDKs durante as diferentes fases do ciclo celular. Já as CDKs são proteínas de vida longa na célula e são reguladas por fosforilação (Morgan, 1995; Sherr, 1996; Pavletich, 1999).

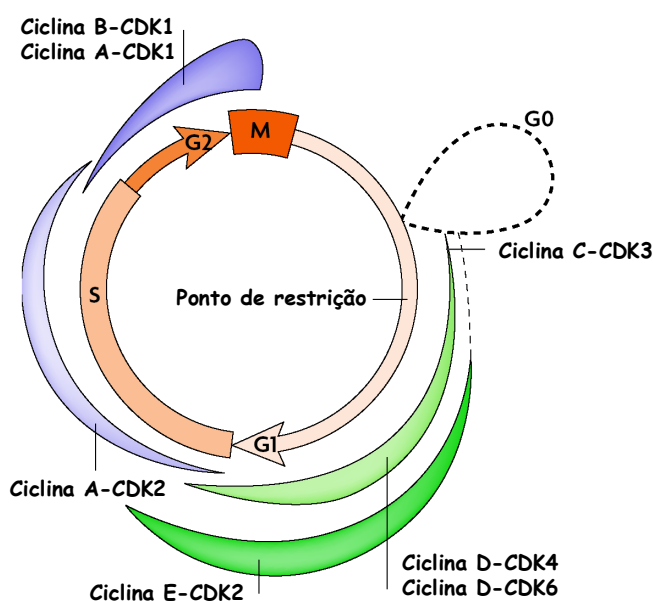


Figura 5: As fases do ciclo celular. O ciclo celular é dividido em quatro etapas: fases G₁, S, G₂ e M. As etapas de duplicação do DNA (fase S, síntese) e divisão celular (fase M, mitose) são alternadas pelas fases G₁ e G₂ ("Gap"). A associação específica entre ciclinas e CDKs determina a transição seqüencial e unidirecional entre as fases do ciclo celular. A saída do estágio de quiescência G₀ depende de estímulos mitogênicos extracelulares (Adaptado Collier, 2007).

Existem outras proteínas que irão interagir com esses complexos ciclinas-CDKs, são as chamadas proteínas inibidoras de CDK. Estas proteínas são divididas em duas famílias: Cip/Kip e INK4, que irão fosforilar e assim inativar as CDKs. A família Cip/kip é responsável pela inibição da CDK2, e dessa forma a inibição da transição da fase G₁ para a S, enquanto que a família INK4 inibe as CDK4 e CDK6 no início da fase G₁ (Sherr & Roberts, 1999 e 2004; Pavletich, 1999).

O início do ciclo celular é mediado por duas famílias: as cinases dependentes de ciclina D e as dependentes de ciclina E. As ciclinas D (D1, D2 e D3) interagem com a CDK4 e CDK6 podendo formar até seis possíveis combinações, que são expressas num padrão tecido-específico. A ciclina D depende de fatores de crescimento para indução de sua síntese. Dessa forma a ciclina D exerce o papel de sensor de fatores de crescimento, formando complexos ativos com as cinases em resposta a estímulos extracelulares. O complexo de ciclina D-CDK4/6 leva a fosforilação de Rb (Bates *et al.*, 1994; Matsushime *et al.*, 1994; Meyerson & Harlow, 1994). A proteína Rb encontra-se associada ao fator de transcrição E2F e esta ligação torna o fator inativo. Após a fosforilação de Rb, o E2F é liberado (Meyerson e Harlow, 1994; Ekholm e Reed, 2000; Massagué, 2004). Agora livre, este fator irá ativar a transcrição de diversos genes envolvidos na passagem da fase G₁ para a fase S, e também genes importantes para a própria fase S. Além das ciclinas E e A, o E2F irá ativar genes envolvidos na replicação do DNA como a DNA polimerase α (Dyson, 1998; Harbour e Dean, 2000). Uma outra importante função do complexo ciclina D-CDK4/6 é o seqüestro dos inibidores de CDK,

especificamente os da família Cip/Kip permitindo assim que a CDK2, juntamente com a ciclina E e a ciclina A, fiquem livres e possam fosforilar seus alvos na transição entre as fases G_1 e S. A ciclina E (E1 e E2) interage com a CDK2 formando um complexo ativo que juntamente com a ciclina D-CDK4/6, irá fosforilar Rb criando um *feedback loop* que ajuda a entrada na fase S (Harbour *et al.*, 1999). A partir desse momento há uma perda da necessidade de fatores mitogênicos para levar a fosforilação de Rb e a progressão pelo ciclo celular, já que a ciclina E-CDK2 assume essa função. Esse ponto é conhecido como ponto de restrição. A atividade do complexo ciclina E-CDK2 tem um pico na transição G_1 -S onde é substituído então pelo complexo ciclina A-CDK2 (Ekholm & Reed, 2000; Massagué, 2004) (Figura 5).

A ciclina A pode se associar com CDK2 ou CDK1 e regular tanto a passagem pela fase S quanto a transição G_2 /M, respectivamente (Girard *et al.*, 1991; Pagano *et al.*, 1992). Durante a fase S, a ciclina A mantém a proteína E2F livre do inibidor Rb, impedindo o regresso a G_1 (Xu *et al.*, 1994). Durante a fase G_2 , o complexo ciclina B-CDK1 fosforila proteínas que regulam diferentes eventos da mitose, como a ruptura da membrana nuclear, a condensação dos cromossomos e a formação do fuso mitótico (Takizawa e Morgan, 2000; Smits e Medema, 2001). Recentemente, a saída do estágio de quiescência G_0 se mostrou dependente da fosforilação de Rb pelo complexo ciclina C-CDK3 (Ren e Rollins, 2004) (Figura 5).

Conhecendo o papel destes diversos complexos e proteínas citadas acima na progressão pelas diferentes fases do ciclo celular, não é surpreendente que o erro nestas etapas leve ao crescimento celular desordenado, que possivelmente pode evoluir ao câncer (Kastan & Bartek, 2004). De fato, diversos destes genes

são encontrados mutados ou superexpressos em cânceres. O primeiro gene supressor a ser descrito foi o Rb. Mutações herdadas nesse locus levam à formação de retinoblastoma (Sherr, 2004). A superexpressão de ciclina D1 é encontrada em quase 50% dos tumores de mama (Donnellan & Chetty, 1998). Já a superexpressão de ciclina E está relacionada a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama e encontra-se aumentada em 15% dos carcinomas gástricos (Keyomarsi *et al.*, 1994 e 2002; Donnellan & Chetty, 1999). Além desses tumores, a superexpressão de ciclina E também foi identificada em diversos tipos de leucemias e linfomas (Donnellan & Chetty, 1999; Scuderi *et al.*, 1996; Hwang & Clurman, 2005). Já a ciclina A é encontrada desregulada em diversos tipos de cânceres, como leucemias, câncer de mama, câncer de testículo, mas é no hepatocarcinoma celular que esta ciclina é mais comumente encontrada superexpressa (Chao *et al.*, 1998; Yam *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1999; Huuhtanen *et al.*, 1999). Estes são apenas alguns exemplos, mas que enfatizam a importância destas proteínas e daquelas que regulam a sua expressão no andamento normal do ciclo celular.

Porém, para uma célula se tornar maligna, outros eventos além da desregulação do ciclo celular devem ocorrer. Esta célula deve se tornar independente de fatores de crescimento, ser capaz de escapar do processo de morte celular programada, ser capaz de induzir a angiogênese e invadir outros tecidos (Hanahan & Weinberg, 2000). Diversas proteínas estão envolvidas na regulação destes processos e podem ser encontradas alteradas em diversos tipos de tumores. Como por exemplo, a proteína p53 que é responsável pela indução de apoptose em resposta a danos celulares. Esta proteína é encontrada com

mutação de perda de função em mais de 50% dos cânceres humanos. Em diversos linfomas é observada a superexpressão do gene *c-Myc*, que leva a um aumento proliferativo da célula e assim à independência de fatores mitogênicos, em associação com a superexpressão também do gene anti-apoptótico Bcl-2 (Hanahan & Weinberg, 2000; Lowe *et al.*, 2004; Vogelstein & Kinzler, 2004).

1.6 NFAT, ciclo celular e câncer.

O aumento intracelular de cálcio é um processo central para a ativação celular. Diversos trabalhos já demonstraram que a sinalização via cálcio estimula a transcrição gênica associada com a progressão do ciclo celular e que também essa via promove a transição G₁/S (Anraku *et al.*, 1991; Tomoto *et al.*, 1996; Lipskaia & Lompré, 2004). Além disso, se sabe que a calcineurina apresenta um papel importante na regulação da progressão do ciclo celular, agindo durante as fases iniciais de G₁ (Baksh *et al.*, 2000; Tereda *et al.*, 1991; Tomoto *et al.*, 1998). Juntos estes resultados sugerem que as proteínas da família NFAT, que são ativadas pela via de cálcio e calcineurina, poderiam ser os mediadores centrais da regulação da maquinaria do ciclo celular.

Já foi mostrado que a Ciclosporina A inibe a expressão das ciclinas A e E em fibroblastos 3T3 e também a expressão de dois inibidores de CDK, o p21^{Waf/Cip1} e o p27^{KIP1}, em queratinócitos (Tomoto *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 2001). Além disso, NFAT1 e NFAT2 agindo em colaboração com os fatores de transcrição Sp1/Sp3 eram capazes de aumentar a transativação do promotor de p21^{Waf/Cip1} (Santini *et al.*, 2001).

Recentemente, foi demonstrado que o fator de transcrição NFAT1 podia se ligar à região promotora do gene de CDK4 e regular de forma negativa a sua expressão (Baksh *et al.*, 2002). Esta regulação era independente da associação com seu parceiro transcricional, o AP-1. Além disso, o NFAT1 também foi implicado no controle de alguns genes de ciclinas, agindo como regulador negativo da expressão destes genes em experimentos com linfócitos primários NFAT1^{-/-}, onde também foi observada uma hiperproliferação deste tipo celular (Caetano *et al.*, 2002). A regulação negativa do gene de ciclina A2 pelo fator de transcrição NFAT1 foi recentemente confirmada no trabalho de Carvalho e colaboradores, (2007). Ainda, a ausência de NFAT1 dispara o crescimento e a diferenciação desordenada de células do tecido cartilaginoso (Ranger *et al.*, 2000).

Outro trabalho recente descreveu um papel oncogênico para o fator NFAT2 em pré-adipócitos 3T3-L1, onde o NFAT2 promovia a progressão do ciclo celular, mesmo em baixas concentrações de soro, e também induzia a expressão aumentada de genes relacionados ao ciclo como a ciclina D1, a ciclina D2 e *c-Myc*, e ainda era observado um aumento da fosforilação da proteína Rb (Neal & Clipstone, 2003).

Resultados para o papel dos fatores de transcrição no desenvolvimento de tumores foram demonstrados nos trabalhos com câncer de colon e de mama, onde o NFAT foi relacionado à metástase tumoral. Foi visto que a integrina $\alpha 6 \beta 4$ ativava os fatores NFAT1 e NFAT5 que então eram capazes de promover a invasão de células de tumores de mama, através da ativação de COX-2, um importante fator na carcinogênese epitelial (Jauliac *et al.*, 2002; Yiu & Toker,

2006). Resultado semelhante foi observado em câncer de cólon, onde o NFAT1 e o NFAT2 aumentavam a expressão de COX-2 (Duque *et al.*, 2005). Está invasão de células tumorais de mama induzida por NFAT era bloqueada pelos sinais de Akt/PKB, que regulava a degradação das proteínas NFAT (Yoeli-Lerner *et al.*, 2005).

Dependendo do tipo celular, a enzima COX-2 pode levar ao aumento da proliferação celular, promoção da angiogênese, inibição da apoptose e estimulação da mobilidade/invasão, através da ativação de prostaglandinas. Além da indução da mobilidade/invasão via ativação de COX-2, o NFAT pode induzir a formação de novos vasos sanguíneos, essencial para o desenvolvimento de tumores. Foi verificado que a expressão de COX-2 induzida pelo fator VEGF em células endoteliais requeria a ativação de NFAT (Iniguez *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2001).

As proteínas NFAT também podem regular outros fenômenos biológicos relacionados a tumorigênese além do ciclo celular, angiogênese e metástase. Os mecanismos de apoptose são essenciais para a progressão celular normal sendo que falhas na sua execução podem levar ao descontrole da proliferação (Lowe *et al.*, 2004). De fato, o NFAT é capaz de induzir a expressão de moléculas pró-apoptóticas como TNF- α , EGR e FasL (McCaffrey *et al.*, 1994; Latinis *et al.*, 1997; Rengarajan *et al.*, 2000b; Chupvilo *et al.*, 2002). Por outro lado, o NFAT pode resgatar células da apoptose através da indução de genes anti-apoptóticos, como o Bcl-2 (Oukka *et al.*, 1998; Manicassamy *et al.*, 2008). Apesar de controversos,

estes dados indicam que as proteínas da família NFAT participam do controle da apoptose, impedindo eventualmente o surgimento de tumores.

Trabalhos mais recentes com tumores observaram papéis importantes para os fatores da família NFAT. Em linfoma de Hodgkin foi visto uma supressão de NFAT2 (Marafioti *et al.*, 2005). Já em um subtipo de linfomas B de células grandes, foram encontrados constitutivamente ativos e interagindo entre si, o NFAT2 e o c-Rel. Neste estudo, os fatores estavam controlando a expressão de CD40L e permitindo assim a manutenção da sobrevivência destes linfomas (Pham *et al.*, 2005). De forma semelhante, em linfomas B de células grandes e linfomas de células do manto, as proteínas NFAT1 e NFAT2, contribuíram para a expressão constitutiva do ativador de linfócitos B (BLyS ou BAFF), suportando também a sobrevivência e proliferação destas células (Fu *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram reportados para leucemias linfoblásticas agudas de células T, onde a ativação da calcineurina é um processo crítico para a manutenção do fenótipo leucêmico (Medyouf *et al.*, 2007). Já em tumores sólidos, o NFAT2 foi visto superexpresso em tumores pancreáticos humanos, onde era responsável por aumentar a expressão de *c-Myc* (Buchholz *et al.*, 2006). Nesse caso, a inibição da via cálcio/calcineurina resultou na atenuação da proliferação celular e do crescimento independente de ancoragem dos tumores (Buchholz *et al.*, 2006).

Como demonstrado até aqui, as proteínas NFAT são capazes de ativar a expressão de genes envolvidos em diversos processos biológicos, como a resposta imune, o ciclo celular, a apoptose e a angiogênese, entre outros. Dado a importância desses fenômenos no desenvolvimento de células malignas, é de extrema importância entender como ocorre a regulação do ciclo celular pelas

proteínas NFAT e seu envolvimento na transformação maligna. Juntos, os resultados acima indicam que a alteração na via calcineurina/NFAT apresenta um papel importante na carcinogênese, e revelam essa via como um potencial alvo terapêutico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral.

Considerando que os fatores de transcrição da família NFAT participam de diferentes fenômenos celulares, o objetivo geral deste trabalho é investigar o envolvimento do fator de transcrição NFAT1 na proliferação e malignização celular.

2.2 Objetivos específicos.

2.2.1 Avaliar a participação do NFAT1 na proliferação de linfócitos B.

2.2.2 Avaliar a expressão diferencial de genes que regulam o ciclo celular nos linfócitos B.

2.2.3 Avaliar o efeito da expressão condicional do gene NFAT1 na proliferação da linhagem celular CHO.

2.2.4 Analisar a participação do fator NFAT1 na malignização celular.

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagens celulares

- a) células CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) – ovário de hamster, doadas pela Prof^a. Maria Bellio – UFRJ.
- b) células CHO-LacZeo – ovário de hamster transfectado com o vetor pFRT/LacZeo do kit Flip-In T-Rex (Invitrogen).
- c) células CHO-NFAT1 – ovário de hamster transfectado com o kit Flip-In T-Rex (Invitrogen).
- d) células 697 - linfócito B humano, doado pelo Dr. Martin Bonamino – INCA.

3.2 Cultura de Linhagem celular

As linhagens celulares CHO-LacZeo, CHO-NFAT1 e 697, foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutamina, 100mg/L de estreptomicina, 100.000U/L de penicilina, 2,0g/L de bicarbonato de sódio. As células foram mantidas em 5% de CO₂ a 37°C. Para desaderir a linhagem celular CHO-NFAT1, foi utilizado Tripsina 0,25% e 4mM EDTA.

3.3 Cultura de células primárias

As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutamina, 100mg/L de estreptomicina, 100.000U/L de penicilina, 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 100mg/L de piruvato de sódio, 1x vitaminas, aminoácidos essenciais, 10mM de HEPES pH 7,4, 55µM de 2-mercaptoetanol e 3,75g/L de bicarbonato de sódio. As células foram mantidas em 5% de CO₂ a 37°C.

3.4 Animais

Foram utilizados em todos os experimentos camundongos selvagens (NFAT1^{+/+}) e deficientes para NFAT1 (NFAT1^{-/-}) com oito a doze semanas de idade. Os animais foram acasalados e mantidos no biotério do Instituto Nacional de Câncer (INCA), conforme os padrões estabelecidos pelo guia de tratamento de animais do *National Institute of Health (NIH)*. Os animais BALB/c nude/nude foram obtidos do IPEN/CNEN/SP–Centro de biotecnologia, com oito a doze semanas de vida e mantidos no biotério do INCA.

3.5 Purificação de linfócitos de camundongos

Em todos os experimentos, os linfócitos primários (linfócitos B, T CD4⁺ e T CD8⁺) foram obtidos de linfonodos totais (inguinal, braquial, axilar e cervical) de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} não imunizados. Suspensões purificadas de células

foram obtidas por seleção negativa com contas magnéticas (Micro Beads, MACS technology) de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec). As células foram marcadas com anticorpos biotinilados conjugados a contas magnéticas associadas à estrepto-avidina. Os seguintes anticorpos biotinilados foram utilizados para que fossem selecionadas populações celulares não desejadas: anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (53.6-7) e anti-B220/CD45R (RA3-6B2) (BD Pharmingen). Posteriormente, as células de interesse eram eluídas enquanto que as não desejadas que estivessem marcadas ficavam retidas na coluna magnética. O grau de pureza das células era avaliado por citometria de fluxo no FACSCalibur (Becton Dickinson) utilizando os seguintes anticorpos: anti-CD4-PE (GK1.5), anti-CD8-FITC (53.6-7), anti-B220/CD45R-FITC (RA3-6B2) e anti-CD3-PE (2C11) (BD Pharmingen). As populações eram isoladas com mais de 90% de pureza. Em todos os experimentos foram utilizadas suspensões celulares normalizadas entre um conjunto de três animais.

3.6 Transfecção estável da linhagem celular CHO utilizando o Sistema Flp-In™ T-Rex™ (Invitrogen)

O vetor pFRT/LacZeo foi transfectado em uma suspensão celular da linhagem celular CHO de $3,0 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI sem soro. Foi utilizado para transfecção 5µg do vetor pFRT/LacZeo ressuspendido em água. A transfecção foi realizada nas seguintes condições: 950µF, 250V, capacitância máxima e tempo constate. Em seguida, as células foram cultivadas em 10mL de meio RPMI com soro em placas de 10cm². Após 24 horas de cultura foram

adicionados 500mg/mL de zeocina. A pressão seletiva com o antibiótico zeocina foi mantida por três semanas. A cada três dias o meio com o antibiótico era trocado e os clones resistentes retirados e passados para placas de 24 poços. Esses clones foram expandidos e congelados no nitrogênio líquido em SFB com 10% de DMSO.

Foi selecionado um clone que possuía uma única inserção do vetor pFRT/LacZeo numa região de alta atividade transcricional (CHO-LacZeo) (Bastos, 2007). Posteriormente, a linhagem CHO-LacZeo foi transfectada com o vetor pcDNA6/TR. O mesmo protocolo citado acima de transfecção foi utilizado. As células foram selecionadas com o antibiótico blasticidina (5µg/mL). Em seguida o vetor pcDNA5/FRT/TO foi transfectado. Este vetor possuía o cDNA do NFAT1 clonado, que foi retirado do plasmídeo original pFBOS (cedido pela Dr. Anjana Rao). O vetor pcDNA5/FRT/TO-NFAT1 foi transfectado na linhagem celular CHO-LacZeo mais pcDNA6/TR (5 x 10⁶ células/ 600µL) juntamente com o vetor de expressão da recombinase pOG44 (Invitrogen). Foi adicionado 6µg do vetor pcDNA5/FRT/TO-NFAT1 e 60µg do vetor pOG44. A pressão seletiva com o antibiótico higromicina (800µg/mL) foi mantida durante 2 semanas. Ao final desse período, as células foram expandidas e congeladas no nitrogênio líquido em SFB com 10% de DMSO.

3.7 Indução de expressão gênica com doxíciclina

Foi realizada uma curva de dose e uma curva de tempo para doxíciclina na linhagem celular CHO-NFAT1. Foram utilizadas as concentrações de 0, 0,05, 0,1,

0,25, 0,5, 1 e 2µg/ml por 2 horas e os tempos de 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas com 1µg/ml de doxíciclina. A análise foi feita pela extração de proteína total e realização de western *blot* para proteína NFAT1, utilizando anticorpo monoclonal anti-NFAT1 (anti-67.1).

3.8 Análise por *western blot*

As células foram centrifugadas e ressuspensas em 20 µL de tampão de ressuspensão (40 Mm de Tris-Cl pH 7.5, 10 Mm EDTA e 60 Mm pirofosfato de sódio), 20 µL de SDS 10% e 10 µL de β-mercaptoetanol (*loading buffer*) e, aquecidas a 100°C por 15 minutos. Os lisados foram estocados a –80°C.

Os extratos das proteínas foram separados em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE 6-8% (30% bis-acrilamida (29:1) e tampão de separação 4x pH 8.8) a 25mA. Junto com os extratos foi aplicado o padrão de peso molecular (Kaledoscope Prestained Standards-BIORAD). Após a corrida, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose em um tampão de transferência, por corrente elétrica (15 volts), por 1 hora a temperatura ambiente (Trans-Blot[®] Semi-Dry electrophoretic transfer cell - BioRad)

Após transferência, as membranas foram bloqueadas com TBS mais 5% leite desnatado por duas horas. Depois do bloqueio, as membranas eram lavadas com TBS-Tween 0,05% e então incubadas por duas horas com os anticorpos primários: anti-67.1 (anti-NFAT1 - monoclonal), anti-GAPDH (Santa Cruz, clone 6C5), anti-ciclina A (Santa Cruz, clone C-19), anti-ciclina E (Santa Cruz, clone M-20) ou anti-ciclina E2 (Santa Cruz, clone N-20). Os anticorpos anti-ciclina E e anti-

ciclina E2 foram incubados também com 5% de leite desnatado. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-Tween 0,05% e incubadas por 1 hora com os anticorpos secundários: anti-coelho, anti-cabra ou anti-rato, conjugados a peroxidase (HRP). Em seguida, as membranas foram lavadas seis vezes com TBS-Tween 0,05% e incubadas com o substrato da peroxidase pelo kit “ECL Western blotting detection reagent” (Amersham Biosciences) como indicado pelo fabricante e autoradigrafadas.

3.9 Análise do ciclo celular

Linfócitos B primários de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram isolados, como descrito acima, e foram cultivados (1×10^6 células/poço) sem estímulo ou estimulados *in vitro* com PMA (10nM) mais ionomicina (1,0μM) por diferentes tempos. Para análise das fases do ciclo celular as células foram marcadas com 500 μL de tampão de iodeto de propídeo (Tris 3.4 mM pH 7.6; NaCl 10 mM; NP-40 0.1%; RNase 700 U/L; PI 0.075 mM) por 15 minutos a 4°C na ausência de luz (Vindelov, 1977). Após o tempo de marcação, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson).

Antes da análise das fases do ciclo celular na linhagem celular CHO-NFAT1, esta foi sincronizada em meio RPMI 0,5% SFB por 72h. O sincronismo foi confirmado com uma análise das fases do ciclo celular. Após a sincronização, as células foram cultivadas ($1,5 \times 10^5$ células/poço) em RPMI 10% SFB e então incubadas ou não na presença de 1,0μg/mL de doxiciclina por diferentes tempos

e a análise das fases do ciclo celular foi realizada como descrita acima por citometria de fluxo.

3.10 Ensaio de proliferação celular

As diferentes células primárias (linfócitos B e T não estimulados) foram isoladas conforme descrito acima e cultivadas (2×10^5 células/poço) em DMEM 10% SFB. As células foram cultivadas sem estímulos (PBS) ou estimuladas *in vitro* conforme indicado: anti-CD3 ($1,0\mu\text{g/mL}$) para linfócitos T e anti-IgM ($5\mu\text{g/mL}$), PMA (10nM), ionomicina ($1,0\mu\text{M}$), Pam3Cys ($0,1\mu\text{g/mL}$), LPS ($1,0\mu\text{g/mL}$) ou CpG ($1,0\mu\text{g/mL}$) para linfócitos B. Para analisar a proliferação celular, as células foram cultivadas na presença de ^3H -timidina ($1,0\text{ }\mu\text{Ci/mL}$) por 8 horas e recolhidas nos tempos indicados (PHDTM Cell Harvester, Cambridge Technology). Em seguida, a incorporação de ^3H -timidina foi dosada em líquido de cintilação através de um contador de partículas β (LS 6000 LL, Beckman Instruments) e expressa em contagens por minuto (CPM).

Para os ensaios de proliferação com a linhagem celular CHO-NFAT1, esta foi sincronizada por 72 horas em RPMI 0,5% SFB. Em seguida foram cultivadas em presença ou em ausência (5×10^3 células/poço) de doxíciclina ($1,0\mu\text{g/mL}$) por 96 horas. As células foram cultivadas na presença de ^3H -timidina e analisadas conforme descrito acima.

Para a linhagem celular CHO-NFAT1 sincronizada ($1,5 \times 10^5$ células/ poço) também foi realizada uma contagem do número de células por tripan nos diferentes tempos de cultivo na presença ou não de doxíciclina ($1,0\mu\text{g/mL}$).

3.11 Ensaio de Cristal Violeta

Células CHO-LacZeo (5×10^3 células/poço) foram cultivadas por diferentes tempos (12, 24, 48, 72 e 96h) com diversas concentrações de doxíciclina: 0, 0,5, 1,0 e $2,0\mu\text{g/mL}$. Após o tempo de cultura determinado, o sobrenadante foi retirado, as células lavadas com PBS, e fixadas por 10 minutos com etanol. Em seguida, as células foram coradas com cristal violeta 0,05% em etanol 20% por 10 minutos e então lavadas com água destilada. O cristal violeta presente nas células coradas foi solubilizado em metanol absoluto e a leitura da placa realizada em espectrofotômetro a 595nm. A absorbância a 595nm foi proporcional ao número de células vivas fixadas.

3.12 RT-PCR

Os linfócitos B foram isolados de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} como descrito acima e foram estimulados (2×10^6 células) *in vitro* com PMA (10nM) mais ionomicina ($1,0\mu\text{M}$) por 24 horas. Já a linhagem celular CHO-NFAT1 foi sincronizada por 72h e então cultivada em RPMI 10% SFB cultivadas na presença ou não de $1,0\mu\text{g/mL}$ de doxíciclina por diferentes tempos. Em seguida, o

RNA total foi extraído com o reagente TRIzol[®] conforme descrito pelo fabricante (Invitrogen). Para os tumores formados pela linhagem celular CHO-NFAT1 nos camundongos BALB/c nude/nude, o RNA foi extraído por TRIzol[®] utilizando um homogenizador. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando o kit da SuperScript III Reverse Transcriptase como descrito pelo fabricante (Invitrogen). A normalização das massas de cDNA foi realizada através da análise da expressão do gene constitutivo de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Foram realizados RT-PCRs para ciclina A2, ciclina E1 e ciclina E2.

As condições de PCR para GAPDH e ciclina A2 foram as seguintes: 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; e extensão final de 72°C por 10 minutos. Para ciclina E1 a temperatura de anelamento foi 58°C e para ciclina E2 foi 60°C. Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2,0% e visualizados com Brometo de Etídeo (0,5µg/mL) em transiluminador ultravioleta (Eagle EyeTM II, Stratagene[®]). Os oligonucleotídeos usados foram os seguintes (IDT):

GAPDH (276 pb): Senso 5' - TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG - 3'

Anti-senso 5' - ACG ACA TAC TCA GCA CCA GCA TCA - 3'

Ciclina A2 (163 pb): Senso 5' – CCT CTC CTC CAT GTC TGT GTT AAG- 3'

Anti-senso 5' – GTG CTC CAT TCT CAG AAG CTG CTT- 3'

Ciclina E1 (276 pb): Senso 5' – TCT GAC CAT TGT GTC CTG GCT GAA - 3'

Anti-senso 5' – TGG GCT TTG TCC AGC AAA TCC AAG- 3'

Ciclina E2 (150 pb): Senso 5' – CCA AAC TTG AGG AAA TCT ACG CTC- 3'

Anti-senso 5' – ACC AGG AGA TGA CTG TTA CTG GAC-3'

3.13 Inoculação em camundongos BALB/c nude/nude

A inoculação em camundongos BALB/c nude/nude foi realizada através de uma injeção subcutânea no dorso do animal. Foram inoculadas 5×10^6 células da linhagem celular CHO-NFAT1. Os animais foram divididos em dois grupos de seis animais. Dois dias antes da inoculação das células, um dos grupos recebeu tetraciclina diluída na água na concentração de $2,5\mu\text{g/mL}$ e o outro grupo recebeu somente água. A água com tetraciclina era trocada a cada três dias. Após a inoculação, os animais foram acompanhados por 30 dias, tendo a cada cinco dias a massa tumoral medida por um paquímetro. Ao final dos 30 dias, os animais foram sacrificados em câmara com saturação de CO_2 . Foi utilizada a seguinte fórmula para obter o volume tumoral: $V = 0,52 \times (\text{dm})^2 \times \text{dM}$, onde dm é o diâmetro menor e dM é o diâmetro maior (Janik et al., 1975).

3.14 Ensaio de proteção a RNase (RPA)

Linfócitos B purificados de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} (2×10^6 células) foram estimuladas *in vitro* com PMA (10nM) mais ionomicina (1,0 μ M) por 24 horas. Após esse tempo, as células foram recolhidas, centrifugadas e o RNA total foi extraído imediatamente do precipitado celular com o reagente TRIzol[®] conforme descrito pelo fabricante (Invitrogen). Os níveis de expressão de RNA mensageiro para a família de fatores *c-Myc* e ciclinas foram avaliados através do ensaio de proteção a RNase (BD RiboQuant[™], BD Pharmingen). Para a análise da expressão dos genes da família *c-Myc* foi usado o conjunto de sondas mMYC, que avaliam a expressão de *sin-3*, *c-Myc*, *L-Myc*, *B-Myc*, *Max* e *Mad*. Para a análise da expressão de ciclinas foram usados os conjuntos de sondas mCYC-1 e mCYC-2, que avaliam a expressão das seguintes ciclinas: A2, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G, H. A normalização das massas de RNA foi realizada através da expressão dos genes constitutivos ribossomal L32 e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

3.15 Ensaio de crescimento em suspensão de agarose

A linhagem celular CHO-NFAT1 ($8,0 \times 10^2$ células) foi colocada em suspensão em uma solução de DMEM 10% SFB e agarose 0,3%. Essa suspensão foi plaqueada em uma placa forrada com uma solução DMEM 10% SFB e agarose 0,6%, já endurecida. No topo da segunda camada de agarose,

também já endurecida, onde as células estavam em suspensão, era adicionado 1 mL de meio de cultura. Nesse meio de cultura era adicionado ou não o antibiótico doxíciclina (1,5µg/mL). Após 20 dias em cultura, trocando o meio de cultura a cada três dias, foi contado o número de colônias formadas e também foi avaliado o tamanho das colônias fotografando-as por microscopia, utilizando o microscópio Zeiss Axiovert S100 em 10X de magnificação.

3.16 Silenciamento da expressão de NFAT1 por siRNA

A linhagem celular 697 ($6,0 \times 10^6$ células) foi transfectada por eletroporação (950µF, 250V, capacitância máxima), em meio RPMI 0%SFB, com siRNA dupla fita contendo 27 nucleotídeos (TriFECTa Dicer-Substrate RNAi kit- IDT). Os siRNA utilizados foram: siRNA *Scramble* (30nM) e siRNA NFAT1 (NM_173091-IDT). O silenciamento da proteína NFAT1 foi realizado utilizando três siRNA NFAT1 diferentes, foi eletroporado 10nM de cada um. Após a transfecção, as células foram cultivadas (2×10^6 células/poço) por 24 e 48 horas e extrato protéico total foi extraído a cada tempo. Em seguida foi realizada a detecção da proteína NFAT1 por *western blot*. Para os ensaios de proliferação, 4×10^3 células eram plaqueadas após serem transfectadas com siRNA *Scramble* (DS) ou com siRNA NFAT1. E então, ensaio de incorporação de ^3H -timidina era realizado como descrito acima no tempo de 72 horas de cultura .

4. Resultados

4.1 NFAT1 regula a proliferação de linfócitos B *naïve*.

As proteínas NFAT já foram relacionadas à proliferação celular em diferentes células e tecidos (Horsley e Pavlath, 2002; Lipskaia e Lompré, 2004), porém o papel específico do membro da família, o NFAT1, na proliferação de linfócitos B e T *naïve* ainda não foi esclarecido. Com a finalidade de analisar o papel específico do NFAT1 na proliferação de linfócitos, diferentes compartimentos linfocitários foram avaliados em camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}. Para isso, linfócitos B e T foram purificados destes animais e cultivados por 36 horas na presença de anti-CD3, para linfócitos T, anti-IgM e PMA mais ionomicina, para linfócitos B. Através do ensaio de incorporação de H³-timidina, foi possível avaliar a proliferação destes tipos celulares. Podemos ver na Figura 6A, que a falta de NFAT1 não afetou a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ primários frente à estimulação com anti-CD3. Contudo, a deficiência em NFAT1 induziu um aumento na proliferação de linfócitos B quando comparado com os linfócitos B do animal selvagem, tanto em resposta a um estímulo específico (Figura 6B, painel esquerdo), quanto em resposta a um estímulo policlonal (Figura 6B, painel do meio).

Levando em consideração a importância das vias que são ativadas pelos receptores *Toll-like* na ativação de linfócitos B (Gerondakis *et al.*, 2007; Lanzavecchia *et al.*, 2007), foi analisado se essas vias também eram capazes de levar a uma diferença na proliferação de linfócitos B NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}. Com

esse objetivo, linfócitos B purificados de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram estimulados *in vitro* com Pam3Cys (TLR2), LPS (TLR4) e CpG (TLR9) por 36 horas, e a incorporação de ³H-timidina foi avaliada. Como podemos ver na Figura 6B painel direito, a ativação dessas vias não induziu uma alteração da proliferação de linfócitos B deficientes para NFAT1 em relação ao linfócito B selvagem. De fato, as vias ativadas pelos receptores *Toll-like* não foram relacionadas até então com a ativação das proteínas NFAT.

Para caracterizar melhor a hiperproliferação dos linfócitos B deficientes para proteína NFAT1, uma análise das diferentes fases do ciclo celular foi realizada através da marcação com iodeto de propídeo. Linfócitos B foram purificados de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} e estimulados com PMA mais ionomicina por diferentes tempos. Foi observado nesta análise que houve um aumento do número de linfócitos B NFAT1^{-/-} nas fases S/G₂/M do ciclo celular em comparação com os linfócitos B selvagens (Figura 7). Juntos estes resultados sugerem que o NFAT1 regula a proliferação de linfócitos B primários e não de linfócitos T, e também indica um papel repressor do ciclo na fase G₁ para esse fator de transcrição.

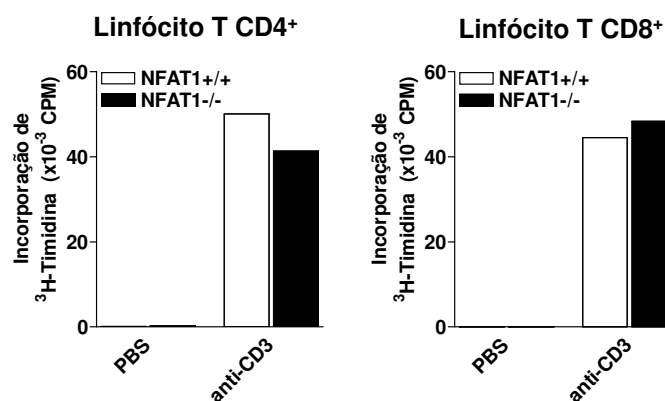
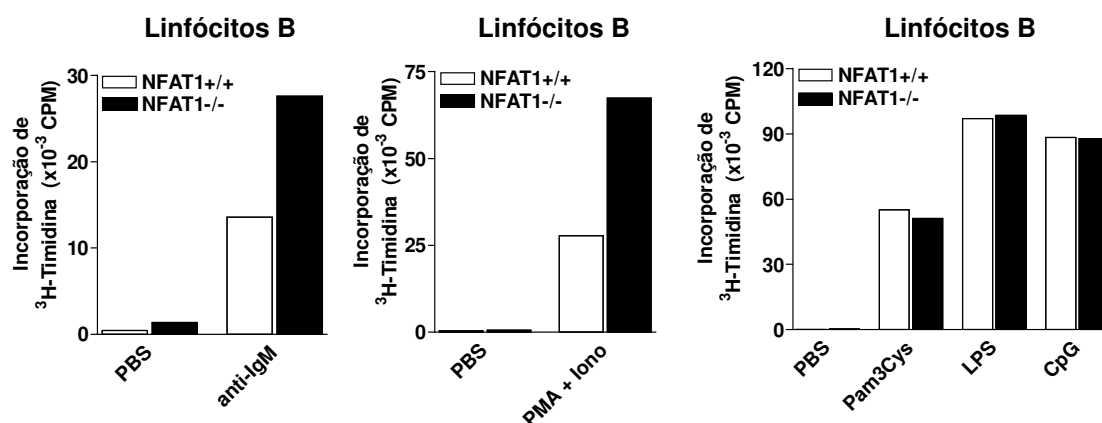
A**B**

Figura 6: NFAT1 regula a proliferação de linfócitos B *naïve*. **A)** Linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (2 x 10⁵ células) purificados de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram não estimulados (PBS) ou estimulados *in vitro* por 36 horas com anti-CD3 ligado a placa (1,0 mg/mL). **B)** Linfócitos B purificados (2 x 10⁵ células) de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram não estimulados (PBS) ou estimulados *in vitro* por 36h com anti-IgM (5,0 µg/mL) (gráfico a esquerda), PMA (10 nM) mais ionomicina (Iono) (1,0 µM) (gráfico do meio), e Pam3Cys (0,1 µg/mL), LPS (1,0 µg/mL) ou CpG (1,0 µg/mL) (gráfico a direita). **A-B)** As células foram pulsadas com ³H-timidina (1,0 µCi/mL) por 8h. Após o tempo indicado, as células foram coletadas e a incorporação de ³H-timidina foi analisada pelo contador β. Estes resultados foram obtidos a partir de um grupo de três animais e são representativos de três experimentos independentes.

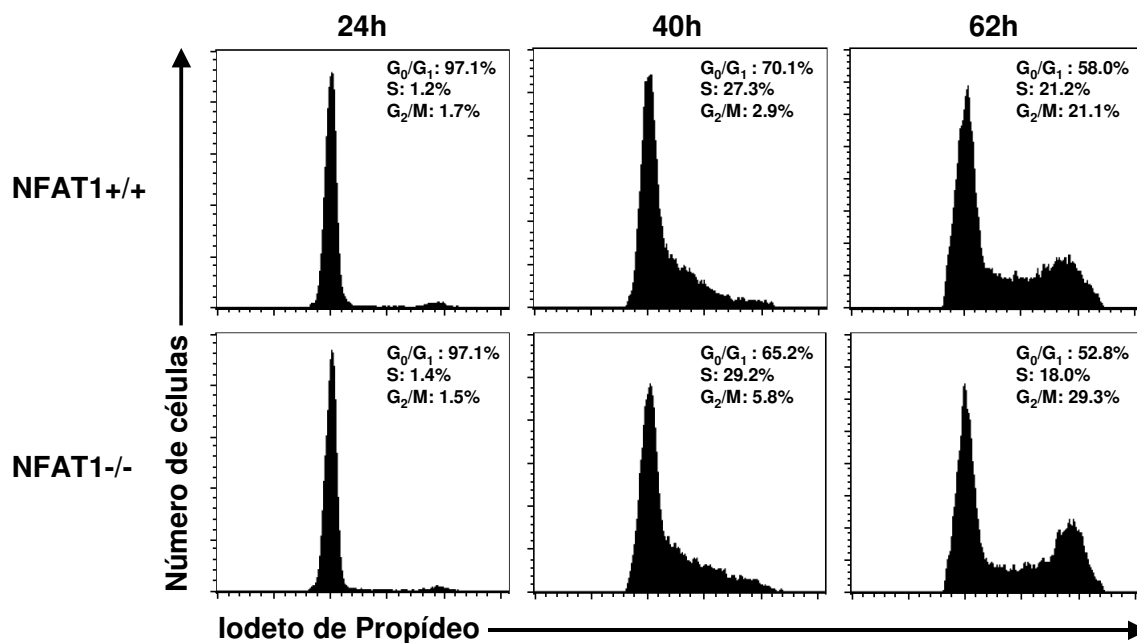


Figura 7: NFAT1 regula a progressão do ciclo celular em linfócitos B *naïve*. Linfócitos B purificados (1×10^6 células) de camundongos *NFAT1*^{+/+} e *NFAT1*^{-/-} foram estimulados *in vitro* com PMA (10 nM) e ionomicina (1,0 μ M) pelos diferentes tempos indicados. Após, as células foram marcadas com iodeto de propídeo e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Esses resultados foram obtidos a partir de um grupo de três animais e são representativos de três experimentos independentes.

4.2 A ausência de NFAT1 induz a morte celular de linfócitos B estimulados.

As proteínas da família NFAT já foram descritas regulando a morte celular em diversos tipos celulares, inclusive em linfócitos (Chupvilo *et al.*, 2002; Rengaranjan *et al.*, 2000). Com o objetivo de avaliar o papel do NFAT1 na morte celular de linfócitos B, foi realizado um ensaio de marcação com iodeto de propídeo em linfócitos B NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} estimulados *in vitro* com PMA e ionomicina por diferentes tempos. A análise da fase Sub-G₀ foi realizada. Nesta análise foi possível verificar um aumento do número de células mortas ao longo do tempo de cultura tanto nos linfócitos B NFAT1^{+/+} quanto no linfócito B NFAT1^{-/-}. Além disso, foi visto um aumento do número de linfócitos B NFAT1^{-/-} na fase Sub-G₀ em relação ao controle, em todos os tempos avaliados (Figura 9). Os resultados até então indicam que apesar dos linfócitos B NFAT1^{-/-} proliferarem mais em relação ao controle, estas células também morrem mais.

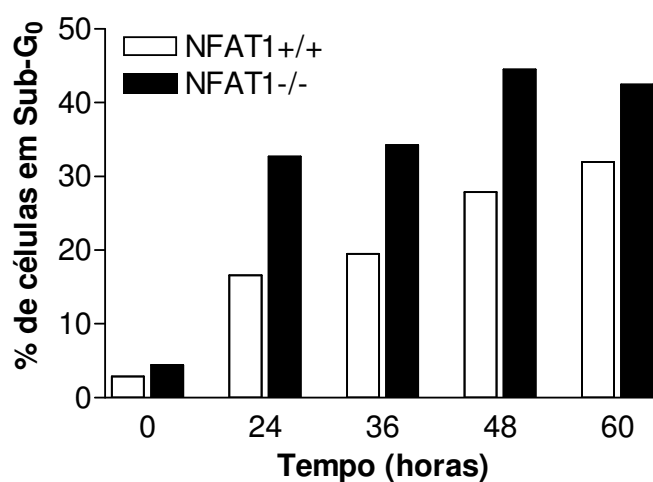


Figura 8: A ausência de NFAT1 induz a morte celular em linfócitos B. Linfócitos B purificados (1×10^6 células) de camundongos NFAT1+/+ e NFAT1 -/- foram estimulados *in vitro* com PMA (10 nM) e ionomicina (1,0 μ M) pelos diferentes tempos indicados. Após, as células foram marcadas com iodeto de propídeo e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Esses resultados foram obtidos a partir de um grupo de três animais e são representativos de três experimentos independentes.

4.3 O NFAT1 inibe a expressão de ciclinas em linfócitos B.

A desregulação de diversas proteínas poderiam estar associadas à hiperproliferação dos linfócitos B deficientes para a proteína NFAT1. Levando em consideração o importante papel do proto-oncogene *c-Myc* nos linfomas de Burkitt e em outras malignidades de linfócito B (Shou *et al.*, 2000; Kuppers, 2005), foi avaliada a expressão de *c-Myc* nessas células. Linfócitos B purificados de animais NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} estimulados com PMA mais ionomicina por 24 horas, tiveram seu RNA extraído e um ensaio de RPA realizado. Interessantemente, nenhuma diferença na expressão dos diversos membros da família *c-Myc* foi observada entre os linfócitos B selvagens e deficientes para proteína NFAT1 (Figura 9, painel esquerdo).

A progressão do ciclo celular é ditada pela ativação de diversos complexos proteicos, onde as ciclinas desempenham um papel fundamental no seguimento e especificidade das diferentes fases do ciclo (Morgan, 1995; Sherr, 1996; Pavletich, 1999). Uma vez que genes de ciclinas são precisamente regulados durante o ciclo celular através da transcrição gênica e apresentam sítios de ligação para a proteína NFAT em suas regiões promotoras, a desregulação destas poderia explicar a hiperproliferação observada em linfócitos B NFAT1^{-/-}. Com isso então, a expressão de diversas ciclinas foi avaliada em linfócitos B selvagens ou deficientes para o fator de transcrição NFAT1 através do ensaio de proteção a RNase (RPA). Este ensaio indicou que linfócitos B NFAT1^{-/-} apresentam um aumento na expressão das ciclinas A2, E, F e H (Figura 9, painel central e direito) em relação aos linfócitos B de camundongos NFAT1^{+/+}. Este resultado sugere

que o fator de transcrição NFAT1 seria um regulador negativo da expressão de ciclinas.

Trabalhos na literatura mostraram que a superexpressão de ciclina E leva a um encurtamento do ciclo celular, e também, que esta ciclina é encontrada superexpressa em diversas doenças linfoproliferativas, como as leucemias. (Resnitzky *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995; Scuderi *et al.*, 1996; Hwang e Clurman, 2005; Donnellan & Chetty, 1999). A ciclina E é representada por dois membros funcionalmente redundantes ciclina E1 e ciclina E2 (Gudas *et al.*, 1999). Resultados anteriores deste trabalho (Figuras 6 e 7) mostraram que os linfócitos B de animais NFAT1^{-/-} apresentam um acúmulo de células em G₁ em relação ao linfócito B selvagem. Por isso fomos avaliar se o NFAT1 poderia estar participando na regulação de ambas ciclinas E em linfócitos B.

Foi, então, realizada a análise da expressão de diferentes membros da ciclina E em linfócitos B primários NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-}, através de RT-PCR. A expressão também foi confirmada pela análise dos níveis proteicos destas ciclinas por *western blott*. Na Figura 10, podemos ver um aumento na expressão de ciclina E1 e E2 (Figura 10A) e também um aumento nos níveis proteicos destas ciclinas (Figura 10B) em linfócitos B NFAT1^{-/-} em relação aos linfócitos B NFAT1^{+/+}. Estes resultados fortalecem o papel repressor da proteína NFAT1 na progressão do ciclo celular e na expressão das ciclinas E.

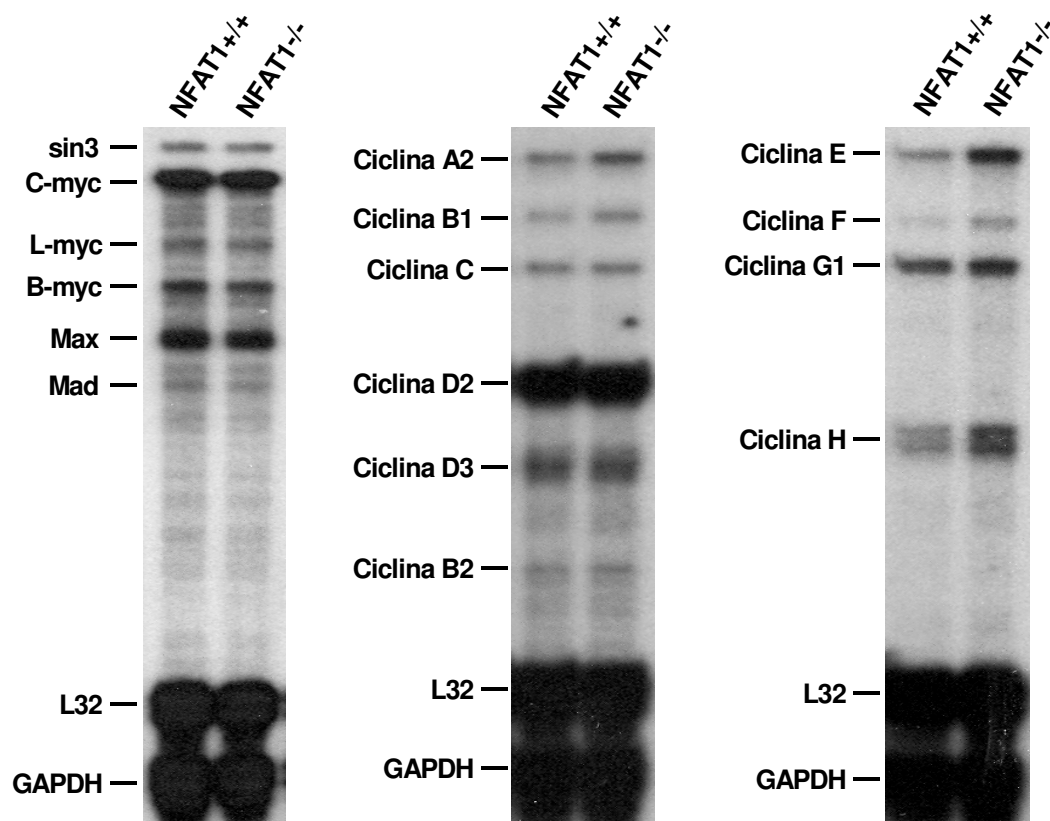


Figure 9: NFAT1 inibe a expressão de ciclinas em linfócitos B. Linfócitos B purificados (2×10^6) de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram estimulados *in vitro* com PMA (10 nM) e ionomicina (1,0 μ M) por 24h. Foi extraído RNA total e foram analisadas a expressão de *c-Myc* (painel esquerdo) e diferentes ciclinas (painel do meio e direito) através do ensaio de proteção a Rnase (RPA). Os níveis dos transcritos foram analisados por autoradiografia. A normalização das massas de RNA foi realizada através da avaliação da intensidade da expressão dos genes constitutivos ribossomal L32 e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Esses resultados foram obtidos a partir de um grupo de três animais e são representativos de três experimentos independentes.

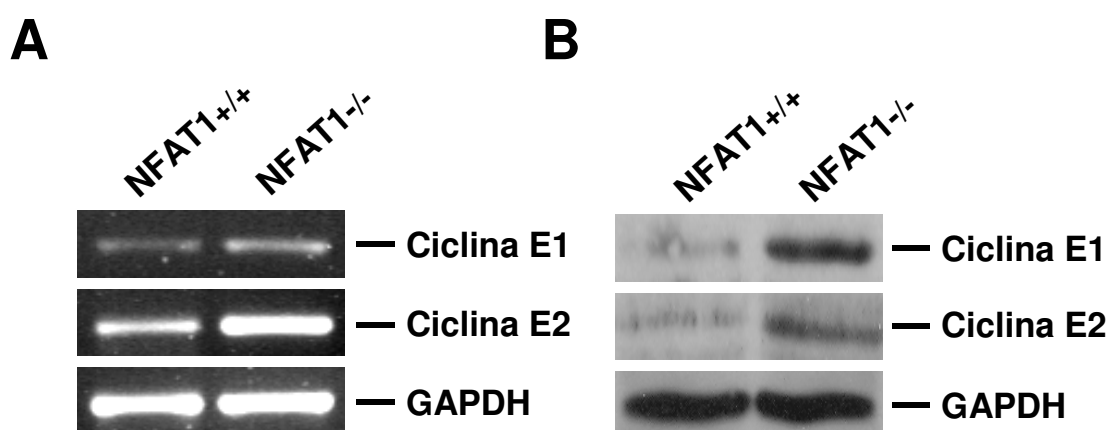


Figura 10: NFAT1 inibe a expressão de ciclina E em linfócitos B. A-B) Linfócitos B purificados (2×10^6 células) de camundongos NFAT1^{+/+} e NFAT1^{-/-} foram estimulados *in vitro* com PMA (10 nM) e ionomicina (1,0 μ M) por 24h (A) ou por 48h (B). **A)** RNA total foi extraído e a análise da expressão de ciclina E1, ciclina E2 e GAPDH foram realizadas por RT-PCR semi-quantitativo. Os produtos do PCR foram resolvidos em géis de agarose e visualizados com brometo de etídeo. **B)** Lisado protéico total foi obtido e os níveis de ciclina E1, ciclina E2 e GAPDH foram detectados por *western blot*. Esses resultados foram obtidos a partir de um grupo de três animais e são representativos de dois experimentos independentes.

4.4 O silenciamento da proteína NFAT1 numa linhagem celular leva ao aumento da proliferação.

Com o objetivo de melhor caracterizar o papel do fator de transcrição NFAT1 na proliferação de linfócitos B, foi utilizada a técnica do silenciamento de expressão através da utilização de pequenos RNAs de interferência (siRNA) para silenciar a expressão do NFAT1 em uma linhagem celular de linfócitos B humanos. Podemos ver na Figura 11 que houve o silenciamento da expressão de NFAT1 na linhagem celular 697 nos diferentes tempos analisados, sendo que a maior diferença observada foi 48 horas após a transfecção dos siRNAs.

Tendo obtido com sucesso o silenciamento do fator de transcrição NFAT1 na linhagem celular 697, o próximo passo do trabalho foi avaliar qual efeito este silenciamento teria na proliferação desta linhagem. Para isso, as células que passaram pela transfecção dos siRNAs foram cultivadas e um ensaio de incorporação de ^3H -timidina foi realizado. Como podemos ver na Figura 12, o silenciamento do fator de transcrição NFAT1 levou a um aumento da proliferação da linhagem celular 697. Este resultado indica um papel supressor da proliferação para o fator de transcrição NFAT1, e corrobora com os resultados observados em linfócitos B primários.

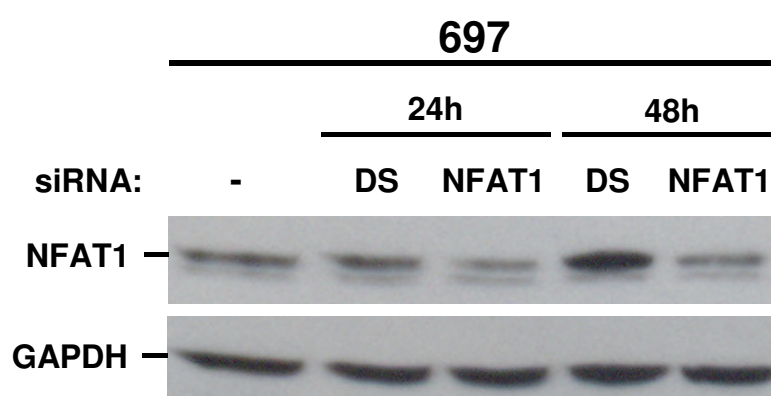


Figura 11: Silenciamento da proteína NFAT1 na linhagem 697 de linfócito B humano. Células 697 (6×10^6 células) foram transfectadas por eletroporação com siRNA *Scramble* (DS) ou com siRNA NFAT1. Após a transfecção, as células foram cultivadas (2×10^6 células/poço) por 24 e 48 horas, e ao final de cada tempo extrato protéico total era obtido. Em seguida, os níveis da proteína NFAT1 e GAPDH foram detectados por *western blott*. Este experimento é representativo de três experimentos independentes

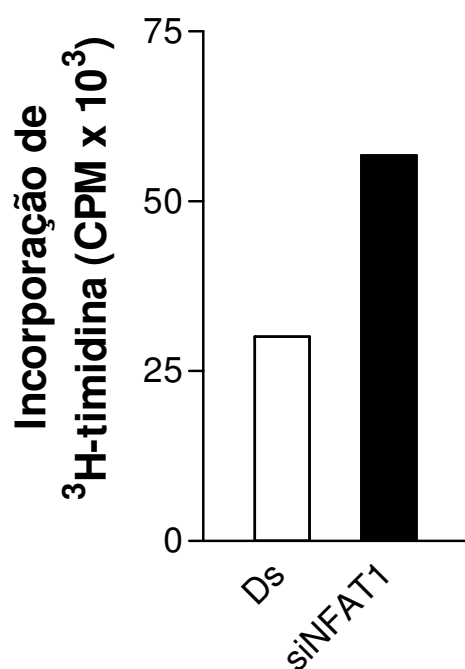


Figura 12: O silenciamento do NFAT1 induz o aumento da proliferação na linhagem celular 697. Células 697 (6×10^6 células) foram transfectadas por eletroporação com siRNA *Scramble* (Ds) ou com siRNA NFAT1. Após a transfecção, as células foram cultivadas (3×10^4 células/poço) por 72h e um ensaio de incorporação de ³H-timidina foi realizado.

4.5 NFAT1 inibe a proliferação celular na linhagem CHO-NFAT1.

4.5.1 Construção e caracterização da linhagem celular CHO-NFAT1

A linhagem celular CHO-NFAT1 foi construída utilizando o kit Flip-In T-Rex (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante (Bastos, 2007). Este sistema permite a geração de uma linhagem celular transfectada com seu gene de interesse de forma estável, sob a regulação de um promotor sensível à tetraciclina. Neste sistema a expressão de seu gene de interesse será induzida pela adição de doxíciclina (análogo à tetraciclina) ao meio de cultura. A linhagem celular parental CHO não expressa a proteína NFAT1 (Figura 13). Podemos ver na Figura 13A, que sem a adição de doxíciclina não há expressão de NFAT1 e a adição de diferentes concentrações de doxíciclina por 2 horas levaram à expressão de NFAT1 na linhagem celular CHO-NFAT1. Não houve diferenças na quantidade de NFAT1 expresso nas concentrações de doxíciclina incubadas por 2 horas (Figura 13A). Com o objetivo de avaliar se o aumento do tempo de incubação da linhagem celular CHO-NFAT1 com o antibiótico doxíciclina poderia influenciar na quantidade de NFAT1 expresso, foi realizada uma curva de tempo de incubação com doxíciclina a 1 µg/mL. Observou-se um aumento na expressão de NFAT1 ao longo do tempo nas células incubadas com doxíciclina, obtendo um pico de expressão em 48 horas (Figura 13B). Após este tempo, há uma drástica diminuição da expressão de NFAT1, com uma baixa detecção desta proteína em

96 horas (Figura 13B). A dose de doxiciclina que foi escolhida para ser usada nos experimentos foi a de 1µg/mL.

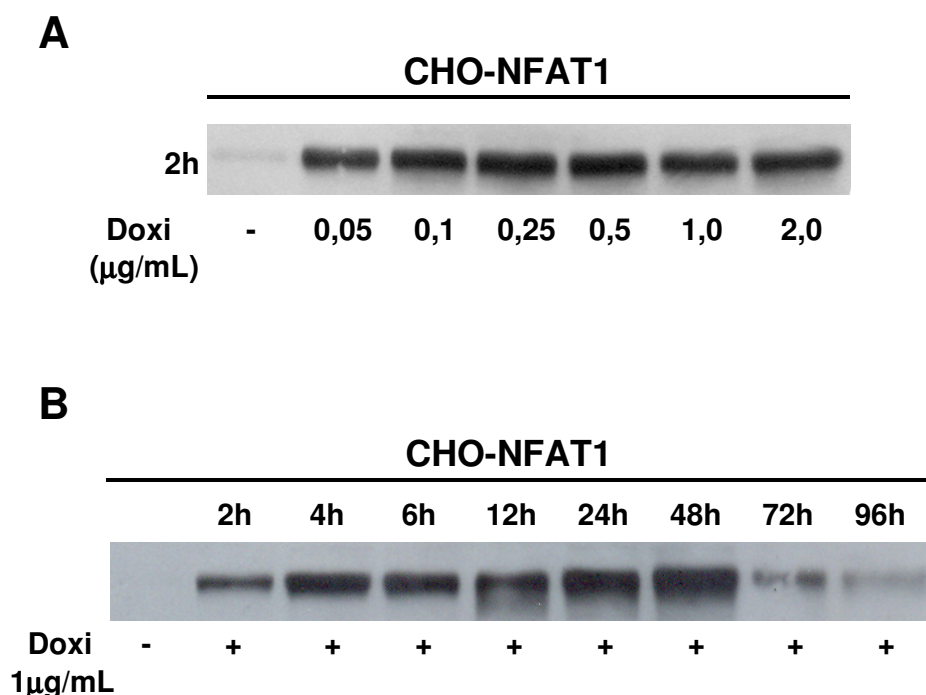


Figura 13: Doxíciclina induz a expressão de NFAT1 na linhagem celular CHO-NFAT1. **A)** Células CHO-NFAT1 (4×10^5 células) foram cultivadas por 2h com diferentes concentrações de doxíciclina (Doxi) (0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0µg/mL). **B)** Células CHO-NFAT1 (4×10^5 células) foram cultivadas com 1,0µg/mL de doxíciclina por diferentes tempos (2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas). **A-B)** Ao final dos tempos determinados, extrato protéico total foi extraído e a expressão da proteína NFAT1 foi avaliada por *western blot* utilizando o anticorpo anti-NFAT1 (anti-67.1).

4.5.2 Análise da proliferação celular na linhagem CHO-NFAT1.

Com o objetivo de avaliar o papel da proteína NFAT1 na progressão do ciclo celular, a linhagem celular CHO-NFAT1 foi utilizada como uma nova ferramenta para responder e confirmar o papel do fator de transcrição NFAT1 como um regulador negativo da proliferação celular.

Antes de avaliar o papel do NFAT1 na linhagem celular CHO-NFAT1, foi realizado um ensaio de proliferação cultivando a linhagem celular CHO-LacZeo com doxiciclina. Este ensaio foi realizado para verificar se o antibiótico doxiciclina teria alguma influência na proliferação da linhagem CHO. Para isso, a linhagem CHO-LacZeo foi incubada com diferentes concentrações de doxiciclina e um ensaio de cristal violeta foi realizado. A linhagem CHO-LacZeo possui apenas o vetor pFRT/LacZeo (ver Materiais e Métodos), e portanto nenhuma expressão de NFAT1. Foi verificado que o antibiótico não afetou a proliferação da linhagem celular CHO-LacZeo nas diferentes concentrações, quando comparados as células não cultivadas com o antibiótico (Figura 14).

O próximo passo foi, então, verificar se existia uma diferença na proliferação entre as células CHO-NFAT1 cultivadas na presença ou não de doxiciclina. Para realizar o ensaio de proliferação por incorporação de ^3H -timidina com a linhagem celular CHO-NFAT1, esta foi sincronizada em meio RPMI 0,5% SFB por 72 horas, para que fosse garantido que no início do experimento a maior parte das células em cultura estivesse na fase G_1 do ciclo celular. Após as 72 horas em meio pobre em SFB, as células foram marcadas com iodeto de propídeo e tiveram avaliadas as diferentes fases do ciclo celular e o percentual de células mortas. Na Figura 15,

podemos ver que após a sincronização 80% das células se encontraram na fase G₁ do ciclo celular e que apenas 4,0% morreram.

As células da linhagem celular CHO-NFAT1 sincronizadas foram então cultivadas ou não na presença de doxíciclina (1µg/mL) e um ensaio de incorporação de ³H-timidina foi realizado. Também foi feita uma contagem do número de células ao longo do tempo. Corroborando com os resultados observados em linfócitos B primários, a linhagem celular CHO-NFAT1 que foi incubada com doxíciclina, proliferou menos que as células que não foram incubadas (Figura 16). Além disso, uma diminuição de células nas fases S e G₂/M foi observada em células CHO-NFAT1 incubadas com doxíciclina, através da marcação com iodeto de propídeo (Figura 17). Após 96 horas de incubação, as células que foram incubadas com doxíciclina apresentaram menos células nas fases S e G₂/M (17,6% e 16%, respectivamente) quando comparados às células que não foram incubadas com doxíciclina (36% e 17,1%) (Figura 17). O mesmo foi observado no tempo de 72 horas de incubação. Este conjunto de resultados reforça a participação de NFAT1 como um repressor da progressão celular.

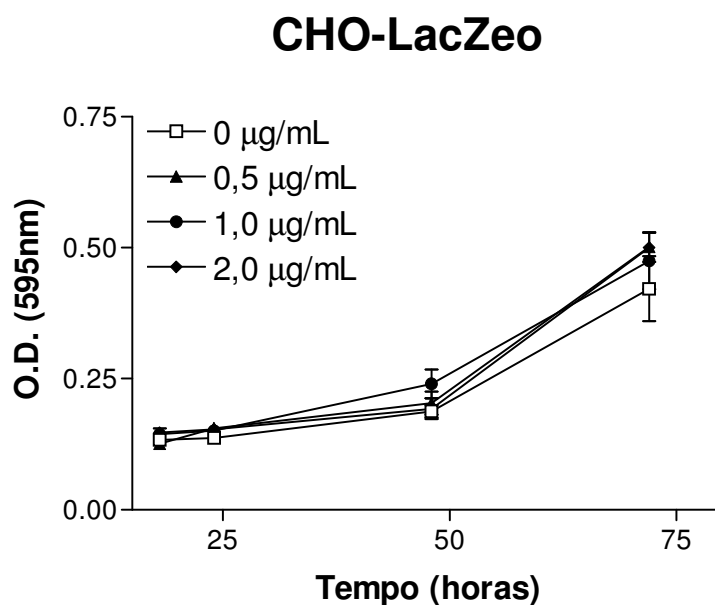


Figura 14: Doxíciclina não afeta a proliferação da linhagem celular CHO-LacZeo. Células CHO-LacZeo (5×10^3 células) foram cultivadas com diferentes concentrações de doxíciclina (0, 0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL) pelos diferentes tempos. Após cada tempo indicado, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta. A análise foi realizada pela absorbância que foi lida no espectrofotômetro a 595nm. Este experimento é representativo de dois experimentos independentes.

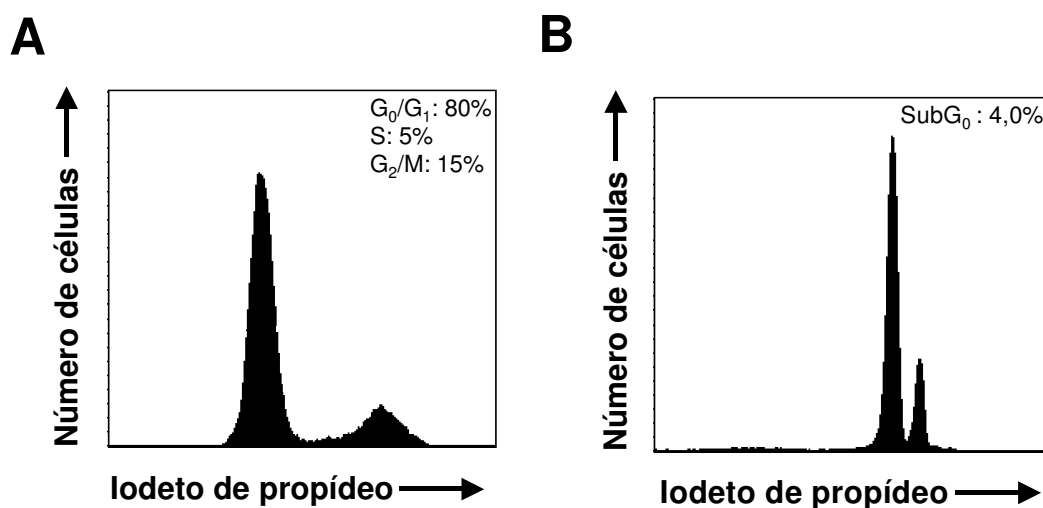


Figura 15: Sincronização da linhagem celular CHO-NFAT1 em meio RPMI 0,5%SFB. A-B) A linhagem celular CHO-NFAT1 (8×10^6 células) foi cultivada por 72h em meio RPMI 0,5% SFB. Após esse período, as células foram marcadas com iodeto de propídeo e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. **A)** Foi realizada a análise das fases G₁, S e G₂/M. **B)** Análise da fase Sub-G₀ foi realizada. Estes experimentos são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

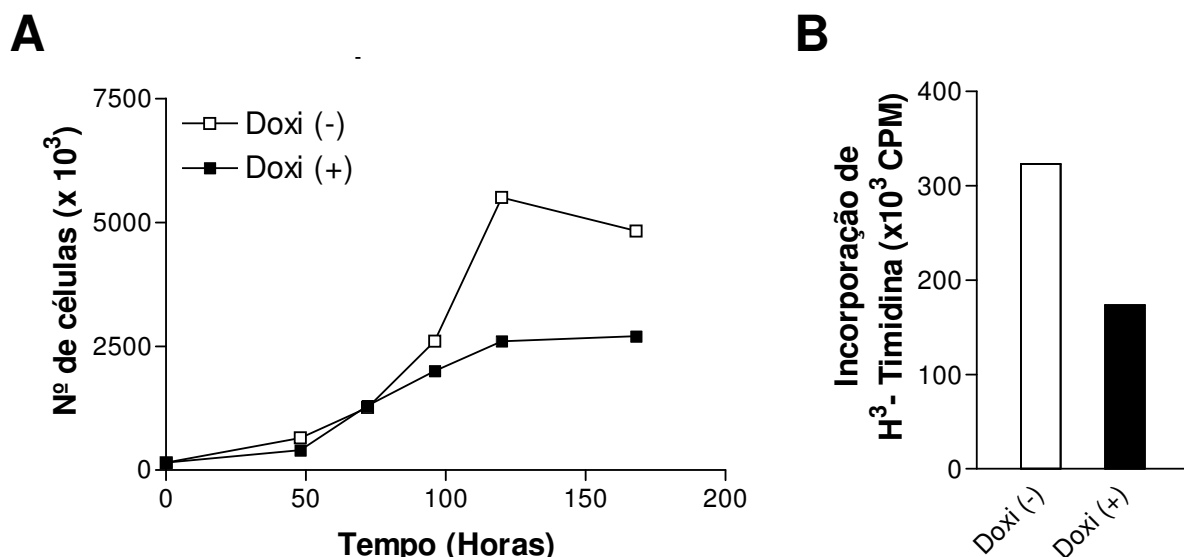


Figura 16: NFAT1 induz a diminuição da proliferação na linhagem celular CHO-NFAT1. A-B) Células CHO-NFAT1 foram sincronizadas por 72 horas em RPMI 0,5% SFB. **A)** Células CHO-NFAT1 foram cultivadas ($1,5 \times 10^5$ células/poço) ou não na presença de doxiciclina ($1,0 \mu\text{g/mL}$) por diferentes tempos. Ao final de cada tempo, as células eram tripsinizadas e contadas em azul de Tripán. **B)** Em seguida, foram não incubadas ou incubadas (5×10^3 células/poço) com o antibiótico doxiciclina (Doxi) ($1,0 \mu\text{g/mL}$) por 96 horas. As células foram cultivadas na presença de ³H-timidina e analisadas conforme descrito. Estes experimentos são representativos de 3 experimentos independentes.

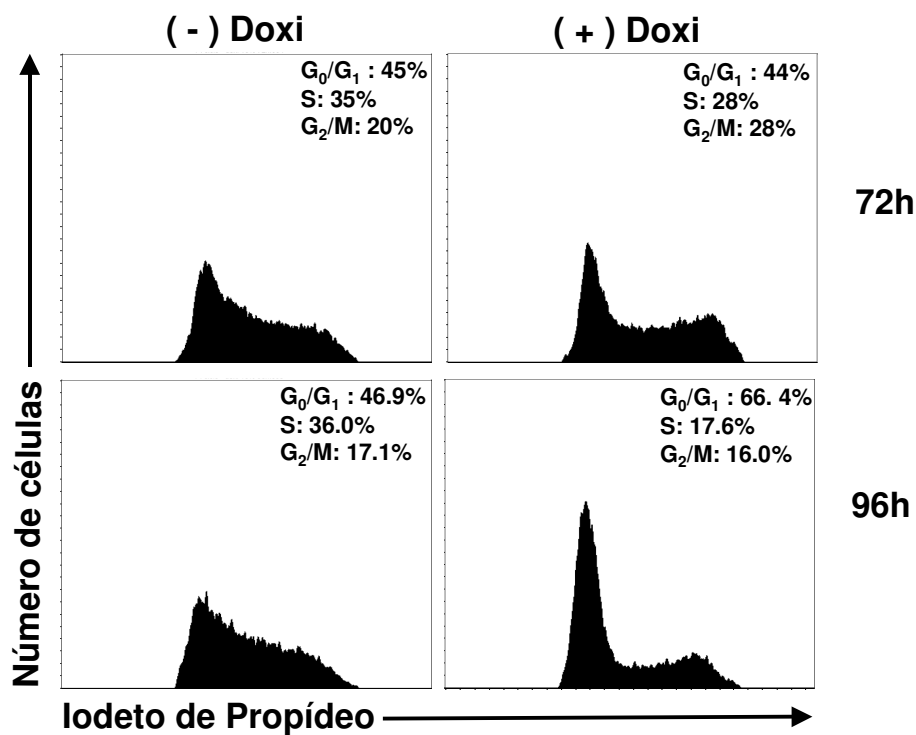


Figura 17: Expressão de NFAT1 leva a parada do ciclo celular na linhagem CHO-NFAT1. Células CHO-NFAT1 foram sincronizadas em meio RPMI com 0,5% SFB por 72h e então cultivadas ($1,5 \times 10^5$ células) na presença ou ausência de doxiciclina (Doxi) ($1 \mu\text{g/mL}$) por 72 e 96h. As células foram então marcadas com iodeto de propídeo e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Este experimento é representativo de pelo menos três experimentos independentes.

4.6 NFAT1 inibe a proliferação da linhagem celular CHO-NFAT1 através da repressão de ciclinas e não pelo aumento da morte celular.

O próximo passo do trabalho foi analisar possíveis mecanismos que poderiam explicar o papel repressor do ciclo celular do fator de transcrição NFAT1. Já foi descrito um papel na regulação da apoptose pelo fator de transcrição NFAT1 e sabe-se que este fator é capaz de regular a expressão do gene FasL (Rengarajan et al., 2000). Com objetivo então de avaliar o papel do NFAT1 na apoptose no modelo utilizado, a linhagem celular CHO-NFAT1 foi cultivada ou não com doxíciclina e a avaliação da fase Sub-G₀ do ciclo celular foi realizada, através da marcação com iodeto de propídeo. Nenhuma diferença foi verificada no percentual de células na fase Sub-G₀ entre as células cultivadas ou não na presença de doxíciclina (Figura 18). Indicando que o NFAT1 parece não ter um papel pró-apoptótico neste tipo celular.

Resultados prévios mostraram que existe uma expressão aumentada de ciclinas A2 e E em linfócitos B deficientes para NFAT1, que poderiam indicar a participação desta proteína durante a regulação destes genes, seja de forma direta ou indireta (Figura 9). Vale ressaltar que a expressão de ciclinas é regulada durante o ciclo celular através da transcrição gênica (Morgan, 1995; Sherr, 1996; Pavletich, 1999). Baseado nos resultados citados acima foi-se avaliar a expressão destes genes na linhagem celular CHO-NFAT1 cultivada ou não com doxíciclina. Foi observada então uma diminuição na expressão das três ciclinas avaliadas (A2, E1 e E2) na linhagem celular CHO-NFAT1 incubada com doxíciclina por 72 horas (Figura 19) em comparação com as células que não foram incubadas com

doxíciclina. Estes resultados, junto com os resultados dos linfócitos B primários, indicam que o papel repressor do fator de transcrição NFAT1 pode ser explicado pela sua repressão direta ou indireta da expressão de diversas ciclinas.

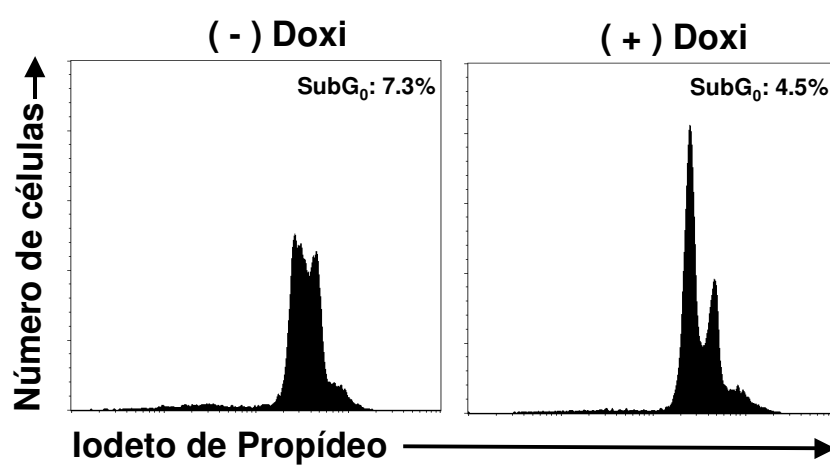


Figura 18: NFAT1 não induz morte celular na linhagem celular CHO-NFAT1. Células CHO-NFAT1 foram sincronizadas em meio RPMI com 0,5% SFB por 72h e então cultivadas ($1,5 \times 10^5$ células) na presença ou ausência de doxiciclina (Doxi) ($1 \mu\text{g/mL}$) por 96h. As células foram então marcadas com iodeto de propídeo e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Análise da fase Sub-G₀ foi realizada. Este experimento é representativo de pelo menos três experimentos independentes.

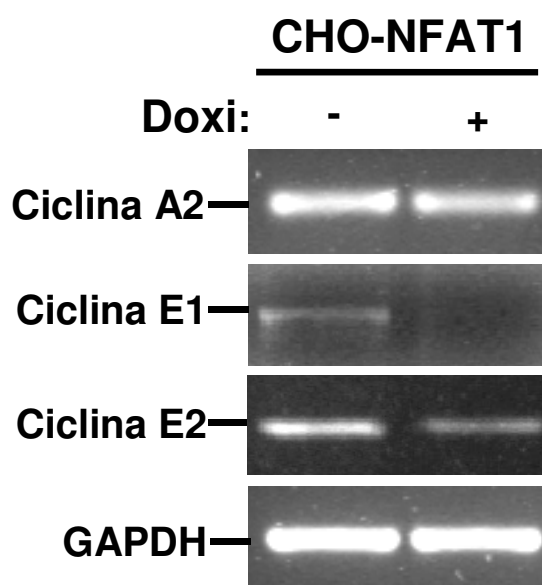


Figura 19: NFAT1 inibe a expressão de ciclinas na linhagem celular CHO-NFAT1. Células CHO-NFAT1 foram sincronizadas em meio RPMI com 0,5% SFB por 72h e então cultivadas ($1,5 \times 10^5$ células) na presença ou ausência de doxiciclina (Doxi) ($1 \mu\text{g/mL}$) por 96h. Após esse tempo RNA total foi extraído e a partir dele foi sintetizado o cDNA. Em seguida foram realizados RT-PCRs para: ciclina A2, E1, E2 e GAPDH. Este experimento é representativo de dois experimentos independentes.

4.7 NFAT1 inibe o crescimento independente de ancoragem *in vitro* da linhagem celular CHO-NFAT1.

Trabalhos recentes têm sugerido o envolvimento de fatores de transcrição da família NFAT nos processos de ciclo celular e tumorigênese em diferentes tipos celulares (Horsley e Pavlath, 2002; Lipskaia e Lompré, 2004). O próximo passo do trabalho foi, então, avaliar o papel do fator de transcrição NFAT1 no crescimento independente de ancoragem, um conhecido processo envolvido na malignização (Hanahan & Weinberg, 2000). Como podemos ver na Figura 20, em um ensaio de crescimento de colônia em meio semi-sólido, as células CHO-NFAT1 cultivadas com doxiciclina formaram um número menor de colônias, que apresentavam também um tamanho menor quando comparadas às colônias formadas pelas células que não foram incubadas com doxiciclina (Figura 20). Estes resultados mostram um novo papel para o fator de transcrição NFAT1 no processo de malignização, acrescentando mais um indício para o papel supressor deste fator.

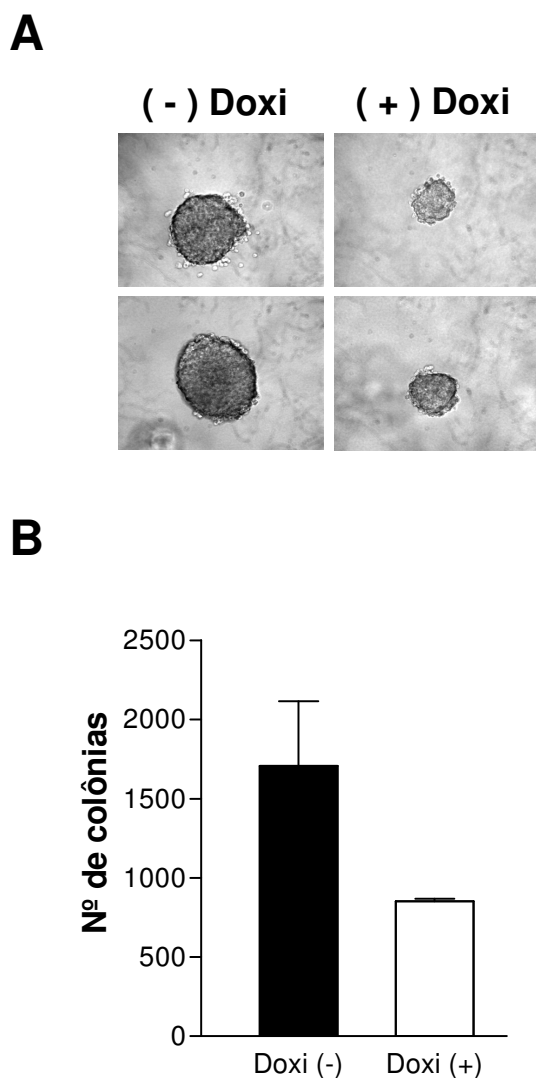


Figura 20: NFAT1 inibe o crescimento independente de ancoragem *in vitro* na linhagem celular CHO-NFAT1. A-B) Células CHO-NFAT1 (8×10^2) foram cultivadas em meio semi-sólido com 10% SFB na presença ou ausência de doxiciclina (Doxi) ($1,5 \mu\text{g/mL}$). **A)** O número de colônias formadas foi contado após 20 dias em cultura. **B)** As colônias foram fotografadas em 10X de magnificação no microscópio Zeiss Axiovert S100. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.8 NFAT1 reprime o crescimento tumoral e a expressão de ciclinas *in vivo*.

Baseado nos resultados anteriores, onde a linhagem celular CHO-NFAT1 incubada com doxiciclina apresentou uma menor taxa de proliferação, um percentual maior de células na fase G₁ do ciclo celular, uma menor formação de colônias em meio semi-sólido, além da expressão aumentada de alguma ciclinas quando comparadas às células não cultivadas com doxiciclina, foi realizado um experimento de crescimento tumoral *in vivo* com a linhagem celular CHO-NFAT1. Para tal, foi inoculado em camundongos BALB/c nude/nude, de forma subcutânea, 5X10⁶ células da linhagem celular CHO-NFAT1. Uma parte desses animais inoculados foram previamente tratados com tetraciclina (2,5 mg/mL) na água, e permaneceram recebendo tetraciclina na água durante todo o experimento, para que a expressão de NFAT1 fosse induzida. A cada cinco dias o volume tumoral foi medido. Como demonstrado na Figura 21, os tumores formados nos animais que receberam tetraciclina apresentavam um volume menor quando comparado aos tumores dos animais que não receberam tetraciclina. Esta inibição do crescimento tumoral pela indução de NFAT1 pode ser vista já no 15º dia após a inoculação das células e revelam uma redução de quatro vezes no volume tumoral no 30º dia, quando comparados aos animais não tratados com tetraciclina (Figura 21). De fato, a indução de NFAT1 correlacionou com a diminuição da expressão das ciclinas A2, E1 e E2 na massa tumoral em comparação com os tumores de animais não tratados (Figura 22). Estes resultados reforçam a hipótese de que o fator de transcrição NFAT1 é um repressor tumoral.

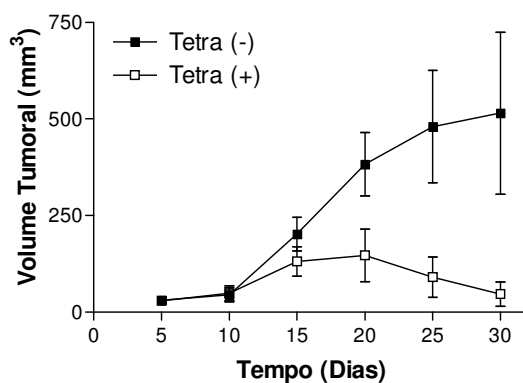
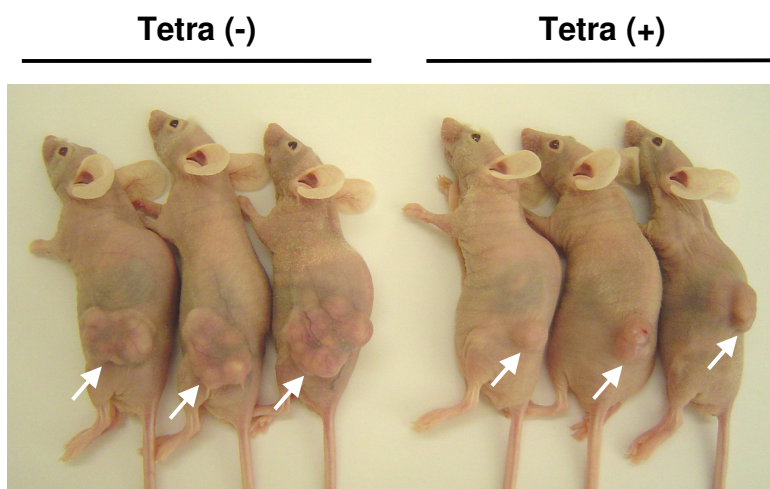
A**B**

Figura 21: NFAT1 inibe o crescimento tumoral *in vivo*. A-B) Células CHO-NFAT1 (5×10^6 células) foram inoculadas de forma subcutânea em camundongos BALB/c nude/nude, que foram previamente expostos, ou não, por 3 dias a tetraciclina (2,5 mg/mL) na água. A tetraciclina continuou sendo administrada durante todo o experimento. O volume tumoral foi medido a cada cinco dias por um período total de 30 dias. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

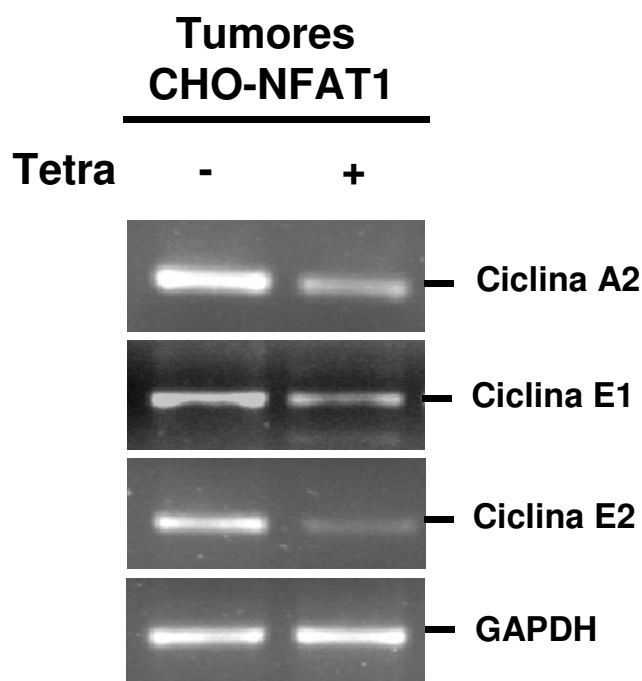


Figura 22: NFAT1 inibe a expressão de ciclinas em tumores *in vivo* da linhagem celular CHO-NFAT1. Células CHO-NFAT1 (5×10^6 células) foram inoculadas de forma subcutânea em camundongos BALB/c nude/nude, que foram previamente expostos, ou não, por 3 dias a tetraciclina (2 mg/mL) na água. A tetraciclina continuou sendo administrada durante todo experimento, que teve um total de 30 dias de duração. Ao final desse período, os tumores foram retirados e tiveram o RNA extraído utilizando um homogenizador. A partir desse RNA foi sintetizado o cDNA. Em seguida foram realizados RT-PCRs para: ciclina A2, E1, E2 e GAPDH. Este experimento é representativo de dois experimentos independentes.

5. Discussão

Os membros da família NFAT já foram descritos como reguladores da proliferação em diversos tipos celulares, como queratinócitos, adipócitos, células musculares e linfócitos (Santini *et al.*, 2001; Baksh *et al.*, 2002; Neal e Clipstone, 2003; Lipskaia e Lompré, 2004). A regulação da proliferação pelos membros da família NFAT pode ser tanto positiva quanto negativa. Enquanto o fator de transcrição NFAT1 é um repressor da proliferação, o membro NFAT2, acelera a progressão do ciclo celular. Em adipócitos, o membro NFAT2 foi descrito como um ativador da proliferação, onde foi responsabilizado pela regulação dos genes de ciclina D1, D2 e também de *c-Myc* (Neal e Clipstone, 2003). Já em linfócitos, foi descrito que o NFAT1 regula de forma negativa a expressão de CDK4 e de ciclina A2, enquanto que em queratinócitos atua como regulador positivo do inibidor do ciclo celular p21^{Cip/Waf1}, e ainda, a ausência deste fator induz a esplenomegalia *in vivo* (Baksh *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2007; Santini *et al.*, 2001). Estes trabalhos sugerem que o membro NFAT1 seria um regulador negativo ubíquo da proliferação de diversos tipos celulares. No entanto, neste trabalho foi descrito o papel do membro NFAT1 na regulação negativa da proliferação especificamente de linfócitos B dentro da população do linfonodo, num estímulo a células primária (Figuras 6 e 7). Sendo o resultado confirmado numa linhagem de linfócitos B, a linhagem 697, porém estes resultados são ainda preliminares, havendo a necessidade de outros experimentos que os confirmem (Figura 12). Diversos trabalhos já haviam demonstrado o papel do membro NFAT1 na proliferação tanto

de linfócitos T, quanto de linfócitos B, porém em ensaios onde o animal era estimulado *in vivo* e depois seus linfócitos eram desafiados *in vitro* (Xanthodakis *et al.*, 1996; Ranger *et al.*, 1998b; Hodge *et al.*, 1996; Caetano *et al.*, 2002).

A diferenciação de linfócitos B é classicamente conhecida por possuir importantes etapas, que culminam com uma resposta imune humoral competente, onde em cada etapa a proliferação do clone ativado terá papel central na progressão à célula efetora ou de memória (Tangye & Hodgknig, 2004). Primeiramente há a necessidade de sinais para saída do linfócito B do estado de quiescência para o estado ativado, e este sinal pode ocorrer pela ativação de receptores *Toll-like* ou pelo BCR. A ativação é seguida pela troca do isotipo de imunoglobulina, processo dependente da divisão celular. Trabalhos mostraram uma dependência no número de divisões pelo qual o linfócito B passou com a troca para os específicos tipos de imunoglobulinas (Tangye & Hodgknig, 2004). O último processo na diferenciação do linfócito B é o desenvolvimento em plasmócitos ou em células de memória. A memória imunológica é caracterizada pela resposta rápida e robusta decorrente da re-exposição ao antígeno original. Sendo que uma das principais características que as células B de memória adquirem para serem capazes de realizar uma resposta rápida ao reencontro com o antígeno é a diminuição da necessidade de estímulos para proliferar (Hofer *et al.*, 2006). Em todos estes momentos, a ativação do BCR pelo antígeno é necessária. A descrição do NFAT1 como um regulador negativo da proliferação de linfócitos B (Figuras 6 e 7), que é ativado neste tipo celular via BCR, levanta a questão da importância deste fator nas diferentes etapas de diferenciação do linfócito B e conseqüentemente na resposta imune. No entanto, as análises, até

então, de animais deficientes para a proteína NFAT1 não demonstraram nenhum efeito drástico deste fator em linfócitos B (Xanthodakis *et al.*, 1996; Ranger *et al.*, 1998b; Hodge *et al.*, 1996). Porém, não se pode descartar a possibilidade de que o papel do NFAT1 na proliferação do linfócito B tenha influência na resposta imune, já que os modelos até então utilizados para avaliar este papel consistem na avaliação de camundongos deficientes para a proteína NFAT1 em todas as células do animal, sendo que outras células poderiam afetar o aspecto geral da ativação dos linfócitos B. Isso é visto no trabalho de Ranger e colaboradores, (1998b), onde foi observado um aumento nos níveis séricos de IgG1 e IgE em camundongos deficientes para NFAT1 x NFAT4, fenômeno descrito ser secundário à elevada produção de IL-4 pelo linfócito T deste animal. O mesmo foi observado no animal deficiente somente para a proteína NFAT1 (Hodge *et al.*, 1996).

Em um trabalho recente foi realizada uma avaliação do papel dos fatores de transcrição NFAT especificamente em linfócitos B através da construção de animais condicionalmente deficientes para calcineurina neste tipo celular. Foi observado neste trabalho um aumento na proliferação dos linfócitos B deficientes, que foi explicado pela elevada expressão de ciclina D2 que levava então ao aumento da fosforilação da proteína Rb (Winslow *et al.*, 2006). No entanto, a deleção da calcineurina acarreta na inativação dos diferentes membros da família NFAT expressos em linfócitos B (NFAT1, NFAT2 e NFAT4) e dessa forma não podemos especificar qual desses fatores é responsável pelo fenótipo observado. Podemos concluir apenas que a calcineurina atua como uma repressora da

entrada na fase S do ciclo celular nos linfócitos B, o que de certa forma corrobora com os resultados do trabalho atual com linfócitos B NFAT1-/-.

Os linfócitos B, após serem gerados na medula óssea, migram para a periferia onde irão encontrar antígenos e realizar suas funções efetoras (Kondo *et al.*, 2001). A habilidade do sistema imune adaptativo de gerar resposta a patógenos requer um repertório diverso de BCRs que possam reconhecer uma diversa gama de proteínas não próprias. Essa diversidade é obtida pelo rearranjo das cadeias de imunoglobulinas. Inevitavelmente, durante a formação desse repertório, há a geração de clones que reagem contra antígenos próprios. Uma parte desses clones é capaz de realizar um processo conhecido como edição do receptor, onde a cadeia leve irá rearranjar novamente com o objetivo de obter um BCR que não seja auto-reativo, caso isso não ocorra as células morrerão por apoptose. No entanto, grande parte destas células auto-reativas consegue chegar à periferia onde são mantidas num estado de anergia. A anergia é caracterizada pela manutenção das células num estado de letargia, onde são capazes de montar uma resposta inicial ao antígeno, porém a falta de um estímulo secundário impossibilita a manutenção de sua ativação (Cambier *et al.*, 2007). Os níveis baixos de cálcio induzidos em células B anérgicas, através da ligação do antígeno próprio ao BCR foram descritos como capazes de induzir a translocação nuclear do fator de transcrição NFAT1 (Healy *et al.*, 1997). Recentemente, o papel direto deste fator na tolerização foi apresentado no trabalho de Barrington e colaboradores, (2006), onde a deficiência de NFAT1 diminuía a tolerância dos linfócitos B aos antígenos próprios. Estes resultados indicaram então que este fator poderia estar regulando genes envolvidos no estado de anergia destes

clones auto-reativos e ainda corroboravam o papel de regulador negativo do fator NFAT1 em linfócitos B. No presente estudo, foi caracterizada a regulação negativa pelo fator NFAT1 dos genes das ciclinas A2, E1 e E2, de forma direta ou indireta, que poderiam estar envolvidos na garantia do estado anérgico (Figuras 9, 10, 19 e 22). A inibição dos genes de ciclinas pelo fator NFAT1 garantiria um potencial proliferativo diminuído aos linfócitos B anérgicos. A análise da possível influência da regulação negativa dos genes das ciclinas pelo fator de transcrição NFAT1 na anergia de linfócitos B é de extrema importância, já que a desregulação deste processo pode acarretar no desenvolvimento de diversas doenças auto-imunes como Lúpus e artrite (Vinuesa *et al.*, 2005).

Os membros da família *Myc* são conhecidos estimuladores da divisão e transformação celular. A expressão desregulada dos fatores de transcrição da família *Myc* contribui para o desenvolvimento de diversos cânceres por um mecanismo que envolve a estimulação da proliferação e inibe a diferenciação. Especificamente em linfócitos B, o papel do oncogene *c-Myc* foi bastante estudado e caracterizado, tendo grande importância nos linfomas de Burkitt e em outras malignidades de linfócito B (Shou *et al.*, 2000; Kuppers, 2005). No linfoma de Burkitt ocorre a translocação do gene de *c-Myc* com o gene da cadeia pesada ou leve de imunoglobulina que gera uma célula cuja expressão de *c-Myc* está sob a regulação do *enhancer* da cadeia pesada ou leve de imunoglobulina, garantindo então a expressão constitutiva do gene de *c-Myc*, e dessa forma a malignização (Janz, 2006). Em trabalho recente, o papel do *c-myc* na fisiologia normal do linfócito B foi caracterizado, onde foi estabelecido que o gene de *c-myc* é necessário tanto para a diferenciação quanto para a proliferação do linfócito B

(Habib *et al.*, 2007). A regulação do gene de *c-Myc* é complexa e dependente de diversos fatores. A descrição da regulação positiva do gene de *c-Myc* pelo fator de transcrição NFAT2 em células de câncer pancreático (Buchholz *et al.*, 2006) e também da regulação negativa pelo fator NFAT1 em linfócitos T CD4⁺ (Mognol e Viola, dados não publicados) ligou os fatores da família NFAT com a regulação direta de um gene do ciclo celular de grande relevância na fisiologia dos linfócitos B. No entanto, não foi vista diferença na expressão dos genes da família *Myc* nos linfócitos B NFAT1^{-/-} em relação ao selvagem, no trabalho atual (Figura 9). Não sendo possível explicar o aumento na proliferação destes linfócitos ao aumento da expressão do gene de *c-Myc*.

Até o momento, não existiam evidências do envolvimento de proteínas NFAT na regulação de ciclinas. Neste trabalho, foi demonstrado que o NFAT1 é capaz de regular de forma negativa a expressão das ciclinas A2, E1 e E2 seja de forma direta ou indireta (Figuras 9, 10 e 19). As ciclinas E e A participam ativamente de diversas etapas do ciclo celular que vão desde a transição G₁/S (ciclinas E e A), passando pela progressão de S (ciclina A), até chegar à transição G₂/M (ciclina A) (Sherr, 1996; Sherr e Roberts, 2004). As ciclinas E, representadas pelos membros E1 e E2, são encontradas em quase todos os tipos celulares e normalmente ambos os membros são expressos ao mesmo tempo em uma célula. Estas proteínas regulam a transição G₁/S quando associadas a CDK2 (Hwang e Clurman, 2005) e são expressas no final da fase G₁, atingem a expressão máxima na transição G₁/S e são finalmente degradadas no início da fase S (Ekholm e Reed, 2000; Hwang e Clurman, 2005). Os complexos ciclina E-CDK2 são responsáveis pela fosforilação sustentada de Rb iniciada pelo complexo ciclina D-

CDK4/6 e fosforilam o inibidor p27^{KIP1}, determinando a entrada em fase S (Sherr e Roberts, 2004; Hwang e Clurman, 2005). Animais deficientes para as ciclinas E1 ou E2 são viáveis, se desenvolvem normalmente e apresentam uma progressão normal do ciclo celular, questionando a real importância destas proteínas durante a proliferação (Geng *et al.*, 2003; Parisi *et al.*, 2003). Contudo, a ausência das duas ciclinas impede a saída de G₀ e dificulta o início da replicação (Geng *et al.*, 2003; Parisi *et al.*, 2003). O aumento da expressão de ciclina E pode ser considerado um fator prognóstico em diversos tipos de cânceres humanos, como mama, pulmão e leucemias, sendo correlacionado com o estágio avançado da doença em alguns casos (Keyomarsi *et al.*, 1994 e 2002; Scuderi *et al.*, 1996; Fukuse *et al.*, 2000). A expressão de ciclina E é ativada pelo fator de transcrição E2F, mas também pode ser regulada por outras proteínas (Botz *et al.*, 1996; Geng *et al.*, 1996; Hwang e Clurman, 2005). De fato, o fator de transcrição NFAT1 é capaz de se ligar à região promotora do gene de ciclina E2 em ensaios de imunoprecipitação de cromatina utilizando extrato protéico de linfócitos T CD4⁺ diferenciados para o fenótipo Th2 (Teixeira e Viola, dados não publicados). Os resultados do atual trabalho demonstram que a expressão de NFAT1 reprime a expressão das ciclinas E1 e E2, e reduz a frequência de células CHO-NFAT1 em fase S, sugerindo um defeito na transição G₁/S, que pode estar associada à diminuição da formação do complexo ciclina E-CDK2 (Figuras 17 e 19). Além disso, em linfócitos B NFAT1^{-/-}, o complexo ciclina E-CDK2 também pode estar associado a um aumento de células nas fases G₂/M do ciclo celular (Figuras 7,9 e 10).

Por sua vez, as ciclinas A regulam a passagem da célula pela fase S e pela transição G₂/M através da associação com CDK2 ou CDK1, respectivamente (Yam *et al.*, 2002). Depois de fosforilada, a proteína Rb libera o fator de transcrição E2F que também induz a expressão de ciclina A (Harbour e Dean, 2000; Sherr e Roberts, 2004). Assim, as ciclinas A podem ser detectadas pela primeira vez no final da fase G₁. Os níveis de expressão da ciclina A aumentam durante a fase S e são mantidos até o início da mitose, quando esta ciclina é degradada (Yam *et al.*, 2002; Sherr e Roberts, 2004). O complexo ciclina A-CDK2 fosforila alguns substratos necessários para a replicação do DNA e garante que a duplicação ocorra uma única vez nesta etapa. Já o complexo ciclina A-CDK1 parece estabilizar a ciclina B durante o início da mitose (Yam *et al.*, 2002). A família das ciclinas A também é composta por 2 membros (A1 e A2). A ciclina A1 é expressa preferencialmente na linhagem germinativa, enquanto que a ciclina A2 começa a ser expressa no início do desenvolvimento embrionário e é a principal ciclina A encontrada em células somáticas (Yam *et al.*, 2002). A ausência da ciclina A2 durante a embriogênese é letal, indicando que esta proteína é essencial para a divisão celular normal (Murphy *et al.*, 1997). O aumento da expressão de ciclina A2 não parece ser um fator prognóstico tão evidente para o câncer, mas foi relacionado com a diminuição da sobrevida geral de pacientes com carcinoma hepatocelular e com sarcoma (Chao *et al.*, 1998; Huuhtanen *et al.*, 1999). Assim como a ciclina E, a expressão de ciclina A é induzida principalmente pelo fator de transcrição E2F, mas também pode ser regulada por outros diversos fatores de transcrição (Blanchard, 2000; Yam *et al.*, 2002). Em trabalho recente, a ligação ao promotor e a regulação negativa do gene de ciclina A2 pelo fator NFAT1 foram

confirmadas (Carvalho *et al.*, 2007). A proteína NFAT1 é capaz, então, de se ligar ao promotor e reprimir a expressão de ciclina A2, o que poderia explicar o retardo na proliferação celular de células CHO-NFAT1 (Figura 16) e a diminuição a frequência de células em fase S e G₂/M (Figura 17).

Apesar de, dentro da população linfocitária, o membro NFAT1 apresentar um papel específico na proliferação de linfócitos B primários, foi demonstrado nesse trabalho que o papel regulador negativo do ciclo celular do NFAT1 pode ser transposto para outro tipo celular (Figuras 16 e 17). De fato, a ausência de NFAT1 também induz o crescimento desordenado de células do tecido cartilaginoso (Ranger *et al.*, 2000) e indicando que o papel repressor do fator NFAT1 no ciclo celular pode influenciar outros tipos celulares.

As proteínas da família NFAT são conhecidas por regularem a morte celular induzida por ativação em linfócitos T, através da regulação do receptor de membrana FasL (Lantini *et al.*, 1997; Ranger *et al.*, 1998c). No entanto, os resultados deste trabalho indicam um papel negativo do fator NFAT1 na regulação da morte celular em linfócitos B (Figura 8). De fato, a caracterização do papel dos fatores de transcrição NFATs na morte celular foi realizado até então em linfócitos T. Juntos, estes resultados sugerem, então, que o fator de transcrição NFAT1 atua de forma diferente em linfócitos B em comparação com sua atuação em linfócitos T. Contudo, mesmo dentro do papel dos fatores de transcrição da família NFAT na regulação da morte celular, há certas divergências. No trabalho de Oukka e colaboradores, (1998), foi visto que a ausência de NFAT4 levou a um aumento do número de linfócitos T apoptóticos, através da diminuição da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2. Além disso, a deleção da calcineurina em camundongos

levou ao aumento da apoptose de células T CD4⁺, correlacionada à diminuição da expressão do gene de Bcl-2 (Manicassamy *et al.*, 2008). O NFAT1 poderia então estar atuando assim como o NFAT4 e a calcineurina na regulação da sobrevivência celular em linfócitos B. Na linhagem celular CHO-NFAT1 não foi vista nenhuma diferença na morte celular entre as células cultivadas ou não em presença de doxíciclina (Figura 18). Isto talvez se deva ao fato de que a célula em estudo ser uma célula epitelial e dessa forma possíveis colaboradores do fator de transcrição NFAT não serem expressos, e ainda, estas células podem não ter a expressão de moléculas envolvidas na morte celular induzida por ativação.

A tumorigênese é um processo composto por várias etapas, que refletem alterações genéticas cujo papel é dirigir as células normais na progressão pela transformação celular até a malignização. Algumas alterações básicas na fisiologia celular são responsáveis por levar conjuntamente à malignização. Podemos citar essas alterações como a independência de fatores de crescimento, a capacidade de escapar do processo de morte celular programada, o potencial replicativo ilimitado, a capacidade de induzir a angiogênese e invadir outros tecidos (Hanahan & Weinberg, 2000). Neste trabalho, outros aspectos da malignização foram avaliados e foi possível verificar pela primeira vez que o fator de transcrição NFAT1 é capaz de regular negativamente o crescimento independente de ancoragem, a formação de tumores em camundongos BALBc nude/nude e o ciclo celular (Figuras 6, 7, 16, 17, 20 e 21).

As proteínas da família NFAT, e até mesmo o NFAT1, foram descritos influenciando outros fenômenos biológicos relacionados com a tumorigênese, como a apoptose, a angiogênese e o potencial metastático de tumores (Latinis *et*

al., 1997; Hernández *et al.*, 2001; Jauliac *et al.*, 2002). De fato, as proteínas NFAT regulam direta ou indiretamente a expressão de diversas moléculas envolvidas com os processos tumorigênicos, como *c-Myc*, COX-2, FasL, Bcl-2, ciclina D, CDK4, p21^{WAF1/CIP1}, CD40L e ciclina A2 (Latinis *et al.*, 1997; Oukka *et al.*, 1998; Santini *et al.*, 2001; Baksh *et al.*, 2002; Neal e Clipstone, 2003; Grumont *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2007). Alguns trabalhos sugerem que proteínas da família NFAT podem se comportar como proto-oncogenes ou genes supressores de tumor. Contudo, estas evidências foram observadas até o momento em linhagens celulares, culturas primárias *in vitro*, ou mesmo modelos murinos de experimentação *in vivo*. A participação de proteínas NFAT durante o processo de tumorigênese em humanos ainda requer uma investigação mais criteriosa. Apesar da descrição neste trabalho do NFAT1 como regulador negativo de vários passos importantes para a formação do câncer, poucos trabalhos relacionam este fator específico da família com a malignização, ou como um supressor de tumor. Sendo então este o primeiro trabalho a demonstrar quais genes podem estar envolvidos no papel negativo do NFAT1 no ciclo celular. Além disso, este fator é capaz de regular outros aspectos da malignização de forma negativa, possibilitando a caracterização do NFAT1 como um possível gene supressor de tumor.

6. Conclusões

6.1 O fator de transcrição NFAT1 é um repressor da proliferação de linfócitos B. Este fator de transcrição regula negativamente a expressão dos genes das ciclinas A2, E1 e E2 em linfócitos B primários.

6.2 O fator NFAT1 também atua como um regulador negativo da proliferação na linhagem celular CHO-NFAT1, onde foi igualmente observada a regulação negativa das ciclinas A2, E1 e E2, correlacionada com um percentual maior de células na fase G₁ do ciclo celular.

6.3 O fator de transcrição NFAT1 atua como regulador negativo do crescimento independente de ancoragem e da formação de tumores em camundongos BALB/c nude/nude, sugerindo um papel supressor tumoral para este fator de transcrição.

7. Referências Bibliográficas

Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383: 787-793.

Anraku Y, Ohya Y, Lida H (1991). Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1093:169-177

Aramburu J, Azzoni L, Rao A, Perussia B (1995). Activation and Expression of the Nuclear Factor of Activated T Cells, NFATp and NFATc, in Human Natural Killer cells: Regulation upon CD16 Ligand Binding. *J. Exp. Med.* 182, 801-810.

Antony P, Petro JB, Carlesso G, Shinnars NP, Lowe J, Khan WN (2003). B cell receptor directs the activation of NFAT and NF- κ B via distinct molecular mechanism. *Exp. Cell Res.* 291:11-24.

Bandyopadhyay RS, Teutsch MR, Wortis HH (1995). B-cell activation by sIgM cross-linking induces accumulation of CD5 mRNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 194:219-228

Baksh S, DeCaprio JA, Burakoff SJ (2000). Calcineurin regulation of the mammalian G0/G1 checkpoint element, cyclin dependent kinase 4. *Oncogene* 19:2820-2827

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

Barrington RA, Borde M, Rao A, Carroll MC (2006). Involvement of NFAT1 in B cell self-tolerance. *J Immunol* 177:1510-1515

Bastos NC (2007). Construção e Caracterização da linhagem celular CHO-NFAT1-Rep. Monografia defendida no Departamento de Genética do Instituto de Biologia-UFRJ.

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

Berland R, Wortis HH (1998). An NFAT-Dependent enhancer is necessary for anti-IgM-Mediated induction of murine CD5 expression in primary splenic B cell. *J. Immunol.* 161:277-285.

Berland R, Wortis HH (2003). Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. *Proc Natl Acad Sci* 100:13459-13464.

Birkeland ML, Monroe JG (1997). Biochemistry of antigen receptor signaling in mature and developing B lymphocyte. *Crit. Rev. Immunol.* 17:353-385

Bishop GA, Hostager BS (2001). Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation. *Immunol. Res.* 24:97-109 ?

Blanchard J-M (2000) Cyclin A2 transcriptional regulation: modulation of cell cycle control at the G1/S transition by peripheral cues. *Biochem Pharmacol*, 60: 1179-1184.

Botz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Dürr P (1996). Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol Cell Biol*, 16: 3401-3409.

Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V (2006). Overexpression of *c-myc* in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca^{2+} /calcineurin pathway. *EMBO J.* 1:11

Brabletz T, Pietrowski I, Serfling E (1991). The immunosuppressives FK506 and cyclosporin A inhibits the generation of protein factors binding to the two purine boxes of interleukin 2 enhancer. *Nucleic Acids Res.* 19:61

Caetano MS, Viera-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MBF, Barcinski MA, Viola JPB (2002). NFATc2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J.* 16:1940-1942.

Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen JV (2007). B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic cells? *Nature Rev. Immunol.* 7:633-643

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

Chao Y, Shih Y-L, Chiu J-H, Chau G-Y, Lui W-Y, Yang WK, Lee S-D, Huang T-S (1998). Overexpression of cyclin A but not Skp2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 58: 985-990.

Choi MS, Brines RD, Holman MJ, Klaus GG (1994). Induction of NF-AT in normal B lymphocyte by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL-4. *Immunity* 1:179-187

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

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

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

Coller HA (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:667-670.

Constant SL, Bottomly K (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cells response: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, 15: 297-322.

Crabtree GR, Olson EN (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109, S67-S79.

Decker EL, Skerka C, Zipfel PF (1998). The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *J Biol Chem*, 273: 26923-26930.

DeFranco AL (1997). The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Curr. Opin. Immunol.* 9:296-308

Donnellan R, Chetty R. (1998). Cyclin D1 and human neoplasia. *J. Clin. Pathol.* 51:1-7

Donnellan R, Chetty R. (1999). Cyclin E in human cancers. *FASEB J.* 13:773-780

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

Dyson N (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 12: 2245-2262.

Edwards JCW, Cambridge G (2006). B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other immune diseases. *Nature Rev. Immunol.* 6:394-403.

Engelke M, Engels N, Dittmann K, Stork B, Wienands J (2007). Ca^{2+} signaling in antigen receptor-activated B lymphocyte. *Immunological Reviews* 218: 235-246

Ekholm SV, Reed SI (2000). Regulation of G₁ cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 676-684.

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

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

Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*, 12: 1173-1180.

Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout III WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*, 114: 431-443.

Germain RN (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 76: 287-299.

Gerondakis S, Grumont RL, Banerjee A (2007). Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol. Cell Biol.* 85:471-475

Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67: 1169-1179.

Go WY, Yiu X, Roti MA, Liu F, Ho SN (2004). NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:10673-10678.

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

Graef IA, Chen F, Crabtree GR (2001). NFAT signaling in vertebrate development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:505-512.

Habib T, Park H, Tsang M, de Alborán IM, Nicks A, Wilson L, Knoepfler OS, Andrews S, Rawlings DJ, Eiswmen RN, Iritani BM (2007). Myc stimulates B lymphocyte differentiation and amplifies calcium signaling. *J. Biol. Chem.* 179:717-731

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

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 98: 859-869.

Harbour JW, Dean DC (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, 14: 2393-2409.

Healy JI, Dolmetsch RE, Timmerman LA, Cyster JG, Thomas ML, Crabtree GR, Lewis RS, Goodnow CC (1997). Different nuclear signals are activated by B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity* 6:419-428

Healy JI, Goodnow CC (1998). Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 16:645-670

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

Ho AM, Jain J, Rao A, Hogan PG (1994). Expression of the Transcription Factor NFATp in Neuronal Cell Line and in the Murine Nervous System. *J. Biol. Chem.* 269, 28181-18186.

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

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

Hoey T, Sun YL, Williamson K, Xu X (1995). Isolation of Two New Members of the NFAT Gene Family and Functional Characterization of the NFAT Proteins. *Immunity* 4, 461-472.

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

Hofer T, Muehlinghaus G, Moser K, Yoshida T, Mei HE, Hebel K, Hauser A, Hoyer B, Luger EO, Dorner T, Manz RA, Hiepe F, Radbruch A (2006). Adaptation of humoral memory. *Immunol. Rev.* 211:295-302

Horsley V, Pavlath GK (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol*, 156: 771-774.

Huet X, Rech J, Plet A, Vié A, Blanchard J-M (1996). Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 16: 3789-3798.

Huhtanen RL, Blomqvist CP, Böhling TO, Wiklund TA, Tukiainen EJ, Virolainen M, Tribukait B, Andersson LC (1999). Expression of cyclin A in soft tissue sarcomas correlates with tumor aggressiveness. *Cancer Res*, 59: 2885-2890.

Hwang HC, Clurman BE (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*, 24: 2776-2786.

Imamura R, Masuda ES, Naito Y, Imai S, Fujino T, Takano T, Arai K, Arai N (1998). Carboxy-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 MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M (2000). An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, 275: 23627-23635.

Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A (1993a). The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 356, 352-355.

Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A (1992a). Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 356, 801-804.

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

Janeway Jr. CA (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 7461-7468.

Janik P, Briand P, Hartmann NR (1975). The effect of estrone-progesterone treatment on cell proliferation kinetics of hormone-dependent GR mouse mammary tumors. *Cancer Research* 35:3698-3704.

Janz S (2006). Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasm. *DNA Repair* 5:1213-1224

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

Kastan MB, Bartek J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432: 316-323.

Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res*, 54: 380-385.

Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS (2002). Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med*, 347: 1566-1575.

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

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

Knecht H, Brousset P, Bachmann E, Pallesen G, Odermatt BF (1994). *Leuk.Lymph.* 15:399-403.

Kondo M, Scherer DC, King AG, Manz MG, Weissman IL (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 11: 520-526.

Kuppers R (2005). Mechanism of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 4:251-262

Lanzavecchia A, Sallusto F (2007). Toll-Like receptors and innate immunity in B cell activation and antibody response. *Curr. Opin. Immunol.* 19:268-274

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

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14: 233-258.

Lewis RS (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 19: 497-521.

Lipskaia L, Lompré AM (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca^{2+} signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell*, 96: 55-68.

Loh C, Shaw KT-Y, Carew J, Viola JPB, Luo C, Perrino BA, Rao A (1996). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem*, 271: 10884-10891.

López-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman A, Rao A (1999). NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 7214-7219.

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

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

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

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

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

Manicassamy S, Gupta S, Huang Z, Molketin JD, Shang W, Sun Z (2008). Requirement of calcineurin A β for the survival of naïve T cells. *J. Immunol.* 180:106-112

Massagué J (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432: 298-306.

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

Marofioti T, Pozzobon M, Hansmann ML, Ventura R, Pileri SA, Moller P, Natkunam Y, Siebert R, Mason DY (2005). The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br. J. Haematol.* 128:333-342

Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 14: 2066-2076.

MacConmara M, Lederer JA (2005). B cells. *Crit. Care Med.* 33:514-516

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

McHeyzer-Williams LJ, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG (2001). Germinal center reaction. *Curr. Opin. Hematol.* 8:52-59

McHeyzer-Williams MG (2003). B cells as effectors. *Curr. Opin. Immunol.* 15:354-361

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

Meyerson M, Harlow E (1994). Identification of G₁ kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol*, 14: 2077-2086.

Morgan DO (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374: 131-134.

Murphy M, Stinnakre M-G, Senamaud-Beaufort C, Winston NJ, Sweeney C, Kubelka M, Carrington M, Brechot C, Sobczak-Thépot J (1997). Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet*, 15: 83-86.

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

Nurse P (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 100: 71-78.

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

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

Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J*, 11: 961-971.

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

Pavletich NP (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, 287: 821-828.

Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH (2001). NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity*, 14: 13-20.

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

Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ (2004). CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 22:307-328.

Rainio E-M, Sandholm J, Koskinen PJ (2002). Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *J Immunol*, 168: 1524-1527.

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

Ranger AM, Hodge MR, Gravallesse EM, Oukka M, Davidson L, Alt FW, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby M, Glimcher LH (1998b). Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity*, 8: 125-134.

Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH (1998c). Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 9:627-635

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

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

Ren S, Rollins BJ (2004). Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 117: 239-251.

Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH (2000a). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol. Today* 21, 479-483.

Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, Gerth AJ, Kroczeck RA, Ashwell JD, Glimcher LH (2000b). Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity*, 12: 293-300.

Rengajaran J, Mowen KA, McBride KD, Smith ED, Singh H, Glimcher LH, (2002a). Interferon regulatory factor 4 (IRF-4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J. Exp. Med.* 195, 1003-1012.

Rengajaran J, Tang B, Glimcher LH (2002b). NFATc2 and NFATc3 regulate Th2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naïve Th cells. *Nature Immunology* 3, 48-54.

Reth M, Wienands J (1997). Initiation and propagation of signals from the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 15:453-479

Ruff VA, Leach KL (1995). Direct Demonstration of NFATp Dephosphorylation and Nuclear Localization in Activated HT-2 cells Using a Specific NFATp Polyclonal Antibody. *J. Biol. Chem.* 260, 22602-22607.

Sagaert X, De Wolf-Peeters C (2003). Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localization and their developmental lineage. *Immunol. Letters* 90:179-186

San-Antonio B, Íñiguez MA, Fresno M (2002). Protein kinase C ζ phosphorylates nuclear factor of activated T cells and regulates its transactivating activity. *J Biol Chem*, 277: 27073-27080.

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

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

Scuderi R, Palucka KA, Pokrovskaja K, Björkholm M, Wiman KG, Pisa P (1996). Cyclin E overexpression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B-cell lineage. *Blood*, 87: 3360-3367.

Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A (2000). The Role of NFAT Transcription Factor in T cell Activation and Differentiation. *Biochimia. Et Biophysica Acta* 1498, 1-18.

Shaw KTY, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A, Hogan PG (1995). Immunosuppressive Drugs Prevent a Rapid Dephosphorylation of

Transcription Factor NFAT1 in Stimulated Immune Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 11205-11209.

Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672-1677.

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

Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev*, 13: 1501-1512.

Sherr CJ, Roberts JM (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 18: 2699-2711.

Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, Dewald G, Kirsch IL, Bergsagel PL, Kuehl WM (1999). Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc deregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97:228-233

Smits VAJ, Medema RH (2001). Cheking out the G₂/M transition. *Biochim Biophys Acta*, 1519: 1-12.

Takizawa CG, Morgan DO (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 658-665.

Tangye SG, Hodgkin PD (2004). Divide and conquer: the importance of cell division in regulating B-cell responses. *Immunol.* 112:509-520

Terada N, Lucas JJ, Gelfand EW (1991). Differential regulation of the tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53, during cell cycle progression of normal human T cells. *J. Immunol.* 147:698-704

Teutsch M, Higer M, Wang D, Wortis HW (1995). Induction of CD5 on B and T cell is suppressed by cyclosporine A, FK-520 and rapamycin. *Inter. Immunol.* 7:381-392

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

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

Venkataraman L, Francis DA, Wang Z, Liu J, Rothstein TL, Sen R (1994). Cyclosporin-A sensitive induction of NF-AT in murine B cells. *Immunity* 1:189-196

Vindelov LL (1977). Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 24: 227-242.

Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature Rev. Immunol.* 5:853-865

Viola JPB, Kiani A, Bozza PT, 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.

Vogelstein B, Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Medicine*, 10: 789-799.

Wang DZ, McCaffrey PG, Rao A (1995). The Cyclosporin-sensitive Transcription Factor NFATp is Expressed in Several Classes of Cells in the Immune System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766, 182-194.

Weiss DL, Hural J, Tara D, Timmerman LA, Henkel G, Brown MA (1996). Nuclear Factor of Activated T cells is Associated with a Mast Cell Interleukin 4 Transcription Complex. *Mol. Cell. Biol.* 16, 228-235.

Winslow MM, Gallo EM, Neilson JR, Crabtree GR (2006). The calcineurin phosphatase complex modulates immunogenic B cell responses. *Immunity* 24: 141-152

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

Xu M, Sheppard K-A, Peng C-Y, Yee AS, Piwnica-Worms H (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 14: 8420-8431.

Yam CH, Fung TK, Poon RYC (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci*, 59: 1317-1326.

Yang R, Nakamaki T, Lübbert M, Said J, Sakashita A, Freyaldenhoven BS, Spira S, Huynh V, Müller C, Koeffler HP (1999). Cyclin A1 expression in leukemia and normal hematopoietic cells. *Blood*, 93: 2067-2074.

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

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

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

Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot J-C, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Ferrara P, McKeon F (1998). Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell*, 93: 851-861.

8. Anexos

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

Report

The NFAT1 Transcription Factor is a Repressor of Cyclin A2 Gene Expression

Lilian D.S. Carvalho^{1,†}

Leonardo K. Teixeira^{1,†}

Nina Carrossini¹

Anita T.N. Caldeira¹

K. Mark Ansel²

Anjana Rao²

João P.B. Viola^{1,*}

¹Division of Cellular Biology; National Cancer Institute (INCA); Rio de Janeiro, Brazil

²The CBR Institute for Biomedical Research and Department of Pathology; Harvard Medical School; Boston, Massachusetts USA

[†]These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: João P.B. Viola; Divisão de Biologia Celular; Instituto Nacional de Câncer (INCA); Rua André Cavalcanti, 37; Centro, Rio de Janeiro RJ 20231-050 Brazil; Tel.: 55.21.3233.1322; Fax: 55.21.3233.1470; Email: jpvila@inca.gov.br

Original manuscript submitted: 04/16/07

Revised manuscript submitted: 05/18/07

Manuscript accepted: 05/21/07

Previously published online as a *Cell Cycle* E-publication:

<http://www.landesbioscience.com/journals/cc/abstract.php?id=4473>

KEY WORDS

cyclin, gene expression, lymphocytes, NFAT, transcription factor

ABBREVIATIONS

CHO	Chinese hamster ovary cells
CsA	cyclosporin A
Iono	ionomycin
NFAT	nuclear factor of activated T cell
OVA	ovalbumin
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate

ACKNOWLEDGEMENTS

See page e6.

ABSTRACT

The NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) family of transcription factors plays a central role in the regulation of several genes related to the immune response. Recently, NFAT proteins have been implicated in the proliferation and differentiation of different cell types. Previous studies have shown that NFAT1-deficient mice display lymphocyte hyperproliferation, shortened cell cycle duration, and cyclin overexpression. Here, we demonstrate that cyclin A2 expression is upregulated in the absence of NFAT1 in lymphocytes. Ectopic expression of NFAT1 in CHO cells decreases cyclin A2 levels. Indeed, NFAT1 binds to a consensus binding site found at the mouse cyclin A2 promoter *in vitro* and *in vivo*. Luciferase reporter assays show that NFAT1 downregulates cyclin A2 expression by directly binding to the cyclin A2 promoter. Together, these results indicate that the NFAT1 transcription factor represses cyclin A2 expression in lymphocytes, and may act as a silencer of gene transcription during the cell cycle.

INTRODUCTION

Cell cycle progression is controlled by cyclin-dependent kinases (CDKs) and their partner cyclins. Cyclin-CDK activation is precisely coordinated throughout the cell cycle. Cyclins are regulated at transcriptional and post-transcriptional levels during cell cycle phases, and control multiple specific steps required for cellular division.^{1,2} Cyclin A has been implicated in the control of S phase entry, as well as in the G₂/M phase transition, through binding to CDK2 and CDK1, respectively. Indeed, cyclin A levels are initially detected in late G₁, substantially increased through S phase, and start to decrease during early mitosis.^{2,3} To date, two cyclin A members have been identified in mammals. In mice, cyclin A1 has been described to be exclusively expressed in male germ cells, while cyclin A2 is expressed in several adult as well as embryonic tissues.^{4,5} Cyclin A2-deficient mice are not viable, suggesting a nonredundant role for this protein during embryonic development.⁶

Regulation of cyclin A2 expression has been widely investigated in different cell types and models.⁷ Cyclin A2 transcription is repressed in quiescent (G₀) and early G₁ cells, and is rapidly derepressed/induced when cells approach the G₁/S boundary.⁸⁻¹⁰ Several studies have identified at least four regulatory elements located within a 70-bp region near the transcriptional start site of cyclin A2 gene. Two of these elements, known as the CRE and CAAT box, are constitutively occupied throughout the different phases of the cell cycle by the CREB/ATF and NF-Y families of proteins, respectively.^{10,11} These regions have been shown to be regulated by the TGF- β and cAMP signaling pathways in different cells.¹²⁻¹⁵ The other two sites, named CCRE/CDE and CHR, are occupied in G₀/early G₁ cells, and are negative regulatory elements in the cyclin A2 promoter.^{9,10,16} Binding proteins that regulate the activity of these elements may include E2F, Rb, CDF-1, and SWI/SNF chromatin remodeling factors.¹⁶⁻¹⁹ Besides these elements, cyclin A2 promoter also seems to contain another negative regulatory region localized upstream of the CCRE/CDE core element.^{8,10} However, the molecular mechanisms that dictate its activity have not been elucidated yet.

Increase of intracellular calcium levels is crucial for cellular proliferation. Several reports have shown that the calcium/calmodulin signaling pathway is able to regulate the expression of cell cycle-related genes, such as cyclin A and E.²⁰⁻²² Furthermore, the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506, which inhibit the activity of calcineurin, also modulate the expression of cyclin genes and CDK inhibitors.^{20,23} The NFAT family of transcription factors encodes four different proteins that are activated through the calcium/calmodulin

signaling pathway.^{24,25} Calcium influx induced by different stimuli activates calcineurin, which is able to dephosphorylate NFAT. NFAT dephosphorylation leads to nuclear translocation, and increased DNA binding affinity.^{26,27} In fact, several reports have shown NFAT binding sites in the promoter/enhancer regions of many inducible genes, such as IL-2, IL-4, IFN γ , TNF α , and the cell surface molecules CD40L, Fas-L and CTLA-4.^{24,25} Recently, the transcription factor NFAT1 has been demonstrated to directly repress the expression of CDK4 in lymphocytes.²⁸ Nevertheless, the involvement of NFAT proteins in the regulation of cell cycle-related genes is still poorly known.

We have previously observed increased expression of cyclin genes in lymphocytes lacking the NFAT1 protein.²⁹ These results suggested to us that NFAT1 could play a negative regulatory role in cyclin expression in these cells. Here, we demonstrate that the NFAT1 transcription factor directly binds to the promoter region of the cyclin A2 gene, and regulates the expression of cyclin A2 in lymphocytes. NFAT1 acts as a repressor of cyclin A2 expression through the binding of a negative regulatory element identified at the cyclin A2 promoter, besides the canonical regions already described. These results indicate NFAT proteins as regulators of cyclin expression in lymphocytes, and central controllers of the mammalian cell cycle.

RESULTS

NFAT1 negatively regulates cyclin A2 expression. NFAT transcription factors regulate the expression of cell cycle-related proteins, such as CDK4, p21 and c-MYC.^{23,28,35} We previously showed that NFAT1^{-/-} lymphocytes display increased expression of certain cyclin genes upon antigen stimulation.²⁹ In this study, we investigate the mechanism underlying increased expression of cyclin A2 by NFAT1^{-/-} lymphocytes. Compared to wild type cells, NFAT1^{-/-} lymphocytes from OVA-sensitized mice expressed higher levels of cyclin A2 mRNA and protein after OVA challenge, as analyzed by RT-PCR and western blot (Fig. 1A, compare lanes 3 and 4; and Fig. 1B, compare lanes 3–6). To confirm this finding, we generated stably-transfected CHO cells in which NFAT1 can be conditionally expressed under the control of the tetracycline repressor. NFAT1 was expressed in these cells only upon doxycycline treatment (Fig. 1C), and NFAT1 induction was associated with decreased cyclin A2 mRNA and protein levels (Fig. 1D and E). Doxycycline treatment did not affect cyclin A2 expression in untransfected CHO cells (data not shown). Together, these results suggest that NFAT1 acts as a repressor of cyclin A2 expression.

The cyclin A2 promoter is repressed by NFAT1. We identified NFAT-responsive regions in the proximal promoter region of the mouse cyclin A2 gene by transfecting Jurkat cells with different promoter constructs (Fig. 2A). As previously described, a construct containing only 24 bp upstream of the transcription

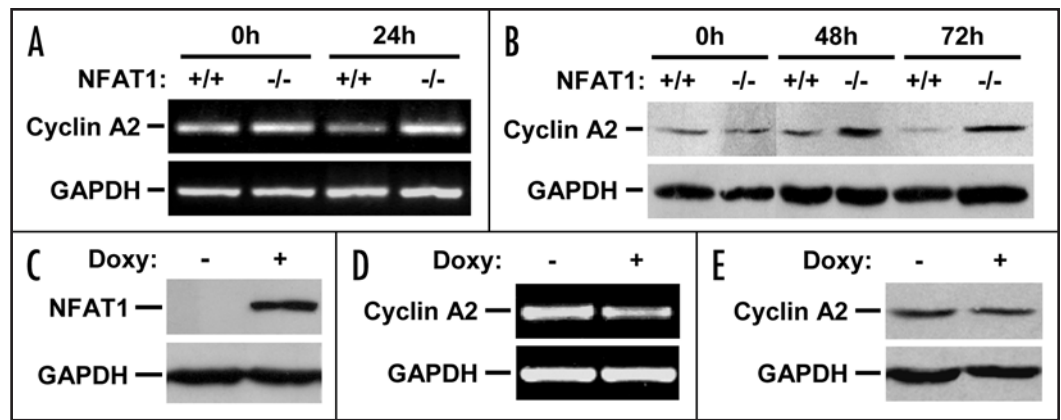


Figure 1. NFAT1 regulates cyclin A2 gene expression. (A and B) Animals (NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-}) were sensitized, and cells from the draining lymph nodes were collected and stimulated *in vitro* with ovalbumin (OVA) after 15 days of sensitization. At the indicated time points, total RNA or total protein lysates were obtained and cyclin A2 or GAPDH levels were analyzed either by RT-PCR (A) or western blot (B). (C–E) CHO-NFAT1 cells were cultivated either in the absence or presence of doxycycline (1 μ g/ml) for 48 hours. Total protein lysates or total RNA was obtained and NFAT1, cyclin A2 or GAPDH levels were analyzed either by RT-PCR (D) or western blot (C and E). These results are representative of at least three independent experiments.

start site (CycA2-24-Luc) had no luciferase activity (Fig. 2A). On the other hand, a construct containing 302 bp of the proximal promoter (CycA2-302-Luc) was 3-fold more active than the original -862 bp promoter (CycA2-862-Luc) (Fig. 2A). Deletion of the -576 to -302 bp region in the context of the -862 bp promoter (CycA2 Δ -576,-302-Luc) increased luciferase activity to the level observed with the partial construct CycA2-302-Luc, suggesting the presence of a negative regulatory element in the -576 to -302 bp region (Fig. 2A). Bioinformatic analysis indicated a consensus NFAT-binding site at position -456 bp of the mouse cyclin A2 promoter, which showed homology to the canonical NFAT binding site found at the mouse IL-2 promoter (Fig. 2B).

We showed that NFAT1 could act as a negative regulator of cyclin A2 expression in lymphocytes. PMA plus ionomycin treatment decreased expression of the -862 bp cyclin A2 promoter in Jurkat T cells, and this decrease was prevented by pretreatment with cyclosporin A (CsA) (Fig. 2C, left), suggesting that endogenous NFAT repressed cyclin A2 expression. Confirming this hypothesis, ectopic expression of NFAT1 resulted in decreased activity of the cyclin A2 promoter in unstimulated cells, with a further decrease observed after stimulation with PMA plus ionomycin; again, the stimulation-dependent decrease was prevented by CsA (Fig. 2C, right). As expected, cells ectopically expressing NFAT1 showed increased induction of a reporter construct containing tandem NFAT:AP-1 composite sites (3xNFAT-Luc) in response to PMA and ionomycin, and this was blocked by CsA (Fig. 2D). These results indicate that NFAT1 is a repressor of cyclin A2 expression in lymphocytes.

NFAT1 binds to the cyclin A2 promoter in lymphocytes. To confirm the role of NFAT1 in cyclin A2 gene repression *in vivo*, we used chromatin immunoprecipitation (ChIP) to monitor NFAT1 binding to the consensus NFAT binding site identified at position -456 bp of the cyclin A2 promoter. In Th1 cells derived from CD4⁺ T cells of wild type mice, NFAT1 bound to the cyclin A2 promoter, regardless of whether the cells were left unstimulated or were stimulated with PMA plus ionomycin, and stimulation-dependent binding was completely blocked by CsA (Fig. 3A and B). We also evaluated NFAT1 binding to the IFN γ and IL-4 promoters, as positive and negative controls respectively based on chromatin accessibility. After

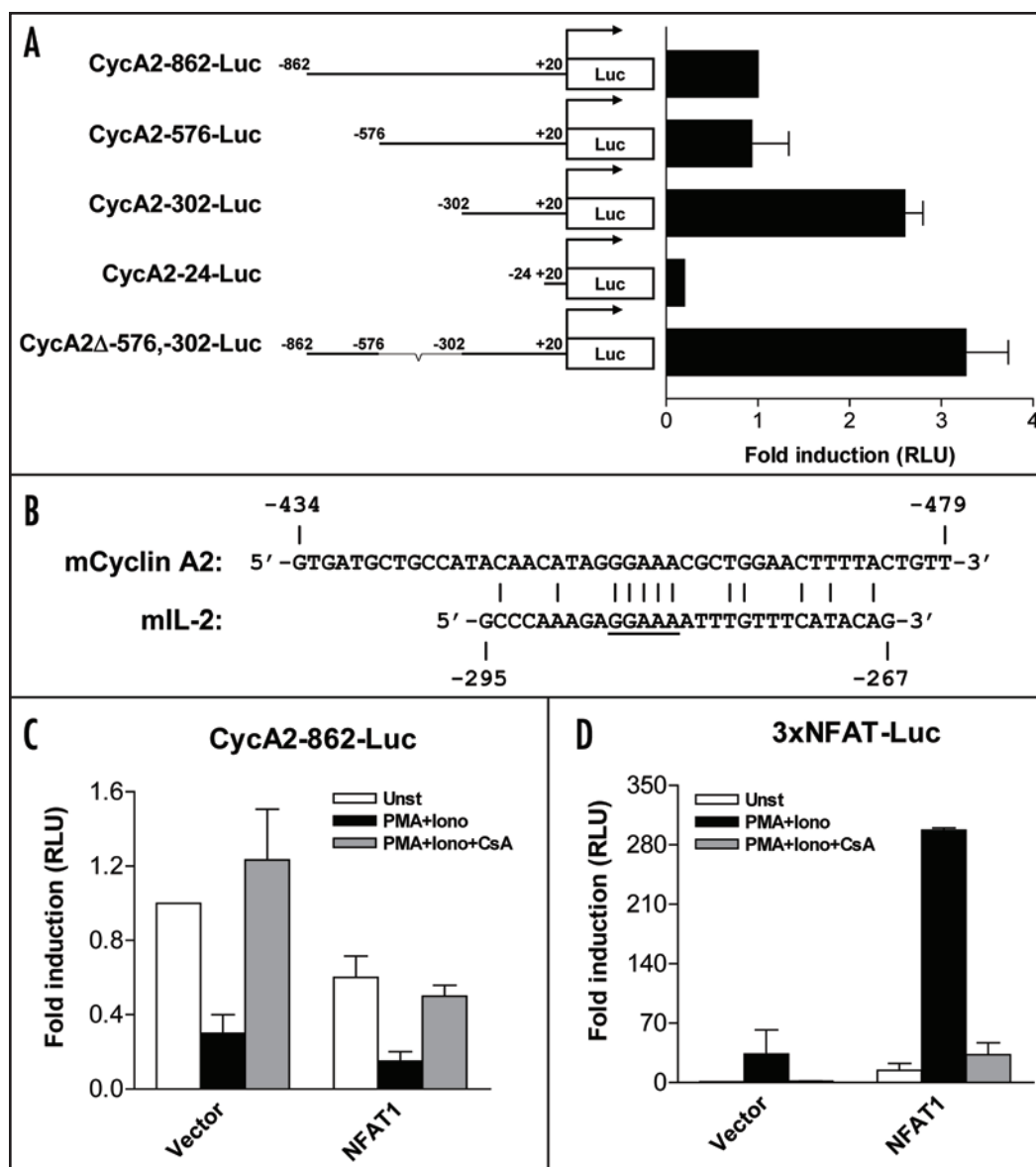


Figure 2. Negative regulatory region at cyclin A2 promoter contains an NFAT binding site. (A) Schematic representation of the luciferase reporter vectors used. The mouse cyclin A2 promoter region (between -862 and +20 bp) was cloned into the pGL3-basic vector (CycA2-862-Luc). The other plasmids were obtained by serial deletions of the full-length reporter plasmid as described: CycA2-576-Luc; -302-Luc; -24-Luc; Δ-576,-302-Luc. Jurkat cells were then transfected with each of the indicated vectors. After 24 hours, cells were stimulated for 16 hours with PMA (10 nM) plus ionomycin (1 μM) and total cell lysates were obtained. Luciferase activity was measured as described, and expressed as relative light units (RLU) relative to CycA2-862-Luc vector. (B) Schematic representation of the mouse cyclin A2 promoter region (between -479 and -434 bp) aligned to the mouse interleukin-2 promoter region (mIL-2; between -295 and -267 bp). The putative NFAT binding site is underlined. (C and D) Jurkat cells were cotransfected with the expression vector (pcDNA5-empty or pcDNA5-NFAT1; Vector or NFAT1, respectively) and the luciferase reporter vector CycA2-862-Luc (C) or 3xNFAT-Luc (D). After 24 hours, cells were left unstimulated (Unst) or stimulated for 16 hours with PMA (10 nM) plus ionomycin (1 μM) either in the absence or presence of cyclosporin A (1 μM). Then, luciferase activity was measured, and expressed as relative light units (RLU) relative to unstimulated cells transfected with pcDNA5-empty (Vector). Results are expressed as mean ± SD of three independent experiments.

PMA plus ionomycin stimulation, NFAT1 bound by ChIP to the IFNγ promoter which is accessible in Th1 cells, but not to the IL-4 promoter which is inaccessible in these cells (Fig. 3C). As expected, NFAT1 did not bind the IFNγ or IL-4 promoters in unstimulated cells (Fig. 3C).

The cyclin A2 promoter contains a functional NFAT-responsive negative regulatory element. We then asked whether the NFAT-binding site identified at position -456 bp was a functional element that bound NFAT1. When tested in an electrophoretic mobility shift assay (EMSA), the recombinant DNA-binding domain of NFAT1 bound an oligonucleotide spanning the -456 bp element but was unable to bind a mutated oligonucleotide in which the GGAAA sequence which contacts NFAT1 was substituted with ACTCT (Fig. 4A; see Materials and Methods). NFAT1 binding was competed in a dose-dependent manner by increasing amounts of unlabelled oligonucleotides from the IL-2 or cyclin A2 promoters, with approximately 10-fold more cyclin A2 than IL-2 oligonucleotide required to produce the same level of competition (Fig. 4A). This result suggests that NFAT1 binds with lower affinity to the

cyclin A2 promoter compared to the IL-2 promoter, consistent with the preference for T or A immediately 5' of the GGAAA sequence for high-affinity binding (A.R., unpublished observations).²⁴ The unlabelled mutant version of the cyclin A2 oligonucleotide did not interfere with NFAT1 binding, even at high concentrations (Fig. 4A).

To probe the function of the -456 bp NFAT-binding element, we mutated it in the context of the -862 bp cyclin A2 promoter (CycA2-862mut-Luc; Fig. 4B). The mutated promoter showed approximately 3-fold increase in luciferase activity compared to the wild type promoter (Fig. 4B). This result is in accordance with the increased luciferase activity observed with the -302 bp promoter construct (CycA2-302-Luc, Fig. 2A), which lacks the NFAT-binding site at position -456 bp. These results strongly support a negative regulatory role for NFAT1 during cyclin A2 expression in lymphocytes.

DISCUSSION

In this work, we demonstrate a previously unrecognized role for the transcription factor NFAT1 in cyclin A2 repression. NFAT1 directly binds to the cyclin A2 promoter, in a region demonstrated to have a negative regulatory function in both human and mouse promoters, suggesting an important evolutionary role.^{8,10} This region is distinct from the CCRE/CDE and CHR negative regulatory regions which are involved in downregulating cyclin A2 expression through the binding of Rb, p120^{E4F}, and certain subunits of the SWI/SNF chromatin remodeling machinery.^{18,19,36} Together, these results indicate that in addition to the repression driven by the CCRE/CDE and CHR elements, NFAT1 may account for the silencing of cyclin A2 during G₀/G₁ cell cycle phase.^{9,10,18}

NFAT1 has also been shown to bind to the promoter region and to repress the expression of CDK4 in lymphocytes, suggesting a general repressor role for this transcription factor during cellular proliferation.²⁸ As also observed in the *CDK4* and *c-MYC* promoter regions, the NFAT binding site found at the cyclin A2 promoter lies in close vicinity to a putative E2F-binding site. Recent data have indicated that E2F and NFAT proteins may compete for the binding and regulation of *cdk4* and *myc* expression in different models.^{28,35} Thus NFAT1 might be responsible for silencing cyclin A2 during the G₀/G₁ phase of the cell cycle, antagonizing the G₁/S phase transition mediated by E2F.

Notably, NFAT1 bound strongly to the cyclin A2 promoter even in unstimulated cells, although it could not be detected at the accessible promoter of the IFN γ gene in the same cell population (Fig. 3A and B). The binding was completely blocked by CsA, indicating that it reflected some basal activation of calcineurin as expected. The results suggest that NFAT1 occupies the cyclin A2 promoter with unusually high affinity in living cells. Given the relatively binding of NFAT1 to the -456 bp element in EMSA assays in vitro (10-fold lower affinity than binding to the IL-2 promoter element; Fig. 4A), one possibility is that the small amount of NFAT present in the nucleus of resting cells is preferentially recruited to the cyclin A2 promoter as a result of cooperation with a preexisting factor that tightly occupies a sequence adjacent to the -456 bp element even in the absence of stimulation. This hypothesis is currently being tested.

NFAT transcription factors have been associated with cellular proliferation and tumorigenesis in different cell types.^{22,37} Deficiency of NFAT1 in vivo caused lymphocyte hyperproliferation, altered cell cycle control, and increased stage-specific cyclin expression.^{29,30,38} Considering cell types other than immune cells, the absence of NFAT1 led to uncontrolled growth of connective tissue and skeletal muscle cells, suggesting a suppressor role for this protein in different tissues.^{39,40} In contrast, the lymphocytes of NFAT2-deficient mice displayed impaired cellular proliferation as well as deficient thymus and lymphoid organ repopulation.^{41,42} Moreover, NFAT2 has been implicated as an oncogenic factor, since it induces cells to acquire growth factor autonomy, and upregulate cyclin D and *myc* expression in adipocytes and pancreatic cells.^{35,43} Together with these studies, our data suggest that NFAT proteins are critical regulators of cyclin gene expression in lymphocytes as well as other cell types.

To summarize, our evidence indicates that NFAT1 functions as a cell cycle repressor with a possible tumor suppressor role in vivo. Potentially, NFAT1-mediated cyclin A2 downregulation might be related to the control of cellular proliferation and tumor development in vivo. Preliminary results from our laboratory support this idea, since conditional expression of NFAT1 protein not only decreases the

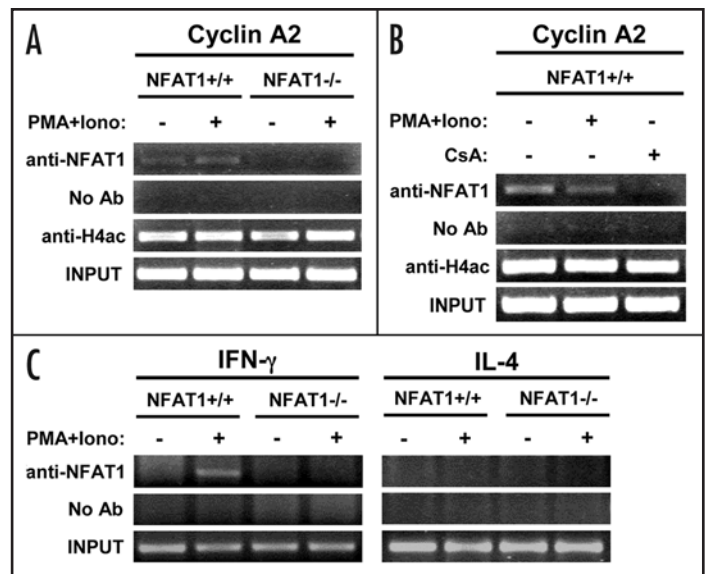


Figure 3. NFAT1 transcription factor directly binds to cyclin A2 promoter in vivo. CD4⁺ T lymphocytes were isolated from naive NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice, and cells were stimulated in vitro with plate-bound anti-CD3 and anti-CD28 for 7 days in the presence of Th1 polarizing conditions as described. Cells were then left unstimulated or stimulated with PMA (10 nM) plus ionomycin (1 μ M) for additional 4 hours either in the absence or presence of cyclosporin A (1 μ M). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was carried out using nuclear extracts, and immunoprecipitation was performed with anti-NFAT1, anti-acetylated forms of histone H4 antibody (anti-H4ac), or no antibody as a negative control (No Ab). Then, DNA was purified and analyzed by PCR for cyclin A2 (A and B) or IFN γ and IL-4 (C) promoter regions containing the NFAT binding sites. As a control, PCR was also done directly on input DNA purified from chromatin before immunoprecipitation (INPUT). These results are representative of at least two independent experiments.

expression of cyclin A2 in CHO cells (Fig. 1C–E), but also inhibits tumor growth when these cells are subcutaneously injected in BALB/c nude/nude mice in a model of tumorigenesis (unpublished results). In fact, several studies have associated the dysregulation of cyclin A with different types of tumors, including hepatocellular carcinoma, soft tissue sarcoma, and leukemia.^{44–47} A better understanding of the specific contribution of each NFAT family member to cell cycle progression will provide further insight into tumorigenic processes.

MATERIALS AND METHODS

Animals, sensitization and cell cultures. Control wild type (NFAT1^{+/+}) and NFAT1-deficient (NFAT1^{-/-}) 8- to 12-week old mice were used in all experiments. Animals were bred and maintained in the Brazilian National Cancer Institute (INCA) animal facility. Animals were treated according to the guide for the care and use of laboratory animals from the National Institutes of Health (NIH, USA). Mice were sensitized in the hind footpad with one subcutaneous injection of 0.1 mL of ovalbumin (OVA, 200 μ g) emulsified in complete Freund's adjuvant as described before.^{30,31} Fifteen days later, cells from the draining lymph nodes were harvested and restimulated in vitro with 0.5 mg/mL of OVA for different time points.²⁹ All cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), L-glutamine, streptomycin-penicillin, essential and nonessential amino acids, sodium pyruvate, vitamins, hepes, 2-mercaptoethanol (all from Invitrogen). Cells were cultivated

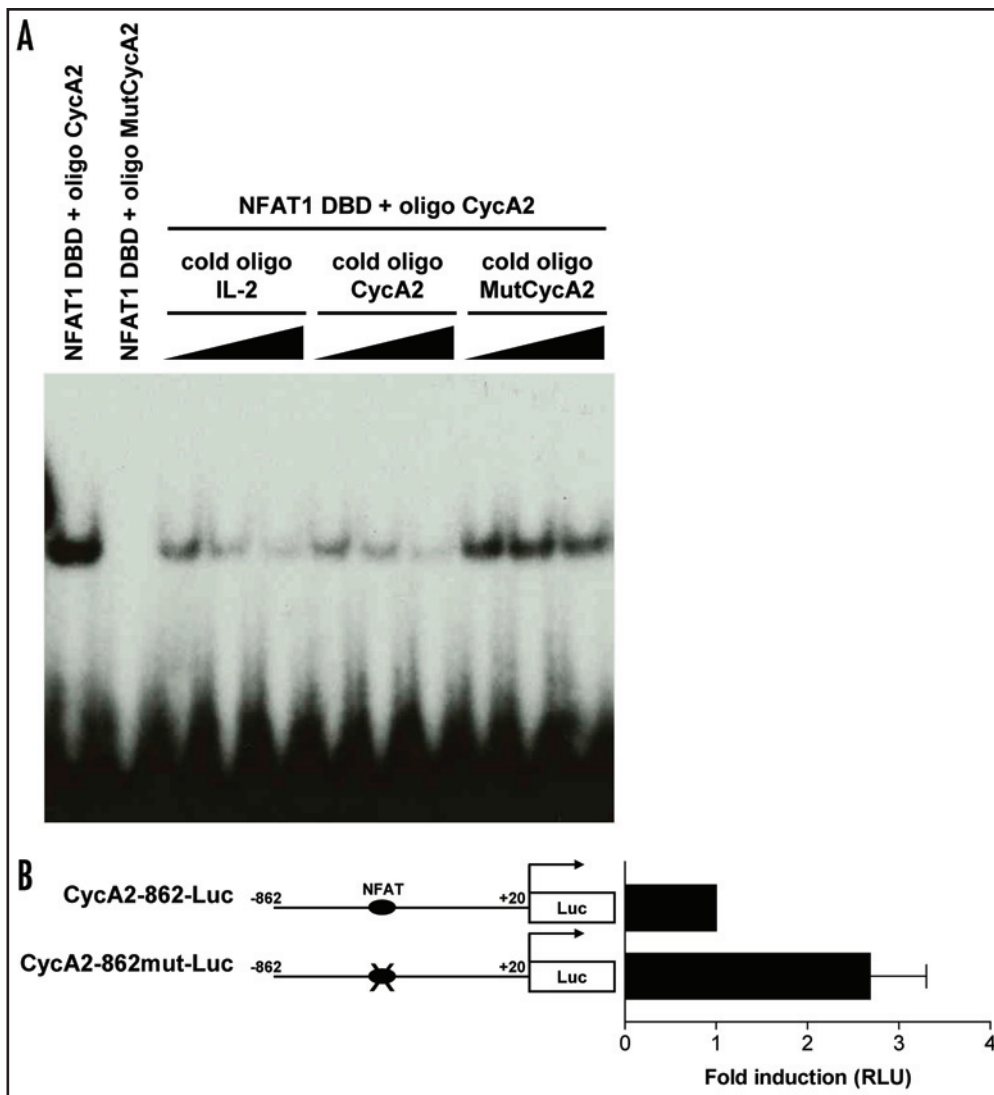


Figure 4. NFAT1 transcription factor inhibits cyclin A2 gene expression in lymphocytes. (A) NFAT1 peptide (NFAT1 DBD) was incubated with labeled oligos containing or not the NFAT binding site: wild type cyclin A2 promoter (CycA2) or the mutated oligo (MutCycA2), respectively. Increasing concentrations of cold oligos were included in the binding reaction before the addition of labeled probes when indicated: IL-2 (5, 10 and 25x), CycA2, and MutCycA2 (50, 100, and 250x). DNA-peptide complexes were analyzed by autoradiography. These results are representative of three independent experiments. (B) Schematic representation of cyclin A2 promoter constructs containing the wild-type NFAT binding site at position -456 (CycA2-862-Luc) or the specific mutation of this site (CycA2-862mut-Luc). Jurkat cells were then transfected as described before. After 24 hours, cells were stimulated for 16 hours with PMA (10 nM) plus ionomycin (1 μ M). Luciferase activity was measured, and expressed as relative light units (RLU) relative to CycA2-862-Luc vector. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments.

in 5% CO₂ at 37°C. The phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ionomycin (Iono), and the antibiotic doxycycline were obtained from Calbiochem[®]; the immunosuppressive drug cyclosporin A (CsA) was obtained from LC Laboratories; the complete Freund's adjuvant (CFA), and the ovalbumin (OVA) were purchased from Sigma-Aldrich.

RT-PCR. Total RNA was extracted with Trizol Reagent (Invitrogen) and semi-quantitative RT-PCR for murine cyclin A2 and GAPDH expression were performed using the Ready-To-Go[™] You-Prime First-Strand Beads (Amersham Biosciences). The primers were used

as follows: cyclin A2, 5'-CCT CTC CTC CAT GTC TGT GTT AAG-3' and 5'-GTG CTC CAT TCT CAG AAC CTG CTT-3' (163-bp product); GAPDH, 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3' and 5'-ACG ACA TAC TCA GCA CCA GCA TCA-3' (276-bp product). PCR conditions were as follows: 95°C 5 min; 28 cycles at 95°C 30s, 55°C 30s and 72°C 45s; and a final elongation at 72°C for 5 min. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels and visualized with ethidium bromide.

Western blot. Total protein lysates were obtained as previously described.²⁷ Briefly, cells (2 $\times$ 10⁶ cells) were lysed in buffer containing 40 mM Tris pH 7.5, 60 mM sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, and 5% SDS, followed by incubation at 100°C for 15 min. Total cell lysates were resolved in SDS-PAGE, and the separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane. The antibodies were used as follows: NFAT1, polyclonal antibody anti-67.1,²⁷ Cyclin A, polyclonal antibody C-19 and GAPDH, monoclonal antibody 6C5 (Santa Cruz). The immunodetection was performed with ECL western blotting detection kit (Amersham Biosciences).

CHO-NFAT1 cell line construction. The CHO-NFAT1 cell line was constructed by using the Flp-In[™] T-Rex[™] System (Invitrogen). Briefly, Chinese Ovary Hamster (CHO) cells were transfected with the acceptor vector pFRT/lacZeo, and cultivated in the presence of zeocin (500 μ g/mL). Recombinant clones were screened for unique insertion by Southern blotting, and high levels of β galactosidase activity. After clone selection, cells were transfected with the pcDNA5/FRT/TO-NFAT1 expression vector, and cultivated in the presence of hygromycin (500 μ g/mL). The pcDNA5/FRT/TO-NFAT1 expression vector was generated by cloning an *NruI/HindIII* fragment from NFAT1 cDNA (isoform C extracted from pFEBOS plasmid,³²) into the pcDNA5/FRT/TO vector linearized with *EcoRV* and *HindIII* (Flp-In[™] T-Rex[™] System, Invitrogen). Then, recombinant clones (CHO-NFAT1) were isolated and screened for low levels of β galactosidase activity, and the presence of NFAT1 protein by western blot. Finally, CHO-NFAT1 cells were transfected with the repressor vector pcDNA6, subsequently cultivated in the presence of blasticidin (5.0 μ g/mL), and isolated as a clone once again. This system enables conditional expression of NFAT1 when derepressed upon tetracycline/doxycycline treatment.

Construction of cyclin A2-promoter reporters. The full-length luciferase reporter plasmid, named CycA2-862-Luc, was obtained by inserting an 882 bp fragment from the mouse cyclin A2 promoter (a generous gift from Dr. J.M. Blanchard,¹⁰) into the pGL3-basic vector (Promega). The CycA2-862-Luc vector contains the -862 to +20 bp region driving the expression of luciferase reporter gene. The *Bgl*II/*Pst*I cyclin A2 promoter fragment was cloned into the *Bgl*II/*Hind*III restriction sites from the pGL3-basic vector. The other plasmids were obtained by serial deletions of the full-length CycA2-862-Luc vector with different restriction enzymes, as follows: CycA2-576-Luc (*Eco*RV); CycA2-302-Luc (*Xho*I); CycA2-24-Luc (*Bss*HII). The CycA2Δ-576,-302-Luc vector was obtained by deletion of the -576 to -302 region from the full-length plasmid with *Eco*RV and *Xho*I enzymes. The CycA2-862mut-Luc mutant plasmid was generated through site-directed mutagenesis of the full-length plasmid (Gene Tailor™ Site-Directed Mutagenesis System; Invitrogen). For site-directed mutagenesis, forward primer was designed as follows: 5' AAACAATAAAAGTTCCAGCGAGAGTCTATGTTGTA 3' (IDT). The mutated NFAT consensus-binding site is underlined.

Transactivation Assay. Jurkat cells (3×10^6 cells/600 μ L) were electroporated (950 μ F, 250 V) in a 0.4-cm GenePulser Cuvette with GenePulser II (Bio-Rad Laboratories). Cells were cotransfected with 3 different plasmids in serum-free media, as follows: (i) one of the indicated CycA2-promoter constructs (3.0 μ g), (ii) the pcDNA5/FRT/TO-NFAT1 expression vector (30 μ g), and (iii) the β galactosidase expression plasmid for normalization of transfection efficiency (1.0 μ g; kindly provided by Dr. J.A. Garcia, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil). After 24 hours, cells were washed, and stimulated in vitro for 16 hours at 37°C with PMA (10 nM) and ionomycin (1.0 μ M). The next day, cells were harvested, and lysis was performed for 20 min at room temperature with 50 μ L of 1X cell culture lysis reagent (Promega). Crude extracts (10 μ L) were added to 100 μ L of luciferase assay substrate (Promega), and luciferase activity was promptly measured in a Monolight 3010 Luminometer (Analytical Luminescence Laboratory). Luciferase activities were expressed as relative light units (RLU).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The NFAT1 DBD recombinant protein was expressed and purified as previously described.³³ Oligonucleotide duplexes (5.0 μ g of each oligo) were generated by denaturation for 10 min at 95°C in hybridization buffer (10 mM Tris pH 7.4, 50 mM NaCl), and immediately followed by overnight hybridization at room temperature. Oligonucleotides (50 ng) were labeled for 1 hour at 37°C with 50 μ Ci [³²P] dATP (Amersham Biosciences) and T4 polynucleotide kinase (10 U; New England Biolabs). Probes were then purified with MicroSpin™ G-25 columns (Amersham Biosciences). Binding reaction was performed for 20 min at room temperature in a total volume of 20 μ L of binding buffer (10 mM HEPES pH 7.0, 125 mM NaCl, 10% glycerol, 0.25 mM DTT, 0.8 mg/mL BSA). Purified NFAT1 DBD protein (10 nM) was incubated with 0.2 μ g/reaction of poly (dI:dC) (Amersham Biosciences) and -0.2–0.4 ng of labeled oligonucleotides (CycA2 or MutCycA2; 10,000 counts/min). When indicated, an excess of unlabeled oligonucleotides (cold oligos: IL-2, 5, 10, 25x; CycA2, 50, 100, 250x; and MutCycA2, 50, 100, 250x) was included in the binding reaction 10 min before the addition of the labeled probes. DNA-protein complexes were separated by electrophoresis under nondenaturing conditions on a 4% polyacrylamide gel in 0.5x TBE buffer. The gel was prerun for 1 hour at 100 V, and samples were run for an additional hour at 200 V. The gel was dried onto Whatman filter paper and analyzed by

autoradiography. The oligonucleotides were used as follows: IL-2 5'-TGGAATTTGTTTCATAGT-3'; CycA2 5'-AGTTCCAGCGTTTCCCTATGTTGTA-3'; MutCycA2 5'-AGTTCCAGCGAGAGTCTATGTTGTA-3' (IDT). The NFAT consensus-binding site is depicted in bold, and the changed nucleotides are underlined.

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). CD4⁺ T cells were positively isolated by magnetic bead selection from total lymph nodes of NFAT1^{+/+} and NFAT1^{-/-} mice (Dynal). CD4⁺ T lymphocytes (2×10^6 cells/well) were stimulated in vitro with plate-bound anti-CD3 antibody (2C11; 0.25 μ g/mL) and anti-CD28 (37.51; 1.0 μ g/mL) for seven days in the presence of Th1 polarizing conditions: IL-12 (10 ng/mL), anti-IL-4 (10 μ g/mL), and IL-2 (20 U/mL). Then, cells were washed, rested for 2 hours, and left unstimulated or restimulated in vitro with PMA (10 nM) and ionomycin (1.0 μ M) for additional four hours. When indicated, CsA (1 μ M) was added to cells 15 min before stimulation. For ChIP assay, cells were treated as previously described.³⁴ Briefly, CD4⁺ T cells (4×10^7) were fixed for 20 min at room temperature with 1:10 dilution of 11% formaldehyde solution (in 50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA), neutralized for 5 min on ice with 1:20 dilution of 2.5 M glycine, and rinsed twice with ice-cold 1x PBS. Nuclei were extracted in 10 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.75% Triton X-100 for 10 min at 4°C, followed by 10 min at 4°C in 10 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA. Then, nuclei were sonicated 10–12 times of 20 sec each at maximal setting, with 1 min of cooling on ice in-between pulses in 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1 mM PMSF, 25 μ g/mL aprotinin, 12.5 μ g/mL leupeptin (550 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific). The size of sonicated DNA was monitored in 1.5% agarose gels, and was around 0.5 kb. Chromatin was cleared by centrifugation for 10 min at 20,000 g, and then precleared for 2 hours at 4°C with Protein A Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences), previously blocked with sheared salmon sperm DNA (100 μ g/mL). Immunoprecipitation was performed overnight at 4°C with a set of NFAT1-specific antibodies (anti-67.1 and anti-T2B1; 15 μ g and 50 μ g, respectively) or anti-acetyl-histone H4 (5 μ g; Upstate Biotechnology). Immunocomplexes were captured with Protein A beads for 3 hours at 4°C, and precipitates were washed sequentially for 5 min at 4°C with different buffers, as previously described.³⁴ Protein A beads were treated for 30 min at 37°C with RNase A (50 μ g/mL; Sigma-Aldrich) in TE buffer, followed by deproteinization at 50°C for 4 hours with proteinase K (200 μ g/mL; Roche) and 0.5% SDS. Formaldehyde crosslinks were reversed at 65°C by overnight incubation. Finally, DNA was purified by phenol-chloroform extraction, precipitated with ethanol in the presence of carrier glycogen, and resuspended in 100 μ L of TE buffer. PCR was done with 5 μ L of the immunoprecipitated DNA. PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C, followed by 28 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 48°C or 60°C, and 30 sec at 72°C, completed by 5 min at 72°C. Primers were used as follows: cyclin A2 promoter, 5'-GTGAGTCACAGGACAATTGGGACA-3' and 5'-TAGGCAGGAGCGTATGGATCTGAA-3' (60°C; 209-bp product); IFN γ promoter, 5'-GCTCTGTGGATGAGAAAT-3' and 5'-AAGATGGTGACAGATAGG-3' (48°C; 250-bp product); and IL-4 promoter, 5'-AAGATTAGTCTGAAAGGCC-3' and 5'-TCAAGAGATGCTAACAATGC-3' (48°C; 290-bp product) (IDT). As loading control, the PCR was done directly on input DNA purified from chromatin before immunoprecipitation. PCR products were resolved on 1.5% agarose gels, and visualized with ethidium bromide.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. J.M. Blanchard for kindly providing the cyclin A2 promoter region, and to Dr. J.A. Garcia for kindly providing the β -galactosidase expression plasmid. This work was supported by grants from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB; CRP/BRA04-02 to J.P.B.V.), Brazilian National Council for Research (CNPq; 472819/2003-8 and 400968/2005-3 to J.P.B.V.), and NIH Fogarty International Center (FIRCA; RO3-TW006466-01 to A.R.). L.K.T. was supported by a Brazilian Ministry of Health fellowship, N.C. by a CAPES fellowship, and A.T.N.C. by a CNPq fellowship.

References

- Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374:131-4.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274:1672-7.
- Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:1317-26.
- Ravnik SE, Wolgemuth DJ. The developmentally restricted pattern of expression in the male germ line of a murine cyclin A, cyclin A2, suggests roles in both mitotic and meiotic cell cycles. *Dev Biol* 1996; 173:69-78.
- Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* 1998; 20:377-80.
- Murphy M, Stinnakre MG, Senamaud-Beaufort C, Winston NJ, Sweeney C, Kubelka M, Carrington M, Brechot C, Sobczak-Thépot J. Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* 1997; 15:83-6.
- Blanchard JM. Cyclin A2 transcriptional regulation: Modulation of cell cycle control at the G₁/S transition by peripheral cues. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1179-84.
- Henglein B, Chenivisse X, Wang J, Eick D, Brechot C. Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:5490-4.
- Zwicker J, Lucibello FC, Wolfraim LA, Gross C, Truss M, Engeland K, Muller R. Cell cycle regulation of the cyclin A, *cde25C* and *cde2* genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J* 1995; 14:4514-22.
- Huet X, Rech J, Plet A, Vie A, Blanchard JM. Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 1996; 16:3789-98.
- Plet A, Huet X, Algarte M, Rech J, Imbert J, Philips A, Blanchard JM. Relief of cyclin A gene transcriptional inhibition during activation of human primary T lymphocytes via CD2 and CD28 adhesion molecules. *Oncogene* 1997; 14:2575-83.
- Bartat I, Henglein B, Plet A, Lamb N, Fernandez A, McKenzie F, Pouyssegur J, Vie A, Blanchard JM. TGF-beta 1 and cAMP attenuate cyclin A gene transcription via a cAMP responsive element through independent pathways. *Oncogene* 1995; 11:1309-18.
- Desdouets C, Matesic G, Molina CA, Foulkes NS, Sassone-Corsi P, Brechot C, Sobczak-Thépot J. Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol Cell Biol* 1995; 15:3301-9.
- Nakamura T, Okuyama S, Okamoto S, Nakajima T, Sekiya S, Oda K. Down-regulation of the cyclin A promoter in differentiating human embryonal carcinoma cells is mediated by depletion of ATF-1 and ATF-2 in the complex at the ATF/CRE site. *Exp Cell Res* 1995; 216:422-30.
- Yoshizumi M, Wang H, Hsieh CM, Sibinga NE, Perrella MA, Lee ME. Down regulation of the cyclin A promoter by transforming growth factor- β 1 is associated with a reduction in phosphorylated activating transcription factor-1 and cyclin AMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 1997; 272:22259-64.
- Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Berges J, Helin K, Jansen-Durr P, Henglein B. Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:11264-18.
- Liu N, Lucibello FC, Engeland K, Muller R. A new model of cell cycle-related transcription: Repression of the cyclin A promoter by CDF-1 and anti-repression by E2F. *Oncogene* 1998; 16:2957-63.
- Philips A, Huet X, Plet A, Rech J, Vie A, Blanchard JM. Anchorage-dependent expression of cyclin A in primary cells requires a negative DNA regulatory element and a functional Rb. *Oncogene* 1999; 18:1819-25.
- Coisy M, Roure V, Ribot M, Philips A, Muchardt C, Blanchard JM, Dantonel JC. Cyclin A repression in quiescent cells is associated with chromatin remodeling of its promoter and requires Brahma/SNF2 α . *Mol Cell* 2004; 15:43-56.
- Tomono M, Toyoshima K, Ito M, Amano H, Kiss Z. Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1998; 353:374-8.
- Baksh S, DeCaprio JA, Burakoff SJ. Calcineurin regulation of the mammalian G₀/G₁ checkpoint element, cyclin dependent kinase 4. *Oncogene* 2000; 19:2820-7.
- Lipskaia L, Lompré AM. Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* 2004; 96:55-68.
- Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP. Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21^{WAF1/CIP1} expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9575-80.
- Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:707-47.
- Macian F. NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:472-484.
- Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A, Hogan PG. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:11205-9.
- Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA, Rao A. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* 1996; 271:10884-91.
- Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, Du J, Fosmire S, Fisher DE, DeCaprio JA, Modiano JF, Burakoff SJ. NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* 2002; 10:1071-81.
- Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MB, Barcinski MA, Viola JP. NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: Evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J* 2002; 16:1940-2.
- Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 1996; 272:892-5.
- Viola JP, Kiani A, Bozza PT, Rao A. Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: Role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* 1998; 91:2223-30.
- Luo C, Burgeon E, Carew JA, McCaffrey PG, Badalian TM, Lane WS, Hogan PG, Rao A. Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol Cell Biol* 1996; 16:3955-66.
- Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG, Rao A. A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J Biol Chem* 1995; 270:4138-45.
- Ansel KM, Greenwald RJ, Agarwal S, Bassing CH, Monticelli S, Interlandi J, Djuretic IM, Lee DU, Sharpe AH, Alt FW, Rao A. Deletion of a conserved IL4 silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nat Immunol* 2004; 5:1251-9.
- Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V. Overexpression of *c-myc* in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J* 2006; 25:3714-24.
- Fajas L, Paul C, Vie A, Estrach S, Medema R, Blanchard JM, Sardet C, Vignais ML. Cyclin A is a mediator of p120^{E4F}-dependent cell cycle arrest in G₁. *Mol Cell Biol* 2001; 21:2956-66.
- Viola JP, Carvalho LD, Fonseca BP, Teixeira LK. NFAT transcription factors: From cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:335-44.
- Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in *NF-ATp*-deficient mice. *Immunity* 1996; 4:397-405.
- Ranger AM, Gerstenfeld LC, Wang J, Kon T, Bae H, Gravalles EM, Glimcher MJ, Glimcher LH. The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *J Exp Med* 2000; 191:9-22.
- Horsley V, Pavlath GK. Prostaglandin F₂ α stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. *J Cell Biol* 2003; 161:111-8.
- Ranger AM, Hodge MR, Gravalles EM, Oukka M, Davidson L, Alt FW, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* 1998; 8:125-34.
- Yoshida H, Nishina H, Takimoto H, Marengere LE, Wakeham AC, Bouchard D, Kong YY, Ohteki T, Shahinian A, Bachmann M, Ohashi PS, Penninger JM, Crabtree GR, Mak TW. The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 1998; 8:115-24.
- Neal JW, Clipstone NA. A constitutively active *NFATc1* mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J Biol Chem* 2003; 278:17246-54.
- Chao Y, Shih YL, Chiu JH, Chau GY, Lui WY, Yang WK, Lee SD, Huang TS. Overexpression of cyclin A but not Skp2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58:985-90.
- Huhtanen RL, Blomqvist CP, Bohling TO, Wiklund TA, Tukiainen EJ, Virolainen M, Tribukait B, Andersson LC. Expression of cyclin A in soft tissue sarcomas correlates with tumor aggressiveness. *Cancer Res* 1999; 59:2885-90.
- Yang R, Nakamaki T, Lubbert M, Said J, Sakashita A, Freyaldenhoven BS, Spira S, Huynh V, Muller C, Koeffler HP. Cyclin A1 expression in leukemia and normal hematopoietic cells. *Blood* 1999; 93:2067-74.
- Liao C, Wang XY, Wei HQ, Li SQ, Merghoub T, Pandolfi PP, Wolgemuth DJ. Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:6853-8.

8.2 Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, Kaufmann C, Morgado-Diaz JÁ, Bozza PT, Viola JPB (2008). Lipid Bodies are reservoirs of cicloxygenase-2 and sites of prostaglandin-E₂ synthesis in colon cancer cells. *Cancer Research* 68:in press.

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

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

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

Abstract

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

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

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

Production of recombinant retroviruses and infection of IEC-6 cells. The retroviral expression vector pBabe-H-rasV12 has been previously described and was kindly donated by Dr. Lowe (Cold Spring Harbor Laboratory; ref. [33]). BD EcoPack2 ecotropic packing cell line (BD Biosciences) was transiently transfected with retroviral vector by calcium phosphate precipitation for 24 h. Cell-free virus-containing supernatant was collected 48 h after transfection and concentrated using Amicon Ultracel 50k (Millipore). The supernatant was supplemented with 8 µg/mL polybrene (FLUKA Chemie) and immediately used for spin infection (2×45 min at $380 \times g$) of 5×10^4 IEC-6 cells. Infected cells were incubated at 37°C for further 24 h and selected for puromycin (Sigma-Aldrich) resistance (7.5 µg/mL) for 14 d.

Lipid body staining and enumeration. Cells (5×10^6 per well) were left unstimulated and untreated or treated with aspirin (500 µg/mL) or C75 (50 µg/mL) for 24 h. Lipid bodies were stained as previously described in each triplicate well ([29]). In brief, cells (10^5 cells/mL) were fixed in 3.7% formaldehyde in calcium/magnesium-free HBSS (pH 7.4), rinsed in 0.1 mol/L cacodylate buffer, stained in 1.5% OsO₄ (30 min), rinsed in distilled water (dH₂O), immersed in 1.0% thiocarbohydrazide (5 min), rinsed in 0.1 mol/L cacodylate buffer, restained in 1.5% OsO₄ (3 min), rinsed, and then dried and mounted. The morphology of fixed cells was observed, and lipid bodies were enumerated by light microscopy with 100× objective lens in 50 consecutively scanned cells.

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

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

Isolation of lipid bodies by subcellular fractionation. Lipid bodies were isolated by subcellular fractionation based on the buoyancy property of these lipid-rich organelles in sucrose gradients as described ([15, 16]). CACO-2 cells (10^8 /mL) in 20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L KCl buffer (pH 7.4) containing 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL benzamidin, 0.7 µg/mL pepstatin, and 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride were disrupted by nitrogen cavitation at 700ψ for 5 min at 4°C. The cavitate was collected dropwise and mixed with an equal volume of disruption buffer containing 1.08 mol/L sucrose. The homogenates were centrifuged at 1800 rpm for 5 min to remove the nuclei. The supernatants were overlaid sequentially with 2.0 mL each of 0.27 mol/L sucrose buffer, 0.135 mol/L sucrose buffer, and Top solution [25 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, and 1 mmol/L EGTA (pH 7.4)] and centrifuged at 35,000 rpm at 4°C for 1 h. Seven discrete fractions were collected sequentially from top to bottom: a top layer of lipid body (fraction 1), the mid-zone between lipid bodies and cytosol (fractions 2–3), the cytosol (fractions 4–5), and the microsomal and pellet (fractions 6–7). Proteins from subcellular fractions were concentrated by precipitation with 20% trichloroacetic acid overnight at 4°C. The precipitates were then washed twice with cold acetone. The protein contents in the fractions were analyzed by DC Protein Assay (Bio-Rad). The activity of lactate dehydrogenase was measured as cytosolic marker using the CytoTox 96 kit (Promega).

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

Immunolocalization. CACO-2 cells (2×10^4 /mL) were fixed in 3% formaldehyde at room temperature for 10 min and permeabilized with 0.05% saponin/HBSS solution for 10 min. The unspecific sites were blocked with 1% normal human serum for 10 min. The cells were incubated for 1 h simultaneously with goat polyclonal anti-COX-2 (C-20; Santa Cruz Biotechnology) or goat polyclonal anti-PGE synthase (PGES; S-16; Santa Cruz Biotechnology) and mouse monoclonal anti-ADRP (AP125; RDI) diluted in 0.05% saponin/HBSS solution. Then, cells were blocked with 1% donkey serum for 10 min before simultaneous incubation with Cy3-conjugated affiniPure F(ab') fragment donkey anti-mouse and Cy2-conjugated affiniPure F(ab') fragment donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 45 min. Then, cells were washed several times with HBSS, mounted in an aqueous mounting medium, and visualized with 100× objective by both phase contrast and fluorescence microscopy.

Immunodetection of PGE₂ at its sites of production. Immunodetection of PGE₂ was performed as previously described ([32]). In brief, cells (2×10^4 /mL) were fixed and permeabilized during 1 h at 37°C with water-soluble 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDAC; 0.5% in HBSS). Then, cells were washed with HBSS and blocked with 2% donkey serum for 15 min before incubation with anti-PGE₂ mAb (Cayman Chemicals) for 45 min. The cells were washed with HBSS and incubated with Cy3-conjugated affiniPure F(ab') fragment donkey anti-mouse for 45 min. Lipid bodies were fluorescent labeled with Bodipy 493/503 (Molecular Probes), added together with the secondary antibodies. The

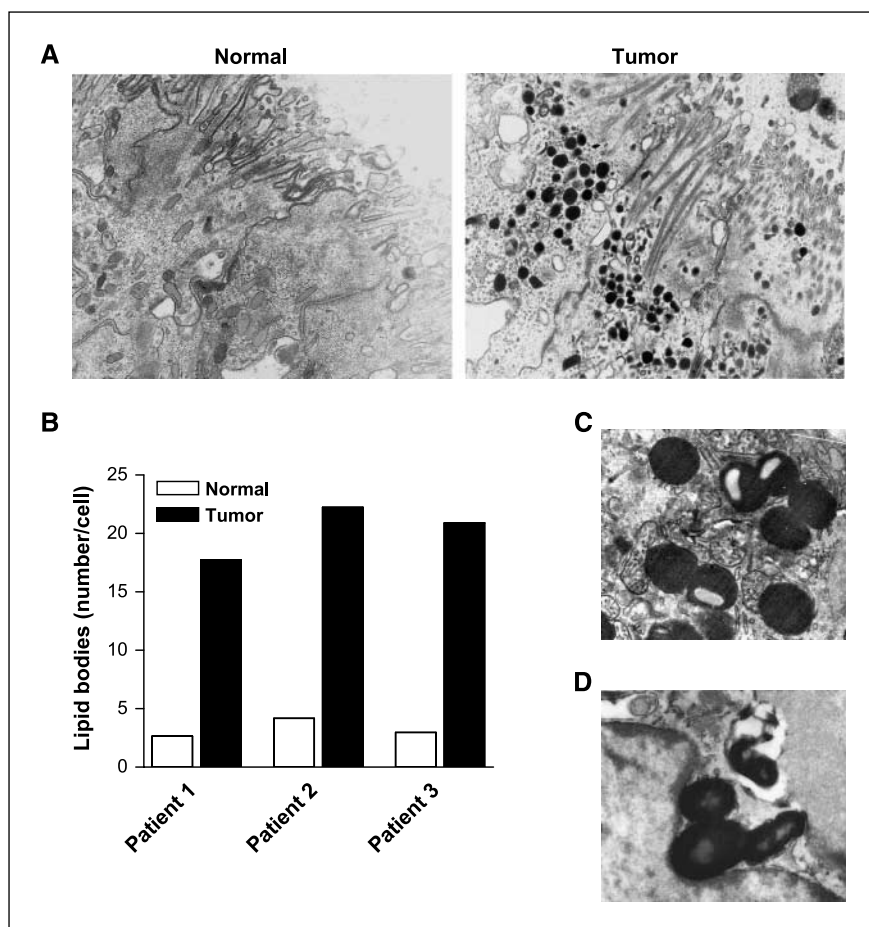


Figure 1. Analysis of lipid bodies of paired samples of human colon cancer and normal tissue. Pairs of samples of colon cancer and adjacent nonneoplastic tissue obtained at the time of surgery from patients undergoing colon surgical resection as described. *A*, analysis of thin sections of the adjacent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

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

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

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

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

Results

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

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

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

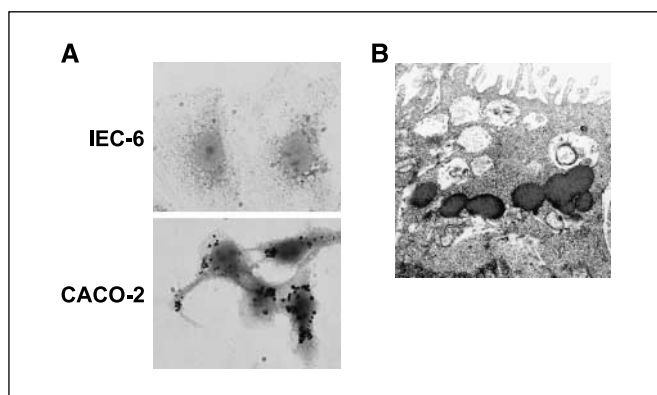


Figure 2. Analysis of lipid bodies in IEC-6 and CACO-2 cell lines. **A**, IEC-6 and CACO-2 cells were grown without stimulation for 24 h and stained for lipid bodies as described. Then, cells were analyzed by phase contrast microscopy with 100 $\times$ objective lens. **B**, analysis of lipid bodies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

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

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

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

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

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

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

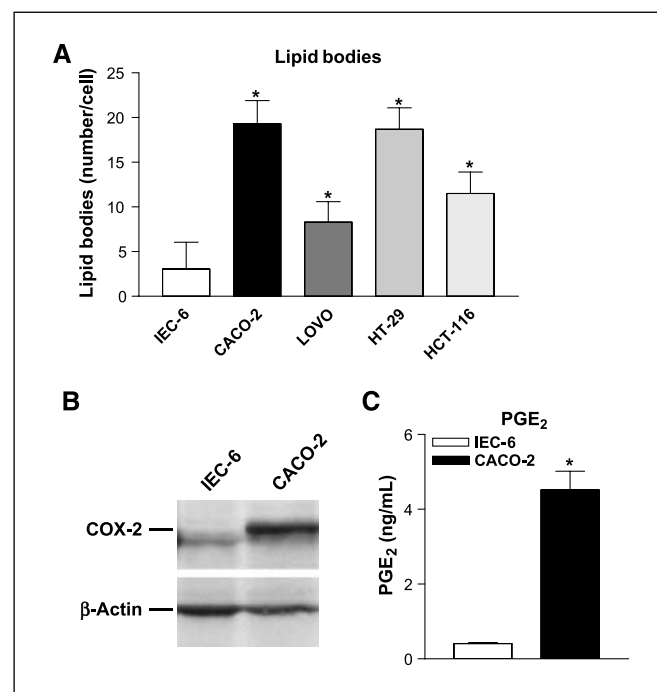


Figure 3. Quantitative analysis of lipid bodies, COX-2, and PGE₂ in colon cancer cell lines. **A**, quantitative analyses of the lipid body numbers in unstimulated IEC-6 and CACO-2, LOVO, HT-29, and HCT-116 cells. The lipid bodies were enumerated in 50 consecutively scanned cells. Columns, mean; bars,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

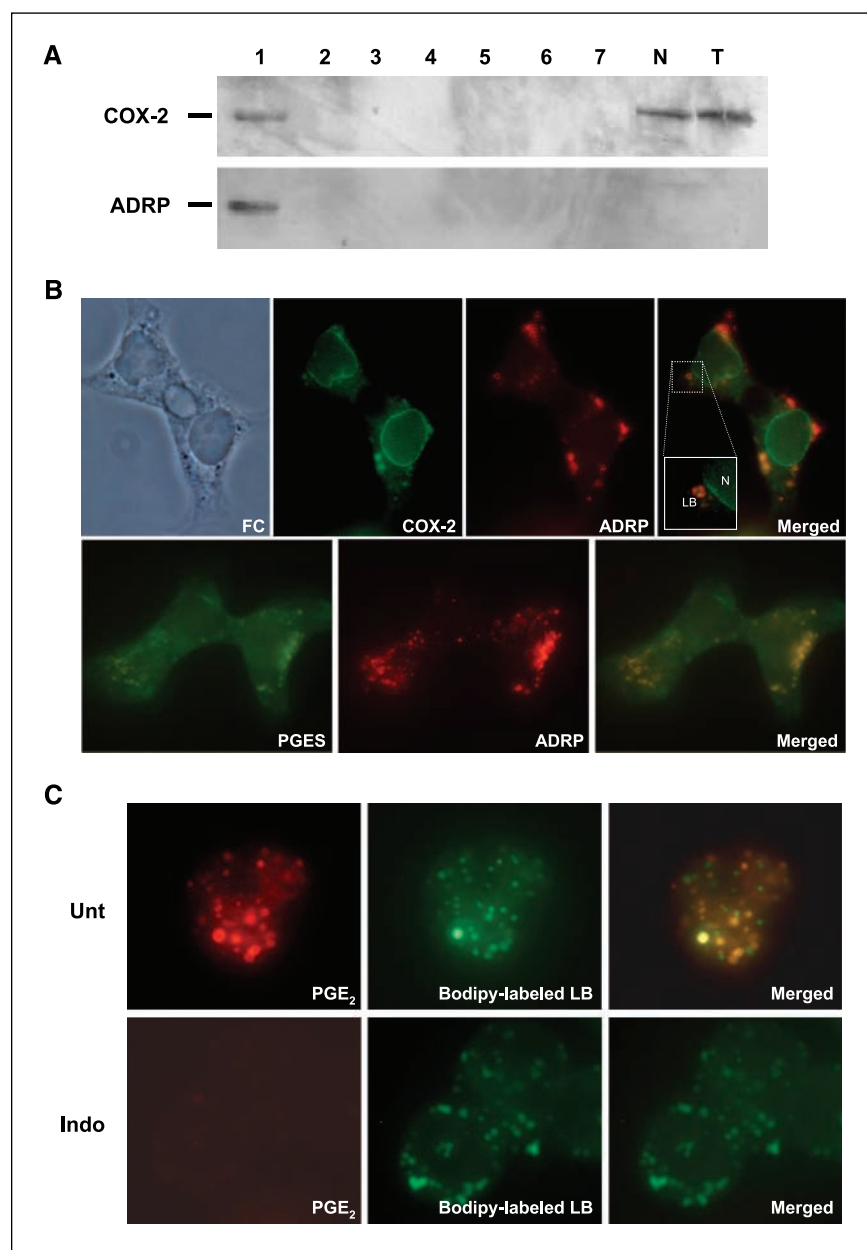


Figure 4. Analysis of COX-2, PGES, and PGE₂ localization in CACO-2 cells. **A**, unstimulated cells were subjected to subcellular fractionation, and fractions were recovered separately. Fractions 1 and 2, lipid bodies; fractions 3 and 4, cytosol; fractions 5, 6, and 7, microsome and membrane; N, nuclear;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

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

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

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

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

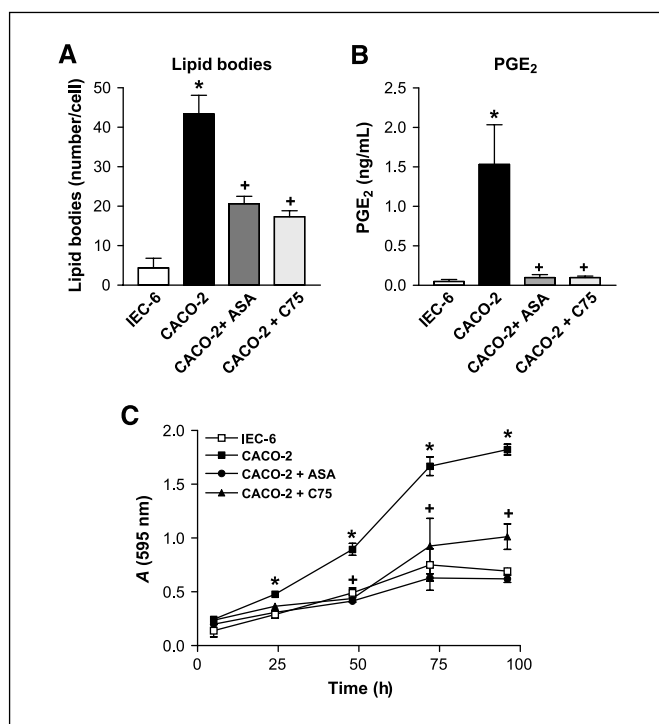


Figure 5. Analysis of lipid bodies, PGE₂ production, and cell growth in CACO-2 cells treated with aspirin and C75. **A**, cells were left unstimulated, and CACO-2 cells were left untreated or treated with aspirin (500 μ g/mL) or C75 (50 μ g/mL) for 24 h. Then, the lipid bodies were enumerated as described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

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

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

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

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

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

Discussion

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

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

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

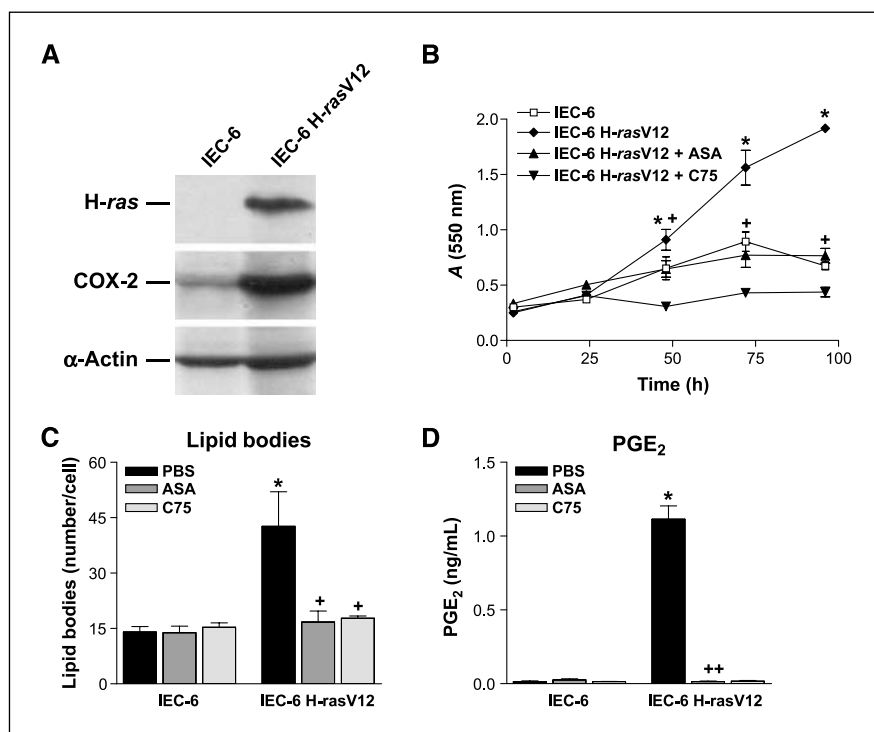


Figure 6. Analysis of lipid bodies, PGE₂ production, and cell growth in H-ras transformed IEC-6 cells treated with aspirin and C75. *A*, analysis of H-Ras (top), COX-2 (middle), and β-actin (bottom) expression in total cell lysates of unstimulated IEC-6 and IEC-6 H-rasV12 cells by Western blot. β-Actin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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

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

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

References

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

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