

ELS NFAT

Maria Castanyer Sardà

Oriol Fornés Crespo

Marta Lloret Llinares

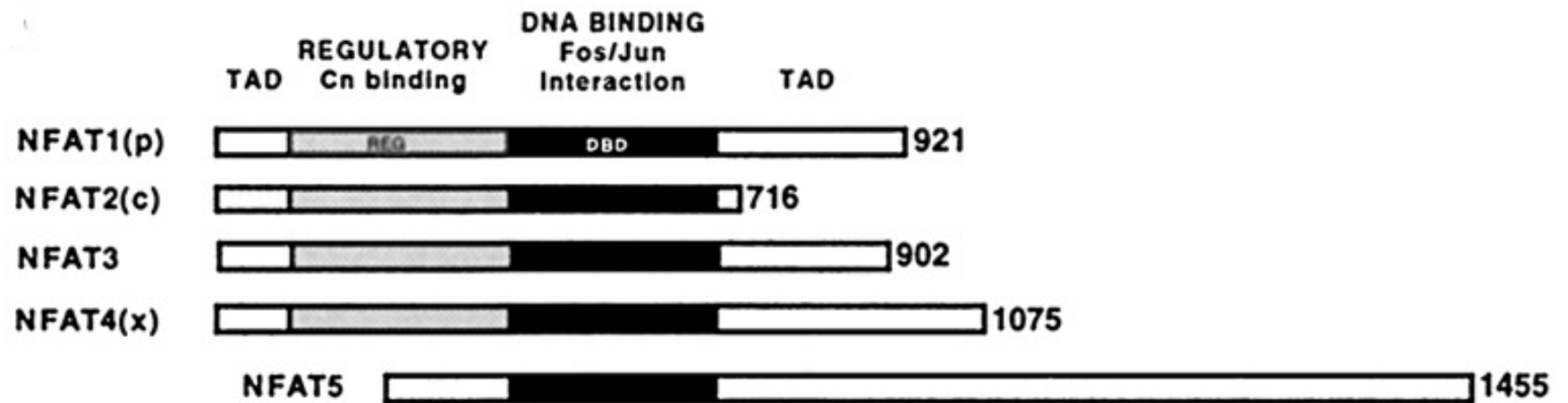
Urko Martínez Marigorta

Ixabel Mendizabal Ezeizabarrena

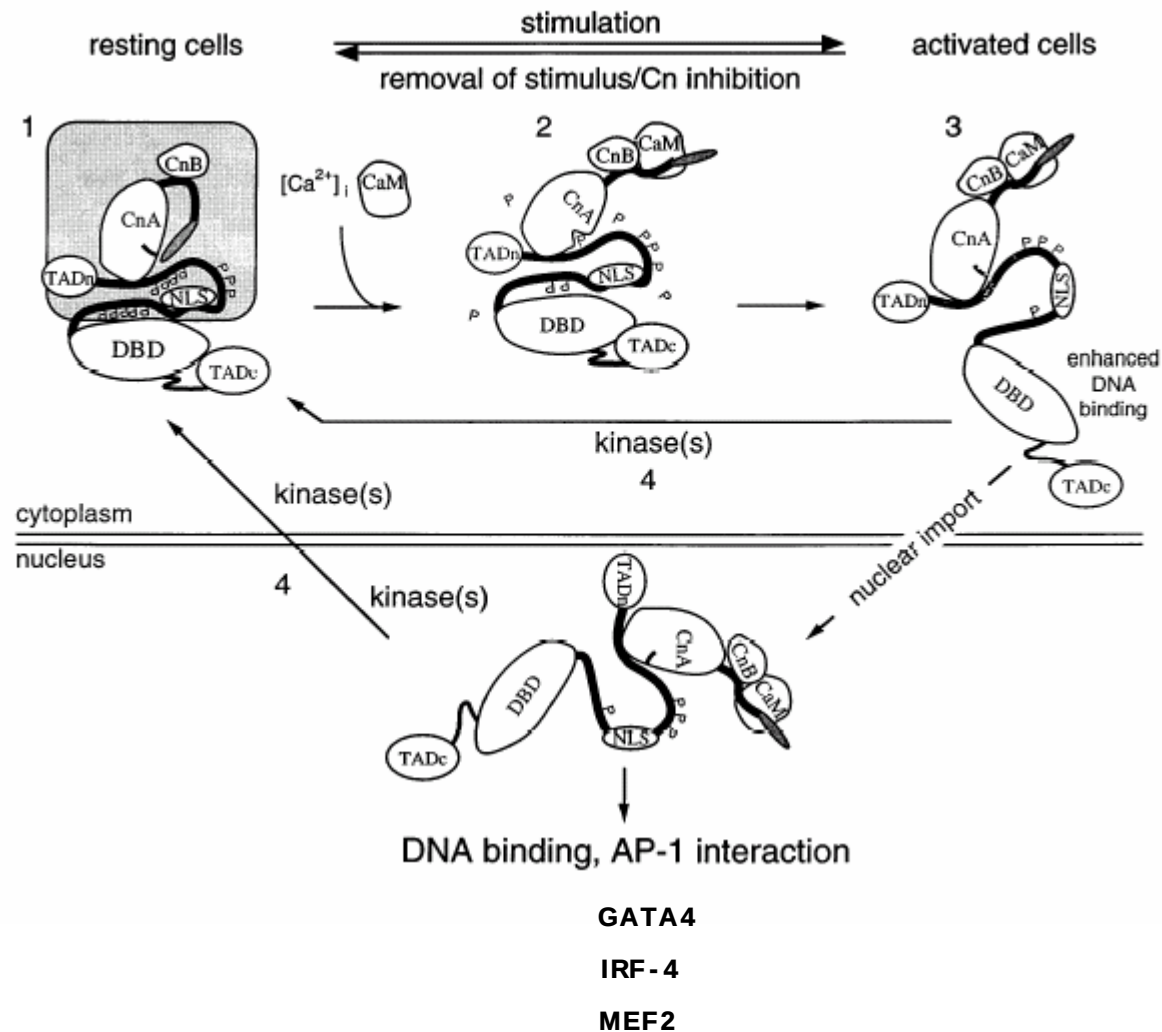
NFAT: nuclear factor of activated T cells

- Família de factors de transcripció
- Funcions NFAT1-4:
 - Desenvolupament i activació de cèl·lules T
 - Morfogènesi vascular i de vàlvules cardíques
 - Hipertròfia de múscul esquelètic i cardíac
 - Desenvolupament neural
 - Condrogènesi i adipogènesi
- Funcions NFAT5:
 - Resposta a estrés osmòtic

DOMINIS FUNCIONALS DELS NFAT



VIA DE SENYALITZACIÓ DELS NFAT1-4



CLASSIFICACIÓ SCOP

NFAT

Classe: tot β

Plegament: Ig-like β -sandwich

Superfamília: E-set domains

Família: factors de transcripció NF κ B/Rel/Dorsal, domini C-terminal

DOMINI RHR

Classe: tot β

Plegament: toxina difteria/factors de transcripció/citocrom f

Superfamília: factors de transcripció p53-like

Família: factors de transcripció Rel/Dorsal, domini d'unió a DNA

RHR: Rel Homology Region

- Consta de dos dominis:
 - RHR-N : reconeix DNA
 - RHR-C : media la dimerització



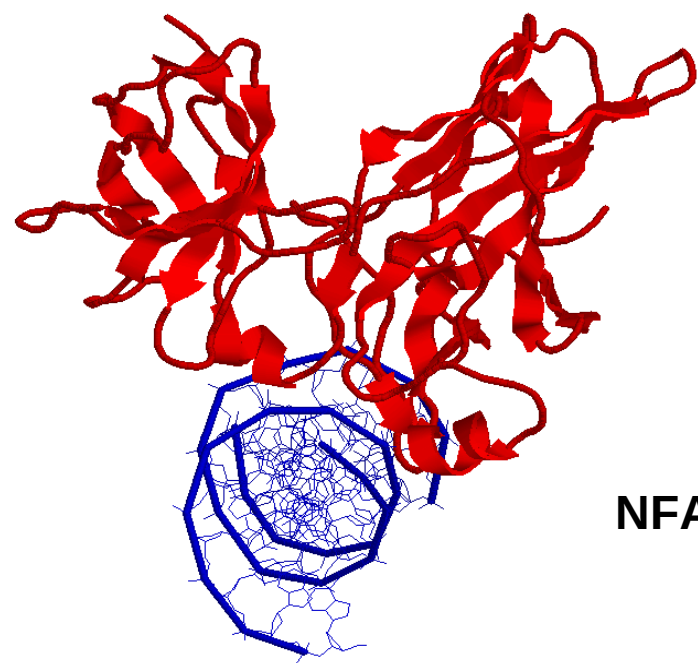
Seqüències consens d'unió dels NFAT

- **NFAT1-4: GGAAAA**
- **NFAT5: TGGAAANNYNY**
- **Elements ?B: GGGRNYYYCC**

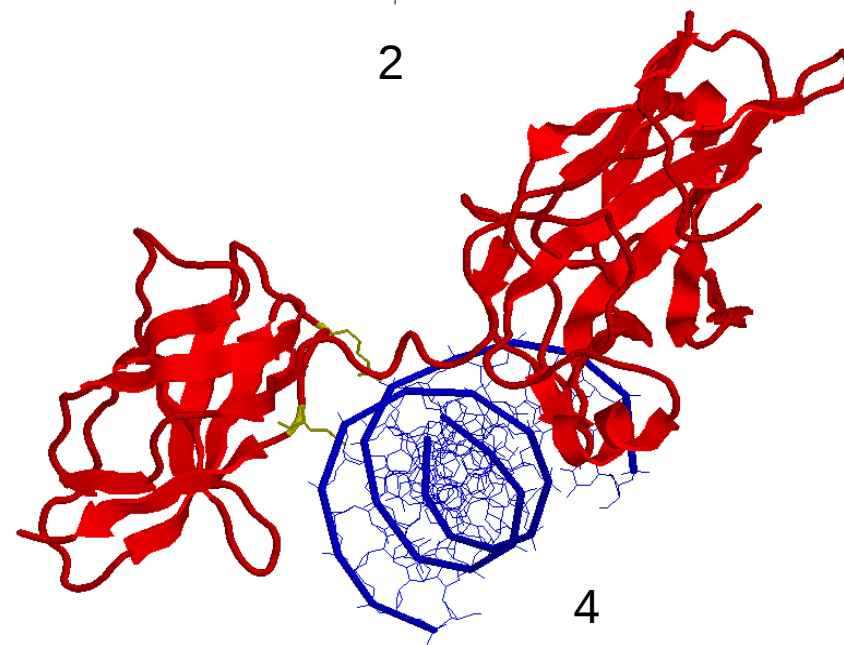
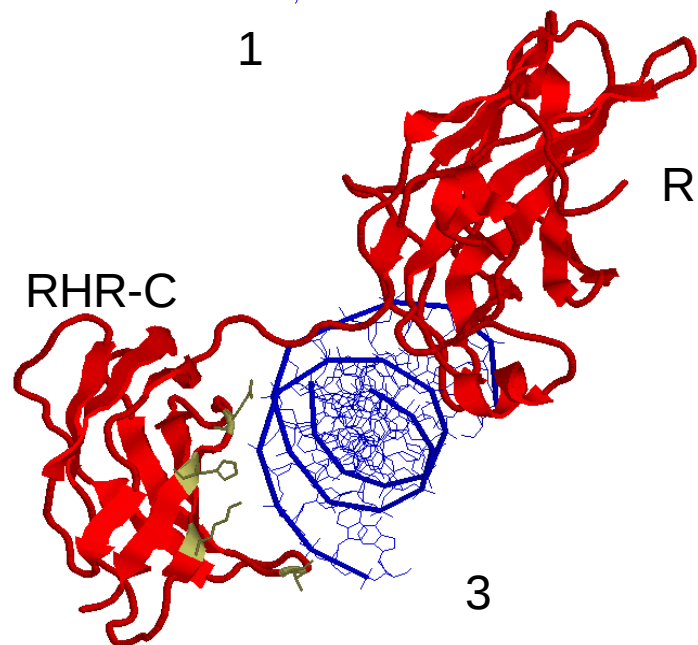
Estructures que hem triat

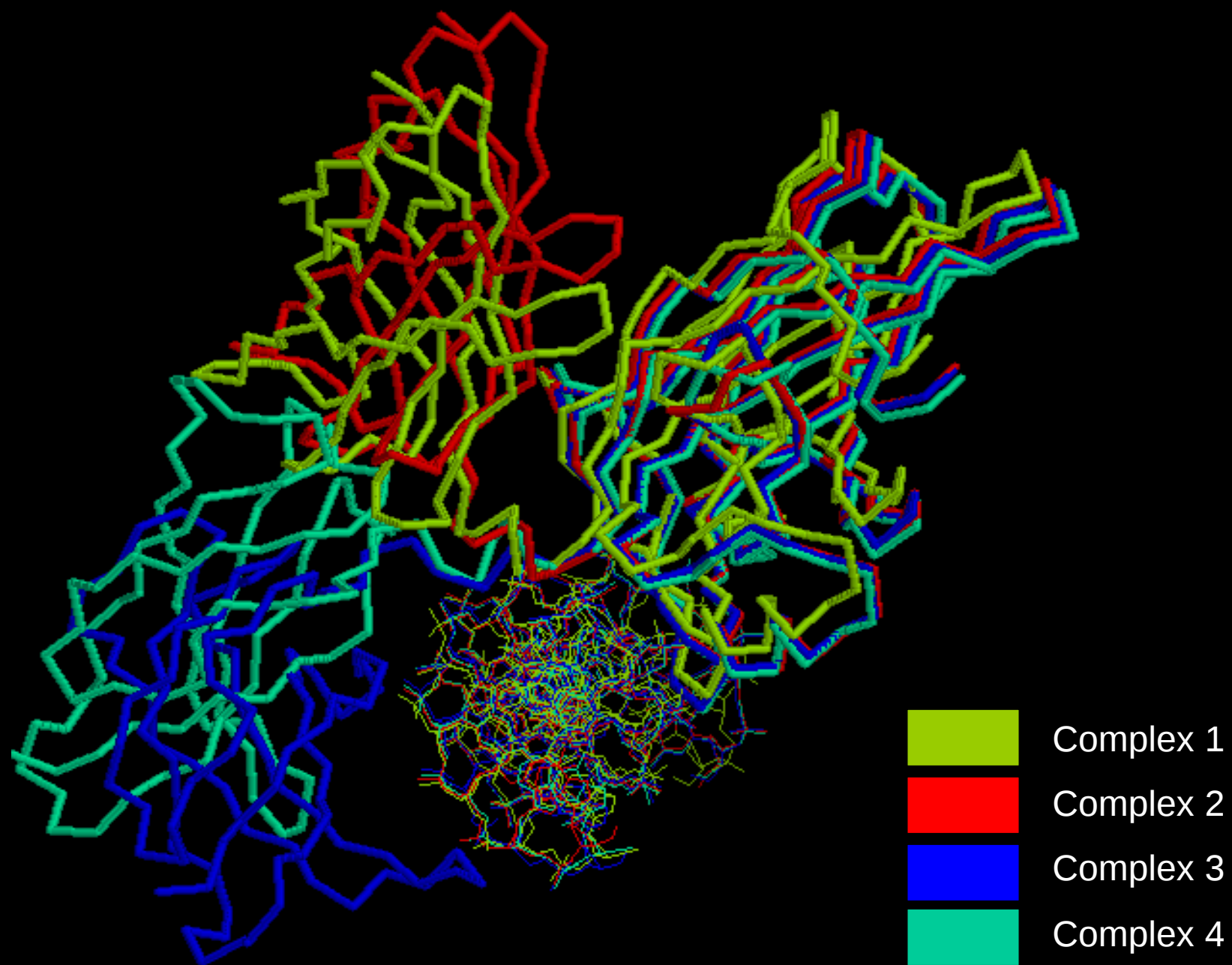
- NFAT1 monomèric
- NFAT1: AP-1 (Fos i Jun)
- Dímers:
 - NFAT1
 - NFAT5

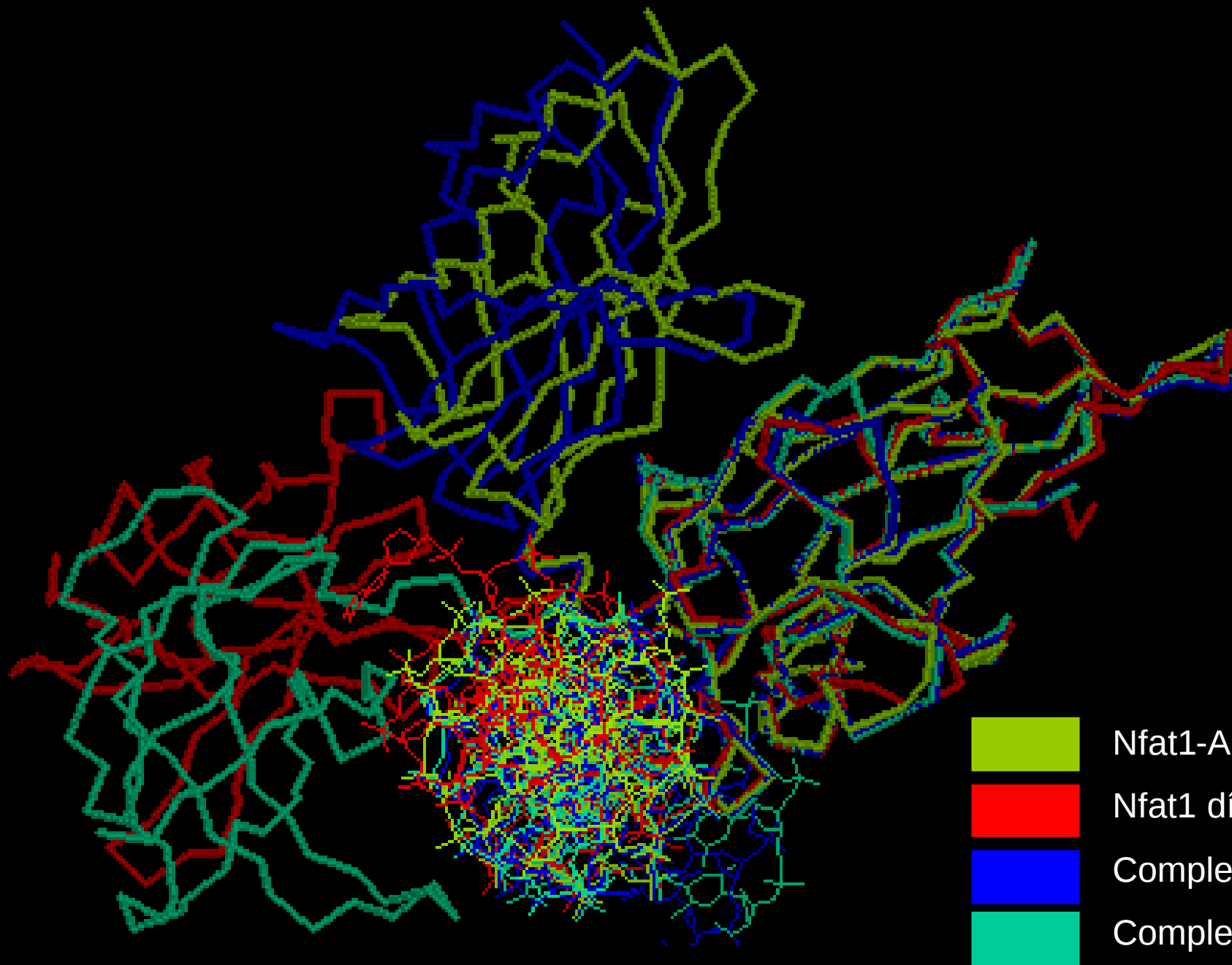
Els factors de transcripció es poden trobar en promotors diferents i amb relacions diferents entre ells (sinèrgia, interacció amb altres, dimerització). Segons el context l'activació gènica serà diferent.



NFAT1 monomèric

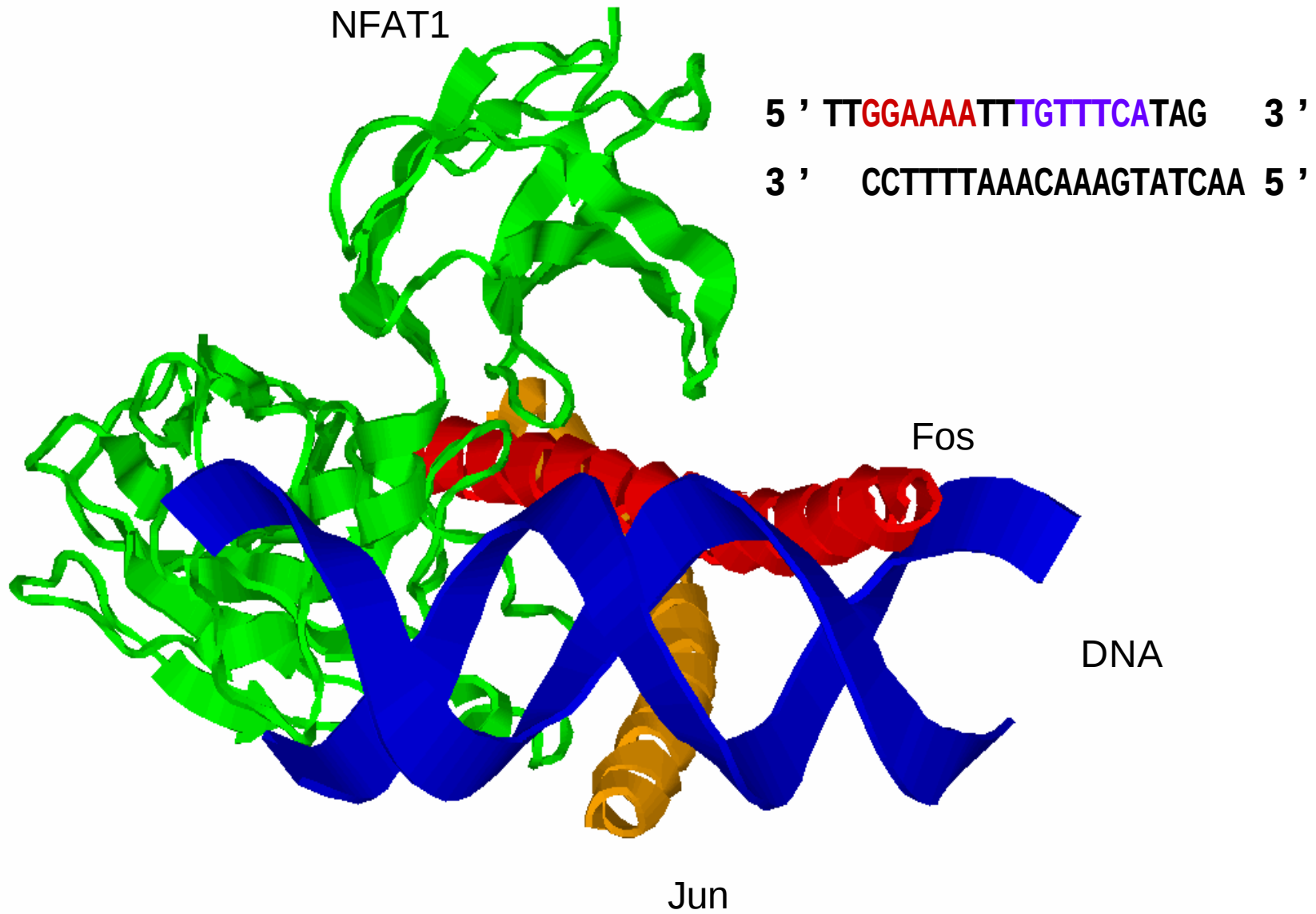






- Nfat1-AP1
- Nfat1 dímer
- Complex 1
- Complex 3

NFAT1, Fos i Jun units al promotor d'IL-2



Interaccions amb el DNA

NFAT1

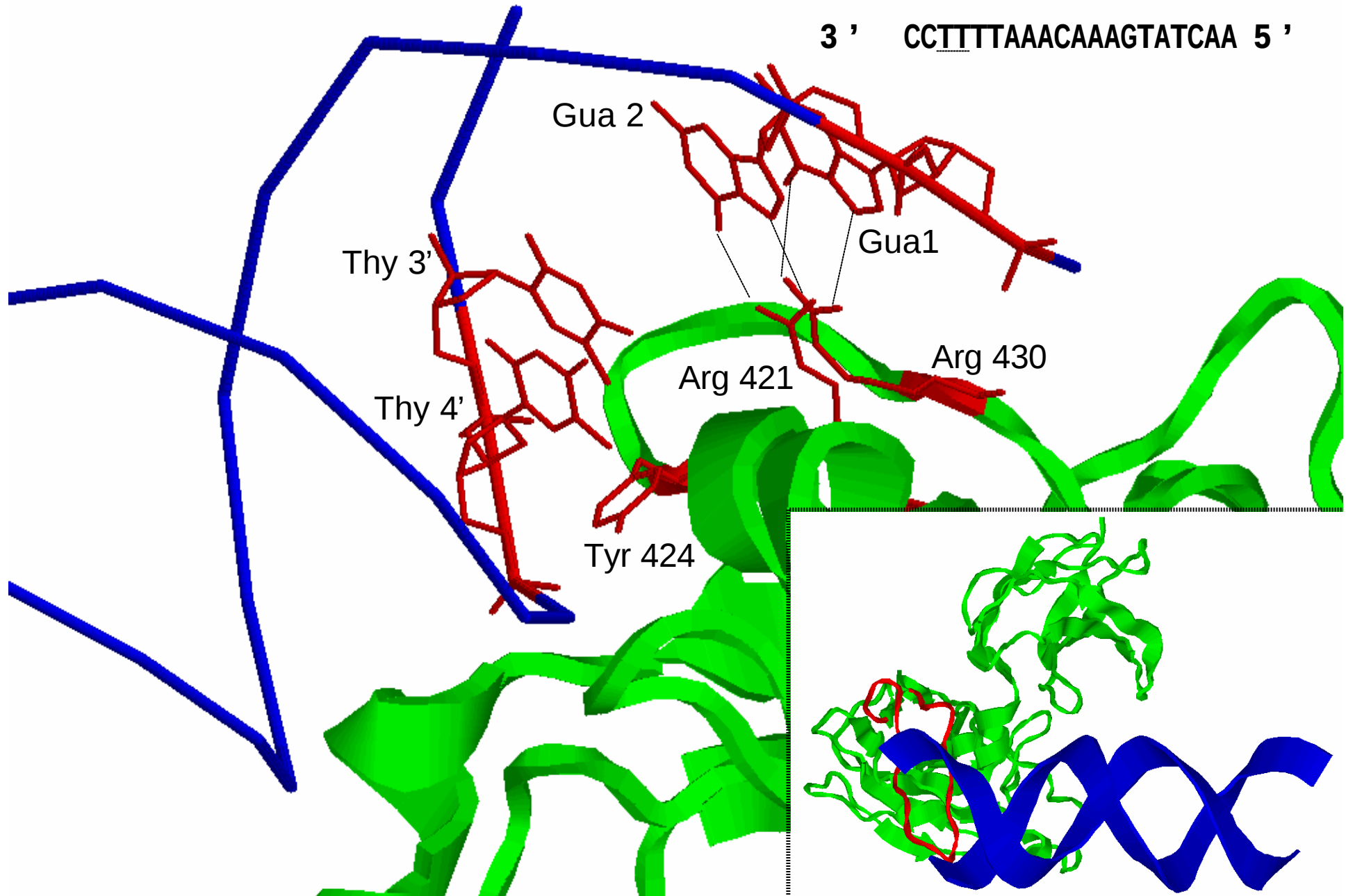
- Interacció RHR-N amb el DNA
 - Loop AB
 - Loop E'F
- Linker α -hèlix
- Interacció RHR-C amb el DNA
 - Loop fg

AP1

Interacció **RHR-N** amb el **DNA** (el loop AB)

5 ' TTGGAAAATTTGTTTCATAG 3 '

3 ' CCTTTTAAACAAAGTATCAA 5 '



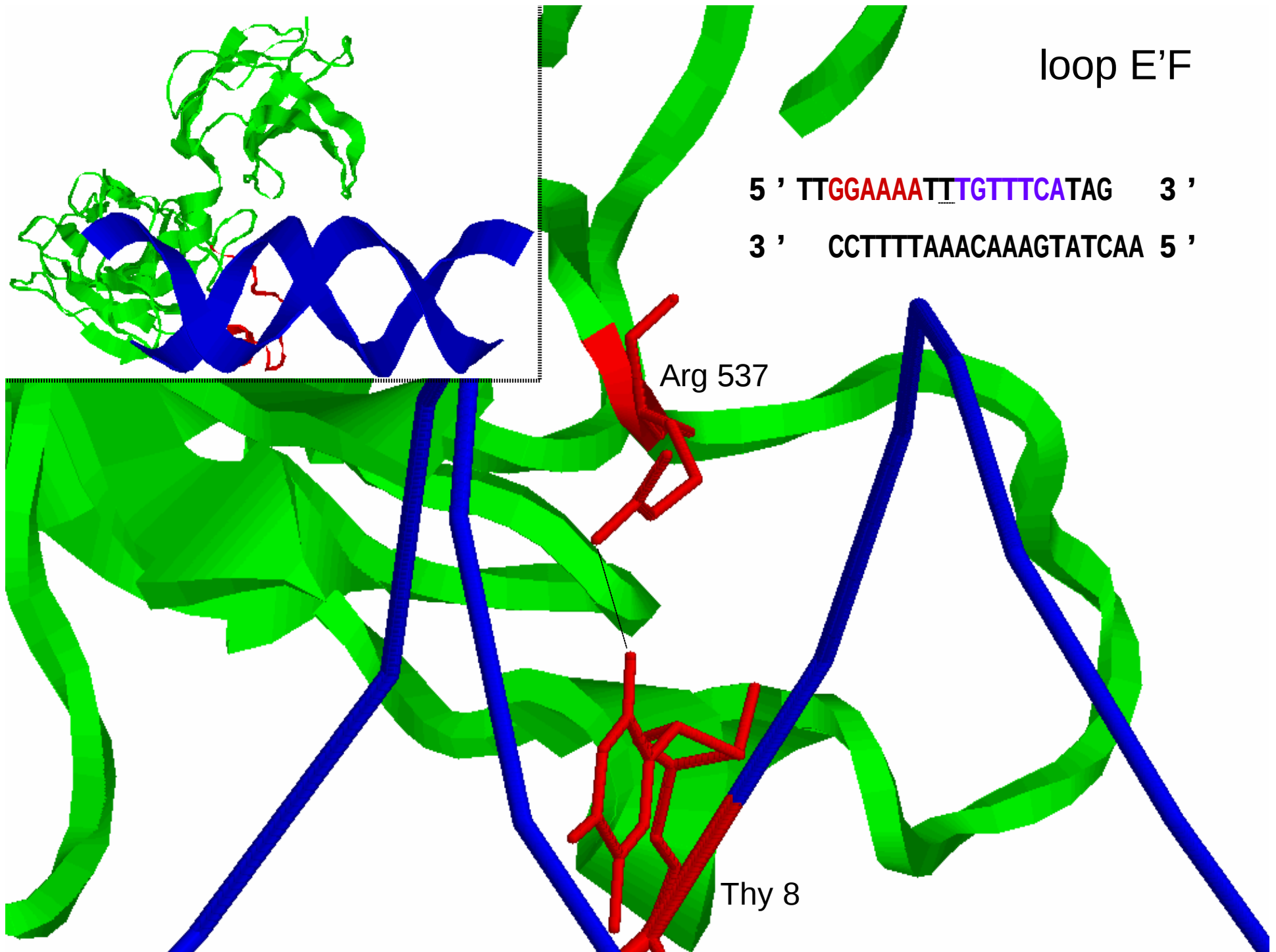
loop E'F

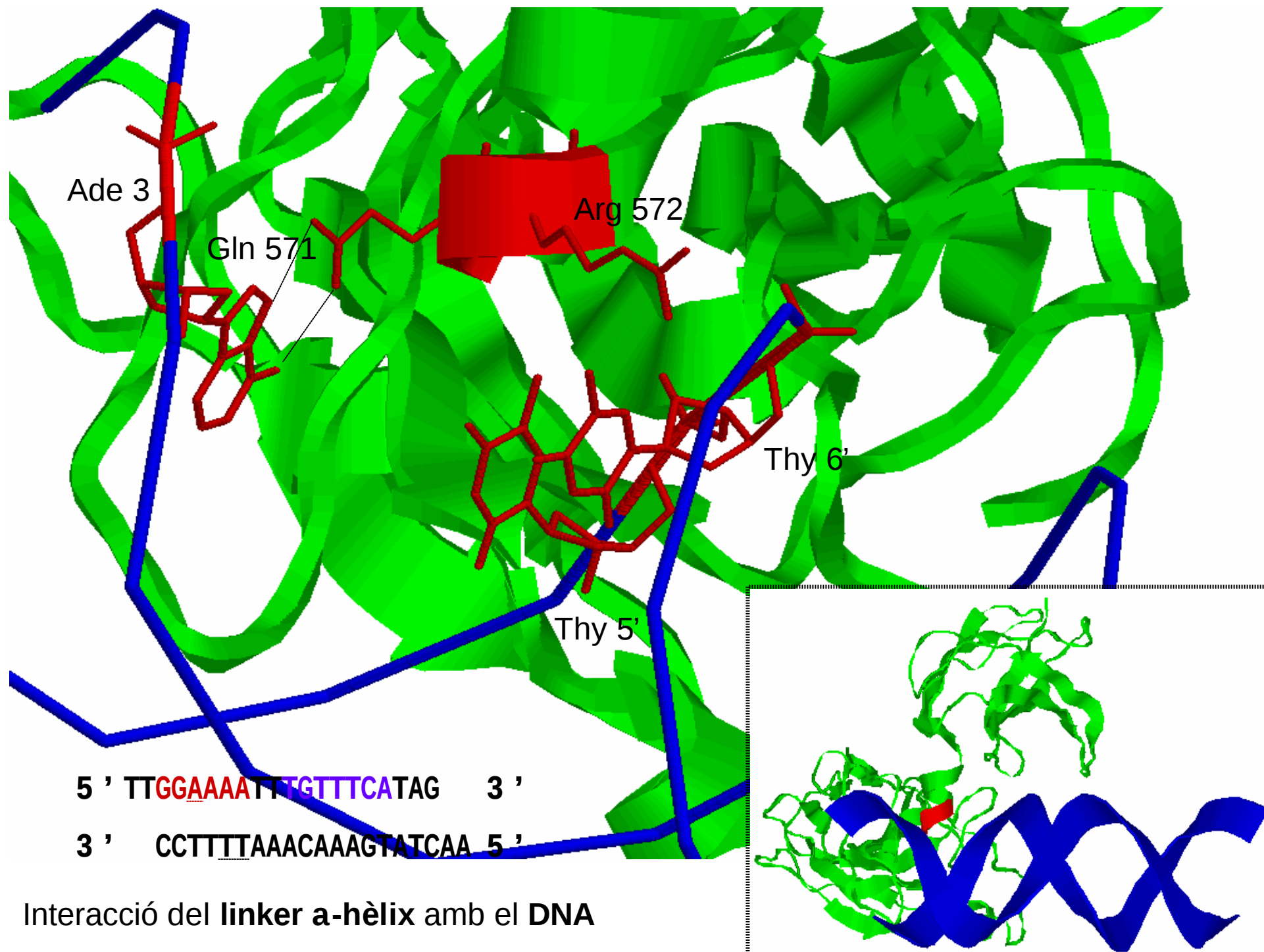
5 ' TT**GGAAA**ATT**TGTTT**CATAG 3 '

3 ' CCTTTTAAACAAAGTATCAA 5 '

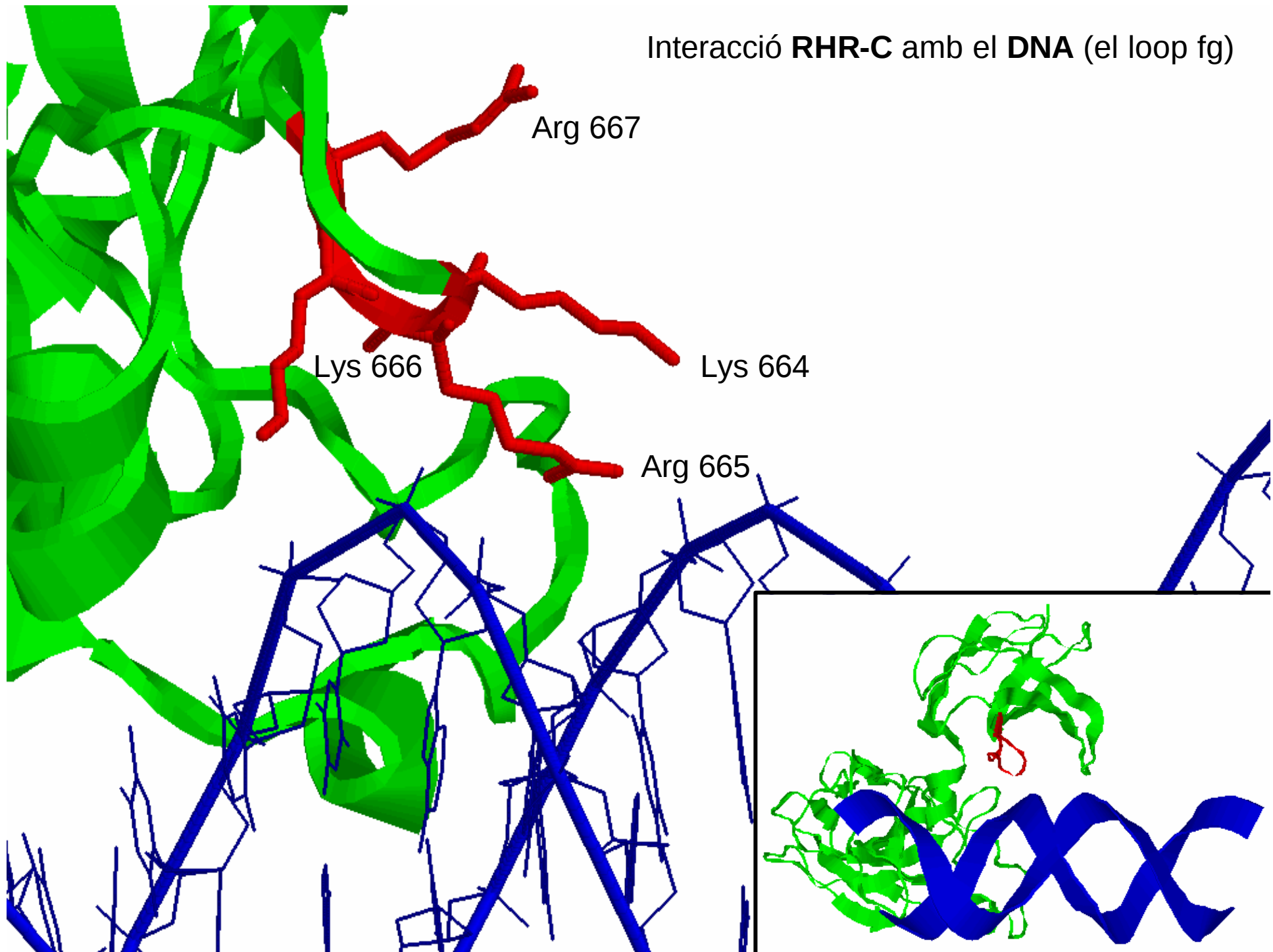
Arg 537

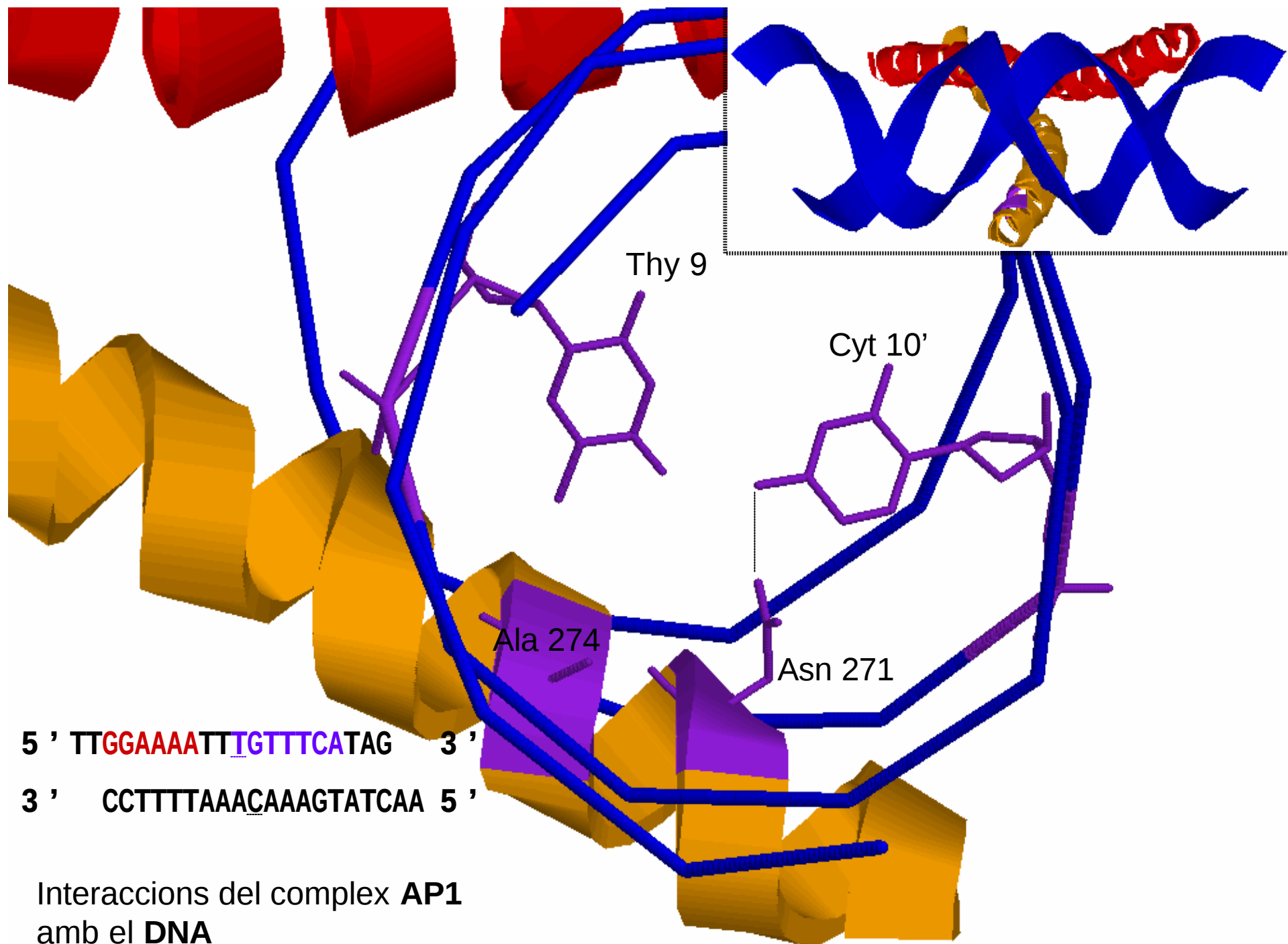
Thy 8





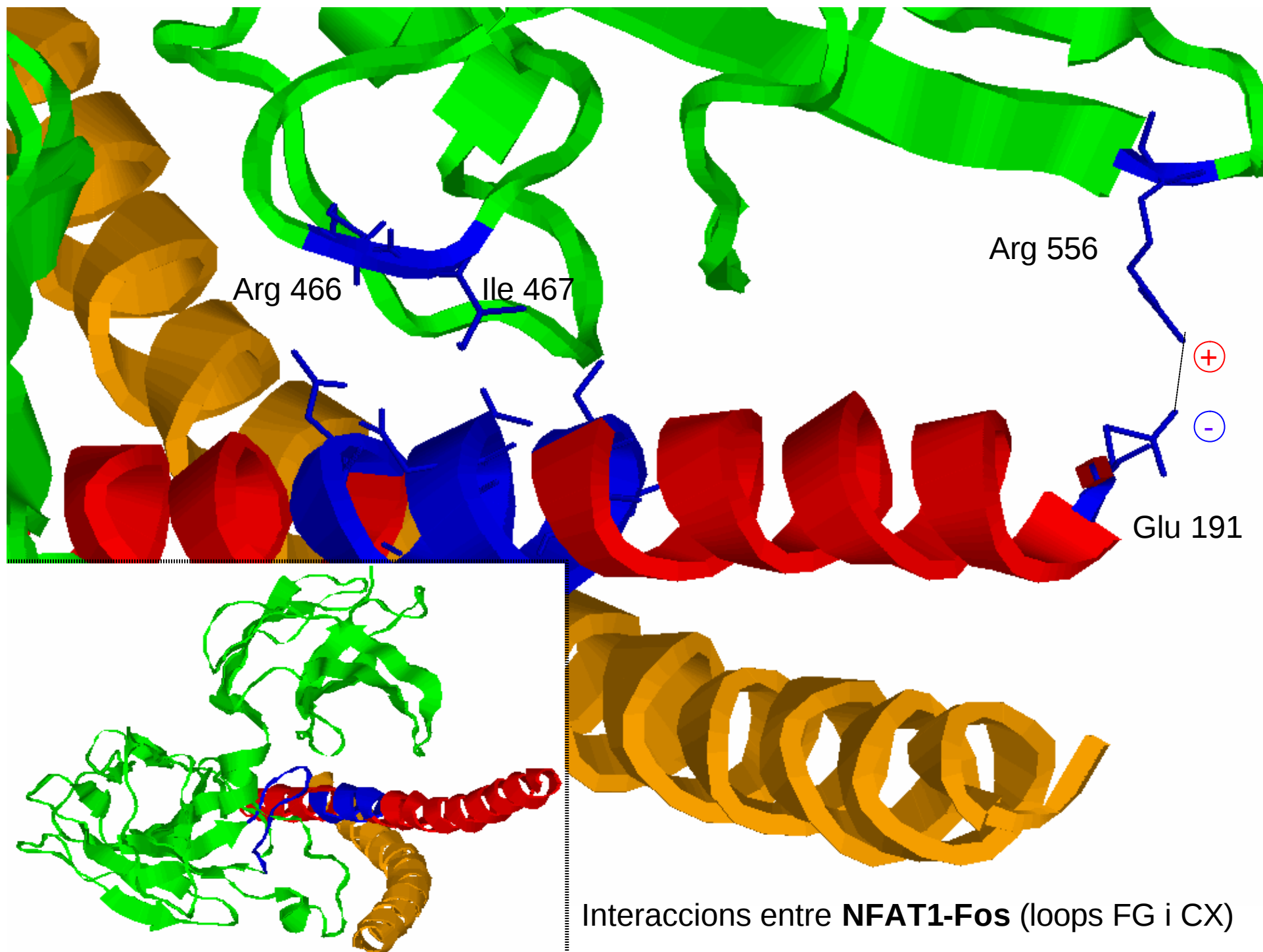
Interacció **RHR-C** amb el **DNA** (el loop fg)

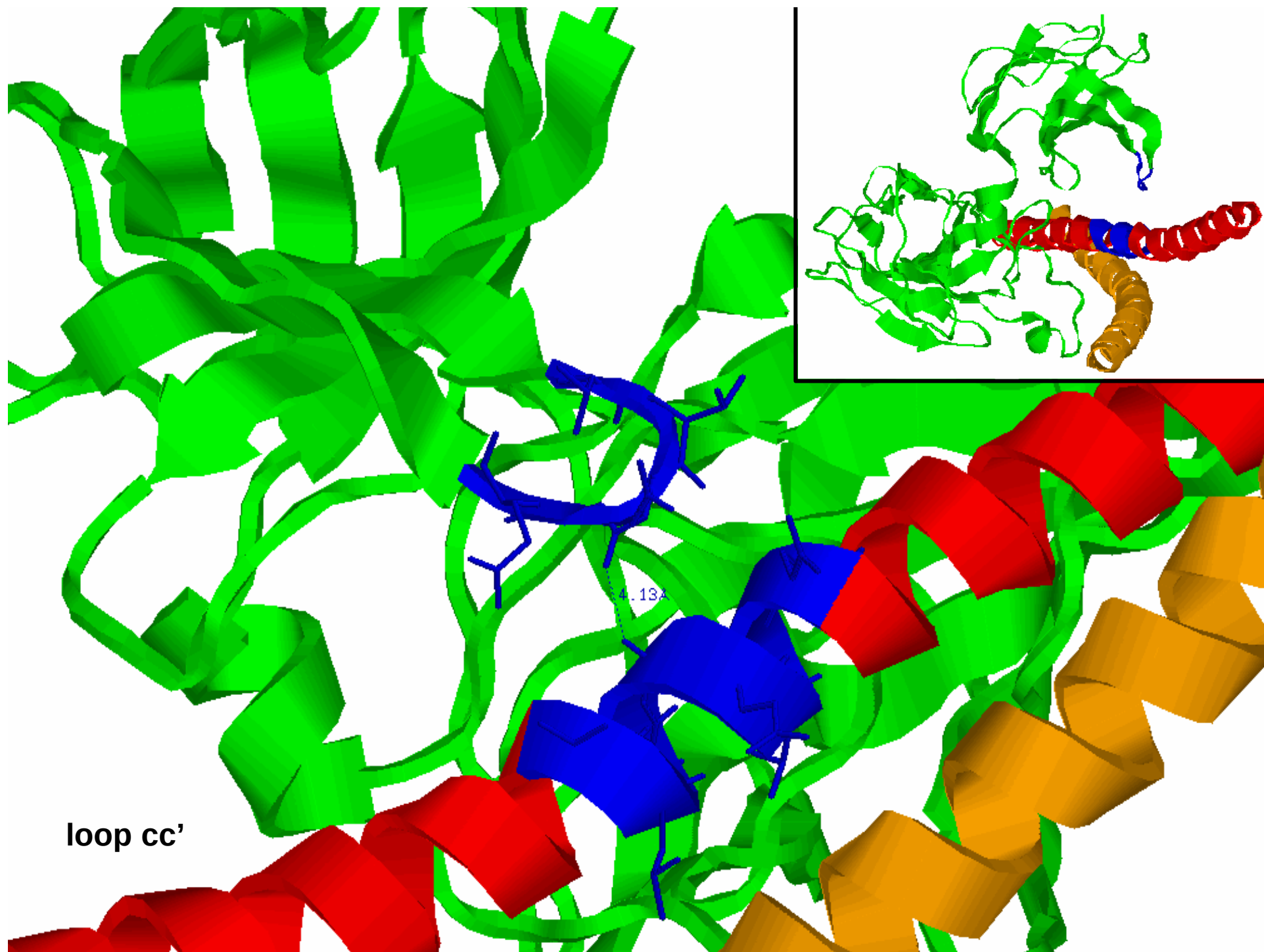


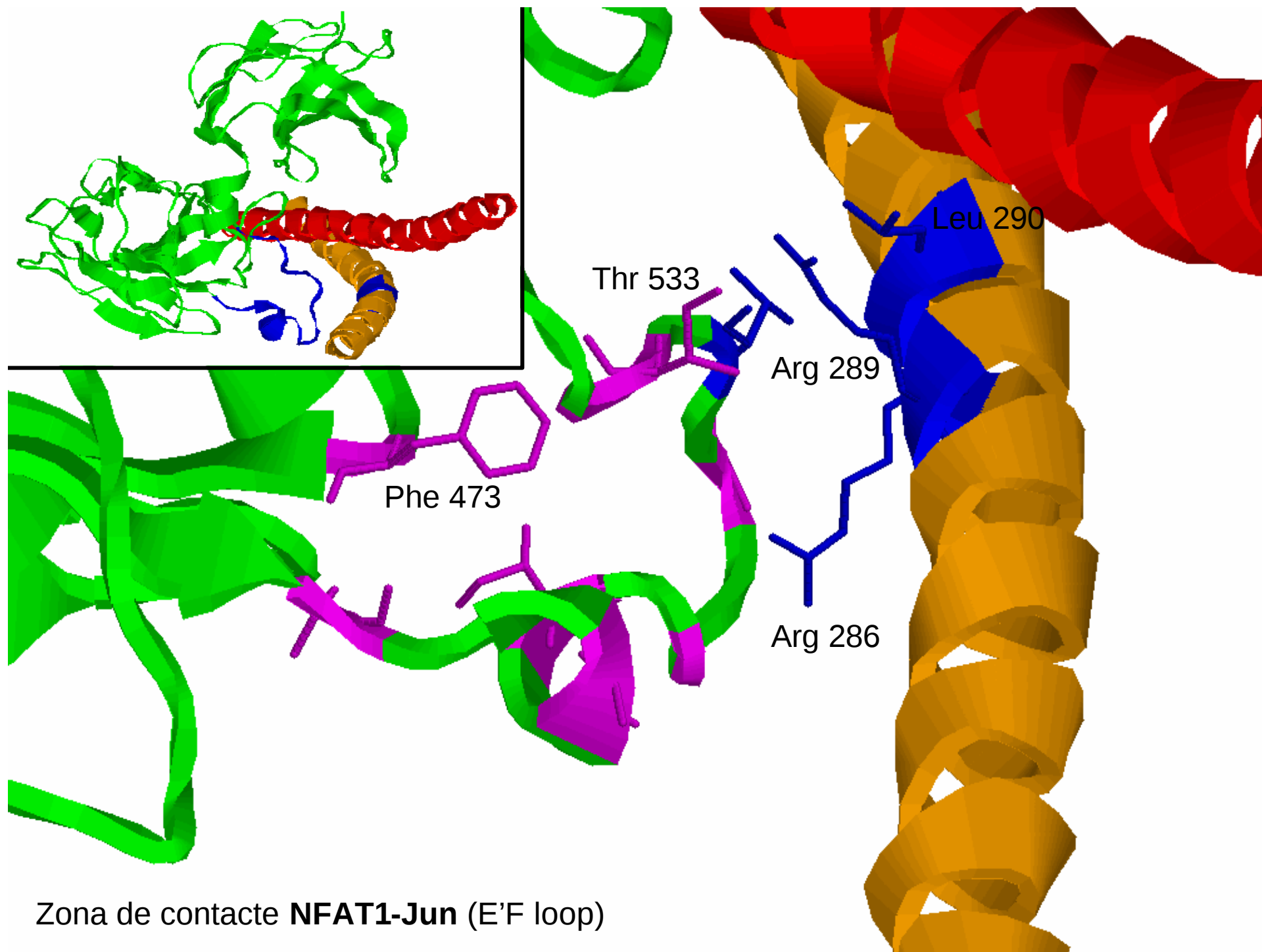


Interaccions NFAT1-AP1

- Reconeixement d'NFAT1-FOS
 - RHR-N (loops FG i CX)
 - RHR-C (loop cc')
- Reconeixement d'NFAT1-JUN (loop E'F)







ALINEAMENT DE SEQÜÈNCIA DEL RHR

```

                                400
nfat1  -----WPLSSQSGSYELRIEVQPKPHHRAHYETEGSRGAVKAPTG--GHPVVQLHGYME
nfat2  -----WQLPSHSGPYELRIEVQPKSHHRAHYETEGSRGAVKASAG--GHP IVQLHGYLE
nfat3  -----WPLPSQYEQLERIEVQPRAHHRAHYETEGSRGAVKAAAPG--GHPVVKLLGYSE
nfat4  -----WPLPSAHFGQCELKIEVQPKTHHRAHYETEGSRGAVKASTG--GHPVVKLLGYNE
nfat5  KKSPMLCGQYPVKSEGKELKIVVQPETQHRAHYLTEGSRGSVKDRTOQGFP TVKLEGHNE
                                .   **.* *** .***.* *****.**   * * *. * *
                                502
nfat1  NKPLGLQIFIGTADERRILKPHAFYQVHRITGKTVTTSYEKIVGN TKVLE IPLEPKNMNR
nfat2  NEPLMLQLFIGTADDRLLRPHAFYQVHRITGKTVSTTSHEA ILSN TKVLE IPLLPENSMR
nfat3  -KPLTLQMFIGTADERNL RPHAFYQVHRITGKMVATASYEAVVSGTKVLEMTLLPENNMA
nfat4  -KPINLQMFIGTADDRYL RPHAFYQVHRITGKT VATASQEI I IASTKVLE IPLLPENNMS
nfat5  --PVVLQV FVGND SGR-VKPHGFYQACRV TGRN- TTPCKEVD IEGTTVIEVGLDPSNNMT
      *. **.*.*.  * ..** *** *.** .* . * . * *. * * * *

nfat1  ATIDCAGILKLRNADIELRKGETDIGRKNTRVRLVFRVHIPESSGRIVSLQTASNPI ECS
nfat2  AVIDCAGILKLRNSDIELRKGETDIGRKNTRVRLVFRVHV PQSGETLSLQVASNPI ECS
nfat3  ANIDCAGILKLRNSDIELRKGETDIGRKNTRVRLVFRVHV PQGGGVVSVQAASVPI ECS
nfat4  ASIDCAGILKLRNSDIELRKGETDIGRKNTRVRLVFRVHI PQSGEVL SLQIASIPVECS
nfat5  LAVDCVGILKLRNADVEARIGIAGSKKSTRARLVFRVNI MRKDGSTLT LQTPSSPILCT
      .** *****.*.* * * . . * ** *****..  * ...* * *. *.
                                602
nfat1  QRSANELPMVERQD TDSCLVYGGQQMILTGQNFTSESKVVFTEKTTD GQQIWEMEATVDK
nfat2  QRSAQELPLVEKQSDSY PVVVGKKMVLSGHNFLQDSKVIFVEKAPDGHVWEMEAKTDR
nfat3  QRSAQELPQVEAYS PSACSVRGGEELVLTGSNFLPDSKVVF IERGPDGKLQWEEEA TVNR
nfat4  QRSAQELPHIEKYS INSCSVNGGHEMVVTGSNFLPESKIIFLEKQDGRPQWEVEGKIIR
nfat5  QP--AGVPEI  K LHSCSVKGEE V L GKNFLKGT KVIFQENVSD-ENSWKSEAEIDM
      *   .* . . * * . . * ** .*** * * * * *

                                678
nfat1  DKSQPNMLFVEIPEYRNKHIRT PVKVMFYVINGKRKRK SQPQHFTYHPV
nfat2  DLCKPNSLVVEIPFRNQ RITSPVHVSFYVCNGKRKRK SQYQRFTYLP A
nfat3  LQSNEVTL TLTVPEYSNKRVS RPVQVYFYVSNGRKRK SPTQSFRFLPV
nfat4  EKCQGAHIVLEVPPYHNP AVTAAVQVHFYLCNGKRKRK SQSRFTYTPV
nfat5  E F Q L VKVPPYHDQHITLPVSVGIYVVTNA RSHDVQPFTYTPD
      . . . * . . * * *. . . * * . *

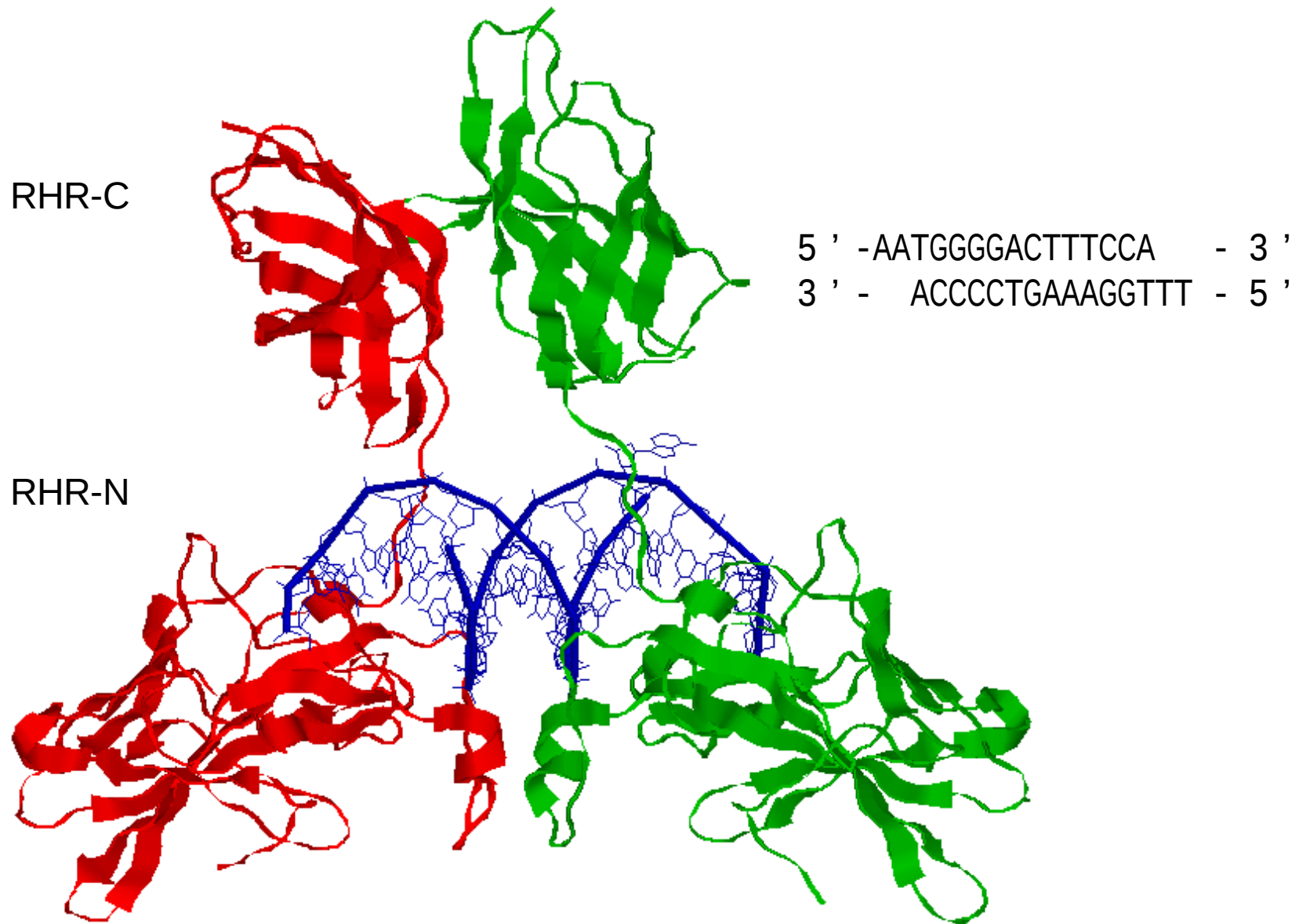
```

RESIDUS IMPLICATS EN:

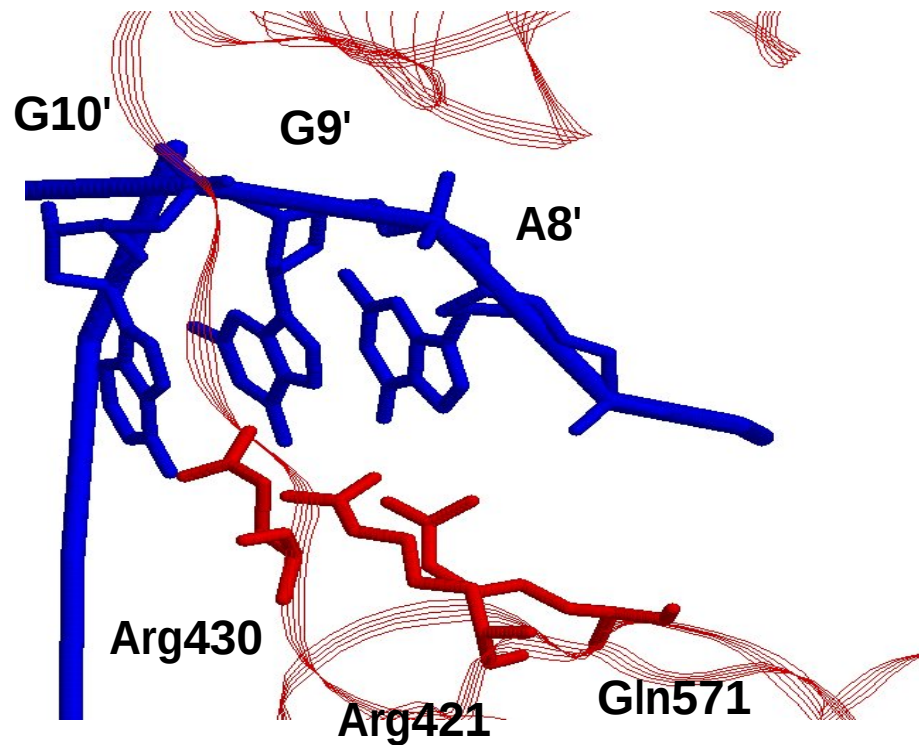


Contactes amb el DNA
Contactes amb FOS
Contactes amb JUN

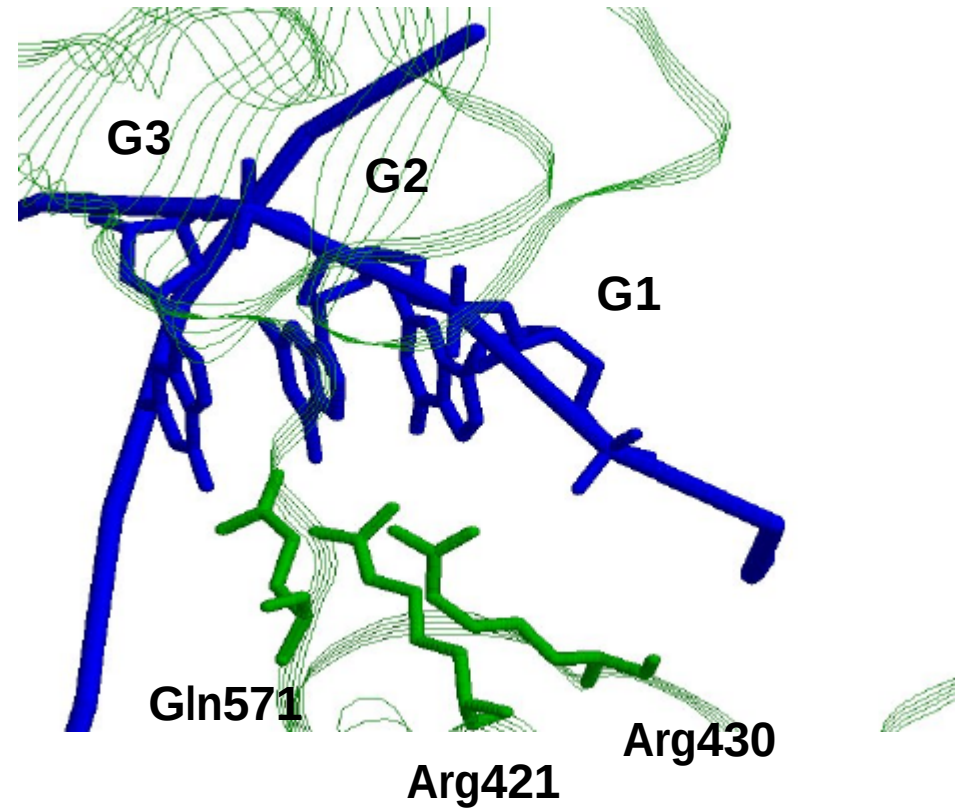
NFAT1 DIMÈRIC UNIT A UN ELEMENT ?B DEL PROMOTOR DEL VIH



Reconeixement del DNA pel dímer



Consens

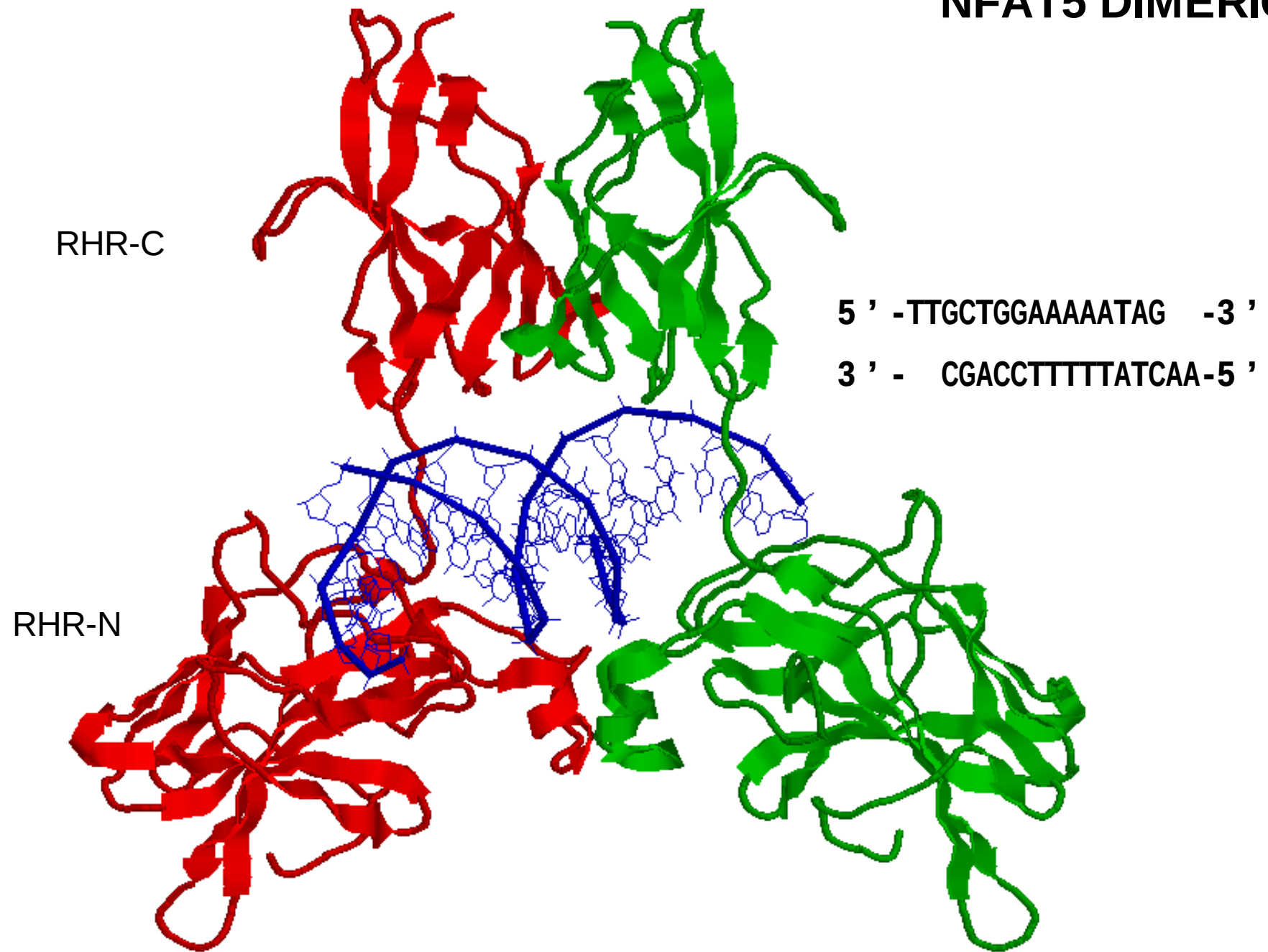


No Consens

5' - GGGACTTTCC - 3'

3' - CCCCTGAAAGG - 5'

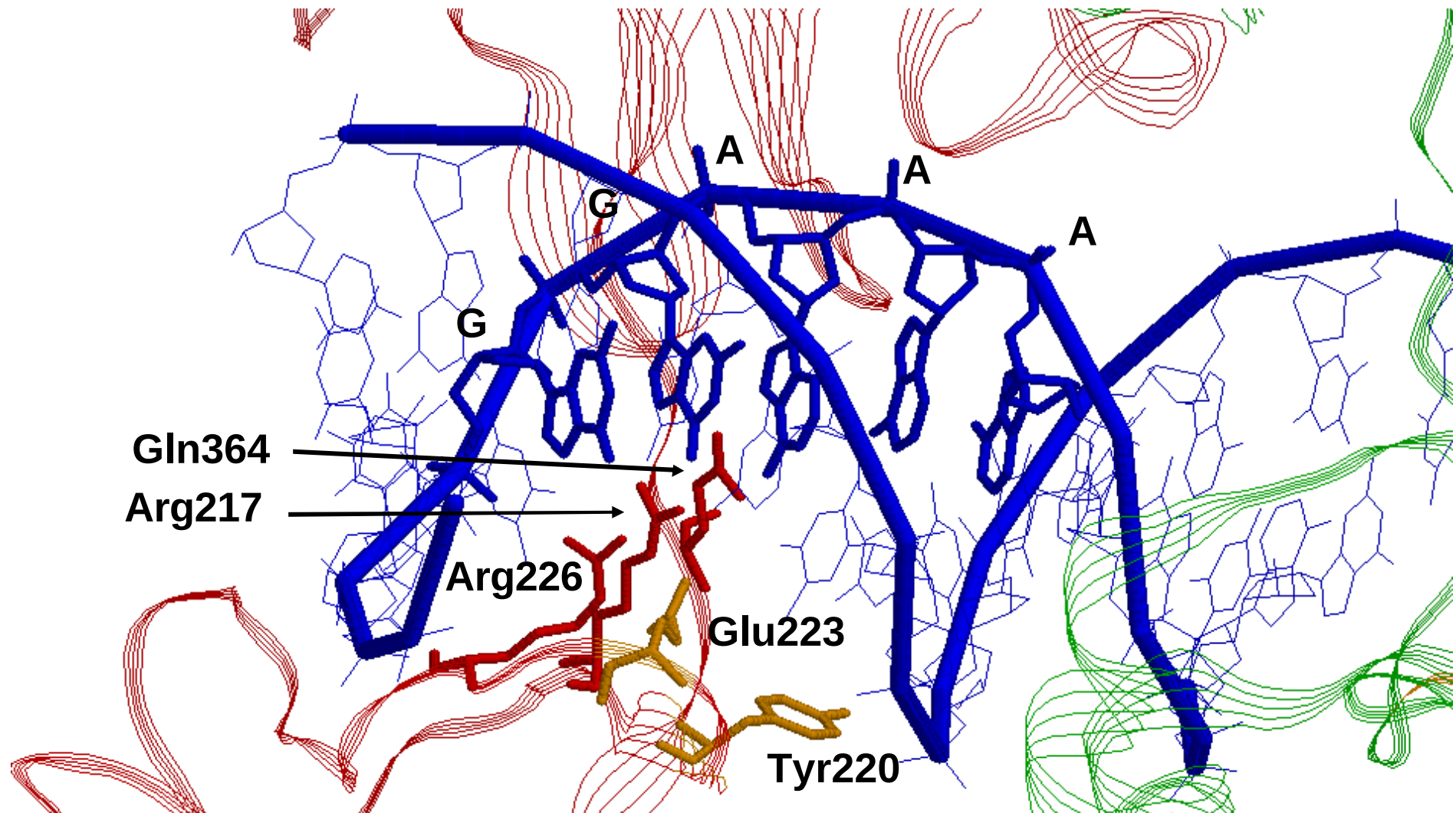
NFAT5 DIMÈRIC



Reconeixement del DNA pel dímer

5' -TTGCT**GA**AAATAG- 3'

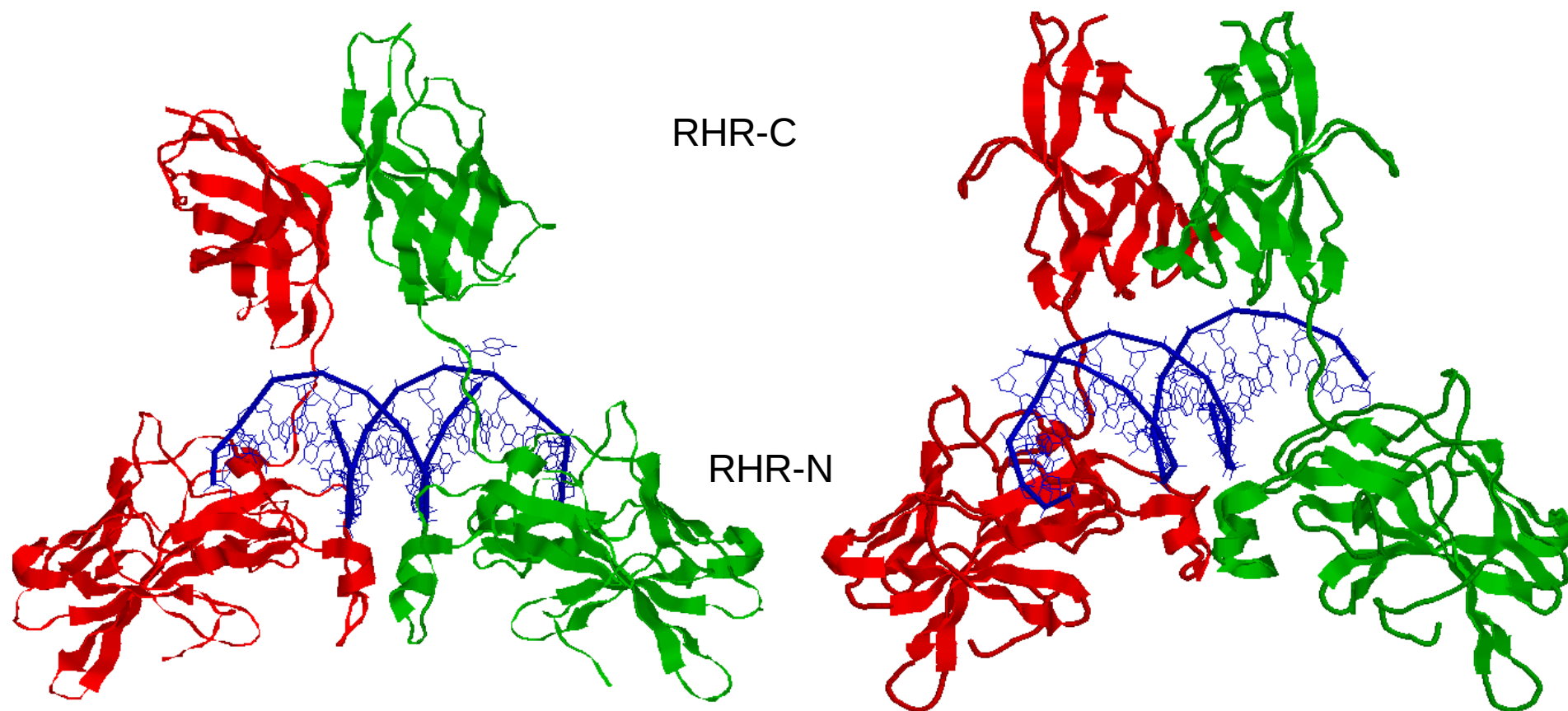
3' - CGACCTTTTATCAA- 5'



Comparació dels dos dímers

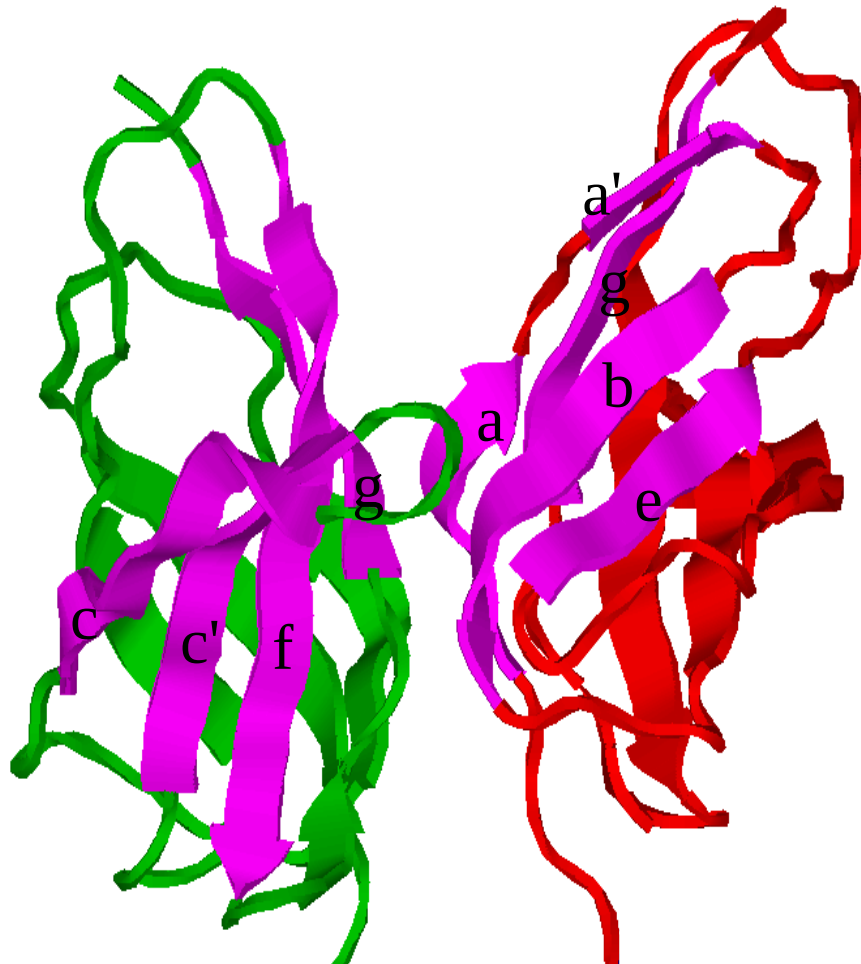
NFAT1

NFAT5

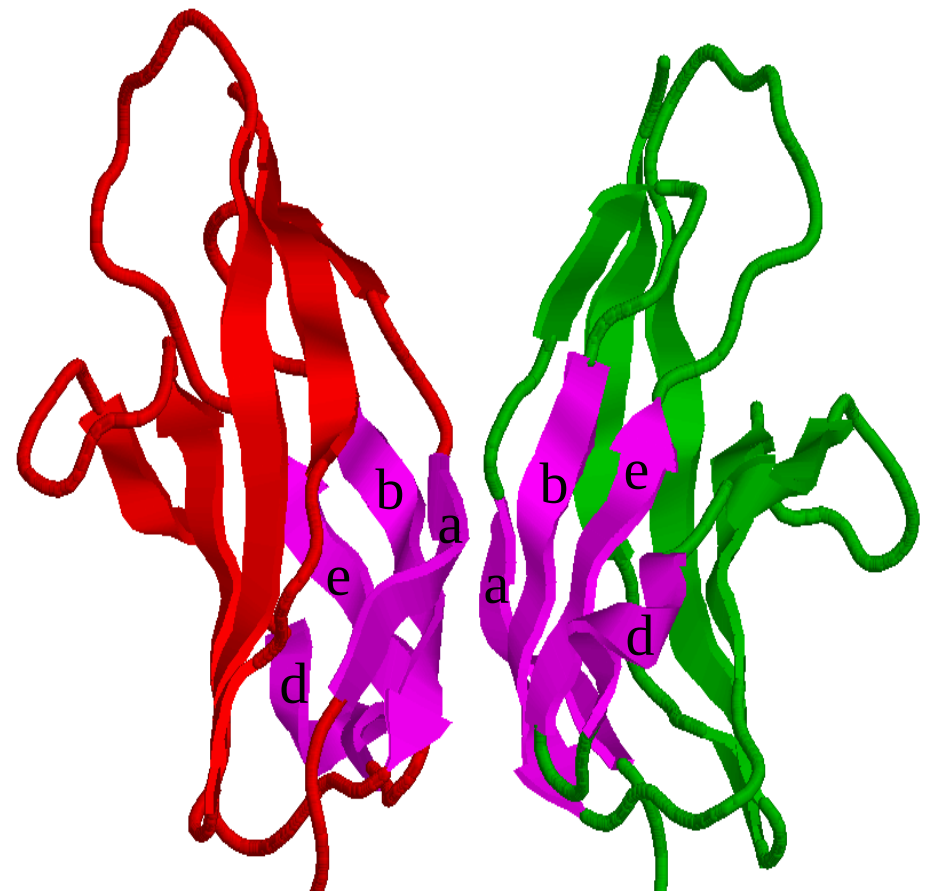


Interacció de fulles β a la Regió RHR-C

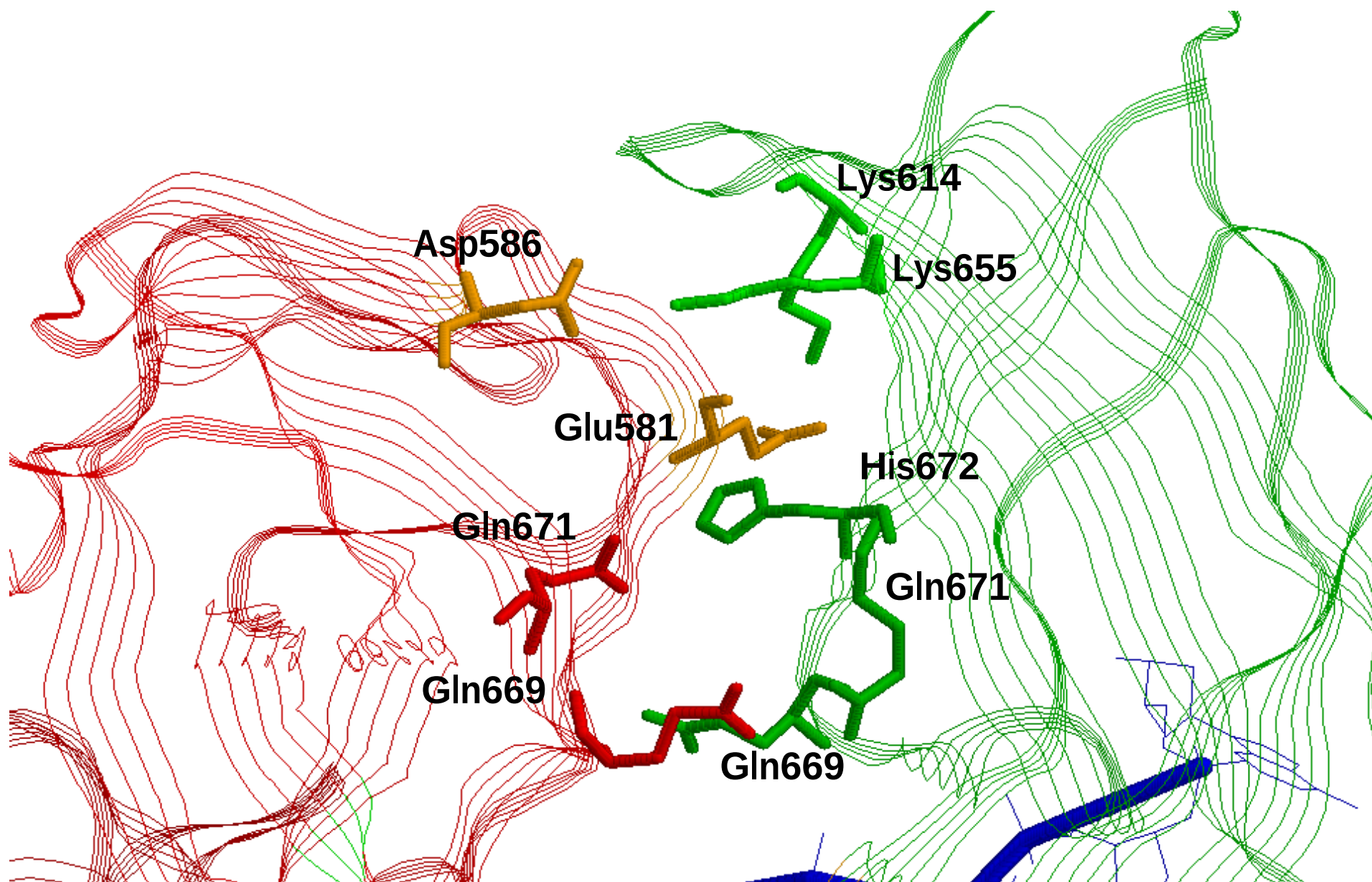
NFAT1



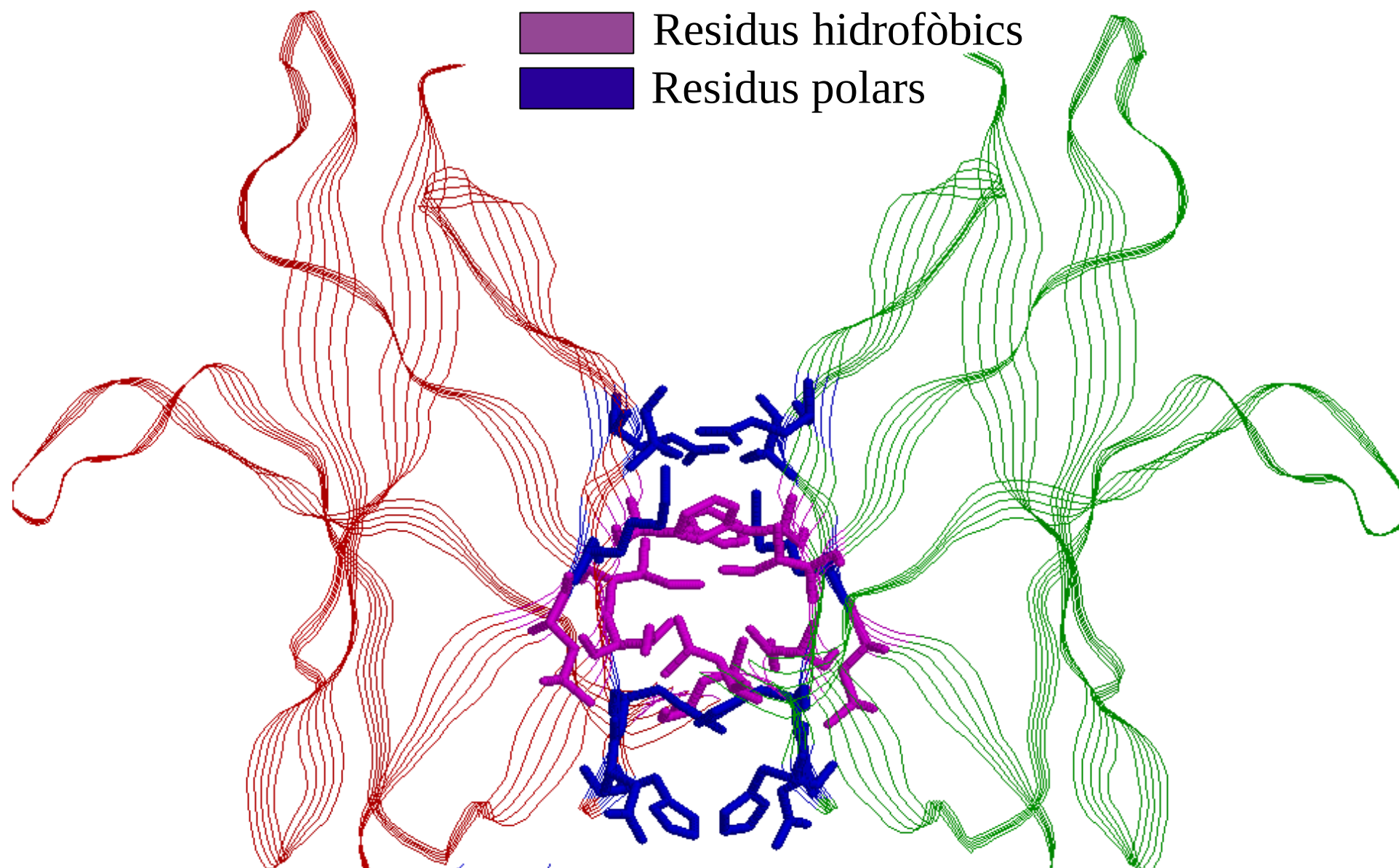
NFAT5



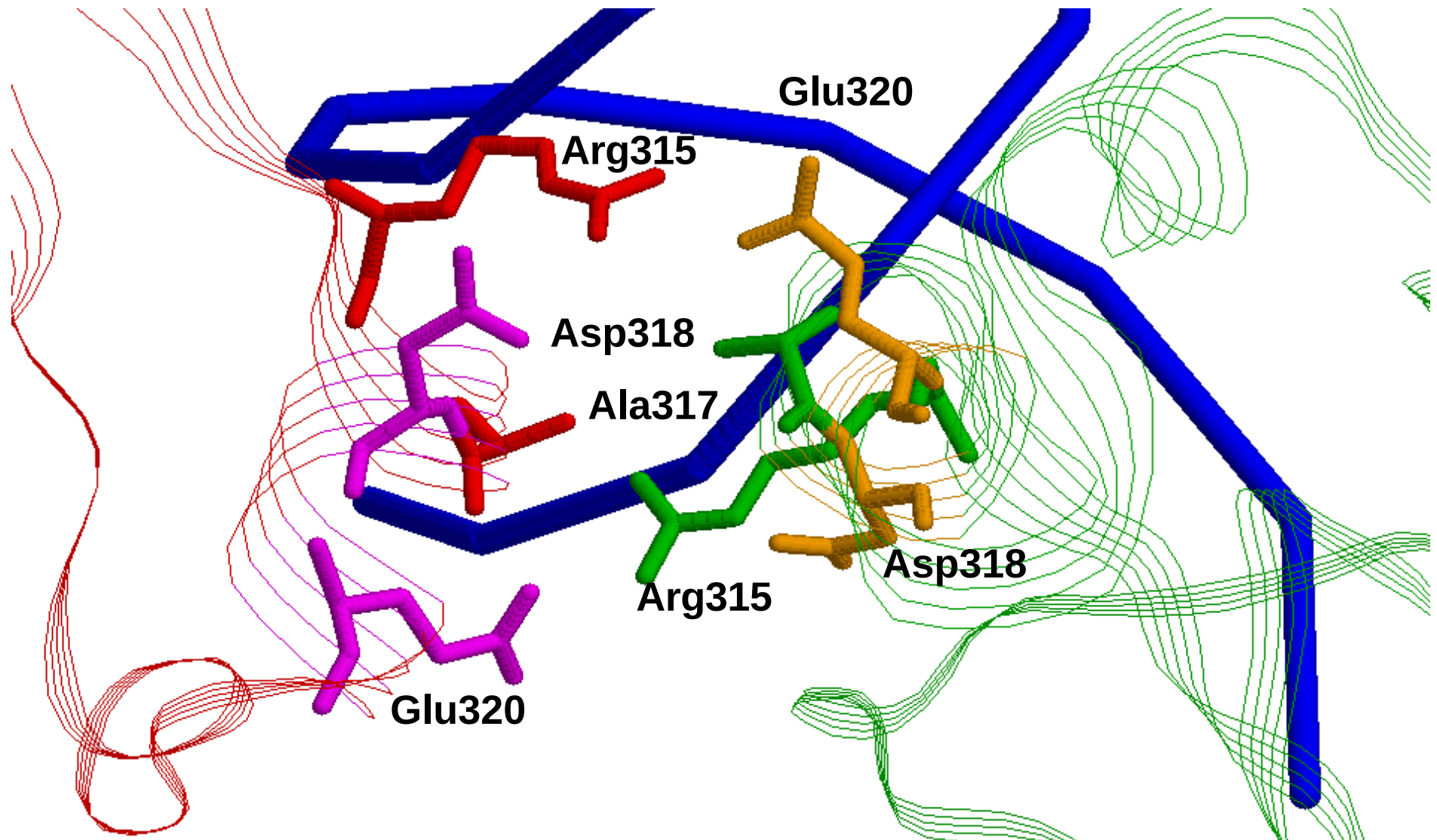
Interacció entre els RHR-C dels dos monòmers en NFAT1



Dimerització per RHR-C en NFAT5



Dimerització per RHR-N (NFAT5)



ALINEAMENT ESTRUCTURAL DEL RHR

nf5c	KKSPMLCGQYPVKSEGKELKIVVQPETQHRARYL	220	TEGSRG	SVKDR	TQQGFPTVKLEGHN-
nf11	-SSVPLEWPLSSQSGSYELRIEVQPKPHHRAHYETE		TEGSRG	AVKAPT	-GGHPVVQLHGYPE
nf5c	-EPVVLQVFVGND		-GRVKPHGFYQACR	-VTGRN	-TTPCKEVDIEGTTVIEVGLDPSNNM
nf11	NKPLGLQIFIGTADERILKPHAFYQVHRITGKT		VTTTSYEKIV	-GNTKVLEIPLEPKNNM	
nf5c	TLAVDCVGILKLRNADVE	330	-ARIGIAGSK	--K	STRARLVFRVNIMRKDGSTLTLQTPSSP
nf11	RATIDCAGILKLRNADIELRKGET---		DIGRKN	TRVRLVFRVH	IPESSGRIVSLQTASNP
nf5c	ILCTQ		PAGVPEILKKS	LHSCSVKGEE	EVELIGKNFLKGTKV-IFQ-----ENVSDE
nf11	IECSQ		SAHEL-----	PMVERQDT	DSCLVYGGQ----
nf5c	NSWKSEAEIDMELFHQNHLLIVKVPPYHDQHITLPVSVGIYVVTNAG		GRSH-----		
nf11	QMIL-----		TGQNF--	TSESKVVFT	ETTDGQ
nf5c	-----		D-----	VQPFTYTPD-	
nf11	QIWEMEATVDKDKSQPNMLFVEIPEYRNKHIRT		PVKVNFYVINGKRKRS	QPQH	FTYHPV

RESIDUS IMPLICATS EN LA DIMERITZACIÓ:

	Contactes amb l'DNA
	Loop E'F
	Simètrica en RHR-C d'NFAT5
	Asimètrica de RHR-C d'NFAT1-4

ALINEAMENT DE SEQÜÈNCIA DEL RHR

```

                                400
nfat1  -----WPLS  QSGSYELRIEVQPKPHHRAHYETEGSRGAVKAPTG-GHPVVQLHG YME
nfat2  -----WQLP  HSGPYELRIEVQPKSHHRAHYETEGSRGAVKASAG-GHP IVQLHGYLE
nfat3  -----WPLP  QYEQLELRIEVQPRAHHRAHYETEGSRGAVKAAPG-GHPVVKLLGYSE
nfat4  -----WPLP  HFGQCELKIEVQPKTHHRAHYETEGSRGAVKASTG-GHPVVKLLGYNE
nfat5  KKSPMLCGQYPVKSEGGKELKIVVQPETQHRARYL TEGSRGSVKDR TQQGFPTVKLEGHNE
                                .      **.* *** .****.* *****.**      * * *. * *
                                502
nfat1  NKPLGLQIFIGTAD E   LKPHAFYQVHRITGKTVTTTSYEKIVGNTKVLE IPLEPKNNMR
nfat2  NEPLMLQLFIGTADD  LRP HAFYQVHRITGKTVSTTSHEA ILSNTKVLE IPLLPENSMR
nfat3  -KPLTLQMFIGTAD E   LRP HAFYQVHRITGKMVATASYEAVVSGTKVLEMTLLPENNMA
nfat4  -KPINLQMFIGTADD  LRP HAFYQVHRITGKTVATASQEII IASTKVLE IPLLPENNMS
nfat5  --PVVLQVFGND SGR-VKPHGFYQACRVTGRN-TTPCKEVD IEGTTVIEVGLDPSNNMT
      *. **.*.*. * ..** *** *.***. .* . * . * *.**.* * * * *

nfat1  ATIDCAGILKLRNADIELRKGETDIGRKNTRVRLVFRVHIP ESSG  IVSLQTASNP I E C S
nfat2  AVIDCAGILKLRNSDIELRKGETDIGRKNTRVRLVFRVHPQPSG  T L S L Q V A S N P I E C S
nfat3  ANIDCAGILKLRNSDIELRKGETDIGRKNTRVRLVFRVHPQGGG  V V S V Q A A S V P I E C S
nfat4  ASIDCAGILKLRNSDIELRKGETDIGRKNTRVRLVFRVHIPQPSG  V L S L Q I A S I P V E C S
nfat5  LAVDCVGILKLRNADVEARIGIAGSKKKSTRARLVFRVNIMRKDGSTLT L Q T P S S P I L C T
      .** *****.*.* * * . . * ** *****.. * ...* * * . *
                                602
nfat1  QRS A H E L P M V E R Q D T D S C L V Y G G Q Q M I L T G Q N F T S E S K V V F T E K T T D G Q Q I W E M E A T V D K
nfat2  Q R S A Q E L P L V E K Q S T D S Y P V V G G K K M V L S G H N F L Q D S K V I F V E K A P D G H H V W E M E A K T D R
nfat3  Q R S A Q E L P Q V E A Y S P S A C S V R G G E E L V L T G S N F L P D S K V V F I E R G P D G K L Q W E E E A T V N R
nfat4  Q R S A Q E L P H I E K Y S I N S C S V N G G H E M V V T G S N F L P E S K I I F L E K G Q D G R P Q W E V E G K I I R
nfat5  Q P -- A G V P E I L R K S L H S C S V K G E E V F L I G K N F L K G T K V I F Q E N V S D - E N S W K S E A E I D M
      *      . * . .      . * * . . . * ** .*. * *      * * *

                                678
nfat1  D K S Q P N M L F V E I P E Y R N K H I R T P V K V N F Y V I N G K R K R S Q P Q H F T Y H P V
nfat2  D L C K P N S L V V E I P P F R N Q R I T S P V H V S F Y V C N G K R K R S Q Y Q R F T Y L P A
nfat3  L Q S N E V T L T L T V P E Y S N K R V S R P V Q V Y F Y V S N G R R K R S P T Q S F R F L P V
nfat4  E K C Q G A H I V L E V P P Y H N P A V T A A V Q V H F Y L C N G K R K K S Q S Q R F T Y T P V
nfat5  E L F E Q N E L I V K V P P Y H D Q H I T L P V S V G I Y V V T N A G R S H D V Q P F T Y T P D
      . . . * . .      * * * . . .      * * . *

```

RESIDUS IMPLICATS EN DIMERITZACIÓ:

-  Simètrica en RHR-C d'NFAT5
-  Asimètrica de RHR-C d'NFAT1-4
-  Loop E'F

Referències

- Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:707-47.
- Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity.* 2001 Jul;15(1):47-58.
- Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene.* 2001 Apr 30;20(19):2476-89.
- Schulz RA, Yutzey KE. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2004 Feb 1;266(1):1-16.
- Viola JP, Carvalho LD, Fonseca BP, Teixeira LK. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Mar;38(3):335-44.
- Sergio Lois, Alberto Moldón, Beatriz Morancho, Joan Planas. Searching a family for NFAT5. (treball biologia estructural 2002).

Referències

- Structure Of The DNA Binding Domains Of Nfat, Fos and Jun Bound To DNA: 1A02
- Crystal Structure Of Human Nfat1 Bound Monomerically To DNA: 1OWR
- Structure Of Nfat1 Bound As A Dimer To The HIV-1 Ltr Kb Element: 1P7H
- Tonebp/DNA Complex: 1IMH

- Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature*. 1998 Mar 5;392(6671):42-8.
- Stroud, J. C., Chen, L.: Structure of Nfat Bound to DNA as a Monomer *J.Mol.Biol.* 334 pp. 1009 (2003)
- Giffin, M. J., Stroud, J. C., Bates, D. L., Von Koenig, K. D., Hardin, J., Chen, L.: Structure of Nfat1 Bound as a Dimer to the HIV-1 Ltr Kb Element *Nat.Struct.Biol.* 10 pp. 880 (2003)
- Stroud JC, Lopez-Rodriguez C, Rao A, Chen L. Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nat Struct Biol.* 2002 Feb;9(2):90-4.

Preguntes PEM

1. El RHR està constituït per 2 dominis:
 - a) Sànvitx greek-key
 - b) Meandre β
 - c) Forquilla β
 - d) Barril TIM
 - e) ? -propeller

2. Assenyala les respostes correctes:

1. El motiu KRKR és important en la unió dels NFAT a l'esquelet del DNA.
2. Els aminoàcids àcids i bàsics poden fer ponts salins en les interaccions proteïna-proteïna.
3. Dues Arg i una Gln són fonamentals en el reconeixement de seqüències específiques pels NFAT.
4. Un Asp i un Glu són molt importants en la interacció dels NFAT amb els fosfats de l'esquelet del ADN.

- a) 1, 2 i 3.
- b) 1 i 3.
- c) 2 i 4.
- d) 4.
- e) 1, 2, 3 i 4.

3. Assenyala l'afirmació falsa:

- a) Els factors de transcripció poden interaccionar entre ells i col·laborar així en l'activació de la transcripció.
- b) El fet que NFAT1 interaccioni amb AP-1 (fos i jun) permet una regulació més fina de la transcripció.
- c) NFAT1 mai s'uneix al ADN de forma dimèrica.
- d) La principal via d'activació dels NFAT1-4 implica el calci i la calcineurina.
- e) La flexibilitat de la regió d'unió entre els dos dominis Ig-like del domini d'unió a ADN dels NFAT1-4 permet que puguin interaccionar amb proteïnes diferents en diversos contextos.

4. Quina de les següents molècules és un dímer en solució i no té cap regió coneguda d'unió a calcineurina?

- a) NFAT1
- b) NFAT2
- c) NFAT3
- d) NFAT4
- e) NFAT5

5. Els NFAT són una família de:

- a) Quinases
- b) Factors de transcripció
- c) Fosfatases
- d) Transportadors
- e) Lligases

6. Com s'anomena el domini d'unió a ADN dels NFAT?

- a) Domini de transactivació.
- b) Domini regulador.
- c) Domini d'unió al lligand.
- d) Regió d'homologia Rel.
- e) Domini catalític.

7. Sobre el loop cc', quines són correctes?

- a) El loop cc' interacciona mitjançant forces de Van der Waals amb una regió de Fos.
- b) El loop cc' es troba en el domini RHR-C dels NFAT.
- c) Les dues anteriors són correctes.
- d) El loop cc' es troba molt conservat en l'aliniament per seqüència dels NFAT.
- e) Totes les anteriors són correctes.

8. Assenyala l'afirmació correcta:

- a) Els NFAT no tenen cap funció al sistema immune.
- b) Els NFAT van ser descoberts a les cèl·lules T.
- c) Els 5 NFAT tenen el mateix número d'aminoàcids a la seva seqüència.
- d) NFAT1 sempre s'uneix al ADN amb la mateixa conformació.
- e) NFAT 5 s'uneix al ADN com a monòmer.

9. Sobre els dímers dels NFAT, és cert que:

1. La interacció entre els dominis RHR-C de NFAT1 implica les mateixes cadenes β dels dos monòmers.
2. La interacció entre els dominis RHR-C de NFAT5 implica les mateixes cadenes β dels dos monòmers.
3. La interacció entre els dominis RHR-C dels monòmers de NFAT1 i NFAT5 implica els mateixos residus.
4. En la interacció entre els dominis RHR-C dels monòmers de NFAT5 intervenen una sèrie de residus hidrofòbics envoltats per residus polars.

- a) 1, 2 i 3.
- b) 1 i 3.
- c) 2 i 4.
- d) 4.
- e) 1, 2, 3 i 4.

10. Assenyala l'afirmació correcta:

- a) Les interaccions de NFAT amb el ADN impliquen majoritàriament residus hidrofòbics.
- b) Quan NFAT1 és dimèric s'uneix al ADN en elements γ B.
- c) NFAT5 conserva les seqüències d'unió a Fos i Jun.
- d) La regió d'unió entre els dos dominis RHR (linker) té un factor B menor a la resta de la molècula.
- e) En la superposició de NFAT1-ADN sobre el ADN es troba una gran conservació estructural del domini RHR-C.

PREGUNTA D'ASSAIG

Quina importància pot tenir en relació amb la funció de NFAT1 el fet que la regió d'unió entre els dominis RHR-N i RHR-C sigui flexible i li permeti adoptar diverses conformacions?