



### III. BIOLOGÍA CELULAR DE INMUNOSUPRESORES INHIBIDORES DE CALCINEURINA

## *La familia de factores de transcripción NFAT como dianas en inmunosupresión*

I. Ortega-Pérez y J. M. Redondo

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Madrid.

#### NFATs: REGULACIÓN Y FUNCIÓN

NFAT es una familia de factores de transcripción, descritos inicialmente en células del sistema inmune, integrada por al menos 5 miembros, 4 de los cuales: NFAT1/NFATp, NFAT2/NFATc, NFAT3 y NFAT4, también denominados NFATc2, NFATc1, NFATc4 y NFATc3, respectivamente, se expresan en el citoplasma de células en reposo<sup>1,2</sup> mientras que el quinto miembro, NFAT5, se caracteriza por presentar una localización constitutivamente nuclear<sup>3</sup>.

Desde un punto de vista estructural, los distintos NFATs, excluyendo NFAT5, son proteínas que presentan dos secuencias de gran homología entre los diferentes miembros, y que son el dominio de unión a ADN (DNA binding domain «DBD»), que a su vez presenta una homología moderada con la DBD de la familia de proteínas Rel (NFκB), y la región homóloga para NFAT (NFAT homology region «NHR»), situada en el extremo amino terminal de la proteína, y que constituye su dominio principal de transactivación. Los NFATs expresados en el citoplasma de células en reposo se translocan al núcleo tras la activación celular, y allí forman un complejo compuesto por unidad citosólica, integrada por los propios miembros de la familia de NFAT, y otra unidad nuclear que se asocia con estos miembros<sup>4</sup> y que puede estar formada por el factor de transcripción AP1, cuya interacción con NFAT ha sido bien caracterizada, aunque también se ha descrito asociación con los factores GATA4 y cMAF<sup>5</sup>. Funcionalmente, NFAT juega un papel fundamental en la inducción de la transcripción de algunos genes que son críticos en la respuesta inmune. En un principio,

NFAT se identificó en células T como un complejo inducible que se unía al elemento de respuesta a antígeno del promotor del gen de la interleucina 2 (IL-2)<sup>6</sup>. Hoy día se sabe que NFAT también está implicado en la regulación de la expresión de otros muchos genes, tanto dentro del sistema inmune, como fuera de él. Así, está claramente determinado su papel en la expresión de las citocinas IL2, IL4, TNF-α, GM-CSF, e IFN-γ en células T o de receptores de superficie como FasL o CD40L, existiendo también evidencias de su implicación en la regulación de la expresión de IL-3 e IL-5 en células T, de TNF-α en células B, o de IL-4 e IL-5 en mastocitos<sup>2</sup>. Dado el papel central que estas citocinas desempeñan en el control y desarrollo de funciones efectoras y reguladoras del sistema inmune, es comprensible que la inhibición de NFAT y, por consiguiente, también de la expresión de los genes que regula, tenga efectos tan dramáticos en el funcionamiento del sistema inmune y conduzca a situaciones de inmunosupresión.

La activación de NFAT requiere de señales iniciadas por la movilización intracelular de Ca<sup>2+</sup>, y está regulada por la acción de la fosfatasa calcineurina, cuya actividad es muy dependiente del sistema Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaM) y es inhibida por acción de las drogas inmunosupresoras ciclosporina A (CsA) y FK506. La activación de la calcineurina conduce a la desfosforilación de NFAT, altamente fosforilado en el citoplasma de las células en reposo<sup>7,8</sup>, lo que origina la exposición de las secuencias de localización nuclear (NLS) y la consiguiente translocación del factor al núcleo celular, donde se une a elementos específicos en el ADN, activando así la transcripción génica<sup>6</sup>. Una vez que se ha desfosforilado y translocado al núcleo, NFAT necesita una estancia sostenida para transactivar los genes que regula. Dicha estancia en el núcleo vendría determinada por la duración de la elevación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intra-

**Correspondencia:** Dr. Juan Miguel Redondo  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa  
CSIC - Facultad de Ciencias. U.A. Madrid

celular aunque, por otro lado, también estaría condicionada por la activación de determinadas quinasas que promoverían su refosforilación y consiguiente exportación al citoplasma, en un proceso en el que, como se ha descrito para NFAT2<sup>9</sup>, NFAT4<sup>10</sup> y nuestro grupo ha caracterizado para NFAT1, parece estar implicada la molécula exportadora CRM1.

La importancia de NFAT no se circunscribe a la regulación de procesos de activación de linfocitos. Así, se ha descrito la implicación de esta familia de factores de transcripción en procesos relacionados con la morfogénesis de las válvulas cardíacas en vertebrados, proceso que no tiene lugar en ratones deficientes en la expresión del miembro NFAT2, por lo que mueren durante el desarrollo embrionario<sup>11</sup>. Por otro lado, en ratones transgénicos donde se expresan formas activadas de NFAT3 o calcineurina, tiene lugar hipertrofia y fallo cardíaco, que se previenen con dosis altas de ciclosporina<sup>12</sup>. Asimismo, nuestro grupo ha identificado recientemente que NFAT se regula en endotelio por estímulos proangiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), donde juega un papel importante en el control de la expresión de genes como el del factor tisular (TF)<sup>13</sup> o el de la ciclooxigenasa 2 (COX2).

### LAS DROGAS INMUNOSUPRESORAS FK506 Y CICLOSPORINA A

CsA y FK506 son drogas inmunosupresoras ampliamente usadas en trasplantes. Sus propiedades inmunosupresoras se deben básicamente a su capacidad de inhibir tanto la transcripción de factores de crecimiento de las células T, como es el caso de la IL-2, como de otros genes de citocinas importantes y de algunos ligandos de moléculas de superficie, cuya expresión es fundamental para que se produzca una respuesta inmune eficaz. Aunque estructuralmente estas drogas son completamente diferentes, ambas inhiben, en último término, la expresión de citocinas de un modo análogo<sup>14</sup>; tanto CsA como FK506 actúan por interacción directa con sus receptores intracelulares; ciclofilina A (CyA) y FKBP (FK506 binding protein), respectivamente, conocidos colectivamente con el nombre de inmunofilinas, receptores que, al igual que los propios ligandos, tampoco comparten similitud estructural. A pesar de estas diferencias, tanto ciclofilina como KFBP poseen actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa, actividad enzimática que cataliza el proceso de isomerización *cis-trans* de los residuos de prolina en sustratos polipeptídicos<sup>15</sup>. Esta actividad isomerasa es inhibida por CsA y FK506, lo que, en principio, sugirió que dicha actividad podría jugar

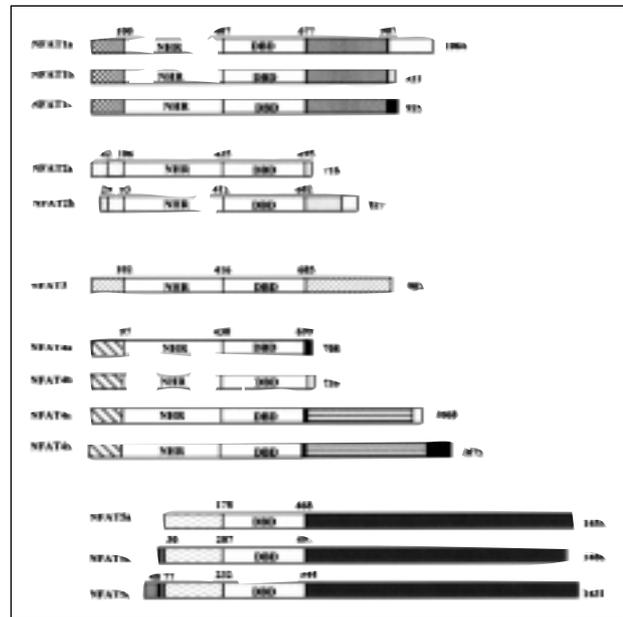


Fig. 1.—NFATs: distintos miembros e isoformas. En este esquema se muestran los miembros conocidos de NFAT con las isoformas generadas por «splicing» alternativo de sus ARNm respectivos. Se indican las regiones de mayor homología entre los distintos miembros: la DBD o dominio de unión al ADN, muy conservada entre las distintas proteínas NFAT, y la NHR o región de homología de NFAT, que constituye el principal dominio regulador de la proteína. Dicha secuencia contiene tanto el sitio de unión a calcineurina (PxxIxIT), como gran número de los residuos de serina que son desfosforilados por la calcineurina. El dominio NHR, si bien comparte menos homología entre los residuos de las distintas proteínas de la familia que la existente en la región DBD, muestra una serie de secuencias concretas, ricas en serina y prolina, altamente conservadas entre los miembros 1 al 4, y que no se han encontrado en otras proteínas. Por su parte, NFAT5, tiene una DBD análoga a la que presentan los otros miembros, pero no posee región reguladora de respuesta a calcineurina. En su lugar muestra una región carboxilo terminal muy larga y rica en glutamina, y una región amino terminal más corta, que contiene una secuencia de localización nuclear bipartita. Estas características específicas convierten a NFAT5 en una proteína constitutivamente nuclear, tanto en células en reposo como en células activadas. El resto de los dominios de NFAT guardan en general poca homología entre las distintas formas de la familia.

un papel directo en la cascada de activación de las células T, probablemente catalizando el plegamiento de un intermediario inactivo a su forma activa. Estudios posteriores determinaron que la interacción de CsA y FK506 con las inmunofilinas da lugar a la formación de un complejo que actúa interfiriendo con la serina-treonina fosfatasa calcineurina, y que es la inhibición de la translocación y activación transcripcional de NFAT, la principal responsable de la capacidad inhibidora de ambas drogas<sup>14</sup>. Aunque el uso de CsA y FK506 ha representado un

importante avance en el campo de los trasplantes, estas drogas presentan importantes efectos secundarios derivados de su efecto desactivador de la calcineurina, como son por ejemplo su toxicidad renal y hepática<sup>6,15</sup>. Ello dificulta o desaconseja su uso en otras patologías que requieren una terapia inmunosupresora, como es el caso de enfermedades autoinmunes, o procesos alérgicos o de inflamación. Debido al papel fundamental de NFAT en la regulación de la expresión de genes críticos para la respuesta inmune, y teniendo en cuenta que los efectos inmunosupresores de CsA y FK506 se derivan de su capacidad de inhibición de dicho factor de transcripción, la caracterización de los componentes implicados en las rutas de regulación de la localización subcelular de NFAT, puede ayudar a identificar posibles nuevas dianas terapéuticas en el proceso de inmunosupresión. Ello podría abrir nuevas perspectivas en la búsqueda de drogas inmunosupresoras alternativas que, aunque también estuvieran basadas en la inhibición del proceso de activación de NFAT, no interfiriesen con la actividad fosfatasa de la calcineurina.

### ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS EN INMUNOSUPRESIÓN

Estudios previos de nuestro grupo determinaron que los ditiocarbamatos (DTCs), potentes agentes antioxidantes, conocidos por su capacidad de inhibir NFκB y activar AP1<sup>16-18</sup> eran capaces de inhibir eficientemente la transactivación de genes dependientes de NFAT, así como la unión de éste al ADN, a través de mecanismos diferentes a los mediados por CsA y FK506<sup>19</sup>. Un estudio más exhaustivo de su mecanismo de acción reveló que los DTCs no inhibían la actividad fosfatasa de la calcineurina ni la translocación al núcleo del factor, sino que inducían una rápida exportación de NFAT al citoplasma en células activadas y tratadas con el antioxidante PDTC (pirrolidín ditiocarbamato). Esto sugería que la acción inhibitoria de estos agentes se debía a que promovían un tránsito rápido de NFAT por el núcleo, insuficiente para ejercer sus funciones transactivadoras. Mediante experimentos de Western Blot detectamos que la movilidad electroforética del factor, una vez exportado aceleradamente al citoplasma en las células tratadas con PDTC, disminuía con respecto a la movilidad observada en células en reposo, lo que podría ser debido a modificaciones post-transcripcionales basadas en una hiperfosforilación del mismo. Estas observaciones apuntaban a una posible implicación de determinadas quinasas, que fueran dianas de los DTCs y que mediasen en

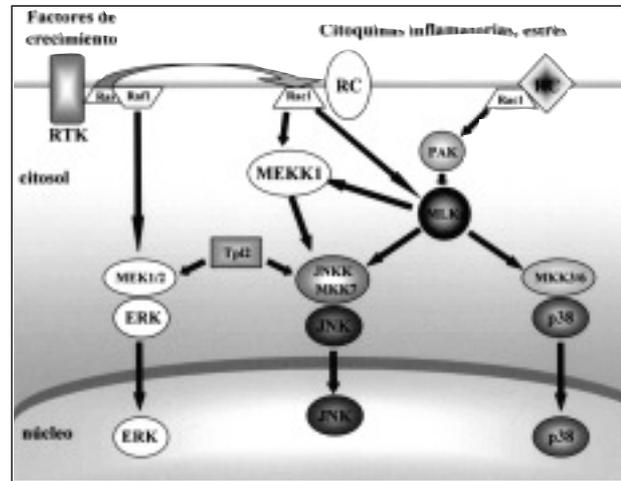


Fig. 2.—Modelo general de las vías de señalización de las MAPK en mamíferos. En la figura se representan las rutas de señalización que conducen a la activación de las MAPKs (mitogen-activated protein kinases) ERK 1 y 2 (extracellular regulated kinases), JNKs/SAPKs (c-jun N-terminal kinases/stress activated protein kinases) y p38/HOG. La activación de las MAPKs está mediada por una serie de reacciones en cascada, en la que cada MAPK es fosforilada por una serie de quinasas superiores a ella en la ruta de señalización, y que es a su vez fosforilada por una tercera quinasas, MAPKKK, encargada de acoplar la señal procedente de la membrana. Estas señales se transmiten de forma diferente dependiendo del tipo celular y del estímulo, si bien suelen implicar la participación de otras quinasas, proteínas adaptadoras y GTPasas como Ras y Rac. La activación de las MAPKs ERK, JNK y p38 conduce, normalmente, a su posterior translocación al núcleo donde pueden integrar señales procedentes de distintas rutas mediante la fosforilación de factores de transcripción que regulan programas específicos de expresión génica.

el mecanismo de relocalización citoplasmática acelerada de NFAT<sup>19</sup>. En este contexto, habíamos observado previamente que las MAPKs p38 y JNK, fosforilaban *in vitro* al factor NFAT en respuesta al tratamiento con PDTC. Puesto que el PDTC ejercía un claro efecto inhibitorio sobre la actividad de NFAT, la identificación de los mecanismos moleculares responsables de este efecto inmunosupresor del PDTC, podría ayudar a identificar nuevos mecanismos y dianas de inmunosupresión. Por ello, nos planteamos estudiar si la activación de estas quinasas de la familia de las MAPKs, ejercía algún papel sobre la regulación de la localización subcelular de NFAT en células activadas o inducía efectos similares a los observados con los DTCs. Así, determinamos que la activación de la ruta de p38 se opone a la localización nuclear de NFAT1 inducida por un aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, mientras que la activación de esta ruta no parece ejercer efecto alguno sobre la localización subcelular de NFAT2.

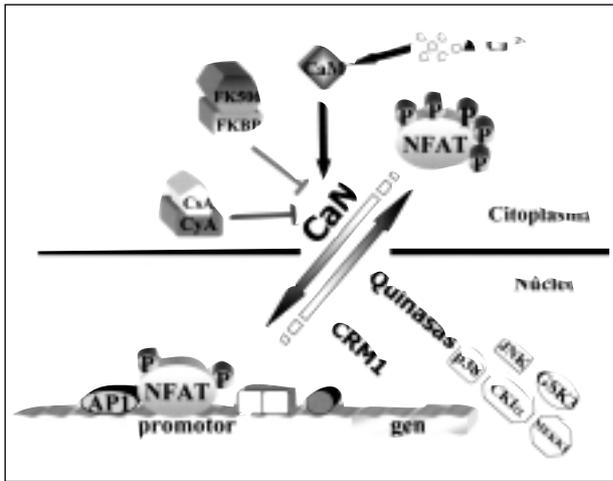


Fig. 3.—Mecanismos de inhibición de NFAT por CsA y FK506. La movilización de calcio intracelular en respuesta a estímulos activadores conduce a la activación de la fosfatasa calcineurina, dependiente del sistema calcio/calmodulina. La calcineurina desfosforila a NFAT, que se transloca al núcleo donde permanece hasta que cesa la señal de  $Ca^{2+}$  y entonces se exporta al citoplasma en un proceso mediado por determinadas quinasas y asistido por la molécula exportadora CRM1. La activación de NFAT es un proceso inhibible por las drogas inmunosupresoras CsA y FK506. Estas dos moléculas actúan por interacción con sus receptores intracelulares, ciclofilina A y FKBP, respectivamente, dando lugar a un complejo capaz de interactuar con la calcineurina e inhibir su actividad fosfatasa, lo que imposibilita la translocación de NFAT y la consecuente inhibición de la expresión de genes activados por este factor de transcripción.

Aunque, como en el caso de p38, hemos detectado asociación *in vivo* de JNK1 y NFAT1, la activación de la ruta de la JNK no tiene efecto sobre la localización subcelular de NFAT1 ni de NFAT2, miembro muy parecido a NFAT1 en las zonas reguladoras de la NHR. En cualquier caso, el hecho de que JNK se asocie y fosforile a NFAT1 apunta a que la actividad de dicha quinasa pudiera ejercer alguna función en la compleja regulación de NFAT1, probablemente a nivel de su capacidad transactivadora. Aun así, no podemos descartar que JNK desempeñe algún papel en la regulación de la localización subcelular de NFAT1, pero en conjunción con otros elementos reguladores. En cuanto a la MAPK ERK, su activación no tiene efecto sobre el proceso normal de exportación/importación nuclear de NFAT inducido en respuesta a la movilización de calcio. Por otro lado, mediante el uso de leptomicina B, metabolito fúngico inhibidor selectivo de la proteína exportadora CRM1, hemos determinado la implicación de dicha molécula en la exportación nuclear de NFAT1, al igual que ya fue descrito para NFAT2<sup>9</sup> y NFAT4<sup>10</sup>. Futuros estudios podrán esclarecer si esta

exportina puede ser una diana terapéutica para la acción de drogas que al inducir su activación condujeran a la aceleración de la salida de NFAT del núcleo, con los consiguientes efectos inmunosupresores que esto ocasionaría.

De forma paralela, otros grupos han llevado a cabo estudios que han arrojado luz para el diseño de nuevas drogas inmunosupresoras que tienen como diana, bien sea directa o indirectamente, NFAT. Así, mediante la técnica del sistema de doble híbrido (two hybrid system) se identificó una asociación entre JNK y NFAT4; más tarde, estudios funcionales demostraron que la activación de JNK, por sobreexpresión de MKK7 en células BHK estimuladas con calcineurina activada, conducía a la exclusión nuclear de NFAT4<sup>20</sup>. Posteriormente, se identificaron la caseína quinasa1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) y la MEKK1 como quinasas efectoras en la regulación de la localización subcelular de NFAT4, por su capacidad de inhibir directa e indirectamente, respectivamente, la translocación del factor al núcleo<sup>21</sup>. Asimismo,

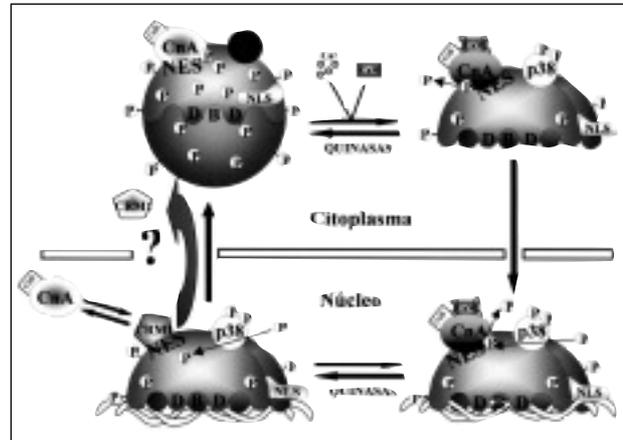


Fig. 4.—Modelo del papel de p38 y CRM1 en la relocalización subcelular de NFAT1. NFAT1 se encuentra altamente fosforilado en el citoplasma de las células T en reposo, donde formaría parte de un complejo que incluiría a la calcineurina y a la MAPK p38. Tras la estimulación celular y elevación del  $Ca^{2+}$  intracelular, se generarían una serie de señales que en último término conducirían a un incremento mantenido de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Esto permite la unión de la calmodulina (CaM) a la calcineurina (CaN y CnB), con lo que se produce su activación, lo que daría lugar a la desfosforilación de NFAT1 y a la exposición de las secuencias de localización nuclear (NLS). Una vez desfosforilado, el complejo NFAT1-calcineurina-p38 se transloca al núcleo, donde la calcineurina mantiene activo a NFAT1 mientras los niveles de  $Ca^{2+}$  están elevados. Cuando cesa la señal de calcio, NFAT1 es refosforilado por p38 y es exportado al citoplasma por un mecanismo en el cual participa la proteína exportadora CRM1. Esta molécula compite con la calcineurina por su sitio de unión a NFAT, la secuencia NES (nuclear export sequence), de modo que sólo podrá unirse y exportar NFAT una vez que se ha apagado la señal del  $Ca^{2+}$  y la calcineurina inactiva se ha disociado del factor.

se ha implicado a la quinasa GSK3 (glucógeno sintasa quinasa) en el proceso de exportación del núcleo de NFAT3 y NFAT2 en neuronas del hipocampo y en células COS transfectadas, respectivamente<sup>22,23</sup>.

Actualmente se están llevando a cabo otro tipo de abordajes que, si bien también dirigidos a inhibir la activación de NFAT sin afectar a la actividad de la calcineurina, basan su estrategia en la interferencia con la unión específica de NFAT y calcineurina. Para ello se ha recurrido a la construcción de librerías combinatoriales de péptidos basados en la secuencia crítica de anclaje de la calcineurina a NFAT, cuyo consenso se ha establecido para todos los miembros del grupo como PxlxIT, donde x son 2 aminoácidos cualesquiera<sup>24</sup>. De entre los péptidos de estas librerías, se han seleccionado aquéllos capaces de unirse a la calcineurina con una afinidad muy superior a la que presenta el péptido con la propia secuencia consenso. De este modo, se consiguen moléculas que compiten eficazmente con el propio NFAT por la unión a calcineurina, de forma tal que se impide la interacción factor/calcineurina y, por tanto, la activación de NFAT, manteniéndose inalterada la actividad fosfatasa de la calcineurina, lo que si bien conduce a la inhibición de la expresión de citocinas mediada por NFAT, no afecta a la regulación de otras proteínas dependientes de la calcineurina<sup>25</sup>.

Las drogas inmunosupresoras CsA y FK506 llevan en uso más de una década para el tratamiento de trasplantes, y hoy día continúan siendo el tratamiento elegido en dichos casos. Si bien su descubrimiento ha supuesto un gran avance, también es cierto que, hoy por hoy, estamos en disposición de explorar estrategias experimentales que nos permitan localizar nuevas dianas en inmunosupresión que faciliten el diseño racional de inmunosupresores más potentes y que presenten menos efectos secundarios. De esta manera, se han desarrollado diversas estrategias que convergen en un punto común, que es la inhibición del factor de transcripción NFAT, un campo de estudio que muy probablemente rendirá nuevas moléculas inmunosupresoras no sólo para su uso en terapias post-trasplantes, sino también en enfermedades autoinmunes, alergias o procesos de inflamación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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* 16: 3955, 1996.
2. Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR: NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369: 497, 1994.
3. López-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A: NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7214, 1999.
4. Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR: Nuclear association of T-cell transcription factor blocked by KF-506 and cyclosporin A. *Nature* 352: 803, 1991.
5. Crabtree GR: Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96: 611, 1999.
6. Rao A, Luo C, Hogan PG: Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707, 1997.
7. 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* 271: 10884, 1996.
8. Choi MS, Brines RD, Holman MJ, Klaus GG: Induction of NF-AT in normal B lymphocytes by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL-4. *Immunity* 1: 179, 1994.
9. Kehlenbach RH, Dickmanns A, Gerace L: Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT *in vitro*. *J Cell Biol* 141: 863, 1998.
10. Zhu J, McKeon F: NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* 398: 256, 1999.
11. Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravallese EM, De la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH: The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392: 186, 1998.
12. Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN: A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93: 215, 1998.
13. Armesilla AL, Lorenzo E, Gómez del Arco P, Martínez-Martínez S, Alfranca A, Redondo JM, González-Amaro R, Portales-Pérez D, Baranda L, Yáñez-Mo M, García-Vicuna R, Cabanas C, Sánchez-Madrid F: Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression. *Mol Cell Biol* 19: 2032, 1999.
14. Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807, 1991.
15. Crabtree GR, Clipstone NA: Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 63: 1045, 1994.
16. Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141, 1994.
17. Aragonés J, López-Rodríguez C, Corbí A, Del Arco PG, López-Cabrera M, De Landázuri MO, Redondo JM: Dithiocarbamates trigger differentiation and induction of CD11c gene through AP-1 in the myeloid lineage. *J Biol Chem* 271: 10924, 1996.
18. Gómez del Arco P, Martínez-Martínez S, Calvo V, Armesilla AL, Redondo JM: JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) is a target for antioxidants in T lymphocytes. *J Biol Chem* 271: 26335, 1996.
19. Martínez-Martínez S, Gómez del Arco P, Armesilla AL, Aramburu J, Luo C, Rao A, Redondo JM: Blockade of T-cell activation by dithiocarbamates involves novel mechanisms of inhibition of nuclear factor of activated T cells. *Mol Cell Biol* 17: 6437, 1997.

## I. ORTEGA-PÉREZ y J. M. REDONDO

20. Chow CW, Rincón M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ: Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 278: 1638, 1997.
21. Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Ferrara P, McKeon F: Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEK1. *Cell* 93: 851, 1998.
22. Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW, Crabtree GR: L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* 401: 703, 1999.
23. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR: Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275: 1930, 1997.
24. Aramburu J, García-Cózar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG: Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1: 627, 1998.
25. Aramburu J, Yaffe MB, López-Rodríguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A, Rakeman AS: Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285: 2129, 1999.