



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA

Dipartimento Materno Infantile e di Biologia e Genetica  
sezione di Biologia e Genetica

Dottorato di ricerca in Bioscienze curriculum Genomica  
Ciclo XXI

TESI DI DOTTORATO

Studio delle interazioni della oncoproteina Tax  
dei retrovirus HTLV con i fattori cellulari della via NF- $\kappa$ B

S.S.D. BIO 13

**Coordinatore: Prof.ssa Carla Voltattorni**

**Tutor: Prof.ssa Maria Grazia Romanelli**

**Dottorando: Dott.ssa Francesca Avesani**

# **INDICE**

# 1 INDICE

<b>1</b>	<b>INDICE</b> .....	1
<b>2</b>	<b>RIASSUNTO</b> .....	4
<b>3</b>	<b>SUMMARY</b> .....	8
<b>4</b>	<b>SCOPO</b> .....	12
<b>5</b>	<b>INTRODUZIONE</b> .....	14
	5.1 Retrovirus.....	15
	5.2 I virus leucemogeni umani delle cellule T.....	16
	5.2.1 Epdemiologia .....	16
	5.2.2 Genoma.....	18
	5.3 L'oncoproteina Tax.....	20
	5.3.1 Domini funzionali della proteina Tax .....	21
	5.3.2 Tax e la modulazione della trascrizione .....	24
	5.3.3 Tax e la via di segnalazione NF- $\kappa$ B.....	28
	5.3.4 Interazioni di Tax e fattori cellulari .....	31
	5.4 Il fattore di trascrizione nucleare p65/RelA.....	34
	5.5 La proteina adattatrice TAB2 .....	36
	5.6 La chinasi IKK $\epsilon$ .....	37
<b>6</b>	<b>MATERIALI E METODI</b> .....	40
	6.1 Colture cellulari .....	41
	6.2 Anticorpi .....	41
	6.3 Costruzione dei vettori d'espressione .....	42
	6.4 Purificazione delle proteine di fusione GST.....	43
	6.5 Glutazione S-transferasi pull down assay.....	44
	6.6 Saggi di co-immunoprecipitazione .....	45
	6.7 Saggi di luciferasi .....	46

<b>7</b>	<b>RISULTATI .....</b>	<b>47</b>
7.1	Le proteine Tax interagiscono con il fattore p65/RelA .....	48
7.2	Le proteine Tax interagiscono con il fattore TAB2 .....	56
7.3	Le proteine Tax interagiscono con la chinasi IKK $\epsilon$ .....	60
7.4	Attivazione NF- $\kappa$ B indotta dalle proteine Tax e sovra- espressione di p65, TAB2 e IKK $\epsilon$ .....	64
<b>8</b>	<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>78</b>
<b>10</b>	<b>ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>93</b>

## **RIASSUNTO**

## 2 RIASSUNTO

I retrovirus umani leucemogeni delle cellule T di tipo 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) sono virus oncogeni responsabili di malattie linfoproliferative e neurodegenerative nell'uomo. Un ruolo determinante nel processo di trasformazione cellulare indotto da HTLV è attribuito alla proteina trans-regolatoria Tax, codificata dall'mRNA virale pX. L'oncoproteina Tax di HTLV-1 (Tax-1) è in grado di riprogrammare la progressione dalla fase G1 ad S del ciclo cellulare attraverso molteplici processi molecolari quali il legame diretto di proteine, la repressione o induzione trascrizionale e le modificazioni post-traduzionali. La proteina Tax di HTLV-2 (Tax-2), confrontata con Tax-1, presenta più del 70% di identità aminoacidica; tuttavia dimostra una ridotta attività trasformante rispetto la sua omologa. Questa diversità nella attività patogenetica rende lo studio strutturale e funzionale delle proteine Tax estremamente promettente per la comprensione dei meccanismi cellulari che più specificamente intervengono nella oncogenesi.

Tax-1 è una proteina di circa 40 kDa che regola la trascrizione virale attraverso la mediazione di proteine cellulari coinvolte in diversi *pathway*. Evidenze sperimentali dimostrano che l'attivazione costitutiva del *signaling* NF- $\kappa$ B da parte di Tax-1 è essenziale per la trasformazione e che Tax-1 interagisce con numerosi fattori di questa cascata. Meno note sono le interazioni di Tax-2 con i fattori della stessa via.

Scopo della presente ricerca è la definizione di omologie e differenze funzionali tra Tax-2 e Tax-1 nell'attivazione costitutiva del *pathway* NF- $\kappa$ B. Abbiamo quindi intrapreso uno studio sulle interazioni di Tax-2 con proteine coinvolte nel *signaling* di NF- $\kappa$ B e sul contributo delle modificazioni post-traduzionali di Tax-1

nell'interazione proteina-proteina. Sono stati scelti tre fattori coinvolti nell'induzione della via canonica NF- $\kappa$ B: il fattore di trascrizione p65/RelA, l'attivatore a monte della via in esame TAB2, e la chinasi IKK $\epsilon$ .

In questo lavoro di ricerca, per la prima volta si riportano dati che indicano il coinvolgimento del fattore di trascrizione p65/RelA e della proteina TAB2 (*TAK1 binding protein 1*) nell'attivazione costitutiva della cascata NF- $\kappa$ B indotta dalla proteina virale Tax-2B. Si dimostra, infatti, l'associazione tra Tax-2B e i fattori p65/RelA e TAB2 in saggi di co-immunoprecipitazione in cellule umane e, mediante saggi di luciferasi, si evidenzia l'effetto cooperativo di p65/RelA e/o TAB2 nell'attivazione indotta da Tax-2 dell'espressione da un promotore NF- $\kappa$ B. Il riconoscimento Tax-2/p65 è stato dimostrato inoltre mediante saggi *in vitro* GST-pull-down. Si dimostra, inoltre, che il riconoscimento di Tax-2 avviene tramite il dominio di TAB2 presente nella regione N-terminale, il quale è necessario per la formazione di un complesso che attivi la cascata NF- $\kappa$ B. Alla luce dei dati qui presentati, si conferma la rilevanza delle interazioni delle proteine Tax con i fattori p65 o TAB2 nell'attivazione della via di segnalazione NF- $\kappa$ B.

Lo studio dell'interazione delle proteine Tax con fattori coinvolti nel *signaling* NF- $\kappa$ B, utilizzando la stessa metodologia, ha individuato una nuova interazione tra le proteine virali Tax-1 e Tax-2B e il fattore IKK $\epsilon$ , una chinasi che media la fosforilazione inducibile di p65/RelA e dell'inibitore citoplasmatico I $\kappa$ B $\alpha$ .

In considerazione del contributo delle modifiche post-traduzionali di Tax-1 nell'induzione della via NF- $\kappa$ B e nell'associazione con fattori cellulari, è stata testata, in co-immunoprecipitazione, l'abilità di mutanti di Tax-1 di riconoscere

p65, TAB2 o IKK $\epsilon$ . I risultati di questi esperimenti escludono un ruolo delle modifiche post-traduzionali di Tax-1 nel legame con questi fattori.

In conclusione, i dati prodotti in questi studi suggeriscono che Tax-1 e Tax-2B mostrano una capacità simile, ma non identica, di associare e attivare fattori del *pathway* NF- $\kappa$ B canonico, e che le differenze tra le due proteine virali nella capacità di deregolare le vie di trasduzione del segnale siano da attribuire, almeno parzialmente, alle diversità nell'interazioni con i fattori coinvolti nel *pathway* NF- $\kappa$ B non-canonico. Successivi studi di associazione con fattori cellulari specificamente coinvolti nella via NF- $\kappa$ B alternativa contribuiranno a chiarire questa ipotesi.



## **SUMMARY**

### **3 SUMMARY**

Human T-cell lymphotropic viruses type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) are related oncoviruses that have been associated with lymphoproliferative and neurodegenerative disorders. The transactivator Tax protein, encoded by the pX region of HTLV genome, is a key factor in cellular transformation. HTLV-1 Tax oncoprotein (Tax-1) reprograms G1 to S progression through multiple mechanistic ways as well as protein-protein binding, transcriptional induction/repression, and post-translational modifications. HTVL-2 Tax (Tax-2) shares more than 70% aa homology with Tax-1, however Tax-2 has a lower transforming activity than Tax-1. Based on this difference the structural and functional study of Tax proteins can be useful to understand the cellular mechanisms that more specifically take part in oncogenesis.

Tax-1 is a 40 KDa transactivator protein which regulates viral transcription by modulating the activity of cellular factors involved in several signal transduction pathways. Tax-1 activation of NF- $\kappa$ B signalling is critical for cellular transformation and while its interaction with NF- $\kappa$ B factors have been intensively investigated little is known about Tax-2 interaction with cellular proteins of this pathway.

The aim of this research is the comparison of Tax-2 and Tax-1 for the ability to activate NF- $\kappa$ B pathway. We studied Tax-2 interactions with factors of NF- $\kappa$ B signalling and the contribution of Tax-1 post-translational modifications in the protein-protein interaction. We chose three factors involved in the canonical NF- $\kappa$ B cascade: the transcription factor p65/RelA, the upstream signaling activator TAB2, and the IKK $\epsilon$  kinase.

In this research, we provide, for the first time, evidence of the involvement of the transcription factor p65/RelA and the protein TAB2 (TAK1 binding protein 1) in Tax-2B-mediated NF- $\kappa$ B activation. In fact, we demonstrate the association of Tax-2B with p65/RelA and TAB2 in co-immunoprecipitation assays in human cells and, by luciferase assays, we highlight the cooperative effect of p65 and/or TAB2 on Tax-2-mediated gene expression activation from NF- $\kappa$ B promoter. Tax-2/p65 recognition was also shown by *in vitro* GST-pull-down assays. We also demonstrate that TAB2 is interacting with Tax-2B through a domain that is necessary to form a complex that activates NF- $\kappa$ B cascade.

Further analysis of Tax interaction with cellular factors involved in the NF- $\kappa$ B signaling, using the same methodology, identifies a novel interaction between Tax-1 and Tax-2 and IKK $\epsilon$  factor, a kinase that mediates inducible phosphorylation of p65/RelA and I $\kappa$ B $\alpha$ .

Considering the contribution of Tax-1 post-translational modifications in NF- $\kappa$ B induction and in association with cellular factors, we tested the ability of specific Tax-1 mutants to recognize p65, TAB2 and IKK $\epsilon$  by co-immunoprecipitation experiments. The results of this analysis exclude a role of Tax-1 post-translational modifications in the association with these factors.

In conclusion, the results obtained in the present study, suggest that Tax-1 and Tax-2B share similar, though not identical, abilities to associate and activate factors of canonical NF- $\kappa$ B pathway. Although we cannot at present explain this diversity, it is tempting to speculate that the differences of the two viral proteins in deregulating signal transduction pathways might be partially attributed to their different capacities to interact with non-canonical NF- $\kappa$ B pathway factors.

Comparative studies of Tax-1 and Tax-2 association with cellular factors specifically involved in alternative NF- $\kappa$ B signaling will give new insight to clarify this hypothesis.

## **SCOPO**

## 4 SCOPO

Scopo della ricerca di questa tesi è lo studio comparativo dei transattivatori virali Tax-1 e Tax-2 nell'induzione costitutiva del *signaling* NF-κB. La via di trasduzione NF-κB è coinvolta nella modulazione delle risposte immunitarie, della progressione del ciclo cellulare, dello sviluppo embrionale e dell'apoptosi, e la sua attivazione costitutiva è associata alla tumorigenesi.

Per meglio comprendere i meccanismi patogenetici indotti da HTLV, abbiamo intrapreso lo studio delle interazioni delle proteine Tax con alcuni dei fattori chiave della via di segnalazione NF-κB e del contributo delle modificazioni post-traduzionali di Tax-1 nell'interazione proteica. I fattori cellulari analizzati sono stati: il fattore di trascrizione p65/RelA, un attivatore a monte della cascata (TAB2), e una chinasi responsabile della fosforilazione di p65/RelA (IKKε). È stato inoltre investigato l'effetto cooperativo delle proteine Tax e dei tre fattori selezionati del *signaling* NF-κB, nella transattivazione dell'espressione genica.

# **INTRODUZIONE**

## 5 INTRODUZIONE

### 5.1 Retrovirus

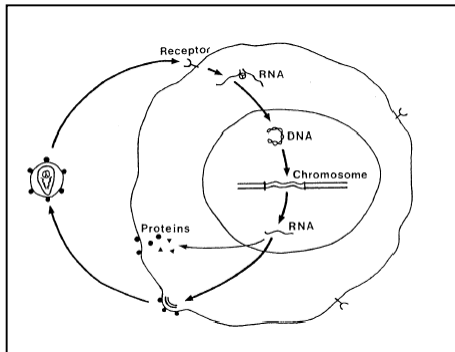
Il 15% dei tumori umani è associato ad un'infezione virale. I virus possono causare tumori con meccanismi diretti, cioè collegati alla presenza di proteine virali ad azione tumorale, oppure con meccanismi indiretti che provocano iperattività cellulare e la perdita del controllo immunitario favorendo l'insorgenza del tumore (Butel JS, 2000). I virus animali rappresentano modelli sperimentali utili alla comprensione dei meccanismi molecolari mediante i quali la piccola quantità di informazione genetica in essi contenuta è in grado di alterare la crescita cellulare trasformando una cellula normale in cellula neoplasica.

Quasi tutti i virus tumorali a RNA appartengono alla famiglia dei retrovirus. Sono virus provvisti di involucro pericapsidico e possiedono un genoma costituito da due molecole di RNA a singolo filamento con polarità positiva. Nelle cellule infettate, durante la replicazione, grazie all'enzima virale trascrittasi inversa, si forma una copia di DNA a doppio filamento che si integra come DNA provirale nel cromosoma della cellula ospite e il virus persiste sotto questa forma per tutta la durata della vita della cellula e nella sua progenie. L'espressione dei provirus produce trascritti che verranno impacchettati per diventare i genomi delle particelle virali, e mRNA che, tradotti, forniranno le proteine virali. In figura 1 è rappresentato il ciclo infettivo di un retrovirus.

Il genoma provirale porta il promotore e gli elementi *enhancer* necessari all'espressione genica in sequenze duplicate in ciascuna estremità del genoma, note come *Long Terminal Repeats* (LTR). Il genoma contiene i geni *gag*, *pol* ed *env*, che si susseguono dall'estremità 5' e codificano rispettivamente per proteine



strutturali del "core" virale, per proteine enzimatiche e per le proteine virus-specifiche del pericapside. In molti retrovirus, inoltre, possono essere presenti alcuni geni codificanti proteine "regolatrici" come *Tax* e *Rex* di HTLV (*Human T-cell Lymphotropic Virus*) e *Tat* e *Rev* di HIV (*Human Immunodeficiency Virus*).



**Figura 1:** Rappresentazione schematica del ciclo retrovirale (Weiss RA, 2001).

## 5.2 I virus umani leucemogeni delle cellule T

### 5.2.1 Epidemiologia

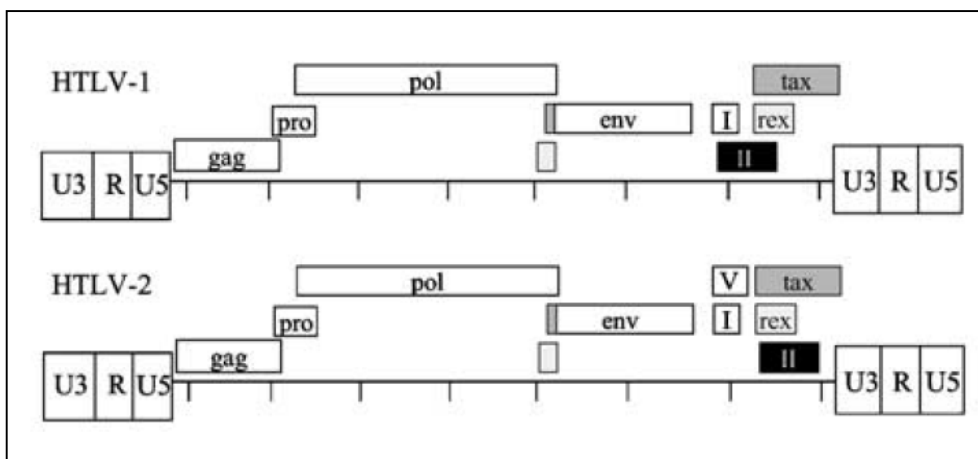
I virus umani leucemogeni di tipo 1 (HTLV-1) e di tipo 2 (HTLV-2) sono retrovirus oncogeni, appartenenti al genere dei Deltaretrovirus, strettamente correlati con un'omologia di sequenza nucleotidica del 70% (Feuer and Green, 2005). Malgrado mostrino un certo numero di proprietà biologiche e strutture comuni, hanno effetti patogenetici diversi: HTLV-1 è responsabile dell'eziologia della leucemia/linfoma delle cellule T dell'adulto (ATLL), del disordine neurologico cronico paraparesi spastica tropicale, nota anche come mielopatia associata ad HTLV-1 (TSP/HAM) (Matsuoka and Jeang 2007), e di alcune malattie infiammatorie croniche come la dermatite infettiva e l'uveite, mentre per HTLV-2 l'eziologia è imprecisata. Sono stati tuttavia riportati in letteratura casi di

mielopatia subacuta con manifestazioni simili a quelle di TSP/HAM associati ad HTLV-2 (Araujo and Hall, 2004).

Si stima che HTLV-1 abbia infettato 15-25 milioni di individui nel mondo, con un tasso di prevalenza maggiore dell'1% in Africa equatoriale, nei Caraibi, e nel sud del Giappone (Proietti et al., 2005). Nelle popolazioni native sia del Nord che del Sud America le infezioni di HTLV-1 e HTLV-2 sono endemiche. In Europa e in USA, HTLV è identificato prevalentemente nei gruppi ad alto rischio di infezione, come operatrici del sesso e tossicodipendenti che assumono droghe per via parenterale (IDU) (Vrieling and Reesink, 2004). Sono stati caratterizzati diversi sottotipi sia di HTLV-1 che di HTLV-2 e ciascun sottotipo è endemico in regioni specifiche. Il sottotipo "a" di HTLV-1 è cosmopolita, il "b", "d" ed "f" sono frequenti in Africa centrale, il "c" in Melanesia, e l'"e" in Africa centrale e settentrionale (Proietti et al., 2005). Il sottotipo "a" di HTLV-2 si ritrova in particolare negli IDU e negli afroamericani, mentre il "b" negli Amerindi (Proietti et al., 2005). Sia HTLV-1 che HTLV-2 infettano numerosi tipi cellulari, inclusi linfociti T, linfociti B, cellule endoteliali, cellule gliali e monociti (Hoffman et al., 1992; Koyanagi et al., 1993; Casoli et al., 1995), ma sono considerati principalmente linfotropici per cellule T perché associati a malattie linfoproliferative per cellule T *in vivo* e perché in grado di trasformare colture primarie di linfociti T (Yamamoto et al., 1982; Miyoshi et al., 1981). HTLV-1 infetta preferenzialmente linfociti T CD4<sup>+</sup> in leucemie asintomatiche e pazienti HAM/TSP, e cellule T CD8<sup>+</sup> in pazienti HAM/TSP, mentre HTLV-2 mostra un tropismo preferenziale per cellule CD8<sup>+</sup> (Feuer and Green, 2005).

### 5.2.2 Genoma

Sia HTLV-1 che HTLV-2 sono virus complessi (figura 2) il cui genoma di 9 Kbp, contiene, in aggiunta alle due LTR e ai geni *gag*, *protease*, *pol* ed *env*, una regione localizzata tra il gene *env* e la LTR alla estremità 3', detta pX (Feuer and Green, 2005). Questa regione include quattro ORF (*open reading frame*) parzialmente sovrapposte che codificano per proteine accessorie, coinvolte nell'infettività, nel mantenimento di alti carichi provirali, nell'attivazione cellulare e nella regolazione dell'espressione genica, e per le proteine regolatrici virali Rex e Tax (Albrecht and Lairmore, 2002; Nicot et al., 2005). Le proteine accessorie codificate da HTLV-1 sono p12<sup>I</sup> e p27<sup>I</sup> nella prima ORF, e p13<sup>II</sup> e p30<sup>II</sup> nella seconda; mentre quelle di HTLV-2 sono p10<sup>I</sup> (ORF I) e p28<sup>II</sup> (ORFII) e p11 (in una quinta ORF assente in HTLV-1) (Albrecht and Lairmore, 2002). Il filamento negativo di RNA di HTLV-1 esprime inoltre la proteina accessoria HBZ (*HTLV-1 basic leucine zipper*), assente in HTLV-2 (Mesnard et al., 2006).



**Figura 2:** Modello strutturale del genoma dei virus HTLV-1 e HTLV-2 (Feuer and Green, 2005).

La proteina p12<sup>I</sup> deregola numerosi *pathway* di trasduzione del segnale specifici nelle cellule T e contribuisce alla proliferazione cellulare, diffusione virale e/o persistenza. Infatti p12<sup>I</sup> causa una ridotta espressione sulla membrana plasmatica sia dei recettori per l'interleuchina 2 (IL-2), sia del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I), favorendo l'evasione dalla risposta immunitaria delle cellule infettate, e promuovendo l'attivazione delle cellule T (Albrecht and Lairmore, 2002).

La proteina p30<sup>II</sup> è un fattore di trascrizione che riduce l'espressione virale per impedire il riconoscimento immunitario durante le fasi di replicazione del virus e garantire così il mantenimento di alti carichi provirali *in vivo*. Attiva la trascrizione di geni cellulari coinvolti nell'attivazione delle cellule T e, grazie alla sua capacità di legare l'RNA, impedisce la traduzione degli mRNA di Tax e Rex trattenendoli nel nucleo (Nicot et al., 2005; Albrecht and Lairmore, 2002).

La proteina p13<sup>III</sup> favorisce la persistenza del virus, limitando il potenziale oncogenico di HTLV-1 e influenzando negativamente la proliferazione. Si localizza nella membrana interna dei mitocondri, modificandone la morfologia e la permeabilità selettiva (Ciminale et al., 1999; Nicot et al., 2005, D'Agostino et al., 2005).

La proteina HBZ, trascritta dal filamento negativo di HTLV-1, aumenta la capacità proliferativa delle cellule infettate da virus, e promuove la sopravvivenza cellulare. Infatti, il suo mRNA induce la proliferazione delle cellule T, mentre il prodotto proteico sopprime la trascrizione virale mediata da Tax (Arnold et al., 2008; Mesnard et al., 2006).

La proteina Rex è una proteina di legame all'RNA, essenziale per lo *splicing* e il controllo del trasporto nucleocitoplasmatico degli mRNA virali. La sua attività è fondamentale per la diffusione virale e la persistenza *in vivo* (Azran et al., 2004; Kashanchi and Brady, 2005).

Tra i geni codificati nella regione pX di HTLV, il gene per la proteina Tax, oggetto di questa tesi, è l'unico gene di HTLV necessario e sufficiente per immortalizzare linfociti T umani primari (Grassmann et al., 1989; Ross et al., 1996).

### **5.3 L'oncoproteina Tax**

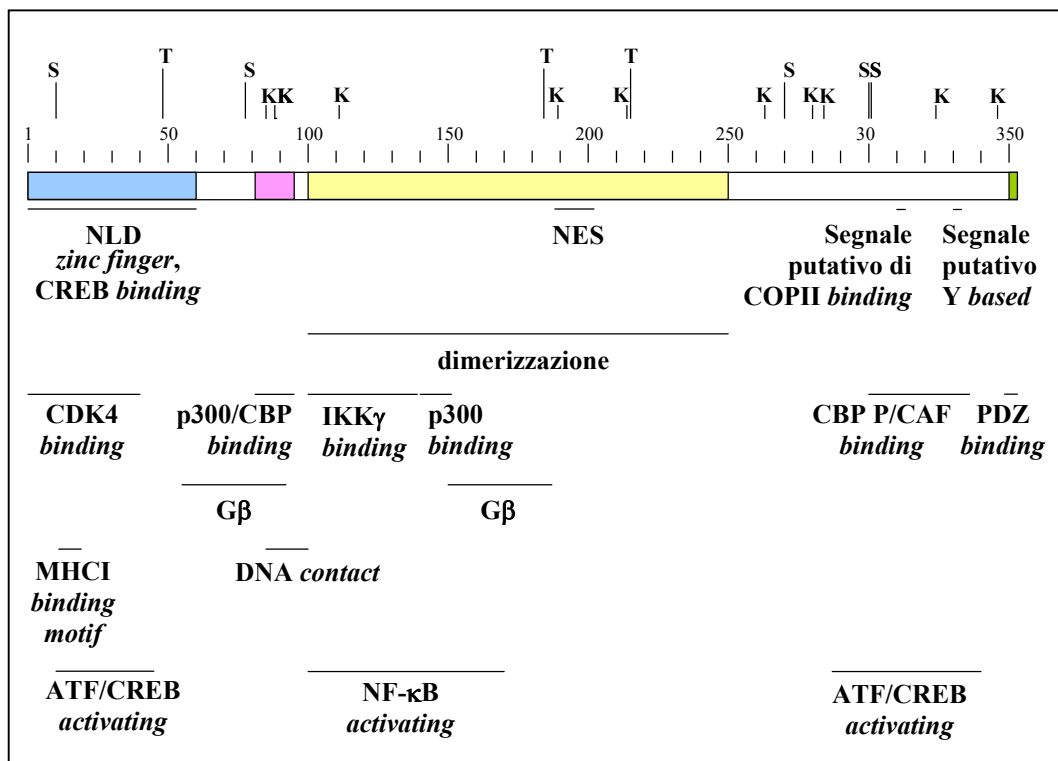
La proteina virale Tax altera la normale regolazione del ciclo cellulare e causa trasformazione, modulando il tasso di trascrizione di geni virali dalle LTR di HTLV e di geni cellulari coinvolti nella crescita e differenziamento cellulare, nel controllo del ciclo cellulare e nella riparazione del DNA (Azran et al., 2004; Jeang et al., 2004). Analisi mediante DNA-*microarray* evidenziano almeno 300 geni cellulari alterati nell'espressione per effetto di Tax (Jeang et al., 2004). Alcuni di questi sono direttamente coinvolti nell'attivazione della proliferazione delle cellule T come le interleuchine 2 e 15 e i rispettivi recettori (Azran et al., 2004). Tax attiva inoltre le cicline D1, D2, D3 e le chinasi dipendenti da cicline CDK4 e CDK6, coinvolte nella progressione del ciclo cellulare, mentre inattiva gli inibitori di queste chinasi (Grassmann et al., 2005; Boxus et al., 2008). Deregola, inoltre, la progressione della mitosi inducendo la formazione di fusioni aberranti *end-to-end* dei cromosomi e la degradazione delle estremità dei cromosomi tramite repressione dell'espressione delle telomerasi umane, alterando i meccanismi di

segregazione cromosomica e dando origine a fenomeni di aneuploidia (Jeang et al., 2004; Grassmann et al., 2005; Boxus et al., 2008).

### **5.3.1 Domini funzionali della proteina Tax**

L'oncoproteina Tax di HTLV-1 (Tax-1) è una fosfoproteina nucleocitoplasmatica di 353 aminoacidi, strutturalmente organizzata in domini multipli di legame che le permettono di interagire con un ampio spettro di fattori cellulari. La regione N-terminale di Tax-1 contiene un determinante di localizzazione nucleare (NLD), un motivo *zinc-fingers*, e domini di legame per subunità proteasomiche, coattivatori trascrizionali, proteine coinvolte nella trascrizione, nella progressione del ciclo cellulare, e nella trasduzione del segnale (Smith and Green, 1992; Semmens and Jeang, 1992; Rousset et al., 1996; Goren et al., 1995; Haller et al., 2002; Boxus et al., 2008). Nella regione centrale sono presenti una sequenza di esporto nucleare (NES), due motivi *leucine zipper-like*, domini di dimerizzazione, e domini di legame con proteine coinvolte nella metilazione istonica, progressione del ciclo cellulare, e trasduzione del segnale. La regione centrale Tax-1 è coinvolta nell'attivazione del pathway di segnalazione cellulare NF- $\kappa$ B (Alefantis et al., 2003; Jin et al., 1999; Xiao et al., 2000; Jeong et al., 2006; Twizere et al., 2007; Boxus et al., 2008). Infine, la regione C-terminale di Tax-1 contiene un motivo PBM (*PDZ binding motif*) che riconosce le proteine che possiedono il dominio PDZ (*PSD-95/Drosophila Discs Large/ Zona Occludens-1*) e domini di transattivazione, di secrezione e di legame per proteine coinvolte nella trascrizione, progressione del ciclo cellulare, e trasduzione del segnale (Rousset et al., 1998; Semmens and Jeang, 1995; Alefantis et al., 2005; Harrod et al., 2000; Boxus et al., 2008).

La proteina Tax-1 è soggetta a modificazioni post-traduzionali, quali la fosforilazione in specifici residui di treonina e serina, l'ubiquitinazione e la sumoilazione nelle dieci lisine presenti nella sequenza e l'acetilazione nel residuo di lisina in posizione 346. Queste modificazioni post-traduzionali ne influenzano la capacità di legame con fattori cellulari (NEMO/IKK $\gamma$ , *NF- $\kappa$ B essential modulator/IKK $\gamma$* ) e l'abilità transattivante (Bex et al., 1999; Durkin et al., 2006; Chiari et al., 2004; Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006; Kfoury et al., 2007, Lodewick et al., 2009). In figura 3 è mostrata uno schema dei domini della proteina Tax-1 e dei residui che sono soggetti a fosforilazione, ubiquitinazione e sumoilazione.



**Figura 3:** Rappresentazione schematica dei domini funzionali noti e dei residui soggetti a modificazioni post-traduzionali della proteina Tax-1.

I due maggiori sottotipi isolati di HTLV-2, 2A e 2B, esprimono proteine Tax di composizione aminoacidica diversa: Tax-2A è una proteina di 331 aa, mentre Tax-2B, di 356 aa, ha un'estensione di 25 aminoacidi al C-terminale (Pardi et al., 1993; Lewis et al., 2000). Tax-1 mostra più del 75% di omologia con la proteina Tax-2B (figura 4). Le differenze tra la sequenza Tax-1 e le sequenze dei sottotipi di Tax-2 (2A e 2B), sono per lo più a livello della regione C-terminale in quanto Tax-2 è priva del motivo PBM. La maggior parte delle informazioni sulla struttura di Tax-2 deriva da studi comparativi con Tax-1 i quali dimostrano che Tax-2 presenta un'organizzazione dei domini simile a quella di Tax-1 ed è soggetta a modificazioni post-traduzionali quali ubiquitinazione e sumoilazione (Ross et al., 1997; Lewis et al., 2002; Meertens et al., 2004; Turci et al., 2006; Turci et al., 2009).

TAX-I	AHFPFGQSLFFGYPVYVFGDCVQGDWCPISSGGLCSARLHRHALLATCPEHQITWDPIDG	60
TAX-II	AHFPFGQSLLYGYPVYVFGDCVQADWC PVS GGLCSTRLHRHALLATCPEHQLTWDPIDG	60
	*****:*****.***:*****:*****:*****	
TAX-I	RVIGSALQFLIPRLPSFPTQRTSKTLKVLTPPIHTHTPNIPPSFLQAVRKYS PFRNGYME	120
TAX-II	RVVSSPLQYLIPRLPSFPTQRTAKTLKVLTPPTPVSPKVPPAFFQSMRKHTPYRNGCLE	120
	**:.*.**:*****:***** * .:*.**:**:*:*:*:*:*:*:*:	
TAX-I	PTLGQHLPTLSFPDPGLRPQNLTYTLWGGSVVCMYLYQLSPPIWPLLPHVVFCHPQQLGA	180
TAX-II	PTLGDQLPSLAFPEPGLRPQNIYTTWGKTVVC LYLFQLSPMTWPLIPHVIFCHPQQLGA	180
	****:*.**:**:*:*:*:*:*:*:*:* ** :***:***:*****:****:***:**** ****	
TAX-I	FLTNVPYKR IEELLYKISLTTGALII LPEDCLPTTLFQPVRAPVTLTAWQHGLLPFHSTL	240
TAX-II	FLTKVPLKRLEELLYKMFLHTGAVIVLPEDDLP TTMFQPVRAPCIQTAWCTGLLPYHSIL	240
	***:** **:*:*:*:*:*:*:* * ***:*.**:**** *****:***** *** *****:** *	
TAX-I	TTPGLIWFIDGTPMISGPCPKDGQPSLVLQSSSFIFHKFQTKAYHPSFLLSHGLIQYSS	300
TAX-II	TTPGLIWFNDGSPMISGPCPKAGQPSLVVQSSLLIFEKFQTKAFHPSYLLSHGLIQYSS	300
	*****.**:***** *****:*** :**.******:***:**** *****	
TAX-I	FHNLHLLFEEYTNIPISLLFMEKEADDNDHEPQISPGELEPPSEKHFRETEV----	352
TAX-II	FHNLHLLFDEYTNIPVSILFNKGEADDNGDQPPEPAAQGES-STQKVRPSHTMNPK	355
	*****:*****:*.***: *****..:* ...:*. * :*:.* :..	

**Figura 4:** Allineamento tra le proteine Tax-1 e Tax-2B. L'allineamento è stato fatto con il programma CLUSTALW. Gli asterischi indicano identità aminoacidica, i due punti una sostituzione conservata, il punto singolo una sostituzione semiconservata.



Malgrado le regioni funzionali note siano conservate, Tax-1 e Tax-2 mostrano delle diversità fenotipiche rilevanti: a differenza di Tax-1, Tax-2 non induce la formazione di micronuclei (Semmens et al., 1996) e l'arresto del ciclo cellulare in cellule umane CD34<sup>+</sup> (Tripp et al., 2005), inibisce in misura minore l'attività trascrizionale del soppressore tumorale p53 (Mahieux et al., 2000), e la sua capacità trasformante è meno efficiente (Endo et al., 2002). Queste diversità rendono lo studio strutturale e funzionale di Tax-2 estremamente promettente per la comprensione dei meccanismi cellulari che più specificamente intervengono nell'oncogenesi.

### **5.3.2 Tax e la modulazione della trascrizione.**

L'attivazione dell'espressione di specifici geni cellulari da parte di Tax è un punto critico nell'induzione di malattia da parte di HTLV. Tax è coinvolta in almeno quattro vie di segnalazione: a) CREB/ATF, via di segnalazione degli elementi di risposta all'AMP ciclico e fattori attivanti la trascrizione; b) NF- $\kappa$ B, via del fattore nucleare- $\kappa$ B; c) SRF, via dei fattori di risposta al siero; d) JAK, via delle chinasi della famiglia Janus (Jeang et al., 2004).

L'attività trasformante di Tax è correlata alla deregolazione di questi processi comuni di attivazione trascrizionale. E' dimostrato, infatti, che la trasformazione di linfociti T periferici del sangue da parte di Tax richiede sia il *pathway* ATF/CREB sia il *pathway* NF- $\kappa$ B (Sun and Yamaoka, 2005; Ross et al., 2000). Nel *pathway* ATF/CREB dipendente, Tax induce la formazione di un complesso composto dal fattore che lega gli elementi di risposta al cAMP (CREB), la proteina che lega CREB (CBP), e la Tax stessa sul promotore virale (Kashanchi

and Brady, 2005). Infatti, nella LTR di HTLV si trovano tre elementi conservati e ripetuti di 21 pb chiamati elementi di risposta a Tax (TxRE), che contengono un dominio centrale omologo all'elemento di risposta all'AMP ciclico (CRE) (Brady et al., 1987; Jeang et al., 1988). Analogamente, Tax induce la formazione di questo complesso sui promotori dei geni cellulari che contengono elementi omologhi ai propri TxRE. Tax-1 interagisce *in vitro* e *in vivo* con numerosi membri della famiglia CREB/ATF, ne favorisce la dimerizzazione e aumenta la loro affinità per le CRE virali, promuovendo così la formazione di complessi Tax-1/CREB/ATF-TxRE. Tax-1 associa anche con ATFx, un fattore che reprime l'attivazione delle LTR. E' così in grado di interagire con fattori che modulano positivamente o negativamente l'attività diretta dal promotore LTR (Franklin et al., 1993; Yin and Gaynor, 1996; Boxus et al., 2008).

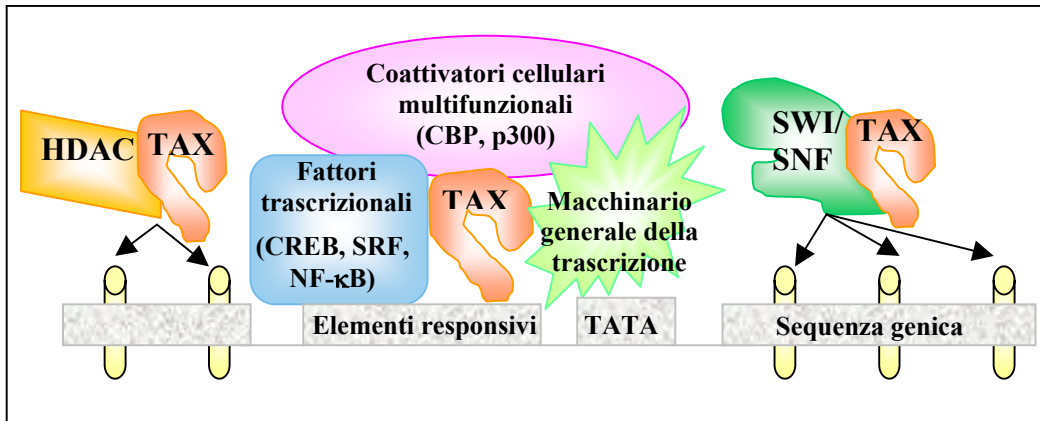
Oltre la via CREB, Tax attiva costitutivamente il *pathway* dei fattori nucleari  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) coinvolti nella regolazione dello sviluppo embrionale, delle risposte immunitarie, della crescita cellulare, dell'apoptosi e dell'oncogenesi (Sun and Yamaoka, 2005). Le interazioni di Tax con i fattori di questa via di segnalazione saranno descritti nel prossimo paragrafo.

L'attivazione trascrizionale è favorita da Tax-1 anche tramite legami con i fattori basali di trascrizione quali il fattore di trascrizione II A, la proteina di legame alla sequenza TATAA e il fattore II associato a TBP, mentre il proseguimento della trascrizione da parte dell'RNA polimerasi II, è assicurato da Tax-1 tramite reclutamento del fattore positivo "b" di allungamento della trascrizione al promotore virale (Caron et al., 1993; Clemens et al., 1996; Cho et al., 2007).

Tax-1, inoltre, facilita l'accesso al DNA dei fattori di trascrizione tramite associazione con complessi proteici responsabili del rimodellamento cromatinico che permettono il passaggio dall'eterocromatina all'eucromatina e viceversa. E' stata dimostrata, infatti, l'interazione di Tax-1 con fattori responsabili della metilazione ed acetilazione degli istoni (Kamoi et al., 2006; Jeong et al., 2006; Ego et al., 2002). Inoltre, Tax-1 facilita lo scorrimento del DNA sui nucleosomi durante la trascrizione mediante l'interazione con la DNA topoisomerasi I e con differenti componenti del complesso ATP dipendente in grado di cambiare la struttura dei nucleosoma SWI/SNF (*Switch/Sucrose Non Fermentable*) (Wu et al., 2004; Suzuki et al., 2000).

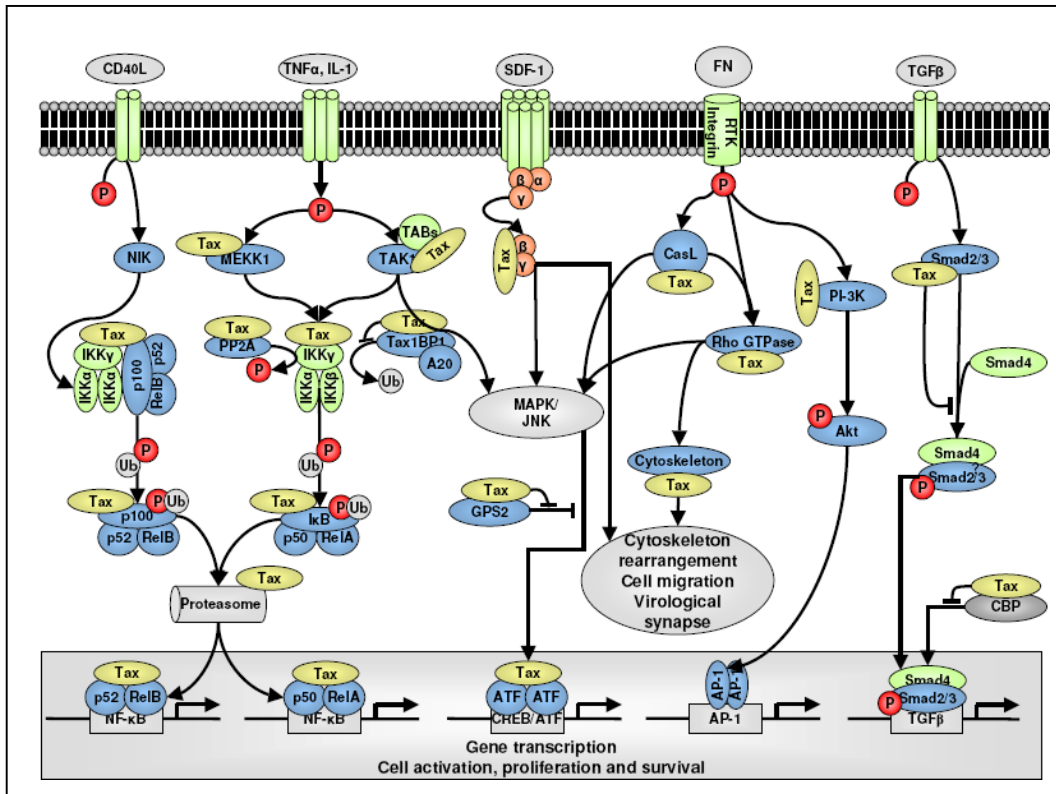
L'espressione genica è, inoltre, regolata da Tax-1 a livello post-trascrizionale e traduzionale tramite interazioni proteina-proteina. E' stata dimostrata infatti l'associazione di Tax-1 con la tristetrapolina, un elemento che trattiene gli mRNA contenenti elementi ricchi di adenina e uridina, in regioni citoplasmatiche discrete coinvolte nella traduzione (Twizere et al., 2003).

Alla luce di quanto sin qui riportato si può definire Tax-1 un fattore trascrizionale pleiotropico che deregola l'espressione di più di un centinaio di geni attraverso l'interazione con attivatori trascrizionali, fattori di trascrizione basali, proteine coinvolte nel rimodellamento cromatinico, e proteine coinvolte nel controllo post-trascrizionale dell'mRNA (Figura 5).



**Figura 5. Modello della transattivazione mediata da Tax.** Tax promuove il rimodellamento della cromatina interagendo con le HDAC. Tax-1, mediante interazioni, recluta sul promotore fattori trascrizionali (CREB, NF-κB), fattori di trascrizione basali, e coattivatori trascrizionali (p300, CBP). Infine, Tax-1, facilita lo scorrimento dell'RNA polimerasi II sul DNA interagendo con SWI/SNF.

La capacità di Tax-1 di influenzare i principali ed essenziali processi cellulari come l'attivazione cellulare, la proliferazione, il riarrangiamento citochelettrico, la migrazione cellulare e la formazione della sinapsi virologica coinvolge oltre le vie di segnalazione CREB e NF-κB, altre vie fondamentali della trasduzione cellulare comprese le vie *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), *Transforming growth factor β* (TGFβ), e *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K). In figura 6 è rappresentata una panoramica delle vie di segnalazione deregolate da Tax-1 (Hall and Fujii, 2005; Boxus et al., 2008).



**Figura 6:** Panoramica dei fattori cellulari coinvolti nel *signaling* cellulare targati da Tax-1. Tax interagisce con le componenti di numerosi *pathway* cellulari (MAPK JNK, NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB, TGF- $\beta$ ) e promuove l'attivazione cellulare, la proliferazione, il riarrangiamento del citoscheletro, la migrazione e la formazione di sinapsi virologiche (Boxus et al., 2008).

### 5.3.3 Tax e la via di segnalazione NF- $\kappa$ B

La via di segnalazione NF- $\kappa$ B è attivata da una vasta gamma di stimoli come citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , interleuchina-1 $\beta$ , ligando CD40), agenti che danneggiano il DNA, recettori della famiglia Toll-like (TLR), esposizione a lipopolisaccaridi o agenti virali (HTLV, EBV). La sua induzione costitutiva spesso risulta nella carcinogenesi. L'attivazione della via NF- $\kappa$ B comporta una cascata di fosforilazioni che risulta nella degradazione di inibitori I $\kappa$ B, proteine che trattengono nel citoplasma dimeri di fattori di trascrizione della famiglia NF-

$\kappa$ B, permettendo così la migrazione nel nucleo di questi ultimi. Nei mammiferi, la famiglia NF- $\kappa$ B è composta da cinque elementi strutturalmente correlati: p65/RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52/p100). Formano diversi complessi dimerici che transattivano o reprimono l'espressione dei geni *target* che portano elementi  $\kappa$ B nel proprio promotore. Ci sono due vie di trasduzione del segnale NF- $\kappa$ B: il *pathway* NF- $\kappa$ B canonico, che risulta principalmente nella formazione di dimeri p50/p65, e quello non canonico, in cui il precursore p100 è degradato in p52 da cui si formano dimeri p52/RelB. I complessi attivati p50/p65 e p52/RelB regolano la trascrizione di differenti geni coinvolti nell'immunità innata o adattativa, nella proliferazione e sopravvivenza cellulare (Xiao et al., 2006).

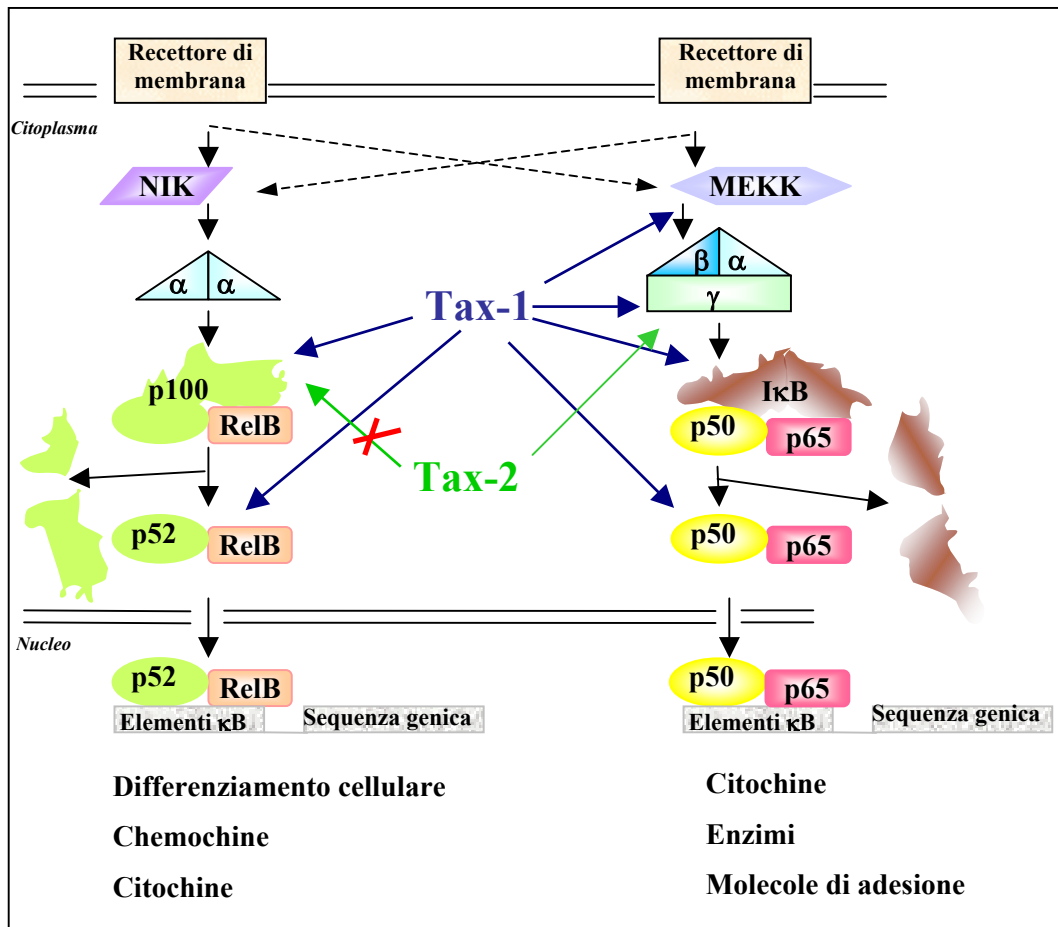
Per la trasformazione indotta da Tax di linee cellulari T è essenziale l'attivazione costitutiva del *pathway* NF- $\kappa$ B (Sun and Yamaoka, 2005). E' dimostrato, infatti, che mutanti di HTLV-1 e HTLV-2 nulli per l'attivazione NF- $\kappa$ B, non immortalizzano cellule T umane primarie (Robek and Ratner, 1999; Ross et al., 2000). Tax-1 stimola e attiva costitutivamente entrambe le vie NF- $\kappa$ B in cellule infettate da HTLV-1. Nel *pathway* canonico, Tax-1 guida la proteolisi di I $\kappa$ B, legando gli inibitori stessi, due subunità proteasomiche (HsN3 e HC9) e chinasi che ne inducono la degradazione, come le chinasi attivate da mitogeno *MAPK/ERK kinase kinase 1* e *TGF- $\beta$  activating kinase 1* (MEKK1 e TAK1, rispettivamente), e le subunità del complesso chinasi IKK (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$ /NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*)) (Rousset et al., 1996; Yin et al., 1998; Harhaj and Sun, 1999; Jin et al., 1999). Nella via non canonica Tax-1, tramite associazione con IKK $\gamma$  e p100, induce il processamento di p100 e la traslocazione

nucleare dei dimeri p52/RelB (Higuchi et al., 2007). Tax-1 promuove, inoltre, l'attivazione del fattore IKK $\gamma$ , favorendone la fosforilazione, mediante formazione di complessi con la subunità IKK $\gamma$  e la proteina fosfatasi 2 A (PP2A), e l'ubiquitinazione (Hong et al., 2007; Shembade et al., 2008).

Nel nucleo, Tax-1 associa con RelA, c-Rel, p50 e p52, aumentandone la dimerizzazione, favorendo il legame ai promotori target, reclutando i coattivatori trascrizionali CBP/p300 e P/CAF e promuovendo così l'espressione genica (Suzuki et al., 1993; Suzuki et al., 1994; Murakami et al., 1995; Bex et al., 1997). Malgrado i numerosi studi che dimostrano le interazioni di Tax-1 con i fattori NF- $\kappa$ B, il meccanismo di attivazione di NF- $\kappa$ B da parte di Tax-1 rimane ancora da chiarire.

Quasi del tutto sconosciute sono le interazioni della proteina Tax-2 con fattori della cascata NF- $\kappa$ B; in letteratura è stato riportato il legame con la subunità IKK $\gamma$  e l'assenza di associazione con il fattore p100 (Meertens et al., 2004, Higuchi et al., 2007).

In figura 7, sono schematizzate le interazioni note delle proteine Tax con i principali fattori del *pathway* canonico e non canonico di NF- $\kappa$ B.



**Figura 7. Interazioni delle proteine Tax con il pathway NF-κB.** A destra è rappresentato il pathway NF-κB canonico. La sua attivazione comporta una cascata di fosforilazioni che coinvolgono la chinasi attivata da mitogeno MEKK e il complesso chinasi IKK (schematizzato con le subunità α, β, γ). Gli inibitori citoplasmatici (IκB) fosforilati vengono degradati, e i dimeri delle subunità NF-κB (principalmente p50/p65) migrano nel nucleo dove promuovono l'espressione di citochine e molecole di adesione. A sinistra è schematizzata la via non canonica. In seguito a stimolazione cellulare, si attivano la chinasi che induce NF-κB (NIK) e la subunità α del complesso IKK (α). Il dominio C-terminale della subunità p100 è degradato e i dimeri p52/RelB formatosi traslocano nel nucleo dove attivano la trascrizione di geni preposti al differenziamento cellulare e produzione di chemochine e citochine. Le interazioni di Tax-1 con i fattori dei pathway NF-κB sono schematizzate dalle frecce blu, mentre quelle di Tax-2 dalle frecce verdi.

### 5.3.4 Interazioni di Tax e fattori cellulari

Come descritto nei paragrafi precedenti, Tax-1 è in grado di interferire con l'espressione genica e le vie di trasduzione del segnale grazie a interazioni con numerose proteine cellulari, molte delle quali sono elencate nella Tabella 1. Lo



studio dell'interattoma di Tax è un utile strumento per la comprensione delle basi molecolari che portano alla patogenesi e persistenza virale nonché alla tumorigenesi.

I dati disponibili in letteratura sulle interazioni della proteina Tax-2 si riferiscono a recenti pubblicazioni, le quali dimostrano che Tax-2, come la sua proteina omologa Tax-1, associa con i coattivatori trascrizionali CBP e p300 (Meertens et al., 2004), la subunità  $\beta$  delle proteine eterotrimeriche G (Twizere et al., 2007), il regolatore principale della trascrizione dei geni del complesso maggiore di istocompatibilità di classi II (CIITA) (Orlandi et al., 2008), il fattore di trascrizione Y (NF-Y) (Orlandi et al., 2008), e con i fattori coinvolti nel *signaling* NF- $\kappa$ B: IKK $\gamma$ /NEMO (Meertens et al., 2004) e Optineurina (Joumo et al., 2008).

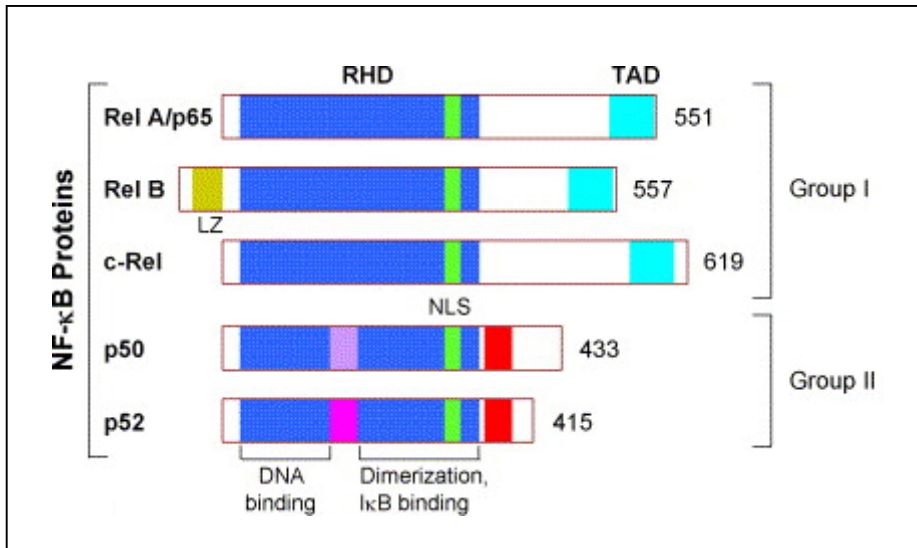
Considerata la rilevanza nei meccanismi di regolazione dell'espressione genica dell'interazione delle proteine Tax con fattori della via di segnalazione NF- $\kappa$ B, in questo lavoro di ricerca si è voluto analizzare l'interazione delle proteine Tax-1 e Tax-2 con tre fattori chiave della via di segnalazione NF- $\kappa$ B: il fattore di trascrizione p65/RelA, TAB2, un attivatore a monte della via in esame, e IKK $\epsilon$ , una chinasi responsabile della fosforilazione di p65/RelA.

<b>Interazioni di Tax-1 con fattori cellulari</b>	
<b>Categorie funzionali</b>	<b>Fattori cellulari</b>
<b>Controllo della trascrizione e traduzione</b>	CREB, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ATF <sub>x</sub> , XBP1 p65, p50, p52, c-Rel NF- $\kappa$ B SRF TORC1, TORC2, TORC3 P/CAF, p300, CBP, HDAC1 CARM1, SUV39H, JNMJD2A TBP, TFIIA Ciclina T DNA topoisomerasi I MsX2 Sc35 Sp1 TTP
<b>Signaling cellulare</b>	IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , p100, p105 MEKK1, TAK1 PP2A TAB2 RhoA, Rac Ubc13 GAP1m Tax1BP1 Smad2, Smad3, Smad4 GPS2
<b>Controllo del ciclo cellulare e riparazione del DNA</b>	CDC20 CDK4, CDK6 Chk1, Chk2 Ciclina D1, D2, D3 Mad1 p15 <sup>INK4B</sup> , p16 <sup>INK4A</sup> RANBP1 RB TAX1BP2 Topoisomerasi I
<b>Proteine citoscheletriche</b>	Actina, Annexina, Gelsolina, $\alpha$ -internexina, $\gamma$ -tubulina
<b>Trasporto intracellulare</b>	Calreticulina CRM1 p62 COPII RanBP2 SCAMP1, SCAMP2 SNAP23
<b>Proteine con domini PDZ</b>	MAGI3, Pro-IL16, hDLG, hSCRIB

**Tabella 1:** elenco non completo dei fattori cellulari che legano Tax-1

#### 5.4 Il fattore di trascrizione nucleare p65/RelA

Il fattore di trascrizione p65/RelA possiede, come le altre subunità della famiglia NF- $\kappa$ B (RelB, c-Rel, p50 e p52), un dominio N-terminale di 300 residui conservato definito *Rel homology domain* (RHD), responsabile del legame al DNA, della dimerizzazione e della traslocazione nucleare. Le subunità p65, RelB e c-Rel contengono domini di attivazione della trascrizione alle loro estremità C-terminali e vengono sintetizzate direttamente in una forma matura; mentre le proteine p50 e p52 vengono prodotte come precursori più grandi, p105 e p100 rispettivamente, e possiedono domini caratteristici degli inibitori citoplasmatici I $\kappa$ B nella porzione C-terminale (figura 8). Sia p105 che p100 sono inibitori citoplasmatici delle subunità NF- $\kappa$ B e la degradazione delle loro estremità C-terminali agisce come meccanismo alternativo dell'attivazione NF- $\kappa$ B. Le forme mature p50 e p52, prive del dominio di transattivazione, possono reprimere o indurre l'espressione genica qualora omodimerizzino o formino dimeri con p65, RelB o c-Rel. L'attivazione del *pathway* canonico risulta principalmente nella formazione di dimeri p50/p65 (Xiao et al., 2006). Il fattore p65 viene fosforilato da numerose chinasi tra cui IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\epsilon$  sia nel nucleo che nel citoplasma. La sua fosforilazione regola la capacità di legame al DNA, la dimerizzazione, l'affinità con gli inibitori citoplasmatici e il reclutamento delle istone acetiltransferasi sui promotori (Viatour et al., 2005).



**Figura 8: Rappresentazione schematica delle proteine NF-κB.** Le proteine NF-κB sono classificate in base al meccanismo di sintesi e la struttura del dominio C-terminale. Le abbreviazioni usate sono: RHD, *Rel homology domain*, TAD, *transactivation domain*, NLS, sequenza di localizzazione nucleare, LZ, *leucine zipper* (Xiao et al., 2006).

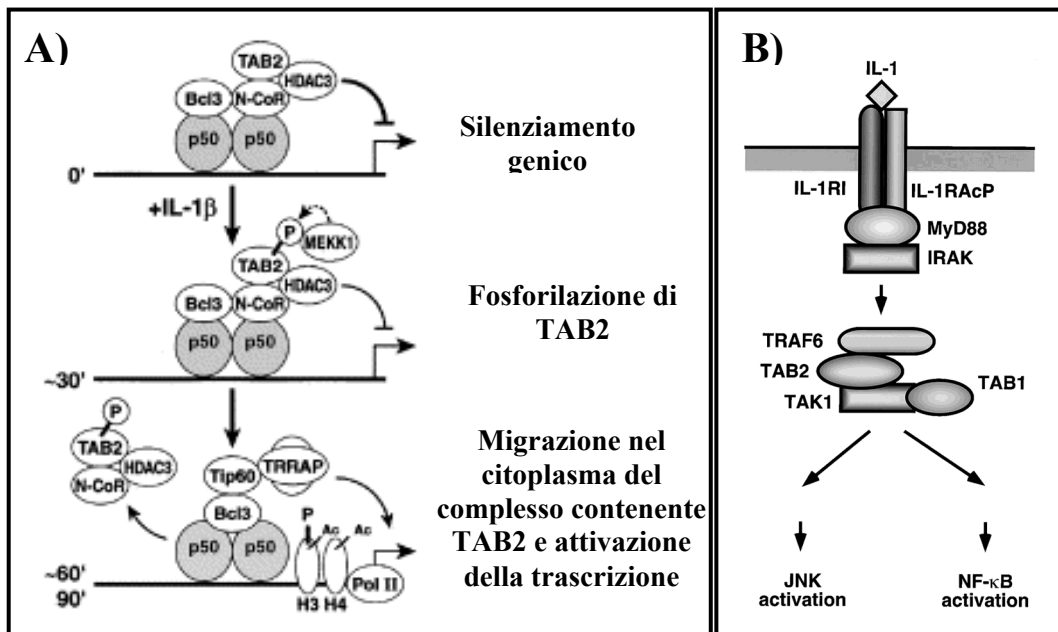
Il fattore p65 ha un ruolo determinante nella deregolazione, indotta da Tax, della via NF-κB. E' stato dimostrato, infatti, il legame e la colocalizzazione nel nucleo, in strutture trascrizionalmente attive, di Tax-1 con il fattore p65 e l'azione sinergica delle due proteine nel promuovere la trascrizione (Suzuki et al., 1994; Bex et al., 1998; Nasr et al., 2006). Recentemente è stato dimostrato che Tax-1 inibisce la funzione del soppressore tumorale p53, inducendo associazione tra il dominio C-terminale di p65 e il fattore p53. Il complesso p65-p53 associa a promotori cellulari che vengono repressi (Jeong et al., 2004).

Per quanto riguarda Tax-2, recentemente è stata dimostrata la colocalizzazione con p65/RelA in strutture nucleari in una maniera simile a quella dimostrata per Tax-1 (Turci et al., 2009).

## 5.5 La proteina adattatrice TAB2

La proteina TAB2 (*TAK1 activating binding protein 2*) è un fattore nucleocitoplasmatico di 693 aminoacidi che possiede un dominio CUE (*coupling ubiquitin conjugation to ER degradation*) nella porzione N-terminale, e, nell'estremità C-terminale, una struttura *coiled-coil* e una sequenza di esporto nucleare (NES) (Kishida et al., 2005; Takaesu et al., 2000; Baek et al., 2002). Nel nucleo, TAB2 associa con la istone deacetilasi 3 (HDAC3) e il co-repressore nucleare recettoriale N-CoR su promotori contenenti elementi  $\kappa$ B che legano omodimeri di p50 trascrizionalmente inattivi (Baek et al., 2002). In seguito a stimolazione con interleuchina 1 $\beta$ , TAB2 viene fosforilato inducendo il trasporto nel citoplasma del complesso TAB2/HDAC3/N-CoR (Baek et al., 2002) (figura 9 A). Nel citoplasma, TAB2 promuove l'attivazione del complesso chinasi IKK, mediante associazione con la chinasi TAK1 e TRAF6 (fattore associato al recettore TNF) (Kishida et al., 2005; Takaesu et al., 2000) (figura 9 B). Grazie alla sua attività nucleare e citoplasmatica TAB2 attiva l'espressione dei geni sotto controllo sia degli omodimeri p50, sia dei dimeri p50/p65. Recentemente, è stato dimostrato che l'associazione di TAB2 con il fattore coinvolto nella comunicazione intercellulare e nel controllo del differenziamento *Numb homolog (Drosophila)-like* (NUMBL), inibisce il legame TAB2-TRAF6 con conseguente soppressione della cascata NF- $\kappa$ B (Ma et al., 2008). TAB2 è quindi un fattore che contribuisce sia all'attivazione sia alla repressione della via NF- $\kappa$ B.

In cellule infettate da HTLV-1 è aumentata l'espressione di TAB2 (Suzuki et al., 2007). E' stato dimostrato che Tax-1 interagisce con TAB2, e le due proteine sinergisticamente attivano la chinasi TAK1 del *pathway* NF- $\kappa$ B (Yu et al., 2008).

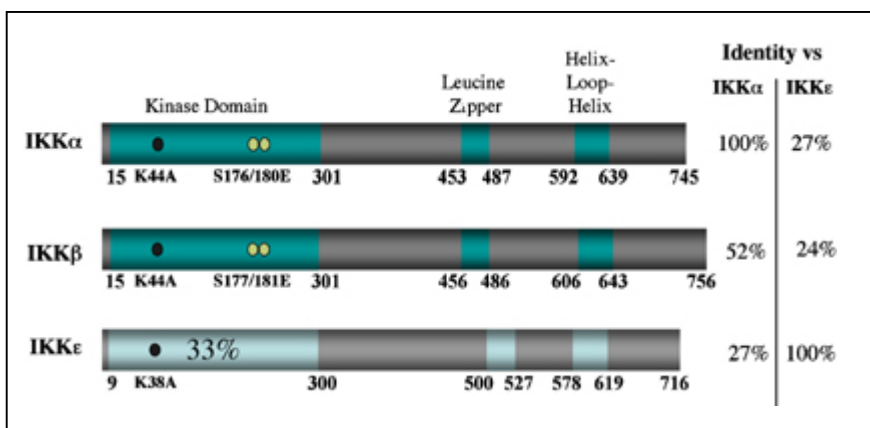


**Figura 9:** (A) Rappresentazione schematica della dinamica della presenza dei fattori p50, N-CoR/TAB2/HDAC3 su un promotore che possiede elementi  $\kappa$ B (Baek et al., 2002). (B) Modello di come TAB2 partecipi al *signaling* IL-1. TAB2 connette TAK1 e TRAF6 e promuove l'attivazione di JNK e NF- $\kappa$ B (Takaesu et al., 2000).

## 5.6 La chinasi IKK $\epsilon$

Il terzo fattore preso in esame in questo studio è la chinasi IKK $\epsilon$ . E' coinvolta nella regolazione di numerose vie di trasduzione del segnale come i *pathway* dei recettori *Toll-like* (TLR), dei fattori di risposta all'interferone (IRF), JNK, PI3K e STAT oltre che nell'attivazione di NF- $\kappa$ B mediata da TRAF2 (Shimada et al., 1999; Maniatis et al., 2001; Nomura et al., 2000; Clément et al., 2008). La sua espressione è relegata a cellule del sistema immunitario (Peters and Maniatis, 2001) anche se inducibile in cellule non ematopoietiche in seguito a stimolazione con fattori di necrosi tumorali, lipopolisaccaridi, ed infezione virale (Shimada et al., 1999; Peters et al., 2000). IKK $\epsilon$  presenta un'omologia in sequenza

aminoacidica del 64% con le subunità IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  del complesso IKK (Shimada et al., 1999; Peters et al., 2000). L'organizzazione dei domini di IKK $\epsilon$  è simile a quella delle chinasi canoniche IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ : nell'estremità N-terminale vi è un dominio chinasi, nella parte centrale un *leucine zipper*, e al C-terminale un dominio *helix-loop-helix* coinvolto nelle interazioni proteina-proteina (Figura 10) (Shimada et al., 1999; Peters and Maniatis, 2001). IKK $\epsilon$  media l'induzione NF- $\kappa$ B fosforilando l'inibitore I $\kappa$ B $\alpha$ , inducendone la degradazione, e le subunità NF- $\kappa$ B, come p65, modulandone la localizzazione intracellulare e la capacità transattivante (Shimada et al., 1999; Peters et al., 2000; Mattioli et al., 2006).



**Figura 10:** Confronto tra le chinasi appartenenti alla famiglia IKK: le chinasi sono classificate in due sottogruppi in base all'omologia di sequenza e la specificità di substrato. Sono indicati i domini principali. Le chinasi classiche (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) presentano un'omologia di 52% l'un l'altra. L'omologia tra le chinasi classiche e IKK $\epsilon$  è limitata al 27% circa (Hiscott et al., 2006).

Recentemente il fattore IKK $\epsilon$  è stato implicato nello sviluppo del tumore al seno. In questo studio è stato dimostrato che in tessuti tumorali umani e in numerose linee cellulari di tumore al seno, IKK $\epsilon$  è espresso costitutivamente (Clément et al., 2008). A livello molecolare, nelle linee cellulari tumorali, la sovraespressione di

IKK $\epsilon$  induce l'espressione di almeno due geni regolati da NF- $\kappa$ B: *MMP9* e *BCL2*.

Inoltre si osserva accumulo nucleare di c-Rel, un substrato di IKK $\epsilon$ , per il quale è già stato dimostrato un ruolo nella tumorigenesi al seno (Clément et al., 2008).

Le interazioni delle proteine Tax con la chinasi IKK $\epsilon$  non sono state fino ad ora investigate.



## **MATERIALI E METODI**

## 6 MATERIALI E METODI

### 6.1 Colture cellulari

Le cellule umane embrioniche di rene 293T sono state mantenute in crescita esponenziale in terreno di crescita D-MEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) addizionato di siero fetale bovino (FCS) al 10%, Penicillina 100U/ml – Streptomicina 100 µg/ml, e L-glutammina (200 mM), a 37 °C e al 5% CO<sub>2</sub>. Per gli studi di co-immunoprecipitazione, le cellule, piastrate alla densità di 4 x 10<sup>5</sup>, sono state trasfettate utilizzando il reagente di transfezione JetPEI (*Polyplus transfection*) seguendo le specifiche del produttore; per gli studi di transattivazione, le cellule piastrate alla densità di 1 x 10<sup>5</sup>, sono state trasfettate utilizzando il reagente di transfezione Polyfect (*Qiagen*), seguendo le condizioni suggerite dal produttore. Le cellule da ibridoma 168A51 (*AIDS research and Reagent Program, National Institutes of Health*) sono state mantenute in terreno di crescita RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) addizionato di siero FCS al 10%, Penicillina 100U/ml – Streptomicina 100 µg/ml, L-glutammina (200 mM), e β-mercaptoetanolo 50 µM a 37 °C e al 5% CO<sub>2</sub>.

### 6.2 Anticorpi

L'anticorpo diretto contro p65/RelA è stato fornito da *Abcam*. Gli anticorpi che riconoscono rispettivamente i tag di sei istidine e V5 sono stati acquistati da *Invitrogen*. L'anticorpo diretto contro il tag Flag è stato comprato da *Santa Cruz biotechnology*. Gli anticorpi secondari anti-rabbit e antimouse sono stati acquistati da *Sigma*. La proteina Tax-1 è stata rivelata con un anticorpo monoclonale anti-

Tax derivato dall'ibridoma 168-A51 (*AIDS research and Reagent Program, National Institutes of Health*).

### 6.3 Costruzione dei vettori di espressione

I vettori pRSV-p65, Tax-1-pJFE, Tax K1-10R-pJFE, Tax K4-8R-pJFE, Tax R4-6K-pJFE, Tax R7-8K-pJFE, Tax F2-pJFE, e HIV-1-LTR-luciferasi sono stati gentilmente offerti da Françoise Bex (Université Libre de Bruxelles). I vettori pCMVF-TAB2, pCMVF-TAB2N e pCMVF-TAB2C sono stati cortesemente concessi da Giichi Takaesu (Kyushu University). Il vettore pCDNA3-Flag-IKK $\epsilon$  è stato gentilmente fornito da Lienhard Schmitz (University of Bern). I vettori (His)<sub>6</sub>-Tax-2, Tax-1-340-V5, Tax-1-300-V5, Tax-2-V5 e Tax-2-pJFE sono stati costruiti in lavori paralleli di questo laboratorio. (His)<sub>6</sub>-Tax2 è stato prodotto clonando la sequenza di Tax-2 (PR-46) nel vettore pcDNA4/HisMAX-TOPO (*Invitrogen*) utilizzando come la sequenza 5'-ACCGTCGACATGGCCCATTTCCAGGATTCGGAC-3' come *primer forward*, e la sequenza 5'-CTTGGGATTGTTTGTGTGAG-3' come *primer reverse*. Il vettore p65-pTNT è stato ottenuto clonando la sequenza di p65/RelA nel vettore pTNT utilizzando la sequenza 5'-CAATCTCGAGATGGACGAACTGTTCCCCCTCATC-3' come *primer forward*, e come *primer reverse* la sequenza 5'-TCAACAGGTACCGGAGCTGATCTGACTCAGCAGG-3'. I vettori d'espressione per GST-Tax-1 (Tax-1 intera, 1-353 aa; Tax-1 60, 1-60 aa) e per GST-Tax-2 (Tax-2 intera, 1-356 aa; Tax-2 60, 1-60 aa; Tax-2  $\Delta$ 60, 60-356; Tax-2 95, 1-95 aa; Tax-2  $\Delta$ 95, 95-356 aa; Tax-2  $\Delta$ 204, 205-356 aa; Tax-2  $\Delta$ 261, 262-356 aa) sono stati ottenuti clonando le sequenze di Tax-1 (numero d'accesso a *Gene Bank*: AAF71373) e Tax-2 (numero d'accesso a

*Gene Bank*: DQ022075) nei vettori della famiglia pGEX utilizzando i *primer* elencati in tabella 2. Tutti i costrutti sono stati sequenziati per verificare il corretto *frame* di lettura e l'assenza di mutazioni nucleotidiche.

<b><i>Primer utilizzati per il clonaggio nei vettori pGEX</i></b>	
<b><i>Vettori ricombinanti</i></b>	<b><i>Forward</i></b>
<b>Tax-1, Tax-1 60</b>	5'-ACCAGCGAATTCGCCCACTCCCAGGGTTTG-3'
<b>Tax-2, Tax-2 60</b>	5'-ACCGGAATTCGCCCATTTCCCAGGATTC-3'
<b>Tax-2 Δ60</b>	5'-ACCGGAATTCCGCGTTGTCAGCTCTCCTCTCC-3'
<b>Tax-2 95</b>	5'-ACCGGAATTCCGCCGATTTCCCAGGATTCGG-3'
<b>Tax-2 Δ95</b>	5'-ACCGGAATTCCGTCTCCCCAAGGTTCCACC-3'
<b>Tax-2 Δ204</b>	5'-ACCGGAATTCATAGTCCTCCCGGAGGACGA-3'
<b>Tax-2 Δ261</b>	5'-ACCGGAATTCCAAGGCAGGGCAGCCATCTT-3'
	<b><i>Reverse</i></b>
<b>Tax-1</b>	5'-CGCCGAAGCTTTCAGACTTCTGTTTCGCGGAAATG-3'
<b>Tax-1 60</b>	5'-CGCAAGCTTTACATCGATGGGGTCCCAGGTG-3'
<b>Tax-2</b>	5'-GCGCAAGCTTTCACCTGGGATTGTTTGTG-3'
<b>Tax-2 60</b>	5'-CGCAAGCTTTACATCGATGGGGTCCCAGGTG-3'
<b>Tax-2 Δ60</b>	5'-GCGCAAGCTTTCACCTGGGATTGTTTGTG-3'
<b>Tax-2 95</b>	5'-CGGCTCGAGTCAAGGAGTGGTGGGAGGGGTAA-3'
<b>Tax-2 Δ95, Tax-2 Δ204, Tax-2 Δ261</b>	5'-CGGCTCGAGTCACTTGGGATTGTTTGTGTGAGAC-3'

**Tabella 2:** Sono riportati i *primer* per la produzione dei cloni Tax-1, Tax-1 60, Tax-2, Tax-2 60, Tax-2 Δ60, Tax-2 95, Tax-2 Δ95, Tax-2 Δ204 e Tax-2 Δ261 nei vettori della famiglia pGEX.

## 6.4 Purificazione delle proteine di fusione GST

Le proteine Tax intere e loro peptidi fusi alla Glutathione-S-Trasferasi (GST) sono state espresse nel ceppo di *E. coli BL21 DE3 pLysS* cresciute ad  $OD_{600} = 0,8$  e indotte con IPTG 0,1 mM per 3 h a 37 °C in agitazione. I *pellet* batterici sono stati

lisati in *B-Per Bacterial Protein Extraction Reagent* (Pierce) con inibitori di proteasi (*mix complete tablets ROCHE*), PMSF 1mM, e DNAsi 5µg/ml. Le proteine di fusione sono state purificate dai lisati batterici grazie all'affinità della GST per il glutatione ridotto immobilizzato sulla resina "glutatione Sepharose 4B" (*Amersham Biosciences*). Durante i diversi passaggi della purificazione, sono state prelevate delle aliquote di controllo che sono state risolte in SDS-page. Il gel di controllo è stato colorato in una soluzione contenente Comassie brilliant blu R250 e successivamente decolorato. Le proteine purificate sono state quantificate mediante metodo Bradford.

### **6.5 Glutazione S-trasferase *Pull Down Assay***

25 µg di proteine di fusione GST sono state immobilizzate su 40 µl di *Glutatione Sepharose<sup>TM</sup> 4B* al 50% per 2 h a 4°C in agitazione in 0,5 ml finali di *buffer* di legame (20 mM HEPES pH 6,8, 150 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0,1% Tween20). Le proteine di fusione non immobilizzate sono state rimosse con 3 lavaggi in *buffer* di legame ed un'aliquota pari a 1/20 della miscela è stata prelevata ed analizzata in SDS-page come controllo della quantità di proteina utilizzata nel saggio di legame. Ripristinato il volume a 0,5 ml finali di *buffer* di legame. La soluzione è stata incubata a 4°C per 4 h in presenza della proteina p65/RelA, trascritta e tradotta *in vitro*, a partire dal vettore p65-pTNT, in presenza di residui di lisina biotinilati, utilizzando il "*TnT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte lysate systems*" e "*Transcend<sup>TM</sup> non-radioactive translation detection system*" (*PROMEGA*). Dopo i lavaggi, la miscela di legame è stata risolta in SDS-page e trasferita su membrana. Per la visualizzazione del segnale, si è proceduto a

rivelazione chemiluminescente con l'utilizzo del Kit commerciale *ROCHE* “*BM chemiluminescence blotting Kit (biotin/Streptavidin)*” che fornisce una perossidasi (POD) coniugata alla streptavidina, il substrato e il tampone di reazione.

## **6.6 Saggi di co-immunoprecipitazione**

Estratti cellulari totali sono stati preparati da cellule 293T ( $\sim 4 \times 10^5$ ) trasfettate con i vettori d'espressione come indicato nei risultati. 24 ore dopo la transfezione, le cellule sono state lavate con PBS e lisate in 300  $\mu$ l di *buffer* di incubazione NP-40 (NaCl 150 mM, TrisHCl pH 7,5 50 mM, NP-40 1%, N-Ethyl Maleimide (NEM) 50 mM, EDTA 2mM e inibitori di proteasi 1:200 *SIGMA*) per 30' in ghiaccio. I lisati cellulari sono stati centrifugati a 15.000 g per 10' e il sopranatante è stato recuperato. Le proteine sono state immunoprecipitate dai lisati cellulari con 2  $\mu$ g di anticorpo anti-p65 o anti-Flag, entrambi prodotti in coniglio, e 50  $\mu$ l di Protein A Sepharose Fast Flow (17-1279-01, *Amersham Bioscience*) a 4° per 3h in *buffer* d'incubazione in agitazione. Gli immunocomplessi sono stati lavati una volta con *buffer* di incubazione NP-40 e due volte in PBS, risospesi in Laemmli sample buffer, risolti in SDS-PAGE, 12,5 % o 10%, e trasferiti su membrana PVDF. Le membrane sono state incubate prima in 5% latte TBST o.n. a 4°, poi per 1,5 h in una soluzione contenente anticorpo primario ed infine per 1,5 h in una soluzione con anticorpo secondario legato ad una perossidasi. Gli anticorpi primari (anti-Tax-1, anti-V5, anti-HisG, anti-p65 e anti-Flag, prodotti in topo o coniglio) e gli anticorpi secondari (anti-mouse e anti-rabbit) sono stati diluiti in 5% latte TBST. Tra un'incubazione e

l'altra le membrane sono state lavate 2 volte in TBST. I segnali sono stati visualizzati usando il kit OPTI-4CN (*BIO-RAD*).

## 6.7 Saggi di luciferasi

Cellule umane HEK 293T, dopo 24 ore dalla semina in piastre Petri da 12 pozzetti alla densità di  $1 \times 10^5$ , sono state co-transfettate con i seguenti vettori plasmidici: 50 ng del vettore pHRG-TK che codifica la proteina luciferasi di *Renilla*, sotto il controllo del promotore della timidina chinasi del virus *herpes simplex*, per monitorare l'efficienza di transfezione (*Promega*); 500 ng di un vettore codificante la proteina luciferasi di lucciola sotto controllo del promotore, attivato dal *signalling* NF- $\kappa$ B, del retrovirus HIV (HIV-LTR-luciferasi); 300 ng dei vettori per Tax-1 o Tax-2 e/o 100 ng dei vettori codificanti i fattori della via NF- $\kappa$ B (p65/RelA, TAB2, IKK $\epsilon$ ). Le quantità di DNA totale sono state equalizzate aggiungendo il vettore pHT2, codificante una proteina che non attiva la via NF- $\kappa$ B. Dopo 36 ore, le cellule sono state lisate, saggiate per l'induzione dell'attività luciferasica usando il sistema "*Dual-Luciferase Reporter assay system*" (*Promega*). L'attività luciferasica è stata misurata con luminometro 20/20n *Single Tube* (*Turner biosystem*) dopo aver mescolato 10  $\mu$ l di lisato cellulare a 30  $\mu$ l di substrato per la luciferasi (*Promega*). L'attività della luciferasi è stata normalizzata rispetto all'attività di *Renilla* espressa dal vettore pHRG-TK. Ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte, i dati sono stati analizzati statisticamente applicando il *t-test* di Student. Un valore  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## **RISULTATI**



## 7 RISULTATI

### 7.1. Le proteine Tax interagiscono con il fattore p65/RelA

Tax-2 presenta una ridotta attività trasformante rispetto la sua omologa Tax-1 (Endo et al., 2002). Entrambe le proteine inducono tumorigenesi attivando costitutivamente la via di segnalazione NF- $\kappa$ B (Sun and Yamaoka, 2005). Mentre di Tax-1 sono note le interazioni con numerosi fattori di questa via, di Tax-2 è nota solo l'interazione con il fattore NEMO/IKK $\gamma$ . Abbiamo quindi intrapreso uno studio comparativo delle due proteine allo scopo di evidenziare il loro specifico coinvolgimento nella formazione di complessi con alcuni fattori chiave della via di segnalazione NF- $\kappa$ B canonica.

Il primo fattore scelto per l'analisi è la subunità p65/RelA. E' un fattore di trascrizione che agisce a valle della cascata in esame ed è dimostrato avere un ruolo chiave nell'induzione della via NF- $\kappa$ B da parte di Tax-1 (Bex et al., 1997; Suzuki et al., 1994; Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Recentemente, presso i laboratori dell'Università di Verona, è stato dimostrato che la proteina Tax-2 co-localizza con p65 nelle medesime strutture nucleari (Turci et al., 2009).

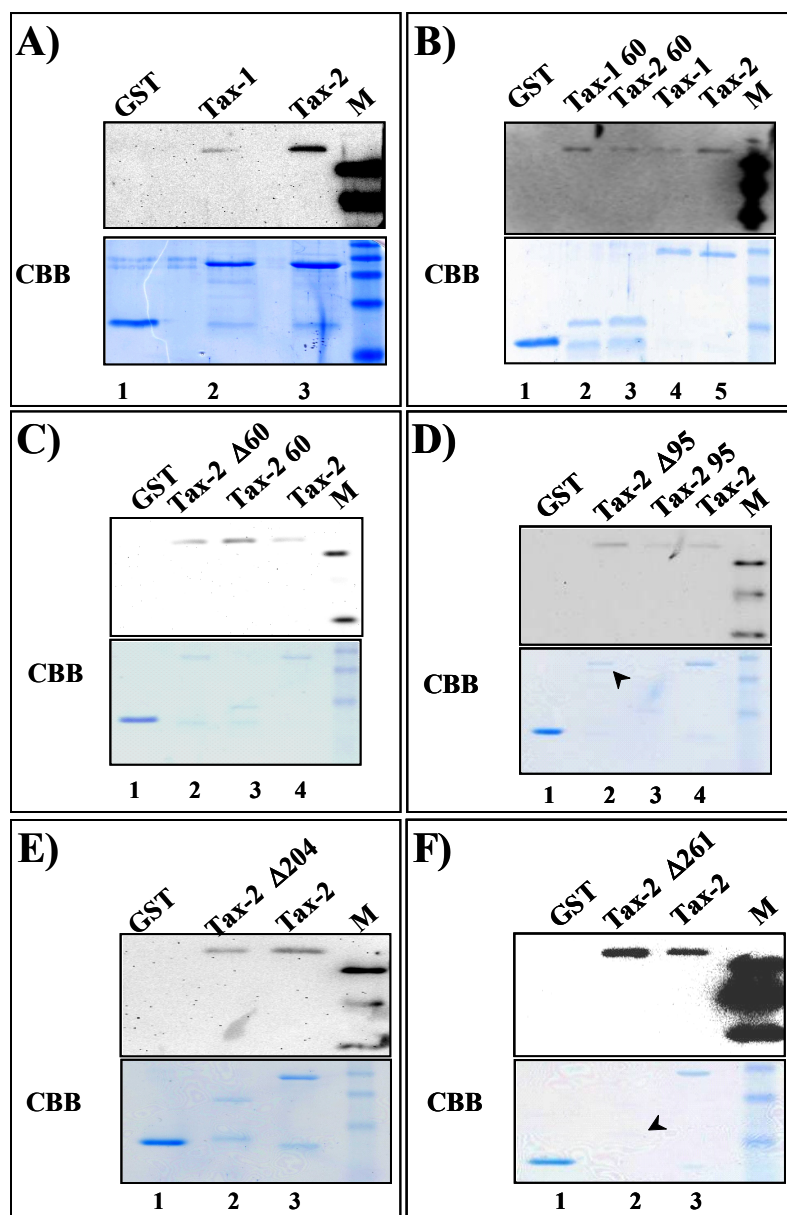
Lo studio descritto in questa tesi è iniziato analizzando l'affinità di p65/RelA con le proteine virali Tax in saggi *in vitro* di legame proteina-proteina secondo la tecnica *GST-pull down*. A tal fine, le proteine Tax-1 e Tax-2 intere sono state espresse fuse all'estremità C-terminale della proteina Glutathione-S-Trasferasi (GST) nel ceppo di *E. coli* BL21 DE3 *pLysS*, purificate, e testate per la loro capacità di riconoscere il fattore p65/RelA.

Il saggio di legame ha dimostrato che le proteine Tax-1 e Tax-2 sono in grado di riconoscere per legame di affinità la proteina p65/RelA. Nella figura 11 A

(pannello superiore), è infatti visibile una banda del peso molecolare atteso della proteina p65/RelA come risultato dell'interazione con le proteine Tax (corsie 2 e 3 rispettivamente), mentre non è stato rilevato alcun segnale relativo al saggio di legame con la sola proteina GST (corsia 1). Nel pannello inferiore è mostrata l'integrità delle proteine utilizzate nei saggi, evidenziata dalle bande corrispondenti alle dimensioni attese per ciascuna proteina separate in un gel di acrilamide (figura 11 A, pannello inferiore).

Lo studio è stato successivamente indirizzato all'identificazione dei domini funzionali di Tax-2 coinvolti nell'associazione con p65/RelA con la stessa tecnica, utilizzando peptidi derivati da delezioni amino e carbossi terminali di Tax-2. A tal fine sono stati testati i primi 60 e 95 aminoacidi di Tax-2 (Tax-2 60 e Tax-2 95, rispettivamente) e i peptidi corrispondenti a Tax-2 deleva dei primi 60, 95, 204 o 261 amino acidi (Tax-2  $\Delta$ 60, Tax-2  $\Delta$ 95, Tax-2  $\Delta$ 204, Tax-2  $\Delta$ 261, rispettivamente). L'analisi è stata estesa anche ai primi 60 residui di Tax-1 (Tax-1 60).

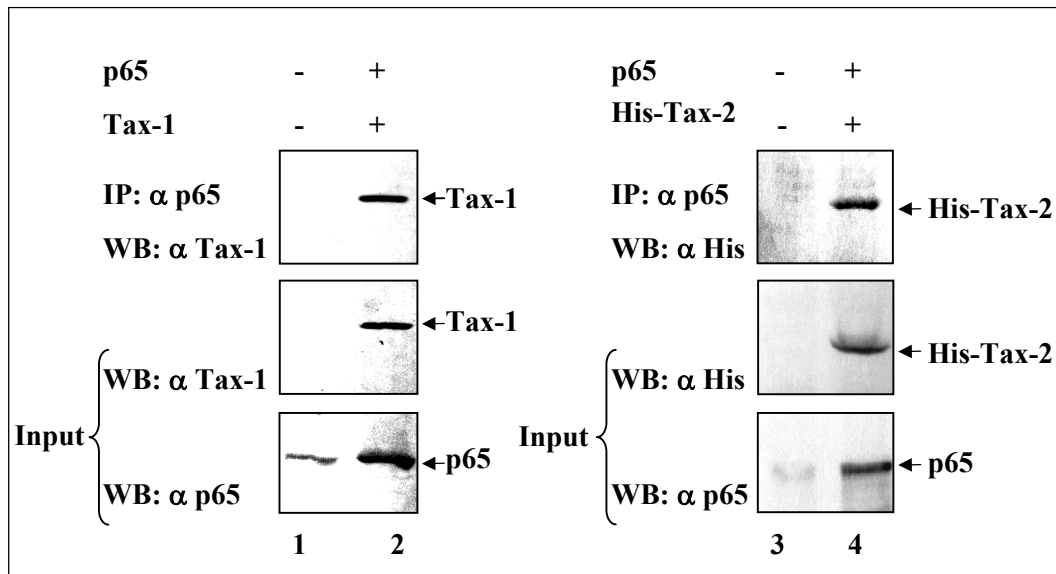
I saggi di legame, mostrati in figura 11 pannelli B, C, D, E, F, hanno dimostrato che i primi 60 aminoacidi di Tax-1, i primi 60 e 95 residui di Tax-2, e i peptidi corrispondenti a Tax-2 priva dei primi 60, 95, 204 o 261 residui contengono elementi in grado di interagire con il fattore p65/RelA. E' infatti visibile una banda del peso molecolare atteso di p65/RelA nei saggi di legame con tutte le proteine di fusione GST descritte. Da queste analisi non è stato tuttavia possibile identificare un dominio delle proteine Tax necessario per questa associazione.



**Figura 11: Saggi di legame GST-pull down tra p65/RelA e peptidi Tax-1 e Tax-2.** p65/RelA è stata tradotta *in vitro* in presenza di lisina biotinilata e incubata con le proteine fuse a GST. La miscela di legame è stata risolta in SDS-page al 12,5% e trasferita su membrana. La presenza di p65, legata alle proteine immobilizzate su resina contenente glutatione è stata rilevata con una perossidasi marcata con streptavidina. I gel colorati con Comassie Brilliant Blue (CBB) corrispondono ad 1/20 della miscela del saggio di legame risolto in SDS-page. (A) Saggi con: GST (1), GST-Tax-1 (2) e GST-Tax-2 (3). (B) Saggi con: GST (1), GST-Tax-1 60 (2), GST-Tax-2 60 (3), GST-Tax-1 (4), GST-Tax-2 (5). (C) Saggi con: GST (1), GST-Tax-2 Δ60 (2), GST-Tax-2 60 (3), GST-Tax-2 (4). (D) Saggi con: GST (1), GST-Tax-2 Δ95 (2), GST-Tax-2 95 (3) e GST-Tax-2 (4). (E) Saggi con: GST (1), GST-Tax-2 Δ204 (2), GST-Tax-2 (3). (F) Saggi con: GST (1), GST-Tax-2 Δ261 (2) e GST-Tax-2 (3).

I saggi *in vitro* di legame tra proteine prodotte da colture batteriche non consentono di studiare le interazioni tra proteine soggette a modificazioni post-traduzionali. Per questo motivo le analisi successive sono state condotte in cellule transfettate, identificando le associazioni tra proteine mediante co-immunoprecipitazione con anticorpi specifici.

La figura 12 mostra il risultato del saggio di immunoprecipitazione di lisati di cellule transfettate con i vettori d'espressione per le proteine Tax e il fattore p65. E' stato così dimostrato che le proteine Tax-1 e Tax-2 sono presenti negli immunocomplessi precipitati dall'anticorpo anti-NF- $\kappa$ B p65 in cellule 293T transfettate che co-esprimono p65/RelA e Tax-1 o Tax-2 fusa ad un *tag* di sei istidine in posizione N-terminale (His-Tax-2) (Figura 12, corsie 2 e 4, rispettivamente, pannelli superiori), mentre nessun segnale è rilevato nelle corsie corrispondenti alle cellule non transfettate (Figura 12, corsie 1 e 3, rispettivamente, pannelli superiori). La presenza e l'integrità di p65 e delle proteine Tax negli estratti cellulari sono state confermate in *Western Blotting* (WB) mediante riconoscimento con anticorpi specifici (figura 12, pannelli inferiori).

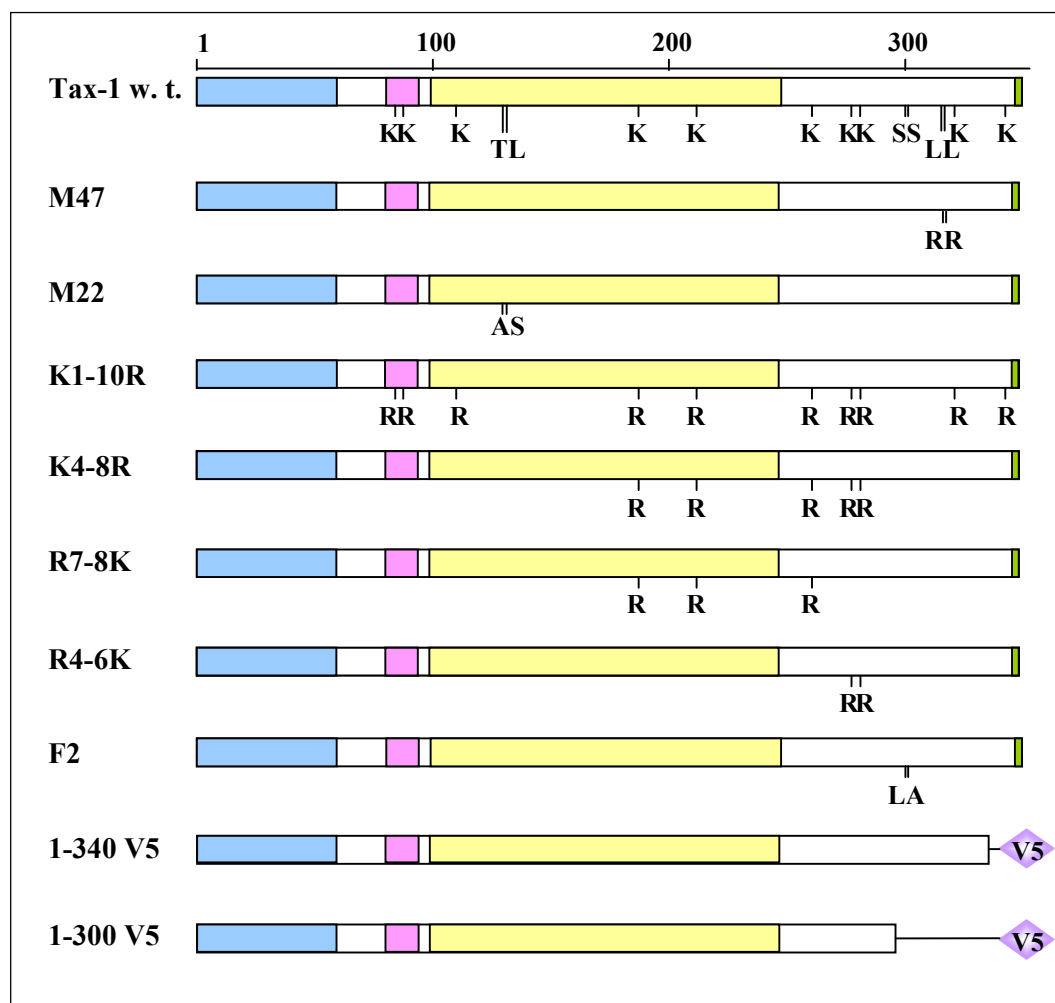


**Figura 12: Saggio di co-immunoprecipitazione tra le proteine Tax e p65/RelA.** Gli estratti di cellule 293T co-transfettate con vettori d'espressione per p65 e per proteine Tax sono immunoprecipitati (IP) con anti-p65, risolti in *SDS page*, trasferiti su membrana, e analizzati per la presenza di Tax-1 o Tax-2 con anti-Tax-1 o anti-HisG rispettivamente (pannelli superiori). I lisati (input) sono stati analizzati per la presenza di p65 e delle proteine Tax (pannelli inferiori). Immunoprecipitati da: cellule non transfettate (1), cellule co-transfettate per p65 e Tax-1 (2), cellule non transfettate (3); cellule co-transfettate per p65 e His-Tax-2 (4).

Lo studio è proseguito analizzando il contributo delle modificazioni post-traduzionali nell'interazione sin qui dimostrata. Le modifiche post-traduzionali di Tax-1, come ubiquitinazione, sumoilazione e acetilazione, influenzano la sua abilità nell'attivare la via NF- $\kappa$ B (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006; Lodewick et al., 2009) e la sua localizzazione intracellulare (Lamsoul et al., 2005). L'ubiquitinazione di Tax-1 è critica per il legame con la subunità IKK $\gamma$  (Nasr et al., 2006), la co-localizzazione nel citoplasma con il complesso IKK (Lamsoul et al., 2005), e la traslocazione nucleare del fattore p65/RelA (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). La sumoilazione di Tax-1 è invece richiesta per la

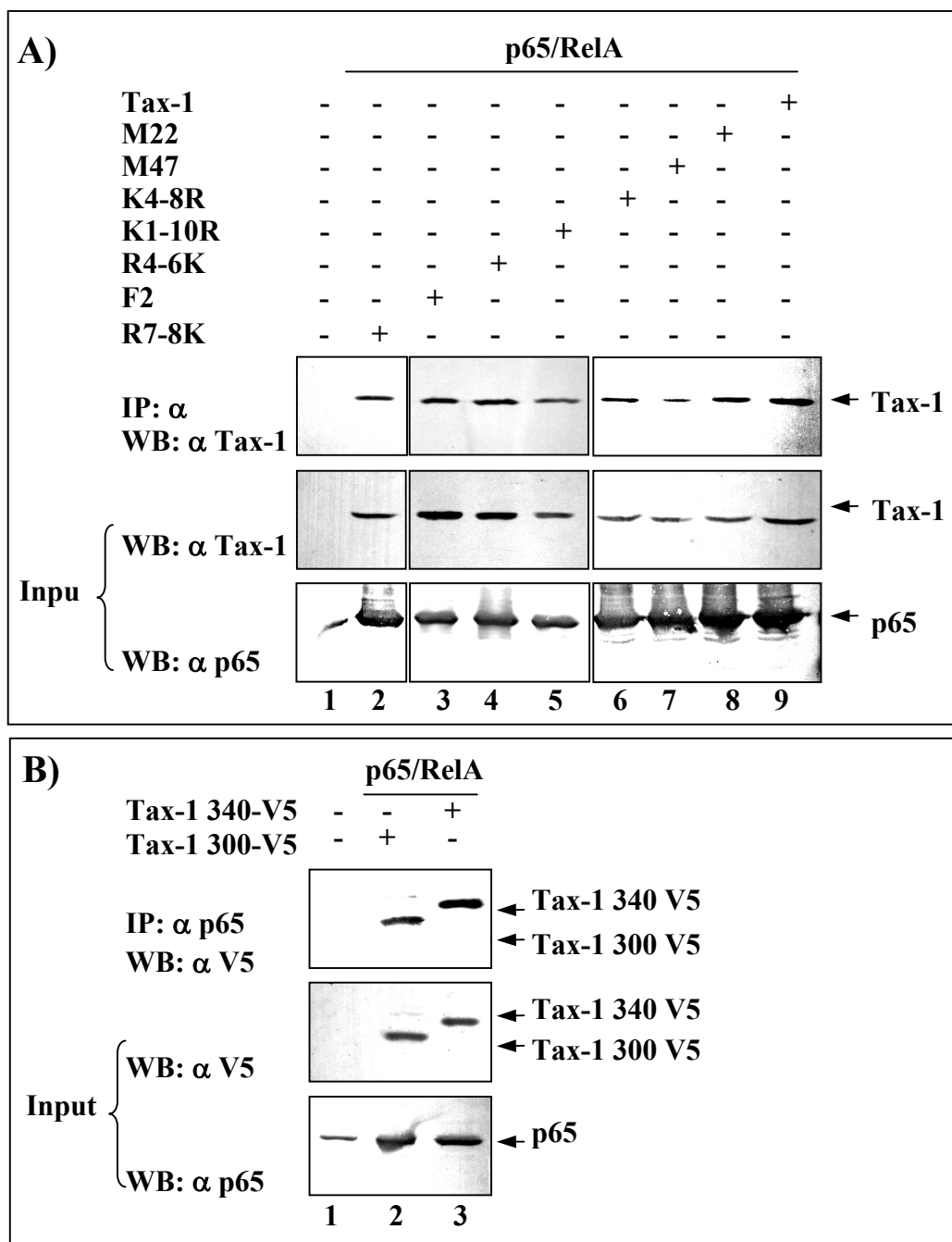
co-localizzazione nei corpi nucleari con p65/RelA e IKK $\gamma$  e per la completa attivazione trascrizionale (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006).

L'incapacità dei mutanti Tax-1 nell'indurre la via NF- $\kappa$ B e nel co-localizzare con p65/RelA e IKK $\gamma$  nei corpi nucleari, potrebbe essere dovuta ad una interazione difettiva con la subunità p65. Per verificare questa ipotesi abbiamo testato mediante co-immunoprecipitazione l'affinità di p65 per specifici mutanti di Tax-1 (figura 13), derivati da sostituzioni puntiformi aminoacidiche o da delezioni difettive nelle modificazioni post-traduzionali.



**Figura 13:** Rappresentazione schematica dei mutanti di Tax-1 analizzati. Sono diagrammati i domini strutturali e i residui sostituiti.

I mutanti utilizzati hanno le seguenti caratteristiche: M47 e M22 sono difettivi per l'attivazione dei *pathway* CREB/ATF e NF- $\kappa$ B, rispettivamente (Smith MR, 1990); il mutante F2 è difettivo per la fosforilazione e l'attivazione del *pathway* NF- $\kappa$ B e CREB/ATF (Bex et al., 1999); il mutante K1-10R è difettivo per la sumoilazione, ubiquitinazione e acetilazione, i mutanti K4-8R e R4-6K sono difettivi nella sumoilazione e ubiquitinazione, nella formazione dei corpi nucleari, e nell'induzione di NF- $\kappa$ B e il mutante R7-8K è parzialmente ubiquitinato e sumoilato, in grado di colocalizzare con p65 e di attivare NF- $\kappa$ B (Lamsoul et al, 2005; Nasr et al., 2006). Inaspettatamente, il fattore p65 è risultato essere presente in tutti gli immunocomplessi analizzati, a dimostrazione che le modifiche post-traduzionali non sono richieste per questa interazione (Figura 14 A, corsie 7, 8, 3, 5, 6, 4, 2, rispettivamente, pannelli superiori). Un simile risultato è stato ottenuto usando il mutante Tax-1 340-V5, privo del dominio PDZ e della lisina acetilabile, e il mutante Tax-1 300-V5, ulteriormente delecto del dominio di legame al coattivatore trascrizionale P/CAF (Figura 14 B, corsia 2 e 3, rispettivamente, pannello superiore). La presenza ed integrità di p65 e di Tax-1, *wild type* o mutanti, negli estratti cellulari è stata rilevata in *Western Blotting* (WB) mediante riconoscimento anticorpale usando anti-NF- $\kappa$ B (Figura 14 A e B, pannelli inferiori), anti-Tax-1 (Figure 14 A, pannelli intermedi) o anti-V5 (Figura 14 B, pannello intermedio).



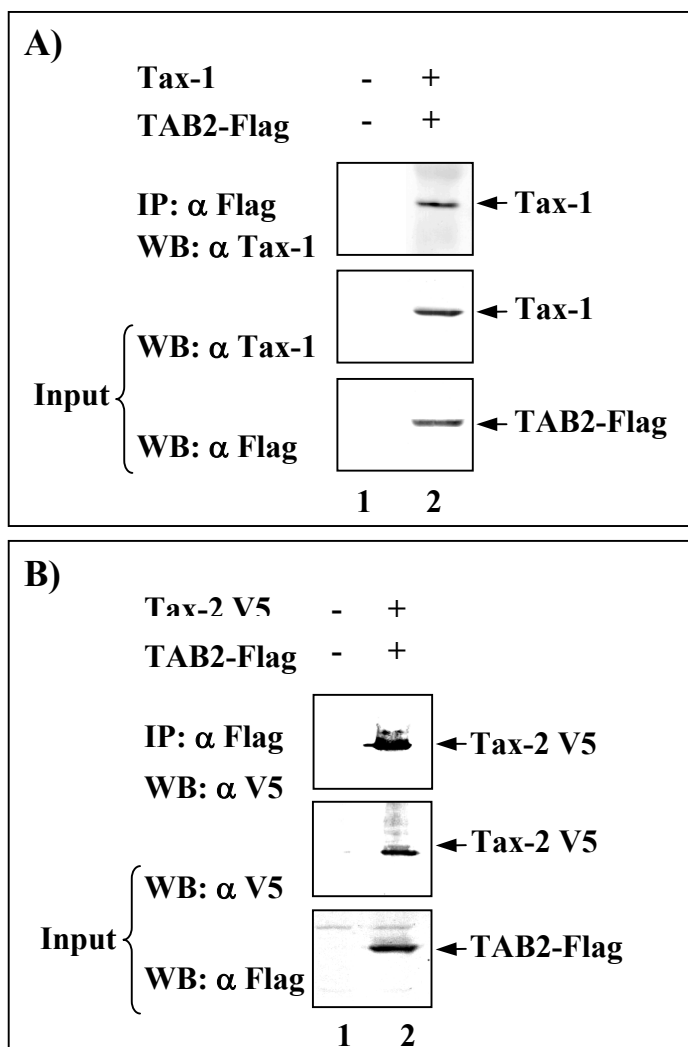
**Figura 14:** Saggi di co-immunoprecipitazione tra p65/RelA e mutanti di Tax-1. Gli estratti di cellule 293T co-transfettate con vettori per p65 e per mutanti di Tax-1 sono stati immunoprecipitati (IP) con anti-p65, risolti in *SDS page*, trasferiti su membrana, e analizzati per la presenza dei mutanti Tax-1 usando un anti-Tax-1 (Pannelli superiori). I lisati (input) sono stati analizzati per la presenza di p65 e dei mutanti Tax-1 (pannelli inferiori). **(A)** Immunoprecipitati da: cellule non transfettate (1), cellule co-transfettate per p65 e per: Tax-1 R7-8K (2), Tax-1 F2 (3), Tax-1 R4-6K (4), Tax-1 K1-10R (5), Tax-1 K4-8R (6), Tax-1 M47 (7), Tax-1 M22 (8), o Tax-1 (9). **(B)** Immunoprecipitati da: cellule non transfettate (1), cellule co-transfettate per p65 e per Tax-1 300-V5 (2) o Tax-1 340-V5(3).



## 7.2 Le proteine Tax interagiscono con il fattore TAB2

Il secondo fattore cellulare preso in esame è la proteina TAB2, *TAK1-binding-protein 2*, di cui è stata dimostrata l'abilità nel modulare la cascata NF- $\kappa$ B (Takaesu et al., 2000; Baek et al., 2002) e per la quale è già stato dimostrata un'implicazione nell'attivazione del *pathway* NF- $\kappa$ B da parte di Tax-1 (Suzuki et al., 2007; Yu et al., 2008).

Per identificare l'associazione di Tax-2 con TAB2, sono stati condotti saggi di co-immunoprecipitazione da lisati di cellule 293T co-transfettate con plasmidi d'espressione della proteina TAB2 fusa all'epitopo di riconoscimento per l'anticorpo anti-Flag e di Tax-2 fusa all'epitopo di riconoscimento per l'anticorpo anti-V5 o di Tax-1. I risultati mostrati in figura 15 indicano che, in cellule umane 293T, gli immunocomplessi precipitati dall'anticorpo di riconoscimento della proteina TAB2 contengono le proteine Tax-1 e Tax-2 (Figura 15 A, corsia 2 e figura 15 B, corsia 2, rispettivamente, pannelli superiori). L'integrità delle proteine espresse nelle cellule transfettate è stata verificata in Western *blotting* con anticorpi specifici (Figura 15 A e B, pannelli inferiori).

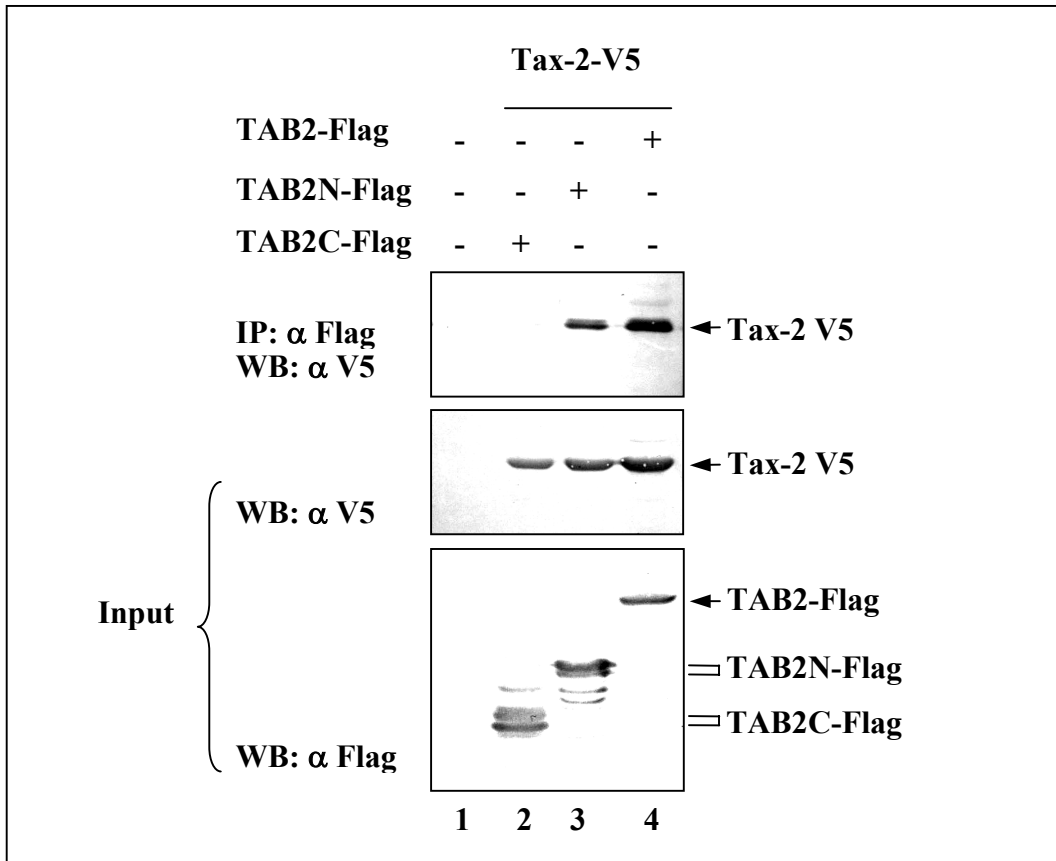


**Figura 15: Saggi di co-immunoprecipitazione tra TAB2 e proteine Tax.** Gli estratti di cellule 293T co-transfettate con vettori d'espressione per Flag-tagged TAB2 e per proteine Tax sono immunoprecipitati (IP) con anti-Flag, risolti in *SDS page*, trasferiti su membrana, e analizzati per la presenza di Tax-1 o Tax-2 con anti-Tax-1 o anti-V5 rispettivamente (pannelli superiori). I lisati (input) sono stati analizzati per la presenza di TAB2 e delle proteine Tax (pannelli inferiori). **(A)** Immunoprecipitati da: cellule non transfettate (1), cellule co-transfettate per TAB2 e Tax-1 (2). **(B)** Immunoprecipitati da cellule non transfettate (1); cellule co-transfettate per TAB2 e Tax-2 V5.

La proteina TAB2 presenta più domini funzionali: un dominio CUE (*coupling ubiquitin conjugation to ER degradation*) all'estremità N-terminale (Kishida et al., 2005), e una struttura *coiled-coil* e una sequenza di esporto nucleare (NES) nella porzione C-terminale (Takaesu et al., 2000; Baek et al., 2002). Il dominio C-terminale di TAB2 è responsabile dell'associazione con numerosi fattori cellulari

coinvolti nella regolazione del *pathway* NF- $\kappa$ B quali TAK1, TRAF6, HDAC3, N-CoR e NUMBL (Suzuki et al., 2000; Baek et al., 2002; Ma et al., 2008). Per determinare quale dominio della proteina TAB2 sia necessario per l'interazione con Tax-2 abbiamo analizzato gli immunocomplessi formati in cellule trasfettate che esprimono Tax-2 e i peptidi di TAB2 tronchi (TAB2N, corrispondente ai primi 399 amino acidi, e TAB2C, corrispondente a TAB2 debole dei primi 400 residui) (Takaesu et al., 2000). Come mostrato in figura 16, la proteina Tax-2 V5 è visibile negli immunocomplessi con TAB2 e TAB2N (Figura 16, corsie 4 e 3, rispettivamente, pannello superiore), mentre è assente in quelli con TAB2C e nella corsia corrispondente ai lisati di cellule non trasfettate (Figura 16, corsia 2 e 1 rispettivamente, pannello superiore). Anche in questa analisi l'integrità delle proteine espresse è stata confermata in *Western blotting* mediante riconoscimento di anticorpi specifici (Figura 16, pannelli inferiori).

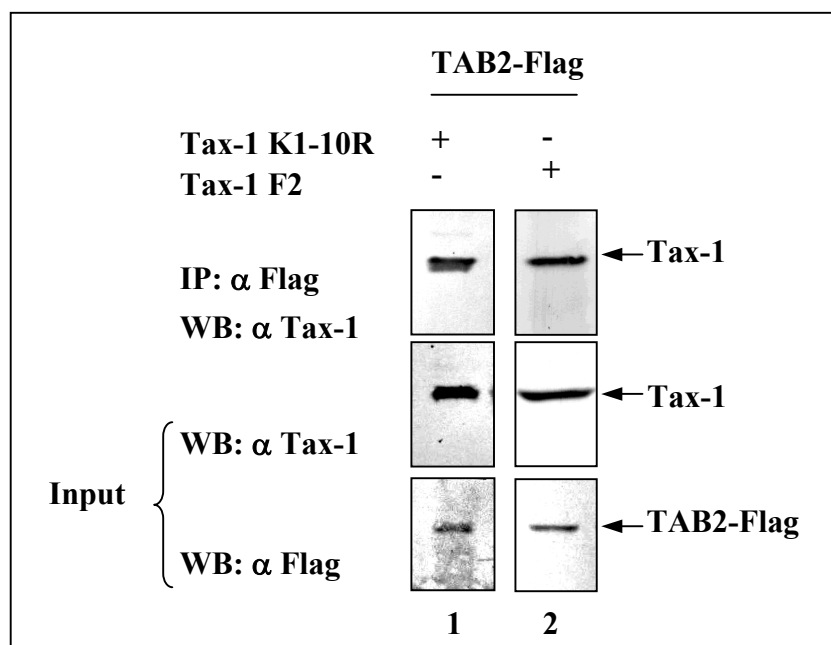
Questo risultato si sovrappone a quanto dimostrato per la proteina Tax-1 (Yu et al., 2008), e conferma che l'interazione tra le proteine Tax e il fattore TAB2 si realizza mediante affinità molecolare con il dominio funzionale non direttamente coinvolto nell'associazione con fattori cellulari noti della via NF- $\kappa$ B e per il quale si può escludere un possibile meccanismo competitivo di interazione cellulare.



**Figura 16:** Saggi di co-immunoprecipitazione tra Tax-2 V5 e mutanti tronchi di TAB2. Gli estratti di cellule 293T co-transfettate con vettori d'espressione per Tax-2 V5 e proteine Flag-tagged sono stati immunoprecipitati (IP) con anti-Flag, risolti in *SDS page*, trasferiti su membrana, e analizzati per la presenza di Tax-2 con anti-V5 (pannello superiore). I lisati (input) sono stati analizzati per la presenza di Tax-2 e delle proteine Flag-tagged (pannelli inferiori). Ordine dei campioni: immunoprecipitati da cellule non transfettate (1); immunoprecipitati da cellule co-transfettate per Tax-2 V5 e per TAB2C (2), TAB2N (3), o TAB2 (4).

Come per p65, si è voluto analizzare il possibile contributo delle modificazioni post-traduzionali di Tax-1 nell'interazione con il fattore TAB2. E' stata testata l'affinità di TAB2 per i mutanti di Tax-1, K1-10R e F2, descritti precedentemente, tramite esperimenti di co-immunoprecipitazione. Come mostrato in figura 17, sia K1-10R che F2 sono rilevati negli immunocomplessi precipitati con l'anticorpo anti-Flag (corsie, 1 e 2 rispettivamente, pannelli superiori). La presenza negli estratti cellulari dei mutanti di Tax-1 e di TAB2 è stata stabilita tramite riconoscimento anticorpale con anti-Tax-1 e anti-Flag rispettivamente (Figura 17,

pannelli inferiori). Queste interazioni indicano che la fosforilazione alle serine Ser<sup>300</sup> and Ser<sup>301</sup>, la sumoilazione, l'ubiquitinazione e l'acetilazione di Tax-1 non sono richieste per il riconoscimento del fattore TAB2.



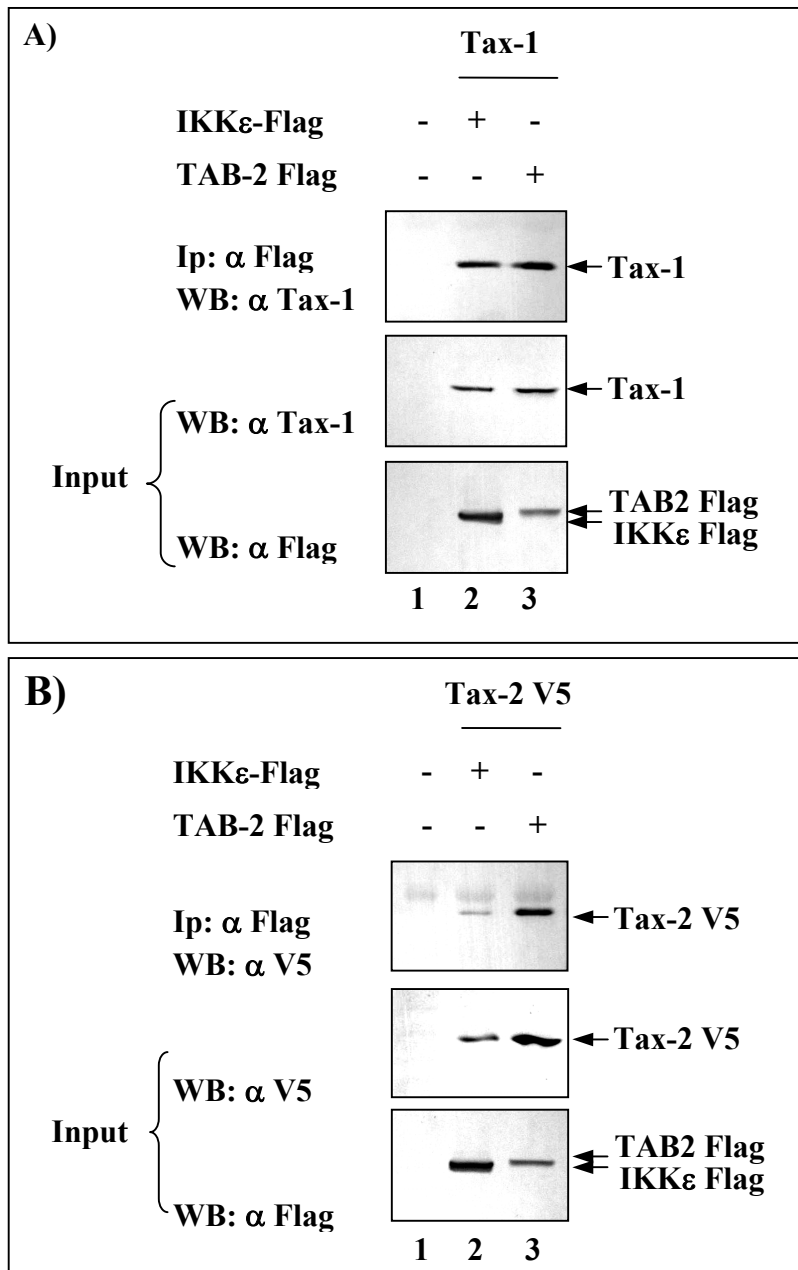
**Figura 17: Saggi di co-immunoprecipitazione tra TAB2 e mutanti Tax-1.** Gli estratti di cellule 293T co-transfettate con vettori d'espressione per TAB2 e mutanti Tax-1 sono stati immunoprecipitati (IP) con anti-Flag, risolti in *SDS page*, trasferiti su membrana, e analizzati per la presenza delle proteine Tax-1 con anti-Tax-1 (pannelli superiori). I lisati (input) sono stati analizzati per la presenza di TAB2 e dei mutanti Tax-1 (pannelli inferiori). Ordine dei campioni: immunoprecipitati da cellule co-transfettate con vettore per TAB2 e per Tax-1 K1-10R (1) o Tax-1 F2 (2).

### 7.3 Le proteine Tax interagiscono con la chinasi IKKε

L'analisi dell'abilità delle proteine Tax di riconoscere nuovi fattori del *signaling* NF-κB può fornire ulteriori contributi alla comprensione del meccanismo tramite il quale Tax-1 e Tax-2 deregolano questo *pathway*. Lo studio è quindi proseguito con l'esame della possibile interazione di Tax-1 e Tax-2 con il fattore IKKε, un elemento della famiglia delle chinasi del complesso IKK responsabile della fosforilazione degli inibitori IκB e delle subunità NF-κB. Al momento non sono

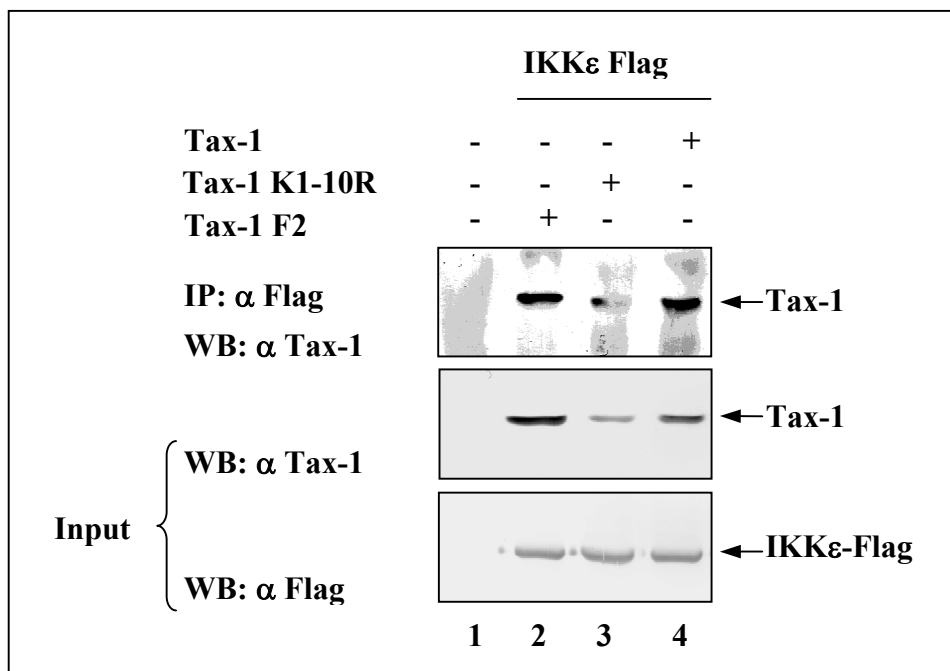
noti studi di associazione tra le proteine Tax e questa chinasi, mentre è stato dimostrato che Tax-1 associa stabilmente con le chinasi IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  in cellule infettate da HTLV-1 (Meertens et al., 2004; Chu et al., 1998; Harhaj et al., 1999; Jin et al., 1999; Xiao et al., 2000).

Anche per questo fattore l'affinità con le proteine Tax-1 e Tax-2 è stata analizzata in esperimenti di co-immunoprecipitazione in cellule 293T transfettate con plasmidi d'espressione per IKK $\epsilon$ , fusa ad un epitopo Flag, e per Tax-1 o Tax-2 fusa all'epitopo V5. I risultati mostrati in Figura 18 A includono un controllo positivo rappresentato dalla co-immunoprecipitazione di Tax e TAB2 in cellule transfettate con i corrispondenti vettori d'espressione (corsie 3, figura 18 A e B). Le proteine Tax-1 e Tax-2 sono presenti nei complessi precipitati con l'anticorpo anti-Flag di IKK $\epsilon$  (figura 18 A e B, corsie 2, pannelli superiori). Tutte le proteine analizzate negli immunocomplessi sono espresse correttamente come dimostrato dal Western *blotting* dei lisati cellulari (Figura 18 A e B, pannelli inferiori).



**Figura 18: Saggi di co-immunoprecipitazione tra IKK $\epsilon$  e proteine Tax.** Gli estratti di cellule 293T co-transfettate con vettori per IKK $\epsilon$  e proteine Tax sono stati immunoprecipitati (IP) con anti-Flag, risolti in *SDS-page*, trasferiti su membrana, e analizzati per la presenza delle proteine Tax. Tax-1 co-precipitata è stata rilevata in con un anti Tax-1 (A), mentre Tax-2 co-precipitata è stata rilevata con un anti-V5 (B) (pannelli superiori). I lisati (input) sono stati analizzati per la presenza di IKK $\epsilon$  e delle proteine Tax (pannelli inferiori). **A)** Immunoprecipitati da: cellule non transfettate (1), cellule co-transfettate per Tax-1 e per IKK $\epsilon$  (2) o TAB2 (3). **B)** Immunoprecipitati da cellule non transfettate (1), cellule co-transfettate per Tax-2 V5 e per IKK $\epsilon$  (2) o TAB2 (3).

Anche per questo fattore, come per p65 e TAB2, l'analisi in esperimenti di co-immunoprecipitazione esclude qualsiasi contributo essenziale delle modificazioni post-traduzionali di Tax-1 nel riconoscimento di IKK $\epsilon$ . I mutanti di Tax-1, F2 e K1-10R, precedentemente descritti sono, infatti, presenti negli immunocomplessi precipitati dall'anticorpo anti-Flag di IKK $\epsilon$  (figura 19, corsia 2 e 3 rispettivamente, pannelli superiori). La presenza negli estratti cellulari di Flag-tagged IKK $\epsilon$  e dei mutanti Tax-1 è stata rilevata mediante riconoscimento con anticorpi specifici (Figura 19, pannelli inferiori).



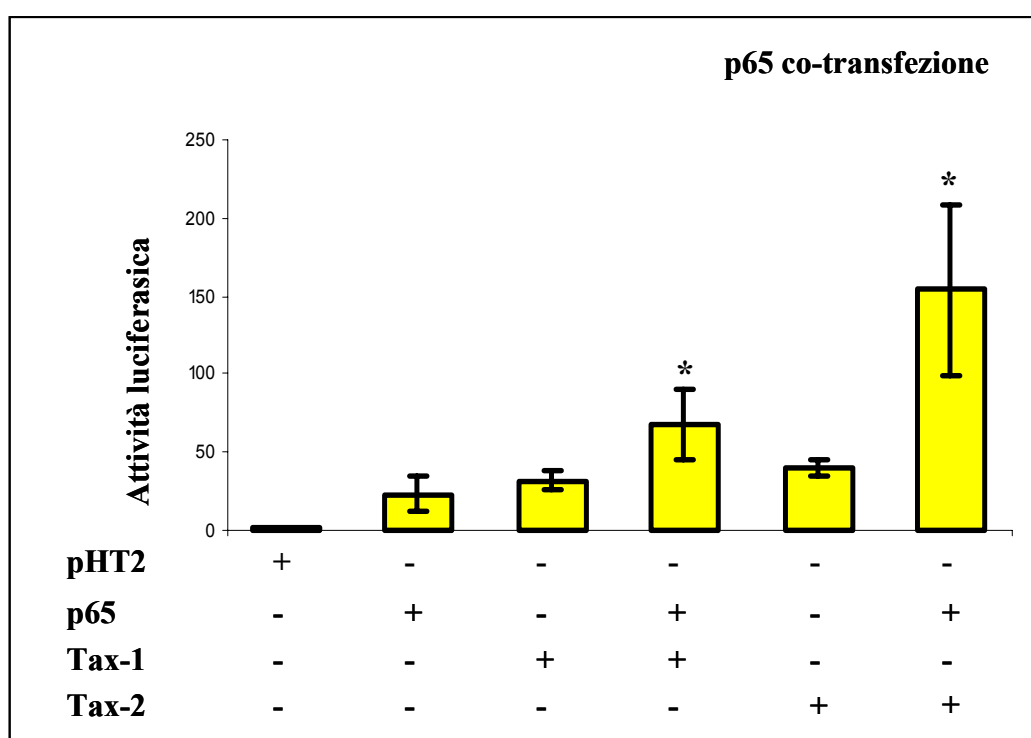
**Figura 19: Saggi di co-immunoprecipitazione tra IKK $\epsilon$  e proteine Tax.** Gli estratti di cellule 293T co-transfettate con vettori per IKK $\epsilon$  e proteine Tax sono stati immunoprecipitati (IP) con anti-Flag, risolti in *SDS-page*, trasferiti su membrana, e analizzati per la presenza delle proteine Tax. Tax-1 e i suoi mutanti co-precipitati sono stati rilevati in con un anti Tax-1 (pannello superiore). I lisati (input) sono stati analizzati per la presenza di IKK $\epsilon$  e di Tax-1 (pannelli inferiori). Immunoprecipitati da: cellule non transfettate (1), cellule co-transfettate per IKK $\epsilon$  e per Tax-1 F2 (2), Tax-1 K1-10R (3) o Tax-1 (4).



#### **7.4 Attivazione NF- $\kappa$ B indotta dalle proteine Tax e sovra-espressione di p65, TAB2 e IKK $\epsilon$**

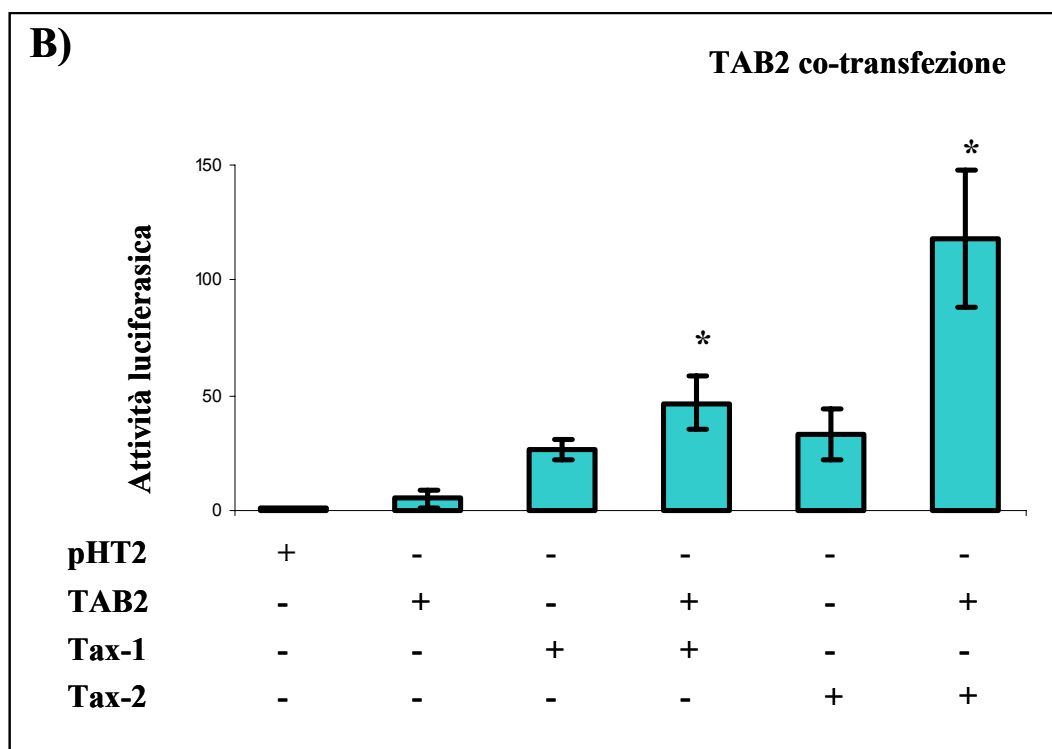
Lo studio del coinvolgimento dei fattori p65/RelA, TAB2 e IKK $\epsilon$  nella deregolazione della via NF- $\kappa$ B mediata dalle proteine Tax-1 e Tax-2 è proseguito esaminando, in saggi di luciferasi, il loro contributo nell'attivare l'espressione dal promotore presente nella LTR di HIV (HIV-LTR-luc), il quale contiene due siti di legame per le subunità NF- $\kappa$ B. A tal fine, cellule 293T sono state transfettate con HIV-LTR-luc, i vettori per Tax-1 e Tax-2 e/o fattori della via NF- $\kappa$ B in esame (vedi materiali e metodi 6.7).

Come mostrato in figura 20, la co-transfezione di vettori d'espressione di p65 e delle proteine Tax, in cellule 293T, induce l'attività luciferasica di circa 2 volte e di circa 4 volte rispetto a quella misurata in cellule esprimenti solo Tax-1 o Tax-2, rispettivamente ( $p < 0,05$ ). Si osserva inoltre che in cellule co-transfettate con p65 e Tax-2, l'attività luciferasica è indotta di circa 4 volte rispetto a quella rilevata in cellule co-transfettate con p65 e Tax-1 ( $p < 0,05$ ).



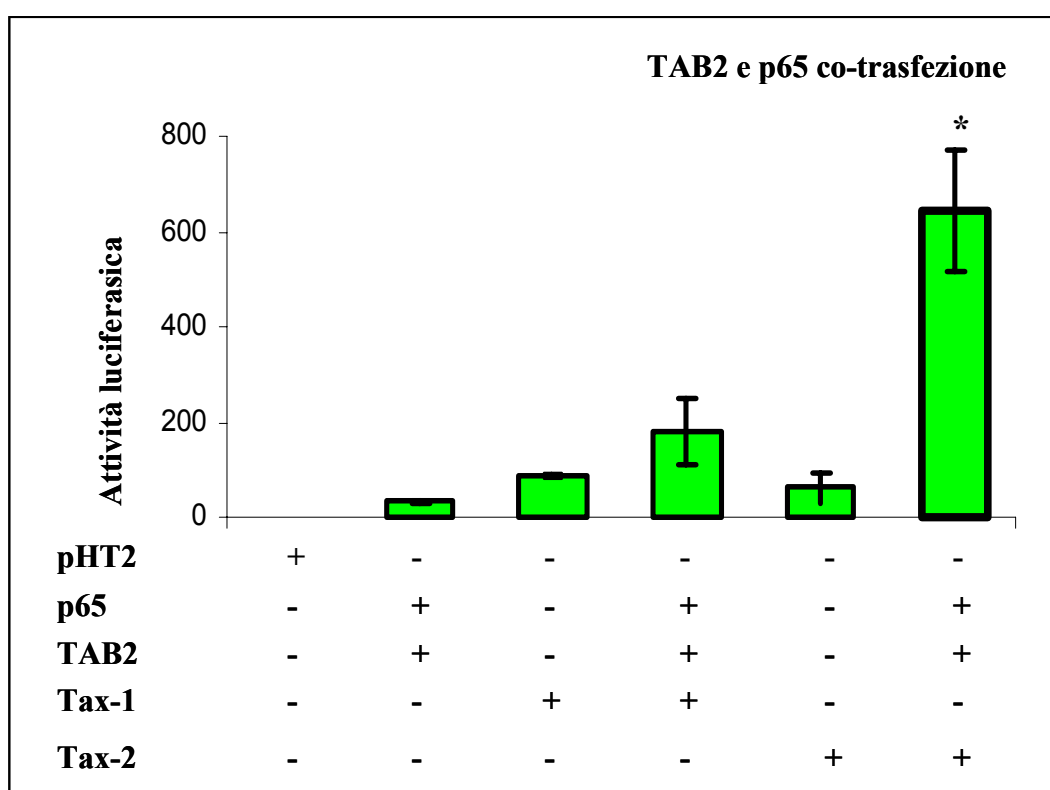
**Figura 20: Attività luciferasica indotta dalle proteine Tax in cooperazione con p65 sulla via NF- $\kappa$ B.** Cellule 293T transfettate con i vettori pHT2, Tax-1, Tax-2 e p65 come indicato dai segni + e -. I risultati sono rappresentati come variazione dell'attività luciferasica rispetto a quella misurata in cellule transfettate con pHT2. I valori mostrati sono il risultato di almeno tre esperimenti indipendenti. E' riportata la deviazione standard. \* Denota i campioni statisticamente significativi valutati secondo il test t di Student ( $p < 0,05$ ).

Nell'analisi del contributo di TAB2 sull'induzione dell'espressione, mediata da Tax-1 o Tax-2, su un promotore NF- $\kappa$ B, si osserva che la presenza del fattore TAB2 aumenta di circa 2 volte l'attività luciferasica indotta da Tax-1 e di circa 4 volte quella indotta da Tax-2 a confronto dell'attività registrata in cellule 293T transfettate solo con vettori per le proteine virali. Queste differenze sono statisticamente significative ( $p < 0,05$ ). E' interessante notare che anche in questo caso la co-transfezione di TAB2 e Tax-2 induce l'attività luciferasica in misura maggiore rispetto a quella rilevata in cellule co-transfettate con TAB2 e Tax-1, di un valore statisticamente significativo di circa 4 volte ( $p < 0,05$ ).



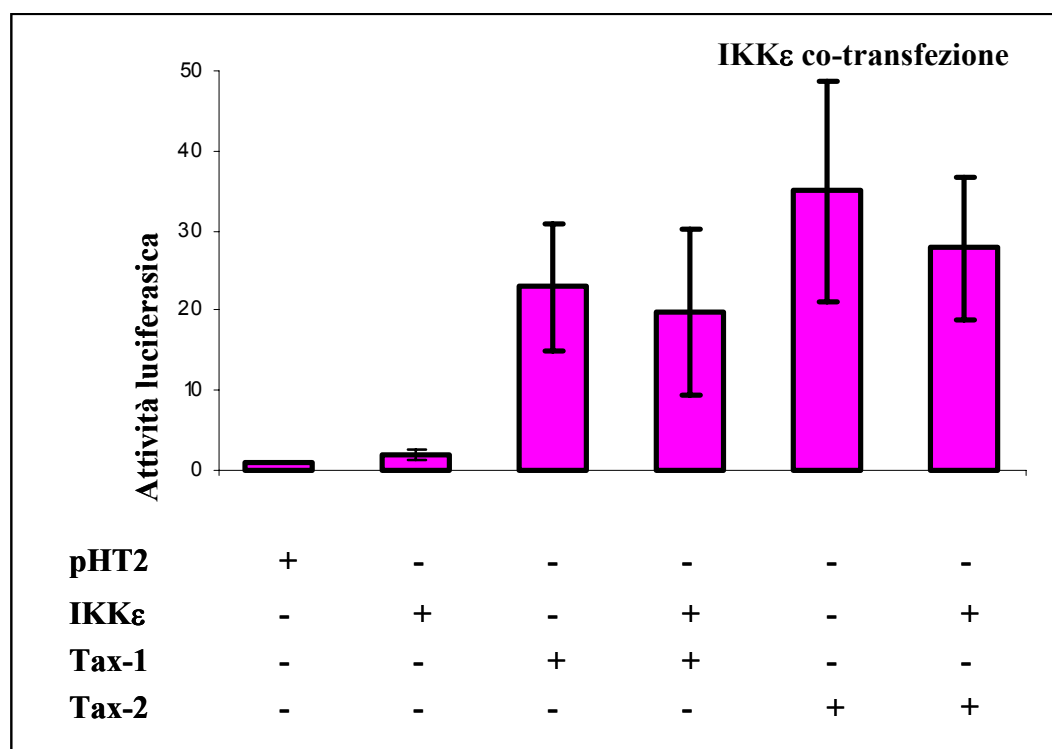
**Figura 21: Attività luciferasica indotta dalle proteine Tax in cooperazione con TAB2 sulla via NF- $\kappa$ B.** Cellule 293T transfettate con i vettori pHT2, Tax-1, Tax-2 e TAB2 come indicato dai segni + e -. I risultati sono rappresentati come variazione dell'attività luciferasica rispetto a quella misurata in cellule transfettate con pHT2. I valori mostrati sono il risultato di almeno tre esperimenti indipendenti. E' riportata la deviazione standard. \* Denota i campioni statisticamente significativi valutati secondo il test t di Student ( $p < 0,05$ ).

L'induzione si conferma maggiore per Tax-2 a confronto con Tax-1 anche in cellule co-esprimenti p65 e TAB2. Come mostrato in figura 22, in cellule co-transfettate con p65, TAB2 e Tax-2, l'attività luciferasica è circa 4 volte quella registrata in cellule co-transfettate con p65, TAB2, e Tax-1 ( $p < 0.05$ ). Questi risultati rappresentano la prima dimostrazione sperimentale di una diversità statisticamente significativa nell'attività di induzione della via NF- $\kappa$ B in relazione ai fattori p65 e TAB2.



**Figura 22: Attività luciferasica indotta dalle proteine Tax in cooperazione con p65 e TAB2 sulla via NF- $\kappa$ B.** Cellule 293T transfettate con Tax-1, Tax-2, p65 e TAB2 come indicato dai segni + e-. I risultati sono rappresentati come variazione dell'attività luciferasica rispetto a quella misurata in cellule transfettate con pHT2. I valori mostrati sono il risultato di almeno tre esperimenti indipendenti. E' riportata la deviazione standard. \* Denota i campioni statisticamente significativi valutati secondo il test t di Student ( $p < 0,05$ ).

A conferma di questa specificità d'azione, i risultati di transattivazione della via NF- $\kappa$ B in presenza di IKK $\epsilon$  non mostrano aumenti significativi né diversità tra Tax-1 e Tax-2. Infatti, la co-espressione della chinasi IKK $\epsilon$  e delle proteine virali non ha effetti significativi sul *pathway* NF- $\kappa$ B rispetto a quando Tax-1 e Tax-2 sono espresse in assenza di IKK $\epsilon$  ( $p > 0,05$ ) (Figura 23).



**Figura 23: Attività luciferasica indotta dalle proteine Tax in cooperazione con IKK $\epsilon$  sulla via NF- $\kappa$ B.** Cellule 293T transfettate con pHT2, Tax-1, Tax-2 e IKK $\epsilon$ . I risultati sono rappresentati come variazione dell'attività luciferasica rispetto a quella misurata in cellule transfettate con pHT2. + e - indicano la presenza o assenza del vettore nelle cellule transfettate. I valori mostrati sono il risultato di almeno tre esperimenti indipendenti. E' riportata la deviazione standard. \* Denota i campioni statisticamente significativi valutati secondo il test t di Student ( $p < 0,05$ ).

In conclusione i risultati dell'attività transattivante delle proteine Tax, hanno messo in evidenza che il fattore di trascrizione p65 e la proteina regolatrice della via di segnalazione TAB2 sono coinvolte nell'attivazione della cascata NF- $\kappa$ B

indotta dalle oncoproteine virali Tax, mentre l'interazione Tax-IKK $\epsilon$  non è sufficiente ad aumentare l'espressione genica tramite la via NF- $\kappa$ B.

Questi esperimenti inoltre evidenziano che l'espressione esogena di p65 e TAB2 promuove la transattivazione da un promotore NF- $\kappa$ B più efficientemente in presenza di Tax-2 che di Tax-1.

## **DISCUSSIONE**

## 8 DISCUSSIONE

La via di segnalazione dei fattori nucleari  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) è coinvolta nelle prime fasi dell'attivazione dell'immunità cellulare. Molti virus hanno evoluto strategie di modulazione della cascata NF- $\kappa$ B per favorire la replicazione virale, la sopravvivenza nella cellula ospite e l'evasione della risposta immunitaria. Per promuovere la replicazione virale o regolare l'apoptosi e i *pathway* che mediano la crescita cellulare, i virus dell'immunodeficienza umana 1 (HIV-1), l'herpesvirus umano 8 e il virus Epstein-Barr utilizzano proteine multifunzionali che dirottano e stimolano la via di trasduzione del segnale NF- $\kappa$ B come parte del loro ciclo infettivo (Hiscott et al., 2006). L'attivazione costitutiva del *pathway* NF- $\kappa$ B può condurre alla trasformazione oncogenica (Karin and Greten, 2005; Lin and Karin, 2007). NF- $\kappa$ B, infatti, regola l'espressione di molti geni, tra cui citochine (IL-1, IL-2, TNF $\alpha$ ), chemochine (IL-8, RANTES) e molecole di adesione (ICAM, VCAM), che promuovono la progressione del ciclo cellulare, e l'invasione tissutale dei tumori tramite transizione epiteliale-mesenchimale, tutte caratteristiche comuni alle cellule tumorali (Ghosh and Hayden, 2008; Karin and Greten, 2005; Lin and Karin, 2007). È stato dimostrato che le subunità NF- $\kappa$ B (c-Rel, RelB, p65) si accumulano nei nuclei di cellule derivate da tumori primari al seno (Clement et al., 2008) e che l'attività oncosoppressiva del fattore di trascrizione p53 può essere inibita mediante un meccanismo che richiede la sua interazione con p65 (Ikeda et al., 2000).

L'oncoproteina virale Tax è in grado di immortalizzare linfociti T umani primari (Grasmann et al., 1989; Ross et al., 1996) e per la trasformazione da essa mediata è essenziale l'attivazione costitutiva della cascata NF- $\kappa$ B (Sun and Yamaoka,



2005). Il meccanismo di induzione è stato ben caratterizzato per Tax-1 ed è stato dimostrato che la sua sola espressione è sufficiente per attivare il *signaling* NF-κB (Lewis et al., 2002). Il meccanismo di modulazione della via di segnalazione NF-κB non è altrettanto noto per la proteina Tax-2, la quale ha un potenziale trasformante minore rispetto la sua omologa di tipo 1. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che le proteine Tax contribuiscano alla diversità nelle patogenesi di HTLV-1 e HTLV-2. Il confronto delle abilità di Tax-1 e Tax-2 nel riconoscere i fattori del *pathway* NF-κB può, quindi, permettere una accurata comprensione delle proprietà patogenetiche delle proteine virali Tax.

In questo lavoro, si identifica per la prima volta, tramite esperimenti *in vitro* GST-*pull down* e di co-immunoprecipitazione in cellule umane 293T, l'associazione tra Tax-2B e il fattore di trascrizione p65/RelA. Mediante saggi di luciferasi, si dimostra che la co-espressione di p65 e Tax-2B cooperativamente attiva l'espressione genica da un promotore NF-κB. La rilevanza della specifica interazione con p65 è stata precedentemente riportata per Tax-1. E' stato infatti dimostrato che la co-espressione di Tax-1 e p65, in cellule transfettate, aumenta significativamente la trascrizione da un promotore con siti di legame per NF-κB (Suzuki et al., 1994; Azran et al, 2005). Inoltre, Tax-1 co-localizza con p65 e p300 in specifiche strutture nucleari coinvolte nella regolazione della trascrizione definite corpi nucleari (Nasr et al., 2006; Lamsoul et al., 2005; Bex et al., 1997). La subunità p65 è necessaria per l'inibizione, mediata da Tax-1, delle funzioni del fattore di trascrizione p53 (Pise-Masison et al., 2000); è stato dimostrato infatti che in cellule trasformate da HTLV-1, viene indotta l'associazione tra p53 e il dominio C-terminale di p65, e conseguente inibizione dell'attività trascrizionale di

p53 (Jeong et al., 2004). Recentemente, un lavoro parallelo di questo laboratorio ha dimostrato che Tax-2B induce l'accumulo della subunità NF- $\kappa$ B p65 in strutture nucleari riconoscibili al microscopio con distribuzione simile a quanto osservato per Tax-1 (Turci et al., 2009). Sommati a questo, i risultati riportati nel lavoro di questa tesi portano a concludere che il coinvolgimento del fattore p65 è una caratteristica comune nella deregolazione della via NF- $\kappa$ B causata dalle proteine Tax.

Dati presenti in letteratura suggeriscono il coinvolgimento delle modificazioni post-traduzionali delle proteine Tax nel riconoscimento di fattori cellulari della via di segnalazione NF- $\kappa$ B, tuttavia, i saggi di co-immunoprecipitazione da noi condotti, utilizzando mutanti di Tax-1 che presentano un *pattern* alterato di sumoilazione, ubiquitinazione, acetilazione e fosforilazione, tendono ad escludere un contributo di queste modificazioni nell'interazione con p65/RelA. Questi dati sono in parte supportati dalla recente dimostrazione della co-precipitazione con l'acetiltransferasi p300 dei mutanti puntiformi Tax-1 R4-6K e Tax-1 R7-8K (Lodewick et al., 2009). Infatti, le proteine Tax-1, p300 e p65 colocalizzano nel nucleo (Bex et al., 1997; Lamsoul et al., 2005). E' possibile che questi fattori nel nucleo formino un complesso stabile la cui associazione non richiede modifiche post-traduzionali di Tax-1. La mancata capacità dei mutanti Tax-1 difettivi nell'ubiquitinazione e/o sumoilazione di formare i corpi nucleari può essere dovuta alla loro incapacità di riconoscere il fattore IKK $\gamma$ , il quale, nel nucleo, colocalizza con p65 e Tax-1 (Lamsoul et al., 2005). Inoltre i dati di associazione tra il mutante M22 (T130A/L131S) e i fattori p65/RelA (prodotto in questa ricerca) e

p52 (Beraud et al., 1994) escludono un ruolo del *leucin zipper domain* (Jin et al., 1999; Xiao et al., 2000) di Tax-1 nel riconoscere le subunità NF- $\kappa$ B.

Il secondo fattore cellulare della via NF- $\kappa$ B studiato per il suo eventuale ruolo nella deregolazione di NF- $\kappa$ B mediata da Tax-2, è la proteina cellulare TAB2, che attiva la cascata a monte (Takaesu et al., 2000) e per la quale è stato dimostrato un coinvolgimento nella modulazione di NF- $\kappa$ B indotta da Tax-1 (Yu et al., 2008). I risultati qui riportati dimostrano che Tax-2B, come Tax-1, riconosce TAB2 nel dominio N-terminale e che l'abilità di Tax-2B di indurre la cascata NF- $\kappa$ B è cooperativamente aumentata dall'espressione di TAB2. Il dominio C-terminale di TAB2 è necessario e sufficiente per interagire con TAK1 e TRAF6; tuttavia è necessario il dominio N-terminale per consentire l'associazione di TAB2, TAK1, TRAF6 che attivi il complesso IKK (Suzuki et al., 2000). E' stato inoltre recentemente dimostrato che la contemporanea over-espressione di Tax-1 e TAB2 aumenta l'attività chinasi di TAK1 (Yu et al., 2008). E' possibile che la proteina Tax-1, tramite associazione con il dominio N-terminale di TAB2, promuova la formazione del complesso TAB2, TAK1 e TRAF6 e attivazione della chinasi TAK1. In un modo simile a Tax-1, l'interazione tra Tax-2B e TAB2 potrebbe essere necessaria per l'efficiente induzione dell'attività di TAK1. I mutanti post-traduzionali di Tax-1 analizzati possiedono ancora la capacità di riconoscere il fattore TAB2; tuttavia rimane da stabilire se le modifiche post-traduzionali di Tax-1 possano influire sull'effetto sinergico di Tax-1 e TAB2 osservato sulla chinasi TAK1. Le proteine Tax e TAB2 sono localizzate e attive sia nel nucleo che nel citoplasma, ed è ipotizzabile che l'interazione tra le proteine virali e il fattore cellulare possa avvenire in entrambi i compartimenti e influire sull'attività

di TAB2 sia nucleare che citoplasmatica. Successivi studi di co-localizzazione tra TAB2 e Tax-2 o Tax-1 contribuiranno a chiarire questo punto.

Da questi studi si può concludere che Tax-2B, come Tax-1, attiva costitutivamente il *signaling* NF- $\kappa$ B, associando con proteine cellulari coinvolte in questo *pathway* che agiscono sulla cascata della via canonica a differenti livelli, dato che il fattore di trascrizione p65/RelA e la proteina adattatrice TAB2 sono coinvolte principalmente nella via NF- $\kappa$ B canonica.

Lo studio dell'interazione delle proteine Tax con fattori coinvolti nella cascata NF- $\kappa$ B ha permesso inoltre di individuare una nuova interazione tra Tax-1 e Tax-2B e il fattore IKK $\epsilon$ , una chinasi che media la fosforilazione inducibile di p65/RelA e dell'inibitore citoplasmatico I $\kappa$ B $\alpha$  (Shimada et al., 1999; Peters et al., 2001; Nomura et al., 2000). Il significato funzionale di questa associazione, sebbene non ancora studiato, potrebbe essere che la chinasi IKK $\epsilon$  partecipi nella deregolazione della via NF- $\kappa$ B indotta da Tax. Le proteine Tax attivano NF- $\kappa$ B mediante un meccanismo che coinvolge la fosforilazione dipendente da segnale degli inibitori I $\kappa$ B e della subunità p65 (Sun and Yamaoka, 2005). E' stato, infatti, riportato che Tax-1 associa e attiva le chinasi IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  (Chu et al., 1998) e che, mediante legame con IKK $\alpha$ , promuove la fosforilazione di p65 e aumenta il potenziale trascrizionale dei dimeri NF- $\kappa$ B (O'Mahony et al., 2004). Dato che IKK $\epsilon$  è in grado di fosforilare gli inibitori I $\kappa$ B (Peters et al., 2000) e la subunità p65 sui residui Ser<sup>468</sup> e Ser<sup>536</sup> (Mattioli et al., 2006), l'associazione tra le proteine Tax e IKK $\epsilon$  potrebbe essere richiesta per un'efficiente induzione dell'attività chinasi di IKK $\epsilon$  e promozione della fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  e/o p65 favorendo

l'espressione genica. Successivi studi di fosforilazione di p65 e di I $\kappa$ B $\alpha$  contribuiranno a verificare questa ipotesi. Come mostrato per p65/RelA e TAB2, le modifiche post-traduzionali di Tax-1 non influenzano la capacità di legame con questo fattore. L'assenza di induzione della trascrizione negli esperimenti di luciferasi descritti in questa tesi, indica che l'interazione Tax-IKK $\epsilon$  non è sufficiente ad aumentare l'espressione genica tramite la via NF- $\kappa$ B. Dato il coinvolgimento di IKK $\epsilon$  in altri *pathway*, come quello dei fattori di risposta all'interferone (IRF), l'interazione Tax-IKK $\epsilon$  potrebbe essere importante per la regolazione genica in altre vie di segnalazione. Questi dati supportano l'ipotesi che le differenze in patogenicità tra HTLV-1 e HTLV-2 siano parzialmente da attribuire alle diverse abilità delle proteine Tax di attivare il *signaling* NF- $\kappa$ B non-canonico più che alla via di segnalazione canonica (Higuchi et al., 2007).

Il confronto tra Tax-1 e Tax-2B nella capacità di attivare l'espressione genica via NF- $\kappa$ B ha evidenziato un dato inaspettato rappresentato dal risultato che la sovraespressione di specifici fattori della cascata NF- $\kappa$ B, quali p65 e TAB2, consente a Tax-2B di transattivare un promotore NF- $\kappa$ B più efficientemente di Tax-1. La diversità funzionale tra le due proteine virali osservata nei saggi di transattivazione potrebbe essere spiegata, anche in questo caso almeno in parte, dal fatto che Tax-1, a differenza di Tax-2, interagisce con il fattore coinvolto nella cascata NF- $\kappa$ B non-canonica p100, inducendone il processamento nella subunità p52 che trasloca nel nucleo e dimerizza con i fattori NF- $\kappa$ B (Higuchi et al., 2007). Gli omodimeri di p52 sono trascrizionalmente inattivi e possono reprimere la trascrizione genica competendo con i dimeri p50/p65 per i medesimi siti  $\kappa$ B (Dejardin et al., 2006). In virtù della sua associazione con p100, Tax-1 potrebbe

aumentare la formazione di omodimeri di p52 in maniera più significativa di Tax-2 con il risultato di una minore attivazione del *pathway* NF- $\kappa$ B rispetto alle cellule transfettate per Tax-2. Ulteriori studi sulla regolazione dell'espressione delle proteine Tax e delle loro interazioni con fattori cellulari specificamente coinvolti nella via non canonica di trasduzione del segnale NF- $\kappa$ B potranno fornire informazioni utili alla comprensione della patogenesi di HTLV.

## **BIBLIOGRAFIA**

## 9 BIBLIOGRAFIA

1. Albrecht B, Lairmore MD: **Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002, **66**:396-406, table of contents.
2. Alefantis T, Barmak K, Harhaj EW, Grant C, Wigdahl B: **Characterization of a Nuclear Export Signal within the Human T Cell Leukemia Virus Type I Transactivator Protein Tax.** *The Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**:21814-21822.
3. Alefantis T, Jain P, Ahuja J, Mostoller K, Wigdahl B: **HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling, interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease.** *J Biomed Sci.* 2005, **12**:961-74.
4. Araujo A, Hall WW: **Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease.** *Ann Neurol.* 2004, **56**:10-9.
5. Arnold J, Zimmerman B, Li M, Lairmore MD, Green PL: **Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation.** *Blood.* 2008, **112**:3788-97.
6. Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M: **Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity.** *Retrovirology* 2004, **1**:20.
7. Azran I, Jeang KT, Aboud M: **High levels of cytoplasmic HTLV-1 Tax mutant proteins retain a Tax-NF-kappaB-CBP ternary complex in the cytoplasm.** *Oncogene.* 2005, **24**:4521-30.
8. Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG: **Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein.** *Cell* 2002, **110**:55-67.



9. Bex F, McDowall A, Burny A, Gaynor R: **The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins.** *J Virol.* 1997, **71**:3484-97.
10. Bex F, Murphy K, Wattiez R, Burny A, Gaynor RB: **Phosphorylation of the human T-cell leukemia virus type 1 transactivator tax on adjacent serine residues is critical for tax activation.** *J Virol.* 1999, **73**:738-45.
11. Béraud C, Sun SC, Ganchi P, Ballard DW, Greene WC: **Human T-cell leukemia virus type I Tax associates with and is negatively regulated by the NF-kappa B2 p100 gene product: implications for viral latency.** *Mol Cell Biol.* 1994, **14**:1374-82.
12. Brady J, Jeang KT, Duvall J, Khoury G: **Identification of p40x-Responsive Regulatory Sequences within the Human T-Cell Leukaemia Virus Type I Long Terminal Repeat.** *Journal of Virology* 1987, **61**: 2175-2181.
13. Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L: **The HTLV-1 Tax interactome.** *Retrovirology* 2008, **5**:76.
14. Butel JS: **Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease.** *Carcinogenesis.* 2000, **21**:405-26.
15. Caron C, Rousset R, Béraud C, Moncollin V, Egly JM, Jalinot P: **Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP.** *EMBO J.* 1993, **12**:4269-78.
16. Casoli C, Cimarelli A, Bertazzoni, U: **Cellular Tropism of Human T-Cell Leukemia Virus Type II Is Enlarged to B Lymphocytes in Patients with High Proviral Load.** *Virology* 1995, **206**:1126-1128.
17. Chiari E, Lamsoul I, Lodewick J, Chopin C, Bex F, Pique C: **Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding.** *J Virol.* 2004, **78**:11823-32.

18. Cho WK, Zhou M, Jang MK, Huang K, Jeong SJ, Ozato K, Brady JN: **Modulation of the Brd4/P-TEFb interaction by the human T-lymphotropic virus type 1 tax protein.** *J Virol.* 2007, **81**:11179-86.
19. Chu ZL, Shin YA, Yang JM, DiDonato JA, Ballard DW: **IKKgamma mediates the interaction of cellular IkappaB kinases with the tax transforming protein of human T cell leukemia virus type 1.** *J Biol Chem.* 1999, **274**:15297-300.
20. Ciminale V, Zotti L, D'Agostino DM, Ferro T, Casareto L, Franchini G, Bernardi P, Chieco-Bianchi L: **Mitochondrial targeting of the p13II protein coded by the x-II ORF of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I).** *Oncogene* 1999, **18**:4505-14.
21. Clemens KE, Piras G, Radonovich MF, Choi KS, Duvall JF, DeJong J, Roeder R, Brady JN: **Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA.** *Mol Cell Biol.* 1996, **16**:4656-64.
22. Clément JF, Meloche S, Servant MJ: **The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis.** *Cell Res.* 2008, **18**:889-99.
23. D'Agostino DM, Silic-Benussi M, Hilaragi H, Lairmore MD, Ciminale V: **The human T-cell leukemia virus type 1 p13II protein: effects on mitochondrial function and cell growth.** *Cell Death Differ.* **2005**, **12 Suppl 1**:905-15.
24. Dejardin E: **The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development.** *Biochem Pharmacol.* 2006, **72**:1161-79.
25. Durkin SS, Ward MD, Fryrear KA, Semmes OJ: **Site-specific phosphorylation differentiates active from inactive forms of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein.** *J Biol Chem.* 2006, **281**:31705-12.

26. Ego T, Ariumi Y, Shimotohno K: **The interaction of HTLV-1 Tax with HDAC1 negatively regulates the viral gene expression.** *Oncogene*. 2002, **21**:7241-6.
27. Endo K, Hirata A, Iwai K, Sakurai M, Fukushi M, Oie M, Higuchi M, Hall WW, Gejyo F, Fujii M: **Human T-cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax protein transforms a rat fibroblast cell line but less efficiently than HTLV-1 Tax.** *J Virol*. 2002, **76**:2648-53.
28. Feuer G, Green PL: **Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2.** *Oncogene* 2005, **24**:5996-6004.
29. Franklin AA, Kubik MF, Uittenbogaard MN, Brauweiler A, Utaisincharoen P, Matthews MA, Dynan WS, Hoeffler JP, Nyborg JK: **Transactivation by the human T-cell leukemia virus Tax protein is mediated through enhanced binding of activating transcription factor-2 (ATF-2) ATF-2 response and cAMP element-binding protein (CREB).** *J Biol Chem*. 1993, **268**:21225-31.
30. Ghosh S, Hayden MS: **New regulators of NF-kappaB in inflammation.** *Nat Rev Immunol*. 2008, **8**:837-48.
31. Goren I, Semmes OJ, Jeang KT, Moelling K: **The amino terminus of Tax is required for interaction with the cyclic AMP response element binding protein.** *J Virol*. 1995, **69**:5806-11.
32. Grassmann R, Dengler C, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, McGuire K, Dochelar MC, Sodroski JG, Haseltine WA: **Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukaemia virus type I X-region genes transduced by a *Herpesvirus saimiri* vector.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, **86**:3351-3355.
33. Grassmann R, Aboud M, Jeang KT: **Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax.** *Oncogene* 2005, **24**:5976-85.

34. Hall WW, Fujii M: **Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection.** *Oncogene*. 2005, **24**:5965-75.
35. Haller K, Wu Y, Derow E, Schmitt I, Jeang KT, Grassmann R: **Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein.** *Mol Cell Biol*. 2002, **22**:3327-38.
36. Harhaj EW, Sun SC: **IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein.** *J Biol Chem*. 1999, **274**:22911-4.
37. Harrod R, Kuo YL, Tang Y, Yao Y, Vassilev A, Nakatani Y, Giam CZ: **p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex.** *J Biol Chem*. 2000, **275**:11852-7.
38. Higuchi M, Tsubata C, Kondo R, Yoshida S, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Mahieux R, Matsuoka M, Fujii M: **Cooperation of NF-kappaB2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2-independent growth transformation of a T-cell line.** *J Virol*. 2007, **81**:11900-7.
39. Hiscott J, Nguyen TL, Arguello M, Nakhaei P, Paz S: **Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses.** *Oncogene*. 2006, **25**:6844-67.
40. Hoffman PM, Dhib-Jalbut S, Mikovits JA, Robbins DS, Wolf AL, Bergey GK, Lohrey NC, Weislow OS, Ruscetti FW: **Human T-cell leukaemia virus type I infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, **89**:11784-11788.

41. Hong S, Wang LC, Gao X, Kuo YL, Liu B, Merling R, Kung HJ, Shih HM, Giam CZ: **Heptad repeats regulate protein phosphatase 2a recruitment to I-kappaB kinase gamma/NF-kappaB essential modulator and are targeted by human T-lymphotropic virus type 1 tax.** *J Biol Chem.* 2007, **282**:12119-26.
42. Jeang KT, Boros I, Brady J, Radonovich M, Khoury G: **Characterization of Cellular factors That Interact with the Human T-Cell Leukaemia Virus Type I p40<sup>x</sup>-Responsive 21-Base-Pair sequence.** *Journal of Virology* 1988, **62**: 4499-4509.
43. Jeang KT, Giam CZ, Majone F, Aboud M: **Life, Death and Tax: role of HTLV-I oncoprotein in genetic instability and cellular transformation.** *J. Biol. Chem.* 2004, **279**:31991-31994.
44. Jeong SJ, Radonovich M, Brady JN, Pise-Masison CA: **HTLV-I Tax induces a novel interaction between p65/RelA and p53 that results in inhibition of p53 transcriptional activity.** *Blood* 2004, **104**:1490-7.
45. Jeong SJ, Lu H, Cho WK, Park HU, Pise-Masison C, Brady JN: **Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 enhances transcriptional activity of the human T-cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat through direct interaction with Tax.** *J Virol.* 2006, **80**:10036-44.
46. Jin DY, Giordano V, Kibler KV, Nakano H, Jeang KT: **Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma.** *J Biol Chem.* 1999, **274**:17402-5.
47. Joumo C, Filipe J, About F, Afonso PV, Flynn D, Gessain A, Vidalain PO, Weil R, Mahieux R: **HTLV-1 Tax Protein Interacts with Cellular Optineurin: Functional Implications for the NF-κB pathway Activation.** Comunicazione orale ad HERN 2008.

48. Kamoi K, Yamamoto K, Misawa A, Miyake A, Ishida T, Tanaka Y, Mochizuki M, Watanabe T: **SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR.** *Retrovirology*. 2006, **3**:5.
49. Karin M, Greten FR: **NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression.** *Nat Rev Immunol*. 2005, **5**:749-59.
50. Kashanchi F, Brady JN: **Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1.** *Oncogene* 2005, **24**:5938-51.
51. Kfoury Y, Nasr R, Favre-Bonvin A, El-Sabban M, Renault N, Giron ML, Setterblad N, Hajj HE, Chiari E, Mikati AG, Hermine O, Saib A, de Thé H, Pique C, Bazarbachi A: **Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome.** *Oncogene*. 2008, **27**:1665-76.
52. Kishida S, Sanjo H, Akira S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J: **TAK1-binding protein 2 facilitates ubiquitination of TRAF6 and assembly of TRAF6 with IKK in the IL-1 signaling pathway.** *Genes Cells*. 2005, **10**:447-54.
53. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira JI, Iwamasa T, Goto I, Yamamoto N: **In Vivo Infection of Human T-Cell Leukemia Virus Type I in Non-T Cells.** *Virology* 1993, **196**:25-33.
54. Ikeda A, Sun X, Li Y, Zhang Y, Eckner R, Doi TS, Takahashi T, Obata Y, Yoshioka K, Yamamoto K: **p300/CBP-dependent and -independent transcriptional interference between NF-kappaB RelA and p53.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, **272**:375-9.
55. Lamsoul I, Lodewick J, Lebrun S, Brasseur R, Burny A, Gaynor RB, Bex F: **Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein.** *Mol Cell Biol*. 2005, **25**:10391-406.
56. Lewis MJ, Novoa P, Ishak R, Ishak M, Salemi M, Vandamme AM, Kaplan MH, Hall WW: **Isolation, Cloning, and Complete Nucleotide Sequence of**

- a Phenotypically Distinct Brazilian Isolate of Human T-Lymphotropic Virus Type II (HTLV-II). *Virology* 2000, 271:142-154.**
57. Lewis MJ, Sheehy N, Salemi M, VanDamme AM, Hall WW: **Comparison of CREB- and NF-kappaB-mediated transactivation by human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) and type I (HTLV-I) tax proteins. *Virology*. 2002, 295:182-9.**
58. Lin WW, Karin M: **A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007, 117:1175-83.**
59. Lodewick J, Lamsoul I, Polania A, Lebrun S, Burny A, Ratner L, Bex F: **Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF-kappaB pathway. *Virology*. 2009, doi:10.1016/j.virol.2008.12.043**
60. Ma Q, Zhou L, Shi H, Huo K: **NUMBL interacts with TAB2 and inhibits TNFalpha and IL-1beta-induced NF-kappaB activation. *Cell Signal*. 2008, 20:1044-51.**
61. Matsuoka M, Jeang KT: **Human T-cell leukemia virus type I at age 25: a progress report. *Cancer Res*. 2005, 65:4467-70.**
62. Mahieux R, Pise-Masison CA, Lambert PF, Nicot C, De Marchis L, Gessain A, Green P, Hall W, Brady JN: **Differences in the ability of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax to inhibit p53 function. *J Virol*. 2000, 74:6866-74.**
63. Mattioli I, Geng H, Sebald A, Hodel M, Bucher C, Kracht M, Schmitz ML: **Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *J Biol Chem*. 2006, 281:6175-83.**
64. Meertens L, Chevalier S, Weil R, Gessain A, Mahieux R: **A 10-Amino Acid Domain within Human T-cell Leukemia Virus Type 1 and Type 2 Tax**

- Protein Sequences Is Responsible for Their Divergent Subcellular Distribution.** *J Biol Chem.* 2004, **279**:43307-43320.
65. Meertens L, Pise-Masison C, Quere N, Brady J, Gessain A, Mahieux R: **Utilization of the CBP but not the p300 co-activator by human T-lymphotropic virus type-2 Tax for p53 inhibition.** *Oncogene.* 2004, **23**:5447-58.
66. Mesnard JM, Barbeau B, Devaux C : **HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia.** *Blood* 2006, **108**:3979-82.
67. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagat K, Hinuma Y: **Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells.** *Nature* 1981, **294**:770-771.
68. Murakami T, Hirai H, Suzuki T, Fujisawa JI, Yoshida M: **HTLV-1 Tax Enhances NF- $\kappa$ B2 Expression and Binds to the Products p52 and p100, but Does Not Suppress the Inhibitory Function of p100.** *Virology* 1995, **206**:1066-1074.
69. Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, Yazbeck V, Hermine O, de Thé H, Pique C, Bazarbachi A: **Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation.** *Blood* 2006, **107**:4021-9.
70. Nicot C, Harrod RL, Ciminale V, Franchini G: **Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 nonstructural genes and their functions.** *Oncogene* 2005, **24**:6026-34.
71. Nomura F, Kawai T, Nakanishi K, Akira S : **NF-kappaB activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation.** *Genes Cells.* 2000, **5**:191-202.
72. O'Mahony AM, Montano M, Van Beneden K, Chen LF, Greene WC: **Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax induction of biologically**



- Active NF-kappaB requires IkappaB kinase-1-mediated phosphorylation of RelA/p65.** *J Biol Chem.* 2004, **279**:18137-45.
73. Orlandi C, Bozzo L, Pilotti E, Casoli C, Accolla RS, Tosi G: **Insight into the molecular mechanism of CIITA-mediated inhibition of HTLV-1 and HTLV-2 transactivators.** Comunicazione orale ad HERN 2008.
74. Pardi D, Kaplan JE, Coligan JE, Folks TM, Lal RB: **Identification and Characterization of an Extended Tax Protein in Human T-Cell Lymphotropic Virus type II Subtype b Isolates.** *Journal of Virology* 1993, **67**:7663-7667.
75. Peters RT, Liao SM, Maniatis T: **IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex.** *Mol Cell.* 2000, **5**:513-22.
76. Peters RT, Maniatis T: **A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases.** *Biochim Biophys Acta.* 2001, **1471**:M57-62
77. Pise-Masison CA, Mahieux R, Jiang H, Ashcroft M, Radonovich M, Duvall J, Guillerme C, Brady JN: **Inactivation of p53 by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax requires activation of the NF-kappaB pathway and is dependent on p53 phosphorylation.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:3377-86.
78. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL: **Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases.** *Oncogene* 2005, **24**:6058-68.
79. Robek MD, Ratner L: **Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone.** *J Virol.* 1999, **73**:4856-65.
80. Ross TM, Pettiford SM, Green PL: **The tax Gene of human T-cell Leukemia Virus Type 2 Is Essential for Transformation of Human T Lymphocytes.** *Journal of Virology* 1996, **70**:5194-5202.

81. Ross TM, Minella AC, Fang ZY, Pettiford SM, Green PL: **Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type 2 Tax.** *J Virol.* 1997, **71**:8912-7.
82. Ross TM, Narayan M, Fang ZY, Minella AC, Green PL: **Human T-cell leukemia virus type 2 tax mutants that selectively abrogate NFkappaB or CREB/ATF activation fail to transform primary human T cells.** *J Virol.* 2000, **74**:2655-62.
83. Rousset R, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P: **Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome.** *Nature.* 1996, **381**:328-31.
84. Rousset R, Fabre S, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P: **The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins.** *Oncogene.* 1998, **16**:643-54.
85. Semmes OJ, Jeang KT: **HTLV-I Tax Is a Zinc-Binding Protein : Role of Zinc in Tax Structures and Function.** *Virology* 1992, **188**:754-764.
86. Semmes OJ, Jeang KT: **Definition of a minimal activation domain in human T-cell leukemia virus type I Tax.** *J Virol.* 1995, **69**:1827-33.
87. Semmes OJ, Majone F, Cantemir C, Turchetto L, Hjelle B, Jeang KT : **HTLV-I and HTLV-II Tax: differences in induction of micronuclei in cells and transcriptional activation of viral LTRs.** *Virology.* 1996, **217**:373-9.
88. Shembade N, Harhaj NS, Parvatiyar K, Copeland NG, Jenkins NA, Matesic LE, Harhaj EW. **The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20.** *Nat Immunol.* 2008, **9**:254-62.
89. Shimada T, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Inoue J, Tatsumi Y, Kanamaru A, Akira S: **IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases.** *Int Immunol.* 1999, **11**:1357-62.

90. Smith MR, Greene WC: **Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes.** *Genes Dev.* 1990, **4**:1875-85. Erratum in: *Genes Dev* 1991, **5**:150.
91. Smith M R, Greene WC: **Characterization of a Novel Nuclear Localization Signal in the HTLV-I Tax Transactivator Protein.** *Virology* 1992, **187**:316-320.
92. Sun SC, Yamaoka S: **Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation.** *Oncogene* 2005, **24**:5952-64.
93. Suzuki T, Hirai H, Fujisawa JI, Fujita T, Yoshida M: **A trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 binds to NF-kB p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kB site and CarG box.** *Oncogene* 1993, **8**:2391-2397.
94. Suzuki T, Hirai H, Yoshida M: Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kB p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kB binding site and activates transcription. *Oncogene* 1994, **9**:3099-3105.
95. Suzuki T, Uchida-Toita M, Andoh T, Yoshida M: **HTLV-1 tax oncoprotein binds to DNA topoisomerase I and inhibits its catalytic activity.** *Virology.* 2000, **270**:291-8.
96. Suzuki S, Singhirunnusorn P, Mori A, Yamaoka S, Kitajima I, Saiki I, Sakurai H: **Constitutive activation of TAK1 by HTLV-1 tax-dependent overexpression of TAB2 induces activation of JNK-ATF2 but not IKK-NF-kappaB.** *J Biol Chem.* 2007, **282**:25177-81.
97. Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K: **TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway.** *Mol Cell.* 2000, **5**:649-58.
98. Tripp A, Banerjee P, Sieburg M, Planelles V, Li F, Feuer G: **Induction of cell cycle arrest by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax in**

- hematopoietic progenitor (CD34+) cells: modulation of p21cip1/waf1 and p27kip1 expression.** *J Virol.* 2005, **79**:14069-78.
99. Turci M, Romanelli MG, Lorenzi P, Righi P, Bertazzoni U: **Localization of human T-cell lymphotropic virus type II Tax protein is dependent upon a nuclear localization determinant in the N-terminal region.** *Gene* 2006; **365**:119-24.
100. Turci M, Lodewick J, Righi P, Polania A, Romanelli MG, Bex F, Bertazzoni U: HTLV-2B Tax oncoprotein is modified by ubiquitination and sumoylation and displays intracellular localization similar to its homologue HTLV-1 Tax. *Virology* 2009, doi:10.1016/j.virol.2009.01.003
101. Twizere JC, Kruys V, Lefèbvre L, Vanderplasschen A, Collete D, Debacq C, Lai WS, Jauniaux JC, Bernstein LR, Semmes OJ, Burny A, Blackshear PJ, Kettmann R, Willems L: **Interaction of retroviral Tax oncoproteins with tristetraprolin and regulation of tumor necrosis factor-alpha expression.** *J Natl Cancer Inst.* 2003, **95**:1846-59.
102. Twizere JC, Springael JY, Boxus M, Burny A, Dequiedt F, Dewulf JF, Duchateau J, Portetelle D, Urbain P, Van Lint C, Green PL, Mahieux R, Parmentier M, Willems L, Kettmann R: **Human T-cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein regulates G-protein signaling.** *Blood.* 2007, **109**:1051-60.
103. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A: **Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation.** *Trends Biochem Sci.* 2005, **30**:43-52.
104. Vrieling H, Reesink HW: **HTLV-I/II prevalence in different geographic locations.** *Transfus Med Rev.* 2004, **18**:46-57.
105. Weiss, R A: **Retroviruses and cancer.** *Current Science* 2001; **81**:528-534.

106. Wu K, Bottazzi ME, de la Fuente C, Deng L, Gitlin SD, Maddukuri A, Dadgar S, Li H, Vertes A, Pumfery A, Kashanchi F: **Protein profile of tax-associated complexes.** *J Biol Chem.* 2004, **279**:495-508.
107. Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. **Domain-specific interaction with the I kappa B kinase (IKK)regulatory subunit IKK gamma is an essential step in tax-mediated activation of IKK.** *J Biol Chem.* 2000, **275**:34060-7.
108. Xiao G, Rabson AB, Young W, Qing G, Qu Z: **Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006, **17**:281-93.
109. Yamamoto N, Okada M, Koyanagi Y, Kannagi M, Hinuma Y: **Transformation of Human Leukocytes by cocultivation with an Adult T Cell Leukemia Virus Producer Cell Line.** *Science* 1982, **217**:737-739.
110. Yin MJ, Gaynor RB: **HTLV-1 21 bp repeat sequences facilitate stable association between Tax and CREB to increase CREB binding affinity.** *J Mol Biol.* 1996, **264**:20-31.
111. Yin MJ, Christerson LB, Yamamoto Y, Kwak YT, Xu S, Mercurio F, Barbosa M, Cobb MH, Gaynor RB: **HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkappaB kinase activity and NF-kappaB activation.** *Cell.* 1998, **93**:875-84.
112. Yu Q, Minoda Y, Yoshida R, Yoshida H, Iha H, Kobayashi T, Yoshimura A, Takaesu G: **HTLV-1 Tax-mediated TAK1 activation involves TAB2 adapter protein.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, **365**:189-94.

## **ABBREVIAZIONI**

## 10 ABBREVIAZIONI

AMP:	Adenosina monofosfato
ATLL:	Leucemia/linfoma delle cellule T dell'adulto
ATP:	Adenosina trifosfato
CBP:	CREB binding protein
CDK:	Chinasi dipendenti da ciclina
CIITA:	Complesso maggiore di istocompatibilità di classi II
N-CoR:	Co-repressore nucleare recettoriale
CREB/ATF:	CRE binding/activating transcription factor
CUE:	Coupling ubiquitin conjugation to ER degradation
D-MEM:	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DNA	Acido desossiribonucleico
EBV:	Virus Epstein Barr
FCS:	Siero fetale bovino
GST:	Glutathione S-trasferasi
HBZ:	HTLV-1 basic leucine zipper
HDAC:	Istone deacetilasi
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
HTLV:	Human T-cell Lymphotropic Virus
ICAM:	Molecole di Adesione Intercellulare
IDU:	Intravenous drug users
I $\kappa$ B:	InibitorikB
IKK:	I $\kappa$ B kinase
IL:	Interleuchina
IP:	Immunoprecipitati
IPTG:	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
IRF:	fattori di risposta all'interferone
JAK:	Chinasi della famiglia Janus
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
LTR:	Long terminal repeats
LZ:	Leucine zipper
MEKK1:	MAPK/ERK kinase kinase 1

MHC-I:	Complesso maggiore di istocompatibilità di classe I
NF- $\kappa$ B:	Fattori nucleari $\kappa$ B
NF-Y:	Fattore di trascrizione Y
NEMO/IKK $\gamma$ :	NF- $\kappa$ B essential modulator/IKK $\gamma$
NEM:	N-Ethyl Maleimide
NES:	Sequenza di esporto nucleare
NLD:	Determinante di localizzazione nucleare
NLS:	Sequenza di localizzazione nucleare
NUMBL:	Numb homolog (Drosophila)-like
RNA:	Acido ribonucleico
ORF:	Open reading frame
PI3K:	Phosphatidylinositol 3-kinase
PBM:	PDZ binding motif
PDZ:	PSD-95/Drosophila discs large/Zona occludens-I
PMSF:	Phenylmethylsulphonyl fluoride
POD:	Perossidasi
RANTES:	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RHD:	Rel homology domain
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
SDS:	Sodio dodecil solfato
SRF:	Fattori di risposta al siero
SWI/SNF:	Switch/Sucrose Non Fermentable
TAB2:	TAK1 activating binding protein 2
TAD:	Transactivation domain
TAK1:	TGF- $\beta$ activating kinase 1
TBK1:	TANK binding kinase 1
TGF $\beta$ :	Transforming growth factor $\beta$
TLR:	Toll like receptor
TNF $\alpha$ :	Fattore di necrosi tumorale $\alpha$
TRAF:	Fattore associato al recettore TNF
TSP/HAM:	Tropical spasticparaparesis/HTLV associated myelopathy



TxRE:	Elementi di risposta a Tax
VCAM:	Vascular cell adhesion molecule-1
WB:	Western blotting